

Rozwój zarodków bydłych wyprodukowanych z oocytów uzyskanych metodą OPU^{*})

ZDZISŁAW SMORAĞ, PIOTR GOGOL, LUCYNA KĄTSKA, JÓZEF JAŻDŹEWSKI*

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa

*Zootechniczny Zakład Doświadczalny IZ, 64-122 Pawłowice

Smorağ Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J.

In vitro and in vivo development of bovine embryos produced by oocytes collected according to the OPU method

Summary

The paper presents the technique of bovine oocyte collection by the ultrasound guided method (ovum pick-up=OPU) as well as the method of in vitro maturation, fertilization and development of recovered oocytes. The quality and developmental potential of oocytes recovered by OPU and by rupturing ovarian follicles (postslaughtered ovaries) were compared. 9.2% of blastocysts were obtained out of the OPU method and 25.5% from the control oocytes. The quality and in vivo development of the blastocysts in both groups were comparable.

Keywords: bovine, oocyte collection, OPU, IVM/IVF/IVC.

Niska rozrodczość samic zwierząt gospodarskich jest głównym czynnikiem limitującym postęp hodowlany. Dotyczy to zwłaszcza bydła. Krowa w ciągu całego życia jest w stanie urodzić jedynie kilka (4-6) sztuk potomstwa. Jak wiadomo, możliwości gametotwórcze jajników bydłych są nieporównywalnie większe, gdyż sięgają dziesiątek, a nawet setek tysięcy oocytów (6). Oznacza to, że wykorzystywany jest tylko ułamek procenta produkowanych przez jajniki gamet. Stymulacja hormonalna w połączeniu z przenoszeniem zarodków zwiększają wykorzystanie puli gamet, gdyż stosując te metody można w jednej rui uzyskać od 4 do 6 przydatnych do przenoszenia zarodków, co sprawia, że metoda może być stosowana w praktyce. Jednak skala jej stosowania jest ograniczona i nieporównywalna do sztucznego unasiwienia.

Postęp, jaki zanotowano w ostatnich latach w opowaniu metod pozaustrojowego uzyskiwania zarodków u bydła sprawił, że metoda ta zaczyna być wyko-

rzystywana w praktycznej realizacji programów hodowlanych. Do tej pory oocyty do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro* uzyskiwano głównie z jajników jałówek lub krów po ich uboju. Aby wykorzystać pozaustrojową produkcję zarodków do realizacji programów genetycznych konieczne jest zastosowanie metody pozwalającej na wielokrotne pobieranie oocytów z jajnika tej samej krowy. Umożliwia to rozwijana w ostatnich latach metoda aspiracji pęcherzyków pod kontrolą dopochwowej sondy USG sprzężonej z igłą. Technika ta została opisana po raz pierwszy przez Pieterse i wsp. (9, 10) i Kruipa i wsp. (5). Metoda transwaginalnego uzyskiwania oocytów bydłych pod kontrolą USG została w ciągu ostatnich kilku lat znacznie udoskonalona. Badania skoncentrowały się nad możliwością zwiększenia liczby uzyskiwanych oocytów poprzez modyfikację czynników technicznych warunkujących efektywność metody, spośród których najważniejszymi okazały się wielkość podciśnienia i rodzaj zastosowanej igły. Procent pozyskiwanych oocytów w stosunku do aspirowanych pęcherzyków wzrósł z ok. 27% (8) do ok. 50% (5). Oprócz zwiększonej efektywności pozyskiwania oocytów, zwiększono

^{*}) Praca wykonana w ramach grantu nr 5-P06D-046-09 finansowanego przez KBN.

również częstotliwość aspiracji do dwóch w tygodniu (6). W efekcie możliwe stało się uzyskanie średnio około 16 oocytów od krowy w tygodniu, co pozwoliło wyhodować *in vitro* ponad 2 nadające się do przeniesienia zarodki. W ciągu sześciu miesięcy możliwe stało się wyprodukowanie ponad 50 zarodków, czyli czterokrotnie więcej niż przy metodzie superowulacji. Daje to szansę uzyskania około 25 cieląt rocznie.

Mimo tego niewątpliwego, zanotowanego w ostatnich latach postępu, dalsze prace są niezbędne szczególnie w odniesieniu do relacji pomiędzy zastosowanym wariantem pobierania, a jakością uzyskiwanych oocytów i ich przydatnością do hodowli *in vitro* oraz zdolności uzyskanych zarodków do pełnego rozwoju *in vivo*. Dotychczasowe obserwacje dotyczące możliwości rozwojowych oocytów bydłęcych uzyskanych metodą OPU wskazują na obniżenie ich zdolności rozwojowej (7).

Celem pracy było określenie potencjału rozwojowego oocytów uzyskanych metodą OPU poprzez badanie możliwości ich dojrzewania i zapłodnienia oraz rozwoju *in vitro* zygot do stadium moruli/blastocysty oraz pełnego rozwoju *in vivo*.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badania przeprowadzono na 30 jałówkach rasy cb i 2 simentaler w wieku 18-24 miesięcy. Zwierzęta charakteryzowały się regularnym cyklem rujowym, prawidłową budową narządów rodnych, ze szczególnym uwzględnieniem jajników, stwierdzoną badaniami rektalnymi.

Przed zabiegiem uzyskiwania oocytów zwierzętom podawano Rometar (Spofa, Praha) w ilości 0,3 ml/100 kg, a ponadto znieczulano nadoponowo podając 4 ml lignokainy. Po około 15 minutach od podania ww. specyfików zwierzę umieszczano w poskromie i przystępowano do zabiegu uzyskiwania oocytów.

Sprzęt. Używano zestawu składającego się z aparatu USG typu Picker (Model CS 9100) i głowicy 6,5 MHz, umożliwiającej osiągnięcie zdolności rozdzielczej ok. 2 mm, współpracującej z zestawem aspiracyjnym produkcji niemieckiej (Model Mariensee), wyposażonym w nasadkę do punkcji. Punkcja wykonywana była przy użyciu krótkich jednorazowych igieł (18 g).

Uzyskiwanie oocytów. Podczas zabiegu sondę wprowadzano do pochwy, a następnie naprzeciwko niej ustalano jajniki przy pomocy manipulacji *per rectum*. Po odpowiednim ustawieniu sondy i jajnika (pęcherzyk jajnikowy znajdował się na linii przejścia igły), igła była popychana, przebijała ścianę pochwy i wchodziła do pęcherzyka. Natychmiast po wejściu końcówki igły do pęcherzyka podłączano podciśnienie (ok. 0,1 bara), co powodowało wysśanie płynu pęcherzykowego z oocytami. Przepłukiwanie następowało przy użyciu płynu PBS o temp. +37°C z dodatkiem 500 j.m. heparyny na 100 ml. Aspirowano tylko pęcherzy-

ki o średnicy większej niż 2 mm. Grupę kontrolną stanowiły oocyty uzyskiwane poubojowo z jajników jałówek i krów rzeźnych. Bezpośrednio po uboju jajniki umieszczano w termosie, tak aby temperatura ich przetrzymywania utrzymywała się w granicach 30-35°C. Po przewiezieniu do laboratorium trzykrotnie przemywano jajniki w płynie PBS z dodatkiem kanamycyny i przeprowadzano dyssekcję pęcherzyków o średnicy 3-7 mm. Następnie pęcherzyki rozrywano w płynie do manipulacji przy użyciu skalpela i wyszukiwano oocyty pod mikroskopem stereoskopowym (2).

Ocena i dojrzewanie oocytów *in vitro*. Zawartość aspirowanych pęcherzyków wraz z płynem omywającym przeszukiwano, następnie pod mikroskopem stereoskopowym liczone i oceniano uzyskane oocyty. Jako kryterium skuteczności postępowania stosowano: średnią liczbę aspirowanych pęcherzyków, średnią liczbę oocytów ogółem i oocytów morfologicznie normalnych przypadającą na próbę oraz odsetek uzyskanych oocytów w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków. Oceny oocytów dokonywano na podstawie wyglądu otaczających je komórek wzgórka jajonośnego i stanu morfologicznego cytoplazmy. Do oocytów morfologicznie normalnych, tj. przydatnych do hodowli *in vitro*, zaliczano oocyty otoczone gęstą i spoistą warstwą komórek wzgórka jajonośnego i posiadające jednolicie granulowaną cytoplazmę, nie wykazującą zmian degeneracyjnych.

Dojrzewanie oocytów prowadzono we współhodowli z komórkami ziarnistymi pęcherzyka jajnikowego. Do współhodowli z oocytami dodawano $3-5 \times 10^6$ komórek ziarnistych/ml pożywki do dojrzewania. Komórki ziarniste pobierano z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 3-4 mm, dobrze unaczynionych, nie wykazujących zmian atretycznych i zawierających morfologicznie prawidłowe oocyty. Pęcherzyki rozrywano, a komórki ziarniste uwalniano mechanicznie ze ścianek pęcherzyka, a następnie dokładnie rozpraszano je w pożywce poprzez pipetowanie. W tak przygotowanej zawieszynie komórek ziarnistych (o koncentracji $3-5 \times 10^6$ komórek/ml) umieszczano 40-50 niedojrzałych oocytów. Hodowlę prowadzono przez 23-24 godz. w temperaturze 39°C, w obecności 5% CO₂ w powietrzu, przy maksymalnej wilgotności. Dojrzałe *in vitro* oocyty zapładniano następnie *in vitro*.

Zapłodnienie *in vitro* oraz hodowla uzyskanych zarodków. Do zapłodnienia używano mrożone nasienie buhaja. Kapacytację rozmrożonych plemników przeprowadzano wg metody Parisha i wsp. (8). Zapłodnienie *in vitro* przeprowadzano w mikrokroplach (50 µl objętości) pożywki do zapłodnienia pod sterylnym olejem mineralnym, w temperaturze 39°C, w obecności 5% CO₂ w powietrzu, przy maksymalnej wilgotności. Krople ekwilibrowano w inkubatorze CO₂ co najmniej 1 godz. przed umieszczeniem w hodowli gamet (3).

Oocyty pozbawione poprzez pipetowanie ekspandujących warstw komórek wzgórka jajonośnego dwukrotnie przepłukiwano w płynie TALP. Następnie 5-10 oocytów w 4 µl płynu do przemywania umieszczano w 40 µl kropli

Tab. 1. Potencjał rozwojowy oocytów uzyskanych metodą OPU

Metoda uzyskiwania oocytów	Liczba			
	uzyskanych oocytów	oocytów przydatnych do hodowli (%)	podzielonych zarodków (%)	uzyskanych blastocyst (%)
OPU	419	229 (54,7)	156 (68,1)	21 (9,2)
Poubojowo (rozrywanie pęcherzyków)	329	329 (100)	228 (69,3)	84 (25,5)

Tab. 2. Rozwój *in vivo* zarodków bydłych wyprodukowanych *in vitro* z oocytów uzyskanych metodą OPU

Metoda uzyskiwania oocytów	Liczba		
	przeniesionych zarodków	biorczyń	ciężarnych biorczyń (%)
OPU	14	14	3 (21,5)
Poubojowo	56	34	7 (23,5)

pożywki do zapłodnienia, dodając 5-6 μ l zawiesiny plemników tak, by końcowa koncentracja plemników wynosiła 1-1,5 \times 10⁶/ml pożywki. Wspólną inkubację gamet prowadzono przez 20-24 godz., w temperaturze 39°C, w obecności 5% CO₂ w powietrzu, przy maksymalnej wilgotności.

Hodowla zarodków do stadium blastocysty. Po zakończeniu inkubacji gamet, potencjalne 4 zygoty dwukrotnie przepłukiwano w płynie TALP do przemywania, usuwając poprzez pipetowanie przylegające plemniki i komórki wieńca promienistego. Zygoty umieszczano w 40 μ l kroplach pożywki Menezo B2. Po tym czasie zarodki przenoszono do współhodowli z komórkami somatycznymi.

a) Przygotowanie komórek somatycznych do współhodowli z zarodkami. Do współhodowli z zarodkami stosowano komórki wątroby szczura (BRL-Buffalo Rat Liver cells). Używano mrożonych komórek BRL, które po rozmrożeniu w łaźni wodnej w temperaturze 37°C i 5 min. ekwilibracji w tej temperaturze rozcieńczono w 10 ml płynu do manipulacji. Następnie zawiesinę komórek odwirowywano przez 5 min. (ok. 700 obrotów/min.). Nadsącz odciągano, a do osadu dodawano 1 ml płynu do manipulacji i obliczano koncentrację komórek. Przygotowaną zawiesinę komórek BRL wprowadzano do płynu TCM199+10%FCS+antybiotyki, dodając 2 \times 10⁶ komórek/ml pożywki. Równocześnie zakładano hodowle w naczynkach 4-oczkowych (0,5 ml zawiesiny komórek BRL/oczeko naczynka, tj. 1 \times 10³ komórek/ml). Hodowlę komórek BRL prowadzono przez 1-2 dni przed umieszczeniem w niej zarodków. Około 3-4 godz. przed umieszczeniem zarodków we współhodowli wymieniano pożywkę zastępując płyn do hodowli komórek somatycznych pożywką Menezo B2 uzupełnioną 10%FCS.

b) Współhodowla zarodków z komórkami somatycznymi. Zarodki po 24 godz. hodowli w kroplach pożywki Menezo B2 przenoszono do współhodowli z komórkami BRL. W czasie hodowli zarodków przeprowadzano częściową wymianę pożywki co 48 godz. aż do momentu zakończenia hodowli, czyli uzyskania blastocyst (hodowla ok. 7-8 dni) lub blastocyst wylętych (hodowla ok. 10 dni).

c) Ocena blastocyst na podstawie liczby komórek. Oceny liczby komórek blastocysty dokonywano w mikroskopie fluorescencyjnym NIKON po uprzednim wybarwieniu blastocysty barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342. W tym celu blastocystę umieszczano na 10 min. w roztworze barwnika Hoechst 33342 o stężeniu 5 μ l/ml pożywki, w temp. 38°C, następnie przenoszono w kropli tej pożywki na szkiełko podstawowe i oceniano w mikroskopie. Dwukrotnie liczono liczbę jąder komórkowych w każdej blastocysty i ustalano wartości średnie.

Przenoszenie zarodków. Zarodki w stadium blastocysty przenoszono metodą niechirurgiczną do zsynchronizowanych jałówek. Ocenę skuteczności zabiegu dokonywano na podstawie badania rektalnego przeprowadzonego po 60 dniach od przeniesienia zarodka.

Wyniki i omówienie

Niewiele ponad połowa (54,7%) oocytów uzyskanych metodą OPU była przydatna do pozaustrojowego uzyskiwania zarodków (tab. 1). Z tej liczby odsetek podzielonych zygot był niemal identyczny (68,1%) jak w grupie kontrolnej, czyli z oocytów uzyskanych poubojowo (69,3%). Zaobserwowano jednakże istotną różnicę w zdolności zarodków do rozwoju do stadium blastocysty. W grupie oocytów uzyskanych metodą OPU odsetek uzyskanych blastocyst w stosunku do liczby zapłodnionych oocytów wynosił 9,2% podczas gdy w grupie kontrolnej wynosił on 25,5%.

Losowo wybrane blastocysty były oceniane pod kątem liczby komórek. Uzyskane dane wskazują na porównywalne liczby komórek w blastocystach wyprodukowanych z oocytów uzyskanych metodą OPU (112

komórek) oraz uzyskanych poubojowo (126 komórek). Część blastocyst (14) uzyskanych z oocytów aspirowanych metodą OPU przeniesiono do 14 zsynchronizowanych jałówek. W grupie kontrolnej przeniesiono 56 blastocyst otrzymanych z oocytów uzyskanych poubojowo do 34 zsynchronizowanych jałówek (tab. 2). Odsetek ciężarnych bioreczeni w obydwu grupach był zbliżony (21,5% ciężarnych bioreczeni w grupie doświadczalnej i 23,5% ciężarnych bioreczeni w grupie kontrolnej). W sierpniu 1998 r. zanotowano urodzenie się cielęcia. Jest to pierwsze w Polsce cielę, jakie urodziło się po przeniesieniu zarodka wyprodukowanego z oocytu uzyskanego metodą OPU.

Zdolności rozwojowe oocytów uzyskanych metodą OPU zależą od zachowania normalnej morfologii samych oocytów, jak również otaczających je komórek wzgórka jajonośnego. W pracach licznych autorów (1, 11) i we wcześniejszych badaniach własnych (12, 13) stwierdzono obniżony procent dzielących się po zapłodnieniu *in vitro* oocytów uzyskanych tą metodą i niższy odsetek rozwijających się do stadium blastocysty. Przyczyną tego może być fakt uzyskiwania mniejszej liczby oocytów otoczonych dużą liczbą komórek wzgórka jajonośnego, w porównaniu z oocytami uzyskanymi z jajników pochodzących z rzeźni (1, 7). Pewną poprawę zdolności oocytów do rozwoju do stadium blastocysty po zapłodnieniu *in vitro* można uzyskać prowadząc współhodowlę oocytów bydłowych uzyskanych metodą OPU z komórkami ziarnistymi (4). Jednakże w badaniach przeprowadzonych przez Brunzeela i wsp. (1) wykazano, że uszkodzenie części komórek wzgórka jajonośnego prawdopodobnie nie jest główną przyczyną obniżonego rozwoju oocytów po zapłodnieniu *in vitro*. Z danych otrzymanych przez nas wynika, że potencjał rozwojowy oocytów jest dość obniżony, a odsetek uzyskanych blastocyst stanowi około 1/3 liczby jaką uzyskano w grupie kontrolnej.

Dlatego też w sytuacji, gdy otrzymano satysfakcjonujące rezultaty uzyskiwania oocytów, główną uwagę należy zwrócić na warunki ich dojrzewania *in vitro*, zapłodnienia, a zwłaszcza hodowli od stadium zygoty do blastocysty. Wydaje się, że ważnym czynnikiem decydującym o rozwoju zarodkowym oocytów uzyskanych metodą OPU jest wyjściowa jakość oocytów, co z kolei wiąże się z jakością zwierząt – dawczyń. Wstępne obserwacje wskazują, że istotne znaczenie zarówno dla ilości jak i jakości oocytów uzyskiwanych metodą OPU może mieć rasa zwierząt – rasy mięsne wydają się być bardziej przydatne niż rasy mleczne.

Możliwości rozwojowe blastocyst uzyskanych z oocytów aspirowanych metodą OPU są porównywalne do zarodków grupy kontrolnej. Wskazuje na to zarówno zadowolająca liczba komórek, jak również ciążę, jakie uzyskano.

Wiele przesłanek zdaje się wskazywać na to, że zastosowanie OPU i pozaustrojowej produkcji zarodków jako alternatywy dla superowulacji może się przyczynić do poprawienia warunków ekonomicznych metody przenoszenia zarodków. Pobieranie oocytów od niestymulowanych samic redukuje koszty hormonów stanowiące znaczącą pozycję w strukturze kosztów metody superowulacji i przenoszenia zarodków. Pozaustrojowa produkcja zarodków z oocytów uzyskanych metodą OPU wymaga wprawdzie zorganizowania laboratorium z wysoko wykwalifikowanym personelem, jednak osiągnięcie zadowolającej efektywności uzyskiwania i zapłodnienia oocytów oraz jakości i ilości uzyskanych zarodków będą mieć rozstrzygające znaczenie także pod względem ekonomicznym.

Piśmiennictwo

1. Brunzeel A. W., Merton J. S., Wijst J., Hazeleger W., Kemp B.: *Theriogenology* 47, 185, 1997.
2. Kańska L., Ryńska B., Smorąg Z.: *Theriogenology* 43, 859, 1995.
3. Kańska L., Ryńska B., Smorąg Z.: *Anim. Reprod. Sci.* 44, 23, 1996.
4. Koniski M., Aoyagi Y., Takedomi T., Atakura H., Waga T.: *Theriogenology* 43, 253, 1995.
5. Kruip Th. A. M., Pieterse M. C., van Benden Th. H., Vos P. L. A. M., Wurth Y. A., Taverne M. A. M.: *Vet. Rec.* 129, 208, 1991.
6. Kruip Th. A. M., Boni R.: *Proc. First Europ. Conf. Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding*, Kraków, 1994, s. 117.
7. Palma G., Oliver N., Moedl J., Weingerkind H., Brem G.: 12th Sci. Meet. A. E.T.E., Lyon, 1996, s. 180.
8. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., Winer M. A., First N. L.: *Biol. Reprod.* 38, 1171, 1988.
9. Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruip Th. A. M., Taverne M. A. M.: *Theriogenology* 30, 751, 1988.
10. Pieterse M. C., Vos P. L. A. M., Kruip Th. A. M., Wurth Y. A., van Benden Th. H., Willemsse A. H., Taverne M. A. M.: *Theriogenology* 35, 857, 1991.
11. Simon L., Bungartz L., Rath D., Niemann H.: *Theriogenology* 39, 312, 1993.
12. Smorąg Z., Kańska L., Gogol P., Ryńska B.: *Folia Histochem.* 35, suppl. 2, 42, 1997.
13. Smorąg Z., Gogol P., Kuznetsov V.: *Biotechnologia* 41, 153, 1998.

Adres autora: prof. dr hab. Zdzisław Smorąg, os. Parkowe 14, 32-083 Balice

JOHNSON C. M., PAPADI G. P., TOMPKINS W. A., SELLON R. K., ORANDLE M. S., BELLAH J. R., BUBENIK L. J.: Dwufazowa odpowiedź grasicy kociąt zakażonych wirusem niedoboru immunologicznego kotów w okresie rozwoju płodowego. (Biphasic thymus response by kittens inoculated with feline immunodeficiency virus during fetal development). *Vet. Pathol.* 35, 191-201, 1998 (3)

Czternaście zarodków kocich w trzecim trymestrze ciąży zakażono bezpośrednio 104 TCID₅₀ wirusa FIV. Zarówno masa jak i struktura histologiczna grasicy kociąt po 2 tyg. po zakażeniu nie różniła się od grasicy kociąt z grupy kontrolnej. Jednakże badanie subpopulacji tymocytów metodą cytometrii przepływową wykazało statystycznie znaczne obniżenie procentu komórek CD4+/CD8+ z 55% w kontroli do 45% u płodów zakażonych wirusem FIV. Wirus występował zarówno w podścielisku jak i w mięszu grasicy. Po 4 tyg. po zakażeniu CD4+/CD8+ u kociąt zakażonych wynosił 15%, w kontroli 66%. U kociąt 16 tyg. po zakażeniu stosunek masy grasicy do masy ciała był identyczny jak u kociąt z grupy kontrolnej, zaś CD4+/CD8+ wynosił w grupie zakażonej 40%, w kontroli 76%. Te zmiany były związane z szeroko zakrojoną transkrypcją wirusa FIV w limfocytach grasicy.