

# 10. Biotechnologia zwierząt

## 163. Na czym polega procedura uzyskiwania zarodków zwierząt w warunkach laboratoryjnych – *in vitro*?

Kompleksowa procedura uzyskiwania zarodków zwierząt w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) obejmuje trzy główne etapy: 1) pozyskanie i przygotowanie gamet do zapłodnienia; oocyty pozyskane z pęcherzyków jajnikowych są w stadium profazy pierwszej mejozy (diktioten) i nie są gotowe do zapłodnienia, dlatego wymagają wstępnej inkubacji określanej mianem dojrzewania (ang. *in vitro maturation*, IVM) w celu osiągnięcia pełnej kompetencji do zapłodnienia (stadium metafazy drugiej mejozy), natomiast ejakulowane plemniki poddawane są procesowi kapacytacji zmierzającemu do nabycia pełnej ruchliwości oraz przygotowania błony komórkowej plemnika do fuzji ze specyficznymi receptorami zlokalizowanymi na osłonce przejrzystej (*zona pellucida*) oocytu, 2) zapłodnienie (ang. *in vitro fertilization*, IVF); etap mający na celu uzyskanie zapłodnionych oocytów (zygot), który można przeprowadzić na dwa sposoby: tzw. standardowy polegający na wspólnej inkubacji gamet albo wspomagany, polegający na mikrochirurgicznym wprowadzeniu jednego plemnika do cytoplazmy oocytu (ang. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI), 3) inkubacja zarodków (ang. *in vitro culture*, IVC) określana także mianem „hodowli zarodków”. Wszystkie etapy procedury prowadzone są w specjalistycznym inkubatorze kontrolującym szereg parametrów środowiska (skład atmosfery gazowej, na przykład 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu, temperatura, wilgotność).

## 164. Jakie są podstawowe źródła gamet (oocytów, plemników) w procedurze uzyskiwania zarodków zwierząt *in vitro*?

Stopień trudności w pozyskiwaniu gamet do procedury IVM/IVF/IVC znacznie się różni w odniesieniu do gamet męskich i żeńskich. Podczas gdy plemniki zwierząt są dostępne w ofercie komercyjnych firm zaj-

mujących się sprzedają nasienia mrożonego (np. bydło) lub świeżego (np. świnia domowa), pozyskanie oocytów jest bardziej skomplikowane. Oocyty rozwijają się w gonadach żeńskich (jajniki) zlokalizowanych w jamie ciała w wyspecjalizowanych strukturach zwanych pęcherzykami jajnikowymi. Istnieją dwa źródła oocytów: jajniki samic poddawanych komercyjnemu ubojowi i jajniki żywych zwierząt, poddanych procedurze przyżyciowego pozyskiwania oocytów (ang. *ovum pick-up*, OPU). Podczas gdy rzeźnia jest źródłem dużej ilości łatwo dostępnego materiału, to procedura OPU dotyczy pojedynczych zwierząt i wymaga wyspecjalizowanego personelu oraz sprzętu. Ponadto samice poddawane procedurze OPU reprezentują zwykle grupę najcenniejszych pod względem hodowlanym zwierząt w stadzie.

Najczęściej stosowanym sposobem pozyskiwania oocytów jest aspiracja zawartości pęcherzyków jajnikowych, w tym oocytów, przy użyciu strzykawki z igłą. Taki uproszczony system stosuje się w laboratorium w odniesieniu do jajników rzeźnianych, natomiast przyżyciowe pozyskiwanie wymaga użycia zestawu USG z głowicą dopochwową wyposażoną w system aspiracji. W tym przypadku oocyty pozyskuje się bezpośrednio z jajników żywego zwierzęcia przeprowadzając igłą przez ścianę pochwy i nakłuwając poszczególne pęcherzyki jajnikowe, kontrolując jednocześnie czynności na monitorze USG. Zabieg przyżyciowego pozyskiwania oocytów (OPU) stosuje się coraz częściej we wspomaganym rozrodzie zwierząt (pierwsze doniesienie u bydła w 1992 r.). Jest także standardowym elementem procedury pozyskiwania *in vitro* zarodków człowieka.

#### **165. Czy zarodki zwierząt pozyskane *in vitro* są podobne do zarodków pozyskanych *in vivo*?**

Dostępna jest bardzo bogata literatura porównująca cechy przedimplantacyjnych zarodków zwierząt pozyskanych *in vivo* i *in vitro*. W ocenie zarodków bydła jako punkt odniesienia przyjęto tzw. złoty standard (ang. *gold standard*). Odpowiada on charakterystyce zarodków pozyskanych *in vivo* mających prawidłową morfologię i dynamikę rozwoju. Przyjmuje się, że dynamika rozwoju przedimplantacyjnych zarodków zwierząt, rozumiana jako czas osiągnięcia poszczególnych stadiów, jest zbliżona w obu systemach. Pewne cechy zarodków pozyskanych *in vitro* odbiegają jednak od parametrów złotego standardu. Dotyczy to między innymi morfologii i aktywności transkrypcyjnej genów. Dobrym przykładem jest proces silnego zwierania się (kompakcji) komórek zarodka

zachodzący w stadium moruli (u bydła około 30 komórek, piąty dzień po zapłodnieniu). W warunkach *in vivo* kompaktacja jest znacznie silniejsza i rozłożona w czasie, podczas gdy w warunkach *in vitro* przebiega szybciej i w ograniczonym zakresie. Wykazano jednak, że w pewnym zakresie zarodek może kompensować te niedoskonałości. Przyjmuje się, że odsetek cięż bydła wynikających z przeniesienia zarodków pozyskanych *in vitro* (40-50%) jest niższy w porównaniu z zarodkami pozyskanymi *in vivo* (60-75%). Należy jednak pamiętać, że część zarodków pozyskanych *in vivo* także wykazuje nieprawidłowości rozwojowe i nie spełnia wymagań złotego standardu. Zjawisko to widać w komercyjnie monitorowanych parametrach rozrodu, na przykład u bydła przyjmuje się, że ponad 90% owulowanych oocytów ulega zapłodnieniu *in vivo*, podczas gdy odsetek urodzonych cieląt waha się między 40 a 55%. Na to zjawisko składa się wiele parametrów (np. stan zdrowia i wiek samicy), ale także duża skala fizjologicznej zamieralności zarodków (około 40% zapłodnionych oocytów).

**166. Czy zarodki zwierząt pozyskane *in vitro* stanowią alternatywę dla zarodków pozyskanych w warunkach naturalnych – *in vivo*?**

Pierwsze cielę wywodzące się z zarodka uzyskanego po zastosowaniu kompleksowej procedury IVM/IVF/IVC urodziło się w 1987 r. Pomimo dużego zainteresowania hodowców zwierząt zarodkami pozyskanymi w warunkach *in vitro* skala ich wykorzystania wiąże się bezpośrednio z efektywnością procedury IVM/IVF/IVC różniącą się znacznie między gatunkami. W największym zakresie zarodki pozyskane *in vitro* wykorzystuje się w hodowli bydła. Zgodnie z danymi Międzynarodowego Towarzystwa Technologii Zarodków IETS (ang. *International Embryo Technology Society*) dotyczącymi bydła, w skali globalnej liczba zarodków pozyskanych *in vitro* i przeniesionych do bioreczerw (757 652) w 2017 r. przewyższyła liczbę zarodków pozyskanych *in vivo* (406 287). W stosunku do 2016 r. udział zarodków pozyskanych *in vivo* w całej puli zarodków bydła wzrósł o 48,9%. Można zatem stwierdzić, że w odniesieniu do bydła zarodki pozyskane *in vitro* stanowią pełną alternatywę dla zarodków pozyskanych *in vivo*. W przypadku innych gatunków zwierząt gospodarskich zakres wykorzystywania zarodków IVF jest znacznie mniejszy, na przykład w 2017 r. przeniesiono 21 011 zarodków koni, w tym 543 zarodków pozyskanych *in vitro* (około 2,6%). U owiec zarodki pozyskane *in vitro* stanowiły zaledwie 0,004% (55/12 626).

### 167. Jaka jest efektywność uzyskiwania zarodków zwierząt *in vitro*?

Efektywność kompleksowej procedury IVM/IVF/IVC jest bardzo zróżnicowana między gatunkami zwierząt i w dużej mierze odzwierciedla aktualny stan wiedzy na temat biologii rozrodu danego gatunku. Rutynowo stosowanym parametrem obrazującym skuteczność tej procedury jest procent zarodków osiagających stadium blastocysty (bydło 6-9 dzień po zapłodnieniu). Jest to najbardziej zaawansowane pod względem rozwojowym stadium przedimplantacyjnego rozwoju zarodka ssaków możliwe do uzyskania w laboratorium. Odsetek zarodków osiagających stadium blastocysty wyrażony stosunkiem liczby blastocyst do liczby oocytów poddanych zapłodnieniu zależy od gatunku i wynosi: 30-40% u bydła i owcy oraz 25-35% u konia. W przypadku świni domowej należy uwzględnić wysoką częstość nieprawidłowości przy zapłodnieniu polegającej na penetracji oocytu przez więcej niż jeden plemnik (polispermia). Dlatego publikowane dane uwzględniają to zjawisko, odnosząc procent blastocyst do prawidłowo zapłodnionych zarodków (monospermia). Udział blastocyst świni waha się od 30% do 40%. Największym wyzwaniem dla embriologów zwierząt okazuje się pies domowy, u którego tylko okazjonalnie uzyskuje się pojedyncze blastocysty.

### 168. Przez jaki czas po zapłodnieniu *in vitro* zarodki mogą rozwijać się w inkubatorze przed ich przeniesieniem do macicy matki zastępczej (bioreczyni)?

W warunkach laboratoryjnych zarodki ssaków mogą rozwijać się z zachowaniem potencjału rozwojowego przez kilka dni po zapłodnieniu, aż do uzyskania stadium blastocysty (np. bydło 6-9 dzień po zapłodnieniu, świnka domowa 6 dzień). Jest to okres rozwoju przedimplantacyjnego, czyli w warunkach naturalnych (*in vivo*) zarodek dopiero przygotowuje się do interakcji z układem rozrodczym samicy i implantacji. Czas inkubacji zarodków zależy od gatunku zwierzęcia oraz założonego celu. W odniesieniu do hodowli zwierząt celem jest zwykle uzyskanie zarodków w stadium blastocysty, które można skutecznie przenieść do macicy matki zastępczej (bioreczyni) w celu implantacji i rozwoju płodu lub poddać mrożeniu (kriokonserwacji) i przechowywaniu.

**169.** Czy procedura pozyskiwania zarodków zwierząt *in vitro* różni się od procedury stosowanej u ludzi?

Podstawowa rozbieżność rutynowo stosowanego protokołu pozyskiwania *in vitro* zarodków zwierząt i człowieka dotyczy warunków przygotowywania oocytów do zapłodnienia (proces dojrzewania). Oocyty zwierząt pozyskuje się z mniejszych, rosnących pęcherzyków jajnikowych, które nie są jeszcze gotowe do owulacji i w naturalnych warunkach tylko nieliczne z nich uległyby owulacji w kolejnych cyklach. Takie oocyty, znajdujące się w stadium profazy pierwszej mejozy (diktioten), są określane mianem „niedojrzałych” i przed zapłodnieniem wymagają dodatkowej inkubacji (dojrzewania) *in vitro* (np. u bydła 24 godziny, u świni 44 godziny). W odróżnieniu od zwierząt w zdecydowanej większości zabiegów IVF u człowieka oocyty dojrzewają w jajniku pacjentki hormonalnie przygotowanej do tego zabiegu. Dynamika wzrostu pęcherzyków jajnikowych jest monitorowana przy użyciu USG. W ściśle określonym czasie przed owulacją wykonuje się zabieg przyżyciowego pozyskiwania oocytów (OPU) w celu pozyskania oocytów dojrzałych do zapłodnienia, czyli w stadium metafazy drugiej mejozy. Należy podkreślić, że niektóre kliniki stosują procedurę dojrzewania *in vitro* (IVM), jednak biorąc pod uwagę skalę, takie zabiegi stanowią niewielki odsetek.

Drugim czynnikiem różnicującym procedury stosowane u zwierząt i człowieka jest sposób zapłodnienia oocyty. U zwierząt dominuje wspólna inkubacja gamet, czyli dochodzi do naturalnej penetracji oocyty przez plemnik. Natomiast u człowieka najczęściej stosuje się zabieg mikrochirurgicznego wprowadzenia jednego plemnika do cytoplazmy oocyty (ang. *intracytoplasmic sperm injection*, ICSI). Oznacza to, że nie dochodzi do penetracji oocyty przez losowy plemnik, a selekcji dokonuje embriolog na podstawie parametrów morfologicznych plemników.

**170.** Czy hodowcy zwierząt są zainteresowani zarodkami o określonej płci?

Zainteresowanie hodowców potomstwem określonej płci wynika bezpośrednio ze specyfiki produkcji zwierzęcej. Dobrym przykładem jest bydło mleczne. Przyjmuje się, że średnia długość życia wysokowydajnej krowy mlecznej w Polsce wynosi 5 lat, z czym wiąże się spora dynamika brakowania (usuwania ze stada i przeznaczania na rzeź) zwierząt i konieczność ich zastępowania przez młode osobniki, co określane jest

mianem remontu stada. Ponieważ produkcja mleka wiąże się z ciążą, dlatego producenci mleka są głównie zainteresowani zwierzętami płci żeńskiej.

Możliwość uzyskiwania potomstwa o określonej płci pojawiła się w 1999 r. wraz z komercyjnym zastosowaniem cytometru przepływowego do sortowania plemników na podstawie przeniesionego chromosomu płci. U zwierząt gospodarskich chromosom X jest większy od chromosomu Y i stąd zawiera on więcej DNA. Cytometr przepływowy, zwany w tym przypadku sorterem, dokonuje pomiaru całkowitej zawartości DNA w każdym z plemników i dzieli populację gamet na dwie kategorie: przenoszące chromosom X i przenoszące chromosom Y. Różnica zawartości DNA w chromosomach X i Y wpływa na zróżnicowaną zawartość całkowitego DNA w plemnikach obu kategorii (np. 3,8% u bydła, 3,6% u świni domowej). Sorter pozwala na uzyskanie frakcji zawierającej >90% plemników zawierających dany chromosom płci. Oznacza to możliwość uzyskania potomstwa o pożądanej płci z prawdopodobieństwem >90%. Należy pamiętać, że dawka nasienia sortowanego jest droższa od dawki standardowej (niesortowanej), a skuteczność unasiwienia (odsetek cięż) jest niższa (około 42%) w porównaniu ze skutecznością po użyciu nasienia niesortowanego (około 52%). Nasienie sortowane wymaga zatem dobrej organizacji rozrodu w stadzie i cieszy się zainteresowaniem głównie w dużych stadach wysokowydajnych krów mlecznych. Według IETS w 2017 r. zarodki bydła uzyskane po użyciu sortowanego nasienia stanowiły w skali globalnej niecałe 6% populacji zarodków pozyskanych *in vivo*. Zainteresowanie nasieniem sortowanym nie ogranicza się tylko do bydła, gdyż jest stosowane, chociaż w mniejszym zakresie, także w rozrodzie koni czy świń.

#### **171. Na czym polega procedura przenoszenia zarodków zwierząt (ang. *embryo transfer*, ET)?**

Przenoszenie zarodków w znaczeniu ogólnym polega na pozyskaniu większej liczby zarodków od wybitnej samicy (dawczyni), wypłukaniu ich z jej macicy po kilku dniach od zapłodnienia i przeniesieniu do macicy tzw. matki zastępczej (biorczyni). Ta biotechnika cieszy się szczególnym zainteresowaniem w hodowli bydła. Bydło jest gatunkiem monopłodowym (ciąża pojedyncza uważana jest za fizjologiczną) o długim okresie ciąży (9 miesięcy) i uzyskiwaniem hodowlanej dojrzałości do rozrodu średnio w wieku 18,5 miesiąca. Te parametry sprawiają, że

hodowcy zainteresowani są uzyskaniem większej liczby potomstwa od wybitnych samic niż pozwala na to standardowy rozród. Procedura przenoszenia zarodków (ang. *embryo transfer*, ET) obejmuje następujące etapy:

- stymulację hormonalną dawczyni w celu uzyskania tzw. mnogiej owulacji (superowulacja)
- hormonalną synchronizację cyklu rujowego dawczyni i biorczyń zarodków
- sztuczne unasiwienie dawczyni
- wyflukanie i ocenę morfologii zarodków siódmego dnia po unasiwieniu, gdy powinny one osiągnąć stadium blastocysty
- przeniesienie prawidłowych zarodków do macicy przygotowanych biorczyń lub ich zamrożenie i przechowywanie.

Hormonalna stymulacja dawczyni w celu uzyskania mnogiej owulacji stwarza warunki do wzrostu i owulacji wielu pęcherzyków jajnikowych, podczas gdy w warunkach fizjologicznych w danym cyklu płciowym gatunek monopłodowy owuluje tylko jeden pęcherzyk pomimo wzrostu większej ich liczby. Pozostałe pęcherzyki ulegają degeneracji. Liczba zarodków możliwych do pozyskania u bydła holsztyńsko-fryzyjskiego (bydło mleczne) po zastosowaniu superowulacji waha się w szerokim zakresie do ponad 50, ze średnią wynoszącą około 6 zarodków na zabieg przeniesienia zarodków.

## 172. Jak została sklonowana owieczka Dolly?

Zasadnicza istota sukcesu zespołu profesora Iana Wilmuta (Wilmut i in., 1997) ze szkockiego Roslin Institute polega na tym, że po raz pierwszy w historii odtworzono dorosłego ssaka z komórki innej niż rozrodcza, a dokładnie z całkowicie zróżnicowanej komórki somatycznej. W celu przeprowadzenia procedury klonowania somatycznego (SCNT) naukowcy pobrali dwa rodzaje komórek: komórkę z wymienia owcy (owca A) oraz dojrzały do zapłodnienia oocyt od drugiej samicy (owca B). Oocyt został poddany procedurze enukleacji, czyli usunięcia jądra komórkowego, a tym samym jądrowego DNA. Następnie komórka somatyczna owcy A została mikrochirurgicznie wprowadzona przez iniekcję do oocytu owcy B uprzednio pozbawionego jądra. W ten sposób powstał jednokomórkowy, klonowany zarodek składający się z komórki wymienia oraz oocytu pozbawionego jądra. Dla dalszego rozwoju oba

elementy tej zrekonstruowanej zygoty poddane zostały jeszcze fuzji w polu elektrycznym. Klonowany zarodek zawierał DNA pochodzący zarówno z komórki somatycznej (DNA jądrowy i kilka kopii DNA mitochondrialnego owcy A), jak i wielu tysięcy kopii mitochondrialnego DNA zawartego w cytoplazmie oocyty owcy B. Następnie zarodek został wprowadzony do macicy trzeciej owcy, czyli matki zastępczej (owca C), która urodziła owieczkę Dolly. Uznaje się, że owca Dolly była klonem owcy A. Różniła się jednak od niej mitochondrialnym DNA pochodzącym z oocyty owcy B. Z pewnością klonowanie komórek somatycznych wyższych ssaków to ogromny sukces naukowy, stwarzający w istotny sposób nowe możliwości w zakresie inżynierii genetycznej, biomedycyny, hodowli zwierząt i wielu innych dziedzin.

### 173. Co rozumiemy pod pojęciem ksenotransplantacji?

Ksenotransplantacja to przeszczepianie komórek, tkanek i narządów pomiędzy różnymi gatunkami. Według U.S. Public Health Service jest to każda procedura, która obejmuje transplantację, implantację czy infuzję człowiekowi żywych komórek, tkanek lub organów pochodzących od zwierząt, a także płynów ustrojowych, komórek, tkanek czy narządów człowieka, które weszły w kontakt *ex vivo* ze zwierzęcymi komórkami, tkankami lub narządami. Niestety, taki przeszczep jest immunologicznie wysoce niezgodny, co wynika z różnic genetycznych pomiędzy dawcą a biorcą. W transplantologii funkcjonuje pojęcie gatunków filogenetycznie bliskich (ang. *concordant*) i odległych (ang. *discordant*), a czas przeżycia przeszczepu zależy od dystansu filogenetycznego, jaki dzieli dawcę i biorcę. W przypadku gatunków blisko spokrewnionych proces odrzucenia przeszczepu jest względnie długi i wynosi od kilku godzin do paru dni. W przypadku gatunków odległych filogenetycznie następuje bardzo szybko, w ciągu kilkunastu minut. Ksenotransplantacja stała się realna dzięki metodom inżynierii genetycznej, która obniża rozpoznawanie przeszczepu i jego natychmiastowe odrzucanie.

### 174. Dlaczego potrzebny jest rozwój ksenotransplantacji?

Pogłębiający się z każdym rokiem niedobór narządów zmusza do poszukiwania nowych i bardziej skutecznych metod ich pozyskiwania. Do najważniejszych z nich można zaliczyć inżynierię tkankową, wykorzystanie komórek macierzystych, terapię biohybrydową, tworzenie



sztucznych narządów czy bioreaktorów, które będą pełnić ich funkcje. Szczególne nadzieje pokłada się w przeszczepianiu zmodyfikowanych metodami inżynierii genetycznej narządów pozyskiwanych od zwierząt, czyli w ksenotransplantacjach.

### **175. Jakie zwierzęta mogą być źródłem komórek, tkanek i narządów dla człowieka?**

Wybór dawcy nie jest prostą kwestią. Narządy zwierzęcia muszą w dużym stopniu wykazywać podobieństwo do narządów człowieka zarówno anatomiczne, jak i fizjologiczne. Pod uwagę bierze się małpy naczelne – pawiany (*Papio* sp.) i szympansy (*Pan troglodytes*), a także świnię domową (*Sus scrofa*). Naczelne są filogenetycznie najbliższym spokrewnionym z człowiekiem zwierzętami (ang. *nonhuman primates*, NHPS). Szympansy i pawiany były początkowo brane pod uwagę jako potencjalni dawcy ze względu na duże podobieństwo anatomiczne i fizjologiczne ich narządów do organów człowieka. Problemem wydają się być jednak małe rozmiary narządów pawiana czy szympansa, a tym samym niemożność wykorzystania na przykład serca u ludzi dorosłych, a jedynie u dzieci oczekujących na właściwy alloprzeszczep (przeszczep od innego człowieka). Podejmowano nawet próby kliniczne z wykorzystaniem organów pochodzących od naczelnych. Pomimo dość owocnych wyników w badaniach klinicznych, zainteresowanie naczelnymi jako potencjalnymi dawcami narządów dla ludzi zmalało z kilku powodów. Małpy są trudne w hodowli, mają niską płodność, wydają na świat zazwyczaj tylko jednego potomka i to po dość długim okresie ciąży, późno osiągają dojrzałość płciową. Wszystko to sprawia, że zastosowanie kliniczne pochodzących od nich narządów potencjalnie byłoby rozwiązaniem bardzo drogim. Mała efektywność ich pozyskiwania mogłaby również nie pokryć w całości zapotrzebowania terapeutycznego na narządy. Ich wykorzystanie budzi także ogromny sprzeciw opinii publicznej. Wiele osób uważa, że struktury społeczne, jakie budują, oraz inteligencja, jaką posiadają naczelne, ze względów etycznych uniemożliwia ich wykorzystanie jako dawców na wielką skalę. Filogenetyczna bliskość jest jednocześnie najsilniejszym atutem i największą barierą. Tak duże podobieństwo biochemiczne sprawia, że znaczna część patogenów wirusowych pawianów i szympanсів jest w stanie z powodzeniem infekować ludzi. Do retrowirusów mogących powodować objawy chorobowe u ludzi zalicza się w szczególności: BaEV (ang. *baboon endogenous retrovirus*), SIV (ang.

*simian immunodeficiency virus*), STLV (ang. *simian T-lymphotropic virus*), SRV (ang. *exogenous simian retrovirus*), SFV (ang. *simian foamy virus*) oraz wirus SV40 (ang. *simian virus*).

Ogrom problemów związanych z wykorzystaniem w ksenotransplantacji gatunków bliskich wymagał znalezienia potencjalnego dawcy wśród gatunków filogenetycznie odległych. Optymalnym gatunkiem okazała się świnia. Świnie są łatwe i tanie w hodowli, rozmnażają się szybko, mają liczne potomstwo. Zróżnicowanie wielkości wśród ras pozwala na dobranie organów o odpowiedniej wielkości dla różnych biorców. Zwierzęta te łatwo poddają się zabiegom inżynierii genetycznej. Mają zbliżone parametry anatomiczne i fizjologiczne. Zbliżona jest także osmolarność moczu, wielkość filtracji kłębuszkowej i przepływ krwi przez nerki. Podobny jest też rzut minutowy serca i ciśnienie tętnicze. Niektóre hormony (insulina) oraz czynniki tkankowe (czynnik VIII krzepnięcia) działają na organizm człowieka, co potwierdza ich zastosowanie w badaniach klinicznych. Perfuzja krwi przez wątrobę świni umożliwia detoksykację chorych w śpiączce wątrobowej. Znaczny dystans filogenetyczny jest jednak powodem ogromnych problemów immunologicznych po przeszczepie, ale potencjalnie zmniejsza ryzyko zakażeń wirusowych. Mimo istotnych problemów właśnie na świni koncentrują się obecnie wszystkie badania mające doprowadzić w przyszłości do zlikwidowania problemu, jakim jest brak narządów do transplantacji u ludzi. Jednak taki narząd jest dla człowieka przeszczepem tkankowo wysoce niezgodnym i prawie natychmiast zaczyna być odrzucany w wyniku tzw. nadostrej reakcji immunologicznej. U człowieka obecne są ksenoreaktywne przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi Gal świni obecnemu na glikolipidach i glikoproteinach. Antygen Gal (Gal- $\alpha$ -1,3-Gal) powstaje w wyniku przyłączenia cząsteczki galaktozy do N-acetylolaktozaminy wiązaniem  $\alpha$ -1,3-glikozydowym przy udziale enzymu  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazy. Zarówno enzym, jak i reszta cukrowa nie występują u ludzi i małp Starego Świata. Sugeruje się, że u przodków wyższych naczelnych gen *GGT1* kodujący enzym  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazę uległ inaktywacji.

Aby przedłużyć czas przetrwania ksenoprzeszczepu w organizmie biorcy, metodami inżynierii genetycznej próbuje się modyfikować genom potencjalnego dawcy, co w konsekwencji prowadzi do uzyskania zwierząt, których organy będą się charakteryzowały obniżoną immunogennością.

## 176. Jakie osiągnięcia mają polskie zespoły w zakresie ksenotransplantacji?

W ramach projektu sektorowego opracowano innowacyjną technologię wykorzystania tkanek transgenicznych świń do celów biomedycznych, na potrzeby ksenotransplantacji, ze szczególnym uwzględnieniem skóry, zastawek i naczyń. Uzyskano świnię, których komórki nie są rozpoznawane przez układ odpornościowy biocy i stanowią alternatywę do wykorzystania komórek macierzystych i sztucznych narządów jak również umożliwią przyszłościowe wykorzystanie transgenicznych tkanek u pacjentów oczekujących na przeszczepy. Jest to znaczące osiągnięcie nie tylko w ramach krajowych prac badawczo-rozwojowych, lecz także w badaniach światowych. Polski projekt był realizowany w latach 2014-2018 przez partnerów: Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu – Katedrę Biochemii i Biotechnologii (lider projektu), Instytut Zootechniki-Państwowy Instytut Badawczy w Balicach, Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Fundację Rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze, Centrum Leczenia Oparzeń im. dr. Stanisława Sakiela w Siemianowicach Śląskich oraz Laboratorium Genetyki Molekularnej. Prowadzone prace hodowlane umożliwiły uzyskanie transgenicznych świń z delecją w obydwu allelach genu, prowadząc do wyłączenia antygeny Gal (Gal- $\alpha$ -1,3-Gal). Obecnie w Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze prowadzone są prace, których celem jest sprawdzenie możliwości wykorzystania do przeszczepów zastawek, natomiast Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich wykorzystuje w praktyce klinicznej skórę pochodzącą od uzyskanych w ramach projektu ksenotransplantacyjnego zwierząt jako materiał opatrunkowy. Z kolei Uniwersytet Medyczny w Poznaniu podjął badania, których celem jest wykorzystanie skóry i naczyń krwionośnych transgenicznych świń. Wzrastająca dostępność genetycznie modyfikowanych świń umożliwi dokonanie postępu w eksperymentach dotyczących transplantacji w układzie świnia-naczelne, wyłączając człowieka. W ten nurt wpisują się prace prowadzone w ramach projektu MEDPIG. Podczas wieloletnich prac uzyskano kilka linii transgenicznych oraz poli-transgenicznych świń, włączono również najnowsze technologie edycji genomu – palce cynkowe oraz technologię CRISPR/Cas9 do uzyskania transgenicznych zwierząt. Niezbędne okazało się opracowanie systemu hodowli zwierząt oraz pozyskiwania tkanek transgenicznych świń

opartego również na biotechnologii rozrodu świń politransgenicznych. Opracowano i charakteryzowano nowe konstrukcje genowe do transgenezy i przeprowadzono wieloparametryczną charakterystykę transgenicznych zwierząt.

Ważną część projektu stanowi praktyczne wykorzystanie uzyskanych świń dla potrzeb biomedycznych, prowadzone przez renomowane ośrodki krajowe. Obejmują one przygotowanie opatrunku biologicznego do leczenia ran oparzeniowych i przewlekłych oraz wykorzystanie naczyń i skóry w leczeniu chorób naczyń człowieka. Ponadto przygotowywano innowacyjne bioprotezy zastawek serca. Skóra transgenicznych świń już wielokrotnie przyczyniła się do uratowania życia ludzi z oparzeniami.

Wartościami dodatkowymi zrealizowanego projektu jest wykazanie możliwości ścisłej współpracy współwykonawców na tym samym materiale biologicznym, jak również wprowadzenie do badań technologii modyfikacji CRISPR/Cas9 i uzyskanie pierwszych na świecie dużych zwierząt z wyłączonym genami warunkującymi odrzucanie przeszczepów.

### **177. Dlaczego prowadzi się badania z zakresu transgenezy zwierząt?**

Modyfikacje genetyczne komórek zwierzęcych prowadzi się w celu potwierdzenia, że wyizolowane (badane) geny kierują syntezą określonych białek lub są odpowiedzialne za określone czynności fizjologiczne. Ocenia się wpływ wprowadzonych mutacji. Uzyskuje się (izoluje) geny odpowiedzialne za syntezę określonych białek. Prowadzi się analizę konsekwencji fizjologicznych ekspresji specyficznych białek. Bada się również wpływ leków lub innych czynników. Prowadzi się produkcję zwiększonych ilości białek, które występują w niewielkich ilościach.

Można również wyróżnić zastosowania praktyczne transgenezy zwierząt. Do celów biomedycznych uzyskuje się białka o znaczeniu farmaceutycznym, ksenogeniczne komórki i tkanki. Planuje się również prowadzenie ksenotransplantacji organów. Wśród celów użytkowych wskazuje się modyfikację produktów nabiałowych, mięsa i produktów mięsnych jak również zwiększenie produkcji wełny.

### **178. Czy transgeniczne zwierzęta wytwarzają komercyjnie dostępne białka?**

Tak. Pierwsze były transgeniczne kozy wytwarzające w mleku rekombinowaną antytrombinę III człowieka, dostępną pod komercyjną nazwą

ATryn®. Antytrombina III to środek antykoagulacyjny stosowany do profilaktyki zakrzepów krwi u pacjentów z rzadką chorobą – dziedzicznym niedoborem antytrombiny. Stany Zjednoczone nie chciały dopuścić do stosowania leków uzyskiwanych w transgenicznym zwierzętach. Jednak firma GTC Biotherapeutics uzyskała w 2006 r. zgodę na dopuszczenie do sprzedaży zatwierdzone przez Komisję Europejską, ATryn® – zgodę Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA) do stosowania przy zapobieganiu krzepnięciu podczas zabiegów chirurgicznych u pacjentów z dziedzicznym niedoborem antytrombiny. Agencja ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA) wprowadziła zmiany w przepisach dotyczących leków pochodzących ze zwierząt w celu zatwierdzenia nowego zastosowania leków pochodzących od zwierząt (ang. *new animal drug application*, NADA). Preparat został zatwierdzony w 2009 r. do sprzedaży dla pacjentów z dziedzicznym niedoborem antytrombiny.

Z kolei firma Alexion Pharmaceuticals, Inc. (Lexington, MA) wprowadziła na rynek europejski i amerykański rekombinowaną lizosomalną kwaśną lipazę człowieka (ang. *lysosomal acid lipase*, LAL), wytwarzaną w genetycznie zmodyfikowanym białku jaj kurzych. Oczyszczone rekombinowane białko, nazywane sebelipazą alfa (nazwa komercyjna KANUMA), jest wskazane do stosowania w długookresowej enzymatycznej terapii zastępczej (ang. *enzyme replacement therapy*, ERT) u pacjentów w każdym wieku z niedoborem lizosomalnej kwaśnej lipazy.

### **179. Czy są dostępne komercyjnie transgeniczne zwierzęta wykorzystywane jako żywność?**

Pierwszym w historii genetycznie zmodyfikowanym zwierzęciem przeznaczonym do spożycia, które weszło do sprzedaży w USA, jest łosoś *AquAdvantage*. Łosoś *AquAdvantage* rośnie dwa razy szybciej niż oryginalny atlantycki łosoś, potrzebuje o 20% mniej pożywienia. Jego twórcą jest firma AquaBounty Technologies, która ma siedzibę w Maynard w stanie Massachusetts. Łosoś *AquAdvantage* jest genetyczną mieszanką trzech ryb: łososia atlantyckiego, pacyficznego i węgorzycy. Do genomu tego zwierzęcia wprowadzono dodatkową kopię genu kodującego hormon wzrostu z odmiany łososia pacyficznego – czawczy. Promotor pochodzi z węgorzycy, dzięki czemu hormon wzrostu produkowany jest stale, a nie jak u zwykłego łososia tylko w lecie. Modyfikacja łososia spowodowała, że osiąga on rozmiary dorosłego osobnika w 16-28 miesięcy,

podczas gdy normalnie łososiom zabiera to 36 miesięcy. Transgeniczna ryba zatrzymuje swój wzrost w momencie osiągnięcia typowych rozmiarów dla tego gatunku. Ryby są hodowane w zamkniętych stawach, co ogranicza możliwość przedostania się do środowiska. Kolejną biologiczną barierą jest sterylność łososi zapobiegająca ich krzyżowaniu się z dzikimi osobnikami. Uzyskano to dzięki potrojeniu kompletu chromosomów. W grudniu 2015 r. w toku długich i rygorystycznych badań naukowych FDA ustaliło, że łosoś *AquAdvantage* może być bezpiecznie spożywany przez ludzi i zwierzęta. Łosoś jest dostępny w Kanadzie i USA.

### 180. Czy genetyczna modyfikacja komarów może pomóc w walce z malarią?

Brytyjska firma Oxitec opracowała genetycznie modyfikowaną linię komara *Aedes aegypti* (OX513A) w celu ograniczenia populacji tego komara w miejscu uwalniania. Otwarte próby polowe zostały przeprowadzone w Brazylii, na Kajmanach, w Panamie i Malezji. *Aedes aegypti* przenosi potencjalnie wyniszczające choroby wirusowe człowieka, w tym Zika, dengi, żółtej febry i chikungunya. Do środowiska uwalniane są wyłącznie samce, ponieważ samice owadów są bezpośrednio odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się chorób lub wytwarzanie larw, które niszczą uprawy. Samce mają jedyne zadanie: znaleźć dzikie samice w miejscu ich występowania i kojarzyć się z nimi. Samce *Ae. aegypti* OX513A zawierają samoograniczający gen (ang. *self-limiting gene*), który koduje nietoksyczne i niealergenne białko, uniemożliwiające ich potomstwu osiągnięcie dojrzałości, co powoduje zmniejszenie populacji owadów szkodników. Modyfikacja jest stabilna przez ponad 150 pokoleń. Pięć badań w trzech krajach wskazało ponad 90-procentową redukcję populacji komarów. Samce są jednocześnie bardziej atrakcyjne od dzikich samców, żyją około 1 tygodnia, a po zaprzestaniu dostarczania modyfikowanych komarów do środowiska zanikają i nie stanowią dla niego zagrożenia.

Metodę można zastosować do różnych szkodników, od komarów przenoszących takie choroby jak denga i Zika, po gąsienice i ćmy niszczące pola kukurydzy. Technologia ma kilka kluczowych zalet. Wykazuje specyficzność dla gatunku, owady rozmnażają się w obrębie własnego gatunku, nie powodując śmierci innych, pożytecznych owadów. Wykorzystuje naturalne instynkty kojarzenia samców wyszukujących w ich

naturalnych środowiskach dzikie szkodniki, a układ można skalować. Nie są stosowane żadne substancje chemiczne szkodliwe dla środowiska. System samoograniczający oznacza, że owady nie mogą utrzymać się w ekosystemie. Białka kodowane przez wprowadzone geny nie są toksynami ani alergenami.