

ANDRZEJ LEDWOŻYW, ADAM KADZIOLKA

## Zwierzęta transgeniczne

Zakład Patofizjologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

W wyniku zapłodnienia, rodzice przekazują połowę swoich genów potomstwu. Geny te stają się integralną częścią nowego organizmu i odpowiadają za determinację jego cech. Niezależna segregacja chromosomów w czasie mejozy i ich rekombinacja w powstającym organizmie potomnym, zapewnia zróżnicowanie genetyczne pomiędzy poszczególnymi osobnikami danego gatunku. Rozmnażanie płciowe zapewnia więc zarówno podobieństwa, jak i pewne różnice. Dobór naturalny w obrębie tej zmienności jest podstawą ewolucji; selekcja sztuczna umożliwia dobór cech zwierząt hodowlanych uznanych za najbardziej wartościowe przez hodowców.

Szybkość odpowiedzi na selekcję danej cechy zależy bezpośrednio od zmienności genetycznej w populacji. Dowodem tego jest wzmożona odpowiedź na dobór sztuczny w populacjach *Drosophila melanogaster* z cząstkami transpozycyjnymi w porównaniu z populacjami bez tych cząstek (22). Inhibitory cytoplazmatyczne zapobiegają ruchowi elementów transpozycyjnych P u zwierząt typu P, lecz nie M. Nowe odmiany indukowane krzyżowo, gdzie matka jest typu M, zaś ojciec typu P, dają dwukrotnie wyższą odpowiedź w tej populacji dysgeniczej w porównaniu z populacją niedysgeniczną. Przeciwnie, rozmnażanie niepłciowe (klonowanie) usuwa zmienność genetyczną pomiędzy poszczególnymi osobnikami. Można w ten sposób zapobiegać zmianom i zapewniać replikację istniejących wartościowych genotypów.

Technika rekombinacji DNA i technologia przeszczepiania zarodków otworzyły drogę wprowadzania specyficznych genów u zwierząt (9), ich ekspresji (3, 36, 37) i transmisji do następnych pokoleń (5, 8). Zwierzęta noszące nowe geny nazywane są zwierzętami transgenicznymi. Ostatnie osiągnięcia w poznaniu struktury i ekspresji genów oraz możliwości ingerowania w ich strukturę umożliwiają sterowanie zmiennością w pożądanym kierunku. Reprodukacja transgeniczna może uczynić zwierzęta ilościowo i jakościowo bardziej wartościowymi, wzmagając szybkość lub stopień adaptacji.

Poprzez wykorzystanie superowulacji i przeszczepiania zarodków można wpływać na decydowanie o stopniu odpowiedzi na daną cechę w sztucznej selekcji bydła opasowego. U bydła mlecznego można uzyskać odpowiedź w małym stadzie, nie różniącą się od wyników uzyskanych na podstawie szerokich programów bazujących na ocenie potomstwa (19,

26). U owiec i kóz technika ta dała zadowalające efekty (31), klonowanie natomiast miało mały wpływ (7).

Technikę transferu genów można podzielić na trzy zasadnicze grupy: mikroiniekcji, infekcji wektorami retrowirusowymi i transferu komórek pnia.

Najbardziej rozpowszechnioną metodą otrzymywania ssaków transgenicznych jest mikroiniekcja DNA do przedjądrza zapłodnionej komórki jajowej. Duże ilości komórek jajowych otrzymuje się zwykle w jednym cyklu rujowym po sprowokowanej superowulacji. Są one unieruchamiane przez przyssanie do pipety o tępy końcu. Do jednego z przedjądrzy zanurza się delikatnie mikropipetkę zawierającą kilka tysięcy do kilkuset cząsteczek DNA. Przeżywające komórki jajowe są wszczepiane matkom zastępczym, u których następuje dalszy ich rozwój. Pewna część zwierząt pochodzących z komórek jajowych poddanych iniekcji, może być nosicielami nowych genów. Zwierzęta transgeniczne najczęściej posiadają wprowadzone geny we wszystkich komórkach. Zintegrowany DNA jest zazwyczaj obecny w wielu kopiach jako powtórzenie tandemowe wbudowane w pojedynczy locus.

Obecność genu we wszystkich komórkach jest prawdopodobnie wynikiem integracji przed pierwszym podziałem. Praktycznym następstwem tego jest fakt, że transmisja do nowego pokolenia jest bardzo sprawna. Postępowanie to jest zdecydowanie skuteczne w przypadku myszy, u których 20% komórek jajowych przeżywa iniekcje i transfer. Powstaje wówczas potomstwo, będące w 25% nosicielami nowych genów (4). Mikroiniekcje były też stosowane do otrzymania transgenicznych królików, świń i owiec (13), jednak liczba zarodków, które rozwinęły się w transgeniczne młode była niższa. Zamieranie zarodków było spowodowane uszkodzeniem fizycznym w czasie iniekcji, nieprawidłowościami w przeszczepianiu, albo letalnym uszkodzeniem genetycznym wskutek wprowadzenia genu w nieodpowiednie miejsce.

Mikroiniekcje stosuje się często u zwierząt gospodarskich, których komórki jajowe są nieprzejrzyste, co utrudnia dostrzeżenie jądra. U owiec wymaga się uważnego mikroskopowania z zastosowaniem kontrastowania interferencyjnego (13). Przedjądrza świni można uwidocznić metodą wirowania komórek jajowych (39).

Transfer genów na drodze mikroiniekcji komórek jajowych wymaga dużej ich liczby i określonego stopnia rozwoju. Metoda ta jest bardzo pracochłonna i czasochłonna u dużych zwierząt, toteż poszukuje się innych dróg, które mogłyby wzmocnić skuteczność inkorporacji genu. Jedną z nich może być wykorzystanie wektorów retrowirusowych.

Genom retrovirusów zbudowany jest z RNA, który po infekcji komórki jest kopiowany w DNA i wbudowywany następnie do chromosomu. Infekcja i wbudowywanie są bardzo wydajne (13). Wektory retrowirusowe konstruowane są w ten sposób, aby były zdolne do przenoszenia sekwencji niewirusowych, a zarazem mogły zakażać komórki i integrować się z ich genomem, jednak bez zdolności do replikacji. Takie wektory mogą wprowadzać nowe geny do potomstwa przy nieznacznej manipulacji zarodkami, bez konieczności wykonywania zabiegu na dużej liczbie zarodków. Mimo, że jak dotąd nie uzyskano w pełni zadowalających rezultatów, badania na myszach wskazują, że kierunek ten zasługuje na kontynuację (15, 35). Niedogodnością tej metody jest fakt, że wymaga ona współinfekcji z zakaźnym wirusem pomocniczym. Wymaga ona też komórek jajowych w stadium podziału, tym samym powstające zwierzęta transgeniczne mogą być mozaikowe, linia potomna staje się chimeryczna i transmisja genów mniej efektywna. Jednak w przeciwieństwie do techniki mikroiniekcyjnej, geny transferowane przy użyciu wektorów retrowirusowych są wbudowywane w postaci pojedynczych kopii.

Komórki pnia pochodzące z zarodka są komórkami multipotencjalnymi, izolowanymi z wewnętrznej warstwy komórek blastocyst (6, 23). Mogą one rosnąć *in vitro* przez długi czas i następnie być wprowadzane do blastocysty. Wprowadzone komórki wydajnie kolonizują wewnętrzną masę komórek blastocysty i biorą udział w rozwoju zwierzęcia, które staje się mozaikowe pod względem komórek pochodzących z blastocysty macierzystej i wprowadzonych komórek pnia (2). Wprowadzone komórki pnia uczestniczą zarówno w kształtowaniu komórek somatycznych, jak i rozrodczych. Korzyścią płynącą z tego sposobu jest możliwość wprowadzania genów do komórek pnia *in vitro*. Komórki po manipulacji genetycznej można selekcjonować i charakteryzować bezpośrednio następnie wprowadzać do blastocysty tylko te, które posiadają zadowalającą charakterystykę. Tą drogą otrzymano mozaikowe zwierzęta transgeniczne (21, 38). Wykazano też ekspresję genów wprowadzonych tą drogą (21), jakkolwiek o przekazywaniu tych cech w linii potomnej brak jest bliższych danych. Nadal brak jest doniesień o liniach komórek pnia pochodzących z zarodków izolowanych od innego gatunku niż myszy.

Możliwości manipulacji fenotypami zwierząt tkwiące w transferze genów wykazano najdobitniej na „gigantycznych” myszach (28). Zwierzęta te były nosicielami genu metalotioneina (hormon wzrostu szczura) i osiągnęły w 74 dniu życia ciężar 1,9 razy większy niż myszy kontrolne, nietransgeniczne. U myszy tych hormon wzrostu szczura syntetyzowany był pod kontrolą promotora metalotioneiny w wątrobie, miejscu ektopowym syntezy hormonu wzrostu. Ektopowa ekspresja genu nie jest wrażliwa na mechanizmy sprzężenia zwrotnego, działające w normalnych warunkach. W konsekwencji stężenie hormonu wzrostu u tych myszy było 700 razy większe niż u zwierząt kontrolnych. Podobne wyniki uzyskano u myszy wykazujących wysoki poziom ludzkiego (29) lub bydłowego (11) hormonu wzrostu. Wtórny efekt nie normalnie wysokiego poziomu hormonu wzrostu jest częsta niepłodność u samic (10, 11). Otrzymano też myszy wykazujące ekspresję czynnika uwalniającego hormon wzrostu człowieka pod kontrolą promotora metalotioneiny (12). Podwyższone stężenie tego czynnika stymulowało syntezę hormonu wzrostu w przysadce, właściwym miejscu jego syntezy. Postępowanie takie nie wywoływało niepłodności samic.

Oprócz wyżej przytoczonych przykładów, wskazujących na możliwości ich zastosowania u przeżuwaczy, uzyskano cały szereg innych danych przy użyciu myszy transgenicznych, dotyczących regulacji ekspresji genów, onkogenezy i regulacji genów kontrolujących syntezę immunoglobulin (27).

Dodatkowe geny powinny potencjalnie prowadzić do syntezy dodatkowych białek. Kierunki współczesnych badań winny więc koncentrować się na możliwościach wprowadzania genów dla nowych białek lub na produkcji białek istniejących w większych ilościach w różnych tkankach lub też w różnym czasie. Białka działają jako sygnały (hormony), enzymy, lub tworzą określone elementy strukturalne, jak wełna, mięso lub mleko. Wzmocnienie syntezy hormonu wzrostu w czasie laktacji może spowodować np. wzrost wydajności mlecznej.

Wiele reakcji enzymatycznych składa się z licznych etapów, z których każdy zależy od wpływu innego enzymu. Cykl reakcji nie jest wrażliwy na zmiany aktywności poszczególnych enzymów. Odwrotnie, selekcja tych zespołów enzymatycznych w szlaku przemian biochemicznych, może wzmacniać ekspresję fenotypów; przykładem mogą tu być enzymy syntezy NADP, których wysoki poziom jest dodatnio skorelowany z grubością tłuszczu grzbietowego u świni (25). Staje się więc konieczne zastosowanie współczesnych technologii do zbudowania systemu kodowania niektórych enzymów. Zastosowanie technologii transgenicznej do wzmocnienia szybkości konwersji substratu w

produkt zależy od rozwoju konstrukcji multigenowych.

W obrębie trzeciej klasy produktów genów znajdują się określone białka, np. mięśni, wełny i mleka. Spośród tej grupy produktów, tylko białka mleka i wełny są ściśle określone, ponieważ białka mięśni podlegają stale cyklicznej wymianie. Badano dokładnie geny keratyny, wykazano jednak, że mRNA tego białka jest nieobecny w pęcherzykach wełny i tym samym stopień produkcji wełny jest ograniczony bardziej dostępnością niezbędnych aminokwasów, niż możliwością przenoszenia przez mRNA (40). Natura jakościowa i proporcje białek mleka i wełny mogą jednakże być zmienione przez wprowadzenie genów ulegających ekspresji odpowiednio w gruczole mlekowym i pęcherzykach wełny. W 1982 r. Palmiter i wsp. (28) zasugerowali, że transgeniczne myszy mogą być użyteczne w produkcji pożądanego białka. Inni autorzy uważają, że gruczoł mlekowy owiec może być układem z wyboru dla zastosowań praktycznych (20).

Mleko składa się w większości z wody, tłuszczu, laktozy i białka. Najważniejszymi białkami w mleku przeżuwaczy są kazeina, betalaktoglobulina i alfa-laktalbumina. Białka te syntetyzuje gruczoł mlekowy, inne — jak np. albumina, przechodzą do mleka z krwi. Jak już wspomniano, produkcja transgenicznych przeżuwaczy jest czasochłonna, kosztowna i iak dotychczas nie stosowana rutynowo. Czas doświadczeń prowadzonych na przeżuwaczach jest bardzo długi; u owiec może on wynosić 2—3 lata od czasu wstrzyknięcia DNA do komórki jajowej do chwili pozyskania mleka od transgenicznej samicy. Opracowano zatem dwa modele: hodowle tkankowe gruczolu mlekowego, na których można badać efektywność lub alternatywne konstrukcje po transfekcji oraz myszy transgeniczne. Ponieważ jednak nie jest możliwe otrzymanie całkowicie zróżnicowanych kultur tkankowych gruczolu mlekowego, oraz fakt, że myszy transgeniczne są bardziej adekwatnym modelem, ten ostatni nie pozostawia wyboru: dla transgenicznych myszy odstep czasu między iniekcją do komórki jajowej a laktacja wynosi około 3 miesiące.

Wizolowano od owiec gen kodujący beta-laktoglobulinę i wprowadzono go do genomu myszy, który normalnie nie koduje tego białka. W elektroforezie białek mleka myszy stwierdzono frakcję współmierującą z frakcją beta-laktoglobuliny owcy. Stężenie tego białka wynosiło około 20 mg/ml. Wskazuje to, że gen białka mleka owcy został wprowadzony do genomu myszy w sposób zezwalający na ekspresję w homologicznej tkance. Badania hodowlane wykazały także, że gen i jego ekspresja są wrodzone. Nie wiadomo jednak, czy ekspresja ogranicza się tylko do gruczolu mlekowego i czy geny białka mleka mogą być użyte jako nośniki

genów strukturalnych dla innych specyficznych białek.

Produkcja wysokowartościowych białek, np. o znaczeniu terapeutycznym, lub enzymów przemysłowych, jest prostym przykładem zastosowania technologii transgenicznej u przeżuwaczy takich jak bydło, kozy czy owce. Żywa ekspresja beta-laktoglobuliny owcy u myszy także wskazuje, że całkiem możliwe jest uzyskanie wzrostu zawartości białka w mleku przeżuwaczy przez wprowadzenie dodatkowych genów strukturalnych. Manipulacje takie mogłyby mieć na celu przede wszystkim wzrost wartości odżywczej mleka lub zmianę jego cech jakościowych dla zwiększenia przydatności do przerobu przemysłowego. Innym celem może być obniżenie zawartości laktozy w mleku. Jest ona nie tylko najmniej wartościowym składnikiem mleka, lecz także znakomita większość ludzi nie posiada zdolności do jej trawienia w okresie niemowlęcym. Dzieci te nie mogą spożywać mleka i jego przetworów bez poważnych następstw zdrowotnych. Z tych powodów produkcja mleka bezlaktozowego jest interesująca i ważna. Jednym ze sposobów osiągnięcia tego celu może być uzyskanie zwierząt wydzielających do mleka laktazę, enzymem hydrolizującym laktozę. W ten sposób cukier ten mógłby być rozkładany do glukozy i galaktozy *in situ*. Drugim sposobem mogłoby być zapobieganie syntezie tego składnika w gruczole mlekowym, która wymaga alfa-laktalbuminy jako czynnika biorącego udział w połączeniu glukozy i galaktozy. Wymagałoby to wygaszenia ekspresji genu alfa-laktalbuminy.

Możliwość użycia zwierzęcych linii transgenicznych posiada jednak dwie wady (32). Po pierwsze — w obecnej chwili brak jest możliwości kontroli nad miejscem wbudowywania genu. Jeśli efekt bezpośredni częściowej fuzji genów może być podobny do każdorazowym jego wprowadzeniu, wyniki pośrednie są trudne do przewidzenia z powodu wpływu inkorporowanego genu na czynność genów sąsiednich. Każda introdukcja transgeniczna winna być zatem oceniana oddzielnie. Po drugie — zwierząt transgenicznych nie można oceniać na podstawie pojedynczych sztuk. Może więc okazać się koniecznym stworzenie populacji hemi- i homozygot rod względem nowego genu dla oceny zamierzonego efektu.

Integracja nowego genu powoduje rozerwanie genów genomu nosiciela, nazywane „mutacją wstawczą” (27). Jedną z konsekwencji rozerwania genów endogennych w miejscu inkorporacji może być to, że niekorzystne skutki uboczne transgenów mogą być w pełni recesywne. Z tego powodu konieczne jest testowanie populacji zarówno homozygotycznych, jak i hemizygotycznych. Wiele mutacji wstawczych jest recesywnie letalnych i eliminacja wsteczna może być bardzo częsta.

Ekspresja genów kodujących białka płaszcza wirusa u zwierząt normalnie podatnych na zakażenie może redukować wiązanie wirusów do białek receptorowych na powierzchni komórki, a tym samym nadawać cechy odporności na zakażenie. Tą samą drogą do uzyskania odporności wskazano ostatnio u roślin: wprowadzenie do roślin tytoniu genu kodującego białko płaszcza wirusa mozaiki tytoniowej hamowało rozwój infekcji wirusowej (1).

Manipulacja pojedynczym locus może być wysoce istotna w okolicznościach, w których niższy poziom produktu obniża nasilenie utempernego sprzężenia zwrotnego. Jednym z przykładów może być kontrola reprodukcji na zasadzie sprzężenia zwrotnego, gdzie zahamowanie wytwarzania hormonów jajnika kontrolujących uwalnianie FSH wzmacnia wydajność owulacji. Czynne i bierne uodpornienie przeciwko sterydom jajnika wzmacnia owulację u owcy (30, 41), jednak technologia ta nie została, jak dotąd, przeniesiona na bydło.

Bysują się dwie potencjalne metody neutralizacji genów: odczulająca ekspresja genów i mutacje kierowane na określony locus. Pierwszym stopniem ekspresji genów jest transkrypcja, tj. synteza mRNA przy użyciu jednego łańcucha DNA genu. W normalnych warunkach łańcuch komplementarny nie ulega transkrypcji. Przy przegrupowaniu genów może jednak nastąpić ekspresja łańcucha komplementarnego. Ten transkrybowany „nonsensowny” RNA i mRNA z łańcucha kodującego są względem siebie wzajemnie komplementarne i tym samym mogą ulegać hybrydyzacji. Może tworzyć się więc dwuniciowy RNA wylwyjący na kolejne etapy ekspresji genów: produkcje RNA, jego ekspedycja z jądra i translacja. Wykazano doświadczalnie ekspresję genu „nonsensownego” (14, 17, 24). Jednym z potencjalnych problemów tej metody neutralizacji genów jest konieczny nadmiar „nonsensownego” RNA w stosunku do mRNA, wynikający z kinetyki hybrydyzacji. Oprócz tego, jeżeli nastąpi neutralizacja genu w wyniku sprzężenia zwrotnego, najprostszym wynikiem może być wzrost szybkości transkrypcji. Jest prawdopodobne, że „nonsensowna” metoda prowadzi do obniżenia ekspresji, a nie do ogólnego wygaszenia; może to być bardzo użytecznym sposobem w przyszłości.

Druga metoda eliminacji funkcji genów może być mutageneza skierowana na określony locus *in vivo*. Wykazano, że geny wprowadzone do hodowli komórkowych mogą ulegać integracji w wyniku rekombinacji homologicznej (33, 34). Metoda ta może być użyteczna do kasowania ekspresji genów przez wprowadzenie DNA rozrywającego gen. Taka rekombinacja homologiczna jest jednak bardzo rzadka i jak dotąd nie znalazła zastosowania u zwierząt transgenicznych. Połączenie drogi embrionalnych komórek pnia i rekombinacji homologicznej

jest bardzo zachęcające — stwarza bowiem możliwość selekcji tych linii komórkowych, które posiadają pożądaną integrację *in vitro*, przed wprowadzeniem bardziej złożonych i kosztownych doświadczeń na zwierzętach.

Należy podkreślić, że opisane powyżej wygaszanie ekspresji może być efektem dominujacym z tego powodu, że działa tutaj mRNA transkrybowany z obu alleli rozpatrywanego genu. Porwanie genu w wyniku rekombinacji homologicznej jest w większości przypadków mutacją recesywną, a efekty mogą być oceniane jedynie poprzez hodowlę prowadzącą do uzyskania homozygotyczności. W przyszłości należy się spodziewać możliwości wymiany pojedynczych nukleotydów w sposób z góry zamierzony; może to dostarczyć sposobów bardzo subtelnego manipulowania genami zarówno w regionach regulacyjnych, jak i kodujących.

Biologia transgeniczna ma wyraźne zastosowanie w dostrojeniu zwierząt. Większość zainteresowań koncentruje się na możliwościach manipulacji śladem mleka i jak to wykazano na murzyczach, jest to wykonalne. Zastosowanie nowych technologii będzie jednak zależeć od pojawienia się zapotrzebowania społecznego. Nowy gen nie jest ani lekiem, ani czynnikiem infekcyjnym i jako taki nie może podlegać akceptacji prawnej. Podstawowa przewaga ulepszenia genetycznego nad bezpośrednią manipulacją stadem potęgowana jest istniejącymi trendami negującymi używanie hormonów w produkcji zwierzęcej i preferencjami dla produktów naturalnych. Praktyka transgeniczna może w tym znaleźć znaczące miejsce.

#### Piśmiennictwo

1. Abel P. P., Nelson R. S., De B., Hoffmann N., Rogers S. G., Freley R. T., Beachy R. N.: Science 232, 739, 1986.
2. Bradley A., Evans M., Kaufman M. H., Robertson E.: Nature 309, 255, 1984.
3. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M.: Cell 27, 223, 1981.
4. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M., Yagle M. K., Palmiter R. D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4439, 1985.
5. Constantini F., Lacy E.: Nature 294, 92, 1981.
6. Evans M. J., Kaufman M. H.: Nature 292, 154, 1981.
7. Gibson J. P., Smith C.: Proc. 3rd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Lincoln, USA, t. 12, 96, 1986.
8. Gordon J. W., Ruddle F. H.: Science 214, 1244, 1981.
9. Gordon J. W., Scanga G. A., Plotkin D., Barbosa J. A., Ruddle F. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7739, 1980.
10. Hammer R. E., Palmiter R. D., Brinster R. L.: Nature 311, 65, 1984.
11. Hammer R. E., Brinster R. L., Palmiter R. D.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50, 379, 1985.
12. Hammer R. E., Brinster R. L., Rosenfeld M. G., Evans R. M., Marc K.: Nature 315, 413, 1985.
13. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L.: Nature 315, 690, 1985.
14. Izant J. G., Weintraub H.: Cell 36, 1007, 1984.
15. Jaehner D., Kirsten H., Mulligan R., Jaenisch R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6927, 1985.
16. Kessler H., Burns J. A.: Biochem. Soc. Trans. 7, 1145, 1979.
17. Kim S. K., Wold B. J.: Cell 42, 129, 1985.
18. King W., Patel M. D., Lobel L. I., Goff S. P., Chi Nguyen-Huu M.: Science 228, 554, 1985.
19. Land R. B., Hill W. G.: Anim. Prod. 21, 1, 1975.
20. Lathé R., Clark A. J., Archibald A. L., Bishop J. O., Sminios P., Wilmut I.: Novel products from livestock, w Exploiting new technologies in animal breeding: genetic development, red. C. Smith, J. W. B. King, J. C. McCay, Oxford University Press, Oxford 1986, s. 91.
21. Lovell-Badge R. H., Bygrave A. E., Bradley A., Robertson E., Evans M. J., Cheah K. S. E.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50, 707, 1985.

22. Mackay T. F. C.: *Genetics* 111, 351, 1985.
23. Martin G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7634, 1981.
24. McGarry T. J., Lindquist S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 399, 1986.
25. Muller E.: Physiological and biochemical indicators of growth and composition, w: *Exploiting new technologies in animal breeding*, red. C. Smith, J. W. B. King, J. C. McCay, Oxford University Press, Oxford 1986, s. 132.
26. Nicholas F. W., Smith C.: *Anim. Prod.* 36, 341, 1983.
27. Palmiter R. D., Brinster R. L.: *Annu. Rev. Genetics* 28, 465, 1986.
28. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Brinberg N. C., Evans R. M.: *Nature* 300, 611, 1982.
29. Palmiter R. D., Norstedt G., Gelleans R. E., Hammer R. E., Brinster R. L.: *Science* 222, 809, 1983.
30. Scaramuzzi R. J., Hoskinson R. M.: Active immunization against steroid hormones for increasing fecundity, w: *Immunological aspects of reproduction in mammals*, red. D. B. Crighton, Butterworths, London 1984, s. 445.
31. Smith C.: *Anim. Prod.* 42, 81, 1986.
32. Smith C., Meuwissen T., Gibson J. P.: *Anim. Breeding* 55, 1, 1987.
33. Smithies O., Gregg R. G., Boggs S. S., Koralewski M. A., Kucherlapati R. S.: *Nature* 317, 230, 1985.
34. Thomas K. R., Folger K. R., Capecechi M. R.: *Cell* 44, 419, 1986.
35. van der Putten H., Botteri F. M., Müller A. D., Rosenfeld M. G., Fan H., Evans R. M., Verma I. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148, 1985.
36. Wagner T. E., Hoppe P. C., Jollick J. D., School D., Hodinka R. L., Gault J. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6376, 1981.
37. Wagner E. F., Stewart T. A., Mintz B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5016, 1981.
38. Wagner E. F., Keller G., Gilboa E., Ruther U., Stewart C.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50, 691, 1985.
39. Wall R. J., Pursel V. G., Hammer R. E., Brinster R. L.: *Evol. Reprod.* 32, 645, 1985.
40. Ward K. A., Franklin I. R., Nurray J. D., Nancarrow C. D., Raphael K. A., Rigby N. W., Byrne C. R., Wilson B. W., Hunt C. L.: *Proc. 3rd World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod., Lincoln, USA, t. 12, 1986, s. 6.*
41. Webb R., Land R. B., Pathiraha N.: Passive immunization against steroid hormones in the female, w: *Immunological aspects of reproduction in mammals*, red. D. B. Crighton, Butterworths, London, 1984, s. 475.

Adres autora: dr Andrzej Ledwożyw, ul Grażyny 29/13, 20-502 Lublin

## FIZJOLOGIA ZWIERZĄT

STANISŁAW BARANOW-BARANOWSKI, KRZYSZTOF JANUS, DOROTA JAKUBOWSKA, DOROTA JANKOWIAK, WIESŁAW F. SKRZYPCZAK

### Wpływ furosemidu na wielkość przestrzeni wodnych w organizmie cieląt\*)

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Doktora Judydy 6, 71-466 Szczecin

W regulacji objętości i osmolalności płynów ustrojowych bierze udział szereg skomplikowanych mechanizmów hormonalnych i nerwowych, wśród których pierwszoplanową rolę odgrywają: układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) i układ antydiuretyczny (1, 7). Oprócz głównych mechanizmów regulacji wielkości przestrzeni wodnych (w szczególności osocza i objętości krwi krążącej) w utrzymaniu izowolemii uczestniczy wiele innych czynników, np. kortyzol, dezoksykortykosteron, aminy katecholowe, kininy, prostaglandyny oraz czynniki natriuretyczne pochodzenia mózgowego lub sercowego (2, 3). Wśród tych ostatnich podkreślić należy rolę tzw. przedsionkowego czynnika (peptydu) natriuretycznego (Atrial Natriuretic Factor — ANF). Jest to substancja uwalniana do krwi przez rozciągnięte ściany przedsionków (głównie lewego) pod wpływem zwiększonej objętości krwi krążącej. Istnieją doniesienia (2), że ANF jest jednym z najsilniejszych (o ile nie najsilniejszym) „fizjologicznych natriuretyków“.

Furosemid (kwas 4-chloro-N-2-furymetyl-5-sulfamoylo-antranilowy) należy do najsilniejszych środków natriuretycznych. Jest on słabym inhibitorem anhidrazy węglanowej oraz silnym Na-K-ATP-azą. Preparat ten nie wpływa istotnie na wielkość przesączania kłębkowego. Działa on bezpośrednio na kanaliki nerkowe, przede wszystkim na gruby odcinek wstę-

pującego ramienia pętli Henlego, w którym hamuje czynny transport chloru i bierny sodu. Długotrwałe stosowanie furosemidu prowadzi do hipokalemii i alkalozji hipochloremicznej oraz upośledzenia tolerancji węglowodanów. Furosemid eliminowany jest z organizmu w 60% za pomocą mechanizmów nerkowych i w 40% na drodze pozanerkowej. Czas półtrwania tego preparatu w ustroju ( $T/2$ ) nie przekracza z reguły 50 minut (8).

Piśmiennictwo zawiera publikacje omawiające wpływ środków diuretycznych na hemodynamikę i wielkość przestrzeni wodnych w żywym organizmie. Badania tego typu prowadzone były z reguły na ludziach i zwierzętach laboratoryjnych (6, 11, 15, 16). Brak jest natomiast doniesień dotyczących działania diuretyków na objętość przedziałów płynowych w organizmie zwierząt gospodarskich; badania takie przeprowadzili jedynie (u koni) Muir i wsp. (10). English i Eecvar (5) określali natomiast wpływ furosemidu na bilans wody, sodu, potasu i chloru w organizmie owiec.

Celem pracy było określenie wpływu domięśniowej iniekcji furosemidu na wielkość przestrzeni wodnych organizmu cieląt.

#### Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono na 15 cielętach-byczkach rasy cb. w wieku 65—70 dni, o średniej masie ciała  $90 \pm 5$  kg. Na każdym zwierzęciu dokonano pomiaru objętości wody całkowitej (TBW), pły-

\*) Praca wykonana i finansowana w ramach CPBP 05.06.1.