

Znaczenie niskich temperatur dla długotrwałego przechowywania nasienia ludzi i zwierząt, było już dostrzegane w drugiej połowie XIX w. Dobrze rozumiano, że zahamowanie procesów biochemicznych może pozwolić na okresowe zatrzymanie życia komórek. Jednakże stosowane wówczas metody zamrażania nasienia, w czasie których następowała krystalizacja wody, prowadziły do niszczenia struktur komórkowych. Badania prowadzone były w dwóch głównych kierunkach, a mianowicie – 1) odwadniania komórek i następnie bardzo szybkiego zamrażania, tak aby uzyskać bezpostaciowe wymrażanie wody, które nie uszkadzałoby struktur komórkowych (witryfikacja) oraz 2) poszukiwania środków osłaniających komórki w procesie mrożenia. Obie drogi nie przyniosły rezultatów. Taki stan trwał prawie do końca lat czterdziestych, kiedy to Christopher Polge odkrył znaczenie glicerolu jako środka osłaniającego w procesie zamrażania nasienia. Szczególnie podatne na zamrażanie okazało się nasienie buhaja. Zastosowano tu metodę opracowaną przez Polge i Lovelock (1). Wyniki zostały potwierdzone uzyskaniem zacieleń po inseminacji nasieniem mrożonym na poziomie fizjologicznym dla bydła (2,3).

Osiągnięcie to stanowiło podstawę i punkt wyjścia do wszystkich następnych poczyniń z zakresu kierowania rozrodem zwierząt, a przede wszystkim dla konstruowania programów postępu hodowlanego, opartych na wykorzystaniu potencjału genetycznego samca. Znaczenie odkrycia osłaniającej roli glicerolu w procesie zamrażania komórek, zostało z czasem opracowane i wykorzystane w odniesieniu także do innych materiałów biologicznych oraz do nasienia i zarodków różnych gatunków zwierząt, w tym także i człowieka. Pod koniec lat pięćdziesiątych ciekły azot – jako środek chłodzący – został wprowadzony do praktyki konserwacji materiałów biologicznych. Zadecydowały o tym właściwości fizyczne i chemiczne ciekłego azotu, który jest środkiem tanim, stosunkowo łatwym w użyciu, nie stwarzającym większego niebezpieczeństwa dla obsługi, dającym tak niską temperaturę, że materiały biologiczne mogą być przechowywane w nim praktycznie przez czas nieograniczony. Ciekły azot ma temperaturę -196°C , a już poniżej -130°C zjawiska biochemiczne ulegają zahamowaniu. Istotne jest pytanie odnośnie do wpływu zjawisk fizycznych, takich jak napromieniowanie. Najwyższa dawka promieniowania zastosowana w doświadczeniu Lyon i wsp. (4), odpowiadająca napromieniowaniu, które może być akumulowane w ciągu 400–500 lat, powodowała tylko nieznaczny spadek przeżywalności zarodków. Według kalkulacji Ashwood–Smith i Grant (5) odnoszących się do materiałów biologicznych przechowywanych w ciekłym azocie, dopiero po około 32 000 lat mogłoby dojść do zniszczeń lub uszkodzeń chromosomów, odpowiadających tym, jakie następują po niszczącym napromieniowaniu rentgenowskim w temperaturze 22°C . Praktycznie, czas przechowywania materiałów biologicznych w temperaturach poniżej -130°C wydaje się nieograniczony. Testem biologicznym jest powszechnie stosowana praktyka używania nasienia buhajów – sprawdzonych na podstawie użyteczności potomstwa po 5–7-letnim okresie jego przechowywania – przy zachowaniu takiej płodności, jaką się uzyskuje po nasieniu świeżym. Sporadycznie, bo nie ma to praktycznego znaczenia ze względów hodowlanych, ukazują się informacje o urodzeniu cieląt po inseminacji nasieniem przechowywanym, np. 20 lat (6). W rezultacie, przechowywanie w temperaturze ciekłego azotu można uważać za sprawdzoną metodę konserwacji materiałów biologicznych. Spadek wartości biologicznej nasienia i zarodków mrożonych, średnio o 20–30% w stosunku do świeżych (z wyjątkiem nasienia buhaja i kozła), należy tłumaczyć nie opanowaną jeszcze w zadowalającym stopniu technologię zamrażania i rozmrażania nasienia innych gatunków poza bydłem i kozami. W rezultacie, podczas zamrażania obecnie dostęp-

nymi metodami, dochodzi do uszkodzeń względnie zniszczeń struktur komórkowych, które stanowią przyczynę powstających strat, obejmujących część zamrożanego materiału. Tym niemniej, praktyczna przydatność metody długotrwałej konserwacji w stanie zamrożonym izolowanych materiałów genetycznych jest tak duża, że mimo tych strat, mających jeszcze miejsce w odniesieniu do materiału genetycznego większości gatunków, zamrażanie nasienia i zarodków znajduje coraz szersze zastosowanie praktyczne. Jednym z takich zastosowań jest tworzenie rezerw materiałów genetycznych zanikających ras i gatunków.

Zanikanie mniej wydajnych ras zwierząt gospodarskich jest oczywistym następstwem wprowadzania ras bardziej wydajnych. Jest to w obecnym świecie proces naturalny, którego nie można zatrzymać. Lokalne rasy mają jednak pewne szczególnie wartości wynikające z wielowiekowego procesu adaptacyjnego, zachodzących mutacji etc. i wartości te należy zachować, stosując metody, które pozwolą na ich odtworzenie, gdy znajdzie taka potrzeba. Zanika również coraz więcej gatunków zwierząt żyjących dziko, zubożając środowisko. Skala i tempo zanikania ras i typów zwierząt gospodarskich przybrała tak alarmujące rozmiary, że zostały podjęte przeciwdziałania zarówno przez poszczególne państwa, jak i międzynarodowe organizacje (FAO, UNEP, IUNC, UNESCO, WWF). Zaczęto tworzyć banki danych (*Data Bank*) dla zbierania charakterystyk istniejących zasobów zwierzęcych w skali globalnej. Najtrudniejszy jest jednak fizyczny problem utrzymania i zachowania rezerwy genetycznej ras i typów zwierząt, które już prawie zanikły, właśnie zanikają, albo grozi im to w ciągu najbliższych lat.

Istniejącą sytuację najlepiej określi kilka przykładów. W Anglii, która jest – jak wiadomo – ojczyzną tak wielu ras zwierząt domowych, z sześciu obecnie głównych, tamtejszych ras bydła tylko dwie (*Hereford* i *Aberdeen-Angus*) są angielskiego pochodzenia, a jako zagrożone i wymagające w związku z tym szczególnej ochrony wlicza się 13 ras bydła, 15 ras owiec, 2 rasy kóz, 7 ras koni i 7 ras świń (7,8). Realizowany na Węgrzech program zabezpieczenia rezerwy genetycznej rodzimych ras zwierząt gospodarskich, obejmuje jedną rasę bydła, jedną bawołów wodnych, trzy rasy owiec, jedną rasę świń, sześć ras koni oraz kilka ras drobiu i psów (9). W ZSRR już zanikły całkowicie, albo są w okresie zanikania: 34 rasy bydła, 25 owiec i 13 świń (10). W Polsce zanikła owca świniarka, a lepsza przyszłość dopiero w ostatnich latach zarysowała się przed prawie ginącą już owcą wrzosówką. Zagrożona jest też jedyna rodzima rasa bydła, mianowicie polskie bydło czerwone.

Tworzenie rezerw genetycznych jest możliwe przy zastosowaniu dwóch systemów: 1) gdy tworzy się stada zachowawcze, 2) gdy gromadzi się określone ilości nasienia i zarodków. Syntetyczną kalkulację stosowania tych systemów wraz z oceną ich zalet i wad, przeprowadził Smith (11). Nie wchodząc w szczegółowe rozważania dotyczące tworzenia takich rezerw od strony genetycznej, trzeba zastanowić się nad walorami organizacyjnymi i technicznymi obu możliwości. Otóż utrzymywanie stad zachowawczych, ze względu na nieokreślony zwykle długi czas trwania takiego przedsięwzięcia, jest zarówno kosztowne, jak i wymaga ogromnej konsekwencji w postępowaniu. Niewielkie z konieczności stada, będą przy tym zawsze narażone na różnego rodzaju niebezpieczeństwa. Natomiast zgromadzenie wymaganej ilości nasienia i zarodków, wiąże się oczywiście ze znacznym wysiłkiem finansowym i organizacyjnym, ale samo przechowywanie ich jest już postępowaniem stosunkowo tanim, nie narażonym na większe ryzyko i nie wymagającym szczególnych działań organizacyjnych. Przyjęcie pierwszej czy drugiej formy organizacyjnej musi jednak wynikać z uwarunkowań lokalnych. Za celowością istnienia tych dwóch metod przemawia na pewno przypadek jaki miał miejsce w 1989 r. w Jackson Laboratory, gdzie pożar zniszczył wiele wyselekcjonowanych szczepów myszy. Licząc się z podobną sytuacją, a także mając na uwadze koszt i uciążliwość utrzymywania tak licznych szczepów, przyjęto metodę odtwarzania potrzebnych linii z zamrożonych zarodków. W Jackson Laboratory postępuje się w ten sposób już od 1978 r. (12).

W naszych warunkach, gdy w grę wchodzi stosunkowo bardzo niewielka liczba ras, racjonalne wydaje się połączenie obu sposobów, co zresztą zostało już zrobione, gdyż zarówno istniejąca stada zachowawcze bydła czerwonego polskiego, jak i owcy wrzosówki, a równocześnie gromadzone są zapasy nasienia i zarodków (13). Kombinowany system tworzenia rezerwy

genetycznej jest stosowany również w Związku Radzieckim. Każda strefa geograficzna ma stada zachowawcze swoich ras, a przy Instytucie Cytologii i Genetyki w Nowosybirsku zostało utworzone centralne – dla całego kraju – stado zachowawcze. Równoległe gromadzone jest nasienie po około 5000 porcji od buhaja (10).

Tworzenie rezerw genetycznych w postaci zamrożonego nasienia i zarodków jest metodą z wyboru dla krajów rozwijających się, gdyż utrzymywanie stad zachowawczych jest tam z różnych powodów prawie niemożliwe. Ponieważ techniczna strona przedsięwzięcia też nastęrcza trudności, pomagają w tym wyspecjalizowane organizacje międzynarodowe, przede wszystkim FAO. W ten sposób powstał w 1988 r. pierwszy regionalny bank genów zwierzęcych (*Regional Animal Gene Bank*) w Ameryce Południowej z ośrodkami w Argentynie i Brazylii. W obu tych centrach gromadzone są zarodki i nasienie zagrożonych ras Południowej Ameryki. Podobne regionalne banki genów zwierzęcych mają wkrótce powstać w Afryce i Azji. Natomiast w RFN został utworzony bank danych dla ewidencji zasobów genetycznych europejskich ras zwierząt. Z czasem bank ten ma zgromadzić dane o zasobach genetycznych zwierząt z całego świata, przekształcając się w Światowy Bank Danych Zasobów Genetycznych Zwierząt (EAAP/FAO – *Global Animal Genetic Resources Data Bank*). Powstają w ten sposób dwa równoległe i uzupełniające się systemy, których celem jest zabezpieczenie istniejącej substancji genetycznej zwierząt gospodarskich: banki materiałów genetycznych i banki danych charakteryzujących istniejące rasy (14).

Tworzenie rezerw genetycznych z izolowanego materiału genetycznego stwarza jednak ryzyko infekcji, co musi być brane pod uwagę, w celu stosowania właściwych środków zapobiegawczych. Metody stosowane przy mrożeniu nasienia i zarodków prowadzą do równie skutecznego zamrażania drobnoustrojów znajdujących się w nasieniu, na powierzchni zarodków, czy też w płynach używanych do konserwacji i hodowli. Niektóre składniki tych płynów są pochodzenia zwierzęcego (jaja, mleko, albuminy, surowica krwi). Stosowany powszechnie dodatek antybiotyków do nasienia należy uważać za sposób redukujący tylko ryzyko przeniesienia infekcji za pośrednictwem nasienia i to jedynie w stosunku do zakażeń bakteryjnych. W stosunku do infekcji wirusowych stanowiących główne niebezpieczeństwo, dodatek antybiotyków nie stanowi żadnego zabezpieczenia. Nie ma jeszcze żadnego pewnego sposobu neutralizacji czynnika zakaźnego, jeżeli ten znajdzie się w środowisku zamrożonego nasienia czy zarodków. Trzeba też brać pod uwagę zmiany, jakie mogą zachodzić w środowisku, i że obojętne obecnie mikroorganizmy, za lat kilkadziesiąt wprowadzone do zmienionego otoczenia, mogą stanowić potencjalne niebezpieczeństwo.

Główny problem stanowi ryzyko zakażenia za pośrednictwem nasienia. Wynika to z faktu, że wszystkie wywoływacze chorób infekcyjnych, stanowiących główne zagrożenie epizootyczne, są wydalane z nasieniem. Natomiast zarodek do czasu wylęgnięcia się na 8–9 dzień, jest chroniony nieprzenikliwą dla drobnoustrojów osłonką przejrzystą. Ze znajomości tych faktów wynikają zasady prewencji sanitarno-weterynaryjnej, które muszą być stosowane przy tworzeniu zasobów nasienia i zarodków, przewidzianych do długotrwałego przechowywania jako rezerw genetycznych.

Nasienie musi pochodzić od samców uznanych za wolne od nosicielstwa wszystkich wywoływaczy chorób zakaźnych, specyficznych dla danego gatunku, czyli wg nomenklatury angielskiej *Specific Pathogen Free* (SPF). Nasienie też musi być wolne od warunkowo-patogennych drobnoustrojów, a także liczba wszechobecnych bakterii musi się mieścić w granicach ustalonych przepisami.

Zarodki przedstawiają znacznie mniejsze ryzyko przeniesienia infekcji, ale również i w tym wypadku muszą być stosowane przepisy OIE przewidujące, że *zona pellucida* zarodków nie może być uszkodzona, a następnie, że zarodki muszą być poddawane 10-krotnemu płukaniu dla usunięcia drobnoustrojów, które ewentualnie mogły się przykleić do osłony przejrzystej. Musi też być gwarancja, że wszystkie składniki pochodzenia zwierzęcego, stosowane do produkcji płynów używanych do wypłukiwania i przechowywania zarodków, muszą pochodzić od zwierząt SPF.

Na zakończenie można, jak się wydaje, stwierdzić, że następuje uświadomienie sobie skutków postępującej ekspansji ludzkiej i zaczyna się stosować metody, które mogą uratować dla przyszłych pokoleń bodaj część bogactwa ginącego świata zwierzęcego.

Literatura

1. Polge C., Lovelock J. E., (1952), *Vet. Rec.*, 64, 396.
2. Polge C., Rowson L. E. A., (1952), *Nature*, London, 169, 626.
3. Polge C., Rowson L. E. A., (1952), *Vet. Rec.*, 64, 851.
4. Lyon M. F., Glenister P. H., Wittingham D. G., Long-term viability of embryos stored under irradiation, in: "Frozen storage of laboratory animals" (1980), Red. G. H. Zeilmaker, Gustaw-Fisher Verlag, Stuttgart, New York, 139.
5. Ashwood-Smith M. J., Grant E., (1977), Genetic stability in cellular stored in the frozen state, in: The freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation Symp. 52. Elsevier Excerpta Medica, North Holland, 251.
6. H. L. (Anon.) (1975), *K. B. Mitteilungen des Schweiz. Verbandes für K. B.*, 13, 105.
7. Alderson L., (1985), *Animal Genetic Resources Information*, 4, 26.
8. Alderson L., (1986), *Animal Genetic Resources Information*, 5, 1.
9. Bodó I., (1985), *Animal Genetic Resources Information*, 4, 16.
10. Dmitrijew N. G., (1987), *Animal Genetic Resources Information*, 6, 13.
11. Smith Ch., (1984), *Animal Genetic Resources Information*, 3, 10.
12. Mobraaten L. E., (1981), The Jackson Laboratory genetics stocks resource repository, in: Frozen storage of laboratory animals, Red. G. H. Zeilmaker, Gustaw-Fisher Verlag, Stuttgart, New York, 165.
13. Wierzbowski S., (1987), Experience in application of embryo and semen freezing to establish a reserve of genetic material. *FAO Animal Production and Health Paper*, 66, 199.
14. Hodges J., (1989), *Animal Genetic Resources. Circular Letter of FAO/UNEP Expert Panel Secretary.*

Creation of genetic reserves of endangered species and breeds as a must

Summary

The creation of animal genetic resources has become a must in the present situation when growing number of domestic breeds and wild living species are endangered. Methods of the organisation of gene banks are discussed with special attention paid to the conservation of the isolated genetic materials.

Stefan Wierzbowski, Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa.

NOWOŚCI!

Własność intelektualna

W styczniu 1989 r. ukazał się pierwszy numer pisma „Intellectual Property in Business” poświęconego problemom prawnym własności intelektualnej i ochronie patentowo-prawnej osiągnięć umysłowych. Zagadnieniem podstawowym, przewodnim, pierwszego numeru nowego pisma naukowego jest biotechnologia w aspekcie problemu ochrony praw autorskich. Wydawca uzasadnia swój wybór tej tematyki dla inauguracyjnego zeszytu dwoma podstawowymi faktami: w roku 2000 światowy rynek biotechnologiczny będzie reprezentował wartość minimum 40 miliardów USD natomiast problemy prawne i patentowe są bardzo skomplikowane i niejednoznaczne (np. w odniesieniu do ochrony patentowej genetycznie modyfikowanych żywych organizmów).

T.T

Opracowano na podstawie: (1989), January, *Intellectual Property in Business*, 1, 1.