

OCENA NASIENIA PODWÓJNIE TRANSGENICZNYCH KRÓLIKÓW Z INTEGRACJĄ GENÓW *WAPFuc* I *WAPhGH**

Piotr Gogol

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,
32-083 Balice k. Krakowa

*Celem badań było porównanie jakości nasienia podwójnie transgenicznych (geny *WAPFuc* i *WAPhGH*) i nietransgenicznych królików. Badania nad wpływem podwójnej transgenezy na cechy ilościowe i jakościowe nasienia królików nie były do tej pory wykonywane. Oceniano po 5 ejakulatów od 6 podwójnie transgenicznych i 6 nietransgenicznych królików rasy nowozelandzka biała. Ocena nasienia obejmowała określanie podstawowych parametrów nasienia (objętość ejakulatu, koncentracja plemników, liczba plemników w ejakulacie) oraz analizę aktywności ruchowej plemników przy użyciu komputerowego systemu analizy ruchu (CASA). Oceniano ruch całkowity (%), ruch postępowy (%) oraz prędkość plemników względem zarejestrowanego toru ($\mu\text{m/s}$). Nie stwierdzono istotnych różnic objętości ejakulatów oraz koncentracji i liczby plemników w ejakulacie. Analiza parametrów ruchu plemników również nie wykazała istotnych różnic pomiędzy samcami podwójnie transgenicznymi i nietransgenicznymi. Uzyskane wyniki wskazują na brak wpływu podwójnej transgenezy na podstawowe parametry nasienia oraz ruchliwość plemników królika.*

Słowa kluczowe: transgeneza, królik, jakość nasienia

Prace nad transgenezą zwierząt ukierunkowane są obecnie przede wszystkim na zastosowania biomedyczne zwierząt transgenicznych, takie jak tworzenie modeli chorób człowieka, ksenotransplantacja oraz wytwarzanie w organizmach zmodyfikowanych genetycznie zwierząt białek wykorzystywanych jako leki – czyli wykorzystywanie ich jako żywe bioreaktory. Zmodyfikowane zwierzęta z wprowadzonym obcym genem mogą produkować cenne białka we krwi, moczu, mleku lub nasieniu. Obecnie za najlepsze źródło rekombinowanych białek uznaje się mleko. W przypadku konstrukcji genowych mających ulegać ekspresji w gruczołach mlekowych zwierząt transgenicznych stosuje się sekwencje regulatorowe genów kodujących białka mleka.

* Praca finansowana z zadania nr 02-009.1.

Ekspresja takich genów występuje tylko w gruczołach mlekowych zwierząt w okresie laktacji i jest ograniczona do komórek gruczołu mlekowego. Obecność obcych białek nie powinna wówczas wpływać na organizm zwierzęcia.

Przykładem takiej modyfikacji ukierunkowanej na gruczoł mlekowy są uzyskane w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB podwójnie transgeniczne króliki z wbudowanym genem fukozylotransferazy (Fuc) (Jura i in., 2003) i genem hormonu wzrostu człowieka (hGH) (Lipiński i in., 2003). Oba te geny połączono z promotorem białka kwaśnej serwatki (WAP, Whey Acidic Protein). Zastosowanie tych konstruktów genowych miało na celu spowodowanie bakteriostatycznego działania mleka, poprzez wzbogacenie jego składu o białko enzymu fukozylotransferazy oraz uzyskanie w mleku hormonu wzrostu człowieka.

Dynamiczny rozwój badań nad wprowadzaniem genetycznych zmian organizmów na drodze transgenezy wymaga odpowiedzi na pytanie o jakość uzyskanego materiału genetycznego i wpływ na płodność. Zaburzenia rozrodu obserwowane były u transgenicznych myszy, świń i owiec (Bartke i in., 1992; Meliska i Bartke, 1997; Maleszewski i in., 1998). Należy jednak zaznaczyć, że obserwacje te dotyczą przede wszystkim zwierząt z wbudowanym genem o działaniu ogólnoustrojowym. Obniżona płodność lub bezpłodność samców transgenicznych związana była z zaburzeniami w zachowaniu płciowym lub wadami budowy i upośledzeniem funkcji plemników. Chrenek i in. (2007) nie stwierdzili wpływu transgenezy u królików na budowę histologiczną jąder i morfologię plemników. W badaniach własnych nie stwierdzono wpływu transgenezy na strukturę chromatyny plemników królika (Gogol i in., 2000). Badania nad wpływem podwójnej transgenezy na cechy ilościowe i jakościowe nasienia nie były do tej pory wykonywane.

Celem przeprowadzonych badań było porównanie jakości nasienia królików podwójnie transgenicznych i nietransgenicznych.

Material i metody

Badania przeprowadzono na nasieniu 6 samców podwójnie transgenicznych pokolenia F2 oraz 6 wybranych losowo samców nietransgenicznych rasy nowozelandzka biała w wieku 6–7 miesięcy. Zwierzęta utrzymywano pojedynczo w klatkach w pomieszczeniu zamkniętym w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB w Balicach. Króliki żywione były komercyjną pełnodawkową mieszanką granulowaną. Dostęp do paszy i wody był nieograniczony. Nasienie do oceny pobierano przy użyciu sztucznej pochwy, w odstępach tygodniowych w miesiącach styczeń i luty. Analizie poddano po 5 ejakulatów od samca. Bezpośrednio po pobraniu oceniano objętość ejakulatów, a następnie nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikiem Galap (IMV, Francja) w stosunku 1:10 i inkubowano przez 15 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Po inkubacji oceniano koncentrację i ruchliwość plemników.

Ocena wykonywana była przy użyciu komputerowego systemu analizy jakości nasienia (CASA) (Sperm Class Analyzer, S.C.A V5.1, Microptic, Barcelona, Spain). Bezpośrednio po dokładnym wymieszaniu nasienia próbka o objętości 3μl była umieszczana na ogrzonym standardowym szkiełku Leja (Leja Products B.V., The

Netherlands). Plemniki oceniano przy wykorzystaniu mikroskopu wyposażonego w urządzenie kontrastowo-fazowe i stolik podgrzewczy o temperaturze 37°C. Z każdej próbki nasienia analizowano minimum 500 plemników. Określano następujące parametry ruchu plemników: ruch całkowity (%), ruch postępowy (%), prędkość względem zarejestrowanego toru (VCL, $\mu\text{m/s}$).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica ver. 12.0. Istotność różnic pomiędzy grupami sprawdzano testem t.

Wyniki

Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy samcami podwójnie transgenicznymi i nietransgenicznymi w odniesieniu do badanych parametrów ilościowych i jakościowych nasienia. Wyniki przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Parametry nasienia królików podwójnie transgenicznych (2xTG) i nietransgenicznych (NTG) (n=60)

Table 1. Semen parameters of double transgenic (2xTG) and non-transgenic (NTG) rabbits (n=60)

Grupa Group	Nr samca No. of male	Objętość nasienia (ml) Semen volume (ml)	Koncentracja plemników (mln/ml) Sperm concentration (million/ml)	Całkowita liczba plemników w ejakulacie (mln) Total sperm count in the ejaculate (million)
2xTG	11	0,5±0,1	295,4±41,4	159,5±46,6
	19	1,0±0,3	332,2±106,5	345,5±136,5
	25	1,0±0,4	492,0±249,0	500,0±380,1
	32	0,8±0,2	745,0±124,7	581,1±183,3
	46	0,8±0,2	654,4±115,3	530,4±108,0
	48	0,8±0,2	424,2±113,2	315,9±72,6
	średnia mean	0,8±0,3	490,5±208,7	404,3±227,6
NTG	1	0,6±0,2	599,2±147,9	387,7±146,4
	4	1,1±0,3	424,2±127,2	488,8±266,0
	20	0,3±0,1	454,5±139,9	141,2±96,9
	30	1,6±0,5	364,6±154,1	575,0±314,2
	33	0,7±0,3	337,2±151,9	266,3±151,7
	44	1,0±0,21	217,0±36,1	223,5±62,6
	średnia mean	0,9±0,5	404,0±169,4	358,8±237,5

Tabela 2. Parametry ruchu plemników samców podwójnie transgenicznych (2xTG) i nietransgenicznych (NTG) (n=60)

Table 2. Sperm movement parameters of double transgenic (2xTG) and non-transgenic (NTG) rabbits (n=60)

Grupa Group	Nr samca No. of male	Ruch ogólny (%) General motility (%)	Ruch postępowy (%) Progressive motility	VCL ($\mu\text{m/s}$)
2xTG	11	66,8 \pm 3,4	26,4 \pm 9,1	37,8 \pm 10,3
	19	68,6 \pm 17,7	38,2 \pm 17,4	52,8 \pm 12,8
	25	89,0 \pm 5,5	74,0 \pm 9,62	70,4 \pm 13,8
	32	88,0 \pm 5,7	73,0 \pm 9,1	67,4 \pm 17,8
	46	78,0 \pm 18,9	63,0 \pm 19,2	57,8 \pm 14,1
	48	89,0 \pm 5,5	78,0 \pm 5,7	67,8 \pm 9,1
	średnia mean	79,9\pm14,1	58,8\pm23,0	59,0\pm16,7
NTG	1	87,0 \pm 9,1	76,0 \pm 10,8	81,6 \pm 3,2
	4	84,0 \pm 11,9	74,0 \pm 9,6	74,0 \pm 12,8
	20	93,3 \pm 9,0	70,8 \pm 26,2	63,3 \pm 18,8
	30	80,0 \pm 10,0	66,0 \pm 17,8	76,6 \pm 17,3
	33	55,0 \pm 28,3	29,0 \pm 33,6	39,8 \pm 11,0
	44	72,5 \pm 6,5	53,8 \pm 4,8	47,0 \pm 4,3
	średnia mean	78,3\pm18,4	61,5\pm24,8	64,3\pm19,7

VCL – prędkość względem zarejestrowanego toru.

VCL – curvilinear velocity.

Omówienie wyników

W prezentowanej pracy porównano wybrane parametry jakości nasienia samców podwójnie transgenicznych i nietransgenicznych rasy nowozelandzka biała. Generalnie parametry nasienia cechują się dużą zmiennością, a na ich wartości mają wpływ takie czynniki, jak rasa, cechy osobnicze, wiek, sezon, żywienie czy intensywność użytkowania rozplodowego (Castellini, 1996; Bodnar i in., 2000; Gogol i in., 2002; Fodor i in., 2003; Nizza i in., 2003).

Uzyskane objętości ejakulatów w grupie samców podwójnie transgenicznych i nietransgenicznych nie różniły się istotnie i mieściły się w zakresie prezentowanym przez Alvarino (2000) od 0,1 do 1,1 ml. Podobne wyniki uzyskali Chrenek i in. (2007), porównując objętości ejakulatów samców transgenicznych (0,62 ml) i nietransgenicznych (0,71 ml).

Bardzo zmiennym parametrem nasienia królika jest koncentracja plemników w ejakulacie. Może się ona wahać od 10 do ponad 1000 mln/ml (Alvarino, 2000). W prezentowanych badaniach koncentracja plemników mieściła się w tym przedziale i wahała się od 166 do 879 mln/ml. Koncentracja plemników, jak również całkowita liczba plemników w nasieniu samców podwójnie transgenicznych, była nieco wyższa

w porównaniu do samców nietransgenicznych, lecz różnice te nie były statystycznie istotne, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Chrenek i in. (2012). Odmienne wyniki uzyskali Chrenek i in. (2007), gdzie w grupie samców transgenicznych (jeden transgen) koncentracja plemników była istotnie wyższa w porównaniu z samcami nietransgenicznymi. Autorzy tłumaczą uzyskane wyniki zbyt niską liczbą przebadanych ejakulatów w grupie samców nietransgenicznych.

Ocena ruchu plemników jest podstawowym, najczęściej wykonywanym testem jakości nasienia. Wcześniejsze badania (Gogol, 2012) wskazują, że parametry ruchu plemników królika oceniane przy użyciu sytemu CASA są czułym wskaźnikiem jakości konserwowanego nasienia. Informacja uzyskana dzięki zastosowaniu komputerowo wspomaganą analizy jakości nasienia jest bogatsza i bardziej szczegółowa w porównaniu z konwencjonalną, subiektywną metodą mikroskopową. Dokładniejszy opis właściwości ruchowych plemników stwarza możliwość bardziej trafnego prognozowania zdolności zapładniającej nasienia. Główne zalety automatycznych systemów analizy nasienia to obiektywność oceny, możliwość określania równocześnie wielu parametrów ruchu oraz standaryzacji warunków badania. Umożliwia to kontrolę jakości oraz zapewnia porównywalność wyników uzyskanych w różnych laboratoriach. W przypadku nasienia królika badania wskazują na możliwość wykorzystania systemu CASA w przewidywaniu zdolności zapładniającej plemników (Lavara i in., 2005; Quintero-Moreno i in., 2007). Do parametrów o największym znaczeniu przy określaniu jakości nasienia i jego zdolności zapładniającej można zaliczyć ruch całkowity, ruch postępowy oraz prędkość plemników względem zarejestrowanego toru (Farrell i in., 1993; Lavara i in., 2005; Gogol, 2012).

Uzyskany w prezentowanej pracy odsetek plemników ruchliwych (ruch całkowity i postępowy) był zbliżony w grupie samców podwójnie transgenicznych i nietransgenicznych i podobny do uzyskanego we wcześniejszych badaniach na nasieniu królików nietransgenicznych (Gogol, 2012; Gogol i in., 2014). Wyższą ruchliwość plemników królików transgenicznych w porównaniu z nietransgenicznymi (65% vs 54%) stwierdzili Chrenek i in. (2007). Ocena ruchliwości była jednak wykonywana metodą subiektywną, która obarczona jest dużym błędem.

Stwierdzona w niniejszej pracy prędkość plemników względem zarejestrowanego toru była nieco wyższa w grupie samców nietransgenicznych, lecz różnica była statystycznie nieistotna. Uzyskane wartości tego parametru były niższe w porównaniu z uzyskanymi we wcześniejszych badaniach na królikach nietransgenicznych (Gogol, 2012; Gogol, 2013), co mogło być spowodowane zastosowaniem w niniejszej pracy krótszego (15 minut vs 30 minut) okresu inkubacji plemników przed wykonaniem pomiaru i/lub wpływem sezonu.

Podsumowując, uzyskane w prezentowanej pracy wyniki świadczą, że obecność konstruktów genowych *WAPFuc* i *WAPhGH* w genomie podwójnie transgenicznych królików nie spowodowała zaburzeń w przebiegu spermatogenezy prowadzących do zmian liczby produkowanych plemników i ich ruchliwości. Wartości badanych parametrów nasienia mieściły się w zakresie normalnych wartości dla rasy nowozelandzka biała.

Piśmiennictwo

- Alvarino J.M.R. (2000). Reproductive performance of male rabbits. Proceedings of the Seventh World Rabbit Congress, Valencia, 4–7 July 2000, pp. 13–35.
- Bartke A., Naar E.M., Johnson L., May M.R., Cecim M., Yun J.S., Wagner T.E. (1992). Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice. *J. Reprod. Fertil.*, 95: 109–118.
- Bodnar K., Szendro Z., Nemeth E.B., Eiben C., Radnai I. (2000). Comparative evaluation of abnormal spermatozoa in Pannon White, New Zealand White and Angora rabbit semen. *Arch. Anim. Breed.*, 43 (5): 507–512.
- Chrenek P., Trandzik J., Massanyi P., Makarevich A., Lukac N., Peskovicova D., Paleyanda R. (2007). Effect of transgenesis on reproductive traits of rabbit males. *Anim. Reprod. Sci.*, 99 (1–2): 127–134.
- Chrenek P., Makarevich A.V., Simon M. (2012). Viability and apoptosis in spermatozoa of transgenic rabbits. *Zygote*, 20 (1): 33–37.
- Farrell P.B., Foote R.H., Simkin M.E., Clegg E.D., Wall R.J. (1993). Relationship of semen quality, number of sperm inseminated, and fertility in rabbits. *J. Androl.*, 14: 464–471.
- Fodor K., Zoldag L., Fekete S.G., Bersenyi A., Gaspard A., Andrasofszky E., Kulcsar M., Eszes F., Shani M. (2003). Influence of fecundity intensity on the growth, body composition and sexual maturity of male New Zealand White rabbits. *Acta Vet. Hung.*, 51 (3): 305–319.
- Gogol P. (2012). Wpływ przechowywania nasienia królika na parametry ruchu i zdolność zapładniającą plemników. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 19 (1): 97–104.
- Gogol P. (2013). Motility parameters and intracellular ATP content of rabbit spermatozoa stored for 3 days at 15°C. *Folia Biologica (Kraków)*, 61 (1–2): 87–91.
- 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 spermatozoa chromatin structure. *Reprod. Dom. Anim.*, 37 (2): 92–95.
- Gogol P., Trzcńska M., Bryła M. (2014). Motility, mitochondrial membrane potential and ATP content of rabbit spermatozoa stored in extender supplemented with GnRH analogue [des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH ethylamide. *Pol. J. Vet. Sci.*, 17 (4): 571–575.
- Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Karetka W., Kopchick J.J., Kelder B., Prieto P.A. (2003). Ekspresja genu WAP-Fuc u transgenicznych zwierząt gospodarskich – efektywność transgenezy przy zastosowaniu metody mikroiniekcji. *Biotechnologia*, 1: 216–222.
- Lavara R., Mocé E., Lavara F., Viudes de Castro M.P., Vicente J.S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64: 1130–1141.
- Lipiński D., Jura J., Kalak R., Pławski A., Kala M., Szalata M., Jarmuz M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Groniek P., Smorąg Z., Pieńkowski M., Słomski R. (2003). Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk. *J. Appl. Genet.*, 44 (2): 165–174.
- Maleszewski M., Kuretake C., Evenson D., Yanagimachi H., Bjordahl J., Yanagimachi R. (1998). Behavior of transgenic mouse spermatozoa with galline protamine. *Biol. Reprod.*, 58: 8–14.
- Meliska C.J., Bartke A. (1997). Copulatory behavior and fertility in transgenic male mice expressing human placental growth hormone gene. *J. Androl.*, 18: 305–311.
- Nizza A., Di Meo C., Taranto S. (2003). Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 436–443.
- Quintero-Moreno A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. (2007). Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod. Domest. Anim.*, 42: 312–319.

PIOTR GOGOL

Evaluation of semen from double transgenic rabbits with integrated WAPFuc and WAPhGH genes

SUMMARY

The aim of the study was to compare semen quality of double transgenic (WAPFuc and WAPhGH genes) and non-transgenic rabbits. The effect of double transgenesis on quantitative and qualitative traits of semen has not been studied to date. Five ejaculates were examined each from 6 double transgenic and 6 non-transgenic rabbits of the New Zealand White breed. The evaluation of semen involved determination of basic semen parameters (ejaculate volume, sperm concentration, sperm count in the ejaculate) and analysis of sperm motility using computer-assisted semen analysis (CASA). Total motility (%), progressive motility (%) and sperm velocity along its path ($\mu\text{m/s}$) were recorded. No significant differences were found for ejaculate volume as well as sperm concentration and sperm count in the ejaculate. The analysis of sperm motility parameters also did not show any significant differences between the double transgenic and non-transgenic males. Our results showed that double transgenesis has no effect on basic semen parameters and sperm motility in rabbits.

Key words: transgenesis, rabbit, semen quality