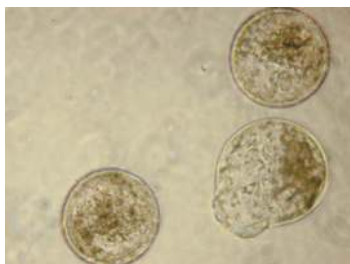


## Chów i hodowla zwierząt gospodarskich na przestrzeni 70 lat - problemy i wyzwania



Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt  
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji  
Instytutu Zootechniki PIB

MONOGRAFIA

Kraków 2020

**Chów i hodowla zwierząt gospodarskich  
na przestrzeni 70 lat – problemy i wyzwania**

**Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt  
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji  
Instytutu Zootechniki PIB**

MONOGRAFIA

**Kraków 2020**

**INSTYTUT ZOOTECHNIKI  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

32-083 Balice, ul. Krakowska 1 tel. 12 3572500 fax 12 422 8065  
www.izoo.krakow.pl facebook.com/IZOO.PIB twitter.com/iz\_pib  
sekretariat@izoo.krakow.pl

---

**Monografia pod redakcją:**

*dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ  
prof. dr hab. Zdzisław Smorąg*

**Recenzenci:**

*prof. dr hab. Adam Okulski  
prof. dr hab. Magdalena Zatoń-Dobrowolska*

**Opracowanie redakcyjne:**

*mgr Danuta Dobrowolska*

**Opracowanie graficzne, projekt okładki  
i skład tekstu:**

*mgr Bogusława Krawiec*

Fot. na okładce:

*archiwum Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji  
oraz Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt IZ PIB*

**ISBN 978-83-7607-329-3**

© Copyright by Instytut Zootechniki PIB

Ark. wyd. 10 Ark. druk. 10,5

Druk: Zespół Wydawnictw i Poligrafii IZ PIB

**GENETYKA I BIOTECHNOLOGIA ROZRODU  
W NOWOCZESNEJ HODOWLI ZWIERZĄT  
– ROZWÓJ METOD BADAWCZYCH  
A NOWE WYZWANIA**

## **Spis treści**

Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt .....	5
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji.....	93

**Zakład Biologii  
Molekularnej Zwierząt**



**Spis treści rozdziału**  
**Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Wstęp .....	9
1. <i>Anna Koseniuk, Dominika Rubiś, Agnieszka Fornal, Angelika Podbielska, Agnieszka Szumiec, Anna Radko:</i> Syntetyczne wprowadzenie do zagadnienia markerów genetycznych wykorzystywanych w kontroli rodowodów zwierząt .....	10
2. <i>Dominika Rubiś, Anna Koseniuk, Agnieszka Szumiec, Grzegorz Smolucha, Agata Piestrzyńska-Kajtoch, Mariusz Kościelny, Anna Radko, Katarzyna Ropka-Molik:</i> Kontrola pochodzenia bydła – ponad 50 lat doświadczenia, przeszłość, terażniejszość i osiągnięcia .....	15
3. <i>Anna Koseniuk, Agnieszka Szumiec, Angelika Podbielska, Dominika Rubiś, Anna Radko:</i> Kontrola pochodzenia owiec – zarys historyczny i współczesność ...	24
4. <i>Anna Koseniuk, Marian Kamyczek, Grzegorz Smolucha, Anna Radko:</i> Pół wieku doświadczenia w kontroli pochodzenia u trzody chlewnej	30
5. <i>Agnieszka Fornal, Katarzyna Kowalska, Agata Piestrzyńska-Kajtoch:</i> Kontrola pochodzenia koni – historia i perspektywy .....	34
6. <i>Angelika Podbielska, Anna Radko:</i> Identyfikacja zwierząt towarzyszących i wolno żyjących .....	39
7. <i>Anna Kozubska-Sobocińska, Katarzyna Kowalska, Wojciech Witariski:</i> Wykorzystanie technik cytomolekularnych w nowoczesnej hodowli zwierząt .....	47
8. <i>Małgorzata Natonek-Wiśniewska, Piotr Krzyścin:</i> Identyfikacja gatunkowa – historia, terażniejszość oraz nowe wyzwania i możliwości .....	53
9. <i>Joanna Warzecha, Magdalena Wojtaszek:</i> Wykorzystanie mikromacierzy w ocenie wartości hodowlanej bydła mlecznego .....	57
10. <i>Agata Piestrzyńska-Kajtoch, Grzegorz Smolucha:</i> Trzęsawka owiec i genotypowanie genu <i>PRNP</i> .....	63



11. <i>Maria Oczkowiec:</i> Nutrigenomika zwierząt gospodarskich – narzędzie do opracowania prozdrowotnych zaleceń u zwierząt i ludzi .....	69
12. <i>Grzegorz Smolucha, Anna Koseniuk, Wojciech Witariski:</i> Proteomika jako narzędzie wspomagające hodowlę .....	75
13. <i>Wojciech Witariski, Przemysław Podstawski, Sebastian Liszka:</i> Hodowle komórkowe w badaniach podstawowych oraz aplikacyjnych .....	82
14. Najważniejsze osiągnięcia, publikacje, patenty i nagrody z ostatnich 10 lat .....	89

## Wstęp

Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt wywodzi się z Zakładu Immunogenetyki, który powstał w strukturze Instytutu Zootechniki PIB w 1964 r. jako pracownia odpowiedzialna za badania grup krwi. W 1977 r. zakres badań poszerzono o analizy cytogenetyczne, a laboratorium kontynuowało funkcjonowanie pod nazwą Zakład Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt. W kolejnych dekadach Zakład dostosowywał prowadzone badania do światowych trendów, wychodząc jednocześnie naprzeciw potrzebom hodowców. Zmieniający się profil badań znajdował odzwierciedlenie w kolejnych nazwach – począwszy od Zakładu Immunogenetyki, poprzez Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, Dział Cytogenetyki Zwierząt, Dział Biologii Molekularnej Zwierząt do Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt, który pod tą nazwą funkcjonuje od końca 2017 r.

W strukturze Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt znajdują się Laboratorium Genomiki oraz Laboratorium Genetyki Molekularnej. Laboratoria wykonują prace badawcze i aplikacyjne oraz badania związane z realizacją programu wieloletniego w zakresie kontroli rodowodów i oceny prawidłowości kariotypów zwierząt hodowlanych oraz genotypowania trzęsawki owiec. Zadaniem Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt jest zastosowanie najnowszych osiągnięć genetyki molekularnej w praktyce hodowlanej, obejmujące m.in.: identyfikację osobniczą i gatunkową zwierząt na poziomie genomu; charakterystykę struktury genetycznej różnych ras zwierząt gospodarskich oraz ocenę zmienności genetycznej populacji; skanowanie genomu w poszukiwaniu markerów SNP cech produkcyjnych i monitorowanie bioróżnorodności populacji; poszukiwanie i identyfikację podłoża chorób genetycznych oraz polimorfizmów w genach warunkujących oporność (wrażliwość) na choroby. Przy zastosowaniu najnowocześniejszych narzędzi biologii molekularnej Zakład prowadzi badania obejmujące genomikę strukturalną i funkcjonalną na poziomie analizy genomu, transkryptomu, miRNAomu, metylomu oraz degradomu oraz identyfikację markerów białkowych charakterystycznych dla cech użytkowych zwierząt hodowlanych.

W 2016 r. po raz pierwszy kompetencje Laboratorium Genetyki Molekularnej do spełnienia normy PN-EN ISO/IEC 17025 zostały potwierdzone przez Polskie Centrum Akredytacji certyfikatem AB1587. Od tego czasu Laboratorium ciągle poszerza zakres metod akredytowanych, bierze udział w badaniach biegłości, prowadząc badania zgodnie ze standardami międzynarodowych towarzystw ISAG (International Society for Animal Genetics) i ICAR (International Committee for Animal Recording), wykonuje usługi badawcze oraz prowadzi działalność szkoleniową i upowszechnieniową.

# 1. Syntetyczne wprowadzenie do zagadnienia markerów genetycznych wykorzystywanych w kontroli rodowodów zwierząt

**Anna Koseniuk, Dominika Rubiś, Agnieszka Fornal,  
Angelika Podbielska, Agnieszka Szumiec, Anna Radko**

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Kontrola rodowodów zwierząt gospodarskich wolno żyjących i towarzyszących jest prowadzona na świecie w oparciu o markery genetyczne. Początkowo, kontrola pochodzenia bydła, owiec, świń i koni była prowadzona z zastosowaniem markerów klasy I, na które składają się układy grup krwi oraz polimorfizm białek krwi i enzymów. Grupy krwi oznaczano z wykorzystaniem reakcji serologicznych. Polegają one na użyciu surowic testowych zawierających przeciwciała skierowane przeciw konkretnej determinancie białkowej znajdującej się na powierzchni erytrocytów (antygen krwinkowy). Analizy polimorfizmu białek i enzymów wykonywano z wykorzystaniem technik elektroforezy w żelu poliakrylamidowym lub skrobiowym. Weryfikacja jakości i specyficzności oraz ujednoczenie nomenklatury reagentów testowych stanowiła o ich uniwersalności i sprawiała, że mogły być wykorzystywane na arenie międzynarodowej. Jakość reagentów testowych pochodzących z różnych laboratoriów na całym świecie, w tym także uzyskiwanych w Instytucie Zootechniki była systematycznie weryfikowana w międzynarodowych testach porównawczych organizowanych przez European Society for Animal Blood Group Research (ESABR) w latach 1966–1972, International Society for Animal Blood Group Research (ISABR) w latach 1974–1988 oraz International Society for Animal Genetics (ISAG) w latach 1990–2004 (ISAG\_History). Aktualne wytyczne dotyczące kontroli pochodzenia zwierząt określone są przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG, ang. *International Society for Animal Genetics*) w celu zapewnienia międzynarodowej standaryzacji badań. Kontrola rodowodów u zwierząt na podstawie polimorficznych antygenów erytrocytarnych nie zawsze dawała możliwość jednoznacznego wskazania pary rodzicielskiej, szczególnie w stadach o podwyższonym współczynniku inbredu (Holm i Bendixen, 1996). Dodatkowym utrudnieniem było uzyskiwanie wysokiej jakości monowalentnych surowic testowych, a także ich standaryzacja. Proces produkcji surowic był długotrwały i kosztochłonny, wymuszony koniecznością prowadzenia szeregu immunizacji (specjalnie do tego celu przeznaczonych zwierząt) krwią o odpowiednim składzie antygenowym. Należy także podkreślić, że identyfikacja antygenów

erytrocytarnych może odbywać się wyłącznie w oparciu o świeżą, nie mrożoną krew pobraną od żyjących zwierząt. Od lat 90. poprzedniego wieku Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG) zalecało stopniowe odchodzenie od badań grup krwi na rzecz analizy mikrosatelitarnych sekwencji DNA.

Markery mikrosatelitarne (STR, ang. *short tandem repeat*) są to sekwencje tandemowe, które zawierają od 10 do 50 powtórzeń motywu o długości od 1 do 6 pz (par zasad). Wysoki stopień ich polimorfizmu, losowe rozmieszczenie w genomie, dziedziczenie zgodnie z prawami Mendla oraz relatywnie mniejszą pracochłonność metody, możliwość automatycznego określania genotypów, wysokie prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica spowodowały, że znalazły one szerokie zastosowanie w badaniach pokrewieństwa.

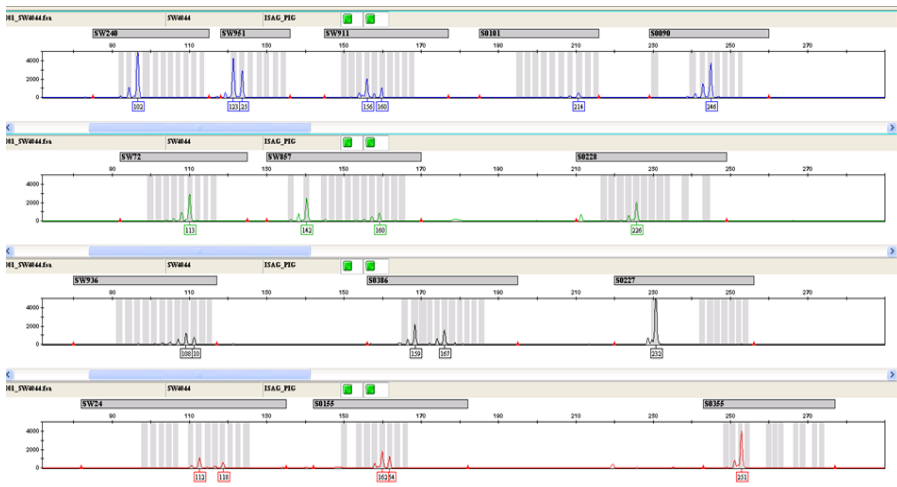
Analiza mikrosatelitarnych sekwencji polega na określeniu różnic w długości powtózonego motywu. Podstawową techniką wykorzystywaną do analizy mikrosatelitarnych sekwencji jest łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*) multiplex. Przy odpowiednio dobranych barwnikach fluoroscencyjnych (fluorofory), które służą do oznakowania starterów oraz zastosowaniu optymalnej temperatury przyłączania się ich do sekwencji mikrosatelitarnych możliwe jest powielenie nawet kilkunastu markerów mikrosatelitarnych w jednej reakcji. Po amplifikacji sekwencji mikrosatelitarnych DNA otrzymuje się różnej długości fragmenty DNA (zawierające różną liczbę kopii motywu nukleotydowego), warunkujące wielkości poszczególnych alleli. Długości zidentyfikowanych alleli określa się podczas rozdziału elektroforetycznego, który w Laboratorium Genetyki Molekularnej przeprowadza się w sekwenatorze 3130xl lub 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). W trakcie elektroforezy kapilarnej różnej długości produkty PCR migrują w żelu poliakrylamidowym zgodnie z regułą, że fragmenty dłuższe, o większym ciężarze molekularnym migrują wolniej niż fragmenty krótsze. Wyniki elektroforezy w postaci barwnych prążków na żelu otrzymuje się dzięki fluorescencyjnie znakowanym starterom, użytym w reakcji amplifikacji. Fluorescencyjne sygnały z żelu są skanowane w trakcie rozdziału elektroforetycznego przez czytnik laserowy, a w programie komputerowym są rejestrowane w postaci wykresów przedstawiających długości produktów PCR w kształcie pików (ryc. 1). Długości produktów PCR wyrażone w parach zasad, odpowiadające wielkościom alleli, są określane w oparciu o standard długości DNA, który dołącza się do każdej próbki przed rozpoczęciem elektroforezy. Otrzymane dane są importowane do programu komputerowego (GeneMapper® Software, Applied Biosystems) przygotowanego do ustalania profilu – genotypu charakterystycznego dla danego osobnika (Radko i in., 2012).

Testy genetyczne wykorzystujące polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych powinny cechować się powtarzalnymi wynikami, porównywalnymi między laboratoriami oraz nie być podatne na błędy wynikające z warunków

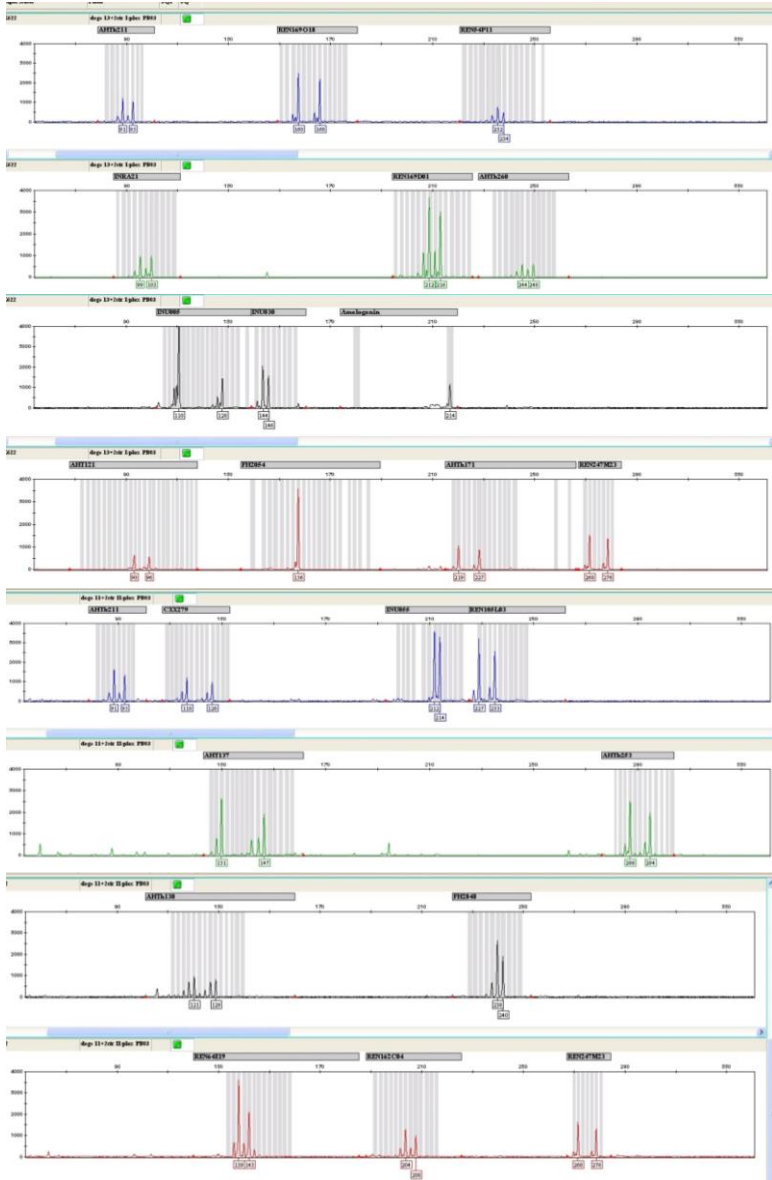
prowadzonych oznaczeń (Marklund i in., 1994). Z tego względu kompetencje laboratoriów są weryfikowane poprzez badania porównawcze, organizowane co dwa lata przez ISAG. Testy kompetencji potwierdzają jakość i rzetelność prowadzonych analiz, a poprzez normalizację wyników zapewniają ich porównywalność pomiędzy laboratoriami. Dzięki normalizacji i standaryzacji analiz badania oraz profile genetyczne, prowadzone w laboratoriach poddających się weryfikacji ISAG, są uznawane na całym świecie.

Innym typem markera DNA wykorzystywanym do identyfikacji osobniczej i potwierdzania danych rodowodowych są polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Występują one licznie w genomie, są stosunkowo łatwe do identyfikacji, charakteryzują się najczęściej polimorfizmem binarnym i mogą być oznaczane za pomocą wysoko wydajnych metod genotypowania, takich jak np. mikromacierze (Vignal i in., 2002). Do tej pory najbardziej zaawansowane są techniki wykorzystujące badania rodowodowe na podstawie SNP u bydła.

a)



b)



Ryc. 1. Przykładowy elektroforegram obrazujący odczyt liczby tandemowych powtórzeń: a) w 14 mikrosatelitarnych loci u świni; b) w 21 mikrosatelitarnych loci DNA i AMEL locus u psa. Barwniki użyte przy syntezie starterów to FAM – niebieski, VIC – zielony, PET – czerwony, NED – żółty (podczas odczytu oznaczony kolorem czarnym).

## Piśmiennictwo

- Holm L.E., Bendixen C. (1996). Usefulness of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. *Anim. Genet.*, 2 (Suppl): 17–42.
- Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L. (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.*, 25 (1): 19–23.
- Radko A., Rychlik T., Rubiś D., Szumiec A. (2012). Kontrola wiarygodności rodowodów owiec w oparciu o markery genetyczne klasy I i II. *Wiad. Zoot.*, L, 2: 13–20.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.*, 34, 3: 275–305.

## **2. Kontrola pochodzenia bydła – ponad 50 lat doświadczenia, przeszłość, teraźniejszość i osiągnięcia**

**Dominika Rubiś, Anna Koseniuk, Agnieszka Szumiec,  
Grzegorz Smolucha, Agata Piestrzyńska-Kajtoch,  
Mariusz Kościelny, Anna Radko, Katarzyna Ropka-Molik**

*Institut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Dynamiczny rozwój badań nad zróżnicowaniem serologicznym krwinek czerwonych u bydła przypadł na lata 40. ubiegłego wieku, kiedy to wykryto dużą liczbę cech antygenowych u tego gatunku (Ferguson, 1941). W 1951 r. Stormont, Irwin i Owen przedstawili interpretację badań antygenów krwinkowych z wykorzystaniem surowic monowalentnych (Stormont, 1978). Uzyskane wyniki pozwoliły na wykorzystywanie antygenów grupowych krwi jako markerów genetycznych, które dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla, a ich identyfikacja jest możliwa przy użyciu metod analitycznych. U bydła liczba i zmienność wykrytych czynników antygenowych była na tyle duża, że umożliwiła identyfikację zwierząt, a tym samym zagwarantowanie wiarygodności danych zawartych w prowadzonej dokumentacji hodowlanej dotyczącej rodowodów zwierząt.

W Polsce od lat 60. XX w. zaczęto wykorzystywać grupy krwi w kontroli rodowodów bydła. Systematycznie zwiększająca się liczba zwierząt objętych badaniami z zakresu kontroli rodowodów spowodowała, że w 1964 r. utworzono Zakład Immunogenetyki w Zootechnicznym Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki w Balicach, w którym prowadzono działalność z tego zakresu. W kwietniu 1969 r. zarządzeniem Ministerstwa Rolnictwa, Instytut Zootechniki został zobowiązany do organizowania i prowadzenia Krajowego Systemu Kontroli Pochodzenia Zwierząt Gospodarskich. W ramach tego systemu Zakład Immunogenetyki koordynował pracę 10 laboratoriów, tj. Pracowni Badania Grup Krwi zlokalizowanych przy Okręgowych Stacjach Hodowli Zwierząt, a także przy ZZZ Chorzelów oraz ZZZ Balice (Rychlik i Radko, 2013).

U bydła zidentyfikowano ponad 100 antygenów erytrocytarnych, dziedziczących się w 12 układach grupowych krwi (A,B,C,F,J,L,M,S,Z,N',R',T'). Do najbardziej polimorficznych zalicza się układy grupowe B i C, w których znanych jest kilkadziesiąt antygenów krwinkowych. Jest to największe rozpoznane zróżnicowanie antygenów erytrocytarnych wśród wszystkich zwierząt gospodarskich (Rychlik i Duniec, 2006).



Wykorzystywanie grup krwi do potwierdzania rodowodów zwierząt gospodarskich, czy też oceny struktury genetycznej konkretnego gatunku wymagało posiadania odpowiedniego zestawu monowalentnych surowic testowych o wysokiej jakości. Zakład Immunogenetyki IZ (przekształcony w późniejszych latach w Zakład/Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt) był jedynym ośrodkiem w Polsce uzyskującym reagenty testowe identyfikujące poszczególne antygeny krwinkowe bydła. Dysponował 96 surowicami testowymi odpowiadającymi międzynarodowym standardom (Rychlik i Kościelny, 2009). Instytut Zootechniki nie tylko zaopatrywał w surowice testowe Pracownie Badania Grup Krwi zlokalizowane w Polsce, ale także eksportował reagenty testowe do innych krajów europejskich, szczególnie krajów Europy Środkowej i Wschodniej.

Ostatni międzynarodowy test porównawczy u bydła dotyczący oznaczania antygenów erytrocytarnych odbył się w latach 2003/2004 i był koordynowany przez Instytut Zootechniki w Balicach. Wyniki międzynarodowych testów porównawczych wykazały, że Laboratorium Zakładu Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ posiadało najszerzy zestaw reagentów testowych spośród wszystkich laboratoriów, które uczestniczyły w porównaniach, a ich wysoka specyficzność odpowiadała standardom międzynarodowym (Rychlik i Kościelny, 2009).

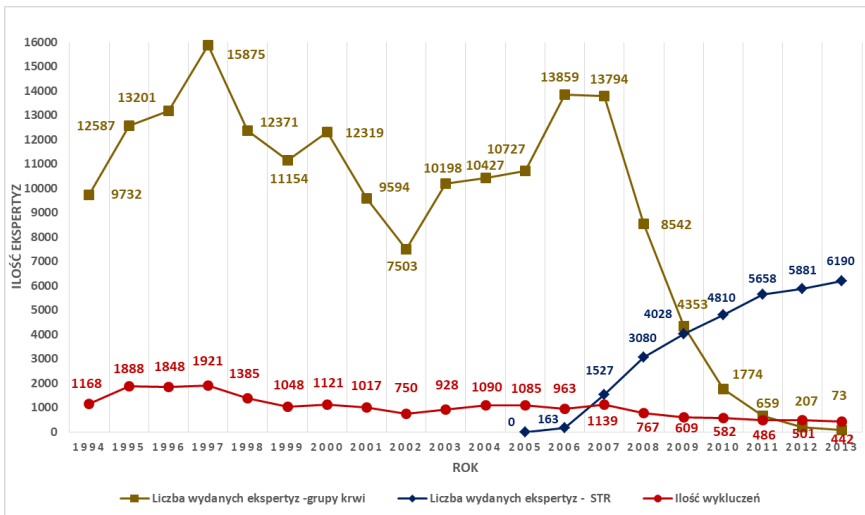
Warto podkreślić, że w Laboratorium Instytutu Zootechniki uzyskano szereg surowic odpornościowych zawierających przeciwciała, które z powodzeniem pozwoliły zidentyfikować nieznane wcześniej antygeny, m.in. z bydłowego układu A, tj. antygen PLB-4 (Duniec i in., 1988) oraz PLB-8 (Duniec i in., 2000), układu C – antygen PLB-9 (Duniec i in., 1989), czy też z układu B – antygen PLB-22, który po teście międzynarodowym International Comparison Test 1999/2000 przyjął międzynarodowe oznaczenie Q” (Duniec i in., 2002).

Od połowy lat 90. ubiegłego wieku Instytut Zootechniki prowadził systematyczną weryfikację danych rodowodowych u bydła w oparciu o zestaw 60 reagentów testowych. Surowice testowe pozwalały na oznaczanie antygenów należących do 10 układów grupowych krwi. W szczególnych przypadkach Laboratorium Zakładu Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ stosowało poszerzony panel reagentów testowych, złożony z 34 surowic testowych (Rychlik i Radko, 2013). W latach 2011–2013 wystawianie ekspertyz potwierdzających dane rodowodowe na podstawie grup krwi odbywało się już wyłącznie w Instytucie Zootechniki PIB.

Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie laboratoriów uprawnionych do przeprowadzania analiz grup i białek krwi lub markerów DNA (Dz. U. z dnia 14 maja 2004 r.) Zakład Immuno- i Cytogenetyki IZ został uprawniony do przeprowadzania identyfikacji osobniczej oraz kontroli rodowodów u zwierząt gospo-

darskich, tj. u bydła, koni, owiec, kóz i trzody chlewnej. Od 2005 r. systematyczną kontrolę rodowodów, prowadzoną dotychczas wyłącznie na podstawie analizy antygenów ertrycytarnych, zaczęto stopniowo zastępować analizą markerów mikrosatelitarnych (STR). Od 2014 r. kontrola rodowodów u bydła odbywała się już bezwarunkowo na podstawie polimorfizmu markerów DNA.

W latach 1994–2013 na podstawie badań grup krwi wystawiono blisko 179 tysięcy ekspertyz dotyczących potwierdzania danych rodowodowych u bydła. W latach 2006–2013 w oparciu o polimorfizm markerów DNA wystawiono ponad 31 tysięcy ekspertyz w zakresie weryfikacji danych rodowodowych u tego gatunku. Spośród wszystkich wystawionych ekspertyz nie udało się potwierdzić pochodzenia po wskazanych rodzicach/rodzicu dla 20 738 osobników. Szczegółowe dane z tego okresu przedstawiono na wykresie 1.



Wykres 1. Liczba ekspertyz dotyczących weryfikacji pochodzenia na podstawie polimorfizmu grup krwi oraz markerów STR w latach 1994–2013 (Rychlik i Kościelny, 2009; Rychlik i Radko, 2013; Baza IMG BOV1 IZ PIB)

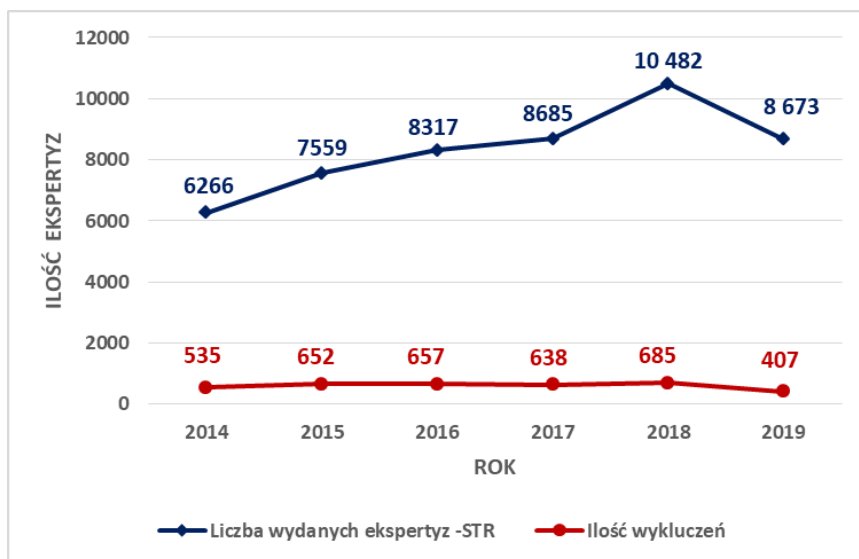
Prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa na podstawie grup krwi wynosiło około 98% (Rychlik i in., 2005), natomiast badania Holma i Bendixena (1996) z zastosowaniem jedynie 6 sekwencji mikrosatelitarnych wykazały prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica równe 99%.

U bydła sekwencje mikrosatelitarne zostały po raz pierwszy opisane w 1990 r. (Fries i in., 1990). Już w 1998 r. Komitet ISAG zalecił stosowanie 6 mikrosatelitarnych *loci* (BM1824, BM2113, SPS115, TGLA122, TGLA126,

TGLA227) jako minimalnego zestawu markerów wykorzystywanych do identyfikacji osobniczej i kontroli rodowodów bydła (Bredbacka i Koskinen, 1999). W kolejnych latach ulegał on zwiększaniu i od 2008 r., zgodnie z decyzją Komitetu ISAG do kontroli rodowodów bydła obowiązuje panel 12 *loci* STR (CMMPT, 2008).

W Instytucie Zootechniki od 1998 r. rozpoczęto wdrażanie metody potwierdzania danych rodowodowych bydła w oparciu o 11 sekwencji mikrosatelitarnych (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 i BM1824) (Janik i in., 2001). W 2008 r., zgodnie z wytycznymi ISAG zwiększono liczbę markerów wykorzystywanych do weryfikacji danych rodowodowych u bydła o dodatkowy marker – *locus* BM1818.

W początkowym okresie do badań polimorfizmu mikrosatelitarnego kierowano wyłącznie buhaje hodowlane i matki buhajów, a w późniejszym czasie również materiał żeński objęty oceną wartości użytkowej. Od 2014 r. systematyczna kontrola rodowodów bydła jest prowadzona w Polsce wyłącznie na podstawie 12 markerów mikrosatelitarnych, rekomendowanych przez ISAG. W latach 2014–2019 wystawiono blisko 50 tysięcy ekspertyz dotyczących potwierdzenia danych rodowodowych bydła. Spośród wystawionych ekspertyz nie udało się potwierdzić pochodzenia po wskazanym rodzicu/parze rodzicielskiej dla 3574 osobników. Szczegółowe dane dotyczące ilości ekspertyz wystawionych w latach 2014–2019 są zamieszczone na wykresie 2.



Wykres 2. Liczba ekspertyz dotyczących kontroli rodowodów u bydła (STR), wydanych w Instytucie Zootechniki PIB w latach 2014–2019 (Baza IMG BOV1 IZ PIB)

Z powodu pojawiających się trudności z wydaniem jednoznacznych opinii odnośnie rodzicielstwa w populacjach o wysokim poziomie inbrodu, w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ PIB opracowano dodatkowy panel, wykorzystywany w sytuacjach, gdy analiza na podstawie podstawowego panelu 12 STR nie daje jednoznacznego wyniku. Dodatkowy panel zawiera 8 *loci* mikrosatelitarnych: CSRM60, CSSM66, ILST065, INRA072, AGLA293, INRA222, INRA92 oraz HUII177 (Radko i in., 2010). Zasadność zwiększenia liczby markerów STR stosowanych w rutynowej kontroli rodowodów poparł Komitet ISAG i na 37 konferencji w Lleida podjęto decyzję o dołączeniu dodatkowych *loci* do walidowanego panelu w najbliższym teście biegiłości (2020/2021). Pod koniec 2019 r. Komitet ISAG opublikował na swojej stronie propozycję nowego panelu markerów STR, zawierającego 4 dodatkowe *loci*: CSRM60, CSSM66, ILST006, HAUT27 (ISAG\_Guidelines a).

Przez wszystkie lata potwierdzania danych rodowodowych bydła na podstawie *loci* STR (2006–2019) Instytut Zootechniki PIB ustalił 112 800 profili DNA i wystawił ponad 80 tysięcy ekspertyz potwierdzających/wykluczających zapisane w dokumentacji dane rodowodowe. W 2020 r. planuje się przebadanie i ustalenie profili DNA dla około 9 tysięcy osobników.

Pierwszy Międzynarodowy Test Porównawczy wyników genotypowania *loci* mikrosatelitarnych, zorganizowany przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG) odbył się w 1995 r. Od tej pory cyklicznie, co dwa lata ISAG organizuje testy międzynarodowe dla wszystkich jednostek badawczych na świecie zajmujących się identyfikacją osobniczą oraz kontrolą rodowodów na podstawie markerów STR u bydła (już od 2005 r.), a także u innych gatunków zwierząt hodowlanych (ISAG\_Guidelines b).

W celu dostosowania się do światowych standardów w Laboratorium Genetyki Molekularnej (LGM) Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki weryfikuje się poprawność wyników genotypowania *loci* STR (ISAG code 84451), biorąc udział w międzynarodowych porównaniach biegiłości ISAG (ISAG code 84451). Od 1997 r. laboratorium uzyskuje za każdym razem najwyższą I rangę (wyniki w zakresie 98–100%).

W 2016 r. Laboratorium Genetyki Molekularnej (LGM) Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB uzyskało akredytację Polskiego Centrum Akredytacji (PCA) wg międzynarodowej normy dla laboratoriów badawczych i wzorcujących, tj. PN-EN ISO/IEC 17025:2005 (Nr AB 1587). W zakresie akredytacji znajduje się procedura badawcza PB01 „Identyfikacja osobnicza bydła w multipleksowych systemach STR”, w ramach której Laboratorium weryfikuje dane rodowodowe u bydła.

W 2015 r. Laboratorium Genetyki Molekularnej IZ PIB uzyskało również Certyfikat Jakości ICAR w zakresie kontroli rodowodów bydła na podstawie *loci* STR na lata 2016–2017. Obecnie Certyfikat Jakości ICAR został przedłużony na kolejne dwa lata, tj. 2020–2021.

Blisko dwie dekady temu podjęto pierwsze próby opracowania panelu markerów SNP przydatnego w identyfikacji osobniczej oraz kontroli rodowodów bydła (Heaton i in., 2002; Werner i in., 2004). W latach 2010–2011, również w Instytucie Zootechniki PIB podjęto próby opracowania panelu markerów SNP przydatnego do kontroli rodowodów ras bydła utrzymywanych w Polsce. Kryterium selekcyjne opierało się o wartość MAF (*minor allele frequency* – możliwie najbliższej 0,5) lokalizacji chromosomowej oraz jak najniższej nierównowadze sprzężeń pomiędzy markerami. Identyfikacja 43 markerów SNP z opracowanego panelu przebiegała w oparciu o metodę mini-sekwencjonowania (*reakcję single-base extension* oraz elektroforezę kapilarną). Poprawność genotypowania markerów SNP w opracowanym panelu została potwierdzona poprzez sekwencjonowanie losowo wybranych próbek o różnych genotypach. Wynik uzyskany w oparciu o analizę 43 markerów SNP był rozstrzygający w sytuacjach, gdy zastosowanie podstawowego (12 STR) i uzupełniającego (8 STR) zestawu STR uniemożliwiało wydanie jednoznacznej decyzji rodzicielskiej.

W 2011 r. Komitet ISAG udostępnił panel podstawowy (core) 100 SNP ujednoczony dla wszystkich jednostek badawczych zajmujących się kontrolą rodowodów u bydła. Dwa lata później panel ten został poszerzony o kolejne 100 *loci* SNP (ISAG additional), dedykowane dla bydła z gatunku *Bos indicus* i ras syntetycznych (ISAG – Guidelines b). Markery SNP zawarte w panelu core oraz additional zostały uwzględnione na wysokowydajnych mikromacierzach genotypowych firmy Illumina, wykorzystywanych w programach selekcji genomowej bydła. Poprawność wyników genotypowania markerów SNP z międzynarodowych paneli (ISAG core i ISAG additional) jest potwierdzana na podstawie międzynarodowych testów porównawczych, organizowanych cyklicznie przez ISAG, analogicznie jak w przypadku markerów STR.

Na 37 konferencji ISAG w Lleida (Hiszpania) w lipcu 2019 r. zdecydowano, aby identyfikacja osobnicza oraz kontrola rodowodów u bydła były prowadzone na podstawie minimum 200 SNP (*panel core + additional*). W takim przypadku kumulatywne prawdopodobieństwo wykluczenia niewłaściwego rodzica, przy znajomości genotypu jednego z rodziców (CPE1) oraz obojga rodziców (CPE2), dla połączonych paneli core i additional, czyli 200 SNP wynosi blisko 100% (ISAG – Guidelines b).

W Instytucie Zootechniki, w Laboratorium Genomiki – podobnie jak w innych jednostkach zajmujących się oceną genomową – genotypy rekomendowane przez ISAG/ICAR do kontroli rodowodów na podstawie markerów SNP są oznaczane w ramach prowadzonej selekcji genomowej w oparciu o mikromacierze genotypowe firmy Illumina.

Laboratorium Genomiki IZ PIB (ISAG code 84451) weryfikuje poprawność wyników genotypowania *loci* SNP bydła w międzynarodowych testach biegłości ISAG od 2013 r., uzyskując najwyższą I rangę (I ranga – wyniki w zakresie 98–100%).

Bardzo dobre wyniki w międzynarodowych testach porównawczych, a także długoletnie doświadczenie w przeprowadzaniu analiz molekularnych pozwoliło Laboratorium Genomiki IZ PIB uzyskać na lata 2019–2020 akredytację ICAR dotyczącą prowadzenia kontroli rodowodów bydła również w oparciu o markery SNP. Ponadto, w marcu 2019 r. Zakład Hodowli Bydła IZ PIB uzyskał akredytację ICAR dla centrów obliczeniowych w zakresie interpretacji danych DNA, w ramach której w Instytucie Zootechniki PIB są wydawane ekspertyzy w zakresie kontroli rodowodów bydła na podstawie rekomendowanych przez ISAG/ICAR markerów SNP. Analiza polimorfizmu SNP w zakresie potwierdzania danych rodowodowych dotyczy przede wszystkim zwierząt objętych oceną genomową, a więc bydła mlecznego rasy holsztyńsko-fryzyskiej. Zakład Hodowli Bydła IZ PIB rozpoczął w 2019 r. wystawianie ekspertyz potwierdzających dane rodowodowe na podstawie *loci* SNP dla bydła tej rasy. Jednak, dla zwierząt nie objętych selekcją genomową dane rodowodowe są potwierdzane rutynowo na podstawie sekwencji mikrosatelitarnych. Zaprojektowana przez Spółdzielnię EuroGenomics nowa mikromacierz (EuroG MD firmy Illumina) zwiększa dokładność oceny wartości hodowlanej u innych ras bydła i jednocześnie umożliwia u nich potwierdzanie danych rodowodowych (Borchersen, 2019). W perspektywie najbliższych lat spowoduje to zwiększenie liczby zwierząt różnych ras z potwierdzonymi danymi rodowodowymi na podstawie markerów SNP.

W Laboratorium Genetyki Molekularnej IZ PIB opracowano autorską metodę analizy panelu zawierającego 194 SNP z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie sond TaqMan MGB (*minor groove binder*) i urządzenia QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System z OpenArray block oraz AccuFill™ System (Applied Biosystems). Opracowany panel zawiera rekomendowane przez ISAG/ICAR SNP core i additional oraz *loci* SNP związane z płcią i chorobami genetycznymi. Pozwala on przede wszystkim na analizę próbek o mniejszej koncentracji DNA, czy też DNA o niższej jakości. Celem opracowania panelu było stworzenie alternatywnej metody do analiz polimorfizmów SNP. Poprawność wyników genotypowania markerów SNP w opracowanym panelu została potwierdzona na podstawie genotypów próbek pochodzących z kilku międzynarodowych testów porównawczych, a także poprzez sekwencjonowanie losowo wybranych próbek o różnych genotypach (Piestrzyńska-Kajtoch i in., 2019).

Wieloletnie doświadczenie w prowadzeniu kontroli pochodzenia u zwierząt hodowlanych oraz wysokie kompetencje pracowników Instytutu Zootechniki PIB potwierdzone wynikami w testach biegłości zostały dostrze-

żone na arenie międzynarodowej. Aktualnie Instytut Zootechniki PIB jest jedyną w Polsce jednostką posiadającą akredytację ICAR w zakresie weryfikacji rodowodów u bydła na podstawie markerów STR (Laboratorium Genetyki Molekularnej) i SNP (Laboratorium Genomiki oraz Zakład Hodowli Bydła).

## Piśmiennictwo

- Borchersen S. (2019). EuroGenomics new EuroG MD beadchip; <http://www.eurogenomics.com/actualites/eurogenomics-new-eurog-md-beadchip.html>
- Bredbacka P., Koskinen M.T. (1999). Microsatellite panels suggested for parentage testing in cattle: informativeness revealed in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian populations (Research Note). *Agric. Food Sci.*, 8: 233–237.
- CMMPT (2008). Cattle molecular markers and parentage testing workshop. In: ISAG Conference (Chair: Leanne Van de Goor ), pp.1–3. CMMPT, Amsterdam.
- Duniec M., Duniec M.J., Pilch E., Rutyna T. (1988). Nowy antygen w układzie grupowym krwi A u bydła. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 15, 1: 9–14.
- Duniec M., Duniec M., Kościelny M. (1989). Fenogrupy układu grupowego krwi C u bydła czarno-białego w Polsce. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 16, 2: 9–15.
- Duniec M., Rychlik T., Duniec M.J., Kościelny M. (2000). PLB-8 – A newly detected antigen of the a blood group system in cattle. *Ann. Anim. Sci. (Rocz. Nauk. Zoot.)*, 27, 4: 21–28.
- Duniec M.J., Duniec M., Rychlik T., Kościelny M. (2002). The Bovine B blood group system is a closed system. *Ann. Anim. Sci.*, 2, 1: 53–62.
- Ferguson L.C. (1941). Heritable antigens in the erythrocytes of cattle. *J. Immun.*, 40: 213–242.
- Fries R., Eggen A., Stranzinger G. (1990). The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 8: 403–406.
- Heaton M.P., Harhay G.P., Bennett G.L., Stone R.T., Grosse W.M., Casas E., Keele J.W., Smith T.P.L., Chitko-McKown C.G., Laegreid W.W. (2002). Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle. *Mamm. Genome*, 13: 272–281.
- Holm L.E., Bendixen C. (1996). Usefulness of microsatellites from the ISAG comparison test for parentage control in Danish Black-and-White cattle. *Anim. Genet.*, 2 (Suppl): 17–42.
- ISAG\_Guidelines a: <https://strbase.nist.gov/cattleSTRs.htm>
- ISAG\_Guidelines b: <http://www.isag.us/committees.asp>
- ISAG\_History: <http://www.isag.us/history.asp>
- Janik A., Ząbek T., Radko A., Natonek M. (2001). Evaluation of polymorphism at 11 microsatellite loci in Simmental cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 1: 19–29.
- Piestrzynska-Kajtoch A., Rubiś D., Fornal A., Gurgul A., Jasielczuk I., Radko A. (2019). Validation of the OpenArray SNP assays for cattle. 37th International Society for Animal Genetics Conference, Lleida, Spain, 30, OP109.

- Radko A., Słota E., Marczyńska J. (2010). Usefulness of a supplementary set of microsatellite DNA markers for parentage testing in cattle. *Pol. J. Vet. Sci.*, 13: 113–117.
- Rychlik T., Duniec M. (2006). Fenogrupy układu grupowego krwi C u bydła ras: czerwono-białej, holsztyńsko-fryzyjskiej i Charolaise. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 33, 2: 183–192.
- Rychlik T., Kościelny M. (2009). Wykorzystanie badań grup krwi w kontroli wiarygodności rodowodów bydła. *Wiad. Zoot.*, 47, 3: 11–16.
- Rychlik T., Radko A. (2013). Rozwój metod kontroli pochodzenia bydła – od grup krwi do polimorfizmu DNA. *Wiad. Zoot.*, 51, 4: 51–57.
- Rychlik T., Radko A., Słota E. (2005). Analiza porównawcza polimorfizmu grup krwi i sekwencji mikrosatelitarnych DNA u polskiego bydła czerwonego. *Mat. LXX Zjazdu PTZ, Wrocław, Komunikaty Naukowe*, s. 50.
- Stormont C. (1978). The early history of cattle blood groups. *Immunogenetics*, 6: 1–15.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.*, 34, 3: 275–305.
- Werner F.A.O., Durstewitz G., Habermann F.A., Thaller G., Krämer W., Kollers S., Buitkamp J., Georges M., Brem G., Mosner J., Fries R. (2004). Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Anim. Genet.*, 35: 44–49.



### **3. Kontrola pochodzenia owiec – zarys historyczny i współczesność**

**Anna Koseniuk, Agnieszka Szumiec, Angelika Podbielska,  
Dominika Rubiś, Anna Radko**

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

#### **Badania grup krwi i polimorficznych wariantów białek krwi i surowicy**

Badania nad polimorfizmem erytrocytarnym owiec zostały zapoczątkowane w 1924 r. przez polskich badaczy Białosuknię i Kączkowskiego (Białosuknia i Kączkowski, 1924) w pracowni profesora Ludwika Hirszfelda – jednego z pionierów badań serologicznych u ludzi na świecie.

Szczytowy okres badań nad polimorfizmem erytrocytarnym u zwierząt gospodarskich na świecie i w Polsce przypada na lata 1950–1980. Ich efektem było m.in. wykrycie 50 cech antygenowych we krwi owiec. W tym samym czasie rozpoczęto badania dotyczące identyfikacji białek krwi i surowicy, a przede wszystkim polimorficznych wariantów transferyny (TF) ( $\beta$  globulina) oraz łańcucha  $\beta$  hemoglobiny (HBB) (Ashton, 1958; Evans i in., 1956). Obydwa białka u owiec cechowały się dużą zmiennością i łatwą identyfikacją fenotypów, a do ich analizy wykorzystywano techniki elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Erhardt, 1986) lub skrobiowym (Smithies, 1955). Po teście porównawczym przeprowadzonym przez European Society for Animal Blood Group Research (ESABR), organizację, która w późniejszym czasie przekształciła się w International Society for Animal Genetics – ISAG (Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt), podjęto pierwsze ustalenia dotyczące nomenklatury polimorficznych form transferyn. W 1990 r. w Michigan (USA) w teście biegłości opracowano nazewnictwo dla 22 antygenów erytrocytarnych owiec: Aa, Ab, Ba, Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bh, Bi, Ca, Cb, Cc, Da, Ma, Mb, Mc, R, 0, X i Z (Rychlik i in., 1996).

Od 1970 r. w Instytucie Zootechniki były intensywnie prowadzone prace badawcze, mające na celu uzyskanie własnego zestawu surowic testowych i ocenę ich przydatności do analizy rodowodów w krajowej populacji owiec. Zestaw surowic testowych zawierających przeciwciała do wykrywania poznanych antygenów erytrocytarnych pozyskiwano w Zakładzie Immunogenetyki według autorskich przepisów „immunizacji”, czyli stymulacji immunologicznej owiec-dawców surowicy. Wyprodukowanie pełnego zestawu surowic testowych było możliwe dzięki utrzymywanej przez Instytut Zootechniki zróżnicowanych pod względem cech antygenowych grupy owiec.

Wszystkie uzyskane reagenty były poddawane międzynarodowej standaryzacji w testach porównawczych (Rychlik i in., 1996).

W 1977 r. Ministerstwo Rolnictwa wprowadziło ustawy o obowiązku prowadzenia kontroli rodowodów w owczarniach. W Instytucie Zootechniki w nadesłanych do badań próbkach krwi prowadzono oznaczenie składu antygenowego czerwonych krwinek oraz polimorfizmu transferyny i hemoglobiny w ramach zadania zleconego przez Ministerstwo Rolnictwa (Rychlik i in., 1996). Na ryc. 1 zobrazowano jak w latach 1977–2015, czyli na przestrzeni 39 lat prowadzonej weryfikacji rodowodów u owiec, systematycznie zmniejszała się liczba niezgodnych rodowodów. Można przypuszczać, że przyczyniły się do tego regularnie prowadzone badania rodowodów, które dały podstawę do weryfikacji zapisów w dokumentacji hodowlanej. W przypadku stwierdzenia w stadzie powyżej 20% niezgodnych rodowodów – hodowca był pozbawiany możliwości produkowania materiału hodowlanego (Rychlik i in., 1996).

Kontrolę rodowodów u owiec w Zakładzie Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ rutynowo prowadzono w oparciu o analizę 6 układów grupowych krwi (tab. 1) oraz polimorficznych wariantów transferyny (TF) i hemoglobiny  $\beta$  (HBB) (tab. 2). Do oznaczania antygenów erytrocytarnych wykorzystywano 16 własnych reagentów testowych: anty Aa, Ab, Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bi, PLB-17, Ca, Cb, Da, Ma, R i 0. Przeciwciała obecne w surowicy testowej wiążą się z determinantami antygenowymi. W wyniku reakcji antygen-przeciwciała dochodzi do aglutynacji (zlepiania się antygenów pod wpływem reakcji ze swoistym przeciwciałem) lub hemolizy (rozpadu błony erytrocytów). U owiec antygeny z układów grupowych A, B, C, M i R oznaczano testem hemolitycznym, a antygen Da z układu D testem aglutynacyjnym (Rychlik i in., 1996). Polimorficzne warianty transferyny i hemoglobiny oznaczano za pomocą elektroforezy poziomej w żelu skrobiowym według zmodyfikowanej metody Smithies O. (1955) (Rychlik i in., 1996; Rychlik i Krawczyk, 2008).

Badania mające na celu porównanie skuteczności metody analizy grup krwi i białek surowicy oraz krwi i polimorfizmu STRs w weryfikacji zapisów rodowodowych dały zbliżone wyniki prawdopodobieństwa wykluczenia niewłaściwego rodzica (PE, ang. *power of exclusion*). U rasy Berrichone du Cher wartość PE wyniosła 0,920 przy zastosowaniu markerów erytrocytarnych i 0,998 z wykorzystaniem polimorfizmu STR (Rychlik i in., 2003).

## **Kontrola rodowodów owiec na podstawie markerów mikrosatelitarnych DNA**

W 2016 r. analiza polimorfizmu mikrosatelitarnego zastąpiła całkowicie kontrolę pochodzenia owiec w oparciu o grupy krwi. Wprowadzenie nowych markerów genetycznych do badań rodowodowych było poprzedzone okresem przystosowawczym, w którym opracowano metodykę, zwalidowano ją w oparciu o wyniki testu porównawczego i gromadzono profile DNA owiec,

które służyły do wyliczeń parametrów statystyki populacyjnej, takich jak prawdopodobieństwo wykluczenia (*power of exclusion*). W tym czasie badanie polimorfizmu mikrosatelitarnego stosowano w przypadkach, gdy system kontroli pochodzenia owiec, oparty wówczas na grupach krwi, uniemożliwił jednoznaczne wskazanie pary rodzicielskiej. Udział po raz pierwszy w międzynarodowym teście biegłości dotyczącym genotypowania DNA owiec (2011–2012 International Ovine Comparison Test) umożliwił standaryzację opracowanych zestawów markerów mikrosatelitarnych. W następnych latach Laboratorium Genetyki Molekularnej brało udział w każdym kolejnym międzynarodowym teście biegłości ISAG, uzyskując za każdym razem najwyższą I rangę zgodności wyników genotypowania (wyniki w zakresie 98–100%).

Przez lata skład panelu markerów rekomendowanego przez ISAG (International Society of Animal Genetics) ulegał zmianom. Od 2013 r. do chwili obecnej w kontroli pochodzenia u owiec na podstawie mikrosatelitarnych sekwencji DNA Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG rekomenduje panel 13 markerów: AMEL, CSRD247, ETH152, INRA005, INRA006, INRA023, INRA063, INRA172, MAF065, MAF214, McM042, McM527, OarFCB20.

W Laboratorium Genetyki Molekularnej ustalono dla badanych markerów mikrosatelitarnych dwa zestawy multiplex ze względu na różne temperatury przyłączania starterów (tab. 3). Od 2016 r. w Laboratorium Genetyki Molekularnej przebadano 5481 owiec. Ilość błędnie podanych rodowodów zmieniała się w poszczególnych latach, osiągając najwyższy procent wykluczeń w drugim roku badań (6,1%) a najniższy w 2018 r., który wyniósł jedynie 0,6% (ryc. 2).

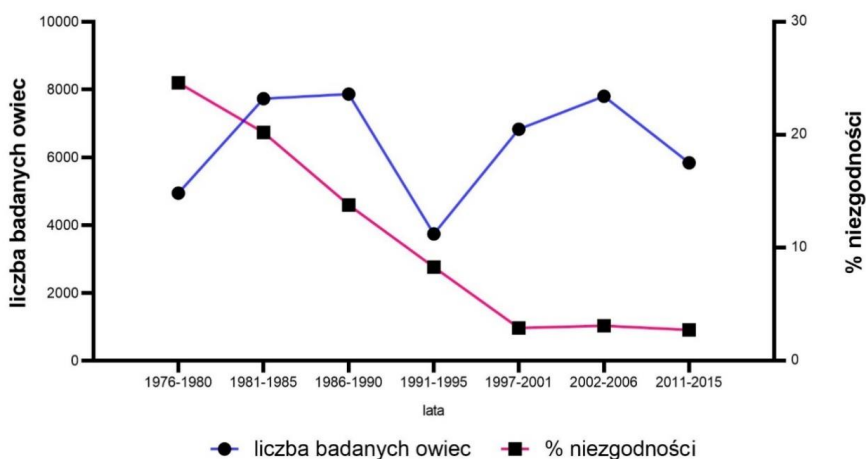
Wyniki kontroli rodowodów są corocznie przekazywane do wiadomości Polskiego Związku Owczarskiego, co pomaga w korygowaniu błędnych rodowodów i porządkowaniu dokumentacji zootechnicznej. Eliminacja z hodowli zarodowej osobników o niezgodnym pochodzeniu daje gwarancję uniknięcia skutków, jakie mogłyby wyniknąć w przypadku użycia do rozrodu zwierząt nie pochodzących po wartościowych, podanych w rodowodach rodzicach.

Tabela 1. Reagenty testowe identyfikowane przy użyciu zestawu surowic testowych w ramach kontroli rodowodów owiec rutynowo prowadzonej w Instytucie Zootechniki

Układy grupowe	Reagenty testowe
A	Aa, Ab
B	Bb, Bc, Bd, Be, Bf, Bg, Bi, PLB-17
C	Ca, Cb
D	Da
M	Ma
R	R, 0

Tabela 2. Polimorficzne warianty transferyny (TF) i hemoglobiny (HB) identyfikowane techniką elektroforezy żelowej

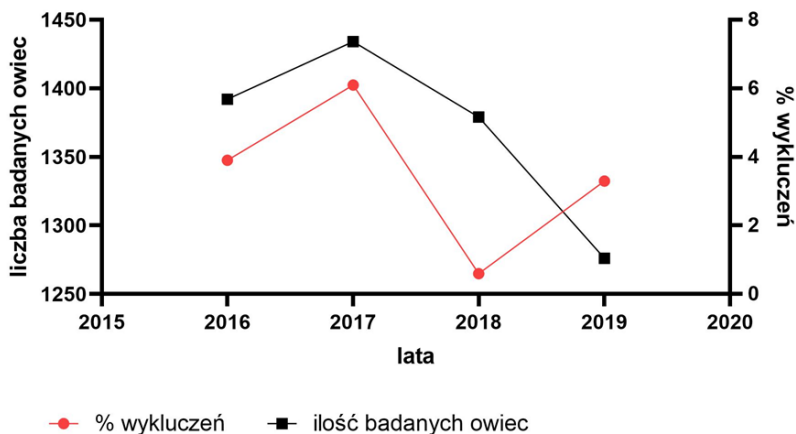
Locus	Geny	Fenotypy
TF	TF <sup>A</sup>	AA, AB, AC, AD, AE, AP
	TF <sup>B</sup>	BB, BC, BD, BE, BP
	TF <sup>C</sup>	CC, CD, CE, CP
	TF <sup>D</sup>	DD, DE, DP
	TF <sup>E</sup>	EE
	TF <sup>P</sup>	PP
HB	HB <sup>A</sup>	AA, AB, BB
	HB <sup>B</sup>	



Ryc. 1. Liczba owiec badanych w Instytucie Zootechniki PIB na podstawie grup i białek krwi pod kątem weryfikacji rodowodów oraz liczba niezgodnych rodowodów na przestrzeni lat 1976–2015

Tabela 3. Podział markerów mikrostaelitarnych na 2 zestawy multipleks ze względu na temperaturę przyłączenia starterów

PCR	Temperatura przyłączenia starterów	Markery
Multiplex 1	61°C	AME, INRA63, INRA006, MAF214, McM042, CSRD247, INRA172
Multiplex 2	58°C	MAF065, McM527, OarFCB20, ETH152, INRA005, INRA23



Ryc. 2. Liczba owiec badanych w Instytucie Zootechniki PIB na podstawie markerów mikrosatelitarnych pod kątem weryfikacji rodowodów oraz liczba niezgodnych rodowodów w latach 2016–2019

### Piśmiennictwo

- Ashton G.C. (1958). Further  $\beta$ -globulin phenotypes in sheep. *Nature*, 182: 1101–1102.
- Białosuknia W., Kączkowski B. (1924). On the differentiation of various breeds of sheep by means of serological methods. *J. Immunol.*, 9: 593.
- Diez-Tascon C., Littlejohn R.P., Almeida P.A., Crawford A.M. (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim. Genet.*, 31: 243–251.
- Evans J.V., King J.W., Cohen B.L., Harris H., Warren F.L. (1956). Genetics of haemoglobin and potassium differences in sheep. *Nature*, 178: 849.
- Erhard G. (1986). Transferrin variants in sheep: separation and characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Anim. Genet.*, 17 (2): 343–352.
- ISAG Comparison test (2013). Panels of markers for parentage verification tested at the 2013–2014 ([www.isag.org.uk](http://www.isag.org.uk)).
- Radko A., Rychlik T. (2003). Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych DNA u owiec rasy Berrichone du Cher. *Rocz. Nauk. Zoot.*, Supl. 17: 105–108.
- Radko A., Słota E. (2007). Polymorphism of 11 microsatellite DNA recommended by parentage control in bulls Holstein Friesian cattle breeds in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 2: 189–196.
- Radko A., Rychlik T., Rubiś D., Szumiec A. (2012). Kontrola wiarygodności rodowodów owiec w oparciu o markery genetyczne klasy I i II. *Wiad. Zoot.*, L, 2: 13–20.
- Rychlik T., Krawczyk A. (2008). Kontrola wiarygodności rodowodów owiec w oparciu o markery genetyczne klasy I. *Wiad. Z.*, XLVI, 2: 3–8.

- Rychlik T., Janik A., Duniec M. (1996). Wykorzystanie badań grup krwi i białke polimorficznych u owiec w praktyce hodowlanej. *Biul. Inf. IZ*, XXXIV, 4: 51–60.
- Rychlik T., Radko A., Duniec M. (2003). Ocena przydatności polimorfizmu niektórych markerów genetycznych w kontroli rodowodów owiec. *Med. Wet.*, 59 (11): 1016–1018.
- Smithies O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels; Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61: 629.

## 4. Pół wieku doświadczenia w kontroli pochodzenia u trzody chlewnej

**Anna Koseniuk<sup>1</sup>, Marian Kamyczek<sup>2</sup>, Grzegorz Smołucha<sup>1</sup>,  
Anna Radko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

<sup>2</sup>*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Doświadczalny Pawłowice,  
ul. Mielżyńskich 14, 64-122 Pawłowice*

### **Badania grup krwi u trzody chlewnej**

Początki badań nad grupami krwi są związane z odkryciami dokonanymi na początku XX w. przez austriackiego immunologa Karla Landsteinerja i polskiego lekarza immunologa Ludwika Hirszfelda oraz zespół polskich badaczy – Szymanowskiego, Stetkiewicza i Wachlera. U świń znanych jest obecnie 16 układów grupowych krwi, w których zidentyfikowano 78 czynników grupowych i 82 allele (tab. 1). W 1968 r. przy współpracy z Wyższą Szkołą Rolniczą – Wydziałem Zootechnicznym w Poznaniu uruchomiono w Instytucie Zootechniki, w Zakładzie Doświadczalnym w Pawłowicach Pracownię Badania Grup Krwi Świń, która w 1987 r. została przemianowana na Pracownię Immunogenetyki. Jednostka ta zajmowała się badaniami grup krwi i ich wykorzystaniem w kontroli pochodzenia u trzody chlewnej.

Badania prowadzono z wykorzystaniem własnych reagentów testowych, których jakość była sprawdzana w Międzynarodowych Testach Porównawczych (Comparison Test). Pod patronatem Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Zwierząt (ISAG) w 1996 r. organizatorem testu była Pracownia Immunogenetyki w Pawłowicach.

Za pomocą standardowego zestawu surowic testowych (w 1996 r. było to 25 reagentów testowych należących do 9 układów grupowych krwi) możliwe było sprawdzenie w chlewniach zarodowych prawidłowości zapisów dokumentacji dotyczącej pochodzenia trzody chlewnej. W początkowym okresie (1968–1970) zamierzano badać jedynie materiał przesyłany do SKURTC, ale zmiana organizacji hodowli świń w kraju, w tym utworzenie centrów hodowlanych, rozszerzyło zakres tych badań na cały obszar kraju. W latach 1978–1984 kontroli danych rodowodowych poddano 4200 osobników. Niezgodności w danych rodowodowych wynosiły 8–10%. Kontrola pochodzenia wykonana w 1990 r. wykazała, że w 22 chlewniach zarodowych niezgodności w pochodzeniu wynosiły 5,7% badanych zwierząt. W latach 1991–1995 sprawdzono pochodzenie 11 065 szt. świń, spośród których u 461

szt. wykluczono pochodzenie po rodzicach zapisanych w dokumentacji hodowlanej, co stanowiło 4,2% badanych zwierząt (Kamyczek, 1997). W badaniach wykonanych w chlewniach zarodowych w latach 2011–2015 wykazano, że niezgodności w pochodzeniu nie przekraczały 1,4% (tab. 2). Od 2016 r. została zmieniona metodyka kontroli pochodzenia u trzody chlewnej, co spowodowało przeniesienie prowadzonych badań do Instytutu Zootechniki w Białymostku, gdzie identyfikuje się rodzicielstwo na podstawie markerów mikrosatelitarnych.

### **Kontrola rodowodów u świń na podstawie polimorfizmu DNA**

W akredytowanym według wymogów normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 Laboratorium Genetyki Molekularnej (LGM) Instytutu Zootechniki PIB od 2016 r. prowadzi się weryfikację rodowodów świń w oparciu o markery mikrosatelitarne DNA. Przy wykorzystaniu mieszaniny znakowanych czterema fluoroforami (FAM, VIC, NED, PET) sekwencji starterowych o odpowiednim stężeniu, podczas jednej reakcji PCR multiplex powieleniu ulega 14 markerów mikrosatelitarnych z podstawowego zestawu rekomendowanego przez ISAG, tj.: S0090, S0101, S0155, S0227, S0228, S0355, S0386, SW24, SW240, SW72, SW857, SW911, SW936, SW951. Otrzymane produkty PCR poddaje się elektroforezie w żelu poliakrylamidowym w obecności standardu długości 500 LIZ, w urządzeniu 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Odczyt wyniku elektroforezy kapilarnej następuje z wykorzystaniem programu GeneMapper® v. 4.0 (Applied Biosystems).

W Instytucie Zootechniki PIB badania weryfikacji rodowodów świń na podstawie markerów STR prowadzone są w ramach zleconego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi programu wieloletniego. Odbiorcami wyników badań kontroli pochodzenia świń są hodowcy zrzeszeni w Polskim Związku Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej „POLSUS”. Największą liczbę próbek do badań DNA przesłano w 2018 r. i w tym też roku odnotowano najwyższy procent nieprawidłowych rodowodów (tab. 2).

Laboratorium Genetyki Molekularnej brało udział do tej pory w dwóch testach biegłości w profilowaniu świń na podstawie mikrosatelitarnych sekwencji DNA (Pig Comparison Test 2016–2017 i 2018–2019). W oparciu o uzyskane rezultaty w obydwu testach biegłości laboratorium LGM zakwalifikowano do pierwszej rangi laboratoriów, które w profilowaniu uzyskały zgodne wyniki w przedziale 100–98% (ryc. 1).



Tabela 1. Grupy krwi u świń (ISAG – Pig Workshop, 1996)

Układ grupowy	Czynniki grupowe	Allele
A	A (A, Aw), O (O,-)	A, O
B	Ba, Bb	a, b
C	Ca	a, -
D	Da, Db	a, b
E	Ea, Eb, Ed, Ee, Ef, Eg, Eh, Ei, Ej, Ek, El, Em, En, Eo, Ep, Es, Et	bdgkmps, degghkmnps, aeglms, defghkmnps, bdfkmps, aeflms, degklmns, aegils, degghjmnt, abgklps, abgkmps, aegmnops, bdgklps, degghjmnr, abgkmops, bdgjmt, bdgjmr
F	Fa, Fb, Fc, Fd	ac, ad, bc, bd
G	Ga, Gb	a, b
H	Ha, Hb, Hc, Hd, He	a, b, ab, cd, bd, bc, be, -
I	Ia, Ib	a, b
J	Ja, Jb	a, b, -
K	Ka, Kb, Kc, Kd, Ke, Kf, Kg	acf, bf, acef, ade, adeg, -
L	La, Lb, Lc, Ld, Lf, Lg, Lh, Li, Lj, Lk, Ll, Lm	adhi, bcgi, bdfi, agim, adhjk, adhjl
M	Ma, Mb, Mc, Md, Me, Mf, Mg, Mh, Mi, Mj, Mk, Ml	ab(e), aem, aejm, ade(m), b, bcd, bcdi, bd, bdg, be(f)m, cd, cdi, cdk, d, djc, dk, ef, efm, h, -
N	Na, Nb, Nc	a, b, bc
O	Oa, Ob	a, b
P	Pa	a, -

Tabela 2. Wyniki kontroli pochodzenia w chlewniach zarodowych na podstawie grup krwi w latach 2011–2015 i polimorfizmu mikrosatelitarnego w latach 2016–2019

Rok	Liczba badanych sztuk	% niezgodności
2011	1799	0,9
2012	1700	0,1
2013	1567	1,1
2014	975	1,4
2015	1021	0,0
2016	1039	1,8
2017	1326	2,4
2018	1380	7,8
2019	754	0,5



Ryc. 1. Certyfikaty potwierdzające kompetencje Laboratorium Genetyki Molekularnej, w międzynarodowych testach porównawczym organizowanych przez ISAG w latach 2016–2017 i 2018–2019

## Piśmiennictwo

- ISAG (2014). Proceedings of the 34th International Conference on Animal Genetics, Xi'an, China.
- Kamyczek M. (1997). Badania grup krwi i ich wykorzystanie w kontroli pochodzenia u świń. Roczn. Nauk. Zoot., Supl., 1: 63–66.

## 5. Kontrola pochodzenia koni – historia i perspektywy

**Agnieszka Fornal, Katarzyna Kowalska, Agata Piestrzyńska-Kajtoch**

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Obecnie w Polsce badania kontroli pochodzenia na podstawie markerów genetycznych są prowadzone w Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB, Zakład Immunogenetyki Zwierząt Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu oraz Laboratorium Badań Markerów Genetycznych u Koni Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

W Instytucie Zootechniki pierwsze analizy markerów klasy I koni zaczęto prowadzić w latach osiemdziesiątych XX w. W Laboratorium Grup Krwi Zakładu Doświadczalnego w Chorzelowie badania były wykonywane wyłącznie w oparciu o markery klasy I. Markery klasy I nie były jednak idealne jako narzędzie do kontroli pochodzenia – prawdopodobieństwo potwierdzenia właściwie ustalonego rodowodu u koni wynosiło 98–99%.

Wraz z rozwojem metod biologii molekularnej zaczęto stosować polimorfizm markerów mikrosatelitarnego DNA – klasy II, STR (ang. *short tandem repeat*). Dla koni pierwotnie zaproponowano dziewięć sekwencji mikrosatelitarnych, które stworzyły minimalny zestaw do weryfikacji rodowodów. Dalsze badania nad zastosowaniem mikrosatelitów w kontroli rodowodów skupiały się na poszukiwaniu nowych sekwencji dla zwiększenia wiarygodności analiz i efektywności w wykluczeniu błędnie oszacowanego rodzicielstwa (Fornal i in., 2014). W 2000 r. laboratorium rozpoczęło badania kontroli rodowodów z zastosowaniem markerów mikrosatelitarnych.

Markery klasy II pozwalają na uzyskanie wyższego niż markery klasy I prawdopodobieństwa potwierdzenia właściwie ustalonego rodowodu z 99,999% pewnością, czyli wyższą niż markery klasy I, graniczącą z pewnością. Z uwagi na powyższe rekomendacje, kontrola pochodzenia koni w Instytucie Zootechniki była prowadzona do 2015 r. z zastosowaniem jednocześnie markerów klasycznych i mikrosatelitarnego DNA. Przez kilkanaście lat analiza markerów klasy I i II była prowadzona równolegle dla zachowania spójności badań oraz ciągłości pokoleń w badaniach. Laboratorium Grup Krwi w Chorzelowie formalnie zakończyło działalność 30 listopada 2015 r., a kontrola pochodzenia jest obecnie prowadzona w oparciu o polimorfizm mikrosatelitarnego DNA w Laboratorium Genetyki Molekularnej w Balicach.

Zestaw markerów genetycznych powinien cechować się uniwersalnością i nie powinien być rasowo-specyficzny, tak aby dla różnych populacji i ras koni wykazywać wystarczający polimorfizm. ISAG monitoruje zmienność genetyczną i użyteczność zaproponowanego zestawu mikrosatelitów do kontroli pochodzenia na całym świecie (Kakoi i in., 2019).

Identyfikację osobniczą i kontrolę pochodzenia koni prowadzimy w naszym Laboratorium zgodnie z bieżącymi wytycznymi ISAG. Do potwierdzenia pochodzenia stosowany jest aktualnie zestaw 12 podstawowych oraz 5 dodatkowych markerów DNA (tab. 1).

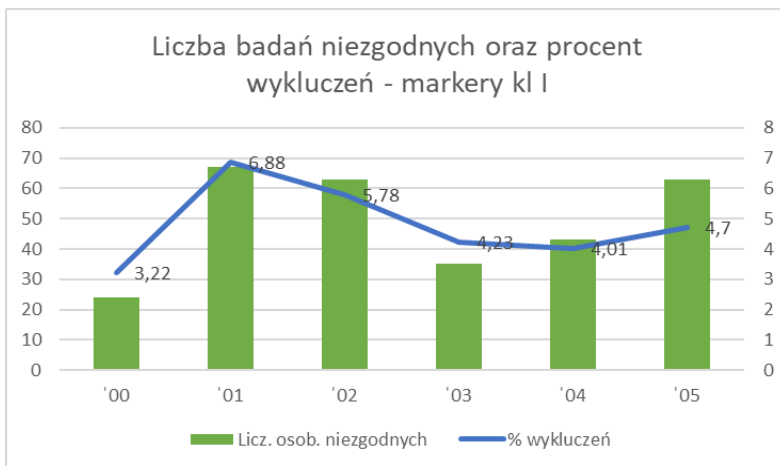
Tabela 1. Zestaw siedemnastu mikrosatelitarnych *loci* stosowanych obecnie w kontroli pochodzenia koni (Dimoski, 2003; Equine Genetics and Parentage Analysis Workshop, 2012; Van de Goor i in., 2010)

<i>Locus</i>	Lokalizacja (chromosom)	Motyw powtórzony	Zakres alleli (pz)
AHT4	24q14	(AC) <sub>n</sub> AT(AC) <sub>n</sub>	144–164
AHT5	8	(GT) <sub>n</sub>	126–144
ASB2	15q21.3-q23	(GT) <sub>n</sub>	216–250
ASB17	2p14-p15	(AC) <sub>n</sub>	87–129
ASB23	3q22.1-q22.3	(TG) <sub>n</sub> and (TG) <sub>n</sub> TT(TG) <sub>4</sub>	175–211
CA425*	28q18	(GT) <sub>n</sub>	226–246
HMS1*	15	(TG) <sub>n</sub>	170–186
HMS2	10	(CA) <sub>n</sub> (TC) <sub>2</sub>	222–248
HMS3	9	(TG) <sub>2</sub> (CA) <sub>2</sub> TC(CA) <sub>n</sub> oraz (TG) <sub>2</sub> (CA) <sub>2</sub> TC(CA) <sub>n</sub> GA(CA) <sub>5</sub>	148–170
HMS6	4	(GT) <sub>n</sub>	151–169
HMS7	1q25	(AC) <sub>2</sub> (CA) <sub>n</sub>	165–185
HTG4	9	(TG) <sub>n</sub> AT(AG) <sub>5</sub> AAG(GA) <sub>5</sub> , ACAG(AGGG) <sub>3</sub>	127–139
HTG6*	15q26-q27	(TG) <sub>n</sub>	84–102
HTG7*	4	(GT) <sub>n</sub>	118–128
HTG10	21	(TG) <sub>n</sub> and TATC(TG) <sub>n</sub>	95–115
LEX3*	Xq	(TG) <sub>n</sub>	142–164
VHL20	30	(TG) <sub>n</sub>	87–105

\* markery dodatkowe

Efektywność stosowanego obecnie zestawu siedemnastu rekomendowanych sekwencji mikrosatelitarnych scharakteryzowano dla wielu ras koni, potwierdzając skuteczność ich działania. Badania te były prowadzone między innymi dla polskiej populacji koni (Gralak i in., 1998; Ząbek i in., 2006). Badania z użyciem markerów DNA wraz ze szczegółową analizą rodowodową umożliwiają nie tylko weryfikację pochodzenia. Mogą być także stosowane m.in. w doborze optymalnego wariantu krzyżowania, tak aby zminimalizować efekty związane ze wzrostem inbrodu w rasach. Markery mikrosatelitarne są użytecznym narzędziem w badaniu struktury ras, a także w przypadku prowadzenia selekcji na określone cechy użytkowe pożądane przez hodowców (Negro i in., 2016).

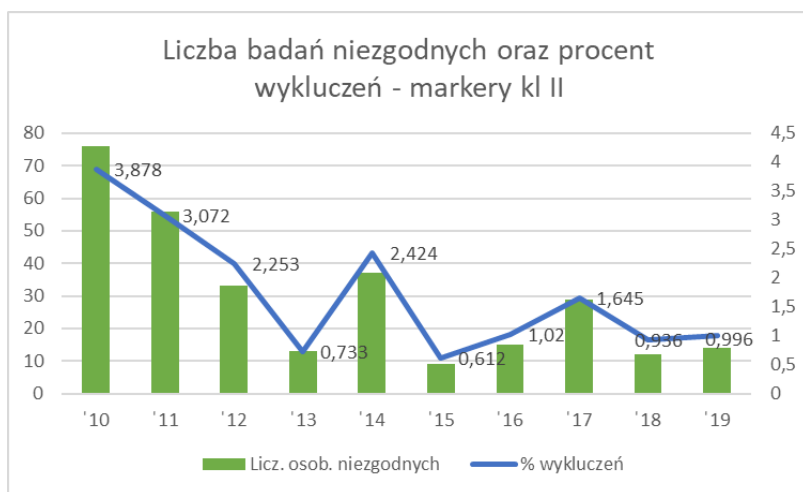
Głównym celem badań kontroli rodowodów koni jest weryfikacja pochodzenia przed wprowadzeniem zwierzęcia do hodowli. W Polsce kontrola pochodzenia koni stanowi warunek wpisania konia do ksiąg hodowlanych. Poza weryfikacją rodowodową, świadczoną dla związków hodowlanych i hodowców indywidualnych, w Laboratorium Genetyki Molekularnej IZ PIB prowadzimy monitoring zmienności genetycznej, oceniamy skuteczność potwierdzania pochodzenia oraz efektywność weryfikacji rodowodów na podstawie badań niezgodnych. Gdy badania prowadzono wyłącznie w oparciu o markery klasy pierwszej, odsetek liczby badań niezgodnych względem wszystkich badań w danym roku był znaczny, na poziomie kilku procent (rys. 1).



Rys. 1. Liczba badań niezgodnych oraz procent wykluczeń w oparciu o markery klasy I dla badań prowadzonych w latach 2000–2005 w Instytucie Zootechniki

Lata pracy naszego Laboratorium, Laboratorium Grup Krwi w Chorzowie oraz Polskiego Związku Hodowców Koni nad rzetelnością zapisów

i weryfikacją rodowodów koni przyczyniły się do sukcesywnego zmniejszania liczby badań niezgodnych. Przyczyniły się do tego również – obowiązek wykonywania i powszechność badań genetycznych. Analiza badań niezgodnych w ostatnich latach (rys. 2) wskazuje skuteczność i zasadność prowadzonych prac genetycznych.



Rys. 2. Liczba badań niezgodnych oraz procent wykluczeń w oparciu o markery klasy II dla badań prowadzonych w latach 2010–2019 w Instytucie Zootechniki

Poza testami rutynowymi prowadzimy między innymi badania naukowe nad zmiennością genetyczną i genetyką populacyjną na podstawie polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych dla ras koni hodowanych w Polsce. Efektem prac jest weryfikacja przydatności markerów jako narzędzi molekularnych do rutynowych testów kontroli pochodzenia oraz monitorowanie zmian zachodzących w strukturach genetycznych badanych ras i populacji koni. W zakresie naszych prac badawczych są także badania z zastosowaniem polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP). Markery te odgrywają coraz większą rolę w kontroli pochodzenia zwierząt, jednakże prace nad nowym panelem SNP dla koni nie są tak intensywne i zaawansowane jak na przykład w przypadku kontroli pochodzenia bydła. Na chwilę obecną trzy zespoły zgłosiły swoje propozycje paneli SNP do kontroli pochodzenia koni (Tozaki SNPs (53 SNPs) – Japonia, Etalon SNPs (101 SNPs) – USA oraz nasze laboratorium – LGM (66 SNPs)). Prace nad zestawami tych markerów są na etapie testowania zmienności różnych ras koni i weryfikacji SNP jako narzędzi do kontroli pochodzenia. Markery SNP są bialleliczne, mają najniższy wskaźnik zmienności ze wszystkich markerów

genetycznych i są łatwiejsze do walidacji. Istnieje prawdopodobieństwo, że tak, jak to się już dzieje powoli u bydła mlecznego, markery SNP mogą zastąpić markery STR w przyszłości.

### Literatura

- Dimoski P. (2003). Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croatian Med. J.*, 44: 332–335.
- Equine Genetics and Parentage Analysis Workshop (2012). *Equine Genetics & Thoroughbred Parentage Testing Standardisation Workshop*; <http://www.isag.us/Docs/EquineGenParentage2012.pdf>: 1–14.
- Fornal A., Radko A., Rychlik T., Piestrzyńska-Kajtoch A., Bąk A. (2014). Zastosowanie polimorfizmu mikrosatelitarnego DNA w kontroli rodowodów koni. *Wiad. Zoot.*, LII, 2: 70–74.
- Gralak B., Kurył J., Łukaszewicz M., Żurkowski M. (1998). Applicability of nine microsatellite DNA sequences vs eleven polymorphic blood protein and enzyme systems for the parentage control in Polish Arabian and Thoroughbred horse. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 16 (4): 209–218.
- Kakoi H., Kikuchi M., Tozaki T., Hirota K.I., Nagata S.I. (2019). Evaluation of recent changes in genetic variability in Japanese thoroughbred population based on a short tandem repeat parentage panel. *Anim. Sci. J.*, 90 (2): 151–157.
- Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L. (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.*, 25 (1): 19–23.
- Negro S., Solé M., Pelayo R., Gómez M.D., Azor P.J., Valera M. (2016). Molecular diversity between two cohorts of six Spanish riding-horse breeds: Impact of selection in Crossbred vs Purebred populations. *Livest. Sci.*, 193: 88–91.
- Van de Goor L.H.P., Panneman H., van Haeringen W.A. (2010). A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Anim. Genet.*, 41: 122–127.
- Ząbek T., Żyga A., Radko A., Słota E. (2006). Analysis of genetic variation in Małopolski horses using molecular and pedigree data. *Ann. Anim. Sci.*, 6 (1): 13–27.

## 6. Identyfikacja zwierząt towarzyszących i wolno żyjących

Angelika Podbielska, Anna Radko

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

### Identyfikacja zwierząt towarzyszących i wolno żyjących

W Instytucie Zootechniki PIB identyfikacja zwierząt hodowlanych na podstawie analizy DNA znalazła szerokie zastosowanie w kontroli rodowodów bydła, koni, owiec i świń. W ostatnich latach badania te znalazły również zastosowanie w badaniach zwierząt towarzyszących, tj. psów, kotów, gołębi, alpak oraz zwierząt wolno żyjących: jeleni, wilków i dzików.

Największe zapotrzebowanie na badania identyfikacyjne obserwujemy u psów, które cieszą się bliskim związkiem z człowiekiem jako towarzysze rodziny, ale także jako zwierzęta hodowlane. W Laboratorium Genetyki Molekularnej IZ PIB, wychodząc naprzeciw potrzebom hodowców i właścicieli psów wprowadzono metodę identyfikacji psów na podstawie analizy DNA. Opracowano i zastosowano metodę multipleksowej analizy markerów mikrosatelitarnych DNA, określanych jako STR (*short tandem repeats*). Markery te są obecnie najpopularniejszym narzędziem do identyfikacji osobniczej i analizy rodowodowej zarówno ludzi (Kling i in., 2017; Coble i in., 2016; Dumache i in., 2016), jak i zwierząt (Linacre i in., 2011), w tym również psów (Halverson i Basten, 2005; Scharnhorst i Kanthaswamy, 2011; Ciampolini i in., 2017).

Do 2015 r. do rutynowych badań identyfikacyjnych psów w Laboratorium Genetyki Molekularnej stosowano zestaw zawierający panel 18 markerów mikrosatelitarnych DNA: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTh260, AHTk253, INU005, INU030, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTh171, REN247M23 oraz genu *amelogeniny* – AMEL, zalecanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG. Obecnie w LGM stosowany jest rekomendowany przez ISAG zestaw 21 markerów, który zawiera 3 uzupełniające markery: AHTh130, REN64E19 i REN105L03. Analiza 21 markerów mikrosatelitarnych oraz genu AMEL jest przeprowadzana w dwóch zestawach multipleksowych STR: 13-plex i 11-plex. Pierwszy z nich zawiera: AHTk211, REN169O18, REN54P11, INRA21, REN169D01, AHTh260, INU005, INU030, AMEL, AHT121, FH2054, AHTh171 i REN247M23. W skład drugiego wchodzi: CXX279, INU055, REN105L03, AHT137, AHTK253, AHTh130, FH2848, REN64E19, REN162C04, REN247M23

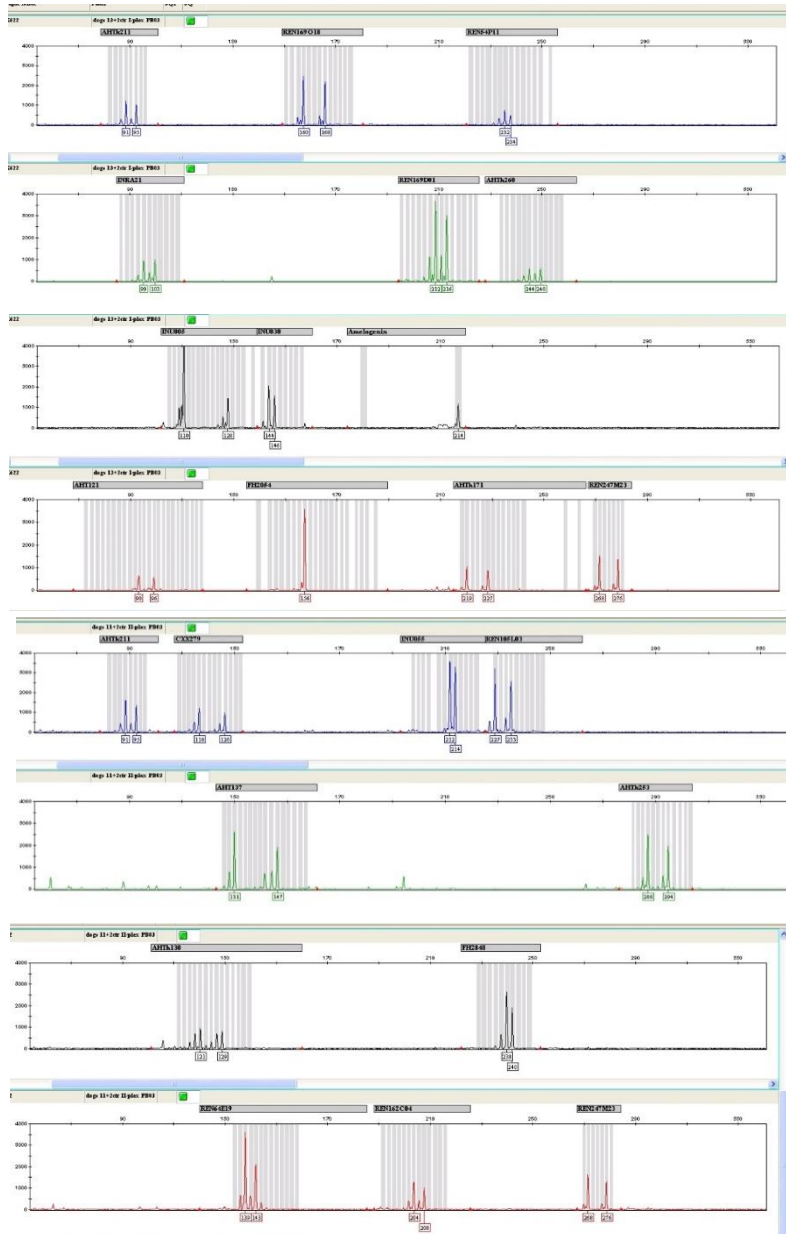


i AHTk211. Markery REN247M23 i AHTk211 amplifikowane w każdym zestawie stanowią wewnętrzne markery kontrolne.

Identyfikacja alleli w 21 *loci* mikrosatelitarnych DNA i na tej podstawie ustalenie profilu DNA unikalnego dla każdego osobnika (rys. 1), pozwala na przeprowadzenie analizy porównawczej profili DNA, która poparta statystyką stanowi skuteczną metodę identyfikacji osobniczej psów (Halverson i Basten, 2005; Scharnhorst i Kanthaswamy, 2011; Ciampolini i in., 2017). Szacowane prawdopodobieństwo wykluczenia (PE) na podstawie stosowanego zestawu 21 *loci* STR daje ponad 99,9 % prawdopodobieństwo właściwie potwierdzonego pochodzenia i 100% pewność wykluczenia pochodzenia (Radko i Słota, 2009; Radko i in., 2018).

Markery stosowane w laboratorium są co dwa lata testowane i standaryzowane w międzynarodowych testach porównawczych DNA organizowanych przez ISAG, a metoda „Identyfikacja osobnicza psów w multipleksowych systemach STR” – PB03 w LGM IZ PIB jest akredytowana przez Polskie Centrum Akredytacji. Wykonywanie badań na najwyższym poziomie potwierdzonych Certyfikatem Jakości umożliwia wystawianie uznawanych międzynarodowo ekspertyz pochodzenia i certyfikatów DNA psów.

W ostatnich latach do IZ PIB zaczęły wpływać zapytania dotyczące identyfikacji osobniczej kotów. Na potrzeby hodowców, Laboratorium Genetyki Molekularnej przygotowało metodę identyfikacji osobniczej opartej, podobnie jak dla psów, na analizie mikrosatelitarnego DNA. Do badań zastosowano markery rekomendowane przez ISAG do identyfikacji i kontroli rodowodów kotów. Przygotowany panel markerów mikrosatelitarnych DNA zawiera 10 *loci*: FCA310, FCA220, FCA069, FCA441, FCA075, FCA229, FCA678, FCA149, FCA105 oraz AMEL *locus*. Laboratorium Genetyki Molekularnej po raz pierwszy wzięło udział w międzynarodowym teście porównawczym Cat Comparison Test 2018–2019, co pozwoliło na standaryzację wartości alleli i możliwość wystawiania profilu DNA, który może być porównywalny z laboratoriami na całym świecie.



Rys. 1. Profil DNA w 21 mikrosatelitarnych *loci* DNA i *AMEL locus* u psa

W ostatnich latach hodowla gołębi pocztowych budzi coraz większe zainteresowanie. Organizowane są wystawy, wyścigi i olimpiady tych ptaków, a ich ceny sięgają nawet kilkadziesiąt tysięcy euro.

Pierwsze próbki w postaci gołębih piór z dutką wpłynęły do Laboratorium Genetyki Molekularnej w 2011 r. Celem przeprowadzonej analizy było ustalenie profilu DNA w 10 loci STR oraz ustalenie płci danego osobnika. Markerami, na podstawie których ustalano profil DNA były: Cl $\mu$ D01, Cl $\mu$ D16, Cl $\mu$ D32, Cl $\mu$ T13, Cl $\mu$ T17, PG2, PG3, PG5, PG6, PG7 oraz marker CHD do ustalenia płci.

Od 2017 r. wprowadzono panel mikrosatelit rekomendowany przez ISAG: Cl $\mu$ D01, Cl $\mu$ D11, Cl $\mu$ D16, Cl $\mu$ D17, Cl $\mu$ D19, Cl $\mu$ D35, Cl $\mu$ T02, Cl $\mu$ T13, Cl $\mu$ T17, Cl $\mu$ T43, PIGN4, PIGN57, PIGN10, PIGN12, PIGN15, PIGN26. Standaryzowaną nomenklaturę uzyskano dzięki udziałowi w międzynarodowych testach biegiłości i zarówno w teście Pigeon Comparison Test 2015/2016, jak i Pigeon Comparison Test 2018/2019 uzyskano 1 rank zgodności genotypowania. Dzięki standaryzowanej nomenklaturze certyfikat uzyskany w Laboratorium Genetyki Molekularnej może być wykorzystany na całym świecie, a profile porównywane z innymi laboratoriami, które również mają standaryzację ISAG.

W 2019 r. Laboratorium Genetyki Molekularnej zgłosiło udział jako Duty Laboratory w kolejnym teście biegiłości Pigeon Comparison Test 2020/2021, co wiąże się z funkcją organizowania takiego międzylaboratoryjnego testu porównawczego.

Od 2020 r. Laboratorium Genetyki Molekularnej posiada akredytację Polskiego Centrum Akredytacji procedury badawczej PB07 pt.: „Identyfikacja osobnicza gołębi w multipleksowych systemach STR” zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025:2017. W ramach procedury Laboratorium zgodnie z wytycznymi PCA oferuje:

- ustalenie profilu DNA danego osobnika – genotyp,
- przeprowadzenie badania jednostronnego – potwierdzenie bądź wykluczenie osobnika po wskazanej matce lub ojcu, w tym przypadku badany jest tylko jeden z rodziców, a prawdopodobieństwo pochodzenia osobnika po wskazanym rodzicu obliczono na poziomie wyższym niż 99,8%,
- przeprowadzenie badania obustronnego – potwierdzenie bądź wykluczenie osobnika po wskazanej parze rodzicielskiej, w tym przypadku badani są obydwój rodzice, a prawdopodobieństwo pochodzenia osobnika po wskazanych rodzicach obliczono na poziomie wyższym niż 99,99%,
- ustalenie płci.

Alpaki są hodowane ze względu na wysoką jakość wełny. Wykorzystuje się je zarówno jako zwierzęta użytkowe w hodowli, jak i towarzyszące w tzw. alpakoterapii. Na wniosek Ministra Rolnictwa w 2019 r. Rada Ministrów przyjęła projekt ustawy o organizacji hodowli i rozrodzie zwierząt gospodarskich. Zgodnie z postulatami hodowców alpaki, została rozszerzona lista zwierząt gospodarskich o ten gatunek, aby umożliwić prowadzenie hodowli alpaki w sposób właściwy dla zwierząt gospodarskich. Po uznaniu alpaki za zwierzęta gospodarskie i utworzeniu dla nich ksiąg hodowlanych prognozowano zwiększenie ich populacji w Polsce, a tym samym przeprowadzenie kontroli pochodzenia, którą wykonuje się w oparciu o markery DNA sekwencji mikrosatelitarnych.

Laboratorium Genetyki Molekularnej w 2019 r. opracowało procedurę badawczą pt.: „Identyfikacja osobnicza alpaki i lamy w multipleksowych systemach STR” i jako pierwsze w Polsce rozpoczęło komercyjne badania genetyczne z zakresu identyfikacji osobniczej oraz potwierdzenia pochodzenia dla alpaki i lamy. Jest to bardzo istotna kwestia przy weryfikacji pochodzenia, niezbędnej do wpisywania kolejnych osobników do ksiąg hodowlanych. Możliwość identyfikacji osobniczej alpaki i lamy może być również istotnym narzędziem w kwestiach spornych, które zawsze występują w procesie hodowli zwierząt.

Do przeprowadzenia kontroli pochodzenia wykorzystywany jest rekomendowany przez ISAG panel 12 markerów mikrosatelitarnych: LCA5, LCA8, LCA19, LCA37, LCA56, LCA65, LCA66, LCA94, LCA99, LGU49, LGU50, YWLL44. Obecnie rozpoczęły się próby opracowania drugiego panelu mikrosatelitarnego, który pozwoliłby na oznaczenie pozostałych markerów wykorzystywanych u alpaki i lamy. Opracowywany jest także test molekularny, umożliwiający odróżnienie hybrydy powstałej z krzyżowania alpaki i lamy od alpaki, gdy zawodzą metody oceny fenotypowej.

Laboratorium Genetyki Molekularnej planuje również wziąć udział w najbliższym międzynarodowym teście biegłości organizowanym przez ISAG – Llama/Alpaca Comparison Test 2020/2021, aby nomenklatura, która jest wykorzystywana do przeprowadzania kontroli pochodzenia na podstawie powyższych markerów była standaryzowana, a certyfikaty z profilem DNA uzyskane w Laboratorium Genetyki Molekularnej mogły być wykorzystane na całym świecie.

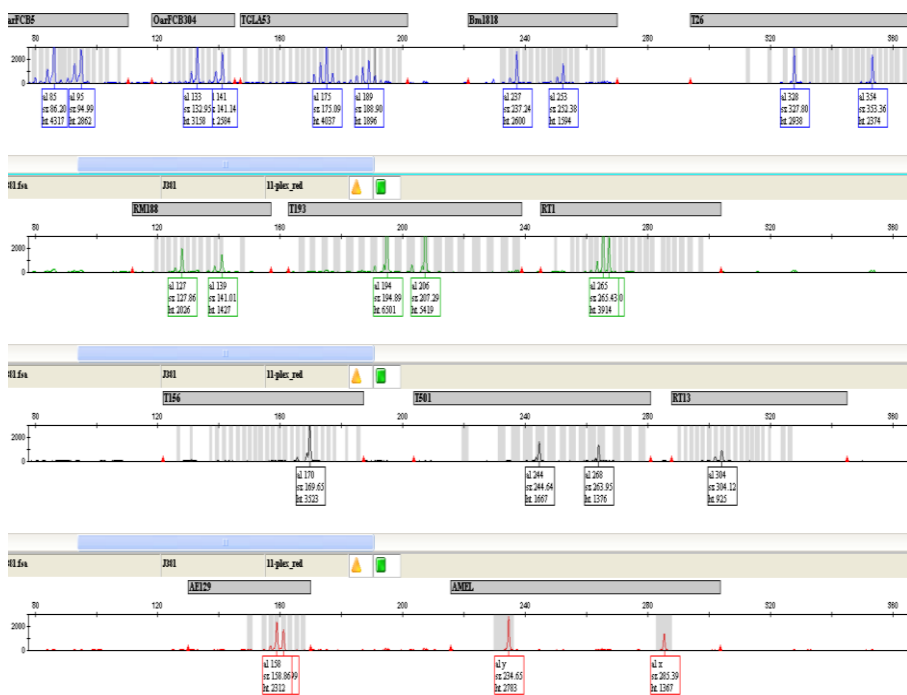
Obecnie LGM oferuje badania:

- ustalenie profilu DNA danego osobnika (genotyp),
- przeprowadzenie badania jednostronnego (potwierdzenie bądź wykluczenie osobnika po wskazanej matce lub ojcu, w tym przypadku badany jest tylko jeden z rodziców),

- przeprowadzenie badania obustronnego (potwierdzenie bądź wykluczenie osobnika po wskazanej parze rodzicielskiej, w tym przypadku badani są obydwój rodzice).

Wykorzystanie automatycznej analizy DNA do badań identyfikacji osobniczej zwierząt pozwoliło na wprowadzenie takich badań u zwierząt wolno żyjących, co w ostatnim czasie spotkało się ze znacznym zainteresowaniem. Analiza DNA jeleni, dzików czy wilków umożliwia identyfikację osobniczą zwierząt na potrzeby prokuratury, sądów, policji, towarzystwa opieki nad zwierzętami. Są to sprawy karne, najczęściej dotyczące kradzieży, kłusownictwa, znęcania się nad zwierzętami bądź uśmiercania ich w okrutny sposób, gdzie materiałem dowodowym są różnego rodzaju mikroślady znalezione w miejscu zbrodni.

Jednym z najważniejszych zwierząt łownych, jak również hodowlanych występujących w Polsce jest jelen ślachtetny. Duże zainteresowanie różnicowaniem genetycznym jeleni, zarówno wolno żyjących, jak i hodowlanych oraz wykonywanie badań w celu opracowania opinii DNA dotyczących identyfikacji jeleni spowodowały konieczność opracowania w LGM panelu markerów STR do ich identyfikacji. Badania mające na celu ocenę polimorfizmu wybranych sekwencji mikrosatelitarnych, opracowanie zestawów multipleksowych STR mających zastosowanie w badaniach identyfikacyjnych u jeleniowatych przeprowadzono w wielu krajach na całym świecie (Martinez i in., 2002; Cosse i in., 2007; Frantz i in., 2008; Pérez-Espona i in., 2008). W przeprowadzonych badaniach własnych testowano 45 sekwencji mikrosatelitarnych specyficznych dla gatunków *Bovidae* i *Cervidae* u ponad 450 jeleni. Na podstawie przeprowadzonych w 2011 r. analiz konserwatywności genetycznej ustalono panel polimorficznych markerów mikrosatelitarnych DNA, który z powodzeniem znalazł zastosowanie w identyfikacji jeleni występujących w polskiej populacji. Opracowany zestaw zawiera 12 markerów STR: BM1818, OarAE129, OarFCB5, OarFCB304, RM188, RT1, RT13, T26, T156, T193, T501, TGLA53 oraz gen amelogeniny – AMEL, analizowane w jednej reakcji multipleksowej w sekwenatorze kapilarnym (Radko, 2011) (rys. 2).



Rys. 2. Profil DNA w 12 mikrosatelitarnych *loci* DNA i *AMEL locus* u jelenia

Badania polimorfizmu mikrosatelitarnego wilków i dzików są przeprowadzane zarówno na zlecenie prokuratur, sądów i komisariatów policji w ekspertyzach sądowych, jak i na zamówienia prywatne, gdyż są doskonałym narzędziem do monitorowania populacji danego gatunku.

Do przeprowadzenia identyfikacji osobniczej wilków wykorzystywany jest panel 19 markerów mikrosatelitarnych: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTTh260, AHTk253, INU005, INU030, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTTh171, REN247M23 i AMEL.

Do przeprowadzenia identyfikacji osobniczej dzików wykorzystywane są 2 panele po 8 markerów mikrosatelitarnych. Iplex składający się z: IGF1, S026, S215, SW72, SW857, SW1492, SW2021, SW2532 oraz II plex, w skład którego wchodzi: S0090, S0155, S0355, SW24, SW122, SW461, SW951, SW2496. Laboratorium wykorzystuje również komercyjny zestaw „Animaltype Pig Multiplex PCR Test kits” firmy Biotype Diagnostic GmbH składający się z 11 mikrosatelitarnych *loci*: SBH1, SBH2, SBH4, SBH10, SBH13, SBH18, SBH19, SBH20, SBH22, S0655, 387A12F oraz SBH23 do ustalania płci.

## Piśmiennictwo

- Ciampolini R., Cecchi F., Spinetti I., Rocchi R., Biscarini F. (2017). The use of genetic markers to estimate relationships between dogs in the course of criminal investigations. *BMC Res Notes.*, 10: 414.
- Coble M.D., Buckleton J., Butler J.M., Egeland T., Fimmers R., Gill P., Gusmão L., Guttman B., Krawczak M., Morling N., Parson W., Pinto N., Schneider P.M., Sherry S.T., Willuweit S., Prinz M. (2016). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Recommendations on the validation of software programs performing biostatistical calculations for forensic genetics applications. *Forensic Sci. Int. Genet.*, Nov; 25: 191–197.
- Cosse M., González S., Maldonado J.E. (2007). Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Genet. Mol. Res.*, 6: 1118–1122.
- Dumache R., Muresan C., Ciocan V., Rogobete A.F., Enache A. (2016). Post-mortem identification of a fire carbonized body by STR genotyping. *Clin Lab.*, 1; 62 (10): 2033–2037.
- Frantz A.C., Hamann J.-L., Klein F. (2008). Fine-scale genetic structure of red deer (*Cervus elaphus*) in a French temperate forest. *Eur. J. Wildl. Res.*, 54: 44–52.
- Halverson J.L., Basten C. (2005). Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. *Croat. Med. J.*, 46 (4): 598–605.
- Kling D., Egeland T., Piñero M.H., Vigeland M.D. (2017). Evaluating the statistical power of DNA-based identification, exemplified by 'The missing grandchildren of Argentina'. *Forensic Sci. Int. Genet.*, Nov; 31: 57–66.
- Linacre A., Gusmão L., Hecht W., Hellmann A.P., Mayr W.R., Parson W., Prinz M., Schneider P.M., Morling N. (2011). ISFG: recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.*, Nov; 5 (5): 501–505.
- Martinez M.J.G., Carranza J., Fernández J.L., Sánchez-Prieto C. (2002). Genetic variation of red deer populations under hunting exploitation in southwestern Spain. *J. Wildl. Manage.*, 66: 1273–1282.
- Pérez-Espona S., Pérez-Barbería J., McLeod E., Jiggins C.D., Gordon I.J., Pemberton J.M. (2008). Landscape features affect gene flow of Scottish highland red deer (*Cervus elaphus*). *Mol. Ecol.*, 17: 981–996.
- Radko A. (2011). Identyfikacja osobnicza zwierząt w oparciu o markery mikrosatelitarne DNA na przykładzie bydła domowego (*Bos taurus*) i jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus*). *Rocz. Nauk. Zoot., Monogr. Rozpr.*, 45: 1–115.
- Radko A., Słota E. (2009). Application of 19 microsatellite DNA markers for parentage control in Borzoi dogs. *Pol. J. Vet. Sci.*, 12 (1): 113–117.
- Radko A., Rubiś D., Szumiec A. (2018). Analysis of microsatellite DNA polymorphism in the Tatra Shepherd Dog. *J. Appl. Anim. Res.*, 46: 1: 254–256.
- Scharnhorst G., Kanthaswamy S. (2011). An assessment of scientific and technical aspects of closed investigations of canine forensics DNA – case series from the University of California, Davis, USA. *Croat. Med. J.*, Jun; 52 (3): 280–292.

## 7. Wykorzystanie technik cytomolekularnych w nowoczesnej hodowli zwierząt

**Anna Kozubska-Sobocińska, Katarzyna Kowalska, Wojciech Witarski**

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Zakres badań cytogenetycznych obejmuje analizy struktury i funkcjonowania aparatu genetycznego komórki z uwzględnieniem efektów fenotypowych identyfikowanych nieprawidłowości kariotypu. Konwencjonalna diagnostyka cytogenetyczna polega na mikroskopowej analizie chromosomów metafazowych lub prometafazowych uzyskanych metodą hodowli limfocytów krwi *in vitro* i barwionych odczynnikiem Giemsa, co pozwala określić liczbę diploidalną i morfologię chromosomów. Następnym etapem diagnostycznym jest różnicujące barwienie prążkowe QFQ, GTG lub RBA i jego modyfikacje (o rozdzielczości 5–10 mln par zasad oraz od 300 do 450 prążków Q, G i R w haploidalnym zestawie chromosomów), które umożliwiają identyfikację poszczególnych par chromosomów homologicznych oraz ustalenie kariotypu konkretnego osobnika. Rozszerzeniem standardowej analizy cytogenetycznej są wysokorozdzielcze techniki prążkowe – HRBT (2–5 mln par zasad), w wyniku których uzyskuje się rozdzielczość od 600 do 900 prążków i subprążków G lub R w haploidalnym zestawie chromosomów prometafazowych. Należy zaznaczyć, że techniki barwienia różnicującego są podstawowym narzędziem w diagnostyce nieprawidłowości chromosomowych oraz cytogenetycznych badaniach przesiewowych, a także niezbędnym elementem badań genomu dotyczących międzygatunkowych homologii chromosomów, fizycznego mapowania genów, lokalizacji konstruktów genowych w genomach zwierząt transgenicznych, jak również konstrukcji gatunkowych map cytogenetycznych.

Badania cytogenetyczne zwierząt hodowlanych prowadzone w Polsce od połowy lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku początkowo obejmowały dwa gatunki: bydło i świnię. Kariotyp bydła, ze względu na akrocentryczną morfologię autosomów, oceniano głównie na podstawie analizy chromosomów barwionych konwencjonalnie i tylko w uzasadnionych przypadkach stosowano techniki barwienia różnicowego. Z kolei, ze względu na duże zróżnicowanie morfologii autosomów w kariotypie świni, ocenę cytogenetyczną u tego gatunku przeprowadzano na podstawie chromosomów metafazowych barwionych głównie technikami GTG, QFQ i RBA (Słota i in., 1988, 2004; Danielak-Czech i Słota, 2007, 2008 a).

Wieloletnie badania populacji bydła wykazały, że najczęstszą mutacją chromosomową są fuzje centryczne zwane translokacjami robertsonowskimi.



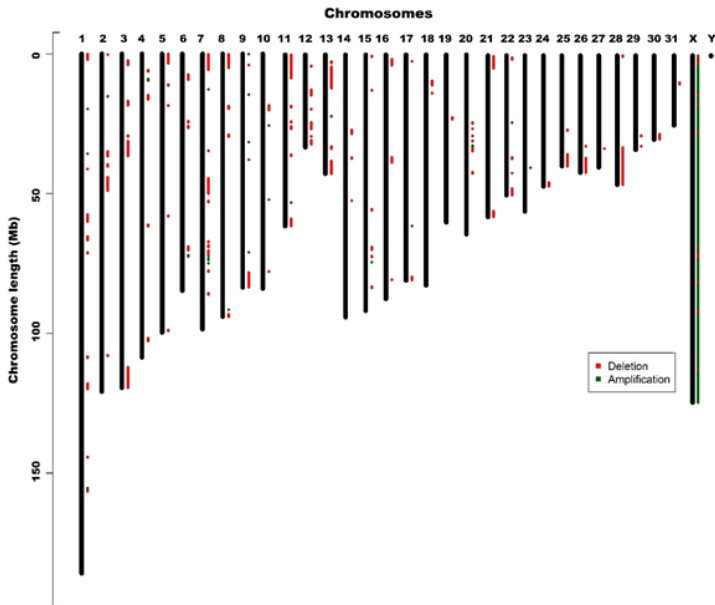
Dotychczas na świecie zdiagnozowano ponad 60 różnych translokacji robertsonowskich w wielu rasach, zarówno prymitywnych jak i szlachejnych, przy czym najczęściej identyfikowano translokację robertsonowską 1;29. Również w Polsce fuzję centryczną 1;29 diagnozowano w populacji bydła rasy Charolaise, u potomstwa trzech buhajów rasy Blond d'Aquitaine, a także u osobników ras: nizinnej czarno-białej, nizinnej czerwono-białej i polskiej czerwonej (Słota i in., 2004). W polskiej populacji bydła, oprócz fuzji 1;29, zidentyfikowano dwie inne translokacje robertsonowskie. W pierwszą zaangażowane były chromosomy z par 13 i 24, natomiast w drugą – dicentryczną autosomy z par 5 i 22 (Słota i in., 1988; Słota i Świtoński, 1992). Następną aberracją stwierdzaną u bydła to trisomia XXY. Spośród kilkunastu zarejestrowanych na świecie nosicieli tego syndromu cztery przypadki zdiagnozowano w Polsce – u trzech buhajków aberracja wystąpiła w postaci prostej – 61,XXY, natomiast u czwartego w formie chimeryzmu 60,XX/61,XXY (Słota i in., 2003).

Z kolei, efektem monitoringu cytogenetycznego, którym objęto liczne populacje świń na świecie, jest identyfikacja około 200 wad kariotypu, głównie strukturalnych aberracji chromosomowych (ok. 150 translokacji wzajemnych), nielicznych aneuploidii heterosomów oraz kilkunastu przypadków chimeryzmu leukocyтарnego. Spośród dotychczas opisanych u tego gatunku mutacji chromosomowych dziewięć zdiagnozowano w Polsce (wszystkie, z wyjątkiem jednej, w Instytucie Zootechniki PIB): dwie inwersje, pięć translokacji wzajemnych, jedną tandem fuzję-translokację i translokację robertsonowską (Rejduch i in., 2003; Danielak-Czech i Słota, 2007, 2008 b; Danielak-Czech i in., 2006, 2010, 2016).

Systemy kontroli kariotypu rozplodników funkcjonują od wielu lat w licznych krajach europejskich, natomiast w Polsce w Instytucie Zootechniki PIB w Balicach od 1989 r. realizowany jest monitoring cytogenetyczny buhajów i knurów zarodowych. Skuteczność funkcjonowania tego systemu, potwierdzona identyfikacją licznych aberracji chromosomowych, uzasadnia potrzebę kontynuacji i intensyfikacji badań cytogenetycznych (Słota i in., 2004; Danielak-Czech i Słota, 2008 a; Kozubska-Sobocińska i Danielak-Czech, 2017).

Możliwości analizy cytogenetycznej w znaczący sposób wzbogaciła technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Obserwacje sygnałów hybrydyzacyjnych na heterosomach pozwoliły na zdiagnozowanie licznych przypadków aneuploidii u koni (Bugno i in., 2006, 2007; Bugno i Słota, 2007), chimeryzmu leukocyтарnego u bydła, owiec i kóz (Kozubska-Sobocińska i in., 2003, 2011, 2016, 2018, 2019; Rejduch i in., 2004; Rychlik i in., 2005), trisomii XXY u buhajka (Słota i in., 2003). Metoda ta została również wykorzystana do identyfikacji chromosomów płci w plemnikach (Kozubska-Sobocińska i Rejduch, 2008), a także w analizie przebiegu mejozy w preparatach uzyskanych z fragmentów gonad (Kozubska-Sobocińska i in., 2009).

Obecnie, dzięki rozwojowi molekularnych technik cytogenetycznych możliwe jest wykorzystanie do analizy kariotypu innowacyjnej, wysoko precyzyjnej techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH).



Ryc. 1. Przykładowy wykres przedstawiający mapę rozmieszczenia CNV na chromosomach konia, uzyskany po analizie techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (schemat własny)

Pozwala ona na identyfikację zmian niewidocznych w standardowym badaniu cytogenetycznym aberracji submikroskopowych z niespotykaną jak dotąd rozdzielczością, sięgającą od kilkuset do kilku-kilkunastu par zasad, bez konieczności prowadzenia hodowli komórkowej. Technika ta umożliwia jednoczesną identyfikację aneuploidii, duplikacji, delecji oraz amplifikacji każdego fragmentu genomu obecnego na macierzy. Metoda polega na wyznakowaniu dwóch izolatów DNA (badanego i referencyjnego) różnymi fluorochromami i porównaniu natężenia fluorescencji w chromosomach danej pary. Różnice w intensywności fluorescencji w próbce badanej w stosunku do DNA wzorcowego świadczą o zaburzeniach w liczbie kopii analizowanych fragmentów genomu (CNV – ang. *Copy Numer Variation*). Warianty liczby kopii definiowane jako segmenty DNA o wielkości od 1 kbp do kilku Mbp, w których zaobserwowano relatywne zwiększenie lub zmniejszenie liczby kopii

w porównywanych genomach (Scherer i in., 2007), mogą mieć istotny wpływ na fenotypową różnorodność, przystosowanie środowiskowe, zmienność w genach kontrolujących rozwój płciowy, funkcje rozrodcze czy regulację hormonalną organizmu (Lin i in., 2009). Obecnie w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym identyfikowane są zmiany chromosomowe i mikrorearanżacje w genomie końskim u osobników obarczonych zaburzeniami rozrodczymi lub rozwojowymi (Kowalska i in., 2017).

Techniki molekularne (FISH, PRINS i aCGH) wprowadzane do diagnostyki cytogenetycznej zwierząt znacznie zwiększają zakres i precyzję badań cytogenetycznych, gdyż oprócz oceny prawidłowości kariotypu umożliwiają identyfikację chromosomów, fizyczną lokalizację genów (Danielak-Czech i in., 2014), identyfikację rearanżacji chromosomowych oraz ocenę polimorfizmu chromosomowego, konserwatywności genetycznej i badań filogenetycznych w aspekcie ewolucji kariotypu (Bugno-Poniewierska i in., 2009).

### Piśmiennictwo

- Bugno M., Słota E. (2007). Application of arm-specific painting probes of horse X chromosome for karyotype analysis in an infertile Hutsul mare with 64,XX/65,XX+Xp. *Acta Vet. Hung.*, 3: 309–314.
- Bugno M., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., Włodarczyk N., Słota E. (2006). A probe generated by chromosome microdissection, useful for detection of equine X chromosome aneuploidy. *Ann. Anim. Sci.*, 2: 205–210.
- Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C. (2007). Detection of equine X chromosome mosaicism in mare using a horse X Whole Chromosome Paint Probe WCPP. *Acta Vet. Hung.*, 2: 207–212.
- Bugno-Poniewierska M., Wnuk M., Witarski W., Słota E. (2009). The fluorescence *in situ* study of highly repeated DNA sequences in domestic horse (*Equus caballus*) and domestic donkey (*Equus asinus*) – Advantages and limits of usefulness in phylogenetic analyses. *J. Anim. Breed. Genet.*, 18 (3): 723–732.
- Danielak-Czech B., Słota E. (2007). A New case of reciprocal translocation (10;13)(q16;q21) diagnosed in an AI boar. *J. Appl. Genet.*, 48 (4): 379–382.
- Danielak-Czech B., Słota E. (2008 a). Karyotype control system of AI boars in Poland: the current survey. *Ann. Anim. Sci.*, 8 (3): 255–262.
- Danielak-Czech B., Słota E. (2008 b). Tandem Fusion-translocation: A unique karyotype rearrangement in the domestic pig. *Ann. Anim. Sci.*, 8 (4): 343–348.
- Danielak-Czech B., Słota E., Bugno M., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C. (2006). Application of chromosome microdissection and chromosome painting techniques for reciprocal translocation in pigs. *Ann. Anim. Sci.*, 6 (2): 219–224.
- Danielak-Czech B., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B. (2010). Diagnosis of tandem fusion-translocation in the boar using FISH technique with human painting probes. *Ann. Anim. Sci.*, 10 (4): 361–366.
- Danielak-Czech B., Kozubska-Sobocińska A., Kruczek K., Babicz M., Rejduch B.

- (2014.) Physical mapping of the HSPB genes in the domestic and wild pigs. *Chromosome Res.*, 22: 414–414.
- Danielak-Czech B., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B. (2016). Molecular cytogenetics in the diagnostics of balanced chromosome mutations in the pig (*Sus scrofa*) – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 16 (3): 679–699.
- Kowalska K., Pawlina K., Witariski W., Wojtaszek M., Bugno-Poniewierska M. (2017). Evaluation of chromosome microrearrangements of a horse applying array CGH. *Mol. Cytogenet.*, 10 (Suppl. 1): 66.
- Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B. (2017). Zasadność systematycznej oceny kariotypu bydła kwalifikowanego do rozrodu. *Med. Weter.*, 73 (8): 451–455.
- Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B. (2008). Identification of heterosomes in spermatozoa of rams with 54,XX/54,XY chimerism. *Vet. Med.-Czech.*, 53 (5): 250–254.
- Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska A. (2003). The application of FISH technique for diagnosing leukocyte chimerism in sheep (in Polish). *Med. Weter.*, 59: 987–989.
- Kozubska-Sobocińska A., Bugno-Poniewierska M., Słota E. (2009). Application of bovine heterosome painting probes to analysis of the bivalent in Rams. *Ann. Anim. Sci.*, 9: 373–378.
- Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B., Słota E., Sysa P.S. (2011). New aspects of degenerative changes in reproductive system of freemartin heifers. *Ann. Anim. Sci.*, 11: 229–239.
- Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B., Rejduch B. (2016). Cytogenetic and molecular diagnostics of XX/XY chimerism in cattle, sheep, and goats – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 16 (4): 989–1005.
- Kozubska-Sobocińska A., Smołucha G., Danielak-Czech B., Witariski W. (2018). Early cytomolecular diagnostics of the Holstein-Friesian breed heifers from heterosexual multiple pregnancies. *Comp. Cytogenet.*, 12 (3): 358–359.
- Kozubska-Sobocińska A., Smołucha G., Danielak-Czech B. (2019). Early Diagnostics of Freemartinism in Polish Holstein-Friesian Female Calves. *Animals*, 9, 971.
- Lin C.H., Lin Y.C., Wu J.Y., Pan W.H., Chen Y.T. i in. (2009). A genome-wide survey of copy number variations in Han Chinese residing in Taiwan. *Genomics*, 94: 241–246.
- Rejduch B., Słota E., Sysa P., Kwaczyńska A., Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B. (2003). Diagnosis of a new reciprocal translocation rcp(9;14)(q14;q23) in infertile boar after the synaptonemal complex analysis. *Ann. Anim. Sci.*, 3 (2): 269–278.
- Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Radko A., Rychlik T., Słota E. (2004). The application of genetic markers for cell chimerism diagnosis in lambs. *J. Anim. Breed. Genet.*, 121: 197–203.
- Rychlik T., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B., Sikora J. (2005). The phenomenon of cell chimerism in goats. *Vet. Med.-Czech.*, 50 (7): 311–314.
- Scherer S.W., Lee C., Birney E., Altshuler D.M., Eichler E.E., Carter N.P., Hurler M.E., Feuk L. (2007). Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat. Genet.*, 39: S7–15.

- Słota E., Danielak B., Kozubska A. (1988). The Robertsonian translocation in cattle quintuplets. Proc. 8<sup>th</sup> Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim., Bristol, ss. 122–124.
- Słota E., Świtoński M. (1992). A new Robertsonian translocation 5;22 in cattle. Studies of banded chromosomes and synaptonemal complexes. Genet. Pol., 33, 3: 227–231.
- Słota E., Kozubska-Sobocińska A., Kościelny M., Danielak-Czech B., Rejduch B. (2003). Detection of the XXY trisomy in a bull by using sex chromosome painting probes. J. Appl. Genet., 44 (3): 379–382.
- Słota E., Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B., Rejduch B., Kowol P., Żyga A. (2004). A note on cytogenetic monitoring of Polish Red cattle. J. Anim. Feed Sci., 13: 65–71.

## **8. Identyfikacja gatunkowa – historia, terażniejszość oraz nowe wyzwania i możliwości**

**Małgorzata Natonek-Wiśniewska, Piotr Krzyścin**

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Początki identyfikacji gatunkowej sięgają lat 80. i pierwszych rozpoznanych przypadków choroby szalonych krów. W odpowiedzi na wykrycie przyczyn tego zjawiska wprowadzono szereg ustaw, mających na celu zakaz spożywania mączek mięsno-kostnych przez przeżuwacze. Aby przepis ten nie pozostał jedynie na papierze, konieczne stało się regularne sprawdzanie potencjalnej obecności zakazanych składników.

Początkowo takie analizy polegały na zastosowaniu metod mikroskopowych do badania głównie tkanek twardych, natomiast do tkanek miękkich wykorzystywano techniki oparte na analizie białek – ich elektroforezie lub wykrywaniu zawartych w nich przeciwciał. W Laboratorium Genetyki Molekularnej trwały w tym czasie prace nad metodą identyfikacji białek bydlęcych w mięsie i jego przetworach, np. w karmie dla zwierząt czy produktach spożywczych. Opracowane metody miały szereg ograniczeń związanych ze swoistością biologiczną, uzależnioną od rodzaju tkanki lub sposobu jej przetworzenia. O ile dla tkanek świeżych specyficzność była 100%, to oznaczenie mączek zwierzęcych nie zawsze było możliwe.

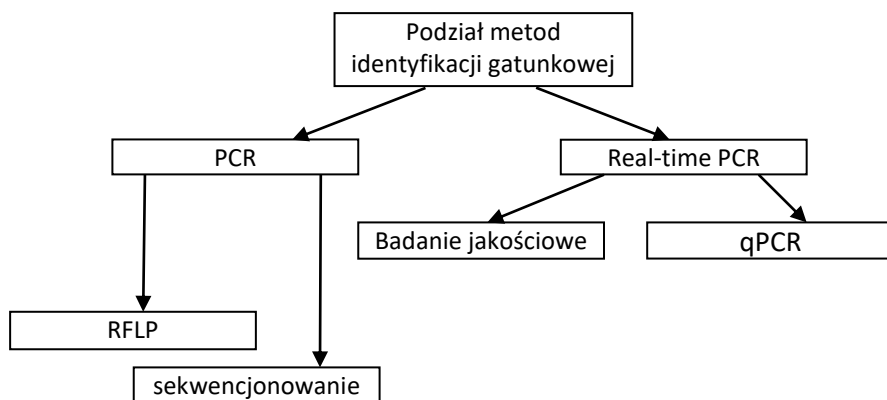
Postęp nauk biologicznych, a w szczególności metod opartych na technologii DNA, umożliwił pokonanie wspomnianych ograniczeń i znacznie ułatwił oraz przyspieszył analizę. Największy rozwój użytecznych tu metod molekularnych nastąpił na początku XXI wieku. Również w Laboratorium Genetyki Molekularnej rozpoczęto w tym czasie badania nad możliwością oznaczenia gatunkowego komponentów zwierzęcych na podstawie DNA.

Początkowo opracowane metody ograniczały się do identyfikacji jakościowej, w której fragmenty DNA specyficzne gatunkowo powielano w reakcji PCR. Następnie, po rozdziale w procesie elektroforezy w żelu agarozowym i analizie wyników w żelu otrzymujemy informację o obecności lub braku oznaczanego gatunku w badanym materiale. Metodę PCR wykorzystywano w laboratorium również jako analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), głównie do oznaczania jeleniowatych, tzn. saren, jeleni, kóz (Natonek-Wiśniewska i in., 2010). Technika ta polega na amplifikacji fragmentów DNA pochodzących od kilku gatunków, a następnie trawieniu odpowiednio wybranymi enzymami restrykcyjnymi, co pozwala na różnicowanie gatunków.

Obecnie w laboratorium, stosując klasyczny PCR, można jakościowo oznaczyć 13 indywidualnych gatunków: bydło, świnię, owce, kury (Natonek-Wiśniewska i in., 2013), kaczki, gęsi (Natonek-Wiśniewska i in., 2016) indyki, konie, koty (Natonek-Wiśniewska, 2009), psy, sarny, kozy, jelenie (Natonek-Wiśniewska i Słota, 2008, 2010) oraz 4 grupy gatunków: drób, przeżuwacze, królestwo zwierząt i domeny eukariotów.

Rozwój nauki i co tym idzie metod analitycznych umożliwił wdrożenie metod opartych na oznaczeniu ilościowym, czyli reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Wprowadzenie ich jest bardzo korzystne, ponieważ pozwala opisać skład ilościowy poszczególnych gatunków.

Obecnie, przy zastosowaniu reakcji real-time PCR, istnieje możliwość oznaczania ilościowego siedmiu pojedynczych gatunków: bydło, świnię, konie, owce (Natonek-Wiśniewska i Krzyścin, 2016), kury (Natonek-Wiśniewska i Krzyścin, 2015), kaczki i gęsi. Przy zastosowaniu tej techniki możemy również oznaczyć DNA należące do domeny eukarioty. Opracowane metody wykorzystują sondy MGB lub barwniki wiążące się z DNA (Eva Green). Metody, zarówno ilościowe jak i jakościowe, wymagają analizy w kierunku obecności konkretnego gatunku lub jego grupy. Odrębnym problemem są próbki, których skład jest całkowicie nieznan. Sposobem umożliwiającym takie badanie jest sekwencjonowanie metodą Sangera, gdzie do analizy wybiera się fragment homologiczny dla kilku gatunków. W ten sposób możemy w szybkim czasie precyzyjnie wyznaczyć przynależność gatunkową próbki. Szczegółowy schemat podziału metod znajduje się na rysunku 1.



Rys. 1. Szczegółowy schemat podziału metod stosowanych w identyfikacji gatunkowej

Każda z tych metod ma swoje zalety i ograniczenia. Zwykle mają bardzo wysoką granicę oznaczalności; niejednokrotnie tak wysoką, że wielkość ta nie ma praktycznego znaczenia w komercyjnych analizach. Wielkość ta, często poniżej 0,001%, nabiera realnego znaczenia przy oznaczaniu niepożądanых substancji śladowych czy przypadkowych artefaktów w próbce.

Ogromnym atutem analizy gatunkowej na podstawie reakcji PCR jest możliwość przeprowadzenia oznaczenia bez względu na rodzaj materiału biologicznego, z którego uzyskujemy DNA. Analiza jest możliwa w materiale surowym (np. mięso, mleko, krew, kości, sierść), przetworzonym (np. kiełbasa, żelatyna, ser, karma dla zwierząt domowych, mączki mięsno-kostne, plazma, kazeina, serwatka), czy zdegradowanym (np. plamy krwi). Skuteczna analiza bez względu na ilość i jakość matrycy jest związana z właściwościami mtDNA; w szczególności wynika ze znacznej ilości jego kopii w każdej komórce oraz z ogromnej odporności na czynniki zewnętrzne, jakim mtDNA może być poddane. Zaleta ta sprawia, że metoda nie ma ograniczeń i może być wykorzystana do bardzo szerokiego spektrum materiału.

Ważnym zagadnieniem dla funkcjonowania Laboratorium jest wprowadzenie systemu jakości laboratoriów badawczych i wzorcujących dla (ISO 17025). Wdrożenie tej normy zaświadcza, że wszystkie badania prowadzone w laboratorium są z nią zgodne i wykonane z odpowiednią dbałością dla wybranej metody badań. Identyfikacja gatunkowa z biegiem lat zyskuje na znaczeniu. Jest stosowana do badania żywności dla ludzi, karmy dla zwierząt, ale także bardzo często do badania mikrośladów. Jest wykorzystywana zarówno do badań komercyjnych, regularnie powtarzalnych, jak oznaczanie wołowiny oraz koniny (badania żywności, paszy), jak również jednorazowych (przykładowo oznaczenie DNA dorsza w plamach krwi). Z tego względu Laboratorium musi być otwarte na możliwość opracowywania coraz to nowych metod. Dostępność sekwencji e w GenBanku sprawia, że opracowanie metody identyfikacji każdego dodatkowego gatunku jest możliwe.

## **Piśmiennictwo**

- Natonek-Wiśniewska M. (2009). Species identification of feline DNA based on analysis of cytochrome b. *Ann. Anim. Sci.*, 4: 379–384.
- Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P. (2015). Opracowanie prostych i skutecznych testów real-time PCR od identyfikacji komponentów bydłych, wieprzowych i owczych w żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, ss. 73–84.
- Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P. (2016). The use of PCR and Real-Time PCR for qualitative and quantitative determination of poultry and chicken meals. *Ann. Anim. Sci.*, 3: 731–741.



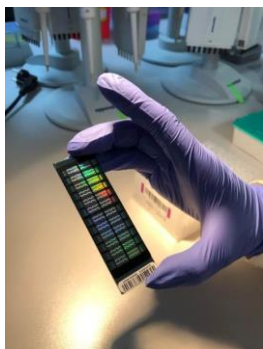
- Natonek-Wiśniewska M., Słota E. (2008). Polymorphism of the cytB gene as a marker for species identification of mammalian mtDNA. *Ann. Anim. Sci.*, 8: 243–247.
- Natonek-Wiśniewska M., Słota E. (2010). Identyfikacja sekwencji genu kodującego dehydrogenazę NADH 1 u sarny. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 37: 145–149.
- Natonek-Wiśniewska M., Słota E., Kalisz B. (2010). Use of cytochrome b polymorphism for species identification of biological material derived from cattle, sheep, goats, roe deer and red deer. *Folia Biol. (Krakow, Pol.)*, 58: 46–50.
- Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P., Piestrzyńska-Kajtoch A. (2013). The species identification of bovine, porcine, ovine and chicken components in animal meals, feeds and their ingredients, based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences. *Food Control.*, 34 (1): 69–78.
- Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P., Bugno-Poniewierska M. (2016). Wykorzystanie polimorfizmu mtDNA do rozróżnienia puchu kaczek i gęsi. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 43 (1): 51–58.

## 9. Wykorzystanie mikromacierzy w ocenie wartości hodowlanej bydła mlecznego

Joanna Warzecha, Magdalena Wojtaszek

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Wartość hodowlana zwierząt przez wiele lat była szacowana pośrednio tylko w oparciu o cechy użytkowe oraz rodowody zwierząt ze sobą spokrewnionych. Odbywało to się w myśl założenia, że na ogół potomstwo po wysoko wydajnych rodzicach również charakteryzuje się wysoką wydajnością. Pomimo iż metody te nadal spełniają swoją rolę, posiadają jednak pewne ograniczenia. Związane jest to z system oceny ojców-buhajów na podstawie oceny i porównywania ich córek przez co jest bardzo kosztowne i czasochłonne (Ptak i in., 2015; Siatka, 2018; Skarwecka, 2019). Postęp w dziedzinie genetyki molekularnej udostępnił narzędzia genetyczne umożliwiające poznanie całych genomów zwierząt hodowlanych, a w rezultacie wytypowanie tysięcy markerów genetycznych, tworząc genomowo wzbogaconą ocenę wartości hodowlanej. Jest ona połączeniem tradycyjnego szacowania wartości hodowlanej z wartością genomową, stanowiącą sumaryczny efekt wielu markerów. Wysokoprzepustową techniką, która pozwala na badanie zmienności w obrębie genomu są mikromacierze genotypowe, wykorzystujące polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP-single nucleotide polymorphism). Najczęściej wykorzystywanymi, a jednocześnie dającymi wiarygodne i powtarzalne wyniki są mikromacierze typu BeadChip opracowane przez firmę Illumina. Mikromacierze te są szklanymi płytkami, na których regularnie rozmieszczone są krzemowe koraliki opłaszczone sondami molekularnymi (Kamiński, 2012).



Fot. 1. Mikromacierz EuroG MD



Fot. 2. Nakładanie prób na mikromacierz EuroG MD

Wartość hodowlana zwierząt przez wiele lat była szacowana pośrednio tylko w oparciu o cechy użytkowe oraz rodowody zwierząt ze sobą spokrewnionych. Odbywało to się w myśl założenia, że na ogół potomstwo po wysoko wydajnych rodzicach również charakteryzuje się wysoką wydajnością. Pomimo że metody te nadal spełniają swoją rolę, posiadają jednak pewne ograniczenia. Związane jest to z systemem oceny ojców-buhajów na podstawie oceny i porównywania ich córek, przez co jest bardzo kosztowne i czasochłonne (Ptak i in., 2015; Siatka, 2018; Skarwecka, 2019). Postęp w dziedzinie genetyki molekularnej udostępnił narzędzia genetyczne umożliwiające poznanie całych genomów zwierząt hodowlanych, a w rezultacie wytypowanie tysięcy markerów genetycznych, tworząc genomowo wzbogaconą ocenę wartości hodowlanej. Jest ona połączeniem tradycyjnego szacowania wartości hodowlanej z wartością genomową, stanowiącą sumaryczny efekt wielu markerów.

Wysokoprzepustową techniką, która pozwala na badanie zmienności w obrębie genomu są mikromacierze genotypowe, wykorzystujące polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (*SNP-single nucleotide polymorphism*). Najczęściej wykorzystywanymi, a jednocześnie dającymi wiarygodne i powtarzalne wyniki są mikromacierze typu BeadChip opracowane przez firmę Illumina. Mikromacierze te są szklanymi płytkami, na których są regularnie rozmieszczone krzemowe koraliki opłaszczone sondami molekularnymi (Kamiński, 2012). Poprzez hybrydyzację sondy te wykrywają komplementarne do siebie sekwencje DNA badanego zwierzęcia i trwale łączą się z nimi. Dzięki zastosowaniu fluorescencji jesteśmy w stanie oznaczyć występowanie SNP podczas skanowania mikromacierzy w skanerach o wysokiej precyzji odczytu (Wojciechowska i Olech, 2013). Redukcja kosztów produkcji i wykorzystania macierzy pozwoliła na wprowadzenie jej do praktyki hodowlanej. Pierwsza komercyjnie udostępniona mikromacierz bydłęca firmy Illumina została zaprojektowana w oparciu o genomy przedstawicieli 19 ras bydła, w tym mięsnego, mlecznego, mięsno-mlecznego, a także bizona amerykańskiego. Wykorzystanie tak dużej ilości ras bydła pozwoliło na powszechne wykorzystanie jej w wielu krajach (Hayes i in., 2009; Kamiński, 2012). Macierz ta występuje pod komercyjną nazwą Bovine 50K SNP i zawiera zestaw 54 000 markerów równomiernie rozmieszczonych na chromosomach. Obecnie w użyciu wykorzystuje się jej trzecią, udoskonaloną wersję.

Prace nad dalszym obniżeniem kosztów badania, a co za tym idzie większą dostępnością dla hodowcy, zaowocowały powstaniem macierzy EuroG10K, obejmującej panel 10 000 loci SNP. W oparciu o wykorzystane markery możliwe jest oznaczenie cech użytkowych oraz identyfikacja defektów genetycznych, takich jak: BLAD, DUMPS oraz HH1, HH2, HH3, HH4, HH5, HH6, HH7 i HCD, czy również oznaczenie prawidłowego umaszczenia i bezrozności. Ponadto, pozwala na weryfikację pochodzenia w oparciu o markery

SNP. Zastosowanie imputacji umożliwia z macierzy o mniejszej gęstości EuroG10K odtworzyć prawdopodobny genotyp zwierzęcia, jaki można by uzyskać z macierzy o większej gęstości Bovine 50K ([http://www.izoo.krakow.pl/zalaczniki/wazne\\_informacje/Era-genomowa-2017.pdf?ver=2](http://www.izoo.krakow.pl/zalaczniki/wazne_informacje/Era-genomowa-2017.pdf?ver=2); Guldbrandtsen i in., 2017; Skarwecka, 2019). Następczynią mikromacierzy EuroG10K jest macierz EuroG MD. Składa się ona z panelu 45 000 markerów, zawierającego markery SNP z macierzy EuroG10K v 8.0, a także część z mikromacierzy BovineLD v 2.0 i BovineSNP50 v 3.0, które są stosowane do oceny różnych ras bydła w różnych krajach. Zwiększenie gęstości przez zastosowanie dodatkowych markerów podniosło dokładność oceny oraz pozwoliło na zastosowanie mikromacierzy EuroG MD do szacowania wartości hodowlanej kolejnych ras bydła mlecznego i mięsnego ([http://www.izoo.krakow.pl/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1941&Itemid=49](http://www.izoo.krakow.pl/index.php?option=com_content&task=view&id=1941&Itemid=49)).

Polska jako jeden z pierwszych krajów wprowadziła system oceny wartości hodowlanej bydła. Już od 1962 r. Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy bierze aktywny udział w prowadzeniu oceny hodowlanej buhajów ras mlecznych, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Na przestrzeni lat metody oceny wartości hodowlanej uległy licznym zmianom oraz modernizacjom wzbogacając podejście konwencjonalne o metody genomowe. Chęć wprowadzenia do powszechnej praktyki genomowej oceny wartości hodowlanej zaowocowała powstaniem w 2014 r. Konsorcjum Genomika Polska, do którego obok Instytutu Zootechniki PIB przystąpiły Polska Federacja Hodowców Bydła i Producentów Mleka w Warszawie, Małopolskie Centrum Biotechniki Sp. z o.o. z siedzibą w Krasnem, Stacja Hodowli i Unasienniania Zwierząt Sp. z o.o. z siedzibą w Bydgoszczy, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Mazowieckie Centrum Hodowli i Rozrodu Zwierząt Sp. z o.o. w Łowiczu oraz Wielkopolskie Centrum hodowli i Rozrodu Zwierząt w Poznaniu z siedzibą w Tulcach Sp. z o.o.

Instytut Zootechniki, jako aktywny członek Konsorcjum zajął się opracowaniem metod obliczeniowych i analitycznych genotypowania, które otrzymały pozytywną ocenę testów walidacji przez organizację INTERBULL (Jędraszczyk, 2013). Wraz z potrzebą zwiększenia dokładności oceny genomowej Polska w 2012 r. dołączyła do Spółdzielni EuroGenimics, wiążącej współpracę międzynarodową pomiędzy Niemcami, Francją, Danią, Holandią, Szwecją, Finlandią oraz Hiszpanią. Pozwoliło to na utworzenie wspólnej bazy referencyjnej, wymiany wyników i doświadczenia oraz wyznaczenie wspólnych celów. Obecnie Spółdzielnia EuroGenomics dysponuje populacją referencyjną liczącą ponad 35 000 buhajów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, co przyczyniło się do zwiększenia dokładności oceny genomowej (<http://www.eurogenomics.com/>).

W Instytucie Zootechniki PIB oznaczanie genotypów była z wykorzystaniem mikromacierzy SNP wykonywane było przez Samodzielną Pracownię Genomiki powstałą w 2011 r. Pracownia realizowała pierwszy etap oceny wartości genomowej, prowadząc bazę materiału biologicznego, izolację DNA i genotypowanie SNP. W wyniku restrukturyzacji Samodzielną Pracownia Genomiki została przekształcona w Dział, a następnie Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt W jego skład wchodzi Laboratorium Genetyki Molekularnej oraz Laboratorium Genomiki, w którym obecnie jest prowadzona część laboratoryjna oceny genomowej metodą techniki mikromacierzy SNP.

Ocena wartości hodowlanej buhajów i krów jest wykonywana zgodnie z wytycznymi INTERBULL jako organizacji mającej status laboratorium referencyjnego Unii Europejskiej. Jest ona przeprowadzana trzy razy w roku wraz z oceną konwencjonalną w oparciu o dane rodowodowe. W odpowiedzi na wysokie zapotrzebowanie hodowców Instytut Zootechniki PIB przeprowadza dodatkowe oceny krajowe we wcześniej uzgodnionych terminach (<http://www.izoo.krakow.pl>; <https://crs.izoo.krakow.pl/>).



Fot. 3. Pierwszy etap analizy wyników genotypowania

Laboratorium Genomiki posiada w swojej ofercie komercyjnie dostępną macierz o większej gęstości BovineSNP50 v 3.0 oraz nową, udostępnianą dla członków Spółdzielni EuroGenomics mikromacierz EuroG MD. Od 2013 r. weryfikuje poprawność genotypowania loci SNP była w międzynarodowych testach biegłości ISAG, uzyskując najwyższą I rangę (98–100%),

potwierdzając tym samym wysokie kompetencje w zakresie genotypowania SNP u tego gatunku. Ponadto, dzięki wieloletniemu doświadczeniu oraz uczestnictwu w międzynarodowych testach biegłości jako jedno z 14 laboratoriów na świecie posiada akredytację ICAR dotyczącą prowadzenia kontroli rodowodów bydła w oparciu o markery SNP (<https://www.icar.org/index.php/certifications/certification-and-accreditation-of-dna-genetic-laboratories/guidelines-for-str-and-snp-based-parentage-testing-in-cattle/accredited-laboratories-for-parentage-testing-in-cattle/>). Jednocześnie, jest jedyną jednostką w Polsce posiadającą akredytację zgodną z procedurami ICAR, pozwalającą na pełną analizę rodowodów u bydła na podstawie markerów SNP. Dodatkowo, Instytut Zootechniki PIB chętnie angażuje się we współpracę międzynarodową rozpowszechniając wiedzę w zakresie oceny wartości hodowlanej oraz oceny genomowej bydła mlecznego.

Obecnie ocena genomowa cieszy się coraz większą popularnością. Wykorzystanie technik genotypowania pozwala uzyskać ocenę wartości hodowlanej dla wszystkich istotnych w hodowli cech już zaraz po urodzeniu zwierzęcia. Pozwala to na redukcję kosztów, a także skrócenie odstępu pokoleniowego, co przekłada się na szybszy postęp hodowlany. W rezultacie przyczynia się to do usprawnienia procesu produkcji, dzięki podejmowaniu świadomych i strategicznych decyzji hodowlanych dla gospodarstwa.

### Piśmiennictwo

- Guldbrandtsen B., Mullaart E., Fritz S., De Roo S., Aamand G.P., David X., Jimenez J.S., Alkhoder H., Liu Z., Schrooten C., Zukowski K. (2017). Wide-spread adoption of customized genotyping improves European cattle breeding, Proc. 68th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science.
- Hayes B.J., Browman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. (2009). Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J. Dairy Sci.*, 92: 433–443.
- Jędraszczyk J. (2013). Konsorcjum EuroGenomics partnerstwo na rzecz rozwoju hodowli w Europie. Aktualności Małopolskiego Centrum Biotechniki Sp. z o.o. z siedzibą w Krasnem, 18: 3–4.
- Kamiński S. (2012). Genomowa ocena wartości hodowlanej zwierząt. *Prz. Hod.*, 80: 7–9.
- Ptak E., Barc A., Jagusiak W. (2015). Rozwój metod oceny wartości hodowlanej zwierząt na przykładzie bydła mlecznego w ujęciu retrospektywnym. *Prz. Hod.*, 83: 1–3.
- Siatka K. (2018). Selekcja genomowa buhajów i jej wpływ na produkcję mleka. *Hod. Bydła*, 4: 55–59.
- Skarwecka M. (2019). Praktyczne wykorzystanie oceny genomowej w hodowli bydła mlecznego. *Wiad. Zoot.*, 1: 109–113.
- Wojciechowska M., Olech W. (2013). Wykorzystanie mikromacierzy DNA w badaniach dzikich zwierząt. *Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej*, 15 (36).

[http://www.izoo.krakow.pl/zalaczniki/wazne\\_informacje/Era-genomowa-2017.pdf?ver=2](http://www.izoo.krakow.pl/zalaczniki/wazne_informacje/Era-genomowa-2017.pdf?ver=2) (odczyt z dnia 04.09.2019).

<https://www.icar.org/index.php/certifications/certification-and-accreditation-of-dna-genetic-laboratories/guidelines-for-str-and-snp-based-parentage-testing-in-cattle/accredited-laboratories-for-parentage-testing-in-cattle/> (odczyt z dnia 20.01.2020).

<http://www.eurogenomics.com/> (odczyt z dnia 05.09.2019).

<https://crs.izoo.krakow.pl/> (odczyt z dnia 20.02.2020).

[http://www.izoo.krakow.pl/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1941&Itemid=49](http://www.izoo.krakow.pl/index.php?option=com_content&task=view&id=1941&Itemid=49) (odczyt z dnia 20.01.2020).

## 10. Trzęsawka owiec i genotypowanie genu *PRNP*

Agata Piestrzyńska-Kajtoch, Grzegorz Smolucha

*Institut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Trzęsawka owiec (ang. *scrapie*) to choroba neurodegeneracyjna, która zawsze kończy się śmiercią zwierzęcia. Chorują na nią owce i kozy, a wykryto ją również u muflonów. Razem z BSE bydła (ang. *Bovine Spongiform Encephalopathy*) i przewlekłą chorobą wyniszczającą jeleniowatych (ang. *Chronic Wasting Disease*) należy do grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (ang. *Transmissible Spongiform Encephalopathies – TSE*) wywoływanych przez infekcyjne czynniki białkowe, tzw. priony. Zgodnie z hipotezą prionową (Prusiner, 1998), na skutek zmian konformacyjnych drugo-, trzecio- i czwartorzędowej struktury normalnego komórkowego białka PrP<sup>C</sup> (bogatego w  $\alpha$ -helisy) powstaje forma patogenna PrP<sup>Sc</sup> (prion; bogaty w  $\beta$ -harmonijki). Priony są nierozpuszczalne, częściowo odporne na działanie enzymów proteolitycznych, UV i temperatury oraz mają zdolność do agregacji w centralnym układzie nerwowym. Podobny mechanizm, w którym białko o nieprawidłowej konformacji katalizuje zmiany struktury fizjologicznego białka komórkowego, prowadzące do powstawania i agregacji patogennych białek obserwuje się w chorobie Alzheimera, Parkinsona czy stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS). Akumulacja prionów w komórkach nerwowych prowadzi do neurodegeneracji, a zanikające komórki nerwowe tworzą puste przestrzenie, przez co obraz mózgu przypomina gąbkę. Objawy kliniczne i przedkliniczne, jak również zmiany histologiczne w mózgu mogą być różne nawet w obrębie tej samej jednostki chorobowej w zależności od tego, jakim szczepem zaraziło się zwierzę. Chore osobniki są bardziej pobudliwe i płochliwe, tracą równowagę, obserwuje się u nich ataksję i mioklonie, pogarsza się ich kondycja, wydrapują sobie sierść. Choroba prowadzi do całkowitej fizycznej i umysłowej dezorganizacji organizmu (Baylis i Goldmann, 2004; Greenlee i Greenlee, 2015; Greenlee, 2019; Baral i in., 2019). Przyżyciowa diagnoza trzęsawki jest trudna i możliwa w zasadzie tylko w przypadku klasycznej trzęsawki metodami immunohistochemicznymi na podstawie biopsji trzeciej powieki, błony śluzowej odbytnicy i węzłów chłonnych. Ostatecznym potwierdzeniem choroby są pośmiertne testy immunohistochemiczne i badanie histopatologiczne różnych wycinków mózgowia. Wykonuje się również test różnicujący, określający czy patogenne białko prionowe jest typowe dla trzęsawki czy dla BSE (Polak i in., 2006; Greenlee, 2019).

Trzęsawka owiec może przyjmować dwie postacie: klasyczną i atypową. Postać klasyczna znana jest od XVIII w., a postać atypową (Nor98)

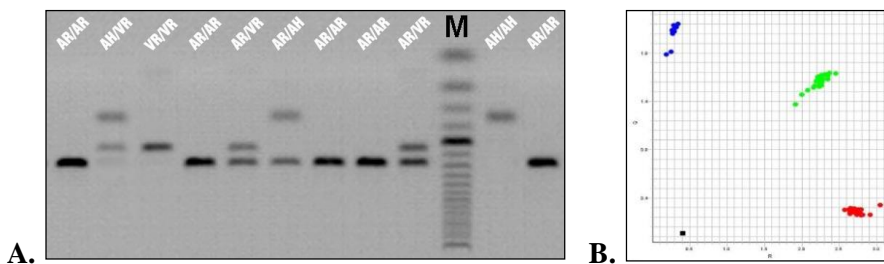


wykryto po raz pierwszy dopiero w 1998 r. w Norwegii (Benestad i in., 2003). Uważa się, że klasyczna trzęsawka owiec jest potencjalnie zakaźna i można się nią zarazić drogą pokarmową lub środowiskową, a atypowa trzęsawka słabo przenosi się w warunkach naturalnych i występuje raczej spontanicznie u starszych zwierząt. Klasyczna i atypowa trzęsawka różnią się od siebie m.in. profilem glikozylacji białka, wrażliwością na trawienie proteazami, występowaniem zmian patologicznych i genetyczną opornością/podatnością zwierząt na zachorowanie (Tranulis i in., 2011; Fast i Groschup, 2013; Greenlee, 2019).

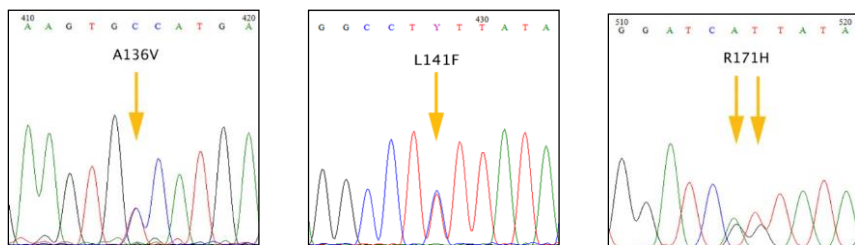
Komórkowe białko PrP<sup>C</sup> jest kodowane przez gen *PRNP*. Stwierdzono, że u owiec różne warianty genu *PRNP* są powiązane z wrażliwością na klasyczną i atypową trzęsawkę. Na podstawie badań prowadzonych na całym świecie zaobserwowano, że cztery kodony genu *PRNP* – 136, 141, 154 i 171 mają związek z występowaniem trzęsawki. Występowanie waliny (V) w kodonie 136, argininy w kodonie 154, glutaminy (Q) i histydyny (H) w kodonie 171 powiązано z podatnością na klasyczną trzęsawkę. Z kolei alanina (A) w kodonie 136, histydyna (H) w kodonie 154 i arginina (R) w kodonie 171 zostały powiązane z opornością na klasyczną trzęsawkę (Baylis i Goldmann, 2004). Utworzone w ten sposób allele (np. A<sub>136</sub>H<sub>154</sub>Q<sub>171</sub>) i genotypy (np. A<sub>136</sub>R<sub>154</sub>R<sub>171</sub>/VRQ) pozwalają na określenie, czy dany osobnik będzie bardziej podatny/oporny na zachorowanie na klasyczną trzęsawkę i przypisanie go do grupy ryzyka narażenia na tę jednostkę chorobową (NSP1-5, gdzie NSP1 oznacza grupę o znikomym ryzyku, a NSP5 grupę o najwyższym ryzyku zachorowania na klasyczną trzęsawkę). Niestety genotyp ARR/ARR, warunkujący oporność na klasyczną trzęsawkę nie warunkuje oporności na trzęsawkę atypową – ta postać choroby występuje także u owiec o tym właśnie genotypie. Trzęsawkę atypową powiązано z obecnością fenyloalaniny (F) w kodonie 141 i histydyny (H) w kodonie 154. Allel F znaleziono dotychczas tylko w konfiguracji z allelem ARQ (AFRQ). Z badań prowadzonych w różnych krajach wynika, że wśród owiec zarażonych atypową trzęsawkę statystycznie istotnie więcej osobników posiada allele AFRQ i ALHQ (Moum i in., 2005; Tranulis i in., 2011; Fast i Groschup, 2013; Greenlee i Greenlee, 2015). Znając genotypy owiec, można skutecznie prowadzić selekcję zwierząt tak, aby zmniejszyć ryzyko wystąpienia chorób prionowych. W krajach europejskich od lat prowadzone są programy monitoringu genotypów *PRNP*, mające na celu zwiększanie częstości genotypu ARR/ARR i zmniejszenie częstości genotypu VRQ/XXX (gdzie XXX oznacza dowolny wariant) w stadach owiec. Potwierdzono ich skuteczność. Decyzją Komisji Wspólnot Europejskich z dnia 18.12.2002 r. (notyfikowaną jako Dokument C(2002) 5102). Unia Europejska zaleca krajom członkowskim badanie genotypów w populacjach owiec pod kątem podatności na scrapie i zwiększenie częstości warunkującego oporność allelu ARR w stadach o znaczeniu gospodarczym w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia klasycznej trzęsawki owiec.

W Polsce badania nad polimorfizmem genu *PRNP* u owiec prowadzone były w Instytucie Zootechniki od 2005 r. W latach 2005–2008 badaniami było objętych kilka tysięcy owiec w ramach projektów zamawianych przez Departament Bezpieczeństwa Żywności i Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Od 2009 r. badania są dalej kontynuowane w ramach innych zadań, projektów i programów, a także w formie usług (Rejduch i in., 2009; Piestrzyńska-Kajtoch i in., 2015; Piestrzyńska-Kajtoch i in., 2017). Instytut Zootechniki PIB dostarcza wyniki genotypowania trzęsawki Głównemu Inspektoratowi Weterynarii, który z kolei przekazuje te dane do Komisji Europejskiej w formie raportu, zgodnie z pkt. 8.2 rozdziału A załącznika III do Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. Dotychczas badaniami objęto łącznie około 12 500 owiec różnych ras. Przez cały ten czas udoskonalano metodę genotypowania tak, aby można było prowadzić badania rutynowo. Badanie wykonuje się na materiale biologicznym w postaci krwi, ale można też oznaczyć genotyp z wymazu czy fragmentu tkanki. Początkowo metoda genotypowania opierała się w naszym Laboratorium wyłącznie na enzymach restrykcyjnych i elektroforezie agarozowej (Garcia-Crespo i in., 2004) (ryc. 1). Obecnie genotypowanie wykonywane jest metodą dyskryminacji alleli z zastosowaniem specyficznych sond TaqMan MGB. Laboratorium opracowało także metodę sekwencjonowania genu *PRNP*, która pozwala na analizę polimorfizmu całego kodującego regionu genu (ryc. 2). Efektem badania jest określony genotyp *PRNP* w postaci czterech kodonów (np. ALRR/AFRQ), niezmienny przez całe życie, potwierdzony sprawozdaniem z analizy (ekspertyzą). Od 2006 r. Laboratorium Genetyki Molekularnej Zakładu Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB (LGM) nieprzerwanie i zawsze z powodzeniem uczestniczy w międzynarodowych testach porównawczych metody genotypowania trzęsawki owiec, organizowanych przez EURL (Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej), które mają na celu potwierdzenie skuteczności i jakości wykonywanych badań.

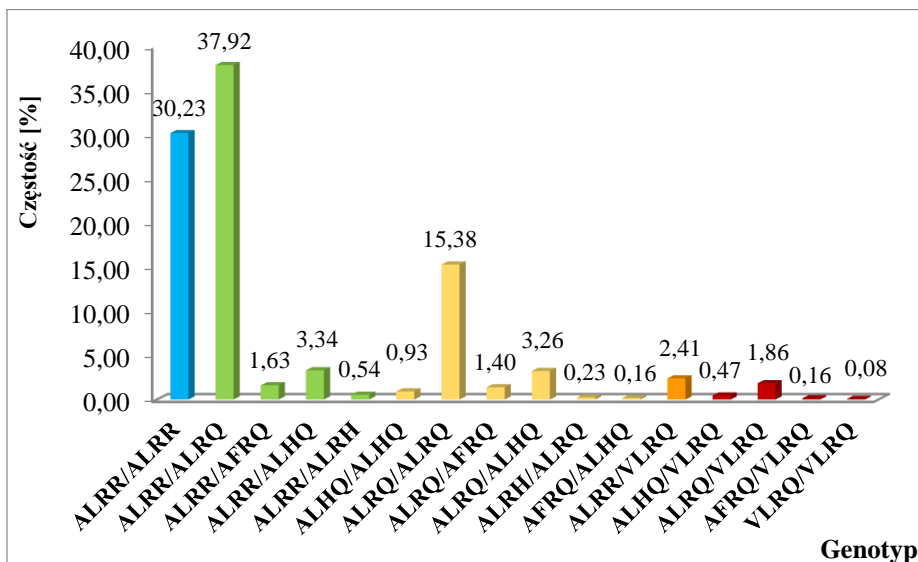
W Polsce cały czas prowadzi się badania nad zmiennością genu *PRNP* u różnych ras owiec (Rejduch i in., 2009; Niżnikowski i in., 2014; Piestrzyńska-Kajtoch i in., 2015; Niżnikowski i in., 2016; Piestrzyńska-Kajtoch i in., 2017). Pozwalają one na oszacowanie frekwencji poszczególnych alleli w badanych populacjach (monitoring) i tworzenie referencyjnych baz genotypów. Na rycinie 3 przedstawiono częstości genotypów *PRNP* owiec badanych w LGM w latach 2016–2019.



Ryc. 1. Genotypowanie genu *PRNP*: A – kodony 136 i 154 zgenotypowane przy pomocy enzymu restrykcyjnego; B – kodon 171 zgenotypowany metodą dyskryminacji alleli



Ryc. 2. Sekwencjonowanie fragmentu genu *PRNP*



Ryc. 3. Frekwencja genotypów *PRNP* u owiec badanych w latach 2016–2019; kolory oznaczają przynależność do grupy ryzyka narażenia na klasyczną trzęsawkę: NSP1 – niebieski, NSP2 – zielony, NSP3 – żółty, NSP4 – pomarańczowy; NSP5 – czerwony

Instytut Zootechniki, zgodnie z wytycznymi unijnymi, oznacza również genotypy *PRNP* u wszystkich owiec i kóz ze zdiagnozowaną w Polsce chorobą prionową. Pierwszy przypadek trzęsawki owiec zdiagnozowano w Polsce w 2009 r. Od tego czasu do dziś (07.2020) w naszym kraju odnotowano 94 przypadki trzęsawki u owiec (76 przypadków atypowej trzęsawki i 18 przypadków klasycznej trzęsawki) oraz dwa przypadki encefalopatii gąbczastej kozy. Wszystkie owce, u których wykryto klasyczną trzęsawkę pochodziły z importu. Podejrzenie przypadku TSE w stadzie, zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. (ujednolicony dokument z dnia 2.07.2020), oznacza konieczność przeprowadzenia dochodzenia w celu identyfikacji wszystkich narażonych zwierząt i podjęcie dalszych kroków w przypadku potwierdzenia diagnozy. Wszystkie owce i kozy w gospodarstwie lub gospodarstwach, w których nastąpiło narażenie, zostają objęte urzędowym ograniczeniem przemieszczania do czasu uzyskania wyników potwierdzających diagnozę. Zgodnie z tym samym rozporządzeniem, w zależności od diagnozy potwierdzającej jednostkę chorobową, mogą zostać zastosowane różne środki, np. objęcie stada intensywnym monitorowaniem TSE przez okres 2 lat, czy bezzwłoczne uśmiercenie narażonych zwierząt (wytypowanych na drodze dochodzenia: gdy nie można wykluczyć BSE). Wiąże się to ze stratami ekonomicznymi.

W handlu wewnątrzunijnym, w aspekcie bezpieczeństwa żywności wymaga się od gospodarstw określenia statusu ryzyka (znikome, kontrolowane) wystąpienia trzęsawki klasycznej. Owce, ich nasienie i embriony przeznaczone na eksport muszą pochodzić z gospodarstw spełniających te wymogi lub mieć potwierdzony genotyp ARR/ARR (załącznik VIII do Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r.). Genotypowanie trzęsawki owiec umożliwia więc nie tylko skuteczną, świadomą selekcję zwierząt, zarządzanie ryzykiem w owczarniach i uniknięcie strat ekonomicznych, ale także ułatwia prowadzenie handlu. Z uwagi na ryzyko ekonomiczne związane ze stwierdzeniem choroby prionowej w stadzie, genotypowanie *PRNP* i selekcja owiec pod kątem eliminacji niekorzystnych wariantów tego genu ma istotne znaczenie dla hodowców tych zwierząt.

## Piśmiennictwo

- Baral P.K., Yin J., Aguzzi A., James M.N. (2019). Transition of the prion protein from a structured cellular form (PrPC) to the infectious scrapie agent (PrPSc). *Protein Sci.*, 28 (12): 2055–2063; DOI: 10.1002/pro.3735.
- Baylis M., Goldmann W. (2004). The genetics of scrapie in sheep and goats. *Current Mol. Med.*, 4 (4): 385–396.
- Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schönheit J., Tranulis M.A., Bratberg B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.*, 153 (7): 202–208; DOI: 10.1136/vr.153.7.202.

- Fast Ch., Groschup M.H. (2013). Classical and atypical scrapie in sheep and goats. In: W.-Q. Zou and P. Gambetti (eds), Prions and diseases: Volume 2, Animals, Humans and the Environment, Springer Science+Business Media, New York, 2: 15–44; DOI 10.1007/978-1-4614-5338-3\_2.
- Garcia-Crespo D., Oporto B., Gomez N., Nagore D., Benedicto L., Juste R.A., Hurtado A. (2004). PrP polymorphisms in Basque sheep breeds determined by PCR-restriction fragment polymorphism and real-time PCR. *Vet. Rec.*, 154 (23): 717–722; DOI: 10.1136/vr.154.23.717.
- Greenlee J.J. (2019). Review: Update on classical and atypical scrapie in sheep and goats. *Vet. Pathol.*, 56 (1): 6–16; DOI: 10.1177/0300985818794247.
- Greenlee J.J., Greenlee M.H.W. (2015). The transmissible spongiform encephalopathies of livestock. *ILAR J.*, 56 (1): 7–25; DOI: 10.1093/ilar/ilv008.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol.*, 86: 231–235.
- Niżnikowski R., Czub G., Świątek M., Głowacz K., Ślęzak M. (2014). Polimorfizm genu białka prionowego PrP u wrzosówki polskiej i owcy żelaźnieńskiej utrzymywanych w stadzie Doświadczalnej Fermy Owiec i Kóz SGGW w Żelaznej. *Rocz. Nauk. PTZ*, 10 (2): 9–16.
- Niżnikowski R., Oprządek A., Świątek M., Czub G., Ślęzak M. (2016). Polymorphism of the PRNP gene in Polish Merino and old-type Polish Merino in flock with clinical status of atypical scrapie. *Ann. Warsaw Univ. of Life Sciences-SGGW, Anim. Sci.*, 55 (1): 99–107.
- Piestrzyńska-Kajtoch A., Kawęcka A., Smołuca G., Miksza-Cybulska A., Rejduch B. (2015). Polimorfizm genu PRNP u owiec rasy świniarka utrzymywanych w stadzie objętym programem ochrony zasobów genetycznych. *Rocz. Nauk. PTZ*, 11, 4: 31–39.
- Piestrzyńska-Kajtoch A., Kawęcka A., Smołuca G. (2017). Polimorfizm genu PRNP rodzimych ras owiec w aspekcie podatności na trzęsawkę (scrapie). *Wiad. Zoot.*, LV, 5: 63–69.
- Polak M.P., Larska M., Rożek W., Żmudziński J.F. (2006). Różnicowanie BSE i trzęsawki w pogłowie owiec i kóz. *Med. Weter.*, 62 (11): 1298–1301.
- Prusiner S.B. (1998). Prions. *Proc. of the National Academy of Sciences, USA*, 95 (23): 13363–13383; DOI: 10.1073/pnas.95.23.13363.
- Rejduch B., Knapik J., Piestrzyńska-Kajtoch A., Kozubska-Sobocińska A., Krupiński J. (2009). Frequency of genotypes in the PrP prion protein gene locus in the Polish sheep population. *Acta Vet. Hung.*, 57 (1): 39–49.
- Tranulis M.A., Benestad S.L., Baron T., Kretzschmar H. (2011). Atypical prion diseases in humans and animals. In: *Prion Proteins*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 23–50.

# 11. Nutrigenomika zwierząt gospodarskich – narzędzie do opracowania prozdrowotnych zaleceń u zwierząt i ludzi

Maria Oczkowicz

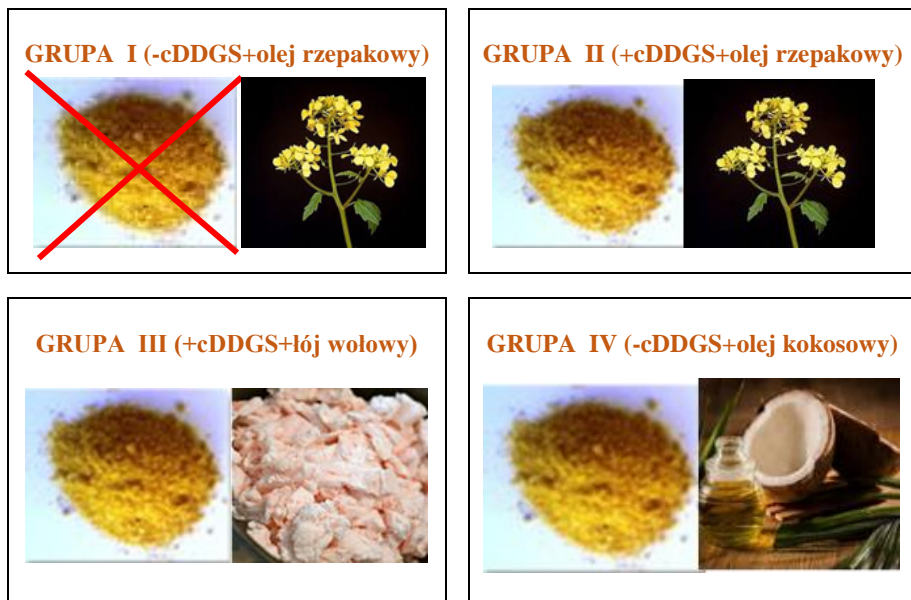
*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Nutrigenomika to dziedzina wiedzy, która bada wpływ odżywiania na regulację genów (Müller i Kersten, 2003). Z kolei, nutrigenetyka zajmuje się oddziaływaniami pomiędzy dietą a genomem, tzn. analizuje, w jakim stopniu odpowiedź organizmu na składniki żywienia jest uzależniona od sekwencji DNA osobnika. Dieta jest jednym z głównych czynników środowiskowych wpływających na stan zdrowia i kondycję ludzi, a także na wyniki użytkowości zwierząt gospodarskich. Rosnąca liczba danych sugeruje, że u podłoża tego oddziaływania leżą interakcje pomiędzy składnikami żywieniowymi a genomem ludzi i zwierząt. Obecnie znanych jest wiele czynników transkrypcyjnych (np. *PPAR*, *SREBP*), które działają jak czujniki składników odżywczych i wpływają na ekspresję innych genów zaangażowanych w metabolizm (Müller i Kersten, 2003). Ponadto, przeprowadzono wiele eksperymentów, które wykazały rolę odżywiania w modyfikacji epigenetycznej (Jiménez-Chillarón i in., 2012). Modyfikacje epigenetyczne obejmują metylację DNA, modyfikację histonów i regulację poprzez mikroRNA. Przypuszcza się, że istnieją dwa krytyczne punkty, w których może wystąpić modyfikacja epigenetyczna. Jednym z nich jest tzw. „wczesne okno” (ang. „*early window*”) i obejmuje okres życia płodowego oraz wczesny etap życia postnatalnego. Drugi to tzw. „*dietary transition*”, czyli przejście na specyficzną dietę (np. dieta wysokotłuszczowa, restrykcja kaloryczna itd.). Hipoteza ta powstała w wyniku analizy skutków tzw. głodowej zimy podczas II wojny światowej w Holandii (ang. *The Dutch Hunger Winter 1944–1945*). Zaobserwowano, że potomkowie kobiet, które w tym okresie były w ciąży, znacznie częściej są narażeni na występowanie chorób krążenia, otyłości, insulinooporności oraz cukrzycy, a także chorób psychicznych (Fernandez-Twinn i in., 2019; Hulshoff Pol i in., 2000). Naukowcy przypuszczają, że jeśli w trakcie życia płodowego organizm jest narażony na niedożywienie, to przystosowuje się do warunków środowiskowych w których występuje ograniczony dostęp do składników odżywczych. Jeśli później, w dorosłym życiu substancje te występują w nadmiarze, to taki organizm trudniej radzi sobie z ich wykorzystaniem, co prowadzi do chorób metabolicznych.

W ostatnich czasach przeprowadzono szereg badań na zwierzętach modelowych, potwierdzających związek pomiędzy przejściem na specyficzną dietę a zmianami w poziomie ekspresji genów. Najwięcej takich doświadczeń przeprowadzono na gryzoniach (myszy, szczury). Coraz częściej jednak wykorzystywane są w tych eksperymentach zwierzęta gospodarskie: świnie, bydło, owce. Wyniki badań na zwierzętach gospodarskich, zwłaszcza świniach, dostarczają cennych informacji na temat oddziaływania składników dietetycznych na regulację ekspresji genów nie tylko pod kątem wpływu na zdrowie zwierząt i ludzi, ale także w aspekcie skuteczności stosowania konkretnej diety dla poprawy wyników użytkowości zwierząt. Pozwalają one na poznanie mechanizmów molekularnych, które są odpowiedzialne za kształtowanie cech użytkowości tucznej i rzeźnej, a także jakości tuszy. Szereg takich badań przeprowadzono u bydła pod kątem wydajności rzeźnej, jakości mięsa, a także użytkowości mlecznej (praca przeglądowa: Nowacka-Woszuk, 2020). Jednak to świnia jest najczęściej wykorzystywana w badaniach nutrigenomicznych. Gatunek ten został zaproponowany jako model zwierzęcy w badaniach nad miażdżycą ponad czterdzieści lat temu (Cevallos i in., 1979). Obecnie świnie stały się obiecującym alternatywnym dla gryzoni modelem zwierzęcym wielu chorób człowieka ze względu na wiele podobieństw w wielkości narządów i fizjologii z ludzkim ciałem. Ponadto, hodowla świń ma na celu zwiększenie wysokiego dziennego przyrostu masy zwierząt, co sprawia, że jest to naturalny model stylu życia prowadzącego do otyłości (Oczkowicz i in., 2019).

W 2015 r. w Instytucie Zootechniki rozpoczęto prace badawcze dotyczące wpływu tłuszczu w diecie opartej o cDDGS (*corn Dried Distillers Grains with Solubles*) na profil transkryptomyczny, poziom metylacji wysp CpG oraz profil mikroRNA w tkankach świni. Przeprowadzone badania obejmowały trzy typy analiz NGS (*Next Generation Sequencing*; Sekwencjonowanie Następnej Generacji): analiza transkryptomu, analiza mikroRNA oraz analiza poziomu metylacji DNA i zostały przeprowadzone na trzech tkankach (mięsień, wątroba, tłuszcz). Dodatkowo, dokonano dokładnej oceny cech użytkowości tucznej i rzeźnej zwierząt, a także profilu tłuszczowego i jakości słoniny. cDDGS jest produktem ubocznym w przemyśle gorzelniczym, jest bogatym źródłem błonnika, białka, kwasów tłuszczowych nienasyconych oraz drożdży. Z tego względu jest szeroko stosowane jako zamiennik soi w diecie świń. Co więcej, postuluje się włączenie cDDGS do diety ludzkiej, np. jako dodatek przy wypieku chleba, ze względu na jego prozdrowotne właściwości. Stosowanie cDDGS w diecie świń wywołuje jednak pewne negatywne skutki, jeśli chodzi o jakość uzyskiwanej słoniny. Ze względu na dużą zawartość kwasów tłuszczowych nienasyconych słonina uzyskana od zwierząt skarmianych cDDGS jest bardziej podatna na utlenianie, szybciej się psuje i ma gorszą z punktu widzenia konsumenta konsystencję. Dlatego też, aby przeciwdziałać temu zjawisku, stosuje się dodatek tłuszczu o wysokiej zawartości kwasów

tłuszczowych nasyconych. W opisywanym eksperymencie utworzono 4 izoenergetyczne grupy żywieniowe, z których każda zawierała 6 zwierząt (ryc. 1).



Ryc. 1. Grupy żywieniowe utworzone podczas doświadczenia

Taki układ doświadczenia pozwalał na przeanalizowanie dwóch czynników równocześnie: cDDGS – poprzez porównanie grup I i II oraz źródła tłuszczu – poprzez porównanie grup II, III, IV. Stwierdzono, że żadna z grup nie różni się pod względem cech użytkowości tucznej i rzeźnej. Masa ciała, masa wyrębów podstawowych oraz grubość słoniny były takie same w badanych grupach, jednak stwierdzono istotne zmiany w profilu kwasów tłuszczowych słoniny (Świątkiewicz i in., 2016). Zgodnie z oczekiwaniami stwierdzono, że dodatek cDDGS w paszy pogarsza jakość słoniny. Najgorsze parametry technologiczne tłuszczu (TBA-RS, liczba jodowa) odnotowano w grupie II (+cDDGS+olej rzepakowy). Ta grupa charakteryzowała się również najwyższą zawartością kwasów nienasyconych. Dodatek tłuszczów zawierających nasycone kwasy tłuszczowe (łój wołowy, olej kokosowy) poprawił znacząco te parametry. Generalnie, zaobserwowano istotną korelację pomiędzy profilem kwasów tłuszczowych w paszy oraz w tłuszczu zwierząt otrzymujących tę paszę. Jednocześnie, zabezpieczenie próbek do analiz molekularnych i zastosowanie najnowszej technologii sekwencjonowania następnej generacji (NGS) pozwoliło na prześledzenie procesów zachodzących w tkance tłuszczowej na poziomie molekularnym, które towarzyszyły obserwowanym zmianom



fenotypowym. Tkanka tłuszczowa jest obecnie uznawana za istotny organ o wysokiej aktywności metabolicznej, a jako jedną z przyczyn występowania chorób metabolicznych uznaje się stan, w którym dochodzi do przewlekłego stanu zapalnego tej tkanki, czemu towarzyszy uwalnianie prozapalnych cytokin. Dlatego, badania nad procesami zachodzącymi w tkance tłuszczowej dostarczają cennych informacji z punktu widzenia zdrowia ludzi i zwierząt. Po porównaniu grupy, która nie otrzymywała w paszy cDDGS (-cDDGS+olej rzepakowy) z grupą otrzymującą ten dodatek w diecie, zidentyfikowaliśmy 93 geny o różnej ekspresji pomiędzy grupami (ang. *DEG* – *Differentially expressed Genes*). Większość zidentyfikowanych genów była zaangażowana w najważniejsze szlaki metaboliczne, takie jak: fosforylacja oksydacyjna, biosynteza kwasów tłuszczowych, metabolizm kwasów tłuszczowych. Zaobserwowaliśmy, że dodanie cDDGS wpływa pozytywnie na ekspresję szeregu genów, które zostały ostatnio zaproponowane jako potencjalne cele farmakologiczne w leczeniu otyłości, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych i chorób neurodegeneracyjnych (np. *FASN*, *AACS*, *ALAS1*, *HMGCS1* i *VSIG4*). Nasze wyniki potwierdziły zasadność wprowadzenia cDDGS do diety człowieka w celu profilaktyki chorób metabolicznych (Oczkowicz i in., 2018).

Od wielu lat wiadomo, że nadmierne spożycie tłuszczów pochodzenia zwierzęcego sprzyja rozwojowi chorób serca, w przeciwieństwie do tłuszczów roślinnych zawierających duże ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych. Mechanizm molekularny wywołujący te efekty nie jest jednak w pełni poznany. Ponadto, stosowanie w diecie człowieka oleju kokosowego ciągle budzi sporo kontrowersji. Olej kokosowy, przez niektórych uważany za tzw. „superfood”, zawiera duże ilości nasyconych kwasów tłuszczowych o średniej i krótkiej długości łańcucha, z których część (np. kwas mirystynowy) wyjątkowo mocno podnosi poziom cholesterolu we krwi. Dlatego, kolejnym celem naszych badań była ocena zmian w poziomie ekspresji genów w tkance tłuszczowej, wywołanych spożywaniem różnych rodzajów tłuszczu. Po porównaniu wszystkich trzech grup, otrzymujących różne źródła tłuszczu w paszy, zidentyfikowaliśmy 31 genów o zróżnicowanej ekspresji, z których najwięcej – 29 stwierdzono między grupą otrzymującą w paszy olej rzepakowy a grupą skarmianą dodatkiem łożu wołowego. Prawie wszystkie z tych genów związane są z patogenezą chorób sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych i nowotworowych u ludzi (np. *PLAU*, *CYBB*, *NCF2*, *ZNF217*, *CHAC1*, *CTCFL*). Pełnią one kluczową funkcję w regulowaniu ciśnienia krwi i procesów krzepnięcia krwi, sygnalizacji ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*) oraz proteolizy. Wśród genów o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy grupami na szczególną uwagę zasługuje gen *PLAU* (*Urokinase –Type Plasminogen Activator*), kodujący aktywator plazminogenu, którego produkt umożliwia przemianę plazminogenu w plazminę – główne białko biorące udział w rozpuszczaniu skrzepów krwi. Poziom ekspresji tego genu był kilkukrotnie wyższy w tkance tłuszczowej osobników otrzymujących w diecie olej rzepakowy.

Gen ten jest określony jako potencjalny gen targetowy w leczeniu zakrzepicy i innych chorób sercowo-naczyniowych. Z punktu widzenia jakości tłuszczu możliwe jest, że podwyższona ekspresja tego genu może przyczyniać się do obniżania jakości technologicznej tłuszczu poprzez wzmożoną aktywność proteolityczną i w konsekwencji zmianę jego konsystencji. Dodatkowo, analiza (*GSEA – Gene Set Enrichment Analysis*) całych profili transkryptomicznych ze wszystkich trzech porównań wykazała, że spożywanie nadmiernych ilości produktów zawierających łój wołowy czy olej kokosowy może wywoływać zmiany w poziomie ekspresji genów kluczowych w patogenezie chorób cywilizacyjnych (Oczkowicz i in., 2019), sugerując większą ostrożność w stosowaniu oleju kokosowego w diecie ludzi.

Reasumując, wykorzystanie zwierząt gospodarskich w badaniach nutrigenomicznych daje unikalną szansę na prześledzenie procesów biologicznych zachodzących pod wpływem określonych substancji w środowisku najbardziej zbliżonym do warunków panujących w ludzkim organizmie. Jednocześnie, podejście takie jest bardziej akceptowane z punktu widzenia etyki badań w porównaniu do wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych ze względu na możliwość późniejszego spożycia produktów pochodzących od badanych zwierząt.

### Piśmiennictwo

- Cevallos W.H., Holmes W.L., Myers R.N., Smink R.D. (1979). Swine in atherosclerosis research: Development of an experimental animal model and study of the effect of dietary fats on cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, 34: 303–317.
- Fernandez-Twinn D.S., Hjort L., Novakovic B., Ozanne S.E., Saffery R. (2019). Intrauterine programming of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 62: 1789–1801.
- Hulshoff Pol H.E., Hoek H.W., Susser E., Brown A.S., Dingemans A., Schnack H.G., Haren N.E. van, Pereira Ramos L.M., Gispen-de Wied C.C., Kahn R.S. (2000). Prenatal exposure to famine and brain morphology in schizophrenia. *Amer. J. Psychiatry*, 157: 1170–1172.
- Jiménez-Chillarón J.C., Díaz R., Martínez D., Pentinat T., Ramón-Krauel M., Ribó S., Plösch T. (2012). The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie*, 94: 2242–2263.
- Müller M., Kersten S. (2003). Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat. Rev. Genet.*, 4: 315–322.
- Nowacka-Woszek J. (2020). Nutrigenomics in livestock-recent advances. *J. Appl. Genet.*, 61 (1): 93-103; doi: 10.1007/s13353-019-00522-x.
- Oczkowicz M., Szmatoła T., Świątkiewicz M., Pawlina-Tyszko K., Gurgul A., Ząbek T. (2018). Corn dried distillers grains with solubles (cDDGS) in the diet of pigs change the expression of adipose genes that are potential therapeutic targets in metabolic and cardiovascular diseases. *BMC Genomics*, 19: 864.

- Oczkowicz M., Szmatoła T., Świątkiewicz M., (2019). Source of dietary fat in pig diet affects adipose expression of genes related to cancer, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. *Genes*, 10: 948.
- Świątkiewicz M., Oczkowicz M., Ropka-Molik K., Hanczakowska E. (2016). The effect of dietary fatty acid composition on adipose tissue quality and expression of genes related to lipid metabolism in porcine livers. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 216: 204–215.

## 12. Proteomika jako narzędzie wspomagające hodowlę

Grzegorz Smołucha, Anna Koseniuk, Wojciech WitarSKI

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

W naukach o zwierzętach, podobnie jak we wszystkich naukach przyrodniczych zastosowanie proteomiki i innych narzędzi post-genomicznych oferuje doskonale możliwości uzyskania bardziej szczegółowego zrozumienia złożonych systemów biologicznych (Marco-Ramell i in., 2016). Prace prowadzone w latach 1995–2003 nad poznaniem ludzkiego genomu (*Human Genome Organisation – HUGO – Organisation*) zapoczątkowały erę dynamicznego rozwoju technik omicznych, a postęp wiedzy, jaki dokonał się w ostatnich latach, poprzez analizę genomu i transkryptomu zrewidował stan naszej wiedzy na temat złożoności zjawisk zachodzących w komórce/tkance/narzędzie. Po zsekwencjonowaniu genomu człowieka intensywne prace naukowców zostały skierowane na poznanie genomów innych organizmów, w szczególności zwierząt gospodarskich. Mnogość nowych informacji oraz pojawiająca się jeszcze większa ilość pytań skłoniła naukowców do podjęcia kolejnego kroku, jakim było rozpoczęcie prac nad identyfikacją wszystkich białek, ich aktywnością biologiczną, modyfikacjami potranslacyjnymi, interakcjami w komórce, a także na identyfikacji zmian w proteomie jako odpowiedzi na zmieniające się warunki biologiczne. W przeciwieństwie do DNA, białka ulegają złożonym modyfikacjom biochemicznym na poziomie potranslacyjnym, a pojedynczy gen może kodować wiele białek za pomocą alternatywnego składowania informacyjnego RNA, dlatego też proteom jest bardziej złożony niż genom (Joshi i Patil, 2017). Intensywne prace nad białkami rozwinęły się i przekształciły w nową gałąź nauki nazwaną proteomiką, rozumianą jako zbiór różnorodnych technik, które służą do pozyskiwania informacji o proteomie (białkowym komponencie kodowanym przez genom).

Od lat 70. poprzedniego wieku w Instytucie Zootechniki PIB prowadzono szereg doświadczeń, będących zaczątkiem badań proteomicznych, które można zaklasyfikować do immunoproteomicznych. Zastosowanie metod elektroforetycznych w badaniach białek osocza krwi i pełnej krwi było na szeroką skalę wykorzystywane w badaniach rodzicielstwa i zmienności genetycznej u świń (Janik, 1986; Kamyczek, 1997), koni (Nogaj i in., 2013) i owiec (Rychlik i Krawczyk, 2008). Prowadzono również badania zmierzające do poznania albumin oraz alfa-, beta- i gammaglobulin, grupujących molekuly o podobnym ładunku elektrycznym, lecz zróżnicowanej masie cząsteczkowej i często odmiennych właściwościach biologicznych. W obrębie frakcji beta-globulin sześć nowych epitopów białek tej frakcji opisali Skiba i Węgrzyn

(Skiba i in., 1994; Skiba i Węgrzyn, 1976, 1999; Skiba i Willmann-Węgrzyn, 1977). W 1993 r. zostały również zidentyfikowane przez Skibę i Węgrzyną (1993) kolejne epitopy immunoglobulin: GA1, GB2 oraz MA2. W ówczesnie działającym Zakładzie Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ w latach 1996–2000 prowadzono badania, które obejmowały swoim zakresem wykrywanie i wykorzystanie antygenowych markerów genów i białek u zwierząt gospodarskich. Prace te dotyczyły oceny przydatności pięciu surowic odpornościowych i zawartych w nich siedmiu alloprzeciwciał do wykrywania i rutynowego oznaczania nowych markerów antygenowych u owiec. Badania te pozwoliły na określenie indywidualnych dla każdej surowicy odpornościowej warunków nastawiania w teście podwójnej immunodyfuzji w żelu agarowym. Wyniki badań wykazały, że przeciwciała zawarte w rozpracowywanych surowicach alloodpornościowych identyfikują epitopy związane z białkami frakcji głównie beta-globulin o m. cz. około 100 kDa oraz immunoglobulin podklas IgG1 i IgG2 (Skiba i in., 2000). W latach 2003–2008 Krzyścin i in. (Krzyścin, 2006 a,b, 2007 a,b; Krzyścin i Rychlik, 2008) prowadzili badania nad charakterystyką markerów antygenowych białek surowicy krwi u owiec oraz oceną ich przydatności jako wskaźników odporności na stany zapalne gruczołu mlekowego. Autorzy ci stwierdzili, że występowanie markera A2mA1, epitopu alfa-makroglobulin o m. cz. ponad 200 kDa było statystycznie istotne i skorelowane z większą podatnością na zapalenia gruczołu mlekowego u badanych owiec. Krzyścin i in. przeanalizowali również polimorfizm hemoglobiny (HBB) i transferyny (TF) i określili zależności wykrytych alleli (i genotypów) ze zdrowotnością wymion. Spośród sześciu obecnych alleli transferyny jedynie dwa wykazały statystycznie potwierdzone, istotne powiązania ze stanem zdrowotnym gruczołu mlekowego: allel TFA – z odpornością, a allel TFP – z podatnością na stany zapalne. Stwierdzili także istnienie statystycznie istotnych korelacji pomiędzy występowaniem genotypu hemoglobiny HBB-AB, a także genotypów transferyny TF-AA, -AD, -BD, -CC oraz -BC i wyższą zdrowotnością wymion. Z kolei, obecność genotypu HBB-BB oraz genotypów TF-AB, -CD i -DD była istotnie powiązana z mniejszą opornością badanych owiec na zapalenia. Ten sam autor w 2011 r. prowadził badania nad określeniem absorpcji i katabolizmu siarowych przeciwciał klasy M u jagniąt przy wykorzystaniu IghmA2 – antygenowego znacznika łańcuchów ciężkich immunoglobulin IgM. Krzyścin i Natonek-Wiśniewska (2011) stwierdzili, że marker antygenowy IghmA2 wydaje się być użyteczny w badaniach występowania siarowych przeciwciał IgM w organizmach rozwijających się jagniąt, a zatem może być pomocny w ocenie kształtowania się nabytej odporności przeciwciałowej u owiec.

W obecnych czasach dzięki szybkiemu rozwojowi nowoczesnych technik analiz proteomika stała się dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki i ma zastosowanie w wielu obszarach związanych z hodowlą zwierząt gospodarskich. Badania te koncentrują się na identyfikacji biomarkerów, które

mogą pomóc zoptymalizować równowagę między produktywnością, jakością produktu i dobrostanem zwierząt (Bilić i in., 2018). Jednym z wielu przykładów zastosowania proteomiki w hodowli zwierząt są badania umożliwiające analizę zmian ekspresji białek mięśni zachodzących *post mortem*. Identyfikacja różnic w profilach białkowych zachodzących w mięśniach dotyczy głównie analizy szybkości degradacji białek miofibrylarnych, prowadzącej do tzw. dojrzwienia mięsa (Jia i in., 2006). Melody i in. (2004) zidentyfikowali białka pochodzące z mięśnia najdłuższego grzbietu i półścięgnistego smukłego u bydła, wykazujące statystycznie istotne zmiany 24 godziny po uboju. Białka te to między innymi kofilina oraz białka szoku cieplnego 20 i 27. Podobnie, w mięśniu grzbietowym świń wykazano akumulację fragmentów aktyny, kinazy kreatyninowej oraz  $\alpha$ -krystraliny wynikającą z 72-godzinnej przechowywania mięsa w warunkach chłodniczych (Melody i in., 2004). Inną cechą kluczową w ocenie parametrów jakości wieprzowiny jest wodochłonność. Van de Wiel i Zang (2007) przeprowadzili analizę proteomiczną mięśnia najdłuższego grzbietu świni, poszukując markerów wodochłonności mięsa. Autorzy wśród potencjalnych kandydatów wymieniają trzy białka: kinazę fosfokreatynową, desminę i aktywator transkrypcji SNF2L1. Badania przeprowadzone przez Cho i in. (2016) miały na celu analizę istotnych czynników wpływających na jakość mięsa wieprzowego, związanych ze stresem oksydacyjnym i rozwojem mięśni. Autorzy za pomocą spektrometrii mas z chromatografią cieczową (LC-MS/MS) przeanalizowali ekspresję białek w wysokiej jakości mięśniach grzbietu *longissimus dorsi* (HQLD) i niskiej jakości mięśniach grzbietowych długich (LQLD) pochodzących od świń rasy Duroc. Pomiędzy HQLD i LQLD zidentyfikowano 24 białka ulegające różnicowej ekspresji, które przypuszczalnie wykazują aktywność katalityczną, aktywność ATPazy, aktywność oksydoreduktazy, wiązanie z białkami cytoskieletu, wiązanie aktyny, wiązanie jonów wapnia i strukturalny składnik mięśnia. Inne badania, przeprowadzone przez Cai i in. (2018) na dwóch gatunkach mięsa pochodzącego od brojlerów, wykazały obecność 8 białek, które ulegały różnej ekspresji między normalnymi i WBC (*Wooden Breast Condition*) próbkami mięsa z mięśni piersiowych. Różnice w proteomie mięśniowym między mięsem normalnym i WBC wskazywały na zwiększony stres oksydacyjny w mięsie WBC w porównaniu z normalnym. Ponadto, ilość niektórych enzymów glikolitycznych, które są niezbędne dla regeneracji trójfosforanu adenozy (ATP) w mięśniach po śmierci, była niższa w mięsie WBC niż w normalnym mięsie. Analizując jakość mięsa nie można pominąć cech, takich jak kruchość i delikatność. Jako główne procesy molekularne, stojące za czynnikami wpływającymi na jakość mięsa w badaniach proteomicznych i fosfoproteomicznych wytypowano: apoptozę, glikolizę, proteolizę i białka regulatorowe włókien mięśniowych. Analizy przeprowadzone przez Zapata i in. (2009) na bydłych mięśniach najdłuższych grzbietu, pochodzących od krów rasy Angus

pozwołyły zidentyfikować białka odpowiedzialne za jakość mięsa. Autorzy zaobserwowali powiązanie pomiędzy łańcuchami ciężkimi miozyny, łańcuchami lekkimi miozyny, aktyny, desminy i fragmentów tubuliny a jakością mięsa. Zidentyfikowane peptydy obejmują szeroki zakres szlaków komórkowych związanych z funkcjami strukturalnymi, metabolicznymi, rozwojowymi (Zapata i in., 2009). Kolejnym istotnym zastosowaniem analiz proteomicznych w hodowli zwierząt są badania ukierunkowane na zoptymalizowanie reprodukcji. Wydajność reprodukcyjna zwierząt gospodarskich ma trzy główne cele: utrzymanie wielkości stada, zapewnienie wydajności i skuteczności selekcji lub hodowli oraz uboju. W przypadku zwierząt gospodarskich opracowano różne techniki wspomagające reprodukcję w celu uniknięcia niepłodności. Sztuczne zapłodnienie, embrio transfer, zapłodnienie *in vitro* i klonowanie to tylko niektóre z nich. Opracowanie i udoskonalenie technik proteomicznych przyniosło korzyści i pozwoliło zrozumieć funkcjonowanie układu rozrodczego zwierząt. Lee i in. (2015) analizowali wielkość miotu, która jest ważnym parametrem wydajności reprodukcyjnej lochy. Autorzy wykazali, że do oszacowania wielkości miotu świń można wykorzystać profilowanie białek łożyskowych jako biomarkerów. U świń charakteryzujących się małą wielkością miotu zidentyfikowano sześć białek, w przeciwieństwie do 13 wytwarzanych przez świnię o dużej liczbie młodych w miocie. Aminopeptydaza (PSA, 70 kDa) i białko wiążące retinol 4 (RBP4, 23 kDa) były dominującymi białkami w grupie świń charakteryzujących się dużym miotem (Lee i in., 2015). Innymi badaniami wykorzystującymi analizy proteomiczne są analizy badające skład nasienia. Pinto i in. (2019) analizowali profile białkowe plemników kóz. Z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas zidentyfikowali 31 białek zaangażowanych w procesy związane ze spermatogenezą oraz zapłodnieniem, włączając w to białka: odpowiadające za połączenie plemnika z komórką jajową, błony akrosomalnej, zaangażowane w metabolizm, cytoszkieletu i odpowiedzi na stres oraz odpowiedzialne za mobilność plemników. Charakterystyka takich białek wyjaśnia molekularne mechanizmy spermatogenezy i modyfikacji zapewniające sukces rozmnażania (Pinto i in., 2019). Techniki proteomiczne zostały również wykorzystane w celu dostarczenia nowych informacji o patogenezie i mechanizmach infekcji bakteryjnej w chorobach zwierząt hodowlanych (Virgin, 2007). Badania proteomiczne koncentrowały się na odpowiedziach organizmów na patogeny podczas klinicznych zakażeń wymienia (mastitis) (Tawerna i in., 2007; Tedeschi i in., 2009). Taverna i in. (2007) odkryli główne białka bydlęcego mastitis *S. aureus*, które mogą być zaangażowane w rozpoznawanie receptorów komórek nabłonkowych wymienia. Tedeschi i in. (2009) zidentyfikowali trzy wysoko immunogenne białka w izolatach bydlęcego mastitis *S. aureus*, zaangażowanych w patogenezę. Ostatnie badania proteomiczne badające różne szczepy *S.*

*aureus* izolowane od krów z klinicznym i subklinicznym zapaleniem wymienia doprowadziły do identyfikacji 15 białek, które wykazywały zmienną ekspresję w szeregu izolatów *S. aureus* (Almeida i in., 2015; Wolf i in., 2011).

Biorąc pod uwagę światowe trendy, potrzeby poszukiwania nowych rozwiązań w hodowli oraz stale poszerzające się spektrum metod i zastosowań proteomiki, w 2019 r. Instytut Zootechniki PIB otworzył nowe laboratorium o profilu proteomicznym. W Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt została uruchomiona pracownia proteomiki, w której realizujemy badania ukierunkowane na analizę proteomiczną mięsa wieprzowego i wołowego w odniesieniu do jego parametrów jakości z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej. Pracownia jest wyposażona w urządzenie do przeprowadzenia rozdziału białek zgodnie z ich punktem izoelektrycznym PROTEAN® i12™ IEF (Bio-Rad), a wizualizacja żeli odbywa się z użyciem ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). System ten umożliwia detekcję żeli barwionych, zarówno chemiluminescencyjne, jak i fluorescencyjne, co daje możliwość identyfikacji setek białek o różnej ekspresji. Zastosowanie nowoczesnych technik proteomicznych oraz połączenie ich z wynikami badań genomicznych daje możliwość lepszego poznania procesów biologicznych zachodzących w organizmie, jak również uzupełniania wiedzy o nowe, cenne informacje dotyczące wymienionych już aspektów hodowli zwierząt gospodarskich. W przyszłości nasze badania będą ukierunkowane na wpływ czynników stresowych na profile białkowe w różnych tkankach zwierzęcych hodowanych *in vitro*, co daje możliwość poznania protein biorących udział w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Innym tematem, który wzbudza nasze zainteresowanie jest wpływ leków i dodatków paszowych na profile białkowe tkanek zwierząt zdrowych, jak również zwierząt z objawami klinicznymi chorób. Analizy te mogą dostarczyć informacji na temat odpowiedzi komórkowej organizmu na substancje lecznicze, jak również mogą pomóc zrozumieć patogenezę niektórych chorób. Wyniki badań opartych na analizach proteomicznych mogą stanowić nieocenione wsparcie diagnostyczne w codziennej profilaktyce hodowlanej zwierząt gospodarskich.

### Piśmiennictwo

- Almeida A.M., Bassols A., Bendixen E., Bhide M., Ceciliani F., Cristobal S., Ecker-sall P.D., Hollung K., Lisacek F., Mazzucchelli G., McLaughlin M., Miller I., Nally J.E., Plowman J., Renaut J., Rodrigues P., Roncada P., Staric J., Turk R. (2015). Animal board invited review: Advances in proteomics for animal and food sciences. *Animal*, 9 (1): 1–17; <https://doi.org/10.1017/S1751731114002602>
- Bilić P., Kuleš J., Galan A., Pontes L.G. de, Guillemin N., Horvatić A., Sabes A.F., Mrljak V., Eckersall P.D. (2018). Proteomics in veterinary medicine and animal science: Neglected scientific opportunities with immediate impact. *Proteomics*, 18 (14): 1800047; <https://doi.org/10.1002/pmic.201800047>



- Cai K., Shao W., Chen X., Campbell Y.L., Nair M.N., Suman S.P., Beach C.M., Guyton M.C., Schilling M.W. (2018). Meat quality traits and proteome profile of woody broiler breast (*pectoralis major*) meat. *Poultry Sci.*, 97 (1): 337–346; <https://doi.org/10.3382/ps/pex284>
- Cho J.H., Lee R.H., Jeon Y.-J., Park S.-M., Shin J.-C., Kim S.-H., Jeong J.Y., Kang H.-S., Choi N.-J., Seo K.S., Cho Y.S., Kim M.S., Ko S., Seo J.-M., Lee S.-Y., Shim J.-H., Chae J.-I. (2016). Proteomic assessment of the relevant factors affecting pork meat quality associated with *longissimus dorsi* muscles in Duroc pigs. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.*, 29 (11): 1653–1663; <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0050>
- Janik A. (1986). Badania nad lipoproteidowymi antygenami surowicy krwi u trzody chlewnej. *Rocz. Nauk. Zoot., Monogr. Rozpr.*, 24.
- Jia X., Hollung K., Therkildsen M., Hildrum K.I., Bendixen E. (2006). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. *Proteomics*, 6 (3): 936–944; <https://doi.org/10.1002/pmic.200500249>
- Joshi K., Patil D. (2017). Proteomics. In: *Innovative approaches in drug discovery*. Elsevier; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801814-9.00009-X>, pp. 273–294.
- Kamyczek M. (1997). Badania grup krwi i ich wykorzystanie w kontroli pochodzenia u świń. *Rocz. Nauk. Zoot., Supl.*, 1; <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmetal.element.dl-catalog-c7e28153-0d1d-4287-8317-84ee01262b29>
- Krzyżcin P. (2006 a). Antigenic markers of sheep plasma globulins in predicting resistance to mammary gland infections. *Ann. Anim. Sci.*, 6 (2); <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmetal.element.agro-84ed183f-e48f-427e-b045-81a961a0475d>
- Krzyżcin P. (2006 b). Usefulness of electrical resistance measurements of milk for field evaluation of udder health in Polish Merino ewes. *Scientific Messenger of Lviv National Academy of Veterinary Medicine*, 8 (1): 161–164.
- Krzyżcin P. (2007 a). Epitopes of blood serum protein epitopes as indicators of sheep susceptibility to mastitis. *Ann. Anim. Sci., Suppl.*, 1: 63–67.
- Krzyżcin P. (2007 b). Etiological factors of mastitis in Polish Merino ewes. *Ann. Univ. MC-S, Sectio EE, Zootechnica (Poland)*.
- Krzyżcin P., Natonek-Wiśniewska M. (2011). Znacznik antygenowy immunoglobulin klasy M w badaniach wchłaniania i zaniku przeciwciał pochodzenia siarowego u jagniąt. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 38: 197–204.
- Krzyżcin P., Rychlik T. (2008). Zależność między polimorfizmem hemoglobiny i transferyny a występowaniem mastitis u owcy kołudzkiej. *Med. Weter.*, 64 (11): 1327–1330.
- Lee D.-G., Nam J., Kim S.W., Kang Y.-M., An H.J., Kim C.W., Choi J.-S. (2015). Proteomic analysis of reproduction proteins involved in litter size from porcine placenta. *Biosci., Biotech., Biochem.*, 79 (9): 1414–1421; <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1039478>
- Marco-Ramell A., Almeida A.M. de, Cristobal S., Rodrigues P., Roncada P., Bassols A. (2016). Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context. *Mol. BioSystems*, 12 (7): 2024–2035; <https://doi.org/10.1039/C5MB00788G>
- Melody J.L., Lonergan S.M., Rowe L.J., Huiatt T.W., Mayes M.S., Huff-Lonergan E. (2004). Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J. Anim. Sci.*, 82 (4): 1195–1205; <https://doi.org/10.2527/2004.8241195x>

- Nogaj A., Nogaj J., Kozubska-Sobocińska A., Rychlik T. (2013). Evaluation of changes in the genetic structure of Hucul horses based on the analysis of I type of genetic markers. *Ann. Univ. MC-S, Sectio EE, Zootechnica*, 31 (2).
- Pinto T.M.F., Moreira R.F., Matos M.N.C., Soares V.V.M., Aguiar M.V. de A., Aragão P. de T.T.D. de, Alves Filho J.G., Moreno F.B.M.B., Monteiro-Moreira A.C. de O., Costa C.R.R., Lima Filho J.L. de, Eloy A.M.X., Cunha R.M.S. da, Pinto T.M.F., Moreira R.F., Matos M.N.C., Soares V.V.M., Aguiar M.V. de A., Aragão P. de T.T.D. de, Cunha R.M.S. da (2019). Evaluation of the proteomic profiles of ejaculated spermatozoa from Saanen bucks (*Capra hircus*). *Anim. Reprod.*, 16 (4): 902–913; <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2019-0001>
- Rychlik T., Krawczyk A. (2008). Kontrola wiarygodności rodowodów owiec w oparciu o markery genetyczne klasy I. *Wiad. Zoot.*, XLVI (2): 3–8.
- Skiba E., Węgrzyn J. (1976). Badania nad polimorfizmem antygenowym białek surowicy krwi u owiec – Antygeny A2 i A3. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 3 (1): 25–34.
- Skiba E., Węgrzyn J. (1993). IgG and IgM antigenic markers in sheep. *Genet. Pol.*, 34 (4): 345–355.
- Skiba E., Węgrzyn J. (1999). Antigenic marker of beta-macroglobulins in sheep-epitope Ns 1. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 26 (4).
- Skiba E., Willmann-Węgrzyn Z. (1977). A4 i A5 – dwa nowo wykryte antygeny białek surowicy krwi u owiec. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 4 (1): 63–71.
- Skiba E., Kościelny M., Węgrzyn J. (1994). Identification and genetics of the antigenic determinants A6 and A7-Beta-globulin markers of sheep. *Polish J. Theoretic. Appl. Genet.*, 35 (1–2): 81–91.
- Skiba E., Węgrzyn J., Kościelny M. (2000). Epitopes of blood proteins in sheep and the nomenclature. *Ann. Anim. Sci.*, 27 (2): 27–35.
- Taverna F., Negri A., Piccinini R., Zeconi A., Nonnis S., Ronchi S., Tedeschi G. (2007). Characterization of cell wall associated proteins of a *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis case by a proteomic approach. *Vet. Microbiol.*, 119 (2–4): 240–247; <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.09.007>
- Tedeschi G., Taverna F., Negri A., Piccinini R., Nonnis S., Ronchi S., Zeconi A. (2009). Serological proteome analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from sub-clinical mastitis. *Vet. Microbiol.*, 134 (3–4): 388–391; <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.019>
- Virgin H.W.S. (2007). *In vivo* veritas: Pathogenesis of infection as it actually happens. *Nature Immunol.*, 8 (11): 1143–1147; <https://doi.org/10.1038/ni1529>
- Wiel D.F.M. van de, Zhang W.L. (2007). Identification of pork quality parameters by proteomics. *Meat Sci.*, 77 (1): 46–54; <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.017>
- Wolf C., Kusch H., Monecke S., Albrecht D., Holtfreter S., von Eiff C., Petzl W., Rainard P., Bröker B.M., Engelmann S. (2011). Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics*, 11 (12): 2491–2502; <https://doi.org/10.1002/pmic.201000698>
- Zapata I., Zerby H.N., Wick M. (2009). Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (11): 4956–4963; <https://doi.org/10.1021/jf900041j>

## 13. Hodowle komórkowe w badaniach podstawowych oraz aplikacyjnych

Wojciech Witarski, Przemysław Podstawski, Sebastian Liszka

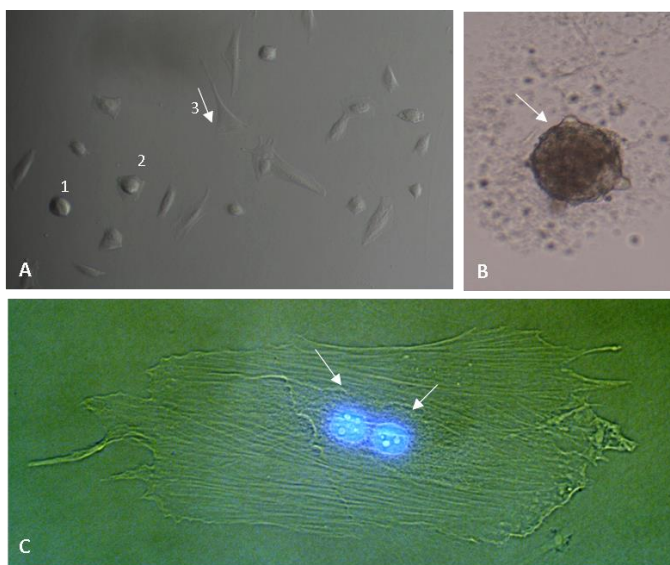
*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Hodowle komórek poza środowiskiem organizmu (*in vitro*) są użytecznym narzędziem dla szybko rozwijających się nauk przyrodniczych. Pozwalają badać procesy zachodzące na poziomie komórki czy tkanki, dotyczące zagadnień biologii molekularnej, biochemii, fizyki procesów biologicznych i innych. Dzięki nim uczyniono znaczne postępy na polu badań nad procesami starzenia, sygnalizacji komórkowej, komunikacji komórki z otoczeniem, procesami mutagenety i kancerogenezy. Przemysł farmaceutyczny wykorzystuje hodowle *in vitro* w celu produkcji syntetycznych białek (np. wytwarzanie szczepionek), w badaniach nad bezpieczeństwem stosowanych produktów (badania toksykologiczne). Do zalet doświadczeń *in vitro* zalicza się wysoką powtarzalność i spójność otrzymanych wyników; zwykle eksperymentom poddaje się „zunifikowane” komórki eukariotyczne, będące jednolitymi genetycznie klonami, w pełni kontrolując warunki eksperymentu.

### **Hodowle *in vitro* – krótki rys historyczny oraz stan obecny**

Z historycznego punktu widzenia, hodowle komórek zawieszonych były pierwszym typem hodowli *in vitro* wprowadzonych w Instytucie Zootechniki. W latach siedemdziesiątych z powodzeniem zaczęto stosować hodowle zawieszonowe limfocytów krwi obwodowej zwierząt gospodarskich (Araraki i Sparkes, 1963), które były wstępnym etapem wszystkich analiz cytogenetycznych: analiz poprawności oraz stabilności kariotypu w przypadku podziałów mitotycznych (por. „Wykorzystanie technik cytomolekularnych w nowoczesnej hodowli zwierząt”). Hodowle te wyprzedziły rozwój wiedzy z zakresu formulacji pożywek hodowlanych oraz postępowanie w instrumentarium służącym do długotrwałego pozaustrojowego utrzymania komórek. Dzięki wysokiej, około 10% zawartości krwi nie wymagają one regulowanej atmosfery dla utrzymania właściwego pH środowiska, ponadto dobrze tolerują wahania składu pożywki. Poprzez biochemiczną aktywację limfocytów hodowle są stosunkowo odporne na kontaminację. Do najpopularniejszych mitogenów (tj. stymulatorów podziałów komórkowych) zaliczamy lektynę pochodzącą ze szkarłatki amerykańskiej, która stymuluje do podziałów zarówno limfocyty B,

jak i limfocyty T poprzez oddziaływanie z receptorami z rodziny TLR (Beke-  
redjian-Ding i in., 2012). Znane są także mitogeny aktywujące wybiórczo lim-  
focyty B (bakteryjne lipopolisacharydy) czy limfocyty T (konkawalina A).

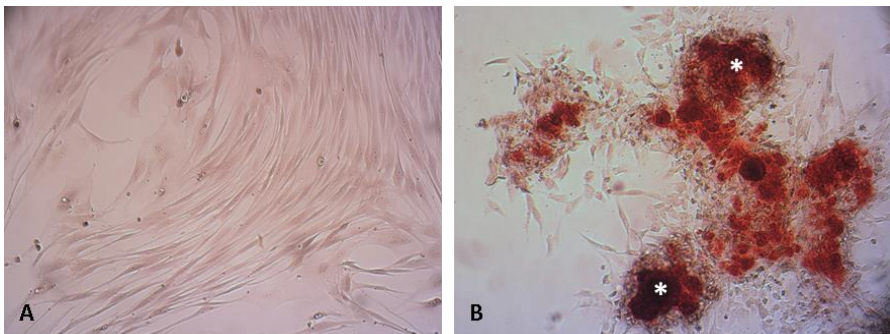


Fot. 1. A. Komórki sarkoidu końskiego w trakcie procesu adhezji do naczynia hodowlanego. Cyframi wskazano różne stadia procesu: 1 – kontakt z podłożem hodowlanym, 2 – zwiększanie powierzchni kontaktu poprzez ekspansję cytoplazmy, 3 – całkowicie adherentna komórka w trakcie ruchu (kierunek wskazany strzałką). B. Sferoid komórek sarkoidu otrzymany metodą „wiszącej kropli” C. Migrujące dwie komórki fibroblastów skóry konia; strzałką zaznaczono jądra barwione DAPI

Oprócz szczególnych przypadków, linii hemopoetycznych czy nowotworowych większość komórek wymaga stałej interakcji z podłożem stałym, które będzie rozpoznawane poprzez jej receptory na błonie komórkowej – niezależne od wapnia integryny, typu IgSF CAM; zależne od wapnia kadheryny, selektyny oraz pozostałe, głównie receptory z grupy CD (Lodish i Berk, 2016). Komórki rosnące w tym układzie mają także zdolność do adhezji poprzez niespecyficzne wiązania, jak oddziaływania van der Waalsa, jonowe (głównie z glikokaliksem komórkowym) i inne.

W laboratorium hodowli komórkowych pozyskiwane są hodowle pierwotne komórek – fibroblastów, chondrocytów oraz keratynocytów skóry końskiej. Pierwotne linie fibroblastów są pozyskiwane poprzez migrację komórek z umieszczonych w medium hodowlanym (DMEM), suplementowanym 10% dodatkiem FBS małych wycinków skóry. Pozyskanie pierwotnych linii keratynocytów wymaga zastosowania enzymatycznego rozdzielenia

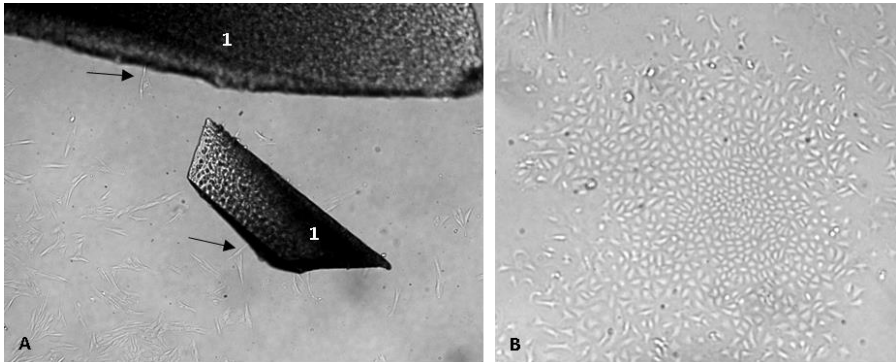
warstw skóry, a następnie zawieszenia w medium hodowlanym (DMEM) suplementowanym 5% dodatkiem FBS komórek keratynocytów pozyskanych podczas wytrząsania warstwy naskórka w roztworze trypsyny (wg Scharma i in., 2016). Chondrocyty pozyskuje się w sposób analogiczny jak w przypadku fibroblastów, gdzie wykorzystuje się technikę migracji komórek z pozyskanych blaszek chrząstki stawowej (fot. 3), by następnie prowadzić hodowlę w uniwersalnym medium hodowlanym DMEM wraz z dodatkiem surowicy do poziomu 10% (Ząbek i in., 2019). Przypadkiem wymagającym szczególnej uwagi ze względu na łatwość różnicowania się są hodowle komórek macierzystych (fot. 2). Wymagają one obecności całej palety substancji aktywnych utrzymujących je w stanie multipotentnym oraz potrzebują odpowiednich podłoży ahdezyjnych. Wraz z postępem nauki, stopniowo odchodzi się od ko-kultur komórkowych z wykorzystaniem tzw. *feeding layer* (warstwa odżywcza) na rzecz wytwarzanych *in vitro* zamienników błony podstawnej i substancji międzykomórkowych, by w przyszłości wykorzystywać jedynie syntetyczne i w pełni zdefiniowane produkty. W laboratorium komórkowym z powodzeniem wykorzystywano techniki pozyskiwania mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (komórki zrębu) oraz krwi obwodowej po stymulacji zwierzęcia GM-CSF (Nędzka, 2018). Od kilkadziesiąt lat duże nadzieje wiąże się z transplantacjami komórek macierzystych, autologicznymi oraz allogenicznymi, dzięki zdolnościom wydzielniczym komórek, potencjałem do samoodnowy oraz, co szczególnie ważne, możliwością różnicowania się w różne typy komórek w obrębie swojego pnia rozwojowego.



Fot. 2. Barwienie hematoksyliną oraz czerwienią alizaryny S fibroblastów (A) oraz różnicowanych komórek macierzystych w kierunku osteocytów (B). Wybarwione depozyty wapniowe onaczone gwiazdką (\*)

Obecnie prowadzone są badania wpływu wybranych genów wirusa brodawczaka krowiego (BPV, *bovine papillomavirus*) na rozwój sarkoidu,

który jest najczęściej spotykaną zmianą skórą występującą w rodzinie koniowatych (Knottenbelt, 2019). Doświadczenia polegają na wprowadzeniu do pozyskanych komórek skóry odpowiednio zaprojektowanych wektorów plazmidowych, zawierających ekspresyjne sekwencje poszczególnych białek wirusowych. Jest to kontynuacja badań mających na celu ustalenie różnic w inwazyjności oraz mobilności pomiędzy fibroblastami zdrowej skóry a komórkami uzyskanymi z sarkoidów końskich (fot. 1).



Fot. 3. Komórki chrząstki stawowej konia. **A** – proces migracji chondrocytów z hodowanych fragmentów chrząstki stawowej (1); **B** – kolonia chondrocytów o fenotypie chondroidalnym

Oprócz hodowli komórek pierwotnych prowadzi się badania z immortalizowanymi komórkami nowotworowymi CaCo<sub>2</sub>, które wykorzystuje się w badaniach nad wpływem składników żywieniowych na integralność nabłonka i żywotność samych komórek.

### **Perspektywy w badaniach *in vitro***

Organoidy są trójwymiarowymi (3D) hodowanymi strukturami komórkowymi, sztucznie generowanymi. Uzyskuje się je w celu generowania zbliżonych do fizjologicznych modeli *in vitro* do badania przebiegu procesów biologii rozwoju, tkanek w różnych eksperymentach dotyczących biodostępności substancji odżywczych i ksenobiotyków, toksykologii, farmakologii itp. (Rossi i in., 2018), umożliwiając redukcję zwierząt potrzebnych w badaniach. Ponadto, kultury 3D stanowią ważne narzędzie do modelowania *ex vivo* w badaniach morfogenezy tkanek i organogenezy (Kretzschmar i Clevers, 2016). W sytuacji, gdy potrzebne są bardziej złożone modele, współ-hodowla organoidowa z innymi typami komórek pozwala badać interakcje między komórkami i lepiej naśladować fizjologiczne warunki mikrośrodowiska (Moreira i in., 2018). Poczyniono znaczący postęp w zrozumieniu organoidów przy

użyciu kultur komórkowych komórek embrionalnych, indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS), dorosłych komórek macierzystych (Sasai, 2013). Hodowle *in vitro* mają znaczące zalety w porównaniu z tradycyjnymi modelami zwierzęcymi i systemami hodowli komórkowej w badaniach fizjologicznych u ludzi i modelowaniu chorób. Zaletą dotyczącą organoidu pochodzącego z ludzkiego narządu jest to, że może stabilnie utrzymywać swoje czyste cechy *in vivo* nawet po wielu pokoleniach, bez istotnych zmian genetycznych lub fizjologicznych (Grabinger i in., 2014). Z drugiej strony można zaobserwować brak niektórych ważnych składników komórkowych typowych dla tkanek *in vivo*. Podstawową różnicą między organoidami a tkankami *in vivo* jest brak naczyń krwionośnych (Iakobachvili i Peters, 2017) oraz brak interakcji z pozostałymi układami, w tym immunologicznym, co ma oczywiście także miejsce w przypadku hodowli 2D.

Dwuwymiarowe hodowle komórkowe pozwalają na modelowanie oddziaływań wewnątrzkomórkowych oraz na badanie interakcji komórka-komórka. Hodowle przestrzenne pozwalają na badanie interakcji na poziomie tkankowym, interakcji całych grup różnorodnych komórek w trójwymiarowym kontekście. Ze sztucznie uzyskanych tkanek komponuje się w pełni funkcjonalne organy, wspomagając się często dodatkowym rusztowaniem. Układ ten w lepszy sposób oddaje fizykochemiczne oraz sygnalizacyjne właściwości organów *in vivo*. Stąd, kolejnym naturalnym etapem rozwoju dla laboratorium hodowli *in vitro* jest opracowanie modeli organoidów jelitowych świni domowej dla potrzeb badań żywieniowych oraz toksykologicznych.

Organoidy jelitowe zostały po raz pierwszy utworzone z krypt jelita cienkiego zawierających komórki o ekspresji białka Lgr5, pozyskane od myszy. Komórki krypt zostały pobudzone do samoodnawiania i różnicowania przez dodanie nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF), R-spondyny i nogginy. Formacje te przypominają makroskopową strukturę jelit ze spolaryzowanymi komórkami nabłonkowymi, tworząc prosty kolumnowy nabłonek z wyraźnymi domenami krypty i kosmków (Wallach i Bayrer, 2017). W 2009 r. Sato i in. stworzyli samoodnawiającą się, nietransformowaną kulturę organoidów mini-jelitowych, która uwolniła się od zależności mezenchymalnej, zamiast tego wykorzystując określony zbiór komórek macierzystych.

Jelitowe komórki macierzyste (ISC), które znajdują się w kryptach jelitowych i charakteryzują się ekspresją genu markerowego LGR5+, mają zdolność różnicowania się – oprócz enteroidów – w bardziej wyspecjalizowane typy komórek kosmków jelitowych, takie jak komórki Panetha, kubkowe, enteroendokrynne, komórki M i inne (Biswas i in., 2015; Sato i Clevers, 2013). Modele 2D i 3D można również łączyć, tak jak zrobili to van der Hee i in. (2018), którzy stworzyli system, gdzie pierwotna monowarstwa nabłonkowa została wygenerowana z organoidów jelita krętego świń, uzyskanych z tkanki jelitowej dwóch 5-miesięcznych osobników.

Organoidy jelitowe można wytwarzać praktycznie dla każdego organizmu z komórek iPS lub z biopsji tkanek zawierających dorosłe komórki macierzyste, co pozwala badać rzadkie patogenne mutacje. Organoidy są podatne na modyfikację genetyczną przy użyciu CRISPR/ Cas9 i mogą być generowane z pojedynczych komórek w celu utworzenia klonalnych organoidów z pożądanymi zmianami genetycznymi, albo w celu analizy wpływu określonej mutacji lub naprawy mutacji obecnej u pojedynczego pacjenta w ramach medycyny spersonalizowanej (Schwank i in., 2013).

### Piśmiennictwo

- Araraki D.T., Sparkes R.S. (1963). Microtechniques for culturing leucocytes from whole blood. *Cytogenetics*, 2: 57–60.
- Bekeredjian-Ding I., Foermer S., Kirschning C.J., Parcina M., Heeg K. (2012). Poke weed mitogen requires toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes. *PLoS ONE*, 7 (1): e29806. doi:10.1371/journal.pone.0029806.
- Biswas S., Davis H., Irshad S., Sandberg T., Worthley D., Leedham S. (2015). Micro-environmental control of stem cell fate in intestinal homeostasis and disease. *J. Pathol.*, 237 (2): 135–145.
- Grabinger T., Luks L., Kostadinova F., Zimmerlin C., Medema J.P., Leist M., Brunner T. (2014). *Ex vivo* culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy. *Cell Death Dis.*, 5:e1228.
- Hee B. van der, Loonen L.M.P., Taverne N., Taverne-Thiele J.J., Smidt H., Wells J.M. (2018). Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Res.*, 28: 165–171.
- Iakobachvili N., Peters P. J. (2017). Humans in a dish: the potential of organoids in modeling immunity and infectious diseases. *Front. Microbiol.*, 8: 2402.
- Knottenbelt D.C. (2019). The equine sarcoid why are there so many treatment options? *Vet. Clin. Equine*, 35: 243–262.
- Kretzschmar K., Clevers H. (2016). Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish. *Develop. Cell*, 38: 590–600.
- Lodish H., Berk A. (eds) (2016). *Molecular Cell Biology*. 8th edition; ISBN: 9781464187445, W.H. Freeman & Co. Ltd.
- Moreira L., Bakir B., Chatterji P., Dantes Z., Reichert M., Rustgi A.K. (2018). Pancreas 3D organoids: current and future aspects as a research platform for personalized medicine in pancreatic cancer. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 5 (3): 289–298.
- Nędza D. (2018). Analiza profilu ekspresji pierwotnych linii komórkowych pozyskanych z krwi obwodowej konia domowego stymulowanego filgastrimem. Praca magisterska, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie.
- Rossi G., Manfrin A., Lutolf M.P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nat. Rev. Genet.*, 19: 671–687 (<https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>).



- Sasai Y. (2013). Cytosystems dynamics in self-organization of tissue architecture. *Nature*, 493: 318–326.
- Sato T., Clevers H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science (New York)*, 340 (6137): 1190–1194.
- Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., Wetering M. van de, Barker N., Stange D.E., Es J.H. van, Abo A., Kujala P., Peters P.J., Clevers H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature*, 459 (7244): 262–265.
- Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., Dekkers J.F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., Ent C.K. van der, Nieuwenhuis E.E., Beekman J.M., Clevers H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 13 (6): 653–658; doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002.
- Sharma R., Barakzai S.Z., Taylor S.E., Donadeu F.X. (2016). Epidermal-like architecture obtained from equine keratinocytes in three-dimensional cultures. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 10: 627–636; doi: 10.1002/term.1788.
- Wallach T., Bayrer J.R. (2017). Intestinal organoids: New frontiers in the study of intestinal disease and physiology. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 64 (2): 180–185.
- Ząbek T., Witarski W., Semik-Gurgula E., Szmatoła T., Kowalska K., Bugno-Poniewierska M. (2019). Chondrogenic expression and DNA methylation patterns in prolonged passages of chondrocyte cell lines of the horse. *Gene*, 707: 58–64.

## 14. Najważniejsze osiągnięcia, publikacje, patenty i nagrody z ostatnich 10 lat

### Publikacje

- Bugno-Poniewierska M., Stefaniuk-Szmukier M., Piestrzyńska-Kajtoch A., Fornal A., Piórkowska K., Ropka-Molik K. (2019). Genetic screening for cerebellar abiotrophy, severe combined immunodeficiency and lavender foal syndrome in Arabian horses in Poland. *Vet. J.*, 248: 71–73; doi: 10.1016/j.tvjl.2019.04.012.
- Gurgul A., Miksza-Cybulska A., Szmatoła T., Jasielczuk I., Piestrzyńska-Kajtoch A., Fornal A., Semik-Gurgul E., Bugno-Poniewierska M. (2019). Genotyping-by-sequencing performance in selected livestock species. *Genomics*, 111 (2): 186–195; doi:10.1016/j.ygeno.2018.02.002.
- Kozubka-Sobocińska A., Danielak-Czech B., Rejduch B. (2016). Cytogenetic and molecular diagnostics of XX/XY chimerism in cattle, sheep, and goats – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 16 (4): 989–1005.
- Kozubka-Sobocińska A., Smołucha G., Danielak-Czech B. (2019). Early diagnostics of Freemartinism in Polish Holstein-Friesian female calves. *Animals*, 9: 971; doi:10.3390/ani9110971.
- Pawlina-Tyszko K., Gurgul A., Szmatoła T., Ropka-Molik K., Semik-Gurgul E., Klukowska-Rötzler J., Koch C., Mählmann K., Bugno-Poniewierska M. (2017). Genomic landscape of copy number variation and copy neutral loss of heterozygosity events in equine sarcoids reveals increased instability of the sarcoid genome. *Biochimie*, 140: 122–132; doi: 10.1016/j.biochi.2017.07.006.
- Pawlina K., Gurgul A., Szmatoła T., Koch C., Mählmann K., Witkowski M., Bugno-Poniewierska M. (2017). Comprehensive characteristics of microRNA expression profile of equine sarcoids. *Biochimie*, 137: 20–28; doi: 10.1016/j.biochi.2017.02.017.
- Piestrzyńska-Kajtoch A., Gurgul A., Polak M.P., Smołucha G., Żmudziński J.F., Rejduch B. (2012). Characterization of PRNP and SPRN coding regions from atypical scrapie cases diagnosed in Poland. *Mol. Biol. Rep.*, 39 (3): 2575–2583; doi: 10.1007/s11033-011-1010-0.
- Piórkowska K., Tyra M., Rogoz M., Ropka-Molik K., Oczkiewicz M., Różycki M. (2010). Association of the melanocortin-4 receptor (*MC4R*) with feed intake, growth, fatness and carcass composition in pigs raised in Poland. *Meat Sci.*, 85: 297–301.

- Piórkowska K., Żukowski K., Połtowicz K., Nowak J., Wojtysiak D., Derebecka N., Wesoly J., Ropka-Molik K. (2018). Transcriptomic changes in broiler chicken hypothalamus during growth and development. *Int. J. Genom.*, ID 6049469, 1–10.
- Ropka-Molik K., Stefaniuk-Szmukier M., Żukowski K., Piórkowska K., Bugno-Poniewierska M. (2017). Exercise-induced modification of the skeletal muscle transcriptome in Arabian horses, *Physiol. Genom.*, 49 (6): 318–326.
- Ropka-Molik K., Stefaniuk-Szmukier M., Żukowski K., Piórkowska K., Gurgul A., Bugno-Poniewierska M. (2017). Transcriptome profiling of Arabian horse blood during training regimens. *BMC Genetics*, 18: 31.
- Semik E., Ząbek T., Gurgul A., Fornal A., Szmatoła T., Pawlina K., Wnuk M., Klukowska-Rötzler J., Koch C., Mählmann K., Bugno-Poniewierska M. (2018). Comparative analysis of DNA methylation patterns of equine sarcoid and healthy skin samples. *Vet. Comp. Oncology*, 16 (1): 37–46; doi: 10.1111/vco.1230.
- Semik E., Gurgul A., Ząbek T., Ropka-Molik K., Koch C., Mählmann K., Bugno-Poniewierska M. (2017). Transcriptome analysis of equine sarcoïds. *Vet. Comp. Oncology*, 15 (4): 1370–1381; doi: 10.1111/vco.12279.
- Smółucha G., Kozubka-Sobocińska A., Koseniuk A., Żukowski K., Lisowski M., Grajewski B. (2020). Polymorphism of the myostatin (MSTN) gene in landes and Kielecka geese breeds. *Animals*, 10, 10.
- Szmatoła T., Gurgul A., Ropka-Molik K., Jasielcuk I., Ząbek T., Bugno-Poniewierska M. (2016). Characteristics of runs of homozygosity in selected cattle breeds maintained in Poland. *Livest. Sci.*, 188: 72–80.

## Patenty

Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P., Bugno-Poniewierska M. (2019). Development of a sensitive and specific qPCR method to detect duck and goose DNA in meat and feathers. *European Food Research and Technology*, 245 (2): 335–342; doi: 10.1007/s00217-018-3165-6.

Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P., Piestrzyńska-Kajtoch A. (2013). The species identification of bovine, porcine, ovine and chicken components in animal meals, feeds and their ingredients, based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences. *Food Control*, 34.1: 69–78.

Słota E., Natonek M., Żyga A., Rejduch B. Patent Nr 196209 pn.: Sposób identyfikacji materiału pochodzenia zwierzęcego w mieszankach paszowych.

## Nagrody

W 2011 r. zespołowa nagroda Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, przyznana za osiągnięcia w zakresie wdrażania postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie, na podstawie opracowania pt.: *Wykorzystanie metod cytogenetyki molekularnej w nowoczesnej hodowli zwierząt gospodarskich*, dotycząca funkcjonowania krajowego systemu kontroli kariotypu zwierząt gospodarskich, przyznana dla prof. dr hab. Barbary Rejduch, dr hab. Anny Kozubskiej-Sobocińskiej, prof. IZ PIB, dr hab. Barbary Danielak-Czech.

W 2013 r. zespołowa nagroda Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi za osiągnięcia w zakresie wdrażania postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie za opracowanie pt.: *Cytogenetyczna i molekularna diagnostyka chimeryzmu komórkowego XX/XY u bydła, owiec i kóz*, autorstwa zespołu: prof. dr hab. Barbary Rejduch, dr hab. Anny Kozubskiej-Sobocińskiej, prof. IZ PIB, dr hab. Barbary Danielak-Czech.

W 2016 r. zespołowa nagroda Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, przyznana za osiągnięcia w zakresie wdrażania postępu w rolnictwie, rozwoju wsi, rynkach rolnych i rybołówstwie na podstawie: *Opracowania uzupełniającego zestawu markerów STR oraz SNP w kontroli rodowodów bydła*, przyznana dla prof. dr hab. Ewy Słoty, prof. dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej, dr hab. Anny Radko, dr inż. Dominiki Rubiś, dr hab. Artura Gurgula.

Nagroda za zajęcie II miejsca w X edycji Konkursu na najlepszą pracę doktorską z zakresu nauk zootechnicznych, organizowanego przez Polskie Towarzystwo Zootechniczne, za pracę Eweliny Semik: *Analiza poziomu metylacji wysp CpG regionów kodujących w DNA tkanki sarkoidów końskich*.

Katarzyna Piórkowska laureatką 21. konkursu w programie START (stypendia przyznawane są młodym, wybitnym uczonym na starcie kariery naukowej)

Nagroda za zajęcie II miejsca w XI edycji konkursu na najlepszą pracę doktorską z zakresu nauk zootechnicznych, organizowanego przez Polskie Towarzystwo Zootechniczne, za pracę Grzegorza Smołuchy: *Polimorfizm i ekspresja genów kodujących białka z nadrodziny TGF-Beta w aspekcie plenności owiec*.



**Zakład Biotechnologii  
Rozrodu  
i Kriokonserwacji**



**Spis treści rozdziału**  
***Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji***

1. *Zdzisław Smorąg:*  
Badania nad rozrodem zwierząt gospodarskich w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym – rys historyczny ..... 97
2. *Piotr Gogol, Monika Trzcńska:*  
Sztuczne unasienianie, konserwacja nasienia, regulacja płci i diagnostyka andrologiczna ..... 103
3. *Jolanta Opiela:*  
Rozwój metod pozaustrojowej produkcji zarodków oraz hodowli *in vitro* komórek macierzystych ..... 112
4. *Jacek Jura:*  
Transgeneza zwierząt; metody oraz wykorzystanie w hodowli i biomedycynie ..... 133
5. *Barbara Gajda:*  
Kriokonserwacja oocytów i zarodków zwierząt ..... 140
6. *Maria Skrzyszowska, Marcin Samiec:*  
Rozwój metod klonowania wybranych gatunków ssaków – możliwości ich wykorzystania w rolnictwie, biomedycynie oraz ochronie ginących ras i gatunków ..... 150





# **1. Badania nad rozrodem zwierząt gospodarskich w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym – rys historyczny**

**Zdzisław Smorąg**

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,  
32-083 Balice k. Krakowa*

## **Sztuczne unasielenie, konserwacja nasienia, regulacja płci i diagnostyka andrologiczna**

Pierwszą jednostką organizacyjną zajmującą się zagadnieniami rozrodu zwierząt gospodarskich w ramach Instytutu Zootechniki był Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, który powstał w 1952 r. Początkowo istniał jako Pracownia Fizjologii Rozrodu, a następnie po blisko 10 latach już jako samodzielny Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasielenia Zwierząt, którego kierownikami byli: prof. dr hab. Władysław Bielański (1952–1968), prof. dr hab. Stefan Wierzbowski (1968–1992), prof. dr hab. Zdzisław Smorąg (1992–2016), dr hab. Grażyna Ptak, prof. IZ PIB (2017–2018), dr hab. Jolanta Opiela, prof. IZ PIB (2018–2019), a od października 2019 r. – prof. dr hab. Zdzisław Smorąg.

W 2004 r. Zakład przyjął nazwę Działu Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, a od 2019 r. – Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji.

Od samego początku istnienia działalność naukowa, naukowo-popularyzacyjna oraz wdrożeniowa była skierowana na zagadnienia związane z organizacją rozrodu zwierząt w kraju i doskonaleniem metod stosowanych w sztucznym unasieleniu. Począwszy od drugiej połowy lat 70. XX w. tematyka Zakładu w coraz większym stopniu koncentrowała się na rozrodzie samicy, ze szczególnym uwzględnieniem badań dotyczących manipulacji na gametach i zarodkach.

W początkowym okresie Pracownia, później Zakład mieściły się w gmachu Collegium Godlewskiego, dawnego Studium Rolniczego UJ, obecnie Akademii Rolniczej przy al. Mickiewicza 21, korzystając z pomieszczeń ówczesnej Katedry Zoohigieny WSR. Twórcą i kierownikiem tak Pracowni, jak i później Zakładu był prof. dr hab. Władysław Bielański.

Bazę zwierzęcą dla prac doświadczalnych Zakładu stanowił Zootechniczny Zakład Doświadczalny w Balicach wraz z gospodarstwem Aleksandrowice. W miarę uzyskiwania odpowiednich pomieszczeń, adaptowanych na potrzeby laboratoryjne, następowało przenoszenie się Zakładu do Balic, zakończone w 1962 r., przy trwającej w dalszym ciągu rozbudowie Zakładu, ostatecznie uformowanego w 1968. Twórcą koncepcji reorganizacji Zakładu oraz

zasad działania powstałego przy nim Centralnego Banku Nasienia IZ był prof. dr hab. Stefan Wierzbowski, który przejął w 1968 r. od prof. Bielańskiego, pozostającego na WSR w Krakowie, kierownictwo Zakładu. W 1968 r. nastąpiło również oficjalne otwarcie Centralnego Banku Nasienia, faktycznie działającego już od 1965. W rekonstrukcji, rozbudowie i wyposażeniu Zakładu współdziałali ówczesni asystenci i adiunkci: Jerzy Branny, Wiesław Kareta, Andrzej Laszczka, Jerzy Morstin, Jan Pilch, Zdzisław Smorąg, Edward Wierchoś i inni.

W tym okresie wyodrębniono w ramach Zakładu trzy pracownie:

- Sztucznego Unasieniania i Konserwacji Nasienia,
- Higieny Nasienia,
- Morfologii Narządów Rozrodczych,

których zakres prac kształtował się stosownie do rozwijanych wówczas kierunków badawczych.

Dominujące nastawienie praktyczne podejmowanych przez Zakład prac we wszystkich kierunkach działalności, a szczególnie w zakresie doskonalenia metody sztucznego unasieniania jako drogi przyspieszania postępu hodowlanego, znalazło odpowiednie uznanie w decyzji Komitetu Nagród Państwowych o przyznaniu w 1972 r. Państwowej Nagrody Zespołowej I stopnia w dziedzinie techniki profesorom: Władysławowi Bielańskiemu (AR Kraków), Lechowi Jaśkowskiemu (Instytut Weterynarii) i Stefanowi Wierzbowskiemu (IZ) za udział w osiągnięciach naukowych i wdrożeniowych w zakresie sztucznego unasieniania zwierząt.

Oprócz prac naukowo-badawczych, których zakres i kierunki realizowane w poszczególnych okresach działalności Zakładu omówione są w osobnym opracowaniu, prowadzona była przez Zakład niemal od samego początku translukacji do Balic, tj. od 1962 r., intensywna działalność dydaktyczna i wdrożeniowa. Organizowane były (we współpracy z Katedrą Zoohigieny WSR w Krakowie) kursy szkoleniowe w zakresie oceny i konserwacji nasienia oraz zasad żywienia, eksploatacji i pielęgnacji buhajów, przeznaczone dla kadry kierowniczej, laboratoryjnej oraz lekarzy weterynarii Państwowych Zakładów Unasieniania Zwierząt, a później Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt. Odbываły się także kursy w zakresie eksploatacji rozplodowej tryków oraz oceny i konserwacji nasienia tryków dla pracowników ferm owczarskich i pracowników Polskiego Związku Owczarskiego, jak też kursy dotyczące pozyskiwania, oceny i konserwacji nasienia knurów i unasieniania loch dla pracowników organizowanych wówczas Stacji Unasieniania Loch oraz ferm trzody chlewnej. W późniejszych latach organizacja tego typu kursów i szkoleń została przejęta przez Ośrodek Szkoleniowy CSHZ przy SHiUZ w Zabierzowie k. Krakowa. Pracownicy naukowcy Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt IZ uczestniczyli w przygotowaniu tych

zająć (wykłady, ćwiczenia) równocześnie z pracownikami naukowymi AR w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy w Krakowie).

Również we współpracy z AR w Krakowie, w porozumieniu z Katedrą Zoohigieny, a później z Katedrą Rozrodu Zwierząt tej uczelni, pracownicy naukowcy i naukowo-techniczni ZFR prowadzili w tym czasie przez wiele lat zajęcia dydaktyczne z wybranych zagadnień rozrodu zwierząt dla studentów starszych roczników Wydziału Zootechnicznego oraz specjalizacji magisterskiej, głównie z zakresu uzyskiwania, oceny i konserwacji nasienia oraz badania samców na płodność.

Od początku istnienia Zakładu, pomimo niezbyt sprzyjających wówczas warunków, inicjowana i realizowana była przez jego kierownictwo oraz pracowników wymiana myśli i doświadczeń ze specjalistami z naukowych ośrodków zagranicznych. Dokonywała się ona nie tylko w oficjalnych, niejako urzędowych ramach, lecz również poprzez osobiste kontakty profesorów – kierowników Zakładu z wybitnymi w skali światowej uczonymi, odwiedzającymi Polskę i tutejsze ośrodki badawcze. Znaleźli się wśród nich prof. Tadeusz Mann, prof. Edward Sörensen, prof. Charles Thibault, prof. Nagase, prof. Ylachos, dr Wilmut, prof. John Aamdal, prof. Telesforo Bonadonna, prof. Werner Leidl, prof. J.P. Renard, prof. Peter Kauffold, prof. John Kopchick, prof. Takashi Nagai i wielu innych.

Współpracy i wymianie myśli naukowej z zakresu rozrodu zwierząt i sztucznego unasieniania służyły również zjazdy, konferencje oraz sympozja, tak krajowe jak i międzynarodowe, w których organizację i realizację pracownicy Zakładu wnosili znaczący wkład koncepcji i pracy. Z zasługujących na szczególne podkreślenie imprez o międzynarodowej randze należy wymienić, oprócz Polsko-Duńskiej Konferencji na temat aktualnych biologicznych i higienicznych problemów stosowania sztucznego unasieniania u bydła, zorganizowanej w Pawłowicach w 1973 r., przede wszystkim VIII Międzynarodowy Kongres Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt, który odbył się w Krakowie w dniach 12–16 lipca 1976. Był on pierwszą w tej dziedzinie międzynarodową imprezą w ówczesnych krajach socjalistycznych z udziałem uczestników z całego świata. Sekretarzem Generalnym Komitetu Organizacyjnego Kongresu był kierownik Zakładu, prof. dr hab. Stefan Wierzbowski. Biuro sekretariatu generalnego mieściło się w Instytucie Zootechniki w Zakładzie Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt w Balicach, a cały zespół pracowników Zakładu był intensywnie zatrudniony w różnych etapach i formach prac organizacyjnych oraz obsłudze Kongresu.

Zakład był również wielokrotnie organizatorem innych konferencji, sympozjów i spotkań naukowych organizowanych przez Instytut Zootechniki, o zasięgu krajowym, względnie międzynarodowym z udziałem zaproszonych uczestników zagranicznych, jak np. konferencja w Pawłowicach w 1982 r. nt. problemów rozrodu bydła w chowie wielkostatnym, sesja naukowa w Krakowie w 1986 nt. przenoszenia zarodków w praktyce hodowlanej, seminarium

w Krakowie w 1987 nt. podstaw embriologii stosowanej, sympozjum polsko-niemieckie w Balicach nt. nowych zagadnień w kwalifikacji rozplodowej koni, sympozjum w Krakowie w 1993 nt. badań w zakresie biotechnologii zwierząt oraz ich zastosowań w hodowli i weterynarii, sesja naukowa w Balicach w 1996 nt. andrologii w rozrodzie zwierząt (poświęcona jubileuszowi prof. S. Wierzbowskiego), czy też konferencja naukowa w Balicach w 1997 nt. stanu badań oraz możliwości praktycznego zastosowania biotechnologii rozrodu zwierząt gospodarskich.

Organizowane były także przez Zakład, w ścisłej współpracy z Sekcją Fizjologii i Patologii Rozrodu Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Oddział w Krakowie, sesje naukowe w latach 1960, 1973 i 1984. Wspólnie z Instytutem Zootechniki redagowany i wydawany był siłami pracowników Zakładu w latach 1973–1976 „Biuletyn Fizjologii i Patologii Rozrodu oraz Sztucznego Unasieniania” PTNW.

W połowie lat 70., a konkretnie w 1976 r., w wyniku poszerzenia zakresu, jak też zmiany profilu niektórych kierunków badawczych miał miejsce kolejny etap zmiany struktury Zakładu. Wyodrębniono w nim, obok nadal istniejących Pracowni Sztucznego Unasieniania i Konserwacji Nasienia oraz Pracowni Higieny Nasienia – Pracownię Biotechniki, w której podjęto pierwsze prace eksperymentalne z zakresu metod transplantacji zarodków bydła i owiec oraz dziedzin z tymi metodami związanych, jak superowulacja, metody zamrażania i oceny wartości biologicznej zarodków, ich pozyskiwania i aplikacji. Likwidacji uległa Pracownia Morfologii Narządów Rozrodczych. Prócz tego, w 1978 r. powołana została w strukturze Zakładu Pracownia Utrzymania Reprodukatorów z zadaniem prowadzenia badań w zakresie ustalania zależności pomiędzy warunkami utrzymania i żywienia zwierząt rozplodowych, tak samców jak i samic, a przebiegiem ich funkcji rozrodczych i płodnością. Pracownia ta w drugiej połowie lat 80. została przekształcona w Pracownię Użytkowania Rozplodowego Zwierząt, z ukierunkowaniem obejmującym, obok problematyki utrzymania reprodukatorów, także zagadnienia eksploatacji rozplodowej.

W tym czasie, prowadzone w Zakładzie od wielu lat badania nad rozrodem owiec (ocena płodności tryków, zamrażanie nasienia tryków, synchronizacja rui i wykotów u owiec) ujęto w ramy zorganizowanego zespołu: w 1982 r. powstała Grupa Problemowa ds. Rozrodu Owiec, przekształcona pod koniec lat 80. w Pracownię Rozrodu Owiec.

W strukturze Zakładu powstał i funkcjonował nieprzerwanie Centralny Bank Nasienia. Jego funkcje i zadania również uległy w latach 80. pewnej zmianie i poszerzeniu, stąd też uzasadniona stała się zmiana nazwy na: Pracownia Centralny Bank Materiału Genetycznego (CBMG), którego zadaniem nadal było przechowywanie materiału genetycznego (doszły tu zamrażane zarodki), prowadzenie badań z zakresu metod konserwacji nasienia oraz ocena importowanych izolowanych materiałów genetycznych.

Jak już wspomniano, koniec lat 70. i lata 80. to, oprócz utrzymania większości dotychczasowych kierunków i aktywności badawczej Zakładu, okres intensywnego rozwoju i poszerzenia zakresu badań dotyczących rozrodu u samic. Wychodząc z problematyki transplantacji i konserwacji zarodków, badaniami tymi objęto sukcesywnie wiele zagadnień, poszerzając w ten sposób płaszczyznę zainteresowań badawczych Zakładu o problemy biotechnologii rozrodu oraz inżynierii genetycznej. Kierunki takie, jak: klonowanie zarodków, hodowla niedojrzałych oocytów, zapłodnienie *in vitro* i transplantacja tak otrzymanych zarodków, uzyskiwanie zwierząt transgenicznych, czy też podjęcie problematyki molekularnej metody oznaczania płci zarodków wymagały z jednej strony uzyskania wyposażenia i aparatury o wysokim standardzie, z drugiej natomiast osiągnięcia przez współdziałający zespół badawczy bardzo wysokiego stopnia specjalizacji. Dzięki wieloletnim staraniom i zabiegom aktualne wyposażenie Zakładu w aparaturę, obejmujące m.in. zestaw do uzyskiwania oocytów bydłęcych pod kontrolą USG, inkubatory CO<sub>2</sub>, wysokiej klasy mikroskopy (Nikon), mikromanipulatory do prac mikrochirurgicznych na oocytach i zarodkach, urządzenia do elektrofuzji komórek, laserowy cytometr przepływowy oraz luminometr (Autolumat), nie odbiega od poziomu zachodnioeuropejskich pracowni tego typu.

Wraz z nowym ukierunkowaniem naukowo-badawczym Zakładu uległy poszerzeniu bądź zmianie również takie formy jego działalności, jak: szkolenia, kursy specjalistyczne, a także współpraca z zagranicą.

W latach 80. zorganizowano i przeprowadzono na miejscu w Zakładzie, jak i w terenie szereg kursów przenoszenia zarodków dla pracowników weterynarii, względnie zainteresowanych specjalistów z ośrodków hodowlanych i gospodarstw rolnych. W tym też czasie pracownicy naukowcy Zakładu wzięli udział w trzech kolejnych cyklach szkoleniowych Studium Podyplomowego AR z zakresu rozrodu zwierząt. Wykłady i zajęcia praktyczne były prowadzone w znacznej części w Zakładzie Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt w Balicach. Pod koniec lat 90. pracownicy naukowcy Zakładu uczestniczyli czynnie w wykładach i zajęciach praktycznych Studium Doktoranckiego otwartego w Instytucie Zootechniki.

Równocześnie, w latach 80. pracownicy naukowcy Zakładu zostali powołani przez Ministra Rolnictwa w skład Państwowej Komisji Egzaminacyjnej dla pracowników Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt oraz lekarzy wet. – andrologów, zatrudnionych w sieci stacji unasieniania w celu uzyskiwania uprawnień do przeprowadzania konserwacji i oceny nasienia wprowadzanego do produkcji. Komisja ta, działając we współpracy z Centralną Stacją Hodowli Zwierząt odbyła począwszy od 1979 r. do pierwszych lat 90. kilkanaście sesji, egzaminując w okresie swej działalności tak pod względem poziomu wiadomości teoretycznych, jak i praktycznych kilkaset osób i nadając im uprawnienia specjalistyczne.

Prócz omówionych form długotrwałego oddziaływania ZFR na poziom praktyki w zakresie rozrodu zwierząt, pracownicy Zakładu byli autorami wielu opinii oraz ekspertyz specjalistycznych, zleczanych przez Ministerstwo Rolnictwa oraz szereg placówek i przedsiębiorstw, a dotyczących tak zagadnień sprzętowo-materiałowych dla wyposażenia Stacji Unasienniania czy ferm hodowlanych, jak i problemów technologicznych, związanych z prowadzeniem rozrodu w różnego typu gospodarstwach.

Dalszemu rozwojowi i wyraźnemu ukierunkowaniu uległy także formy prowadzonej przez Zakład współpracy z zagranicą. Z wielorakiej tematyki i zakresów tej współpracy, prowadzonej uprzednio w ramach ówczesnej RWPG, jeszcze w latach 70. utrwaliła się i wyraźnie wyspecjalizowała współpraca z Niemcami, z Instytutem Niemieckiej Akademii Nauk w Dummerstorfie. Prowadzona była również w formie wymiany doświadczeń oraz wspólnych badań współpraca z Francją, z ośrodkiem INRA w Jouy-en-Josas; z USA, Edison Biotechnology Institute Ohio University; Cardiovascular and Pulmonary Research Institute Allegheny Campus Medical School-Pittsburg; jak też z Japonią, Tohoku National Agricultural Experiment Station, Department of Animal Production, Morioka.

Tematyka badawcza rozwijana w ramach utworzonych ww. kierunków zostanie szczegółowo przedstawiona w kolejnych podrozdziałach monografii.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> W przygotowaniu monografii wykorzystano opracowanie autorstwa prof. dr. hab. Andrzeja Laszczki i prof. dr. hab. Zdzisława Smorąga ujęte w publikacji wydanej z okazji 60-lecia IZ PIB (Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy 2000–2010. Wyd. IZ PIB, Kraków, 2010).

## **2. Sztuczne unasienianie, konserwacja nasienia, regulacja płci i diagnostyka andrologiczna**

**Piotr Gogol, Monika Trzcńska**

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Dominującą tematyką badawczą w początkowym okresie działalności Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt (obecnie: Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji) była problematyka rozrodu samców zwierząt gospodarskich. Wynikało to z potrzeb rozwijającej się hodowli i produkcji zwierzęcej oraz coraz bardziej upowszechnianego sztucznego unasieniania. Od początku problematyka ta była ukierunkowana w stronę rozwoju badań i opracowania metod oceny płodności samców, takich jak: ogiery, buhaje czy tryki. Obejmowała badania dotyczące zachowania płciowego ogierów i buhajów oraz anatomicznych i histologicznych uwarunkowań produkcji nasienia poprzez studia nad budową jąder, najądrzy i nasieniowodów. Dużą uwagę zwracano na metody oceny nasienia ze szczególnym uwzględnieniem jego morfologii oraz na rozwój metod konserwacji nasienia w stanie płynnym i jego zamrażanie w niskich temperaturach (etap zamrażania przy wykorzystaniu zestalonego CO<sub>2</sub>). Ze względu na potrzeby rozwijających się stacji sztucznego unasieniania byłą zostały podjęte prace nad wpływem warunków utrzymania i pielęgnacji samców, głównie buhajów na wartość ich nasienia i przydatność eksploatacyjną. W kolejnych latach nastąpił rozwój badań nad konserwacją nasienia buhajów, a później i innych gatunków (tryki, knury) poprzez zamrażanie w ciekłym azocie. Ta nowa wówczas technika długotrwałej konserwacji nasienia została dopracowana i zaadaptowana do warunków polskich oraz wprowadzona do praktyki sztucznego unasieniania w skali całego kraju przez pracowników Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt. Na podstawie całości uzyskanych doświadczeń i badań związanych z problematyką produkcji, uzyskiwania, konserwacji i użytkowania nasienia mrożonego została opracowana laboratoryjna instrukcja dla Stacji Unasieniania (PZUZ, później SHiUZ), wprowadzona przez Departament Produkcji Zwierzęcej jako obowiązująca w całym kraju.

W 1968 r. Ministerstwo Rolnictwa powołało w Instytucie Zootechniki Centralny Bank Nasienia (CBN) (obecna nazwa: Bank Materiałów Biologicznych). Głównym zadaniem CBN było przechowywanie nasienia od młodych buhajów, które początkowo dostarczano do CBN ze wszystkich zakładów unasieniania w Polsce. Ponadto, z uwagi na rozwijający się import nasienia, Ministerstwo Rolnictwa zleciło CBN prowadzenie jego oceny i kwalifikacji



do inseminacji w kraju. W 1968 r. zdeponowano w CBN pierwszy materiał biologiczny (nasienie) pochodzący od buhaja rasy polskiej czerwonej. W ciągu 50 lat funkcjonowania banku jego zasoby były sukcesywnie powiększane o nasienie buhajów ras: polskiej czerwonej, polskiej czerwono-białej, polskiej czarno-białej oraz białogrzbiętej. Dzięki temu powstała unikatowa i jedyna w Polsce kolekcja materiału biologicznego, oryginalna zarówno pod względem genotypu, jak i ilości zgromadzonego materiału. W chwili obecnej kolekcja Banku Materiałów Biologicznych składa się z ponad 58 000 porcji nasienia buhajów ras rodzimych. Większość materiału stanowi nasienie pozyskane przed wdrożeniem prac hodowlanych, a więc materiał pochodzący od zwierząt nie poddanych wypierającemu krzyżowaniu z wysoko wydajnymi rasami bydła mlecznego. Zgromadzona kolekcja materiału biologicznego ras rodzimych jest wykorzystywana jako element działań w programach hodowlanych w zakresie ochrony *in situ* zasobów genetycznych bydła w Polsce.

W kolejnych latach działalności Zakładu kontynuowane były prace nad doskonaleniem metod konserwacji oraz zastosowaniem mrożonego nasienia tryków (Kareta i Wierzbowski, 1993). W ramach badań nad rozrodem tego gatunku zwierząt opracowano metodę domacicznej inseminacji maciurek obniżonymi dawkami nasienia mrożonego oraz prowadzono wszechstronne obserwacje laparoskopowe rozwoju i owulacji pęcherzyków jajnikowych u owiec.

W szerokim zakresie podejmowanych zagadnień badawczych biotechnologii rozrodu rozpoczęto także prace nad regulacją i oznaczaniem płci plemników i zarodków (Bochenek i in., 2000 b). W początkowym okresie podjęto prace nad opracowaniem procedur przygotowania plemników buhaja, tryka i knura do analizy cytometrycznej i sortowania na frakcję „męską” i „żeńską”. W 2003 r. rozpoczęto prace nad seksowaniem nasienia buhajów. Pierwsze próby przeprowadzono na nasieniu dwóch buhajów rasy polska czerwona. Właśnie po inseminacji frakcją X jednego z nich urodziło się we wrześniu 2003 r. pierwsze w Polsce cielę o zaprogramowanej płci żeńskiej.

Następnie, prowadzone były intensywne badania nad rozwojem metody seksowania nasienia w kooperacji z partnerami krajowymi, jak też europejskimi i amerykańskimi. Badania te stanowiły kolejny etap we wprowadzaniu technologii regulacji płci u zwierząt gospodarskich w kraju (Bochenek i Smorąg, 2005, 2007). W praktyce hodowlanej, stosując do inseminacji nasienie seksowane i mrożone, uzyskano płodność powyżej 65% oraz zgodność spodziewanej płci ponad 97%.



Fot. 1. Cielę urodzone po inseminacji seksowanym nasieniem

W kolejnych latach w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB oprócz oceny standardowych parametrów jakościowych plemników opracowywano panel zaawansowanych metod diagnostycznych. W celu pogłębienia znajomości biologii komórki plemnikowej podjęto badania nad zastosowaniem biofizycznej, submolekularnej metody pomiaru emisji fotonowej z plemników buhaja, tryka i knura jako próbę, umożliwiającą bardziej wszechstronne określenie wpływów środowiskowych na te komórki, tak pod względem intensywności i prawidłowości metabolizmu, jak i stanu błon komórkowych. W 2002 r. podjęto współpracę z Akademią Pedagogiczną w Krakowie (obecnie Uniwersytet Pedagogiczny) nad ultrasłabą emisją fotonową (zwaną również ultrasłabą luminescencją) plemników zwierząt gospodarskich, jej źródłami, mechanizmami i energetyką, a także możliwością wykorzystania wyników pomiaru do poszerzenia wiedzy z zakresu biologii plemników i ich reakcji na stresowe czynniki środowiskowe i technologiczne. Dzięki ulepszeniom metodycznym i technicznym w zakresie hardware i software metody zliczania pojedynczych fotonów i użyciu filtrów granicznych zmierzono natężenie i sumy świetlne, monitorowano kinetykę emisji oraz wykonano unikalne pomiary rozkładu spektralnego promieniowania elektromagnetycznego emitowanego przez plemniki różnych gatunków zwierząt gospodarskich. Wykazana zależność pomiędzy parametrami luminescencji

z plemników a ich stanem fizjologicznym pozwoliła na określanie na podstawie parametrów indukowanej emisji fotonowej intensywności negatywnego oddziaływania na komórki plemnikowe różnorodnych czynników środowiskowych (Laszczka i in., 1995; Godlewski i in., 2003). Badania kontynuowano koncentrując się na określeniu optymalnych warunków pomiaru emisji fotonowej z plemników w luminometrze. Analizowano wpływ takich czynników, jak: rodzaj użytego rozrzedzalnika, koncentracja plemników w próbce, objętość próbki, stężenie wzmacniacza chemiluminescencji (luminolu) czy rodzaj użytego roztworu indukującego. Celem kolejnego etapu badań było lepsze poznanie procesów towarzyszących oddziaływaniu na plemniki czynników środowiskowych i technologicznych ze szczególnym uwzględnieniem stabilności peroksydacyjnej lipidów błon plazmatycznych plemników oraz emisji fotonowej jako biofizycznego zjawiska związanego z intensywnością i prawidłowością procesów metabolicznych zachodzących w komórce. Wykonane prace wykazały przydatność pomiaru emisji fotonowej z plemników do oceny jakości nasienia (Gogol, 2005; Gogol i Szczęśniak-Fabiańczyk, 2006; Gogol i in., 2007; Gogol i Pieszka, 2008; Gogol i in., 2009).

Ciągły rozwój biologii pozwolił lepiej poznać różnorodność molekularnej budowy struktur plemnika, co umożliwiło opracowanie metod oceny zmian apoptotycznych plemników jako wyznacznika ich zdolności zapładniającej (Trzcńska i in., 2011). Przy ocenie plemników nie można opierać się wyłącznie na cechach morfologicznych, charakterystycznych dla komórek somatycznych, lecz należy skoncentrować się na zmianach biochemicznych. Cechą charakterystyczną wczesnych stadiów apoptozy jest niewielka zmiana w przepuszczalności błony komórkowej. Mikropory powstające w zewnętrznej warstwie błony można identyfikować przy wykorzystaniu fluorochromu YO-PRO-1 (Trzcńska i in., 2008). Fluorochrom dyfunduje przez mikropory/mikrokanały w plazmo-lemmie i łączy się z DNA komórki, podczas gdy sama błona komórkowa ma jeszcze zachowaną strukturalną integralność. Dodatkowe zastosowanie w tej metodzie jodku propydydy (PI) umożliwia detekcję komórek nekrotycznych. Podczas przeprowadzania analizy w mikroskopie fluorescencyjnym można wyróżnić trzy subpopulacje plemników. Pierwszą z nich stanowią plemniki żywe (YO-PRO-1<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), które nie emitują fluorescencji, drugą plemniki apoptotyczne YO-PRO-1-pozytywne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), fluoryzujące na zielono oraz trzecią plemniki martwe, nekrotyczne, emitujące zarówno zieloną, jak i czerwoną fluorescencję (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Metodą pozwalającą na relatywnie wczesną diagnostykę apoptozy jest wykrywanie reszt fosfatydyloseryny (PS) na powierzchni błony cytoplazmatycznej za pomocą aneksyny V sprzężonej z izotiocyjanianem fluoresceiny (ang. *fluorescein isothiocyanate*; FITC). W czasie apoptozy zachodzi translokacja fosfatydyloseryny z powierzchni wewnątrzkomórkowej na zewnętrzną. Aneksyna V w obecności jonów Ca<sup>2+</sup> łączy się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloseryna, dzięki czemu stosuje się ją jako marker

apoptozy. Oznaczanie na powierzchni błony komórek reszt PS przy użyciu aneksyny V sprzężonej z FITC oraz weryfikacja stopnia przepuszczalności błony plazmatycznej dla PI, barwiącego DNA i RNA komórek o zaburzonej integralności błony umożliwia odróżnienie plemników żywych, nieapoptotycznych (aneksyna V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) od wczesnoapoptotycznych (aneksyna V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) oraz wczesnonekrotycznych (aneksyna V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), a także od plemników martwych (nekrotycznych) (aneksyna V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>). Wyznakowane aneksyną V-FITC plemniki emitujące – zieloną, a barwiące się jodkiem propydyiny – czerwoną fluorescencją można analizować w mikroskopie fluorescencyjnym (Trzcińska i Bryła, 2011; Bryła i Trzcińska, 2014). Z badań własnych wynika, że wykrywanie zmian apoptotycznych w plemnikach knura pozwala na określenie ich zdolności zapładniających *in vivo* (Trzcińska i in., 2009, 2011, 2015; Trzcińska i Bryła, 2015). W czasie procesu apoptozy dochodzi również do otwarcia megakanałów mitochondrialnych i spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego. Mitochondria plemnika, dzięki zdolności do produkcji energii – w procesie fosforylacji oksydacyjnej – umożliwiają jego ruch postępowy, stając się strukturami określającymi zdolność plemników do zapłodnienia komórki jajowej. Do pomiaru zmian potencjału mitochondrialnego może służyć barwnik JC-1, który w żywych plemnikach gromadzi się w mitochondriach w postaci agregatów widocznych w mikroskopie fluorescencyjnym jako czerwono-pomarańczowa fluorescencja, natomiast w plemnikach apoptotycznych i nekrotycznych o zdepolaryzowanej błonie mitochondrialnej gromadzi się w formie monomerycznej, widocznej w postaci zielonej fluorescencji. Badania własne (Trzcińska i in., 2008) na plemnikach knura wykazały pozytywną korelację pomiędzy ruchem, spadkiem potencjału mitochondrialnego a odsetkiem plemników apoptotycznych. Otwarcie megakanałów i wypływ jonów wapnia z mitochondriów poprzedzają inne zmiany charakterystyczne dla apoptozy, takie jak kondensacja chromatyny oraz fragmentacja DNA. W ZBRiK ocenę struktury (fragmentacji) chromatyny wykonuje się metodą Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) (Bochenek i in., 2000 a); Gogol i in., 2000, 2002). Opiera się ona na stwierdzeniu, że nieprawidłowa struktura chromatyny jest związana ze wzrostem wrażliwości DNA na denaturację. W metodzie tej wykorzystuje się metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny. Barwnik ten związany z podwójną nicią DNA fluoryzuje w paśmie zielonym, natomiast w połączeniu z pojedynczą nicią DNA w paśmie czerwonym. Po łagodnej denaturacji chromatyny za pomocą obniżonego pH u plemników z nieprawidłową jej strukturą następuje wzmocnienie fluorescencji w paśmie czerwonym. Ten wzrost świecenia jest mierzony w cytometrze przepływowym. Badania własne wykazały występowanie wysokiej korelacji pomiędzy wrażliwością chromatyny plemnikowej buhajów na denaturację a płodnością uzyskiwaną po inseminacji tym

nasieniem (Bochenek i in., 2001). Z kolei, badania przeprowadzone na nasieniu knura wykazały, że procedura zamrażania-rozmrażania nie indukuje fragmentacji DNA w plemnikach (Trzcńska i Bryła, 2015).

W Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB od kilku lat prowadzono prace nad opracowaniem składu rozrzedzalnika mroźniowego, jak również sposobu postępowania z nasieniem knura podczas mrożenia. Realizacja prac była możliwa w ramach projektu badawczego nr N311 524840 pt.: „Antyoksydanty i nowe związki osłaniające w kriokonserwacji nasienia knura ocenianego przy zastosowaniu markerów apoptotycznych” oraz działalności statutowej IZ PIB. Poprawę efektywności kriokonserwacji nasienia knura planowano osiągnąć poprzez dodatek substancji przeciwdziałających procesom oksydacyjnym oraz substancji o właściwościach osłaniających wrażliwe na uszkodzenia kriogeniczne błony plazmatyczne plemników. W badaniach zastosowano suplementację rozrzedzalnika żółtkowo-laktowowo-glicerolowego wybranymi antyoksydantami (glutation, butylowany hydroksytoluen, dysmutaza ponadtlenkowa i/lub katalaza) oraz solą sodową kwasu hialuronowego jako substancją osłaniającą. Jakość nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu oceniano na podstawie odsetka plemników: wykazujących ruch całkowity i postępowy, żywych ocenianych za pomocą markerów apoptotycznych (YOPRO-1/PI, Annexin V-Fluos/PI), żywych z integralnym akrosomem (PNA-FITC/PI), z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1) oraz nie wykazujących fragmentacji DNA (TUNEL). Na podstawie przeprowadzonych badań (Trzcńska i Bryła, 2015; Trzcńska i in., 2015) opracowano nowy skład rozcieńczalnika mroźniowego i technologię kriokonserwacji nasienia knura. Badania nad kriokonserwacją nasienia knura doprowadziły do uzyskania w 2018 r. patentu nr PL 228192 B1 na wynalazek pt.: Rozcieńczalnik do mrożenia nasienia knura i sposób mrożenia nasienia oraz złożenia w 2019 r. wniosku patentowego nr P 432175 na wynalazek pt.: Sposób przygotowania dawki inseminacyjnej kriokonserwowanego nasienia knura. Dzięki opatentowanej metodzie możliwe jest uzyskanie wysokiej jakości nasienia po rozmrożeniu oraz wysokiej liczby żywych prosiąt urodzonych po inseminacji kriokonserwowanym nasieniem knura.



Fot. 2. Prosięta urodzone po inseminacji kriokonserwowanym nasieniem

Prowadzone w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB badania pozwalają na wykorzystanie kriokonserwanego nasienia knura w programach ochrony zasobów genetycznych, jak i specjalistycznych programach hodowlanych, mających na celu zachowanie wybranych cech, również tych utraconych w wyniku intensywnej hodowli. Problem w szczególności dotyczy nielicznych i mocno spokrewnionych stad ras rodzimych świń: puławskiej, złotnickiej pstrej i złotnickiej białej. Zgromadzenie materiału biologicznego w postaci nasienia knurów tych ras jest jedyną możliwością zabezpieczenia puli genetycznej populacji na wypadek jej zubożenia, spadku zmienności, wyginięcia czy eliminacji całych stad, np. w wyniku pojawienia się wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASF).

W 2014 r. powstał na terenie Instytutu Zootechniki PIB Krajowy Bank Materiałów Biologicznych (KBMB) w celu gromadzenia materiału biologicznego od pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich. Utwo-

rzono w nim 4 banki gatunkowe dla: świń, koni, owiec i kóz oraz bydła. W poszczególnych bankach przechowywany jest materiał biologiczny w postaci nasienia oraz zarodków i oocytów. Od 2018 r. KBMB został włączony do Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji. Do dnia dzisiejszego w KBMB zgromadzono 37 400 słomek nasienia buhajów oraz 143 zarodki świń rasy puławskiej i 34 złotnickiej pstrej (Trzczińska i Bryła, 2019).

### Piśmiennictwo

- Bochenek M., Smorąg Z. (2005). Regulacja płci u bydła poprzez separacje plemników X i Y – wstępne wyniki badań. *Med. Weter.*, 61: 50–52.
- Bochenek M., Smorąg Z. (2007). Regulacja płci ssaków za pomocą separacji plemników. *Wyd. UWM Olsztyn, J. Strzeżek (red.), Biologiczne uwarunkowania wartości rozrodowej samca*, ss. 347–357.
- Bochenek M., Smorąg Z., Różycki M., Dziadek K. (2000 a). Examination of sperm chromatin structure and fertility of boar semen. *Ann. Anim. Sci.*, 27, 2: 79–86.
- Bochenek M., Skrzyszowska M., Smorąg Z. (2000 b). Seksowanie nasienia buhajów. *Prz. Hod.*, 68 (6): 14–16.
- Bochenek M., Smorąg Z., Pilch J. (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56: 557–567.
- Bryła M., Trzczińska M. (2014). Zastosowanie związków osłaniających w kriokonserwacji nasienia knura. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 41 (1): 33–39.
- Godlewski M., Gogol P., Kwiecińska T., Laszczka A., Szczeńsiak-Fabiańczyk B., Wierzuchowska D. (2003). Zastosowanie pomiaru emisji fotonów do oceny wartości biologicznej nasienia. *Biotechnologia*, 1 (60): 116–128.
- Gogol P. (2005). Iron-induced luminescence of boar spermatozoa cells. *Ann. Anim. Sci.*, 5 (1): 91–98.
- Gogol P., Pieszka M. (2008). Ferrous ion induced photon emission as a method to quantify oxidative stress in stored boar spermatozoa. *Folia Biol. (Kraków)*, 56 (3–4): 173–177.
- Gogol P., Szczeńsiak-Fabiańczyk B. (2006). Effect of long-term storage on induced photon emission of boar spermatozoa. *Czech J. Anim. Sci.*, 51 (2): 61–65.
- Gogol P., Bochenek M., Smorąg Z. (2000). Sperm chromatin integrity of bucks transgenic for the WAP bGH gene. *Anim. Reprod. Sci.*, 64: 113–120.
- Gogol P., Bochenek M., Smorąg Z. (2002). Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod. Dom. Anim.*, 37: 92–95.
- Gogol P., Wierzchoś-Hilczer A., Cegła M. (2007). Iron-induced luminescence as a method for assessing lipid peroxidation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.*, 1 (6): 844–848.
- Gogol P., Szczeńsiak-Fabiańczyk B., Wierzchoś-Hilczer A. (2009). The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod. Biol.*, 9 (1): 39–49.
- Kareta W., Wierzbowski S. (1993). An assessment of sperm motility estimation for evaluation of rams. *Theriogenology*, 40, 1: 205–209.

- Laszcza A., Godlewski M., Kwiecińska T., Rajfur Z., Sitko D., Szczęśniak-Fabiańczyk B., Słowiński J. (1995). Ultra-weak luminescence of spermatozoa. *Current Topics Biophys.*, 19, 1: 20–31.
- Trzcińska M., Bryła M. (2011). Wpływ apoptozy na zdolność zapładniającą plemników knura. *Prz. Hod.*, 12: 9–11.
- Trzcińska M., Bryła M. (2015). Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18: 473–480.
- Trzcińska M., Bryła M. (2019). Kriokonserwacja materiału biologicznego zwierząt gospodarskich (<https://lifescience.pl/miesiac-partnera-klastra/kriokonserwacja-materialu-biologicznego-zwierzat-gospodarskich/>).
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2008). Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *J. Anim. Feed Sci.*, 17: 372–380.
- Trzcińska M., Bryła M., Bochenek M., Słomski R., Smorąg Z. (2009). Assessment of plasma membrane and chromatin structure of sperm from transgenic and non-transgenic boars. *Theriogenology*, 72: 1141–1147.
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2011). Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo*. *Anim. Reprod. Sci.*, 124: 90–97.
- Trzcińska M., Bryła M., Gajda B., Gogol P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 83: 307–313.



### 3. Rozwój metod pozaustrojowej produkcji zarodków oraz hodowli *in vitro* komórek macierzystych

Jolanta Opiela

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Badania przeprowadzane w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu Zwierząt koncentrowały się na produkcji zarodków zwierzęcych *in vitro*, w tym na opracowaniu złożonych metod dojrzewania oocytów, zapłodnienia i hodowli zarodków. Ponadto, opracowano protokoły długoterminowej hodowli przedantralnych i wczesno antralnych pęcherzyków jajnikowych u bydła (Smorąg i in., 2008; Kątska i Ryńska, 1998).

W 1985 r. opracowano test penetracji komórek jajowych chomika jako metodę oceny nasienia ssaków (Kątska, 1985). Inne badania dotyczyły osłonki przejrzystej (*zona pellucida*, ZP) oocytów bydłęcych. Po pierwsze, zbadano wpływ utrzymywania niedojrzałych oocytów bydłęcych w jajowodach bydłęcych *in vitro* na rozpuszczanie ZP w 0,1% pronazie, rolę komórek wzgórka jajonośnego w tym procesie i możliwość odwrócenia procesu. Oocyty ogołoczone z otaczających komórek wieńca promienistego umieszczono w izolowanych jajowodach bydła w 37°C. Średni czas rozpuszczania ZP wydłużył się proporcjonalnie do czasu utrzymywania oocytów w jajowodach. W przypadku grupy kontrolnej do rozpuszczenia ZP wystarczyło tylko 4,6 min. Gdy komórki jajowe trzymano *in vitro* przez 120 min, a następnie zanurzono w płynie pęcherzykowym przez 30 min do 18 godzin, nastąpiło znaczące odwrócenie wrażliwości osłonki przejrzystej na proteolizę (Smorąg i Kątska, 1988).

Po drugie, zbadano wpływ utwardzania osłonki przejrzystej dojrziałych oocytów bydłęcych *in vivo* na zapłodnienie. Do badania wykorzystano przedowulacyjne i poowulacyjne oocyty pozyskane od superowulowanych jałówek. Oocyty przedowulacyjne, zanim zostały użyte do zapłodnienia *in vitro* składały się z: 1) hodowanych *in vitro* przez 4–6 godzin w celu umożliwienia dokończenia dojrzewania oraz 2) inkubowanych w jajowodzie królika przez 4–5 godzin w celu umożliwienia dokończenia dojrzewania i wywołania stwardnienia osłonki przejrzystej. Kilka oocytów służyło jako kontrola dojrzalności jądrowej i rozpuszczalności ZP. Oocyty przedowulacyjne i postowulacyjne zapładniano *in vitro* przy użyciu zamrożonych/rozmrzniętych plemników traktowanych heparyną i kapacytowanych metodą podpływania plemników (ang. *swim-up*). Stwierdzono znaczące różnice ( $P < 0,01$ ) między wskaź-

nikami zapłodnienia hodowanych oocytów przedowulacyjnych (68,8%) i inkubowanych w jajowodach królika (42,9%) lub odzyskanych z jajowodów bydłych (40,7%). Można stwierdzić, że twardnienie ZP wyraźnie wpływa na efektywność zapłodnienia oocytów. Czynnikiem ten należy wziąć pod uwagę przy rozważaniu źródła pozyskiwania lub traktowania oocytów używanych do zapłodnienia *in vitro* (Kątska i in., 1989).

Efektorem prac doskonalących technikę IVP u bydła było urodzenie pierwszego w Polsce cielęcia pochodzącego z zarodka uzyskanego przy zastosowaniu kompleksowej metody *in vitro*, obejmującej zapłodnienie, a następnie hodowlę zarodka, wszystko poza organizmem samicy. Miało to miejsce 31 marca 1990 r. w Zakładzie Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Instytutu Zootechniki, gdzie poród rozwiązano stosując cesarskie cięcie ze względu na znaczną dysproporcję między wielkością cielęcia (41 kg) a matki (352 kg). Przypadek ten stanowił wówczas dowód, jeden z bardzo nielicznych na świecie, możliwości uzyskiwania potomstwa z oocytów pobieranych z jajników krów rzeźnych. Ogółem do hodowli użyto 136 niedojrzałych oocytów bydłych. Zapłodnienie stwierdzono u 93 (68,3%) oocytów, a podziały zarodkowe wykazywało 30 (22,0%) zygot. W wyniku 7-dniowej hodowli uzyskano 6 blastocyst i jedną morulę (5,1%). Rozwój pozostałych zarodków uległ zahamowaniu w stadiach od 1 do 8 'blastomerów bądź miał przebieg nieprawidłowy. 6 uzyskanych blastocyst przeniesiono metodą niechirurgiczną czterem zsynchronizowanym jałówkom-biorczyniom. Ciążę stwierdzono u jednej jałówki. W wyniku porodu, który nastąpił w 283. dniu ciąży, uzyskano buhajka, którego umaszczenie i cechy budowy wskazywały, że ojcem był buhaj rasy simentalskiej (Kątska i in., 1991).

Zespół prof. Kątskiej badał również wpływ współhodowli na zdolność rozwojową bydłych oocytów poddawanych dojrzewaniu i zapłodnieniu *in vitro* (Kątska i in., 1995). Przeprowadzono dwa eksperymenty w celu porównania wpływu różnych systemów hodowli i fazy cyklu jajowodów dawcy na potencjał rozwojowy współhodowanych zarodków bydłych pochodzących z dojrzałych i zapłodnionych *in vitro* oocytów i ustalenia skutecznej metody zamrażania komórek nabłonka jajowodu. W pierwszym eksperymencie badano efekty pożywek (Menezo B2, syntetyczny płyn jajowodowy, SOF); surowic (brak surowicy, płodowa surowica cielęca FCS, ludzka surowica HS); oraz obecność lub brak monowarstwy komórek nabłonka jajowodu bydła (BOEC) na zdolności rozwojowe zarodków bydłych. W drugim eksperymencie zbadano wpływ statusu hormonalnego dawcy jajowodów (superowulowany kontra niestymulowany) oraz kriokonserwację tkanki jajowodów na wsparcie kompetencji rozwojowych bydłych zygot uzyskanych z dojrzałych i zapłodnionych *in vitro* oocytów. Komórki nabłonkowe jajowodu kriokonserwowano zgodnie ze zmodyfikowaną dwustopniową metodą wcześniej stosowaną na zarodkach króliczych. Dla zygot hodowanych wspólnie z monowarstwą BOEC uzyskano następujące wskaźniki rozwoju blastocysty: 40,1%;

34,5%; 13,0%; i 19,2%, odpowiednio w pożywce B2 bez surowicy, B2 plus 20% HS, SOF plus 20% HS i SOF plus 20% FCS. W przypadku braku BOEC wskaźniki wyniosły 12,3%; 41,4%; i 8,9% odpowiednio w B2 plus 20% HS, SOF plus 20% HS i SOF plus 20% FCS. Wykazano, że źródło komórek nabłonkowych jajowodów i wcześniejsze zamrożenie nie miało wpływu na odsetek uzyskanych zygot (około 70%) ani na odsetek rozwiniętych blastocyst (około 20%).

Pod koniec lat dziewięćdziesiątych rozpoczęto badania dotyczące metod hodowli pęcherzyków preantralnych. Kątska i in. (1989) zbadali wpływ wielkości przedantralnych i wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych bydła i pożywek hodowlanych na ich wzrost *in vitro*. Poszczególne pęcherzyki izolowane przez mikrodysekcję kawałków jajnika były dzielone na różne klasy wielkości: od 75 do 324 i> mikronów. Pęcherzyki jajnikowe hodowano osobno w TCM 199 z dodatkiem płodowej surowicy cielęcej (FCS) + suplementy (FSH, estradiol-17 beta, insulina, transferyna, selenin sodu, pirogronian sodu, 1-glutamina i hipoksantyna) lub w Menezo B2 + FCS + suplementy (Eksperyment 1) oraz w TCM 199 + surowica (SS, steer serum) z dodatkami lub bez dodatkowych suplementów (eksperyment 2). Całkowita liczba izolowanych pęcherzyków różnej wielkości była podobna u jałówek i krów. Nie obserwowano znaczącej różnicy w szybkości wzrostu pęcherzyków o różnych rozmiarach w dwóch pożywkach (TC 199 i B2). Jednak, hodowla pęcherzyków w TCM 199, która została uzupełniona tylko SS i nie zawierała żadnych innych dodatków, znacznie zmniejszyła przeżywalność i wzrost pęcherzyków w porównaniu z hodowanymi w suplementowanej pożywce. Czas przeżycia pęcherzyków był związany z ich wielkością na początku hodowli. Najdłuższy okres wzrostu dotyczył pęcherzyków o średnicy 275 do 324 mikronów (tj. np. 10,7 +/- 5,7; 12,1 +/- 6,2 i 12,2 +/- 2,7 dni, odpowiednio dla hodowli w suplementowanym surowicą FCS Menezo B2 i TCM 199 oraz TCM 199 suplementowanym surowicą SS). Przeżycie i wzrost niektórych pęcherzyków utrzymano przez 23 dni. Kolejnym celem doświadczenia było scharakteryzowanie wzrostu i konfiguracji jądrowej oocytów izolowanych z późnych przedantralnych i wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych bydła bezpośrednio po uzysku i hodowli *in vitro* (Kątska i in., 2000). Poszczególne pęcherzyki izolowano metodą mikrodysekcji z kawałków zewnętrznej kory jajnika. Pęcherzyki zostały posortowane według średnicy do klas od 175 do 224, 225 do 274 i 275 do 325 mikrometrów. Pęcherzyki wybrane do hodowli *in vitro* umieszczano pojedynczo w 40 mikrolitrowych kroplach pożywki (TCM 199 wzbogaconej w FCS, insulinę, transferynę, selenin sodu, pirogronian sodu, 1-glutaminę, hipoksantynę, FSH i estradiol-17beta) i hodowano przez 6, 8, 11, 14 lub 17 dni. Rozmiary pęcherzyków i oocytów stopniowo zwiększały się wraz z wydłużaniem czasu trwania hodowli. Analiza związku między średnimi średnicami oocytów w czasie uzysku i po hodowli *in vitro* wykazała znaczne różnice po hodowli trwającej 8 dni (76,9 ± 9,9 vs. 86,1 ± 11,1 mikrom; P<0,05), 11 dni

(77,0 +/- 9,9 vs. 91,9 +/- 17,5 mikrom;  $P < 0,01$ ), 14 dni (80,0 +/- 9,5 vs. 97,9 +/- 16,5 mikrom;  $P < 0,01$ ) i 17 dni (82,6 +/- 6,6 vs 97,2 +/- 11,5 mikrom;  $P < 0,01$ ). Nie wykazano różnic statystycznych między oocytami w 5 grupach hodowli wstępnych (79,5 ± 8,8; 76,9 ± 9,9; 77,1 ± 9,9; 80,1 ± 9,5 i 82,6 ± 6,6 mikrom). Zatrzymanie mejozy wystąpiło u 71,9% oocytów hodowanych w naszym systemie do 14 dni. Odsetek stadium pęcherzyka płciowego (GV) nie różnił się znacząco między komórkami jajowymi ocenianymi jako „świeże” lub hodowanymi przez 6, 8, 11 lub 14 dni. Nie zaobserwowano związku między klasą wielkości pęcherzyków a częstością stadium GV. Wydłużenie okresu hodowli do 17 dni drastycznie zmniejszyło odsetek oocytów w stadium GV (18,7%) i zwiększyło odsetek oocytów mających przedwcześnie rozpoczętą mejozę (GVBD; 46,3%) i cechy degeneracji (25,0%). Wyniki te sugerują, że spośród wszystkich czasów hodowli użytych w eksperymencie, 14 dni okazało się najdłuższym czasem hodowli umożliwiającym zarówno wzrost oocytów, jak i utrzymanie konfiguracji jądrowej na etapie GV.

Kolejnym celem badań dotyczących wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych było zbadanie wzrostu i przeżywalności w hodowli *in vitro*, a następnie kompetencji mejotycznych oocytów bydłęcych odzyskanych z wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych (Alm i in., 2006). Badanie zostało przeprowadzone we współpracy z grupą prof. Alm z Forschungsinstitut für die Biologie Landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf, Rostock, Niemcy. Pęcherzyki izolowane przez mikrodysekcję kawałków kory jajnika podzielono na dwie grupy wielkości: (I) średnica 0,2–0,5 mm i (II) średnica 0,4–0,7 mm. Pęcherzyki grupy I hodowano w stanie nienaruszonym, natomiast w grupie II kompleksy oocyty+komórki wzgórka jajonośnego (COC) izolowano z pęcherzyków i poddawano hodowli. Pęcherzyki lub kompleksy oocytów z komórkami wzgórka jajonośnego zatapiało w żelu kolagenowym i hodowano w TCM 199 uzupełnionym 3% BSA i 4 mM hipoksantyną przez 14 dni (Grupa I) lub 7–10 dni (Grupa II). Następnie, ww. kompleksy odzyskiwano z żelu. Oocyty, które utraciły większość przyległych komórek wzgórka jajonośnego utrwalano natychmiast po odzyskaniu. Kompleksy COC wykazujące prawidłową morfologię natychmiast utrwalano lub poddawano dojrzewaniu *in vitro* (IVM) przez dodatkowe 24 godziny, po czym utrwalano. Pod koniec hodowli 57,6% zwartych COC w pęcherzykach grupy I zachowało konfigurację GV, 16,7% wznowiło mejozę, a 25,8% uległo zdegenerowaniu lub nie wykryto chromatyny. Po IVM odsetek oocytów wznowiających mejozę znacznie wzrósł (z 16,7% do 42,7%;  $P < 0,05$ ), a 9,1% wszystkich oocytów osiągnęło stadium TI lub MII. Wyizolowane kompleksy COC w Grupie II zaczęły tworzyć struktury pęcherzykowe po 24 godzinach hodowli (7,1%). Udział tych struktur osiągnął 50,8% po 2–3 dniach hodowli, a następnie stopniowo zmniejszał się z powodu degeneracji. W dniu 10 tylko 5,8% kompleksów COC zostało sklasyfikowanych jako nienaruszone. Z odzyskanych oocy-

tów z komórkami wzgórka jajonośnego z nowo utworzonych struktur podobnych do pęcherzyków po 7–10 dniach hodowli *in vitro* 54,7% znajdowało się w stadium GV, 31,0% w stadium GVBD, a 14,3% uległo degeneracji lub konfiguracja chromatyny nie była wykrywalna. Po 24 godzinach IVM 67,6% oocytów wznawiało mejozę, a 21,6% wszystkich oocytów osiągnęło stadium TI i MII. Wyniki te pokazują, że izolowane wczesne pęcherzyki i kompleksy COC izolowane z wczesnych pęcherzyków antralnych mogą rosnąć w hodowli *in vitro* i mogą osiągnąć kompetencje mejotyczne.

Współpraca z niemieckim laboratorium prof. Alm zaowocowała również powstaniem artykułu o wzorcach agregacji mitochondriów i ich aktywności w hodowanych *in vitro* oocytach bydłych uzyskanych z wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych (Kątska-Książkiewicz i in., 2011). Niska kompetencja rozwojowa oocytów hodowanych *in vitro* a pozyskanych z wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych może być związana z ich statusem mitochondrialnym, dlatego celem tego badania było zbadanie konfiguracji chromatyny, wzoru agregacji mitochondriów i aktywności mitochondrialnej niehodowanych i *in vitro* hodowanych oocytów bydłych uzyskanych z wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych. Kompleksy oocyt-komórki wzgórka jajonośnego z sąsiadującymi komórkami ziarnistymi (COCG) uzyskano z wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 0,4 do 0,8 mm. Oocyty kontrolne (Dzień 0) izolowano ze świeżo pozyskanych COCG i utrwalano oraz wybarwiono. Wybrane COCG umieszczono w hodowli *in vitro* na 7 dni lub 14 dni. Po hodowli, COC o normalnym wyglądzie umieszczano w pożywce do dojrzewania na 24 godziny, a następnie utrwalono i wybarwiono MitoTracker CMTM Ros Orange i Hoechst 33258. Procent oocytów z niedojrzałą konfiguracją chromatyny po hodowli *in vitro* malał wraz z czasem hodowli *in vitro* i wyniósł odpowiednio 96,7; 72,5 i 35,4% dla Dnia 0, Dnia 7 i Dnia 14 hodowli. Pozostałe oocyty degenerowały lub wznawiały mejozę. Po dojrzewaniu *in vitro* najwyższy odsetek oocytów w diakinezie lub metafazie I stwierdzono w grupie D7 + IVM (59,4%). Gdy hodowlę przedłużono do 14. dnia i w kolejnej dobie oocyty poddano dojrzewaniu *in vitro*, liczba zdegenerowanych oocytów po IVM dramatycznie wzrosła. Rozkład mitochondriów w oocytach zmieniał się z jednorodnego na heterogenny wraz ze wzrostem czasu hodowli. Aktywność oddechowa mierzona intensywnością fluorescencji wzrosła w czasie hodowli pęcherzyków i była najwyższa w oocytach, które rozpoczęły fazę GVBD, czyli rozpadu pęcherzyka zarodkowego. Podsumowując, w przypadku oocytów w izolowanych COCG z wczesno-antralnych pęcherzyków jajnikowych warunki hodowli dłuższe niż 7 dni powinny być bardziej dostosowane do powolnego dojrzewania jądra, któremu towarzyszy obniżony metabolizm energetyczny, aby zapobiec piknozie chromatyny.

Grupa prof. Kątskiej współpracowała również z grupą prof. Skrzyżowskiej, prowadzącej badania nad klonowaniem somatycznym różnych

zwierząt gospodarskich. Prof. Kątska była odpowiedzialna za przygotowanie komórek-dawców jądra przy użyciu hodowli *in vitro*. Ważnym czynnikiem regulującym tempo rozwoju zarodków klonowanych jest faza cyklu komórkowego dawcy jąder, dlatego celem eksperymentu było zbadanie rozmieszczenia faz cyklu komórkowego w komórkach wzgórka jajonośnego i fibroblastach bydła, hodowanych przy użyciu rutynowego protokołu, jak i podczas zastosowania związków zatrzymujących cykl komórkowy (Kątska i in., 2002). Najwyższy odsetek komórek skumulowanych w stadium G0 + G1 zaobserwowano w niehodowanych, zamrożonych/ rozmrożonych komórkach pochodzących z niedojrzałych oocytów (79,8 +/- 2,2%), świeżych i zamrożonych/ rozmrożonych komórek z dojrzałych oocytów *in vitro* (84,1 +/- 6,2 i 77,8 +/- 5,7%) oraz w komórkach dzielących się (odpowiednio 72,7 +/- 16,3 i 78,4 +/- 11,2%, odpowiednio z komórek wzgórka jajonośnego niedojrzałych i dojrzałych *in vitro* oocytów). Głodzenie komórek wzgórka jajonośnego znacznie zmniejszyło odsetek komórek w fazach G0 + G1, a przedłużone głodzenie znacznie zwiększyło odsetek komórek w fazach G2 + M. Hodowla *in vitro* komórek wzgórka jajonośnego do pełnej konfluencji nie zwiększyła odsetka komórek w fazach G0 + G1. W przeciwieństwie do obserwacji na komórkach wzgórka jajonośnego, wyraźnie wyższy odsetek komórek w fazach G0 + G1 obserwowano, gdy komórki fibroblastów hodowano do pełnej konfluencji lub głodzono ( $P < 0,01$ ). Ten wzrost był większy w miarę przedłużania się okresu głodzenia. Stwierdzono, że dla określonych typów komórek należy zastosować specyficzne strategie hodowli, aby osiągnąć poprawę wydajności klonowania.

Zespół prof. Kątskiej analizował również czas dojrzewania jądrowego oocytów kotów domowych (Kątska-Książkiewicz i in., 2003). Badania przeprowadzono we współpracy z dr. Pieńkowskim w ramach projektu finansowanego przez firmę PienGen Biomedical Corporation, Knoxville, USA. W tym badaniu autorzy porównali wpływ przechowywania jajników, pożywki IVM, obniżonej atmosfery tlenu i czasu trwania hodowli na dojrzewanie *in vitro* oocytów kotów domowych. Jeden losowo wybrany jajnik z każdej pary (69 par) przechowywano w PBS w 10°C przez 16–24 godzin przed izolowaniem oocytów. Drugi jajnik nie przechowywany z każdej pary służył jako kontrola. W eksperymencie I badano wpływ pożywek hodowlanych (TCM 199 w porównaniu z SOF) i atmosfery o zmniejszonej zawartości tlenu (wilgotna atmosfera gazowa o zawartości 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu lub 5% CO<sub>2</sub>: 5% O<sub>2</sub>: 90% N<sub>2</sub>) na IVM oocytów zarówno przechowywanych, jak i nie przechowywanych. W drugim eksperymencie porównano czas dojrzewania jądrowego zarówno przechowywanych, jak i nie przechowywanych oocytów hodowanych przez 17–18, 20–21, 24–26, 28–30, 33–34 lub 42–45 godzin przed oceną stadium mejozy. W obu doświadczeniach I i II wskaźnik odzysku, jakość i kompetencje do dojrzewania mejotycznego oocytów pochodzących z przechowywanych jajników nie różniły się w porównaniu z nie przechowywanymi.

W eksperymencie I ani pożywka hodowlana ani atmosfera gazowa nie wpływała na dojrzewanie oocytów. W eksperymencie II średni odsetek oocytów osiągających metafazę II w ciągu 17–18 godzin hodowli wynosił 36,1% i nie zwiększał się znacząco w czasie do 28 godzin. Najwyższy odsetek oocytów (67,3%) osiągnął stadium metafazy II po 42–45 godzinach hodowli. Dlatego wnioskowano, że można wyróżnić dwie „fale” dojrzewania jądrowego oocytów kóz. Pierwsza fala ma miejsce w ciągu 26 godzin i jest prawdopodobne, że większość oocytów tej fali dojrzewa do 17–18 godzin; druga fala występuje po 28–30 godzinach IVM. Można założyć, że ta podwójna fala może odzwierciedlać obecność dwóch populacji oocytów o dwóch różnych stopniach „nie-dojrzałości”, które wymagają różnych długości IVM.

Prof. Kątska z zespołem pracowała także nad produkcją zarodków *in vitro* u kóz. Miało to miejsce w czasie, gdy badania nad pozaustrojową produkcją zarodków u tego gatunku w porównaniu z innymi gatunkami domowymi, zwłaszcza bydłem, były przedmiotem niewielu doniesień, pomimo ich przydatności zarówno dla badań podstawowych, jak i do zastosowań komercyjnych. Celem badań było porównanie skuteczności IVP u kóz przy użyciu niedojrzałych oocytów pęcherzykowych odzyskanych od kóz stymulowanych FSH i kontrolnych (Kątska-Książkiewicz i in., 2004). Po IVM oocyty zapładniano świeżym lub rozmrożonym nasieniem kapacytowanym heparyną lub nie. Dojrzałe oocyty zapładniano *in vitro* świeżym lub zamrożonym nasieniem tego samego kozła. Po IVF zygoty hodowano przez 24 godziny, a podzielone zarodki dalej hodowano z komórkami nabłonka jajowodu koziego lub przenoszono do zsynchronizowanych biorczyń. Średnia liczba oocytów odzyskanych od kóz poddanych działaniu FSH była znacznie wyższa ( $P < 0,01$ ) w porównaniu do kontroli. Niezależnie od użytego nasienia, świeżego lub zamrożonego, nie zaobserwowano różnic w uzysku blastocyst, gdy plemniki traktowano heparyną. Jednak, najwyższy odsetek zapłodnionych komórek jajowych podejmujących rozwój (79,4%), a także rozwój do stadium blastocysty (37,3%) uzyskano po zapłodnieniu świeżym nasieniem kapacytowanym bez użycia heparyny. W przeciwieństwie do świeżego nasienia, zastosowanie heparyny do kapacytacji mrożonego/rozmrożonego nasienia znacznie poprawiło ( $P < 0,01$ ) podziały zarodkowe. Nie stwierdzono różnic między kompetencjami rozwojowymi *in vivo* zarodków związanych z pochodzeniem nasienia po przeniesieniu do biorców. U ponad 60% biorców stwierdzono ciążę, a 20% wszystkich przeniesionych zarodków przeżyło, urodziło się 13 zdrowych kózłat. Protokół IVP kóz prof. Kątskiej pozwala na uzyskanie zarodków o kompetencjach rozwojowych porównywalnych do bydłych.

Zespół prof. Kątskiej-Książkiewicz opracował również efektywne warunki uzyskiwania *in vitro* zarodków kozich poprzez dojrzewanie i zapłodnienie *in vitro* oocytów pęcherzykowych pobieranych z jajników przy zastosowaniu przyżyciowej metody laparoskopowej (LOPU – *laparoscopic ovum pick-up*) czego wymiernym dowodem było narodzenie żywego, zdrowego

koźłęcia po przeprowadzeniu laparoskopowego przeniesienia zarodków (LET – *laparoscopic embryo transfer*) (Kątska-Książkiewicz i in., 2008). Na wydajność metody nie miał również wpływu typ hodowli zarodków – porównywano efektywność współhodowli zarodków z komórkami nabłonka jajowodu i z komórkami VERO. Nie wykazano też osobniczego wpływu mrożonego nasienia samca na wydajność IVP u kóz (Kątska-Książkiewicz i in., 2007).

W dalszych swoich badaniach postawiliśmy sobie również za cel udoskonalenie przyżyciowej selekcji niedojrzałych kompleksów oocyt-komórki wzgórka jajonośnego (COC – *Cumulus-Oocyte-Complex*) przed poddaniem dojrzewaniu *in vitro*. Selekcja przeprowadzana po przyżyciowym barwieniu kompleksów oocyt-komórki wzgórka jajonośnego brylantowym błękitem krezyłu (*brilliant cresyl blue*, BCB) pozwala na określenie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PDH), enzymu syntetyzowanego w pierwszej połowie fazy S, w czasie wzrostu oocyty. Oocyty bydlęce poddane selekcji na podstawie aktywności G6PDH i ocenione jako BCB+ wykazują istotnie wyższe zdolności rozwojowe w porównaniu z oocytami BCB- (Alm i in., 2006). W naszych badaniach celem było ustalenie czy istnieje związek między stopniem zaawansowania zmian apoptotycznych a ocenianym przyżyciowo poziomem G6PDH w niedojrzałych oocytach. Zakładano, że oocyty BCB- mogą cechować się zaburzeniami w aktywacji genów prowadzącymi do zmian apoptotycznych w komórce, które mogłyby powstawać już podczas wzrostu w pęcherzyku lub też w okresie późniejszym, w czasie dojrzewania *in vitro*. Wykazano, że aktywność G6PDH nie może służyć jako marker apoptozy w oocytach bydlęcych. Z uwagi na to, że nasze wyniki, jak i innych autorów (Alm i in., 2006; Pujol i in., 2004; Opiela i in., 2008 a, 2010; Bhojwani i in., 2007) wyraźnie wskazywały na obniżoną zdolność rozwojową oocytów BCB-, kontynuowano badania poszukując czynnika odpowiedzialnego za tę sytuację. W tym celu zbadano korelacje pomiędzy poziomem transkryptów TFAM (*mitochondrial transcription factor A*), POLG (*DNA polymerase subunit gamma*) i NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*), które są czynnikami replikacyjnymi mitochondrialnego DNA (mtDNA) oraz transkryptu COX1 (*mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I*) kodowanego przez genom mitochondrialny, a aktywnością G6PDH w oocytach bydlęcych przed i po dojrzewaniu *in vitro*. W tym wypadku hipoteza badawcza potwierdziła się. Niedojrzałe oocyty BCB- miały statystycznie istotnie niższy poziom analizowanych transkryptów: TFAM, NRF1 i COX1 oraz statystycznie niższy poziom mRNA genu TFAM w dojrzałych oocytach (Opiela i in., 2010). Wynik ten potwierdza zasadność stosowania przyżyciowej selekcji niedojrzałych kompleksów oocyt-komórki wzgórka jajonośnego barwieniem BCB, gdyż eliminacja oocytów BCB- przyczynia się do zwiększenia efektywności metody. Całościowe omówienie plusów i minusów stosowania barwienia BCB omówiono w pracy przeglądowej: Opiela i Kątska-Książkiewicz (2013).



Kolejnym celem badawczym naszej grupy było podniesienie wydajności technologii IVP przez suplementację pożywki do dojrzewania *in vitro* hialuronianem (HA) w celu zwiększenia dojrzałości cytoplazmatycznej oocyty oraz zwiększenia bezpieczeństwa technologii poprzez zastąpienie surowicy zwierzęcej białkiem roślinnym. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że dodatek hialuronianu do pożywki o stężeniu 0,07% i 0,035% nie ma wpływu na osiąganą dojrzałość mejotyczną oraz jakość mierzoną poziomem fragmentacji DNA oocytów. Suplementacja pożywki do dojrzewania hialuronianem o stężeniu 0,07% statystycznie istotnie zmniejsza poziom fragmentacji DNA uzyskanych blastocyst. Odnotowano tendencję wzrostową liczby uzyskanych blastocyst w przypadku dodania HA o stężeniu 0,07% do IVM, jednak różnice te nie były statystycznie istotne. Suplementacja pożywki IVM hialuronianem o stężeniu 0,07% wydaje się być wartością graniczną, gdyż odnotowano wyższy poziom ekspresji proapoptotycznego transkryptu genu Bax w komórkach granulozy stosowanych jako współhodowla w hodowli oocytów. Dlatego wnioskowano, że dobór odpowiedniego stężenia HA jest główną determinantą warunkującą powodzenie stosowania metody (Opiela i in., 2014).

W ostatnich latach dąży się do wyeliminowania surowicy krwi (FBS, FCS, ECS) lub jej pochodnych, np. albuminy jako składnika pożywki do dojrzewania oocytów i hodowli zarodków. Powodem jest niejednoznaczny wpływ surowicy na jakość oocytów i zarodków, zarówno pozytywny jak i negatywny. Wiadomo, że dodatek surowicy zwiększa odsetek uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro* blastocyst, szczególnie w przypadku suboptymalnych warunków hodowli (Russel i in., 2006). Istnieją również doniesienia na temat szkodliwego wpływu surowicy na rozwój oocytów (Ali i Sirard, 2002) i zarodków (Rizos i in., 2003). Stwierdzono, że FCS zawiera zarówno związki antyapoptotyczne, np. białkowe czynniki wzrostu, jak i proapoptotyczne, np. czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ , ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), który może indukować śmierć komórki. Jednakże, badania Fouladi-Nashta i in. (2005) nie potwierdziły tego spostrzeżenia, bowiem wykazano brak różnic w liczbie jąder apoptotycznych w zarodkach hodowanych zarówno w pożywce zawierającej surowicę, jak i bez surowicy. Natomiast, jak wykazali Rizos i in. (2003), w zarodkach hodowanych w obecności surowicy następował znaczny wzrost ekspresji białka Bax. Z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa wynika zatem, że wpływ surowicy nie jest jednoznacznie określony. Wiadomo też, że surowica zawiera enzymy, hormony czy czynniki wzrostu w zróżnicowanych stężeniach, często odmiennych w kolejnych seriach produktu, co może powodować dużą zmienność warunków hodowli, a więc i efektywność pozaustrojowego uzyskiwania zarodków. Ponadto, stosowanie w pożywkach produktów pochodzenia zwierzęcego, mimo znacznej poprawy sanitarnej w zakresie ich pozyskiwania oraz metod sterylizacji, związane jest z ryzykiem infekcyjnym. W świetle prezentowanych przykładów celowe było

zatem opracowanie pożywki do dojrzewania oocytów, która pozwoliłaby na standaryzację warunków hodowli oraz wyeliminowałaby ryzyko wynikające z obecności surowicy ze względów sanitarno-weterynaryjnych. W poszukiwaniu bardziej efektywnych rozwiązań w hodowli *in vitro* podjęto próby zastosowania substytutów roślinnych. Wykazano już korzystny wpływ zastąpienia surowicy zwierzęcej białkiem roślinnym w pożywkach do hodowli zarodków (Gajda i in., 2007) oraz w pożywkach używanych w pracach z plemnikami ssaków (Bochenek i Smorąg, 2008). W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że białko roślinne (PP, *plant protein*) w zaproponowanym przez nas stężeniu 0,6% i systemie dojrzewania oocytów *in vitro* (TCM199 uzupełnione FSH 10 $\mu$ g/ml i estradiolem 1  $\mu$ g/ml oraz w 2 grupie doświadczalnej uzupełnione dodatkowo 1% HA) nie wykazało wpływu na odsetek oocytów uzyskujących dojrzałość mejotyczną w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak w obu grupach pożywek suplementowanych PP odnotowano nieprawidłową strukturę chromatyny po barwieniu, dlatego wysunięto wniosek o proapoptotycznym działaniu tego białka (Opiela i in., 2012).

Od lat zainteresowanie naukowców skupia się wokół analizy pojedynczych zarodków (Lechniak i in., 2008). Kwestie etyczne w zastosowaniu IVF u ludzi najlepiej obrazują celowość tego typu poszukiwań. U zwierząt selekcja zarodków ma również kluczowe znaczenie z uwagi na ich wybór do transferu. W przypadku bydła ciąża bliźniacza nie jest pożądana. Ocena morfologiczna dokonywana pod mikroskopem stereoskopowym należy do podstawowych metod, niemniej jednak jest niewystarczająca do pełnego scharakteryzowania jakości zarodka, dlatego poszukiwane są inne metody, wśród których można wymienić: analizy na poziomie transkryptu (mikromacierze, techniki interferencji RNA) czy białek, wśród których metabolomika z czułymi metodami detekcji, takimi jak: np. masowa chromatografia gazowa (GC-MS), chromatografia cieczowa (LC-MS) czy jądrowy rezonans magnetyczny (NMR) przedstawia się szczególnie atrakcyjnie z uwagi na małą inwazyjność. Analizie można poddawać również płyn pęcherzykowy (oocyty) lub pożywkę, w której zarodki się rozwijały. Wpisując się w przedstawiony nurt badań wykazaliśmy przydatność spektroskopii furierowskiej w podczerwieni do oceny jakości pojedynczych blastocyst. Spektroskopia furierowska w podczerwieni (FTIR, ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) albo absorbcyjna spektroskopia w zakresie podczerwieni z zastosowaniem transformaty Fouriera jest stosunkowo nowatorską i innowacyjną metodą w naukach biologicznych i medycznych w porównaniu do jej stosowania w chemii analitycznej. Spośród technik spektroskopowych, obrazowanie FT-IR ujawnia naturę próbki biologicznej i wytwarza widmowe mapy składu i zmian strukturalnych bez użycia chemicznego markera na poziomie molekularnym. Pomiar FT-IR jest nieinwazyjny a przygotowanie próbki – minimalne. Co więcej, technika ta jest szczególnie przydatna, gdy ilość dostępnego materiału jest ograniczona. Pomimo dużego zain-

interesowania wykorzystaniem obrazowania FT-IR w medycynie i biologii zastosowanie tego rodzaju spektroskopii wciąż jest bardzo ograniczone w badaniach embriologicznych. Mikrospektroskopia FT-IR została z powodzeniem zastosowana do badania stadiów dojrzewania oocytów myszy (Ami i in., 2008) oraz w celu monitorowania spontanicznego różnicowania mysich zarodkowych komórek macierzystych (Ami i in., 2011). Obrazowanie FT-IR z detektorami FPA określiło stan różnicowania pojedynczych ludzkich komórek mezenchymalnych poddawanych i niepoddawanych różnicowaniu (Krafft i in., 2007). Z kolei, Thumanu i in. (2009) zastosowali mikroskopię *synchronową w podczerwieni* (SR-IR) z detektorami FPA do analizy trzech składników biochemicznych blastocysty myszy oraz w badaniu zróżnicowania neuronalnego zarodkowych komórek macierzystych myszy (Tanthanuch i in., 2010). Nasze badania potwierdziły, że spektroskopia furierowska w podczerwieni znajduje zastosowanie dla oceny jakości blastocyst. Zastosowanie źródła laboratoryjnego absorpcji (IR) i detektora promieniowania podczerwonego FPA (ang. *Focal Plane Array*) pozwala obrazować pasma charakterystyczne dla DNA, białek, amidów i lipidów obecnych w komórkach blastocyst bydłowych. Na tej podstawie można wnioskować o rozkładzie danej biocząsteczki, np. DNA, lipidów i białek. Możliwe jest wyekstrahowanie widm pojedynczych komórek i przeprowadzenie analizy statystycznej w celu zbadania różnic pomiędzy pojedynczymi komórkami w blastocystyce i/lub pomiędzy komórkami w badanych blastocystach. Na podstawie hierarchicznej analizy klastrowej oraz analizy składowych głównych można wnioskować, że komórki blastocysty, której oocyt był hodowany w pożywce z hialuronianem, są bardziej podobne do komórek blastocysty pochodzącej ze współhodowli z komórkami Vero niż do komórek blastocysty hodowanej w pożywce SOF. Na podstawie analizy pól powierzchni pod pikami możliwe było przeprowadzenie ilościowej analizy głównych biocząsteczek. I tak wykazaliśmy, że komórki blastocysty hodowanej we współhodowli z komórkami Vero posiadały ilościowo największe zasoby amidów II rzędu. W sytuacji, gdy wykluczymy amidy II rzędu, komórki blastocysty, której oocyt był hodowany w pożywce z hialuronianem, będą posiadały podobne ilości biocząsteczek w porównaniu do blastocyst hodowanych we współhodowli z komórkami Vero, natomiast mniejsze zasoby biocząsteczek w porównaniu do komórek blastocysty hodowanej w pożywce SOF. Określenie drugorzędowej struktury białek pozwala wnioskować o ich zmianach konformacyjnych, co może mieć znaczenie w badaniu rozwoju blastocyst. W analizowanych przez nas blastocystach stosunek  $\alpha$  helisy do  $\beta$  był porównywalny dla wszystkich komórek. Analiza ilościowa kwasów nukleinowych pozwala określić intensywność procesów replikacji DNA czy transkrypcji RNA. W analizowanych blastocystach stosunek RNA do DNA był porównywalny (Wiecheć i in., 2013). Powyższe badania realizowaliśmy w kooperacji z Instytutem Fizyki Jądrowej w Krakowie. Oprócz opisanej spektroskopii FTIR w prowadzonych przez nas badaniach używano też

innych metod oceniających, np. poziom zaawansowania apoptozy w oocytach, zarodkach i komórkach na poziomie DNA, RNA i białek (TUNEL, qPCR, western-blotting, fluorescencyjny pomiar aktywności kaspaz, immunofluorescencja). Metody analiz oocytów i zarodków opisano w artykule Opiela (2009), jak i w rozdziałach w książkach (Opiela i in., 2008 a,b; 2013 a,b).

Działalność naukowa naszego laboratorium po 2010 r. została poszerzona o badania nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC, ang. *Mesenchymal stem cells*). Początkowo prace ograniczały się do badań nad MSC świni, z biegiem lat analizy objęły również MSC koni, owiec, kóz i bydła. Heterogenny charakter populacji hodowanych *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych, wyizolowanych ze szpiku kostnego wymusza konieczność szczegółowej charakterystyki immunocytochemicznej i molekularnej tych komórek, która pozwoli na określenie stopnia ich multipotencji. Komórki MSC zróżnicowane w kierunku adipocytów i osteoblastów oraz niezróżnicowane (kontrolne) poddaliśmy również analizie cytometrycznej cyklu mitotycznego pod kątem rozkładu poszczególnych jego faz (G0/G1, S, G2/M). Doświadczenie to miało na celu wykazanie wpływu długoterminowej hodowli różnicującej MSC na profil rozkładu DNA. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują na obniżoną stabilność DNA wyrażającą się wzrostem odsetka komórek aneuploidalnych po 5-tygodniowej hodowli różnicującej *in vitro* (Opiela i in., 2013 b). W innej pracy natomiast wykazaliśmy, że różnicowanie MSC w kierunku adipo- i osteocytów nie wpływa na poziom ekspresji proapoptotycznego białka Bad, co dowodzi, że różnicowanie nie indukuje apoptozy (Opiela i in., 2013 a). Z uwagi na niepełną efektywność różnicowania MSC w żądany typ komórek (np. osteoblasty, adipocyty, mioblasty lub komórki śródbłonna) celowe jest poszukiwanie genów odpowiedzialnych za kontrolowanie ww. procesu. Obiecujące raporty o wysokiej ekspresji genów kilku metaloproteinaz macierzy i ich inhibitorów – TIMPs w komórkach MSC (tj. MMP-1, -2, -19 i TIMP-1, -2, -3) (Panepucci i in., 2004; Cronwright i in., 2005) stały się podstawą do wysunięcia hipotezy na temat ich kluczowej funkcji w różnicowaniu MSC (Mannello i in., 2006). Badaliśmy czy metaloproteinaza MMP-2 i jej inhibitor TIMP-2 oraz czynniki transkrypcji *MEF2a* and *TAZ* są zaangażowane w różnicowanie w kierunku adipocytów i/lub osteoblastów. Nasze wyniki sugerują możliwe zaangażowanie *MEF2a* w osteogenezę świńskich MSC, gdyż znaczny wzrost poziomu tego transkryptu był obserwowany w zróżnicowanych komórkach. Ponadto, wyniki te potwierdzają hipotezę o funkcji MMP niezależnej od TIMP-2, ponieważ nie wykryto różnicy w ekspresji MMP-2 między osteocytami a MSC niezróżnicowanymi (Opiela i in., 2016).

Efektywność klonowania somatycznego świń, mierzona odsetkiem zarodków rozwijających się do stadium blastocysty lub odsetkiem urodzonego potomstwa w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów, utrzymuje się

na stosunkowo niskim poziomie. Jednym z czynników ograniczających w największym stopniu wydajność klonowania u tego gatunku jest niepełne i nieprawidłowe przeprogramowanie pamięci epigenetycznej jąder komórek somatycznych w rozwijających się zarodkach klonalnych. Nasze badania dowiodły, że wykorzystanie jako dawców jąder MSC szpiku kostnego, które charakteryzują się wysokim stopniem multipotencji oraz znaczną plastycznością genomową/epigenomową, umożliwia zwiększenie przedimplantacyjnego potencjału rozwojowego zarodków klonalnych świni. Wykazaliśmy ponadto, że sztuczna modulacja epigenomowa hodowanych *in vitro* MSC przy wykorzystaniu niespecyficznych inhibitorów deacetylaz histonów, w naszym wypadku trichostatyny A (TSA), ułatwia proces przeprogramowania epigenetycznie uwarunkowanej aktywności transkrypcyjnej genomu jądrowego tych komórek w zarodkach klonalnych świni (Samiec i in., 2015). Wydajność klonowania somatycznego świń jest statystycznie istotnie wyższa przy zastosowaniu modulacji MSC inhibitorem TSA. Zaobserwowano również poprawę jakości uzyskanych klonalnych zarodków świni, gdyż poziom ekspresji transkrypcyjnego OCT4 był statystycznie istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej.

Wyniki kolejnego doświadczenia wykazały, że zależna od TSA modulacja epigenomiczna dawców jądrowych silnie wpływa zarówno na zdolność rozwojową *in vitro*, jak i na jakość cytologiczną sklonowanych zarodków międzygatunkowych (świńsko → bydłęcych) (Opiela i in., 2017). Kompetencje rozwojowe do osiągnięcia stadium blastocysty wśród zarodków hybrydowych (świńsko → bydłęcych), które zostały zrekonstruowane przy użyciu bydłęcych ooplastów i epigenetycznie modulowanych świńskich MSC, utrzymano na stosunkowo wysokim poziomie (Opiela i in., 2017). Kompetencje te były wyższe niż odnotowane w badaniach innych autorów, ale nadal były zmniejszone w porównaniu z kompetencjami klonowanych zarodków wewnątrzgatunkowych (świńskich), które zostały odtworzone za pomocą świńskich ooplastów i jąder komórkowych MSC transformowanych lub nietransformowanych epigenetycznie. A zatem, po raz pierwszy zastosowaliśmy MSC przechodzące zależną od TSA transformację epigenetyczną jako źródło komórek dawcy jądrowego do klonowania między komórkami somatycznymi u innych gatunków zwierząt. Ponadto, opracowaliśmy wydajną sekwencyjną aktywację fizykochemiczną międzygatunkowych przenoszonych jądrowo cybryd klonalnych pochodzących z ooplazmy bydła i świńskich jąder MSC (Opiela i in., 2017).

W dalszych badaniach przeprowadziliśmy również szczegółową charakterystykę wyprowadzonych linii MSC szpiku kostnego na poziomie immunocytochemicznym, molekularnym i genetycznym, gdyż charakterystyka MSC u tego gatunku jest niepełna. Analiza ta dotyczyła również komórek poddawanych modulacji epigenetycznej za pomocą TSA celem określenia wpływu tych modulacji na właściwości, multipotencje i jakość MSC. Wykazano, że traktowanie MSC TSA nie wpływa negatywnie na ww. parametry, co

więcej obserwowaliśmy np. wzrost ekspresji markera pluripotencji Nanog w komórkach modulowanych. Uzasadnione zatem wydaje się być stwierdzenie, że modulacja TSA wzmacnia multipotentencje MSC (Samiec i in., 2019).

Chociaż potwierdzono skuteczność TSA w klonowaniu, leżące u podstaw procesy i mechanizmy osiągniętych efektów nie są jeszcze w pełni zrozumiałe, szczególnie w przypadku MSC świń. Dlatego, aby to wyjaśnić, przeprowadziliśmy kompleksową analizę transkryptomu MSC traktowanych TSA przy użyciu wysokoprzepustowego sekwencjonowania i oceniliśmy wpływ TSA na profil transkrypcji MSC po 24 godzinach hodowli *in vitro*. Oceniono również stabilność indukowanych zmian ekspresji genów po kolejnych 55 i 72 godzinach hodowli komórek bez TSA (Gurgul i in., 2017). Wyniki tych badań wykazały, że TSA nie wpływa na ekspresję wybranych antygenów powierzchniowych, tj. CD90 (marker dodatni), CD31 i CD34 (markery ujemne) i ma szeroki wpływ stymulujący na transkrypcję MSC, wpływając na geny w całym genomie z pewnymi niewielkimi oznakami działania miejscowego w regionach na SSC2 i SSC6. Okazało się, że TSA ma większy wpływ na geny, które już uległy ekspresji, natomiast posiada jedynie niewielkie zdolności do indukcji ekspresji wyciszonych genów. Trichostatyna A wpływa na geny powiązane z szerokim zakresem procesów biologicznych, jednak znaleźliśmy pewne dowody na specyficzną stymulację genów związanych z rozwojem, różnicowaniem, neurogenezą lub miogenezą. TSA również wydawało się zakłócać szlaki sygnalizacyjne Wnt poprzez wzmożenie aktywności kilku genów tej ścieżki. Analiza transkryptomu komórek hodowanych po usunięciu TSA wykazała, że ekspresja większości genów stymulowanych TSA została przywrócona do poziomu początkowego. Niemniej jednak, zestaw około sześciuset genów, odpowiedzialnych np. za adhezję, transdukcję sygnału i komunikację komórkową, uległ zmianie nawet po 55 i 72 godz. hodowli *in vitro* bez dodatku TSA. Trichostatyna A zwiększyła również ekspresję niektórych genów markerów pluripotencji (FGF2, LIF, TERT), ale ich ekspresja ustabilizowała się podczas dalszej hodowli bez TSA. Szczegółowa analiza czynników związanych z różnicowaniem neuronalnym pozwoliła nam wnioskować, że TSA stymuluje głównie szlak różnicowania MSC świń w neurony prawdopodobnie poprzez interakcję ze ścieżką sygnalizacji zależnej od Wnt i w ten sposób uruchamia mechanizmy sprzyjające przeprogramowaniu epigenetycznemu (Gurgul i in., 2017).

Ocenialiśmy także zmiany transkryptomu MSC świńi wynikające z mrożenia komórek. Aż 5575 genów cechowała zmieniona ekspresja, sugerując zaangażowanie komórek w odzyskiwanie po rozmrożeniu procesów związanych z napięciem błony komórkowej, jej regulacją, naprawą uszkodzeń błony, utrzymaniem kształtu komórki, homeostazy energii związanej z pracą mitochondriów i mediacją apoptozy. Trichostatyna A jest w stanie przeciwdziałać do pewnego stopnia zmianom transkryptomu, jednak zalety i specyficzność jej działania wymagają dalszych badań (Gurgul i in., 2018).

W toku prac z komórkami MSC, zarówno świeżymi, jak i mrożonymi zauważyliśmy, że jakość morfologiczna MSC po rozmrożeniu drastycznie obniża się. Stosowane z sukcesem protokoły mrożenia dla komórek somatycznych nie sprawdzają się dla komórek macierzystych. Dlatego celem naszego kolejnego badania było opracowanie efektywnej metody kriokonserwacji MSC świni. Metoda HHP (ang. *high hydrostatic pressure*) jest przykładem innowacyjnego podejścia do poprawy efektywności kriokonserwacji komórek. Indukcja reakcji obronnych komórek poprzez poddawanie ich działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) przed kriokonserwacją prowadzi do zminimalizowania wpływu działania stresu na komórki. Ze względu na fakt udokumentowanego wpływu metody HHP na poprawę kriotolerancji oocytów (Pribenszky i in., 2008 a), plemników (Pribenszky i in., 2006, 2009; Huang i in., 2009) oraz bardziej wrażliwych na kriokonserwację blastocyst (Pribenszky i in., 2008 c) wnioskowaliśmy, że wysokie ciśnienie hydrostatyczne może również wpływać korzystnie na jakość MSC poddawanych mrożeniu. Po kilkunastodniowej hodowli *in vitro* świńskie MSC poddawano działaniu HHP o ciśnieniu: 20 MPa, 30 MPa, 40 MPa, 50 MPa i 60 MPa. Następnie komórki kriokonserwowano i po rozmrożeniu poddawano ocenie żywotności, tempa proliferacji, poziomu ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni komórek oraz poziomu ekspresji transkryptów genów *C-myc*, *Rex1*, *Sox2*, a także *surwiwiny* metodą RT-qPCR. W celu zbadania bezpośredniego wpływu HHP na komórki przeprowadzono ocenę obecności proapoptotycznego białka Bax metodą Western-blotting w komórkach poddawanych HHP z pominięciem kriokonserwacji. Na podstawie wyników uzyskanych z ww. analiz wybrano najkorzystniejsze wartości ciśnienia HHP, tj. 40 MPa i 60 MPa do dalszych badań. Ocenę jakości MSC prowadzono dwukierunkowo. Bezpośredni wpływ HHP analizowano poprzez ocenę jakości komórek MSC w oparciu o zmiany apoptotyczne na 3 etapach apoptozy: w fazie inicjacji (kaspaza 8), w fazie wykonawczej (Bax, Bcl<sub>xL</sub>, Bcl<sub>xS</sub> oraz surwiwina) oraz w fazie zniszczenia (CAD). Z kolei, wpływ HHP na zdolności funkcjonalne MSC oceniany był pośrednio poprzez analizę jakości blastocyst uzyskanych we współhodowli z MSC. Zarodki bydłące podejmujące podziały komórkowe przenoszono do hodowli *in vitro* w 4 grupach doświadczalnych: 1. w pożywce zawierającej syntetyczny płyn jajowodowy (SOF – ang. *synthetic oviductal fluid*) (SOF), 2. w pożywce SOF zawierającej komórki MSC nie poddawane działaniu HHP (SOF/MS), 3. w pożywce SOF zawierającej komórki MSC poddawane działaniu HHP o wartości ciśnienia 40 MPa (SOF/MS/HHP40) oraz 4. w pożywce SOF zawierającej komórki MSC poddawane działaniu HHP o wartości ciśnienia 60 MPa (SOF/MS/HHP60). Zarodki w stadium blastocysty poddawano analizie TUNEL. Analiza wyników uzyskanych dla komórek MSC nie poddanych kriokonserwacji wykazała brak statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji proapoptotycznego białka Bax pomiędzy analizowa-

nymi grupami doświadczalnymi. Stwierdzono, że stosowanie HHP o wartościach 40 MPa, 50 MPa i 60 MPa przed kriokonserwacją zwiększa żywotność MSC natychmiast po rozmrożeniu, a HHP o wartości 40 MPa zwiększa tempo proliferacji komórek w 8. dniu hodowli *in vitro*. Jednocześnie wykazano, że HHP nie wykazuje negatywnego wpływu na jakość komórek, gdyż: nie wpływa na utratę multipotencji (*c-myc*, *rex1*, *sox2*) oraz nie indukuje apoptozy w komórkach (brak podwyższonej ekspresji białek proapoptotycznych: PS, kaspazy 8, CAD, Bax, i Bclxs) (Romanek i in., 2018 a). Z kolei, ocena wpływu HHP na zdolności funkcjonalne MSC nie przyniosła jednoznacznej odpowiedzi. Ze względu na procentowo niski uzysk blastocyst w grupach zarodków hodowanych w SOF/MSC/HHP40 i HHP60, analizie TUNEL poddano tylko odpowiednio 8 i 4 blastocysty. Choć blastocysty te charakteryzowały się statystycznie niższym indeksem apoptotycznym ( $P < 0,05$ ) w stosunku do zarodków uzyskanych z pozostałych hodowli, to jednak w kontrolnej pożywce SOF uzyskano wysoko statystycznie więcej blastocyst ( $P < 0,005$ ) w porównaniu do liczby blastocyst wyhodowanych w SOF/MSC oraz w SOF/MSC/HHP60 i HHP40. (Romanek i in., 2018 b). Wyniki powyższego doświadczenia wskazywały, że niska efektywność uzysku blastocyst w grupach hodowanych we współhodowli z MSC nie wynikała z faktu zastosowania HHP na komórki, ale z faktu zastosowania MSC. Dlatego, w kolejnym doświadczeniu przeprowadzono hodowlę zarodków w trzech systemach: we współhodowli z komórkami VERO (grupa kontrolna), we współhodowli z komórkami mezenchymalnymi (MSC) wyprowadzonymi ze szpiku kostnego świni oraz w pożywce SOF. Uzyskane zarodki z trzech systemów hodowli poddano ocenie ilościowej i jakościowej. Spośród ocenionych systemów hodowla w pożywce SOF okazała się najbardziej korzystna – wykazano statystycznie wysoko istotne różnice w liczbie podzielonych zarodków pomiędzy hodowlą w pożywce SOF a hodowlą z komórkami VERO ( $P < 0,025$ ) oraz pomiędzy hodowlą w pożywce SOF a hodowlą w SOF we współhodowli z MSC ( $P < 0,0025$ ). Zarówno odsetek, jak i jakość uzyskanych blastocyst były najwyższe przy zastosowaniu pożywki SOF. Wykazano najniższy poziom fragmentacji DNA blastomerów zarodków bydlęcych hodowanych w pożywce SOF. Jednocześnie, niskie wyniki uzysku zarodków bydlęcych we współhodowli z komórkami MSC wskazują na niekorzystne warunki tego systemu hodowli. Wykazano bowiem statystycznie wysoko istotne różnice w liczbie uzyskanych blastocyst pomiędzy hodowlą w pożywce SOF we współhodowli z MSC a hodowlą we współhodowli z komórkami VERO ( $P < 0,01$ ) oraz pomiędzy hodowlą w pożywce SOF we współhodowli z MSC a hodowlą w pożywce SOF ( $P < 0,0001$ ) (Opiela i in., 2018). Najprawdopodobniej, stosowana objętość pożywki jak i sama pożywka, tj. SOF są nieoptymalne dla hodowli MSC.



Aktualnie podejmujemy prace w zakresie opracowania warunków hodowli 3D *in vitro*, zarówno komórek mezenchymalnych, jak i zarodków bydłych.

### Piśmiennictwo

- Ali A., Sirard M.A. (2002). Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod.*, 66: 901–905.
- Alm H., Kańska-Książkiewicz L., Ryńska B., Tuchscherer A. (2006). Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, 65: 1422–1434.
- Ami D., Mereghetti P., Natalello A., Doglia S.M., Zanoni M., Redi C.A., Monti M. (2011). FTIR spectral signatures of mouse antral oocytes: Molecular markers of oocyte maturation and developmental competence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813: 1220–1229.
- Ami D., Neri T., Natalello A., Mereghetti P., Doglia S.M., Zanoni M., Zuccotti M., Garagna S., Redi C.A. (2008). Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy. *Mol. Cell Res.*, 1783: 98–106.
- Bhojwani S., Alm H., Torner H., Kanitz W., Poehland R. (2007). Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 67: 341–345.
- Bochenek M., Smorąg Z. (2008). The effect of a plant protein component of media used for bull sperm sexing on sperm membrane status. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20: 209.
- Cronwright G., LeBlanc K., Götherström C., Darcy P., Ehnman M., Brodin B. (2005). Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: Down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res.*, 65: 2207–2215.
- Fouladi-Nashta A.A., Alberio R., Kafi M., Nicholas B., Campbell K.Y., Webb R. (2005) Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in the preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online*, 10: 497–502.
- Gajda B., Bryła M., Smorąg Z. (2007). Effect of protein source on *in vitro* development of porcine embryos. *Mat. I Zimowej Konferencji TBR: Centralne I Lokalne Regulacje Procesów Rozrodczych*, s. 87.
- Gurgul A., Opiela J., Pawlina K., Sznatola T., Bochenek M., Bugno-Poniewierska M. (2017). The effect of histone deacetylase inhibitor trichostatin A on porcine mesenchymal stem cell transcriptome. *Biochimie*, 139: 56–73.

- Gurgul A., Romanek J., Pawlina-Tyszko K., Szmatoła T., Opiela J. (2018). Evaluation of changes arising in the pig mesenchymal stromal cells transcriptome following cryopreservation and Trichostatin A treatment. *PLoS ONE*, 13 (2): e0192147.
- Huang S.Y., Pribenszky C., Kuo Y.H., Teng S.H., Chen Y.H., Chung M.T., Chiu Y.F. (2009). Hydrostatic pressure affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, 112: 136–149.
- Kątska L. (1985). The hamster ova penetration test as a method of evaluating mammalian sperm. *Ginekol. Pol.*, 56: 725–729.
- Kątska L., Ryńska B. (1998). The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology*, 50: 213–222.
- Kątska L., Kauffold P., Smorąg Z., Duschinski U., Torner H., Kanitz W. (1989). Influence of hardening of the zona pellucida on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 32: 767–777.
- Kątska L., Smorąg Z., Bąk M., Wierzbowski S. (1991). Urodzenie cielęcia z zarodka uzyskanego *in vitro*. *Med. Weter.*, 47: 169–171.
- Kątska L., Ryńska B., Smorąg Z. (1995). The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology*, 43: 859–870.
- Kątska L., Alm H., Ryńska B. (2000). Nuclear configuration of bovine oocytes derived from fresh and *in vitro*-cultured preantral and early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, 54: 247–260.
- Kątska L., Bochenek M., Kania G., Ryńska B., Smorąg Z. (2002). Flow cytometric cell cycle analysis of somatic cells primary cultures established for bovine cloning. *Theriogenology*, 58: 1733–1744.
- Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Kania G., Smorąg Z., Gajda B., Pieńkowski M. (2003). Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. *Theriogenology*, 59: 1567–1574.
- Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Gajda B., Smorąg Z. (2004). Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of *in vitro* embryo production in goats. *Theriogenology*, 62: 576–586.
- Kątska-Książkiewicz L., Opiela J., Ryńska B. (2007). Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocysts production in goats. *Theriogenology*, 68: 736–744.
- Kątska-Książkiewicz L., Opiela J., Ryńska B., Wieczorek J., Cegła M., Smorąg Z. (2008). Laparoscopic transfer of goat 6–8 cell embryos produced *in vitro*. *Annals Anim. Sci.*, 8: 37–45.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H., Torner H., Heleil B., Tuchscherer A., Ryńska B. (2011). Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, 75: 662–670.
- Krafft C., Salzer R., Seitz S., Ern C., Schieker M. (2007). Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by FTIR microscopic imaging. *Analyst*, 132: 647–653.
- Lechniak D., Warzych E., Pers-Kamczyc E. (2008). Analiza transkryptów jako narzędzie w ocenie jakości oocytów i zarodków bydła. *Biotechnologia*, 1: 31–44.

- Mannello F., Tonti G.A., Papa S. (2006). Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24: 475–481.
- Opiela J. (2009). Apoptosis in preimplantation bovine embryos and methods used for its detection. *Ann. Anim. Sci.*, 9: 3–16.
- Opiela J. (2013). Metody oceny zarodków świni. W: Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni – aspekty biologiczne i biotechnologiczne. B. Gajda, Z Smorąg (red.). Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, ss. 91–101.
- Opiela J., Kańska-Książkiewicz L. (2013). The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reprod. Biol.*, 13: 177–183.
- Opiela J., Kańska-Książkiewicz L., Lipiński D., Słomski R., Bzowska M., Ryńska B. (2008 a). Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*, 69: 546–555.
- Opiela J., Kańska-Książkiewicz L., Smorąg Z. (2008 b). Wykrywanie małych ilości białek metodą hybrydyzacji western blot. W: Analiza DNA teoria i praktyka. Ryszard Słomski (red.). Wyd.UP Poznań, ss. 530–536.
- Opiela J., Lipiński D., Słomski R., Kańska-Książkiewicz L. (2010). Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Anim. Reprod. Sci.*, 118: 188–193.
- Opiela J., Latasiewicz E., Smorąg Z. (2012). Optimal concentration of hyaluronan and plant protein in different culture systems for *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Indian J. Exp. Biol.*, 50: 839–846.
- Opiela J., Bartel Ż., Romanek J., Wiczorek J., Wilczek P. (2013 a). The quality of porcine mesenchymal stem cells and their osteo- and adipogenic cell derivatives – the level of proapoptotic BAD protein expression. *Ann. Anim. Sci.*, 13: 753–763.
- Opiela J., Samiec M., Bochenek M., Lipiński D., Romanek J., Wilczek P. (2013 b). DNA Aneuploidy in porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells undergoing osteogenic and adipogenic *in vitro* differentiation. *Cellular Re-programming*, 15: 425–434.
- Opiela J., Romanek J., Lipiński D., Smorąg Z. (2014). Effect of hyaluronan on developmental competence and quality of oocytes and obtained blastocysts from *in vitro* maturation of bovine oocytes. *BioMed Res. Int.*, Article ID 519189, 8 pp.
- Opiela J., Lipiński D., Romanek J., Juzwa W., Bochenek M., Wilczek P. (2016). MMP-2, TIMP-2, TAZ and MEF2a transcript expression in osteogenic and adipogenic differentiation of porcine mesenchymal stem cells. *Ann. Anim. Sci.*, 16: 369–385.
- Opiela J., Samiec M., Romanek J. (2017). *In vitro* development and cytological quality of inter-species (porcine→bovine) and intra-species (porcine) cloned embryos are affected by trichostatin A-dependent epigenomic modulation of adult mesenchymal stem cells. *Theriogenology*, 97: 27–33.
- Opiela J., Bülbül B., Romanek J. (2018). Varied approach of using MSCs for Bovine embryo *in vitro* culture. *Anim. Biotech., Anim. Biotechnol.*, 30: 1–8.

- Panepucci R.A., Siufi J.L., Silva W.A. Jr., Proto-Siquiera R., Neder L., Orellana M., Rocha V., Covas D.T., Zago M.A. (2004). Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22: 1263–1278.
- Pribenszky C., Du Y., Molnár M., Harnos A., Vajta G. (2008 a). Increased stress tolerance of pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 200–207.
- Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Harnos A., Szenci O. (2006). Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18: 162–163.
- Pribenszky C., Molnár M., Kútvolgyi G., Harnos A., Horváth A., Héjja I. (2009) Sublethal hydrostatic pressure treatment improves fresh and chilled boar semen quality *in vitro* and *in vivo*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 21: 107–107.
- Pribenszky C., Siquiera E., Molnár M., Rumpf R. (2008 c). Improved post-warming developmental competence of open pulled straw-vitrified *in vitro* produced bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pretreatment. *Reprod. Fertil.*, 20: 125–125.
- Pujol M., Lopez-Béjar M., Paramio M.T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61: 735–744.
- Rizos D., Gutierrez-Adan A., Perez-Garnalo S., Fuente J. de la, Boland M.P., Lonergan P. (2003) Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.*, 68: 236–243.
- Romanek J., Opiela J., Lipiński D., Smorag Z. (2018 a). Effect of high hydrostatic pressure applied before cryopreservation on the survival rate and quality of porcine mesenchymal stem cells after thawing. *Anim. Biotechnol.*, 29 (4): 283–292.
- Romanek J., Opiela J., Smorag Z. (2018 b). The impact of high hydrostatic pressure (40 MPa and 60 MPa) on apoptosis level and functional activity of cryopreserved porcine mesenchymal stem cells. *Ann. Anim. Sci.*, 1: 1–17.
- Russell D.F., Baqir S., Bordignon J., Betts D.H. (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev.*, 73: 1255–1270.
- Samiec M., Opiela J., Lipiński D., Romanek J. (2015). Trichostatin A-mediated epigenetic transformation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells biases the *in vitro* developmental capability, quality and pluripotency extent of porcine cloned embryos. *BioMed Res. Int.*, Article ID 814686, 13 pp.
- Samiec M., Romanek J., Lipiński D., Opiela J. (2019). Expression of pluripotency-related genes is highly dependent on trichostatin A-assisted epigenomic modulation of porcine mesenchymal stem cells analysed for apoptosis and subsequently used for generating cloned embryos. *Anim. Sci. J.*, 90: 1127–1141.

- Smoraż Z., Kątska-Książkiewicz L., Skrzyszowska M., Jura J., Gajda B., Bochenek M. (2008). Animal reproduction biotechnology in Poland. *Int. J. Dev. Biol.*, 52: 151–155.
- Smoraż Z., Kątska L. (1988). Reversible changes in dissolution of the zona pellucida of immature bovine oocytes. *Theriogenology*, 30: 13–22.
- Tanhanuch W., Thumanu K., Lorthongpanich C., Parnpai R., Heraud P. (2010). Neural differentiation of mouse embryonic stem cells studied by stir spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 967: 189–195.
- Thumanu K., Tanhanuch W., Lorthongpanich C., Heraud P., Parnpai R. (2009). FTIR microspectroscopic imaging as a new tool to distinguish chemical composition of mouse blastocyst. *Mol. Struct.*, 933: 104–111.
- Wiecheć A., Opiela J., Lipiec E., Kwiatek W.M. (2013). Utility of FT-IR imaging spectroscopy in estimating differences between the quality of bovine blastocysts. *J. Mol. Structure*, 1049: 227–232.

## 4. Transgeneza zwierząt; metody oraz wykorzystanie w hodowli i biomedycynie

Jacek Jura

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,  
32-083 Balice k. Krakowa*

W historii rozwoju nauk rolniczych, obejmujących ostatnie 70 lat, związanych z pracami dotyczącymi szeroko pojętej poprawy cech użytkowych zwierząt gospodarskich można wyróżnić trzy zasadnicze etapy. Pierwszy to wprowadzenie sztucznej inseminacji w latach 50. XX w. Drugi, datowany na lata 70. to rozwój tzw. biotechniki, czyli badania i wprowadzanie do praktyki zabiegów mających na celu lepsze wykorzystanie potencjału rodzimego samicy – wywoływanie mnogiej owulacji (superowulacji) przy zastosowaniu preparatów hormonalnych, chirurgiczne a później niechirurgiczne uzyskiwanie zarodków od poddanych superowulacji dawczyń oraz metody mikromanipulacji i kriokonserwacji zarodków (Jura i in., 1987; Gajda i in., 1989). Na początku lat 80., a ściślej w 1982 r. okazało się, że można przeszczepiać informację genetyczną (geny) pomiędzy osobnikami pochodzącymi z różnych gatunków. Zabieg taki nazwano transgenezą. Bardzo szybko okazało się, że technika ta może być bardzo przydatna w procesie doskonalenia zwierząt hodowlanych. Okazało się również, że nauki rolnicze, a zwłaszcza zootechniczne w połączeniu z dynamicznie rozwijającą się wówczas biotechnologią pozwalają na stworzenie wspólnego pola badań, którego obszar rozciąga się od hodowli zwierząt, poprzez przemysł farmaceutyczny, na medycynę ludzką. We wszystkich wymienionych etapach czynnie uczestniczył i uczestniczy Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji.

Uzyskiwanie zwierząt transgenicznych jest jedną z najdynamiczniej rozwijających się dziedzin szeroko pojętej biotechnologii. Tematyka badawcza z tego zakresu została podjęta w ówczesnym Zakładzie Fizjologii Rozrodu Zwierząt w 1989 r. Podążając za wyznaczonymi wówczas trendami, dotyczącymi techniki wprowadzania egzogennej informacji genetycznej, rozpoczęto pierwsze próby stosując metodę mikroiniekcji do jednego z przedjądrzy zapłodnionej komórki jajowej. Pierwsze, pionierskie w naszym kraju badania nad uzyskiwaniem genetycznie modyfikowanych królików były prowadzone we współpracy z prof. Andrzejem Płócienniczakiem i dotyczyły genetycznych modyfikacji królików w celu uzyskania szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. Badania te zakończyły się częściowym sukcesem, nie udało się uzyskać ekspresji wektora HBsAg, jedynie jego integrację (Jura i in., 1992). Badania te doprowadziły natomiast do opracowania skutecznych

procedur związanych z przygotowaniem materiału do transfekcji, to jest synchronizacji biorczyń i dawczyń, uzyskiwaniem zygot w odpowiednim stadium rozwojowym, doskonaleniem procedur związanych z mikromanipulacjami, hodowlą *in vitro* oraz techniką przeszczepiania transfekowanych zygot.

Na początku lat 90. ubiegłego wieku Zakład, pod kierownictwem prof. Smorąga, rozpoczął współpracę z prof. L-M Houdebine z Institut National de la Recherche Agronomique (Francja) oraz z prof. J.J. Kopchickiem z Edison Biotechnology Institute Ohio University (USA). W ramach współpracy podjęto badania nad uzyskiwaniem transgenicznych królików, świń i bydła. Współpraca z INRA zaowocowała wprowadzeniem w ramy badawcze Zakładu metod umożliwiających wykrywanie obcej informacji genetycznej wprowadzonej do genomów potencjalnie transgenicznych zwierząt – PCR. Ponadto, rezultatem tej współpracy było opracowanie techniki mikroiniekcji do pęcherzyka zarodkowego (GV) niedojrzałych oocytów bydłecych (Jura i in., 1990). Wprowadzenie nowatorskiej w tym czasie techniki PCR zaowocowało również opracowaniem procedury do oznaczania płci zarodków bydła (Wayda i in., 1995).

W okresie tym rozwijano i rozszerzano w Zakładzie prace nad uzyskiwaniem transgenicznych zwierząt hodowlanych, poszerzając współpracę o Harvard Medical School (USA). Tematyka badań dotyczyła modyfikacji zwierząt gospodarskich w kierunku poprawy cech produkcyjnych (Różycki i in., 1999), podniesienia efektywności procesu transgenezy przy zastosowaniu standardowej techniki mikroiniekcji DNA oraz wpływu różnego rodzaju czynników embriologicznych na efektywność transgenezy (Smorąg i in., 1999). W Zakładzie realizowano wówczas pierwszy w Instytucie Zootechniki grant: „Uzyskiwanie zwierząt transgenicznych”, projekt badawczy nr 5 0391 91 01. W badaniach wykorzystano konstrukcję genową bydłeciego genu hormonu wzrostu przygotowaną przez EBI, Ohio University (USA). Konstrukcja zawierała laboratoryjnie niezmodyfikowany gen hormonu wzrostu bydła oraz intron A, połączony z transkrypcyjną sekwencją regulatorową mysiej metalotioneiny (mMt). U wyprodukowanych w EBI transgenicznych myszy powodowała ona zwiększenie masy ciała. Wektor był wprowadzany do pęcherzyków zarodkowych niedojrzałych oocytów i przedjądrzy zygot oraz do jąder komórkowych zarodków 2-komórkowych. W rezultacie przeprowadzonych prac uzyskano 2 buhajki ze stwierdzoną integracją wprowadzonej konstrukcji genowej Mt-bGH 10Δ6, u których stwierdzono podwyższony poziom IGF-1. U jednego osobnika stwierdzono podwyższony poziom hormonu wzrostu. Ponadto, osobniki transgeniczne charakteryzowały się większymi przyrostami masy ciała w porównaniu do grupy kontrolnej buhajków będących w tym samym wieku (Jura i in., 1994).

Wymieniona wyżej konstrukcja genowa Mt-bGH 10Δ6 oraz zawierająca zmutowany gen hormonu wzrostu bydła Mt-bGH M8 (obie przygotowane przez zespół prof. Johna Kopchicka z EBI) zostały zastosowane w pracach nad

uzyskiwaniem transgenicznych świń w celu poprawy ich cech użytkowych oraz w celu zbadania wpływu zastosowanych modyfikacji genetycznych na wybrane parametry rozwojowe. Wynikiem tych prac było uzyskanie transgenicznych świń, u których w ramach współpracy z grupą kierowaną przez prof. Mariana Różyckiego (Zakład Hodowli Trzody Chlewnej IZ) przeprowadzono badania porównawcze. Badania wykazały niewielki wpływ wprowadzonej konstrukcji genowej Mt-bGH 10Δ6 na cechy użytkowe transgenicznych świń. Przy czym istotne było, że nie stwierdzono negatywnego wpływu zmutowanego genu (Mt-bGH M8) na rozwój somatyczny transgenicznych świń (Różycki i in., 1999).

Kolejne prace z zakresu transgenezy zwierząt hodowlanych, prowadzone w Zakładzie do 2001 r., koncentrowały się na modyfikacjach genetycznych ukierunkowanych na gruczoł mlekowy. Prowadzone były badania mające na celu uzyskanie transgenicznych zwierząt produkujących mleko o obniżonej zawartości laktozy, która jest głównym czynnikiem alergennym mleka. Na potrzeby tych badań strona amerykańska przygotowała konstrukcję genową składającą się z mysiego genu promotora kwaśnego białka serwatki mleka (mWAP) oraz sekwencji genu ludzkiej fukozylotransferazy, odpowiedzialnej między innymi za powstawanie w mleku pentoz – cukrów, do których zaliczana jest laktoza. Badania prowadzone były na królikach, kozach i swniach. W ich wyniku uzyskano transgeniczne króliki, kozy i świnię z ekspresją genu WAP-Fuc ukierunkowaną na gruczoł mlekowy (Jura i in., 2000 a,b).

Badania dotyczące wykorzystania świń z ekspresją konstrukcji genowej WAP-Fuc były kontynuowane do 2004 r. Stworzyły one podstawę do udziału Zakładu w pierwszym interdyscyplinarnym ogólnopolskim projekcie badawczym zamawianym: „Identyfikacja polimorfizmu genów u zwierząt domowych i mechanizmy ich oddziaływania na cechy użytkowe”, zadanie pt. „Badanie wybranych cech transgenicznych świń z ekspresją genu WAP-Fuc” (PBZ-KBN-036/(2000). Rezultatem tych badań było wykazanie, że mleko transgenicznych loch z ekspresją genu WAP-Fuc działa bakteriostatycznie na bakterie *E.coli* (Jura i in., 2004 a; Słota i in., 2004; Smorąg i in., 2004).

Wymierne i pozytywne rezultaty uzyskanych w Zakładzie wyników badań z zakresu transgenezy spowodowały, że tematyka badawcza została wzbogacona o prace dotyczące możliwości uzyskiwania białek o znaczeniu terapeutycznym od genetycznie zmodyfikowanych zwierząt gospodarskich. W ramach tego została podjęta współpraca z grupą badaczy z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, kierowaną przez prof. Ryszarda Słomskiego. Pierwszym osiągnięciem w ramach tej współpracy było uzyskanie transgenicznych królików produkujących aktywny biologicznie ludzki hormon wzrostu w mleku. Badania zostały doprowadzone do etapu, w którym wydzielany z mlekiem transgenicznych królików ludzki hormon wzrostu (hGH) został z niego wyodrębniony i przebadano jego aktywność biologiczną



(Lipiński i in., 2003; Kalak i in., 2004; Szalata i in., 2004). Ponieważ współpraca z ww. ośrodkiem zakończyła się wymiernym rezultatem, jej kontynuacją było przygotowanie i uzyskanie w 2002 r. projektu badawczego zamawianego, dotyczącego tematyki wykorzystania transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji: „Wykorzystanie transgenezy w genetycznej modyfikacji świń dla pozyskiwania organów do transplantacji u człowieka”, PBZ-KBN-048/P05/2001. Projekt ten był pionierski w skali kraju i skupiał 11 polskich jednostek badawczych. Koordynatorem tego projektu był prof. Zdzisław Smorąg, kierownik Zakładu. Po roku intensywnych prac, opierając się wyłącznie o konstrukcje genowe wytworzone w kraju, udało się uzyskać pierwszą w Polsce transgeniczną świnię (knur TG 1154) z ekspresją ludzkiej fukozylotransferazy. W rezultacie dalszych prac wyprodukowano linię transgenicznych osobników, którą posłużyli się lekarze transplantolodzy do badań analizujących możliwość jej praktycznego wykorzystania w medycynie. Wypracowane podejście badawcze i rezultaty uzyskane z realizacji tego projektu zostały wykorzystane do przygotowania kolejnych projektów badawczych (Jura i in., 2007, 2004 b; Sypniewski i in., 2005; Lipiński i in., 2008; Szalata i in., 2008).

W 2009 r. rozpoczęto realizację kolejnego grantu NCBiR pt.: „Uzyskanie transgenicznych świń jako dawców tkanek i narządów do transplantacji u ludzi oraz ich biotechnologiczna, fizjologiczna i medyczna charakterystyka”, a w 2014 r. w ramach Innomed NCBiR – trzeciego grantu dotyczącego ksenotransplantacji: „Zwiększenie potencjału uzyskiwania świń politransgenicznych metodami biotechnologii rozrodu”, którego realizację zakończono w 2018 r.

Efektami realizacji wymienionych projektów było uzyskanie pokolenia F0 dla genów: ludzkiej fukozylotransferazy (Fuc- nadekspresja), galktozylotransferazy (Gal- nadekspresja genu ludzkiego oraz knock-out genu endogennego), HLAe., ULBP1. Uzyskano również linie podwójnie i potrójnie transgenicznych osobników oraz transgeniczne osobniki homozygotyczne. W badaniach zastosowano najnowsze techniki stosowane do edycji genomu – technologie „palca cynkowego” (ZFN) oraz CRISPR/Cas9. Efektami praktycznymi wynikającymi z realizacji wymienionych projektów były: wykorzystanie w badaniach przedklinicznych skóry transgenicznych świń w leczeniu oparzeń, zastawek jako bazy do uzyskania zastawek do ksenoprzeszczepów u ludzi. Podjęto również badania nad wykorzystaniem dużych naczyń krwionośnych (tętnic) jako alternatywy w operacjach bypass u ludzi (Zeyland i in., 2014, 2018; Lipiński i in., 2019).

Ponadto, wyprowadzone i utrwalone linie transgenicznych świń zostały wykorzystane jako zwierzęta modelowe w badaniach realizowanych w ramach projektu Strategmed – NCBiR (2017–2020): „Opracowanie zoptymalizowanych metod leczenia uszkodzeń tkankowych w oparciu o innowacyjne kompozyty oraz mezenchymalne komórki macierzyste i ich pochodne u pacjentów z chorobami cywilizacyjnymi”.

Równolegle z badaniami dotyczącymi ekspresji określonych białek w gruczołach mlekowych zwierząt hodowlanych oraz zagadnieniami z zakresu ksenotransplantacji, we współpracy z Państwowym Instytutem Weterynarii w Puławach prowadzono prace nad zastosowaniem rybozymów w walce z białaczką u bydła. W wyniku tej współpracy uzyskano transgeniczne króliki z ekspresją rybozymowego DNA, ukierunkowanego przeciwko wirusowi białaczki (Rola i in., 2002).

Realizowany był także projekt badawczy pt.: „Uzyskanie transgenicznych królików produkujących białko alr w mleku, w połączeniu z mapowaniem wybranych fragmentów genomu królika”, 3PO6D 007 22. Rezultaty przeprowadzonych badań zostały częściowo opublikowane, a wyniki mapowania szczyrzego promotora WAP, wykorzystanego jako mediatora ekspresji alr, zostały zdeponowane w Gene Bank (Jura i in., 2004 c, 2005).

Oprócz nurtu badań dotyczących edycji genomu zwierząt gospodarskich, prowadzono też prace nad podniesieniem efektywności transfekcji. Z uwagi na to, że w początkowym etapie prac związanych z transgenezą dominującą techniką stosowaną do modyfikacji genomu biorcy była mikroiniekcja DNA, celowe było ustalenie optymalnego dla danego gatunku stężenia wprowadzanego DNA. Badania takie zostały wykonane, a wynikające z nich ustalenia wykorzystano w realizacji prac. Podjęto również badania nad opracowaniem alternatywnych metod transfekcji zygot zwierząt gospodarskich. Efektem tych działań było opracowanie lipo-mikroiniekcji oraz nano-fekcji. Lipo-mikroiniekcja polega na wprowadzeniu mieszaniny lipofektant-DNA pod osłonkę przejrzystą zygoty. Wyniki badań przeprowadzonych na zygotach świni i królika wykazały, że około 12% zygot transfekowanych tą metodą wykazuje ekspresję genu markerowego. W przypadku nano-fekcji uzyskano efektywność ekspresji na poziomie 19%, co w odniesieniu do najnowszych metod transfekcji stosowanych w transgenezie stawia opracowane techniki na podobnym poziomie uzyskiwanej efektywności.

### Piśmiennictwo

- Gajda B., Smorąg Z., Wierzbowski S., Wieczorek B., Jura J. (1989). Transfer of vitrified sheep morula. *Zuchthygiene*, 24: 97–100.
- Jura J., Smorąg Z., Wieczorek B. (1987). Effectiveness of superovulation in heifers after PMSG application in unknown phase of oestrus cycle. *Zuchthygiene*, 22: 184.
- Jura J., Smorąg Z., Kańska L., Bak M. (1990). *In vitro* maturation of bovine oocytes following buffer microinjection into germinal vesicle or cytoplasm. *IETS*, 1990. *Therigenology*, Suppl. I.
- Jura J., Plucienniczak A., Smorąg Z., Ryńska B. (1992). Efektywność mikroiniekcji konstruktu HBsAg do zygot króliczych. *Mat. XI Zjazdu PTG*, Kraków, 10–11.09.1992, s. 33.

- Jura J., Kopchick J.J., Chen W.Y., Wagner T.E., Modliński J.A., Reed M.A., Knapp J.R., Smorąg Z. (1994). *In vitro* and *in vivo* development of bovine embryos from microinjected zygotes and 2-cell embryos. *Theriogenology*, 41: 1259–1266.
- Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Skrzyszowska M., Kochick J.J., Kelder B., Prieto P.A., Kareta W., Pasięka J. (2000 a). Efektywność transgenezy u królika, kozy i świni z zastosowaniem genu modyfikującego skład mleka. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 5: 246–250.
- Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Kareta W., Kopchick J.J., Kelder B., Prieto P.A. (2000 b). Inheritance rate of WAP-Fuc gene in pigs and goats. *Ann. Anim. Sci.*, 27 (4): 105–113.
- Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Jurkiewicz J. (2004 a). Production of F1 and F2 generations of WAP-Fuc transgenic pigs. Molecular analysis. *Ann. Anim. Sci.*, 4, 2: 215–222.
- Jura J., Słomski R., Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek J., Lipiński D., Kalak R., Juzwa W., Zeyland J. (2004 b). Production of transgenic pigs suitable for xenotransplantation with the use of standard DNA microinjection. *Ann. Anim. Sci.*, 4, 2: 321–328.
- Jura J., Jura J., Murzyn K., Węgrzyn P., Zarębski A. (2004 c). Gene bank report AY312406.
- Jura J., Jura J., Murzyn K., Węgrzyn P., Zarębski A. (2005). Cloning and characterization of 5' upstream promoter region of rat WAP gene. *BBA-Gene Structure and Expression*, 1727, 1, 58–64.
- Jura J., Smorąg Z., Słomski R., Lipiński D., Gajda B. (2007). Factors affecting the production of potential transgenic pigs by DNA microinjection; a six-year retrospective study. *J. Anim. Feed Sci.*, 16: 641–650.
- Kalak R., Lipiński D., Wielgus K., Jarmuż M., Jura J., Szalata M., Michalak E., Pławski A., Kaczmarek M., Nuc K., Korcz A., Gronek P., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R. (2004). Assessment of transgene inheritance and transgene mapping in rabbits producing the human growth hormone in milk. *Ann. Anim. Sci.*, 4, 2: 241–252.
- Lipiński D., Jura J., Kalak R., Pławski A., Kala M., Szalata M., Jarmuż M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Gronek P., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R. (2003). Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk. *J. Appl. Genet.*, 44 (2): 165–174.
- Lipiński D., Jura J., Juzwa W., Zeyland J., Mały E., Bochenek M., Pławski A., Szalata M., Smorąg Z., Słomski R. (2008). Reduced level of Gal epitope on the surface of pig cells expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. Part 1. *Animal biotechnology*. V. Řehout (ed.), Scientific Pedagogical Publishing, České Budějovice, Biotechnology, pp. 225–227; ISBN 80-85645-58-0.
- Lipiński D., Nowak-Terpiłowska A., Hryhorowicz M., Jura J., Korcz A., Słomski R., Juzwa W., Mazurkiewicz N., Smorąg Z., Zeyland J. (2019). Production of ZFN-mediated GGTA1 knock-out pigs by microinjection of gene constructs into pronuclei of zygotes. *J. Pol. J. Vet. Sci.*, 22 (1): 91–100; doi: 10.24425/pjvs.2018.125611.
- Rola M., Kuźmak J., Jura J., Bicka L., Skrzyszowska M., Gajda B., Smorąg Z., Cantor G.H. (2002). Development of transgenic rabbits with ribozyme directed to

- bovine leukemia virus *rex/tax* mRNA. Bull. Vet. Inst. Puławy, 46, 2: 197–204.
- Różycki M., Smorąg Z., Kopchick J.J., Chen W.Y., Jura J., Pasięka J., Orzechowska B., Gajda B., Skrzyszowska M. (1999). Performance of transgenic pigs produced with the use of two different growth hormone gene constructs. J. Appl. Genet., 40 (1): 29–37.
- Słota E., Rejduch B., Danielak-Czech B., Bugno M., Jura J., Smorąg Z. (2004). Analysis of chromosome structure and physical localization of the Wap-Fuc construct in the genome of transgenic pigs. Ann. Anim. Sci., 4, 2: 223–232.
- Smorąg Z., Gajda B., Jura J., Skrzyszowska M., Pasięka J. (1999). Factors affecting the production of zygotes in superovulated pigs: A seven-years retrospective study. Ann. Anim. Sci., 26 (4):155–161.
- Smorąg Z., Bochenek M., Bugno M., Danielak-Czech B., Gajda B., Jura J., Jurkiewicz J., Mucha A., Rejduch B., Różycki M., Słota E., Tyra M., Wayda E. (2004). Badania wybranych cech transgenicznych świń z ekspresją genu WAP-Fuc. Postępy genetyki molekularnej bydła i trzody chlewnej. M. Switoński (red.). Wyd. AR w Poznaniu. 3.4: 381–410.
- Sypniewski D., Machnik G., Mazurek U., Wilczok T., Smorąg Z., Jura J., Gajda B. (2005). Distribution of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) DNA in organs of domestic pig. Ann. Transplant., 10, 2: 46–51.
- Szalata M., Lipiński D., Kalak R., Tobała P., Lehmann J., Wielgus K., Jura J., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R. (2004). Purification and characterization of the human growth hormone obtained in the milk of transgenic rabbits. Ann. Anim. Sci., 4, 2: 351–362.
- Szalata M., Lipiński D., Wielgus K., Jura J., Smorąg Z., Słomski R. (2008). Production of recombinant proteins in the mammary gland of transgenic and double transgenic rabbits. Part I. Animal biotechnology. V. Řehout (ed.), Scientific Pedagogical Publishing, České Budějovice, Biotechnology, pp. 377–379, ISBN 80-85645-58-0.
- Wayda E., Płucienniczak G., Jura J., Płucienniczak A., Kątska L., Skrzyszowska M., Smorąg Z. (1995). Molekularna metoda oznaczania płci zarodków bydłęcych wyhodowanych *in vitro*. Med. Weter., 9: 530–532.
- Zeyland J., Woźniak A., Gawrońska B., Juzwa W., Jura J., Nowak A., Słomski R., Smorąg Z., Szalata M., Mazurek U., Lipiński D. (2014). Double transgenic pigs with combined expression of human  $\alpha 1,2$ -fucosyltransferase and  $\alpha$ -galactosidase designed to avoid hyperacute xenograft rejection. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), 62 (5): 411-22; doi: 10.1007/s00005-014-0280-3.
- Zeyland J., Hryhorowicz M., Nowak-Terpiłowska A., Jura J., Słomski R., Smorąg Z., Gajda B., Lipiński D. (2018). The production of UL16-binding protein 1 targeted pigs using CRISPR technology. 3 Biotech., 8 (7): 316; doi: 10.1007/s13205-018-1334-8.

## 5. Kriokonserwacja oocytów i zarodków zwierząt

Barbara Gajda

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,  
32-083 Balice k. Krakowa*

Prace związane z kriokonserwacją zarodków zwierząt gospodarskich rozpoczęto w Zakładzie w latach 70. ubiegłego stulecia (Smorąg i in., 1977, 1979, 1982; Wierzbowski i in., 1980; Vlachov i in., 1981; Gajda i in., 1989 a,b). Rezultatami tych prac było uzyskanie na początku 1977 r. jagniąt, a rok później cieląt po przeniesieniu mrożonych zarodków. Było to znaczące osiągnięcie, gdyż urodzone jagnięta po przeniesieniu mrożonych zarodków należały wówczas do jednych z nielicznych na świecie. Podobnie w przypadku bydła, było to pierwsze w Polsce cielę urodzone po transplantacji mrożonego zarodka. Uzyskane wyniki stanowiły mocną przesłankę do nawiązania szerokiej współpracy międzynarodowej i to zarówno w ramach krajów należących do byłego RWPG, jak też z krajami Europy Zachodniej.

Pod koniec lat 80. XX w. rozpoczęto badania związane z szeroko pojętą problematyką kriokonserwacji, głównie metodą witrifikacji zarodków króliczych, owczych i bydłowych (Smorąg i in., 1989; Gajda i in., 1989 b; Gajda, 1990; Smorąg i in., 1990; Smorąg i Gajda, 1991; Gajda i Smorąg, 1993; Smorąg i Gajda, 1993, 1994 a,b; Gajda, 1996). W metodzie tej zestalanie płynów odbywa się nie na drodze krystalizacji, jak to ma miejsce podczas zamrażania, ale poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania. Metoda stanowi duże uproszczenie w stosunku do konwencjonalnych sposobów kriokonserwacji. Należy zaznaczyć, że podjęte wówczas badania z zakresu witrifikacji zarodków króliczych i owczych były pierwszymi tego typu badaniami na świecie.

W badaniach nad określeniem warunków witrifikacji zarodków króliczych koncentrowano się na kilku wybranych zagadnieniach: ustalenia stężenia związków osłaniających niezbędnych do witrifikacji zarodków króliczych, określenia stopnia toksyczności związków osłaniających na zarodki, możliwości obniżenia koncentracji mieszaniny witrifikacyjnej, określenia wpływu kształtu przestrzennego i objętości próbki na efektywność witrifikacji, możliwości witrifikacji zarodków uzyskanych po hodowli *in vitro*, możliwości witrifikacji zarodków uzyskanych metodą niechirurgiczną, określenia skuteczności witrifikacji zarodków na podstawie ich zdolności do rozwoju *in vitro* i *in vivo*.

Procedurę witrifikacji opracowaną dla zarodków króliczych zastosowano w badaniach nad zarodkami owczymi. Uzyskano przeżywalność *in vivo*

wynoszącą około 50%. Był to rezultat porównywalny z przeżywalnością zarodków kriokonserwowanych na drodze zamrażania. Stwierdzono, że warunkiem pełnego rozwoju *in vivo* witrifikowanych zarodków owczych jest ich przeniesienie do biorczyń w czasie nie przekraczającym 2 min po rozmrożeniu i usunięciu środka osłaniającego (Gajda i in., 1989 a,b; Gajda, 1990).

Efektom prac z tego zakresu było urodzenie się pierwszych w świecie królicząt i jagniąt oraz jednego z pierwszych na świecie cieląt po przeniesieniu witrifikowanych zarodków (Smorąg i in., 1989; Gajda i in., 1989 a,b; Smorąg i Gajda, 1994 a).

Drugi etap prac nad witrifikacją zarodków ssaków miał na celu poszukiwanie optymalnych warunków witrifikacji zarodków króliczych znajdujących się we wczesnych stadiach rozwoju i dotyczył następujących szczegółowych zagadnień: określenia roli wstępnej dehydratacji zarodków w roztworach sacharozy i trehalozy na ich przeżywalność, ustalenia optymalnego czasu ekwilibracji, określenia wpływu związków osłaniających, stanowiących mieszaniny witrifikacyjne na przeżywalność zarodków, określenia wpływu podwyższonej koncentracji soli w roztworze PBS na efektywność witrifikacji zarodków w stadium od zygoty do blastocysty, ustalenia warunków witrifikacji w zależności od stadium rozwoju zarodka, określenia efektywności metody witrifikacji na podstawie: hodowli *in vitro* i po przeniesieniu do zsynchronizowanych biorczyń oraz porównania efektywności witrifikacji zarodków świeżych i hodowanych *in vitro* (Smorąg i in., 1989, 1990; Gajda, 1990; Gajda i Smorąg, 1993; Gajda, 1996; Smorąg i Gajda, 1998; Gajda i Smorąg, 2003).

Badania dotyczące kriokonserwacji metodą witrifikacji zarodków bydlęcych uzyskanych *in vivo* wykazały możliwość zwiększenia ich przeżywalności zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, kiedy wprowadzono wielostopniowe dodawanie związków osłaniających (Gajda i in., 2000 a). Użycie mieszaniny glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy do witrifikacji zarodków bydlęcych w stadium 8-16 blastomerów i moruli pozwoliło na uzyskanie przeżywalności od około 30 do ponad 50%. Stwierdzono, że niezależnie od stosowanego czasu ekwilibracji przeżywalność witrifikowanych 8-16-blastomerowych zarodków była niższa niż morul (Smorąg i Gajda, 1994 a,b, 1995; Gajda i Smorąg, 1998; Gajda i in., 2000 a,b).

Opracowanie efektywnych metod zapłodnienia i hodowli *in vitro* wzbudziło zainteresowanie kriokonserwacją zarodków uzyskanych tą metodą. Z badań w zakresie witrifikacji zarodków bydlęcych uzyskanych metodą zapłodnienia *in vitro* i współhodowli z komórkami nabłonka jajowodowego wynikało, że ich podatność na kriokonserwację tą metodą jest obniżona w porównaniu z zarodkami uzyskanymi *in vivo*. W przeprowadzonych doświadczeniach uzyskano około 20-40% przeżywalność dla witrifikowanych morul i blastocyst uzyskanych *in vitro*, co było wartością niższą w porównaniu do przeżywalności zarodków uzyskanych *in vivo*. Jednocześnie wykazano, że po

zastosowaniu krótkiego czasu ekwilibracji (2–5 min) przed witrifikacją wra- stał odsetek przeżywających blastocyst wyprodukowanych *in vitro* (Gajda i in., 2000 a,b). Wykazano, że zarodki w stadium blastocysty uzyskane w wy- niku zapłodnienia i hodowli *in vitro*, które były witrifikowane w podwyższo- nej o 25% koncentracji soli w PBS, przeżywały *in vitro* na poziomie wyno- szącym ponad 50% (Gajda i in., 1997).

Reasumując można stwierdzić, że w wyniku przedstawionych wyżej badań opracowano efektywną metodę witrifikacji zarodków króliczych znaj- dujących się w stadium od zygoty do blastocysty (Smorąg i in., 1989; Smorąg i Gajda, 1993; Gajda, 1996) oraz zarodków bydłęcych w stadium moruli i bla- stocysty (Smorąg i Gajda, 1994 a,b). Wykazano także możliwość skutecznej witrifikacji zarodków owczych w stadium moruli (Gajda i in., 1989 a,b).

Pod koniec lat dziewięćdziesiątych XX w. badania z zakresu witrifi- kacji poszerzono o doświadczenia na zarodkach świni. Głównym celem badań było określenie czynników warunkujących efektywną hodowlę *in vitro* i krio- konserwację zarodków tego gatunku. Szczegółowa tematyka badawcza doty- czyła następujących problemów: określenia i wyboru optymalnych warunków hodowli *in vitro* zarodków świni znajdujących się we wczesnych stadiach roz- woju (Gajda, 1998; Gajda i Smorąg, 2004), określenia stopnia toksyczności związków osłaniających wchodzących w skład mieszanin witrifikacyjnych na zarodki świni w trakcie ich ekspozycji przed witrifikacją (Gajda i Smorąg, 2000), witrifikacji zarodków świni w wybranych mieszaninach witrifikacyj- nych (Gajda i Smorąg, 2000), porównania efektywności witrifikacji zarod- ków uzyskanych *in vitro* i *in vivo* (Gajda i Smorąg, 1998, 1999, 2002), wpływu zminimalizowanej objętości witrifikowanej próbki na efektywność witrifika- cji zarodków w różnych stadiach rozwojowych (Gajda i Smorąg, 2001), oceny rozwoju *in vivo* zarodków świni witrifikowanych przy zastosowaniu wariantu kriokonserwacji ocenionego jako optymalny (Gajda i in., 2004). W rezultacie prowadzonych w tym czasie badań z zakresu kriokonserwacji zarodków świni uzyskaliśmy w 2003 r. potomstwo po transplantacji witrifikowanych zarod- ków (Gajda i in., 2004). Były to pierwsze w Polsce prosięta uzyskane po trans- plantacji kriokonserwowanych zarodków świni. W ww. badaniach, oprócz za- stosowania skutecznych rozwiązań z zakresu kriokonserwacji, zmodyfiko- wano metodę transferu kriokonserwowanych zarodków świni. Polega ona na wprowadzaniu witrifikowanych blastocyst świni do jajowodu zamiast stan- dardowego przeniesienia do rogu macicy (Patent nr P 359085, 2008) (Gajda i in., 2005; Gajda i Wieczorek, 2009).

W kolejnych latach podjęto badania mające na celu wyjaśnienie przy- czyny niskiej efektywności kriokonserwacji zarodków świni. Jak wiadomo, jest ona spowodowana wysoką zawartością lipidów w cytoplazmie komórek zarodkowych tego gatunku. W tym czasie w literaturze brak było informacji określających poziom i rodzaj związków lipidowych w oocytach i zarodkach świni. Badania realizowane we współpracy z Zakładem Cytologii i Histologii

Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie zaowocowały nowymi informacjami dotyczącymi m.in. ilości i jakości związków lipidowych w poszczególnych stadiach rozwojowych zarodków świni uzyskanych *in vivo* i po hodowli *in vitro* (Romek i in., 2009, 2010, 2011 a,b) oraz wpływu warunków hodowli zarodków świni na ich podatność na kriokonserwację (Gajda i in., 2011) W rezultacie, przyczyniło się to do opracowania bardziej efektywnej metody wtryfikacji oocytów i zarodków tego gatunku. Za cykl prac badawczych na temat „Lipidy w oocytach i zarodkach świni – nowe metody identyfikacji, regulacji zawartości oraz implikacje dla biotechnologii” zespół w składzie: dr Marek Romek, dr hab. Barbara Gajda, prof. IZ PIB, mgr Ewa Krzysztofowicz, prof. dr hab. Zdzisław Smorąg, otrzymał w 2011 r. wyróżnienie Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych Polskiej Akademii Nauk.

Obserwacje dotyczące pozytywnego wpływu czynnika regulującego metabolizm komórkowy – siarczanu fenazyny na metabolizm glukozy oraz redukcję akumulacji lipidów, przeprowadzone na zarodkach bydłęcych, skłoniły nas do podjęcia badań nad wpływem tego dodatku na zawartość lipidów w hodowanych zarodkach świni. Analiza zawartości tłuszczów w zarodkach uzyskanych po hodowli w zmodyfikowanych warunkach wykazała niższy poziom względnej zawartości lipidów w zarodkach hodowanych z dodatkiem PES w porównaniu do zarodków hodowanych w warunkach standardowych, przy czym obniżeniu uległa zawartość trójglicerydów, natomiast zawartość fosfolipidów i cholesterolu nie zmieniała się (Romek i in., 2011 a). Przeprowadzone próby wtryfikacji blastocyst świni, uzyskanych po hodowli w pożywce z dodatkiem siarczanu fenazyny, wskazywały też na wyższą przeżywalność po rozmrożeniu zarodków uzyskanych po hodowli w zmodyfikowanych warunkach w porównaniu z zarodkami grupy kontrolnej (Gajda i in., 2011).

W następnych latach podjęto badania mające na celu określenie czynników wpływających na efektywną kriokonserwację oocytów świni (Gajda, 2017). Jak wiadomo, kriokonserwacja oocytów ssaków wciąż jest problemem nierozwiązanym w stopniu umożliwiającym jej praktyczne wykorzystanie. Tymczasem, w związku z coraz lepszym opanowaniem pozaustrojowej produkcji zarodków i możliwościami wykorzystania oocytów w programach zachowania bioróżnorodności ssaków oraz klonowania somatycznego zwierząt, potrzeby związane z rozwiązywaniem tego problemu są coraz bardziej aktualne. Przeprowadzone badania wykazały, że użyta do wtryfikacji oocytów świni mieszanina składająca się z dwumetylosulfotlenku i glikolu etylenowego pozwoliła na uzyskanie przeżywalności *in vitro* od 11 do 19% tylko w przypadku oocytów dojrzałych (Gajda i Smorąg, 2008). Niezależnie od zastosowanej mieszaniny wtryfikacyjnej (z dodatkiem białka lub bez) partenogenetycznie rozwijały się tylko wtryfikowane oocyty dojrzałe *in vivo*. Bada-



nia te potwierdziły stwierdzoną wcześniej mniejszą podatność na kriokonserwację oocytów niedojrzałych niż oocytów dojrzałych. Przeniesienie do jajowodów 4 loszek-biorczyń 127 dojrzałych *in vivo* oocytów wityfikowanych w mieszaninie z dodatkiem białka pod postacią surowicy płodów cielęcych nie zaowocowało uzyskaniem ciąży. Natomiast, po przeniesieniu do 2 biorczyń 48 dojrzałych oocytów wityfikowanych w mieszaninie bez dodatku białka w obydwu przypadkach stwierdzono ciążę (Gajda i Smorağ, 2010). W wyniku ich oproszenia uzyskano 12 żywych prosiąt, które poddane testom weryfikacji wykazały pochodzenie 4 z nich po oocytach nitryfikowanych (fot. 1) (Gajda i in., 2015). Oznacza to, że uzyskano prosięta, jedne z nielicznych na świecie, urodzone po przeniesieniu wityfikowanych oocytów świni. Osiągnięcie to zostało uhonorowane nagrodą Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi za wybitne krajowe osiągnięcie mające znaczenie dla wdrażania postępu w rolnictwie w 2016 r.



Fot. 1. Prosięta urodzone po transferze wityfikowanych oocytów  
(Gajda i in., 2015)

Celem badań dotyczących określenia warunków hodowli zarodków uzyskanych po zapłodnieniu metodą ICSI świeżych i kriokonserwowanych oocytów świni (Mandryk, 2013) był rozwój metod pozaustrojowego uzyskiwania zarodków świni oraz poprawa efektywności ich hodowli *in vitro* i kriokonserwacji. Zakładano, że metoda pozaustrojowego zapłodnienia techniką

docytoplazmatycznej iniekcji plemnika do oocytu (ICSI) umożliwi uzyskanie większej liczby prawidłowo zapłodnionych oocytów dzięki wykluczeniu zapłodnienia polispermicznego, tj. wniknięcia do oocytu więcej niż jednego plemnika. Uzyskane pozaustrojowo zygoty hodowano *in vitro* do stadium blastocysty ekspandującej w pożywkach z dodatkiem różnego źródła białka czy też kwasu hialuronowego (Grad-Mandryk i in., 2013). Zastosowane modyfikacje warunków hodowli umożliwiły pozaustrojowe uzyskanie zarodków w stadium blastocysty o wyższej jakości. Uzyskane zarodki poddawano kompleksowej ocenie jakości obejmującej ocenę morfologiczną, tempo rozwoju, całkowitą liczbę komórek w blastocystach oraz poziom fragmentacji DNA (Grad i in., 2009, 2012, 2013; Grad i Gajda, 2011; Mandryk, 2013).

Ostatnio prowadzone są badania z zastosowaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (200 do 800 mm Hg) do poprawy efektywności kriokonserwacji metodą witrifikacji oocytów i zarodków świni. Przyjmuje się, że w oocytach i zarodkach w wyniku stresu wywołanego wysokim ciśnieniem może nastąpić wzrost tolerancji komórek na kolejny stres wywołany zabiegiem kriokonserwacji. W rezultacie powinno to doprowadzić do zwiększenia efektywności tego zabiegu. Rozwijano również badania z zakresu witrifikacji oocytów i zarodków w komorze próżniowej z ciekłym azotem, umożliwiającej obniżenie jego temperatury do około  $-210^{\circ}\text{C}$ , co z kolei pozwala na zwiększenie tempa schładzania próbki do około  $130\ 000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . W oocytach i zarodkach poddanych wysokiemu ciśnieniu hydrostatycznemu przed i po witrifikacji przeprowadzono kompleksowe badania dotyczące potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (Romek i in., 2013, 2019) oraz całkowitej zawartości i identyfikacji poszczególnych typów lipidów. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono wyższy odsetek morfologicznie normalnych oocytów po rozmrożeniu w przypadku zastosowania witrifikacji w komorze próżniowej, umożliwiającej obniżenie temperatury ciekłego azotu o około  $15^{\circ}\text{C}$  w porównaniu do witrifikacji w standardowych warunkach. Nie zaobserwowano różnic w podatności na witrifikację oocytów świni traktowanych lub nie przed kriokonserwacją wysokim ciśnieniem hydrostatycznym. Z kolei, wykazano wyższy odsetek dzielących się zygot w przypadku zapłodnienia *in vitro* witrifikowanych oocytów dojrzewających z dodatkiem tymozyny w porównaniu do zygot kontrolnych rozwijających się z oocytów dojrzewających bez tego dodatku. Analiza zmian apoptotycznych wykazała nieco większą średnią liczbę komórek apoptotycznych w witrifikowanych blastocystach hodowanych w pożywce standardowej w porównaniu do hodowanych z dodatkiem tymozyny (Gajda i in., 2019 a,b).

Przeprowadzone badania umożliwiły zatem zwiększenie efektywności metody kriokonserwacji oocytów i zarodków świni (Gajda, 2017; Gajda i Smorąg, 2018; Gajda i in., 2019 b).

Na obecnym etapie rozwoju opisane wyżej metody kriokonserwacji oocytów i zarodków świni zostały włączone do koordynowanego przez Instytut Zootechniki PIB programu BIOSTRATEG pt.: „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” realizowanego w latach 2015–2019 i będą wykorzystane w programach zachowania bioróżnorodności zwierząt.

### Piśmiennictwo

- Gajda B. (1990). Zastosowanie witrifikacji do zamrażania zarodków króliczych i owczych. Instytut Zootechniki, Balice, Rozpr. dokt., 80 ss.
- Gajda B. (1996). Vitrification of rabbit embryos at 1-cell to morula stage in an ethylene glycol-based solution. *Cryo-Letters*, 17: 363–370.
- Gajda B. (1998). *In vitro* culture of pig embryos. *Ann. Anim. Sci.*, 25: 31–38.
- Gajda B. (2017). Aktualny stan i możliwości kriokonserwacji oocytów świni. *Wiad. Zoot.*, 5: 70–79.
- Gajda B., Smorąg Z. (1993). Factors affecting the survival of one- and two-cell rabbit embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 39: 499–506.
- Gajda B., Smorąg Z. (1994). *In vitro* survival of porcine embryos following exposure to vitrification solution. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 16: 59–60.
- Gajda B., Smorąg Z. (1998). Kriokonserwacja oocytów i zarodków ssaków. *Biotechnologia*, 2: 10–32.
- Gajda B., Smorąg Z. (1999). Viability of *in vivo* and *in vitro* produced porcine blastocyst vitrified in EFS solution. *Ann. Anim. Sci.*, 26, 4: 149–154.
- Gajda B., Smorąg Z. (2000). Survival of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. *Cryo-Letters*, 21: 231–236.
- Gajda B., Smorąg Z. (2001). Efektywność witrifikacji zarodków świńskich w zależności od objętości kriokonserwowanej próbki. *Mat. II Zjazdu TBR*, Warszawa, 5–8.06.2001, P–IV–4.
- Gajda B., Smorąg Z. (2002). Vitrification of cultured and non-cultured expanded and hatched pig blastocyst. *Cryo-Letters*, 23: 385–388.
- Gajda B., Smorąg Z. (2003). *In vitro* survival of rabbit embryos vitrified in EFS medium and increased by 50, 70 or 100% PBS salt concentration. *Ann. Anim. Sci.*, 3: 41–46.
- Gajda B., Smorąg Z. (2004). Cells number in pig blastocyst cultured in different media. *Ann. Anim. Sci.*, 4: 315–320.
- Gajda B., Smorąg Z. (2008). Cryopreservation of *in vivo* matured pig oocytes by OPS vitrification. *Acta Biol. Crac.a*, 50: 47.
- Gajda B., Smorąg Z. (2010). Pregnancy after transfer of pig matured oocytes vitrified using ops method. *Mat. Konf. „II Zimowej Szkoły TBR”*, 17–19.02.2010, s. 21.
- Gajda B., Smorąg Z. (2018). Kriokonserwacja oocytów świni. *Instr. wdroż. Wyd. IZ PIB*, i-1/2018: 20 ss.
- Gajda B., Wieczorek J. (2009). Transplantacja chirurgiczna zarodków świni. *Instr. wdroż. Wyd. IZ PIB*. i-1/2009, 20 ss.

- Gajda B., Smoraż Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B. (1989 a). Transfer of vitrified sheep morula. *Zuchthygiene (obecnie: Reprod. Domestic. Anim.)*, 24: 97–100.
- Gajda B., Smoraż Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B. (1989 b). Zastosowanie witrifikacji do zamrażania zarodków owczych. *Prz. Hod.*, 57: 25–28.
- Gajda B., Kańska L., Smoraż Z. (1997). Viability of bovine *in vivo* and *in vitro* produced morula vitrified in EFS solution. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*, 24: 5.
- Gajda B., Kańska L., Smoraż Z. (2000 a). Effect of equilibration time and developmental stage on viability after vitrification of *in vitro* and *in vivo* produced bovine embryos. *Ann. Anim. Sci.*, 27: 73–78.
- Gajda B., Smoraż Z., Kańska L. (2000 b). Witrifikacja jako metoda kriokonserwacji zarodków króliczych, świńskich i bydłęcych. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 5: 241–245.
- Gajda B., Smoraż Z., Wieczorek J. (2004). Prosięta uzyskane po transplantacji witrifikowanych blastocyst. *Med. Weter.*, 60: 371–373.
- Gajda B., Smoraż Z., Wieczorek J. (2005). Survival of vitrified pig blastocysts (Beneficial effect of oviduct transfer). *Proc. Seventh International Conference on pig Reproduction*, 12–15.06.2005, Kerkrade, The Netherlands, p. 91.
- Gajda B., Romek M., Krzysztofowicz E., Grad I., Bryła M., Smoraż Z. (2011). Lipid content and cryotolerance of porcine embryos cultured with phenazine ethosulfate. *Cryo-Letters*, 32: 349–357.
- Gajda B., Skrzypczak-Zielińska M., Gawrońska B., Słomski R., Smoraż Z. (2015). Successful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using OPS method. *Cryo-Letters*, 36: 8–18.
- Gajda B., Poniedziałek-Kempny K., Rajską I., Smoraż Z. (2019 a). *In vitro* fertilization and subsequent development of vitrified porcine oocytes matured with thymosin. *Proc. The 5th Winter Workshop of the Society for Biology of Reproduction: “Central and Local Regulations of Reproductive Processes”*, Zakopane, Poland, 13–15.02.2019, p. 30.
- Gajda B., Poniedziałek-Kempny K., Rajską I., Smoraż Z. (2019 b). Metody zwiększania efektywności kriokonserwacji oocytów świni. (The methods of increase in cryoconservation efficiency of pig oocytes). *Mat. LXXXIV Zjazdu Naukowego PTZ: Osiągnięcia i perspektywy zootechniki w aspekcie zrównoważonego rolnictwa i ochrony środowiska*, Szczecin, 18–20.09.2019, s. 88.
- Grad I., Gajda B. (2011). Sperm motility parameters of boar semen and effectiveness of *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Acta Biochim. Polon.*, 58: 145.
- Grad I., Gajda B., Smoraż Z. (2009). Quality of fast and slow developing pig blastocysts derived from *in vitro* culture. *Proc. II Polish-French Symp.: Endocrinology of Reproduction*, Kraków, 23–25.04.2009, abstr. 69, p. 55.
- Grad I., Kosenyuk Y., Gajda B. (2012). Developmental competence of pig embryos after standard *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Mat. XXX Konf. Embriologicznej*, Jurata, 16–18.05.2012, *Acta Biol. Crac.*, 54: 30.
- Grad-Mandryk I., Kosenyuk J., Gajda B. (2013). Developmental competence of pig embryos obtained from ICSI: the effect of medium supplementation of BSA, FCS or EPS. *Reprod. Biol.*, 135: 11–13.

- Mandryk I. (2013). Optymalizacja warunków hodowli zarodków uzyskanych po zapłodnieniu metodą ICSI świeżych i kriokonserwowanych oocytów świnii. Instytut Zootechniki PIB, Balice, Rozpr. dokt., 93 ss.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Smorąg Z. (2009). Lipid content in non-cultured and cultured pig embryo. *Reprod. Dom. Anim.*, 44: 24–32.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Smorąg Z. (2010). Changes of lipid composition in non-cultured and cultured pig embryos. *Theriogenology*, 74: 265–276.
- Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kępczyński M., Smorąg Z. (2011 a). Lipid content in pig blastocysts cultured in the presence or absence of protein and vitamin E or phenazine ethosulfate. *Folia Biol. (Kraków)*, 59: 45–52.
- Romek M., Gajda B., Rolka M., Smorąg Z. (2011 b). Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and preimplantation non-cultured and cultured embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, 46: 471–480.
- Romek M., Kucia M., Gajda B., Smorąg Z. (2013). Mitochondrial activity in pre-implantation cultured porcine embryos after sublethal high hydrostatic pressure stress. *Proc. 29th Scientific Meeting of A.E.T.E., Istanbul, Turkey*, 6–7.09.2013, p. 196.
- Romek M., Kucia M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Smorąg Z. (2019). Effect of high hydrostatic pressure on mitochondrial activity, reactive oxygen species level and developmental competence of cultured pig embryos. *Theriogenology*, 140: 99–108.
- Smorąg Z., Gajda B. (1991). Vitrification of non-cultured and cultured rabbit embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 26: 151–158.
- Smorąg Z., Gajda B. (1993). Witryfikacja i transplantacja zarodków króliczych. *Instr. wdroż. Wyd. IZ. 9/93*: 12 ss.
- Smorąg Z., Gajda B. (1994 a). Viability of bovine embryos after different equilibration/vitrification treatment. *Appl. Biol. Comm.*, 4: 27–31.
- Smorąg Z., Gajda B. (1994 b). Cryopreservation of mammalian ova and embryos by vitrification. *Biotech. Adv.*, 12: 449–465.
- Smorąg Z., Gajda B. (1995). Witryfikacja oocytów i zarodków ssaków. *Biotechnologia*, 3: 68–83.
- Smorąg Z., Gajda B. (1998). *In vitro* and *in vivo* survival of rabbit embryos vitrified in EFS medium and increased PBS salt concentration. *Cryo-Letters*, 19: 99–104.
- Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., Kareta W., Gajda B. (1977). Wyniki transplantacji zamrożonych zarodków u owiec. *Med. Weter.*, 33: 552–554.
- Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., Kańska L., Gajda B. (1979). Konserwacja zarodków bydłowych w temperaturze ciekłego azotu. *Med. Weter.*, 25: 299–302.
- Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., Laszczka A., Gajda B. (1982). Transplantation von tiefgefrorenen Schafembryonen. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 36: 163–167.
- Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J. (1989). Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31: 1227–1231.

- Smorąg Z., Heyman Y., Garnier V., Gajda B. (1990). The effect of sucrose and trehalose on the viability of one- and two-cell rabbit embryos. *Theriogenology*, 33: 741–747.
- Vlachov K., Zagorski D., Kaczeva D., Bobadov N., Smorąg Z., Kątska L., Gajda B. (1981). Transplantacja na zamrazeni embrioni ot owce sled prodlzitelno shraniwania i transport. *Vet. Sbirka*, 5: 18–20.
- Wierzbowski S., Wierchoś E., Smorąg Z., Gajda B. (1980). Chirurgiczna i niechirurgiczna transplantacja mrożonych zarodków bydła. *Med. Weter.*, 36: 641–643.

## 6. Rozwój metod klonowania wybranych gatunków ssaków – możliwości ich wykorzystania w rolnictwie, biomedycynie oraz ochronie ginących ras i gatunków

Maria Skrzyszowska<sup>1</sup>, Marcin Samiec<sup>1</sup>

*Instytut Zootechniki PIB, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,  
32-083 Balice k. Krakowa;*

*e-mail: maria.skrzyszowska@izoo.krakow.pl; marcin.samiec@izoo.krakow.pl*

### Opracowanie oryginalnej modyfikacji metody bisekcji na potrzeby klonowania zarodków i uzyskiwania monogenetycznego potomstwa wybranych gatunków zwierząt gospodarskich

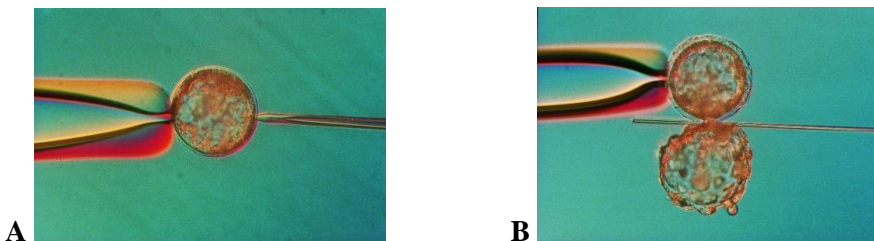
Od szeregu lat w Instytucie Zootechniki PIB w Balicach, w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji prowadzone są badania z zakresu klonowania zwierząt gospodarskich. Opracowanie technik niechirurgicznego pozyskiwania i przenoszenia zarodków bydłęcych otworzyło nowe możliwości rozwoju nowoczesnych technologii wspomaganego rozrodu (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*), m.in. takich jak klonowanie (zarodkowe i somatyczne). Metody klonowania zwierząt różnią się między sobą nie tylko rodzajem użytej techniki mikrochirurgicznej, lecz przede wszystkim liczebnością klonów potencjalnie możliwych do uzyskania. Jedną z pierwszych i efektywnych metod klonowania bydła była bisekcja zarodków, najczęściej zarodków w stadium blastocysty. Zabieg bisekcji polegał na rozdzieleniu/przecięciu (mikronożem lub szklaną igłą umocowaną na ramieniu mikromanipulatora; bisekcja standardowa) zarodka na dwie ekwiwalentne części. W wyniku transferu „połówek” zarodków do dróg rodnych samic-biorczyń uzyskano pierwsze w Polsce pary identycznych genetycznie cieląt (monogenetyczne bliźnięta; Skrzyszowska i in., 1988) (ryc. 1).



Ryc. 1. Monogenetyczne pary identycznych genetycznie cieląt uzyskanych po transferze „połówek” blastocyst bydłęcych do dróg rodnych jałówek-biorczyń

<sup>1</sup> Maria Skrzyszowska i Marcin Samiec przyczynili się w jednakowym stopniu do powstania tego rozdziału w niniejszej monografii naukowej (równy wkład autorski).

Prawidłowo przeprowadzony zabieg bisekcji blastocysty pozwalał na zachowanie ekwiwalencji „połówek” nie tylko pod względem liczebności komórek, ale także właściwej proporcji komórek węzła zarodkowego do komórek trofoektodermalnych, jaka występuje w zarodku nie poddanym bisekcji. Bisekcja jest relatywnie prostą i wydajną metodą podwajania liczby zarodków i produkcji monogenetycznych bliźniąt (efektywność na poziomie 25–30%), jest jednak techniką dość inwazyjną, w trakcie zabiegu dochodzi do zniszczenia i wyeliminowania części komórek zarodkowych. Szczególnie dotkliwe mogą być straty komórkowe w obrębie węzła zarodkowego, które w istotny sposób wpływają na obniżenie potencjału rozwojowego „połówek” zarodków (Skrzyszowska i Smorąg, 1989). Rezultatem naszych badań przeprowadzonych w kierunku poprawy efektywności dzielenia zarodków było opracowanie nowatorskiej technologii uzyskiwania monogenetycznych bliźniąt w oparciu o zmodyfikowaną bisekcję (Skrzyszowska i in., 1997, 1999). Zaproponowany sposób bisekcji pozwalał na znaczne ograniczenie strat komórkowych w porównaniu do występujących w trakcie standardowej bisekcji, ograniczał je bowiem do kilku komórek. Istotą tej metody było prowokowanie specyficznego sposobu wylęgania się blastocysty, w trakcie którego dokonywany był zabieg bisekcji. Ten sposób wylęgania inicjowany był poprzez wcześniejsze nakłucie lub nacięcie osłonki przejrzystej blastocysty. W warunkach hodowli *in vitro* około 50% perforowanych blastocyst ekspandowało przez szczelinę w osłonce przejrzystej, osiągając na pewnym etapie procesu wylęgania stan, w którym fragment blastocysty znajdujący się już poza osłonką przejrzystą był zbliżony wielkością do reszty zarodka pozostającego wciąż w obrębie osłonki przejrzystej. Wylęgający się według tego schematu zarodek przypomina kształtem „ósemkę”. Na tym etapie wylęgania obie części zarodka są połączone jedynie wąskim mostkiem komórkowym. Przecięcie mostka komórkowego szklaną mikroigłą lub metalowym ostrzem, podobnie jak w przypadku bisekcji standardowej, jest zabiegiem o niewielkim stopniu inwazyjności (ryc. 2).



Ryc. 2. Zmodyfikowana bisekcja zarodka świni w stadium blastocysty. A) Perforacja osłonki przejrzystej blastocysty szklaną mikroigłą; B) Specyficznie wylęgająca się w wyniku przeprowadzonej perforacji blastocysta poddana mikrochirurgicznemu rozdzieleniu na dwie ekwiwalentne „połówki” (przy użyciu szklanej mikroigły)

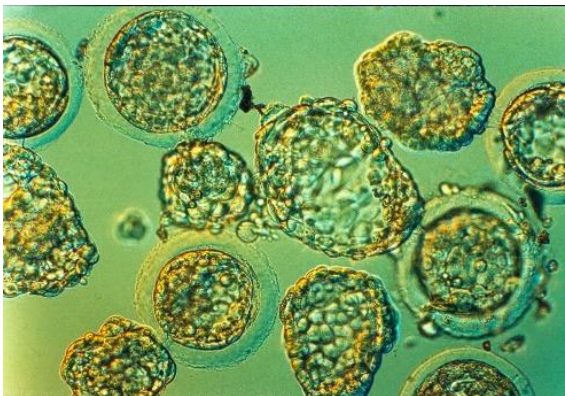


Skutkiem tej czynności było uszkodzenie/zniszczenie jedynie kilku komórek. Uzyskane na tej drodze „połówki” blastocyst transferowane do macicy jałówek/krów biorczyń wykazały kompetencje do pełnego rozwoju *in vivo*.

Korzyści wynikające z produkcji monogenetycznych bliźniąt u bydła są wymierne zarówno w aspekcie praktycznym, jak i czysto poznawczym, zwłaszcza w kategorii eksperymentów embriologicznych ukierunkowanych na ocenę wczesnego rozwoju zarodkowego, śmiertelności embrionalnej oraz okołoinplantacyjnej sygnalizacji endokrynologicznej w układzie matka zastępcza-zarodek, a także w kategorii badań cytogenetycznych i fizjologicznych, szczególnie o charakterze żywieniowym.

Ponadto, podczas zabiegu bisekcji możliwe jest przeprowadzenie biopsji komórek do analizy molekularnej w celu określenia genetycznej płci zarodka, co także może mieć walor aplikacyjny, np. w kreowaniu postępu hodowlanego zwierząt użytkowych.

Włączenie efektywnej metody bisekcji zarodków bydłęcych do programu hodowlanego MOET (ang. *multiple ovulation and embryo transfer*) może poszerzyć ofertę programową tego przedsięwzięcia i odegrać ważną rolę w przyspieszeniu genetycznego postępu u tego gatunku. Mankamentem metody jest wielkość możliwego do uzyskania klonu, ograniczonego jedynie do monogenetycznych bliźniąt. Potencjalnie bardziej liczebne klony są możliwe do uzyskania techniką transplantacji jąder komórek zarodkowych (ECNT; ang. *embryo cell nuclear transfer*) (ryc. 3) lub jąder komórek somatycznych (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*) do cytoplazmy oocytów, z których usunięto ich własny materiał genetyczny.



Ryc. 3. Klon liczący osiem blastocyst królika, uzyskanych techniką ECNT z jąder blastomerów pochodzących z zarodka w stadium 8-komórkowym

**Opracowanie nowatorskich rozwiązań służących zwiększaniu efektywności uzyskiwania identycznych genetycznie zarodków i/lub potomstwa świni, kozy, królika, konia oraz kota domowego metodami klonowania somatycznego na potrzeby hodowli zwierząt i badań interdyscyplinarnych (biomedycyny i biofarmacji)**

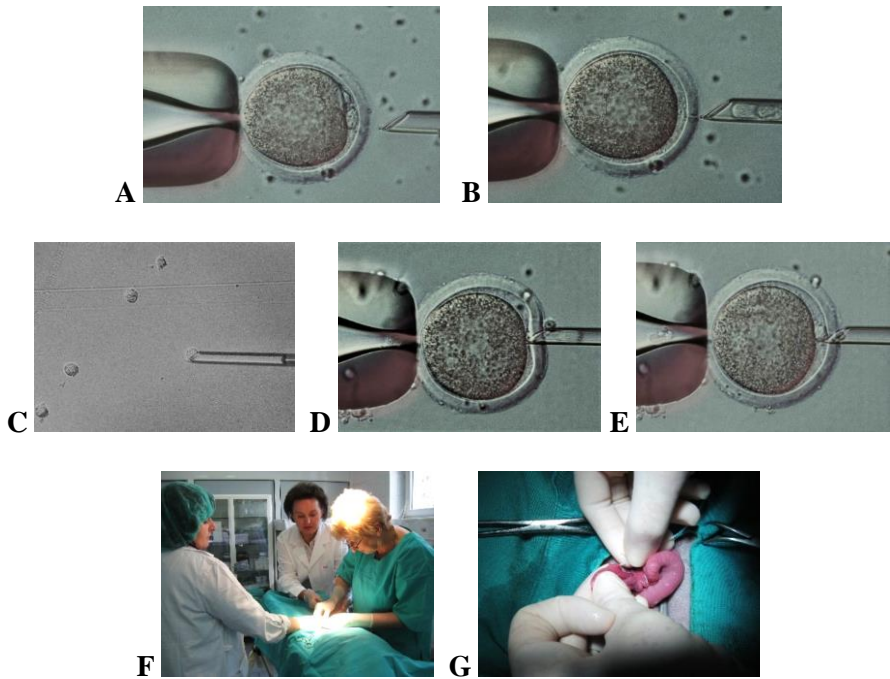
Badania prowadzone w latach 2003–2020 w Laboratorium Klonowania Ssaków Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji (ZBRiK) były ukierunkowane na wykorzystanie nowoczesnych narzędzi biotechnologii reprodukcyjnej oraz genomowej inżynierii embrionalnej do uzyskiwania i powielania (multiplikacji) monogenetycznych zarodków, płodów i/lub potomstwa wybranych gatunków ssaków, takich jak: świnia, koza, królik, koń i kot domowy. Jednym z najbardziej spektakularnych dokonań zespołu badawczego było opracowanie nowatorskiej metody chimerowego klonowania somatycznego królików, w której pojedynczy blastomer zarodka 2-komórkowego wykorzystano jako biorcę dla jądra transgenicznego fibroblastu tkanki skórnej. Uzyskane dwa transgeniczne króliki NT20 (ryc. 4) i NT7 (wykazujące ekspresję genu kodującego ludzki hormon wzrostu – hGH, ukierunkowaną na komórki gruczołów mlekowych) były pierwszymi ssakami na świecie otrzymanymi przy zastosowaniu tej oryginalnej strategii klonowania chimerowego. Osiągnięcie to zostało uznane za jedno z 10 największych osiągnięć polskiej nauki w rankingu tygodnika „Newsweek” w 2003 r. oraz zostało wymienione przez dziennik „Rzeczpospolita” wśród 14 liczących się w skali światowej osiągnięć polskiej nauki w 2003 r. Wyniki tych eksperymentów zostały opublikowane w *Biology of Reproduction*, renomowanym czasopiśmie naukowym o wysokim współczynniku IF (Skrzysowska i in., 2006).



Ryc. 4. Transgeniczny królik NT20, produkujący w mleku hormon wzrostu człowieka, uzyskany innowacyjną techniką chimerowego klonowania somatycznego, opracowaną w ZBRiK IZ PIB

Spośród innych znaczących w skali krajowej dokonań na uwagę zasługuje również fakt narodzin pierwszych w Polsce kóz klonalnych (maciorki

i koziołka), uzyskanych metodą transplantacji jąder komórek fibroblastycznych tkanki skórno-powłokowej dorosłych osobników do enukleowanych oocytów (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*) (ryc. 5).

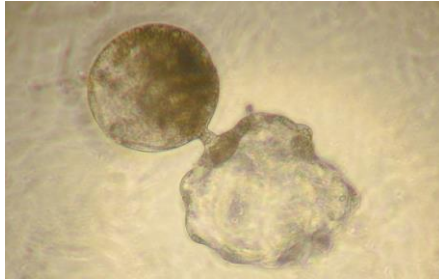


Ryc. 5. Procedura klonowania somatycznego kozia. A) Dojrzały *in vitro* oocyt kozia (w stadium metafazy II) przed zabiegiem enukleacji; B) E nukleacja oocytu metodą mikrochirurgiczną wspomaganą chemicznie. Usuwanie z oocytu ciała kierunkowego I rzędu oraz „stożka” ooplazmatycznego, zawierającego chromosomy metafazowe; C) Selekcja fibroblasto-podobnej komórki-dawcy jądra; D) Rekonstrukcja enukleowanego oocytu kozia. Iniekcja komórki somatycznej do przestrzeni okołozółtkowej wyjądrzonego oocytu; E) Kompleks ooplast-komórka somatyczna przed zabiegiem elektrofuzji; F-G) Chirurgiczny zabieg transferu zarodków klonalnych do jajowodu maciorki-biorczyni

Jest to drugi przypadek uzyskania w Polsce ssaków klonalnych, uwzględniając również urodzonego w wyniku realizacji własnych prac badawczych, po raz pierwszy w naszym kraju i na świecie transgenicznego królika, wyprodukowanego przy wykorzystaniu nowatorskiej techniki chimerowego klonowania somatycznego (Skrzyszowska i in., 2006). Ciąża bliźniacza, którą uzyskano po wprowadzeniu do jajowodu hormonalnie zsynchronizowanej samicy-biorczyni kozich zarodków zrekonstruowanych z jąder hodowanych *in vitro* komórek fibroblastycznych, pochodzących z dwóch różnych linii komórkowych,

zakończyła się urodzeniem różnopłciowego potomstwa klonalnego (maciorki i koziołka) (Skrzyszowska i Samiec, 2006 a).

Na podkreślenie zasługują badania nad klonowaniem somatycznym ssaków z rodziny kotowatych (*Felidae*), które skutkowały uzyskaniem pierwszych na świecie klonalnych blastocyst kota domowego, rozwijających się z zarodków zrekonstruowanych z jąder płodowych komórek fibroblastycznych lub z jąder komórek wzgórka jajonośnego otaczających dojrzałe *in vitro* oocyty kocie (ryc. 6). Wyniki tych prac zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Theriogenology* (Skrzyszowska i in., 2002).



Ryc. 6. Wylęgająca się blastocysta klonalna kota domowego, uzyskana w wyniku hodowli *in vitro* zarodka zrekonstruowanego z jądra komórki ziarnistej wzgórka jajonośnego

Godny uwagi pozostaje również nurt badań ukierunkowanych na uzyskanie pierwszych w Polsce klonalnych blastocyst bydłęcych oraz zaawansowanych w rozwoju płodów bydłęcych po domacicznym transferze zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblasto-podobnych komórek mięśnia najdłuższego grzbietu (*Musculus longissimus dorsi*) oraz zarodków zrekonstruowanych z jąder komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego, otaczających dojrzałe *in vitro* oocyty krów lub jałówek (Skrzyszowska i in., 2000) (ryc. 7).



Ryc. 7. Wylęgająca się blastocysta klonalna krowy, uzyskana w wyniku hodowli *in vitro* zarodka zrekonstruowanego z jądra komórki ziarnistej wzgórka jajonośnego

Wśród istotnych dokonań zespołu badawczego należy wymienić uzyskanie w warunkach całkowicie pozaustrojowych pierwszych w Polsce blastocyst klonalnych konia domowego, rozwijających się z zarodków zrekonstruowanych techniką klonowania somatycznego z jąder komórek fibroblastycznych, wyizolowanych z tkanki skórno-powłokowej (Skrzyszowska, Samiec i in., 2009).

Innym przełomowym w skali krajowej dokonaniem było wyprodukowanie na drodze klonowania somatycznego pierwszych w Polsce klonalnych blastocyst świni, otrzymanych w następstwie rozwoju *ex vivo* sztucznie aktywowanych oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek wzgórka jajonośnego otaczających dojrzałe *in vitro* oocyty loch lub loszek (Samiec i in., 2003). Do ważnych osiągnięć należy także zaliczyć opracowanie nowatorskiej metody pseudofizjologicznej/biologicznej aktywacji transkomplementarnej (transcytoplazmatycznej) cybryd klonalnych świni. Przy zastosowaniu tej metody stymulowano zarodkowy program rozwojowy oocytów świni zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych lub fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników na drodze elektrofuzji z cytoplasmami wyizolowanymi z zygot królika (tzw. zygoplastami). Metoda ta skutkowałą zwiększeniem potencjału rozwojowego *in vitro* oraz jakości zarodków klonalnych świni. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Polish Journal of Veterinary Sciences* (Samiec i in., 2012) oraz *Reproductive Biology* (Samiec i Skrzyszowska, 2014). Opracowany przez zespół badawczy inny sposób biologicznej aktywacji zrekonstruowanych oocytów – poprzez docytoplazmatyczną mikroiniekcję ekstraktów cytozolowo-nukleoplazmatycznych zygot, stosowany w klonowaniu somatycznym ssaków, w tym świni, jest przedmiotem patentu udzielonego w latach 2014/2015 na rzecz Instytutu Zootechniki PIB przez Urząd Patentowy RP.

W badaniach prowadzonych w latach 2009–2012 w ramach realizacji autorskiego projektu finansowanego przez NCN po raz pierwszy w klonowaniu ssaków (w tym świni) zastosowano nowe metody nieinwazyjnej (nisko inwazyjnej) analizy fluorocytochemicznej do oceny kondycji strukturalno-funkcjonalnej (jakości biochemicznej i biofizycznej) zarodków klonalnych w stadium blastocysty. Jakość biochemiczna i biofizyczna przedimplantacyjnych zarodków w stadium blastocysty była oceniana przyżyciowo metodą fluorescencyjnego wykrywania zmian proapoptotycznych, które zachodziły w błonie plazmatycznej komórek wężła zarodkowego i/lub trofoblastu. Przyżyciowa diagnostyka symptomów towarzyszących wczesnym i późnym fazom śmierci apoptotycznej komórek przeprowadzana była przy wykorzystaniu koniugatu aneksyny V-eGFP lub barwnika YO-PRO-1. Oba markery są zdolne do niespecyficznego znakowania, zarówno apoptotycznych komórek wężła zarodkowego, jak i komórek trofoektodermy blastocyst klonalnych. Pierwszy z wyżej wymienionych markerów pozwala na oznaczanie symptomów towa-

rzyszających wczesnym fazom apoptozy, takich jak: 1) eksternalizacja reszt fosfatydyloseryny (PS) na powierzchni zewnętrznej błony plazmatycznej i 2) utrata asymetrii składu aminofosfolipidowego w dwuwarstwie lipidowej błony. Z kolei, drugi z markerów umożliwia wykrywanie symptomów towarzyszących późnym fazom apoptozy, takich jak powstawanie tzw. dziur lipidowych w plazmolemme i błonach mitochondrialnych. Niski stopień inwazyjności przyżyciowych metod analizy fluorycytochemicznej komórek blastocyst klonalnych zwiększa ich wartość aplikacyjną w ocenie jakości morfologicznej, biochemicznej i biofizycznej zarodków na etapie rozwoju przedimplantacyjnego. Perspektywą racjonalnego wykorzystania tego kierunku badań jest poprawa efektywności uzyskiwania zarodków świni metodami klonowania somatycznego poprzez zwiększenie zarówno jakości, jak i kompetencji rozwojowych *in vitro* zarodków klonalnych (Samiec i Skrzyszowska, 2015).

W rezultacie innowacyjnych prac naukowo-badawczych z zakresu klonowania somatycznego świń opracowano także oryginalną metodę sekwencyjnej aktywacji fizykochemicznej rekonstruowanych oocytów z użyciem impulsów elektrycznych oraz jonomycyny wapnia i kombinacji specyficznych i niespecyficznych inhibitorów kinaz cyklicznych (R-roskowityny i 6-dimetyloaminopuryny) z blokerem syntezy białek (cykloheksimidem). Wyniki tych eksperymentów, w których R-roskowityna została po raz pierwszy wykorzystana w klonowaniu somatycznym ssaków do sztucznej aktywacji cybryd klonalnych świń, zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Theriogenology* (Samiec i Skrzyszowska, 2012 a). W ramach tych badań do zabiegów rekonstrukcji enukleowanych oocytów świń wyselekcjonowano jako dawców jąder nieapoptotyczne/nienekrotyczne komórki fibroblastyczne, których jakość była oceniana w oparciu o wspomniane wcześniej metody przyżyciowe. Warto podkreślić, że w latach 2003–2015 prowadzono zakrojone na szeroką skalę badania nad opracowaniem efektywnych metod sztucznej aktywacji oocytów świń zrekonstruowanych technikami klonowania, jak również nad zastosowaniem różnych metod rekonstrukcji enukleowanych oocytów oraz wykorzystaniem różnych rodzajów komórek somatycznych do uzyskiwania klonalnych zarodków świń. Efektem tych badań było opublikowanie wielu artykułów i monografii naukowych (Samiec i in., 2003, 2013 a,b; Samiec i Skrzyszowska, 2005 a, 2009, 2010 a,b, 2013, 2015; Skrzyszowska, Samiec i in., 2008).

Prace nad klonowaniem somatycznym transgenicznych świń zaowocowały uzyskaniem pierwszych w Polsce homozygotycznych i heterozygotycznych, mono- i politransgenicznych blastocyst oraz płodów klonalnych ze zhumanizowanym układem immunologicznym. Rozwijające się transgeniczne zarodki i płody klonalne wykazywały ekspresję genów rekombinowanej  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazy człowieka ( $\alpha$ -1,2-FT) oraz  $\alpha$ -galaktozydazy człowieka ( $\alpha$ -Gal). Ponadto, przejawiały one ekspresję genów kodujących an-

tygen głównego układu zgodności tkankowej człowieka (HLA-E) lub kluczowe białka immunomodulatorowe (immunosupresory) enzymatycznej kaskady ludzkiego układu dopełniacza, które są przedstawicielami obecnych w błonach komórkowych inhibitorów cytotoxyczości zależnej od komplementu, charakteryzującymi się ściśle określonymi tzw. kompleksami różnicowania (CD; ang. *cluster of differentiation*). Do tych immunosupresorów należą: czynnik przyspieszający rozkład konwertaz C3 i C5 (CD55/DAF; ang. *cluster of differentiation 55/decay-accelerating factor*) oraz protektyna, określana również mianem błonowego inhibitora reaktywnej lizy komórkowej lub czynnika restrykcji homologicznej o masie molekularnej 20 kDa (CD59/MIRL/HRF20; ang. *cluster of differentiation 59/membrane inhibitor of reactive lysis/homologous restriction factor-20 kDa*). Wymienione wyżej prace z zakresu klonowania somatycznego i transgenezy świń stanowią zatem dobrą podstawę dla generowania transformowanego genetycznie potomstwa klonalnego z obniżoną międzygatunkową barierą immunologiczną w układzie heterologicznym świnia-człowiek (Samiec, 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2006; Skrzyszowska i Samiec, 2006 b,c; Skrzyszowska i in., 2013).

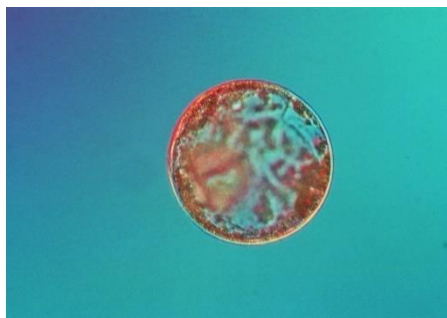
Oryginalnym rezultatem prowadzonych badań było wykorzystanie po raz pierwszy w świecie wysoko efektywnej metody nukleofekcji do transgenizacji *in vitro* komórek somatycznych-dawców jąder w celu uzyskiwania transgenicznych zarodków klonalnych świni, wykazujących 100% ekspresję transgenu białka reporterowego eGFP (ang. *enhanced green fluorescent protein*). Wyniki tych eksperymentów zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Theriogenology* (Skrzyszowska, Samiec i in., 2008).

Innym kierunkiem podejmowanych badań było określenie wpływu indukowalnych modulacji epigenetycznych komórek-dawców jąder, dojrzewających *in vitro* oocytów-biorców jąder oraz oocytów zrekonstruowanych z jąder komórek somatycznych na przed- i/lub poimplantacyjne zdolności rozwojowe klonalnych zarodków świni i kozy. Do wyżej wymienionych transformacji epigenomowych wykorzystywane zostały egzogenne inhibitory deacetylaz histonowych starej generacji (trichostatyna A) oraz nowej generacji (skryptaid lub kwas walproinowy). Wyniki tych prac zostały opublikowane m.in. na łamach takich czasopism, jak: *Animal Science Papers and Reports* (Samiec i Skrzyszowska, 2012 b) oraz *Annals of Animal Science* (Skrzyszowska i Samiec, 2020).

Zastosowanie indukowalnych modulacji epigenetycznych mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (BM-MSCs), które stanowiły źródło komórek-dawców jąder w klonowaniu somatycznym świń, było kolejnym nowatorskim rozwiązaniem zastosowanym w embriologii eksperymentalnej i genomowej inżynierii embrionalnej zwierząt gospodarskich. Rozwiązanie to było oparte na wykorzystaniu niespecyficznego inhibitora deacetylaz białek histonowych chromatyny jądrowej, jakim jest trichostatyna A (TSA), do transformacji epigenomowej komórek BM-MSCs oraz użyciu ich



do rekonstrukcji oocytów w klonowaniu świń. Skutkiem tego innowacyjnego przedsięwzięcia było znaczące zwiększenie pozaustrojowych zdolności rozwojowych zarodków klonalnych do osiągnięcia stadium blastocysty (ryc. 8), jak również poprawa ich jakości cytologicznej (mierzonej liczbą komórek w blastocystach) oraz jakości molekularnej (mierzonej stopniem ekspresji genów pluripotencji). Efektem końcowym badań była oryginalna publikacja naukowa w renomowanym czasopiśmie *BioMed Research International* (Samiec, Opiela i in., 2015).



Ryc. 8. Ekspandująca blastocysta klonalna świni, uzyskana w wyniku hodowli *in vitro* zarodka zrekonstruowanego z jądra komórki BM-MSC, poddanej TSA-zależnej modulacji epigenetycznej

Z kolei, inne prace badawcze skupiały się na wykorzystaniu modulowanych epigenetycznie i analizowanych w kierunku apoptozy komórek BM-MSCs jako dawców jąder w procedurze uzyskiwania zarodków świni techniką klonowania somatycznego. Wykazano, że zastosowana za pośrednictwem TSA modulacja epigenetyczna nie miała wpływu na inicjację i progresję procesów apoptozy w analizowanych populacjach komórek BM-MSCs. W kontekście tych prac, transformowane epigenetycznie komórki BM-MSCs, które użyto do efektywnej produkcji *in vitro* klonalnych zarodków świni, zostały poddane kompleksowej ocenie jakości cytologicznej i molekularnej, w tym ewaluacji poziomu pluripotencji oraz cech sprzyjających „molekularnemu odmłodzeniu”, czy też właściwości przeciwdziałających „molekularnemu starzeniu się” komórek. Efekty tych badań zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Animal Science Journal* (Samiec i in., 2019).

W podsumowaniu można stwierdzić, że wyniki wszystkich wyżej opisanych badań z zakresu biotechnologii rozrodu świń i kóz oraz genomowej inżynierii zarodkowej tych gatunków zwierząt gospodarskich, ze względu na wysoki potencjał aplikacyjny w rolnictwie i w dziedzinach badań interdyscyplinarnych przyczyniają się lub mogą w niedalekiej przyszłości przyczynić się



do: 1) poprawy wskaźników wartości hodowlanej i użytkowej zwierząt gospodarskich, w tym zwiększenia ich wydajności mlecznej, mięsnej i rozplodowej; jak również 2) uzyskiwania i powielania transgenicznych zwierząt klonalnych na potrzeby przemysłu biofarmaceutycznego oraz medycyny transplantacyjnej i regeneracyjnej tkanek i organów człowieka, a także przedklinicznych i klinicznych testów w terapiach genetycznie uwarunkowanych lub nabytych chorób człowieka.

### **Opracowanie innowacyjnych technologii wspomaganego rozrodu kóz i świń w oparciu o międzygatunkowe klonowanie somatyczne w układzie: koza→bydło, koza→świnia oraz świnia→bydło dla potrzeb tworzenia rezerw genetycznych kóz oraz świń**

Celem prac naukowo-badawczych prowadzonych w latach 2015–2017 było opracowanie metod międzygatunkowego klonowania somatycznego kóz w układzie międzyrodzajowym i wewnątrzrodzinowym: koza→bydło oraz w układzie międzyrodzajowym i międzyrodzinowym: koza→świnia. Koza, ze względu na stosunkowo wysoką wydajność mleczną, jest szczególnie atrakcyjnym obiektem do badań z zakresu transgenezy gruczołu mlekowego i uzyskiwania biofarmaceutyków (biopreparatów hormonalnych i enzymatycznych) wykorzystywanych w terapiach chorób genetycznych człowieka (Skrzyszowska i Samiec, 2006 a; Samiec i Skrzyszowska, 2011 a). W Polsce obserwujemy w ostatnich latach gwałtowny spadek pogłowia kóz, który spowodował znaczne utrudnienia w dostępności do materiału biologicznego od tego gatunku zwierząt, a tym samym utrudnienia w prowadzeniu prac badawczych z zakresu embriologii eksperymentalnej i stosowanej. Ograniczony popyt konsumencki skutkuje brakiem obrotu mięsem kozim na rynku rolno-spożywczym i towarowym, a także wynikającym z tego brakiem możliwości uzyskiwania jajników z materiału rzeźnego na potrzeby badań podstawowych oraz prac eksperymentalnych i wdrożeniowych. Wyjściem z tej sytuacji jest rozwiązanie polegające na wykorzystaniu łatwo dostępnych źródeł oocytów pochodzących z materiału rzeźnego (jajników) innych gatunków zwierząt, takich jak: bydło i świnie oraz użycie ich w klonowaniu międzygatunkowym kóz. W takim wariantcie klonowania dawcą materiału genetycznego są linie komórkowe wyprowadzone z próbek tkankowych nowonarodzonych lub młodocianych osobników kozy. W dotychczasowych badaniach z zakresu klonowania kóz, opartego na układzie wewnątrzgatunkowym (homologicznym) koza→koza, niezbędne było zabezpieczenie (zakup i utrzymanie) odpowiedniej stawki zwierząt, zarówno dawców komórek somatycznych, jak i przede wszystkim dawczyń oocytów. Względy ekonomiczne, jak i wyraźne tendencje spadkowe w hodowli kóz sprawiają, że atrakcyjności nabiera wariant międzygatunkowego klonowania w układzie międzyrodzajowym – zarówno wewnątrzrodzinowym (koza→bydło), jak i międzyrodzinowym (koza→świnia).

Źródłem komórek-dawców jąder w międzygatunkowym klonowaniu kóz były komórki fibroblasto-podobne, wyizolowane z krwi obwodowej kóz. Z kolei, źródłem komórek-biorców jąder były dojrzałe *in vitro* oocyty bydła oraz oocyty świń. Z przeprowadzonych badań własnych wynika, że wykorzystanie jako dawców jąder modulowanych epigenetycznie komórek fibroblasto-podobnych krwi obwodowej dorosłych osobników kozy skutkowało wzrostem kompetencji rozwojowych *in vitro*, ale także podwyższeniem jakości cytologicznej wewnątrzgatunkowych (kozich) zarodków klonalnych. Dlatego też, w realizacji prac badawczych z zakresu międzygatunkowego klonowania w układzie: koza→świnia do rekonstrukcji oocytów świni wykorzystano komórki fibroblasto-podobne krwi obwodowej kozy, modulowane epigenetycznie przy użyciu niespecyficznego inhibitora deacetylaz histonowych, jakim jest skryptaid.

Stwierdzono nieznacznie niższy potencjał rozwojowy międzygatunkowych (kozio-bydlęcych) zarodków klonalnych w porównaniu do potencjału wewnątrzgatunkowych (kozich) zarodków klonalnych. Natomiast, potencjał rozwojowy kozio-świńskich zarodków klonalnych okazał się być niższy, nie tylko w odniesieniu do niehybrydowych zarodków klonalnych świni, lecz także w odniesieniu do hybrydowych (kozio-bydlęcych) zarodków klonalnych. Niższe zdolności kozio-świńskich zarodków klonalnych w stosunku do kozio-bydlęcych wydają się być skutkiem bardziej odległego pokrewieństwa filogenetycznego między osobnikami-dawcami komórek somatycznych a osobnikami-dawcami oocytów, czyli skutkiem dalszych relacji taksonomicznych w układzie heterologicznym: koza domowa (*Capra aegagrus hircus*) → świnia domowa (*Sus scrofa domestica*) w porównaniu do układu: koza domowa (*Capra aegagrus hircus*) → bydlę domowe (*Bos primigenius taurus*). Mimo większego dystansu filogenetycznego w układzie koza domowa→świnia domowa, wykorzystanie modulowanych epigenetycznie komórek fibroblasto-podobnych kozy jako dawców jąder umożliwiło pokonanie restrykcyjnej bariery międzygatunkowej, czyli przekroczenie swoistego punktu kontrolnego, jakim jest blok rozwojowy w późnym stadium 4-blastomerowych zarodków klonalnych, zrekonstruowanych z ooplastów świni. Na tym etapie embriogenezy świni ma bowiem miejsce aktywacja transkrypcyjna genomu zarodkowego, czyli przejście z matczynej do zarodkowej kontroli ekspresji genów. Wydaje się, że wykorzystanie modulowanych epigenetycznie komórek somatycznych jako dawców jąder w klonowaniu międzygatunkowym sprzyjało ich przeprogramowaniu, zarówno w środowisku obcogatunkowej cytoplazmy enukleowanych oocytów świni, jak też następnie w cytoplazmie blastomerów dzielących się hybrydowych (kozio-świńskich) zarodków klonalnych. Konsekwencją prawidłowego przeprogramowania pamięci epigenetycznej jąder transformowanych epigenomowo komórek somatycznych kozy był rozwój zrekonstruowanych kozio-świńskich zarodków klonalnych do stadium blastocysty, a także inicjacja i progresja procesów ekspansji

komórek pierścienia trofoblastycznego oraz wylęgania się blastocyst z osłonek przejrzystych (Samiec i in., 2018; Skrzyszowska i Samiec, 2018).

Fakt, że zależna od trichostatyny A (TSA) transformacja epigenetyczna szpicopochodnych mezenchymalnych komórek macierzystych (BM-MSK) świni skutkowałą zwiększeniem kompetencji rozwojowych *in vitro* oraz podwyższeniem jakości cytologicznej i molekularnej zarodków klonalnych świni, wykorzystano w wariacie klonowania międzygatunkowego świń, w układzie międzyrodzajowym i międzyrodzinowym: świnia→bydło. Kompetencje rozwojowe zarodków zrekonstruowanych z jąder modulowanych epigenetycznie komórek macierzystych były wyższe niż zrekonstruowanych z jąder niemodulowanych komórek macierzystych. Generalnie jednak, potencjał rozwojowy hybrydowych zarodków świńsko-bydłęcych był niższy w porównaniu do potencjału zarodków klonalnych uzyskanych w wyniku klonowania wewnątrzgatunkowego. Dystans filogenetyczny w układzie międzyrodzajowym (świniowate: *Suidae* → krętorogie: *Bovidae*) i międzyrodzajowym (*Sus*→*Bos*) okazał się być stosunkowo duży. Jednakże, wykorzystanie modulowanych epigenetycznie komórek BM-MSK świni-dawców jąder pozwoliło pokonać restrykcyjną barierę międzygatunkową w postaci bloku rozwojowego występującego w stadiach 8–16-komórkowego zarodka, kiedy w embriogenezie bydła dochodzi do aktywacji transkrypcyjnej genomu zarodkowego. Konsekwencją prawidłowego przeprogramowania pamięci epigenetycznej jąder transformowanych epigenomowo komórek BM-MSK świni w ooplazmie bydłęcej i w środowisku cytoplazmatycznym blastomerów był rozwój *in vitro* świńsko-bydłęcych zarodków klonalnych do stadiów ekspandującej lub wylęgającej się blastocysty. Do aktywacji programu rozwojowego zrekonstruowanych oocytów świńsko-bydłęcych wykorzystano oryginalną strategię w oparciu o sekwencyjne zastosowanie bodźców fizykochemicznych, w pierwszym etapie – impulsów prądu stałego (indukowanie fuzji), a w kolejnym – w ramach opóźnionej aktywacji chemicznej *de novo* zastosowano antybiotyk jonoforowy (jonomycynę wapnia), a następnie mieszaninę niespecyficznego inhibitora aktywności kinaz cyklozależnych (6-dimetyloaminopuryny) oraz odwracalnego blokera syntezy białek (cykloheksimidu). Efektem końcowym tych prac badawczych była oryginalna publikacja naukowa w czasopiśmie *Theriogenology* (Opiela, Samiec i in., 2017).

Badania z zakresu uzyskiwania międzygatunkowych zarodków klonalnych, zarówno w układzie heterologicznym: koza→świnia oraz świnia→bydło, jak i wewnątrzrodzajowego klonowania międzyrodzajowego w układzie: koza→bydło, nie były dotąd prowadzone i stanowią nowy kierunek badawczy w embriologii eksperymentalnej ssaków i w biotechnologii wspomaganego rozrodu zwierząt gospodarskich. Według naszej wiedzy, krwiopochodne komórki fibroblasto-podobne kozy, podlegające skryptaido-zależnej modulacji epigenetycznej, a także komórki BM-MSK świni, podlegające TSA-zależnej modulacji epigenetycznej zostały wykorzystane po raz

pierwszy jako źródło dawców jąder w międzygatunkowym klonowaniu somatycznym ssaków, w tym zwierząt gospodarskich.

Proponowany kierunek badań może przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat czynników warunkujących interakcje jądrowo-cytoplazmatyczne w międzygatunkowych cybrydach klonalnych zrekonstruowanych z ooplastów i jąder komórek somatycznych dwóch różnych gatunków ssaków. Ponadto, może on ułatwić rozpoznanie czynników i zrozumienie mechanizmów warunkujących epigenetyczne przeprogramowanie jąder komórek somatycznych w ksenogenicznym/heterologicznym środowisku cytoplazmatycznym zarówno oocytów-biorców, jak i w środowisku cytoplazmatycznym potomnych blastomerów w rozwijających się hybrydowych zarodkach klonalnych ssaków, w tym zwierząt gospodarskich (Samiec, 2005 a,b; Samiec i Skrzyszowska, 2005 b, 2018 a,b).

W podsumowaniu można stwierdzić, że realizowany kierunek badań z wykorzystaniem obcogatunkowych oocytów może przybliżyć perspektywę osiągnięcia satysfakcjonującej wydajności technologii klonowania kóz i świń. Jest to warunek niezbędny dla praktycznego wykorzystania tej metody do użytkowania transgenicznych zwierząt na potrzeby przemysłu biofarmaceutycznego. Ponadto, wyniki przeprowadzonych prac badawczych, ze względu na duże znaczenie dla rozwoju rolnictwa i gospodarki, mogą przyczynić się do ochrony zasobów genetycznych i tworzenia rezerw genetycznych zagrożonych wyginięciem endemicznych ras kóz i świń oraz restytucji populacji ginących ras w celu zachowania bioróżnorodności.

### **Międzyrasowe klonowanie wewnątrzgatunkowe jako innowacyjne narzędzie wykorzystywane w celach ochrony genetycznych zasobów zagrożonych wyginięciem wybranych ras zwierząt gospodarskich**

Do ratowania i restytucji ginących ras i gatunków zwierząt gospodarskich wykorzystywane są nowoczesne technologie wspomaganego rozrodu zwierząt (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*), w tym genomowej inżynierii embrionalnej. Jedną z nich jest wewnątrzgatunkowe klonowanie międzyrasowe ssaków. Strategiczne i innowacyjne narzędzie biotechnologii reprodukcyjnej ssaków, jakim jest międzyrasowe klonowanie somatyczne, może być jedynym narzędziem reintrodukcji ginących ras zwierząt użytkowych dzięki możliwości wykorzystania obcorasowych oocytów pochodzących od osobników powszechnie bytujących ras do rekonstrukcji zarodków z jąder komórek somatycznych zwierząt ras zagrożonych wyginięciem. Ponadto, ten kierunek badań może przyczynić się do poszerzenia wiedzy podnoszącej pozycję polskiego sektora badawczo-rozwojowego w zakresie genomowej inżynierii embrionalnej.

Celem prac badawczo-rozwojowych, prowadzonych w latach 2016–2019 w ramach finansowanego przez NCBR projektu BIOSTRATEG2, było

utworzenie genetycznych rezerw w postaci kriogenicznie zabezpieczonych linii komórek somatycznych wybranych ras zachowawczych bydła i świń (bydło polskie czerwone, świnia puławska, świnia złotnicka pstra) i wykorzystanie ich do uzyskiwania zarodków klonalnych na drodze klonowania somatycznego dla potrzeb realizacji programów zachowania bioróżnorodności w subpopulacjach zagrożonych wyginięciem i rzadkich rodzimych ras zwierząt hodowlanych (ryc. 9). Wśród głównych założeń przeprowadzonych w ramach projektu badań należy wymienić: 1) Kriogeniczne zabezpieczenie bioptatów tkanki skórno-powłokowej, pochodzących od wybranych gatunków i ras zachowawczych zwierząt gospodarskich; 2) Wyprowadzenie, kriokonserwację i charakterystykę cyto-genetyczną (kariotypowanie) linii komórek fibroblastycznych, pochodzących z bioptatów tkanki skórno-powłokowej wybranych gatunków i ras zachowawczych zwierząt gospodarskich; 3) Weryfikację potencjału rozwojowego *in vitro* zarodków uzyskanych techniką klonowania somatycznego z jąder kriokonserwowanych i kariotypowanych komórek fibroblastycznych, pochodzących od wskazanych gatunków i ras zachowawczych zwierząt gospodarskich.



Ryc. 9. Laboratorium klonowania ssaków – prof. dr hab. Maria Skrzyszowska i dr hab. Marcin Samiec, prof. IZ PIB w trakcie przeprowadzania zabiegów klonowania somatycznego zwierząt gospodarskich

Wymiernym efektem zrealizowanego kierunku badań jest poszerzenie możliwości ochrony zasobów genetycznych endemicznych ras bydła i świń przy wykorzystaniu nowoczesnych technologii wspomaganego rozrodu zwierząt gospodarskich. Technologie te są oparte na użyciu metod genetycznej/genomowej inżynierii embrionalnej dla potrzeb uzyskiwania i powielania zarodków bydła polskiego czerwonego oraz świń rasy puławskiej i złotnickiej pstrej

na drodze wewnątrzgatunkowego klonowania międzyrasowego. W celu zachowania bioróżnorodności oraz zwiększenia stopnia międzyosobniczej zmienności genetycznej w rzadkich subpopulacjach bydła i świń – wprowadzone i kriogenicznie zabezpieczone w banku materiałów biologicznych linie komórek fibroblastycznych zostały wykorzystane jako źródło dawców jąder w zabiegach rekonstrukcji oocytów i multiplikacji zarodków bydła polskiego czerwonego, świni puławskiej i złotnickiej pstrej za pomocą międzyrasowego klonowania somatycznego. To strategiczne przedsięwzięcie może stanowić w przyszłości podstawowy instrument w programach tworzenia rezerw genetycznych, których potencjał aplikacyjny tkwi w możliwości uzyskiwania międzyrasowych zarodków klonalnych w kontekście ich późniejszego wykorzystania w programach restytucji stad zarodowych zagrożonych wyginięciem ras bydła, świń oraz innych gatunków zwierząt hodowlanych.

Konsekwencją realizacji niniejszych prac naukowo-badawczych było:

1) Utworzenie rezerw genetycznych z eksplantów tkankowych i linii komórkowych zagrożonych wyginięciem lub rzadkich lokalnych ras bydła i świń; 2) Ocena aktywności proliferacyjnej oraz charakterystyka cytogenetyczna (kariotypowanie) linii komórkowych wyprowadzonych z biopłatów tkankowych wybranych ras zachowawczych (bydło polskie czerwone, świnia puławska oraz świnia złotnicka pstra) oraz 3) Uzyskanie i ocena kompetencji rozwojowych *in vitro* klonalnych zarodków pochodzących z kriogenicznie zabezpieczonych i kariotypowanych linii komórek fibroblastycznych bydła polskiego czerwonego, świni puławskiej oraz świni złotnickiej pstrej (Samiec, Skrzyszowska i in., 2020).

Na podkreślenie zasługuje fakt, że techniki wewnątrz- lub międzyrasowego klonowania somatycznego mogą być atrakcyjnym narzędziem w badaniach podstawowych ukierunkowanych na identyfikację czynników warunkujących interakcje między genomem jądrowym komórki somatycznej a częściami mitochondrialnego DNA komórki-dawcy jądra oraz oocytu-biorcy jądra, jak również pełniejsze poznanie molekularnych mechanizmów determinujących epigenetyczne przeprogramowanie genomu jądrowego komórki somatycznej w cytoplazmie oocytu-biorcy, a następnie w cytoplazmie blastomerów rozwijających się zarodków klonalnych (Samiec, 2005 a,b; Samiec i Skrzyszowska, 2016, 2018 a,b). Ponadto, w efekcie szczegółowego poznania wyżej wymienionych czynników i mechanizmów, a w rezultacie zwiększenia wydajności, techniki klonowania somatycznego różnych gatunków zwierząt gospodarskich mogą stanowić idealne narzędzie wykorzystywane w praktyce hodowlanej, w szczególności dla potrzeb uzyskiwania oraz powielania nie-transgenicznych i transgenicznych osobników o wysokiej wartości genetycznej i użytkowej (Samiec, 2004; Samiec i Skrzyszowska, 2005 c, 2011 a,b; Skrzyszowska i Samiec, 2006 a,b,c, 2019).

Rezultaty przeprowadzonych prac naukowo-badawczych z zakresu opracowania nowych strategii, które służą zwiększaniu efektywności uzyskiwania i powielania identycznych genetycznie zarodków wybranych gatunków i ras zwierząt gospodarskich (bydło, świnie) metodami biotechnologii rozrodu oraz genomowej inżynierii zarodkowej (międzyrasowego klonowania somatycznego), ze względu na duże znaczenie dla rozwoju nauki i gospodarki oraz wysoki potencjał aplikacyjny w rolnictwie i w dziedzinach badań interdyscyplinarnych, prowadzą również do lub mogą w przyszłości przyczynić się do:

- 1) ochrony zasobów genetycznych i tworzenia rezerw genetycznych zagrożonych wyginięciem rodzimych ras zwierząt gospodarskich wybranych gatunków (bydło, świnie);
- 2) restytucji (odtworzenia) oraz multiplikacji subpopulacji ginących i rzadkich ras bydła polskiego czerwonego, świnii puławskiej i świnii złotnickiej pstrej w celu zachowania bioróżnorodności oraz podwyższenia stopnia wewnątrzpopulacyjnej i międzyosobniczej zmienności genetycznej;
- 3) przełożenia (translacji) wyników badań podstawowych na wdrożenia w dziedzinach nauk interdyscyplinarnych z zakresu tworzenia odzwierzęcych produktów biotechnologicznych (transgenicznych) dla przemysłu biofarmaceutycznego oraz medycyny transplantacyjnej i regeneracyjnej tkanek i organów człowieka, a także przedklinicznych i klinicznych testów w terapiach genetycznie uwarunkowanych lub nabytych chorób człowieka.

### Piśmiennictwo

- Opiela J., Samiec M., Romanek J. (2017). *In vitro* development and cytological quality of inter-species (porcine→bovine) cloned embryos are affected by trichostatin A-dependent epigenomic modulation of adult mesenchymal stem cells. *Theriogenology*, 97: 27–33.
- Samiec M. (2004). Development of pig cloning studies: past, present and future. *J. Anim. Feed Sci.*, 13 (2): 211–238.
- Samiec M. (2005 a). The role of mitochondrial genome (mtDNA) in somatic and embryo cloning of mammals. A review. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (2): 213–233.
- Samiec M. (2005 b). The effect of mitochondrial genome on architectural remodeling and epigenetic reprogramming of donor cell nuclei in mammalian nuclear transfer-derived embryos. *J. Anim. Feed Sci.*, 14 (3): 393–422.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2005 a). Microsurgical nuclear transfer by intraooplasmic karyoplast injection as an alternative embryo reconstruction method in somatic cloning of pigs and other mammal species; application value of the method and its technical advantages: a review. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (6): 235–242.

- Samiec M., Skrzyszowska M. (2005 b). Molecular conditions of the cell nucleus re-modelling/reprogramming process and nuclear-transferred embryo development in the intraooplasmic karyoplast injection technique: a review. *Czech J. Anim. Sci.*, 50 (5): 185–195.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2005 c). Perspektywy klonowania somatycznego dla uzyskiwania zwierząt transgenicznych (Advantages and perspectives of using somatic cloning for production of transgenic animals). *Med. Weter.*, 61 (1): 24–28.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2006). Znaczenie świnia dla klonowania somatycznego i transgenezy (The role of pig in somatic cell cloning and transgenesis). *Bio-technologie*, 1 (72): 53–67.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2009). Aktywacja oocytów w klonowaniu somatycznym świń i innych gatunków ssaków (Activation of oocytes in the somatic cell cloning of pigs and other mammalian species). Monografia naukowa. M. Samiec (red.). Ośrodek Wydawnictw Naukowych (Scientific Publishers OWN), Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań, 147 ss.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2010 a). Preimplantation developmental capability of cloned pig embryos derived from different types of nuclear donor somatic cells. *Ann. Anim. Sci.*, 10 (4): 385–398.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2010 b). The use of different methods of oocyte activation for generation of porcine fibroblast cell nuclear-transferred embryos. *Ann. Anim. Sci.*, 10 (4): 399–411.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011 a). Transgenic mammalian species, generated by somatic cell cloning, in biomedicine, biopharmaceutical industry and human nutrition/dietetics – recent achievements. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 317–328.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2011 b). The possibilities of practical application of transgenic mammalian species generated by somatic cell cloning in pharmacology, veterinary medicine and xenotransplantation. *Pol. J. Vet. Sci.*, 14 (2): 329–340.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2012 a). Roscovitine is a novel agent that can be used for the activation of porcine oocytes reconstructed with adult cutaneous or fetal fibroblast cell nuclei. *Theriogenology*, 78 (8): 1855–1867.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2012 b). High developmental capability of porcine cloned embryos following trichostatin A-dependent epigenomic transformation during *in vitro* maturation of oocytes pre-exposed to *R*-roscovitine. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 30 (4): 383–393.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2013). Assessment of *in vitro* developmental capacity of porcine nuclear-transferred embryos reconstituted with cumulus oophorus cells undergoing vital diagnostics for apoptosis detection. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (3): 513–529.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2014). Biological transcomplementary activation as a novel and effective strategy applied to the generation of porcine somatic cell cloned embryos. *Reprod. Biol.*, 14 (2): 128–139.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2015). Zastosowanie metod przyżyciowej analizy fluorycytochemicznej do wykrywania symptomów śmierci apoptotycznej



- w komórkach-dawkach jąder oraz w zarodkach świni uzyskiwanych technikami klonowania somatycznego (The use of the methods of *intra vitam* fluorochemical analysis for detection of apoptotic cell death in porcine nuclear donor cells and embryos generated by somatic cell cloning techniques). Monografia naukowa. M. Samiec (red.). Roczn. Nauk. Zoot. Monogr. Rozpr., 53. Wyd. Instytut Zootechniki PIB, Kraków, 110 ss.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2016). Epigenetyczne podłoże przemodelowania chromatyny jądrowej oraz przeprogramowania aktywności transkrypcyjnej genomu komórek somatycznych w ontogenetycznym rozwoju ssaków klonalnych (Epigenetic foundations of remodeling of nuclear chromatin and reprogramming of transcriptional activity for somatic cell-derived genome in the ontogenetic development of cloned mammals). Monografia naukowa. M. Samiec (red.). Wyd. IZ PIB, Kraków, 108 ss.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018 a). Intrinsic and extrinsic molecular determinants or modulators for epigenetic remodeling and reprogramming of somatic cell-derived genome in mammalian nuclear-transferred oocytes and resultant embryos. *Pol. J. Vet. Sci.*, 21 (1): 217–227.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2018 b). Can reprogramming of overall epigenetic memory and specific parental genomic imprinting memory within donor cell-inherited nuclear genome be a major hindrance for the somatic cell cloning of mammals? *Ann. Anim. Sci.*, 18 (3): 623–638.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Smorąg Z. (2003). Effect of activation treatments on the *in vitro* developmental potential of porcine nuclear transfer embryos. *Czech J. Anim. Sci.*, 48 (12): 499–507.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Lipiński D. (2012). Pseudophysiological transcomplementary activation of reconstructed oocytes as a highly efficient method used for producing nuclear-transferred pig embryos originating from transgenic foetal fibroblast cells. *Pol. J. Vet. Sci.*, 15 (3): 509–516.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Bochenek M. (2013 a). *In vitro* development of porcine nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells analysed cytometrically for apoptosis incidence and accuracy of cell cycle synchronization at the G0/G1 stages. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (4): 735–752.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Opiela J. (2013 b). Creation of cloned pig embryos using contact-inhibited or serum-starved fibroblast cells analysed *intra vitam* for apoptosis occurrence. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (2): 275–293.
- Samiec M., Opiela J., Lipiński D., Romanek J. (2015). Trichostatin A-mediated epigenetic transformation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells biases the *in vitro* developmental capability, quality, and pluripotency extent of porcine cloned embryos. *Biomed. Res. Int.*, 2015: 814686, 13 pp.
- Samiec M., Skrzyszowska M., Opiela J. (2018). Both close and far phylogenetic distance between epigenomically modulated nuclear donor cell and host ooplasm is not an obstacle for generation of inter-species nuclear-transferred (NT) blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.*, 53 (Suppl. 2): 192–192.
- Samiec M., Romanek J., Lipiński D., Opiela J. (2019). Expression of pluripotency-related genes is highly dependent on trichostatin A-assisted epigenomic modulation of porcine mesenchymal stem cells analysed for apoptosis and subsequently used for generating cloned embryos. *Anim. Sci. J.*, 90 (9): 1127–1141.

- Samiec M., Skrzyszowska M., Witarowski W. (2020). Ochrona cennych zasobów genetycznych oraz restytucja ginących ras i gatunków zwierząt gospodarskich – potencjalne kierunki zastosowania klonowania somatycznego ssaków w praktyce hodowlanej (Conservation of valuable genetic resources and restitution of endangered livestock breeds and species – potential targets of somatic cell cloning of mammals in livestock breeding practice). *Prz. Hod.*, 2: 1–4.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2006 a). Rozwój badań nad klonowaniem somatycznym kóz (Development of the studies on somatic cell cloning in goats). *Biotechnologia*, 1 (72): 133–150.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2006 b). Production of transgenic animals by somatic cell cloning – implications for biomedicine, pharmacy and agriculture. *Ann. Anim. Sci.*, 1 (Suppl.): 45–51.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2006 c). Wykorzystanie nowych kierunków badań w klonowaniu somatycznym świń (The use of new strategies in the studies on somatic cell cloning in pigs). *Biotechnologia*, 1 (72): 68–81.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2018). Inter-genus taxonomic incompatibility between nuclear donor cells and recipient ooplasts brings about differences in development of caprine-bovine cloned (C/B-CL) and bovine cloned (B-CL) embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, 53 (Suppl. 2): 198–198.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2019). Możliwości wykorzystania technik klonowania we wspomaganym rozrodzie bydła, technologii żywności, przemyśle biofarmaceutycznym, biomedycynie oraz restytucji ginących lub wymarłych ras i gatunków zwierząt (The possibilities of using cloning techniques in assisted reproduction of cattle, food technology, biopharmaceutical industry, biomedicine and restitution of endangered or extinct animal breeds and species). *Wiad. Zoot.*, 4 (304): 78–92.
- Skrzyszowska M., Samiec M. (2020). Enhancement of *in vitro* developmental outcome of cloned goat embryos after epigenetic modulation of somatic cell-inherited nuclear genome with trichostatin A. *Ann. Anim. Sci.*, 20 (1): 97–108.
- Skrzyszowska M., Smorąg Z. (1989). Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. *Theriogenology*, 32 (1): 115–122.
- Skrzyszowska M., Znaniecki R., Bychawski S., Smorąg Z. (1988). Przenoszenie dzielonych zarodków bydłecych (Transplantation of bisected cattle embryos). *Med. Weter.*, 44 (7): 412–414.
- Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L. (1997). Demi-embryo production from hatching of zona-drilled bovine and rabbit blastocysts. *Theriogenology*, 48 (4): 551–557.
- Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L., Bochenek M. (1999). Cattle twins after transfer of demi-embryos derived from zona-perforated blastocysts. *J. Anim. Feed Sci.*, 8 (2): 223–231.
- Skrzyszowska M., Shioya Y., Nagai T., Geshi M., Takenouchi N. (2000). Development of cloned bovine embryos from nuclei of cumulus cells and muscle cell origin. *Theriogenology*, 53 (1): 244–244.

- Skrzyszowska M., Kątska L., Ryńska B., Kania G., Smorąg Z., Pieńkowski M. (2002). *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology*, 58 (8): 1615–1621.
- 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., Pieńkowski M. (2006). Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning. *Biol. Reprod.*, 74 (6): 1114–1120.
- Skrzyszowska M., Samiec M., Słomski R., Lipiński D., Mały E. (2008). Development of porcine transgenic nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells transfected by the novel technique of nucleofection or standard lipofection. *Theriogenology*, 70 (2): 248–259.
- Skrzyszowska M., Samiec M., Młodawska W., Kochan J., Okólski A., Tuin E. van der, Smorąg Z. (2009). Development of equine cloned embryos derived from *in vitro*-matured oocytes receiving adult dermal fibroblast cell nuclei. *Reprod. Fertil. Dev.*, 21 (1): 125–126.
- Skrzyszowska M., Samiec M., Modliński J.A., Smorąg Z. (2013). Biotechnologiczne, molekularne i epigenetyczne aspekty klonowania somatycznego świń oraz jego znaczenie dla transgenezy. Rozdział II-3 w podręczniku: Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji. Wydanie II. Z. Smorąg, R. Słomski, L. Cierpka (red.). Ośrodek Wydawnictw Naukowych (Scientific Publishers OWN), Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (ICB PAN), Poznań, ss. 187–231.