

# Izolacja oocytów od cielných jałówek techniką OPU

ANNA M. DUSZEWSKA, ZYGMUNT REKLEWSKI\*

Zakład Embriologii Doświadczalnej, \*Zakład Genetyki i Hodowli Bydła, IGiHZ PAN Jastrzębiec, 05-551 Mroków

Duszewska A. M., Reklewski Z.

## Isolation of oocytes from pregnant heifers by OPU

### Summary

The aim of the study was to evaluate pregnant heifers as donors of oocytes. Oocytes were isolated by OPU (ovum pick-up) from four two-month pregnant heifers. Ovaries of 4 donors were punctured twice a week during 8 weeks (16 sessions). The evaluated parameters included: the percentage of isolated oocytes (ratio between the number of isolated oocytes and punctured follicles) and the percentage of oocytes qualified for in vitro maturation (ratio between qualified and isolated oocytes). The percentage of isolated oocytes reflects the differences between donors. The highest percentage was found in donor 3 (62.3) and the lowest in donor 2 (39.3). The percentage of qualified oocytes was similar in all donors (between 89.10 and 95.80). The evaluation of these parameters allows for the selection of the best donor of oocytes.

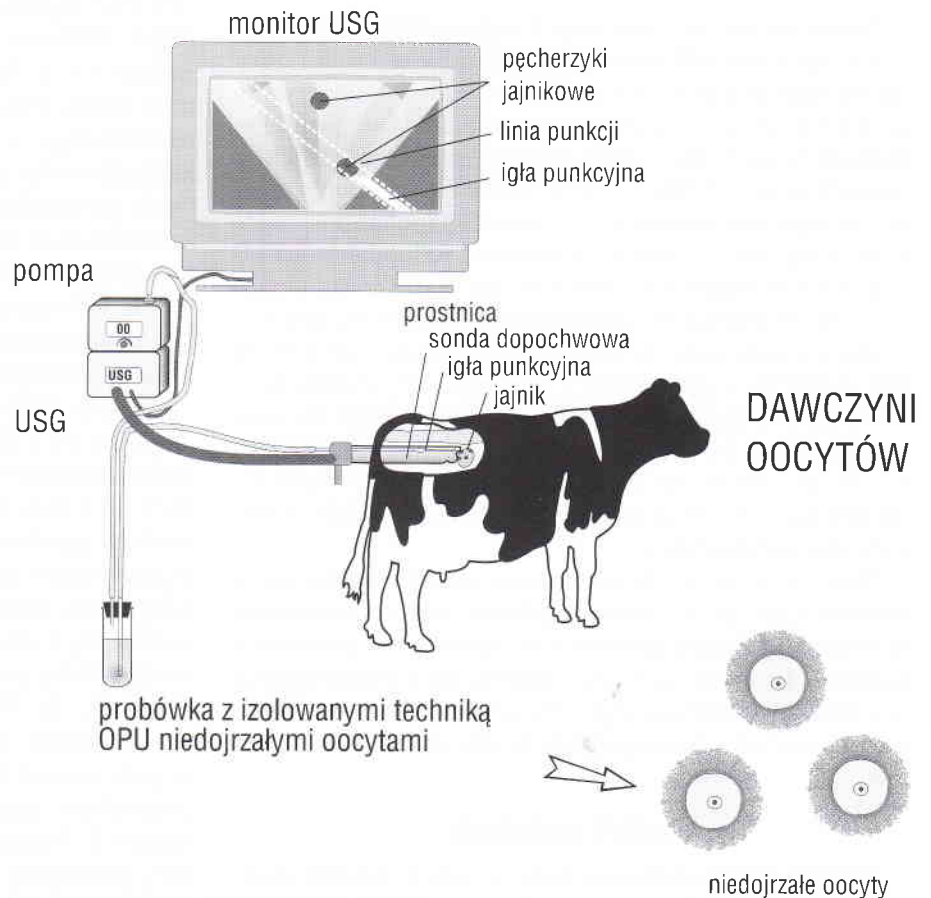
**Keywords:** OPU, pregnant cattle, oocytes.

Technika OPU (Ovum Pick-Up) polega na przyżyciowej izolacji oocytów z pęcherzyków jajnikowych (ryc. 1). OPU po raz pierwszy zastosowano w medycynie ludzkiej (4, 10, 12). Dla potrzeb bydła została ona zaadaptowana przez Pieterse'a (14, 15, 16).

Techniką OPU można izolować oocyty w metafazie II podziału mejozy (dojrzałe oocyty). Jednak w większości przypadków izolowane są w profazie I podziału mejozy (nie-dojrzałe oocyty). Oocyty mogą być pobierane zarówno od jałówek, jak i od krów. Jednak dolna granica wieku dawczyni jest limitowana wielkością pochwy, do której wprowadza się sondę z igłą punkcyjną. Dlatego u młodych samic oocyty mogą być izolowane jedynie laparoskopowo, lub też chirurgicznie. Również nieuzasadnione jest stosowanie OPU u krów powyżej 15 roku życia, co wiąże się z obniżeniem u nich liczby oocytów diplotenowych (5). Oocyty można pobierać od samic będących w naturalnym cyklu, bądź też po stymulacji hormonalnej. Oocyty można izolować z jajników płodów, cieląt jak i od cielných jałówek i krów (6, 8). Wynika to z rozwoju pęcherzyków jajnikowych, który odbywa się falami. Liczba fal i ich dłu-

gość jest swoista gatunkowo. U bydła obserwowane są dwie lub trzy fale rozwoju pęcherzyka (2).

Wykorzystanie ciężarnych samic jako dawczyń oocytów pozwala uzyskać od nich potomstwo w okre-



Ryc 1. Izolacja oocytów techniką OPU

sie ich cielności, co przyczynia się do zmniejszenia odstepu międzypokoleniowego, a tym samym do przyspieszenia postępu hodowlanego. Należy jednak podkreślić, że dawczyniami oocytów mogą być cienne jałówki lub krowy, ale tylko między drugim a czwartym miesiącem ciąży. Dolna granica jest związana z potwierdzeniem cielności badaniem ultrasonograficznym, które wykonuje się 6 tygodni od inseminacji. Natomiast górna granica wynika z dostępności do jajnika i możliwością jego precyzyjnego przytrzymania oraz możliwością manipulowania sondą sprzężoną z igłą punkcyjną tak aby nie uszkodzić płodu.

Izolowane oocyty powinny charakteryzować się ściśle przylegającymi komórkami wzgórka jajonośnego, utworzonego z około pięciu warstw komórek ziarnistych. Cytoplazma oocytu powinna być jednorodna, bez oznak degeneracji. Na tej podstawie oocyty są kwalifikowane do dojrzewania *in vitro* (in vitro maturation – IVM).

Celem badań była ocena cielnych jałówek jako dawczyń oocytów, pozyskiwanych techniką OPU. Ocena dawczyń przeprowadzono na podstawie odsetka izolowanych oocytów oraz odsetka zakwalifikowanych oocytów do dojrzewania *in vitro*.

### Material i metody

Dawczyniami oocytów były 4 cienne jałówki (w 2 miesiącu ciąży), rasy HF. Oocyty izolowano techniką OPU dwa razy w tygodniu przez 8 tygodni (n=16 sesji u każdej dawczyni). Do izolacji oocytów użyto aparatu USG firmy Pie Medical Scanner 200 z sondą wytwarzającą ultradźwięki o częstotliwości 7,5 MHz, z prowadnicą dla igły punkcyjnej oraz pompy podciśnieniowej (50 mm HG) połączonej z igłą punkcyjną (18G). Punkcję wykonano po podaniu dożylnym 0,4 ml Demosedanu (Pfizer) oraz podaniu nadoponowo 3 ml 2% polokainy z adrenaliną (Biowet-Drwalew).

Oocyty izolowano do probówki zawierającej płyn TCM 199 (GIBCO) z dodatkiem 2 mM NaHCO<sub>3</sub> (MERCK) i 0,5% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), (GIBCO) oraz antybiotyków. Izolowane oocyty płukano dwa razy w płynie TCM 199 (GIBCO) z dodatkiem 2 mM NaHCO<sub>3</sub> (MARCK) i 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS), (GIBCO) oraz antybiotyków.

Dawczynie oceniano pod kątem odsetka izolowanych oocytów czyli liczby izolowanych oocytów w stosunku do liczby nakłuc (liczba pęcherzyków jajnikowych poddanych punkcji). Również oceniano odsetek zakwalifikowanych oocytów do dojrzewania *in vitro* czyli liczbę zakwalifikowanych oocytów w stosunku do liczby izolowanych oocytów.

### Wyniki i omówienie

Wyniki badań zamieszczono w tab. 1. Ocena dawczyń przeprowadzono na podstawie dwóch paramet-

Tab. 1. Ocena dawczyń oocytów pod kątem podstawowych parametrów OPU (n=16)

Nr dawczyni	Liczba nakłuc	% izolowanych oocytów (liczba izolowanych oocytów)	Liczba izolowanych oocytów w I sesji	% zakwalifikowanych oocytów (liczba zakwalifikowanych oocytów)
1	97	49,5 (48)	0	95,8 (46)
2	117	39,3 (46)	1	89,1 (41)
3	114	62,3 (71)	5	94,4 (67)
4	103	54,4 (56)	4	91,0 (51)

trów. Pierwszym z nich był odsetek izolowanych oocytów wyrażony liczbą izolowanych oocytów w stosunku do liczby nakłuwanych pęcherzyków jajnikowych. Najwyższą liczbę nakłuc czyli punkcji pęcherzyków jajnikowych wykonano u dawczyni nr 2, natomiast najmniej u dawczyni nr 1. Należy jednak podkreślić, że liczba nakłuc nie jest pod żadnym względem wskaźnikiem mogącym mieć znaczenie przy wyborze samicy na dawczynię. Natomiast dla zespołu lekarzy, izolujących oocyty techniką OPU, liczba izolowanych oocytów w stosunku do liczby nakłuwanych pęcherzyków jajnikowych jest istotnym wskaźnikiem. Stwierdzono różnicę między dawczyniami w odsetku izolowanych oocytów (min. 39,3%, max 62,3%). Również badania innych autorów wskazują na istotne różnice pomiędzy dawczyniami. Zbliżone do minimum (39,3%) wyniki otrzymał Kruij (11) i Fry (7) natomiast zbliżone do maksimum Pieterse (15) i van der Schans (17). Występujące między dawczyniami różnice mogą wskazywać na różnicę w ułożeniu układu rozrodczego, a tym samym na dostępność do jajnika i na możliwości jego ułożenia względem sondy. W skrajnych przypadkach powyższe zagadnienia mogą dyskwalifikować samice jako dawczynię oocytów, pomimo obserwowanej dużej liczby pęcherzyków jajnikowych. Również istotnym czynnikiem może być wielkość podciśnienia (9) oraz umiejętności praktyczne lekarzy izolujących oocyty (13).

Oocyty izolowano z pęcherzyków jajnikowych o średnicy od 2 do 6 mm. Jednak w pierwszej sesji OPU nakłuwane były wszystkie pęcherzyki jajnikowe o średnicy od 2 mm. Celem tego było wprowadzenie pęcherzyków jajnikowych w fazę rekrutacji. Pozostawienie pęcherzyków jajnikowych powyżej 6 mm przyczyniłoby się do wprowadzenia ich w fazę selekcji, co wiązałoby się z atrezią większości z nich, a to z kolei uniemożliwiłoby ponowną izolację oocytów w odstepie 3-4 dni (1, 2). W pierwszej sesji liczba nakłuwanych pęcherzyków u trzech dawczyń była zbliżona (dawczyni numer 1, 3 i 4) natomiast znacznie mniej pęcherzyków jajnikowych było nakłutych u dawczyni numer 2. Pomimo występującej w pierwszej sesji różnicy pomiędzy dawczyniami, nie miało to wpływu na liczbę nakłuwanych pęcherzyków jajnikowych po 10

sesjach, ponieważ najgorsza dawczyni po pierwszej sesji okazała się najlepszą po 16 sesjach.

Drugim ocenianym parametrem był odsetek zakwalifikowanych oocytów do dojrzewania *in vitro*. Jest to parametr opierający się na ocenie cech morfologicznych z tym, że przyjęcie jakiegokolwiek skali stosowanej dotychczas, a odnoszącej się do oocytów pochodzących z jajników od krów poddanych ubojowi w rzeźni nie jest wiarygodna. Jest to związane z samą techniką izolacji. Oocyty izolowane przy pomocy podciśnienia są otoczone mniejszą liczbą warstw komórek wzgórką jajonośnego bądź też charakteryzują się ich brakiem. Jednak powyższe cechy nie dyskwalifikują ich z hodowli. Stwierdzono, że odsetek uzyskanych zarodków w oparciu o oocyty izolowane techniką OPU jest porównywalny do odsetka zarodków uzyskanych w oparciu o oocyty izolowane z jajników pozbawionych od krów poddanych ubojowi w rzeźni (1, 3).

Natomiast bezwzględnie dyskwalifikowane były oocyty z uszkodzoną osłonką przejrzystą (częstotliwość występowania tego zjawiska jest o wiele częstsza niż w przypadku materiału rzeźnianego). Prawdopodobnie jest to związane z samą techniką izolacji, a dokładnie z stosowanym podciśnieniem, które w niektórych przypadkach jest zbyt wysokie. Być może ma też znaczenie igła, która w skrajnych przypadkach uszkadza oocyt. Również dyskwalifikowane były oocyty wykazujące oznaki degeneracji w obrębie ooplazmy. Częstotliwość występowania niniejszych zmian była taka sama w przypadku wszystkich dawczyń, czego potwierdzeniem jest odsetek zakwalifikowanych oocytów określany w stosunku do liczby izolowanych oocytów. Najwyższy odsetek oocytów zakwalifikowanych w stosunku do liczby izolowanych oocytów obserwowano u dawczyni 1 natomiast najniższy u dawczyni 2. Generalnie jednak odsetek zakwalifikowanych oocytów u poszczególnych dawczyń należy uznać za wysoki.

Kwalifikacja oocytów pozwala na standaryzację populacji oocytów, czyli na w miarę dokładny wybór tylko tych komórek, które mają szansę w warunkach *in vitro* podjąć proces dojrzewania, w wyniku którego osiągną metafazę II podziału mejotycznego (dojrzewanie *in vitro*). Ocena na podstawie odsetka izolowanych oocytów oraz odsetka zakwalifikowanych oocytów pozwala na wybór najlepszych dawczyń oocytów. Za najlepszą dawczynię należy uznać trzecią jałówkę, natomiast za najgorszą drugą jałówkę. Wybór najlepszy dawczyń oocytów umożliwia stworzenie stada dawczyń. Izolowane od nich oocyty po zakwalifikowaniu do dojrzewania, a następnie dojrzewaniu *in vitro* (in vitro maturation-IVM) mogą być zamrożone lub inseminowane, w wyniku czego dochodzi do zapłodnienia (in vitro fertilization – IVF). Powstała zygota jest hodowana przez siedem dni do stadium moruli i blastocysty (in vitro culture-IVC). Zarodki w tym stadium mogą być przeniesione do biorczyń lub też mogą być zamrożone.

## Piśmiennictwo

1. Becker F., Kanitz W., Nurnberg G., Kurth J., and Spitschak M.: Comparison of repeated transvaginal ovum pick-up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. *Theriogenology* 1996, 46, 999-1007.
2. Boni R., Roelofszen M., Pieterse M., Kogut J., and Kruip Th.: Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 1997, 48, 277-289.
3. Brackett B., Zuelke K.: Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1993, 39, 43-64.
4. Dellenbach P., Nisand I., Morreau L., Feger B., Plumere C., Gerlinger P.: Transvaginal sonographically controlled follicle puncture for oocyte retrieval. *Fert. Steril.* 1985, 44, 656-662.
5. Erickson B.: Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 1966, 25, 800-805.
6. Evans A., Adams G., and Rawlings N.: Prepubertal ovarian and endocrine changes preceding first ovulation in heifers. *J. Reprod. Fert., Abstract Ser.* No. 11, 1993, 76, abs. 141.
7. Fry R., Simpson T., Squires T., Parr R., Damanik R.: Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology* 1994, 41, 197.
8. Hopper H., Silcox R., Byerley D. and Kiser T.: Follicular development in prepubertal heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 1993, 31, 7-12.
9. Kanitz W., Becker F., Spitschak M., Torner H.: Method and results of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. *Proc. 9th Scientific AETE Meeting, Lyon* 1993, abs. 218.
10. Kemeter P., Feichtinger W.: Transvaginal oocyte retrieval using a transvaginal sector probe combined with an automated puncture device. *Human Reprod.* 1986, 1, 21-24.
11. Krupi Th., Boni R., Roelofszen M., Wurth Y., Pieterse M.: Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 1993, 39, 251.
12. Lenz S., Leeton J., Renou P.: Transvaginal recovery of oocytes for in vitro fertilization using vaginal ultrasound. *J. In Vitro Embryo Transfer* 1987, 4, 51-55.
13. Looney C., Lindsey B., Gonseth C., Johnson D.: Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 1994, 41, 67-72.
14. Pieterse M., Kappen K., Krupi T., Taverne M.: Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the bovine ovaries. *Theriogenology* 1988, 30, 751-762.
15. Pieterse M., Vos P., Krupi T., Wurth Y., van Beneden T., Wilmense A., Taverne M.: Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991, 35, 19-24.
16. Pieterse M., Taverne M., and Kruip Th.: Collection of bovine oocytes by means of transvaginal ultrasound guided puncture technique. *Proc. 11th Internat. Congress on Animal Reprod. Artificial Insem., Dublin* 1988, 3, 348.
17. Van der Schans A., van der Westerlaken L., de Wit A., Eyerstone W., de Boer H.: Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 1991, 35, 288.

Adres autora: dr Anna Maria Duszczeńska, Jastrzębiec, 05-551 Mroków; e-mail: amd@yahoo.com

## MIN K., CHAE C.: Serotyp i profile genotypowe apx izolatów terenowych *Actinobacillus pleuropneumoniae* w Korei. (Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea). *Vet. Rec.* 145, 251-254, 1999 (9)

Pleuropneumonia prosiąt wywołana przez *Actinobacillus pleuropneumoniae* występuje powszechnie i powoduje duże straty ekonomiczne w hodowli trzody chlewnej. Wyróżnia się dwa biotypy (1,2) tego zarazka oraz 12 serotypów. Sto izolatów terenowych *A. pleuropneumoniae* pochodzących z lat 1995-1997 z płuc 160 świń ze zmianami typowymi dla zapalenia płucnej i płuc zbadano w teście aglutynacji szkiełkowej, precypitacji i teście PCR dla apxICA, apxIICA, apx IBD oraz apx IIIBD. Serotyp 2, do którego zaliczono 28 izolatów i 6, do którego należało 11 izolatów występowały najczęściej. Jedynie dwa izolaty należały do serotypu 7 zaś 3 izolaty nie udało się zaliczyć do żadnego ze znanych serotypów. Wśród 97 izolatów, dla których określono przynależność serotypową 70 miało te same geny apx jak odpowiednie szczepy referencyjne. Jednakże 27 izolatów nie zawierało w swoim genomie genu apx odpowiadającemu odpowiedniemu serotypowi. Wśród nich 10 należało do serotypu 2, 17 do serotypu 5, 3 do serotypu 6 i 2 należały do serotypu 7.