

БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ ЖИВОТНЫХ – ОСНОВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАЛИЦКОЙ ГРУППЫ УЧЕНЫХ

**доктор, проф. Здзислав Сморонг, доктор, проф. Люцина Контска-Ксёнкевич,
доктор Мария Сквишовска, доктор Яцек Юра,
доктор Барбара Гайда, доктор Михал Бохенек**

Государственный научно-исследовательский институт зоотехники,
Отдел биотехнологии репродукции животных,
32-083 Балице (Краков, Польша)

В статье изложена информация об основных направлениях исследований и результатах экспериментов, проводимых Балицкой группой исследователей в области биотехнологии воспроизводства животных.

Ключевые слова: биотехнология репродукции животных, получение эмбрионов in vitro, клонирование, трансгенез, проточная цитометрия, криоконсервация ооцитов и эмбрионов, крупный рогатый скот, овца, коза, свинья, кролик, домашняя кошка.

Отдел биотехнологии репродукции животных Государственного научно-исследовательского института зоотехники был основан в 1950 году как одно из учреждений Министерства сельского хозяйства Польши. В течение первых лет своей истории работа отдела была сфокусирована на практических направлениях, связанных с искусственным осеменением крупного рогатого скота и лошадей. Профессор Владислав Беланский, первый руководитель отдела, придавал первоочередное значение практической стороне исследований. В середине 1960-х годов был создан Центральный банк спермы крупного рогатого скота с целью контроля за разведением животных, микробиологического контроля за хранящимся семенем, а также для импорта и экспорта замороженной спермы.

Профессор Стефан Вежбовский, руководитель отдела с 1968 года, продолжил этот практический подход и сфокусировал исследования на усовершенствовании методов искусственного осеменения различных видов животных в таких направлениях, как хранение и оценка спермы, поведение животных и андрология.

На протяжении второй половины 1970-х годов пределы исследований отдела расширились и включали также аспекты репродуктивной биологии самок. Началось изучение суперовуляции, пересадки и криоконсервации эмбрионов некоторых видов млекопитающих. В 1980-х годах эти исследования дополнились изучением вопросов получения эмбрионов in vitro и эмбрионального клонирования. В начале 1990-х началось изучение трансгенеза и регуляции пола животных. В настоящее время ключевыми направлениями исследований отдела являются: получение эмбрионов in vitro, криоконсервация гамет и эмбрионов, трансгенез животных, клонирование, а также цитометрическая оценка и разделение спермиев по полу. С 1992 года отдел возглавляет профессор Здзислав Сморонг.

Отдел сотрудничает с несколькими польскими и иностранными исследовательскими группами разных профилей исследований. В результате

этого сотрудничества было разработано несколько междисциплинарных проектов в области воспроизводства животных, фармакологии и медицины.

Получение эмбрионов in vitro

Исследования получения эмбрионов *in vitro* направлены на развитие комплекса методов: созревания ооцитов, их оплодотворения и культивирования эмбрионов. Эти работы были начаты в прошлом веке на крупном рогатом скоте и козах. В конце прошлого столетия начали проводиться эксперименты по долгосрочному культивированию поздних преантральных и ранних антральных фолликулов яичников коров, целью которых было достижение более эффективного использования репродуктивного потенциала самок.

В 1990 году в Балице родился первый теленок после пересадки бластоцисты, полученной по технологии *in vitro* [1]. Наши исследования показали, что количество извлекаемых ооцитов зависит, главным образом, от метода их сбора. Мы установили, что когда ооциты извлекают путем вскрытия изолированных фолликулов, то получается больший выход нормальных ооцитов на одно животное, чем при использовании аспирационного метода. Однако не было обнаружено взаимосвязи между количеством фолликулов яичника и качеством извлеченных ооцитов. Мы также установили, что большинство ооцитов способно созревать в диапазоне температур от 35°C до 39°C [2]. Нами показано, что у крупного рогатого скота затвердевание зоны пеллюцида происходит как *in vitro*, так и *in vivo*. Затвердевание может индуцироваться после попадания незрелых или зрелых ооцитов без клеток кумулюса в яйцевод как гомологичного, так и гетерологичного вида животных (кроличий или овечьих) *in vitro* или *in vivo*. Затвердевание зоны пеллюцида оказывает сильное влияние на оплодотворяемость ооцитов и развитие эмбрионов [3]. В результате наших исследований по капацитации спермиев для оплодотворения *in vitro* было показано, что большую роль в получении эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* играют такие факторы, как индивидуальные особенности быков, технологические аспекты получения спермы (сперма из эякулята или эпидидимальная, свежая или замороженно-оттаянная) и, наконец, присутствие семенной плазмы [4].

Исследования, проводимые на поздних преантральных и ранних антральных фолликулах яичников крупного рогатого скота были сфокусированы на изучении взаимосвязей между различными системами культивирования и выживаемостью ооцитов *in vitro*, а также их способностью к мейозу [5].

Эксперименты по получению *in vitro* козых эмбрионов привели к развитию методов извлечения ооцитов от убитых животных, успешной капацитации свежей и замороженно-оттаянной спермы козла, а также метода культивирования эмбрионов до стадии бластоцисты в со-культуре с эпителиальными клетками яйцеводов козы [6].

В результате наших исследований по получению и созреванию ооцитов домашних кошек была разработана система культивирования, в которой диплотенные ооциты кошки созревали и достигали стадии метафазы II мейоза [7].

Эксперименты по получению двоен

Изучение методов получения двоен было начато в 1980-х годах. Проводились исследования по бисекции эмбрионов мыши, овец и крупного рогатого скота. Бисекция эмбрионов является травматической процедурой, которая сопровождается повреждением некоторого количества клеток, что может уменьшать способность пересаженных частей эмбрионов к имплантации. Наши

эксперименты показали, что у поздних овечьих и коровьих эмбрионов при бисекции теряется 12-13 % клеток [8]. Чтобы уменьшить эти потери был разработан неинвазивный метод бисекции коровьих бластоцист. Согласно этому методу зону пеллюцида бластоцисты перфорируют (разрезают) около места расположения внутренней клеточной массы (ВКМ). После этого эмбрион оставляют на культивирование до вылупления. В процессе вылупления, когда бластоциста примерно на половину выпячивается через отверстие в зоне пеллюцида, приобретая форму “8” с разделенной пополам ВКМ, эмбрион делят на две части. При этом одна половинка бластоцисты остается внутри зоны пеллюцида, а другая вне ее. При разделении вылупляющихся бластоцист, имеющих форму “8”, теряется минимальное количество клеток, которое ограничивается узким клеточным мостиком, соединяющим две части вылупляющегося эмбриона. В результате пересадки частей эмбрионов, полученных этим методом, получено много пар монозиготных близнецов [9].

Клонирование животных

В конце 1990-х годов мы начали исследования по соматическому клонированию разных видов сельскохозяйственных животных (свиньи, козы, кролики) и домашних животных (домашние кошки).

Свиньи

Нами проводятся исследования по соматическому клонированию генетически модифицированных свиней с “гуманизированной” иммунной системой. Мы пересаживали в свиные энуклеированные ооциты ядра фибробластических клеток кожи от гетерозиготных и гомозиготных трансгенных хряков, экспрессирующий рекомбинантный человеческий ген H-transferees (α -1,2-fucosyltransferase; α -1,2-rhFT). В результате этого примерно 30% реконструированных свиных эмбрионов развивались *in vitro* до стадии морулы и бластоцисты. После пересадки этих эмбрионов синхронизированным реципиентным свинкам или свиноматкам супоросность подтвердилась у 10 самок из 39 реципиентов. Однако между 35 и 47 днем супоросности происходила резорбция плодов (неопубликованные данные).

В других экспериментах культивированные *in vitro* фетальные и адультивные фибробластические клетки кожи (конфлюэнтные или после сывороточного голодания) подвергались цитометрическому анализу на предмет фазы клеточного цикла и определения клеток с глубоким апоптозом. Цитометрический анализ подтвердил высокую эффективность искусственной синхронизации митотического цикла на стадии G0/G1, индуцированной контактным ингибированием или сывороточной недостаточностью, и позволил различить апоптотические и неапоптотические фибробласты. Мы определили, что метод, использованный для синхронизации ядер донорских клеток, и тип фибробластов, использованных для реконструкции энуклеированных ооцитов, влияли на способность свиных эмбрионов, реконструированных путем пересадки ядер, к развитию *in vitro*. Мы также наблюдали, что потенциал развития *in vitro* (до стадий морула/бластоциста) клонированных свиных эмбрионов, происходящих из ооцитов, реконструированных неапоптотическими фетальными фибробластическими клетками, был выше, чем у эмбрионов, происходящих из ооцитов, реконструированных неапоптотическими адультивными дермальными фибробластами [10].

Козы

Мы оценили потенциал развития *in vivo* клонированных козьих эмбрионов, происходящих из ооцитов, реконструированных ядрами клеток кумулюса, а также фетальными и адультивными фибробластами кожи уха. Таким образом, мы получили два клонированных козленка, которые развились из ооцитов, реконструированных адультивными дермальными фибробластами (неопубликованные данные).

Кролики

Мы применили новую технику химерного соматического клонирования для получения трансгенных кроликов. Адультивные трансгенные фибробластические клетки кожного происхождения с геном Tg(War-GH1) микрохирургически пересаживались в один из энуклеированных бластомеров двухклеточных эмбрионов, в то время как вторая эмбриональная клетка оставалась интактной. Реконструированные эмбрионы по окончании процедуры клонирования либо сразу пересаживали самкам-реципиентам, либо предварительно культивировали *in vitro* до стадии бластоцисты. В результате ПЦР-анализа трансген был обнаружен в клетках только у 4 из 14 бластоцист. Из 9 реципиентных самок 4 (44,4 %) забеременели и родили в общей сложности 24 (14,7 %) детеныша. ПЦР-анализ показал позитивный трансгенный сигнал только у двух новорожденных кроликов (1,2 %), из которых один живой, а другой мертворожденный. Живой трансгенный кролик NT20 выглядит здоровым, анатомически и физиологически нормальным. Эти результаты показали, что ядро адультивной трансгенной фибробластической клетки кожи, помещенное в микроусловия одного из энуклеированных бластомеров двухклеточного кроличьего эмбриона, способно управлять развитием химерного зародыша не только до стадии бластоцисты, но также и дальше вплоть до взрослого организма [11].

Домашние кошки

Мы изучали влияние возраста реципиентных цитопластов и типа соматических клеток, использованных в качестве доноров ядер на предимплантационное развитие реконструированных эмбрионов кошек. Нами показано, что клонированные эмбрионы, полученные из реконструированных ооцитов, которые созревали *in vitro* менее 35 часов, имели больший потенциал развития и были способны достигать стадии бластоцисты. Как нам известно, это было первое сообщение об успешном получении реконструированных бластоцист кошек [12-13].

Трансгенез животных

В 1989 году наша группа начала исследования трансгенеза сельскохозяйственных животных: кролик, коза, свинья и крупный рогатый скот. В основном мы использовали метод микроинъекции ДНК в пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток, полученных *in vivo* или *in vitro* [14].

На первых этапах получения трансгенных животных мы, в основном, использовали конструкцию генов, состоящую из гена гормона роста, соединенного с mMt (mouse Metallothionein) промотором. После этого мы также использовали генную конструкцию со специфическим тканевым промотором, который использовался для модификации состава молока, для получения протеинов в молоке с терапевтической целью, или создания модельных животных с заболеванием сосудов, подобных человеческому. В этих исследованиях мы сотрудничали с передовыми исследовательскими группами из Гарвардской Медицинской школы (Бостон, США), Национального научно-исследовательского

сельскохозяйственного института (Франция) и Биотехнологического института Эдисона (Университет в Огайо, США).

В конце 1990-х годов мы начали сотрудничество с факультетом биохимии и биотехнологии сельскохозяйственной академии (г. Познань). В результате этого сотрудничества были получены линии трансгенных кроликов, которые секретируют человеческий гормон роста в молоке [15]. Мы также участвовали в мультидисциплинарном проекте исследований по ксенотрансплантации, реализацией которого занимались 11 медицинских и биотехнологических исследовательских групп Польши. В результате получена линия генетически модифицированных свиней (включая гомозиготных особей). Клинические исследования показали, что после перфузии изолированного сердца свиньи человеческой кровью фаза острого отторжения была задержана [16].

В настоящее время в исследованиях трансгенеза свиней используются новые поколения генных конструкций, содержащие разные репортерные гены. Целью этого проекта является получение человеческого альфа-интерферона и человеческой сыворотки крови в молоке трансгенных свиней [17].

Исследования по проточной цитометрии

Более 15 лет тому назад наша исследовательская группа, занимающаяся проточной цитометрией, сфокусировала свою работу на изучении сперматозоидов животных и новых методов оценки качества спермы. Эти исследования в 2003 году привели к успешному результату: впервые в Польше родился теленок после инсеминации спермой, разделенной по полу [18]. В настоящее время в Польше родилось уже более 100 телят после стандартной инсеминации спермой, разделенной по полу.

Для точной оценки состояния мембраны спермиев мы используем двойное флуоресцентное окрашивание [19]. Изучалась возможность использования цитометрической оценки структуры хроматина спермиев в качестве нового метода определения повреждений ДНК у этих объектов. Было показано, что аномалии хроматина спермиев играют большую роль в фертильности самцов [20], а также то, что процедура разделения спермиев по полу оказывает очень незначительное влияние на структуру их ДНК [21].

Криоконсервация ооцитов и эмбрионов

В 1970-х годах наша группа начала исследования по криоконсервации эмбрионов. Нами проводились эксперименты по замораживанию эмбрионов овец [22] и крупного рогатого скота [23]. С конца 1980-х мы занялись изучением витрификации. В то время витрификация была новым подходом в криоконсервации ооцитов и эмбрионов. Суть витрификации состоит в затвердевании раствора после быстрого увеличения вязкости во время замораживания без кристаллизации. В результате наших исследований впервые в мире были получены кролик [24] и овца [25] после трансплантации витрифицированных эмбрионов. В последнее время мы занимаемся витрификацией эмбрионов свиней. Было показано, что бластоцисты, полученные *in vitro*, обладают лучшей способностью к витрификации, чем бластоцисты, полученные *in vivo*. Этот феномен специфичен для эмбрионов свиней. У других видов животных более пригодными для криоконсервации являются бластоцисты, полученные *in vivo*. После трансплантации витрифицированных эмбрионов синхронизированным реципиентам мы впервые в Польше получили поросят от пересадки криоконсервированных эмбрионов свиней [26].

Библиографический список

1. Kątska L., Smorąg Z., Bak M., Wierzbowski S. (1991) Calf developed from in vitro produced embryo. *Medycyna Wet.*- No.47.- P.169-171.
2. Kątska L., Smorąg Z. (1985) The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes // *Anim. Reprod. Sci.*- 9:205-212.
3. 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.*- No.32.- P.767-777.
4. Kątska L., Ryńska B., Smorąg Z. (1996) Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa // *Anim. Reprod. Sci.* -No.44.-P.23-31.
5. Kątska-Książkiewicz L., Alm H. (2005) Effect of culture methods on cumulus and oocyte morphology and meiotic competence of bovine oocytes from early antral follicles // *Arch. Tierz. Dummerstorf.*- No.48.- P.562-571.
6. 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.*- No.62.- P.576-586.
7. Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Kania G., Smorąg Z., Gajda B., Pieńkowski M. (2003) Timing of nuclear maturation of non-stored and stored domestic cat oocytes // *Theriogenology.* -No.59.- P.1567-1574.
8. Skrzyszowska M., Smorąg Z. (1989) Cell losses in bisected mouse, sheep and cattle embryos // *Theriogenology.*- No.32.- P.115-122.
9. 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.* -No.8.- P.223-231.
10. Skrzyszowska M., Samiec M. (2005) Production of porcine nuclear transfer embryos using fetal fibroblast cells analyzed on apoptosis // *Reprod. Fertil. Dev.* -No.17.- P.182-183.
11. 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.* -No.74.- P.1114-1120.
12. Skrzyszowska M., Kątska L., Smorąg Z., Ryńska B., Kania G., Gajda B., Pieńkowski M. (2001) In vitro development of somatic nuclear transferred cat embryos // *Theriogenology.* - No.55.- P. 292.
13. Skrzyszowska M., Kątska L., Ryńska B., Kania G., Smorąg Z., Pieńkowski M. (2002) In vitro developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: preliminary report // *Theriogenology.* -No.58.- P.615-1621.
14. 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.*- No.41.-P.1259-1266.
15. 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. (2003a) Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk // *J. Appl. Genet.* -44(2).- P. 165-174.
16. Skarysz J., Bochenek M. (2006). Użycie serca transgenicznych świń w układzie heterologicznym z zastosowaniem krwi ludzkiej – doświadczenia własne. W: *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji.*- Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2006.- Str. 331-340; ISBN 83-7314-013-1.
17. Lipiński D., Szalata M., Kalak R., Pławski A., Nuc K., Kala M., Juzwa K., Słomska K., Gronek P., Jura J., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R. (2003b) Ekspresyjne konstrukcje genowe prawidłowych i zmutowanych genów. Expressive gene structures of proper and modified genes. *Biotechnologia.* -1(60).- P.48-73.

18. Bochenek M., Smorag Z. (2005) Cattle sex regulation by separation of X and Y spermatozoa – preliminary results. *Medycyna Wet.* -61(1).- P.50-52.
19. Bochenek M., Laszczka A., Sławiński J., Skrzyszowska M., Szczęśniak-Fabiańczyk B. (1999) Integrity of bull sperm membranes double-stained with SYBR-14 and PI, assessed by fluorescent microscopy and flow cytometry // *Ann. Anim. Sci.* -No.26.- P.115-125.
20. Bochenek M., Smorag Z., Pilch J. (2001) Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination // *Theriogenology* .-56(4).- P.557-567.
21. Bochenek M., Herjan T., Okólski A., Smorag Z. (2006) Sperm chromatin abnormalities after semen sexing procedure – preliminary results. Editors: H.Alm, H.Torner and JF.Wade // *Havemeyer Foundation Series* .-No.18.- P.13-15.
22. Smorag Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E. (1978) Results of transplanting 3, 6 and 7 days old frozen sheep embryos // *Bull.L' Acad.Pol.Sci.*- 2, 26, 4.- P.273.
23. Smorag Z., Kątska L., Wierzchos E. (1981) Some factors affecting viability of mouse and cattle embryos frozen to -40°C before transfer to liquid nitrogen // *Anim. Reprod. Sci.* No.4.- P.65-72.
24. Smorag Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J.(1989) Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos // *Theriogenology* .-31(6).- P.1227-1231.
25. Gajda B., Smorag Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B. (1989) Transfer of vitrified sheep morula // *Zuchthygiene.*- No.24.- P.97-100.
26. Gajda B., Smorag Z., Wieczorek J.(2004) Piglets obtained after transplantation of vitrified pig embryos // *Medycyna Wet.*- 60 (4).- P.371-373.

БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ ТВАРИН – ОСНОВНИ ДОСЛІДЖЕННЯ БАЛІЦЬКОЇ ГРУПИ ВЧЕНИХ

доктор, проф. Здіслав Сморог, доктор, проф. Люцина Контська-Ксьонжкевич,
доктор Марія Скужишовська, доктор Яцек Юра, доктор Барбара Гайда,
доктор Міхал Бохенек, Державний науково-дослідний інститут зоотехніки,
Відділ біотехнології репродукції тварин, 32-083 Баліце (Краків, Польща)

У статті викладена інформація про основні напрями досліджень і результати експериментів, що проводяться Баліцькою групою дослідників у галузі біотехнології відтворення тварин.

Ключові слова: біотехнологія репродукції тварин, in vitro, клонування, трансгенез, проточна цитометрія, кріоконсервація ооцитів і ембріонів, велика рогата худоба, вівця, коза, свиня, кріль, домашня кішка.

LIVESTOCK TRENDS OF BALITZE SCIENTISTS & EXPERIMENTAL RESEARCH OF ANIMAL REPRODUCTION BIOTECHNOLOGY

Smorag Z., the doctor, professor; Kątska-Książkiewicz L., the doctor, professor;
Skrzyszowska M., the doctor; Yura J., the doctor; Gajda B., the doctor
Bohenek M., the doctor, The state scientific-research institute of zoo-technique
The animal reproduction biotechnology department, Balitze, Krakov, Poland

This article presents the data on the basic livestock trends of the Balitze scientists. This article also highlights the experimental research results on animal reproduction biotechnology.

Key words: animal reproduction biotechnology, in-vitro embryo development, cloning, trans-genesis, jet photometry freezing preservation of oocytes & embryos, cattle, sheep, goat, pig, rabbit, domestic cat.