

Potencjał rozwojowy zarodków owiec w stadium dwóch przedjądrzy^{*})

MAŁGORZATA LIBIK, TOMÁŠ SLAVÍK^{*}, MACIEJ MURAWSKI, EDWARD WIERZCHOŚ

Katedra Hodowli Owiec i Kóz Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
^{*}Ústav živočišné Fyziologie a Genetiky, Akademie Věd České Republiky, 277 21 Liběchov, Republika Czeska

Libik M., Slavík T., Murawski M., Wierzchoś E.

Developmental potential of sheep embryos at two pronuclei stages

The aim of this study was to test the viability of embryos of two pronuclei stages after transfer to recipients. Experiments were carried out on 300 oocytes recovered from ovaries of Polish Longwool sheep. 76.6% (230) of the oocytes underwent the maturation process successfully. The cytological evaluation of the embryos revealed a high rate of fertilisation. In 80% (184/230) of the embryos both pronuclei and the tail in the vicinity of the male pronucleus were present. The polysperms exceeded 10%. To test developmental ability, 72 embryos after two pronuclei stages were transferred to 12 recipients; 3 embryos were introduced into each oviduct of the recipients. As a result, 9 (75%) pregnant ewes delivered in term and 14 lambs were born. As a control, 20 Polish Longwool sheep were synchronically naturally inseminated, which resulted in 18 sheep delivering 29 lambs. These results demonstrate that sheep embryos can be produced *in vitro*, and after being cultured to only two pronuclei stages they can be successfully transferred to recipients.

Keywords: *in vitro* fertilization, embryo transfer, sheep

Pomimo, że od urodzenia pierwszych jagniąt uzyskanych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego oocytów dojrzałych owiec minęło już ponad 15 lat (1, 2), to postęp w zakresie wprowadzania metody do praktyki jest nadal minimalny. Co prawda, metoda IVM/IVF w kolejnych latach ulegała dalszemu doskonaleniu poprzez wykorzystanie pośrednich biorczyń w celu uzyskania zarodków w stadium blastocysty, jednak odsetek rodzących się jagniąt, w przeciwieństwie do bydła był także niewielki (2, 3, 7). Jak twierdzi Walker i wsp. (9) przyczyny tego stanu tkwią prawdopodobnie w niedopracowaniu metod hodowli *in vitro* co może mieć wpływ na występowanie anomalii zarodków i płodów.

Trudności ograniczające skuteczność metody, tj. hodowli *in vitro* zarodków owiec do stadiów najbardziej zalecanych do transplantacji, starali się pokonać w tym czasie Slavík i wsp. (8) poprzez transplantację zarodków w stadium dwóch lub czterech blastomerów bezpośrednio do jajowodów matek biorczyń. Ostatnio, dość duży sukces odnieśli O'Brien i wsp. (4) oraz Ptak i wsp. (6) uzyskując potomstwo po zapłodnieniu *in vitro* oocytów dorosłych owiec i jagniąt oraz hodowli pozaustrojowej zarodków do stadium blastocysty.

Z uwagi na fakt, iż próby długotrwałej hodowli zarodków owiec w warunkach *in vitro* w celu uzyskania

stadium blastocysty są nadal dość skomplikowane i kosztowne, podjęto próbę uproszczenia postępowania, tj. transplantacji zapłodnionych komórek jajowych w stadium dwóch przedjądrzy, a więc średnio około 20 godzin po zapłodnieniu, z pominięciem hodowli *in vitro* do stadium moruli czy blastocysty.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w okresie sezonu rozrodczego na 42 maciorkach rasy polska owca długowłnista, z których 10 wykorzystano jako dawczynie oocytów, 12 było biorczyńmi zarodków, a 20 pokrytych naturalnie stanowiło grupę kontrolną.

Jajniki pozyskiwano poubojowo od owiec, a oocyty izolowano poprzez nacinanie i skaryfikację warstwy korowej. Do hodowli wykorzystano 300 oocytów o prawidłowej budowie cytoplazmy, otoczone spoiwą warstwą komórek wzgórka jajonośnego. Dojrzewanie oocytów (około 30 oocytów w 4 dołkowej płytce, Nuncklon, Dania) prowadzono przez 24 godziny w pożywce TCM 199 z dodatkiem FSH 1 IU/ml oraz 10% BSA w cieplarni o temp. 38,5°C i 5% zawartości CO₂ w powietrzu (5).

Do zapłodnienia *in vitro* wykorzystano świeże nasienie tryka o sprawdzonej płodności, poddane rutynowej ocenie makro i mikroskopowej. Tuż po pobraniu nasienie rozrzedzono tą samą pożywką, którą używano do hodowli oocytów uzupełnioną dodatkowo 20% surowicą bydlęcą (BSA) i wirowano dwukrotnie przy 200 g przez 10 min. Następnie, osocze nasienia o objętości 1 ml i znajdujące się w nim plemniki wprowadzano pod odmierzone wcześniej 1,5

^{*} Praca wykonana w ramach DS. 3242/KHOiK/01, GACR#524/99/0844.

ml pożywki i przenoszono na 15 min. do cieplarki o temp. 38,5°C, tworząc w ten sposób warunki do kapacytacji plemników metodą „swim up”. Po zebraniu górnej warstwy pożywki i obliczeniu koncentracji plemników, dodawano je ($1 \times 10^6/\text{ml}$) do dojrzałych oocytów umieszczonych w pożywce zawierającej 50 IU/ml heparyny.

Współinkubację oocytów z plemnikami prowadzono przez okres 20-22 godzin, w tych samych warunkach co dojrzewanie gamet. Przed planowanym zabiegiem transplantacji, określano skuteczność zapłodnienia na podstawie obecności dwóch przedjądrzy i witki plemnika w cytoplazmie oocytu (ryc. 1). Preparaty mikroskopowe wykonywano z losowo wybranych zarodków, które utrwalono w kwaśnym alkoholu, wybarwiono orceiną, a następnie oceniono je w mikroskopie odwróconym z optyką Nomarskiego.

Cykl rujowy bioreczni synchronizowano przy użyciu dopochwowych gąbek (Chronogest, Intervet, Holandia) zawierających 40 mg Cronolone. Gąbki zakładano na okres 14 dni, a w dniu ich usunięcia dodatkowo podawano zwierzętom 500 IU PMSG (Seroganodotropin, Biowet) w formie jednorazowej iniekcji. Transplantacje zarodków w kolejnych doświadczeniach wykonywano metodą chirurgiczną wprowadzając je grupie przygotowanych bioreczni (4 sztuki) bezpośrednio do lejka jajowodu. Zarodki w stadium dwóch przedjądrzy wprowadzano do jajowodów 12 maciorkom bioreczniom około 56 godzin po rui.

Grupę kontrolną stanowiło 20 owiec maciorek, u których cykl rujowy synchronizowano wg wyżej opisanego postępowania. Owce kryto sprawdzonym pod względem płodności trykiem dwukrotnie w ciągu jednego dnia, aż do czasu ustąpienia objawów rujowych.

Wyniki i omówienie

Potencjał rozwojowy pojedynczych blastomerów zarodków owiec produkowanych *in vitro*, lub dzielonych na dwie połowy śledziła Członkowska (3). W wyniku zapłodnienia *in vitro* oocytów owiec, a następnie hodowli *in vivo* do stadium moruli i blastocysty w jajowodach pośrednich bioreczni, autorka uzyskała 9 jagniąt z 21 transplantowanych blastocyst. Pierwszymi, którzy opanowali metodę zapłodnienia i hodowli *in vitro* zarodków owiec do stadium blastocysty i otrzymali potomstwo po transplantacji tych zarodków byli O'Brien i wsp. (4). Podobny sukces był udziałem Ptak i wsp. (6) wykorzystujących oocyty jagniąt i dorosłych owiec. W 1992 r. Slavik i Fulka (8) otrzymali potomstwo po transplantacji wyprodukowanych *in vitro* zarodków owiec transplantowanych w stadium 2 lub 4 blastomerów do jajowodu bioreczni. Autorzy ci wykazali również, że tylko transplantacja większej liczby zarodków do jajowodu (od 4-5) może zakończyć się znaczącym sukcesem. Po wprowadzeniu jednego zarodka do jajowodu wykończyło się bowiem zaledwie 30% owiec.

Przeprowadzone badania własne miały na celu rozpoznanie możliwości uzyskania potomstwa po transplantacji jeszcze wcześniejszych stadiów rozwojowych zarodka od tych, jakie użyli w swych doświadczeniach Slavik i Fulka (8). Na ogólną liczbę pozyskanych 300 oocytów, dojrzałość do zapłodnienia *in vitro* osiągnęło średnio 76,6% tj. około 230 komórek jajowych. Zapłodnienie *in vitro*, a więc obecność dwóch przedjądrzy oraz witkę plemnika w sąsiedztwie męskiego przedjądrza, stwierdzono u 184 tj. 80% zarodków. Przy czym u 10% zarodków obserwowano kilka przedjądrzy co świadczyło o ich wielokrotnej penetracji przez plemniki (polispermia). W celu sprawdzenia zdolności rozwojowej tak wyprodukowanych zarodków, transplantowano je 12 bioreczniom, wprowadzając po 3 zarodki do jednego jajowodu. Łącznie 12 bioreczniom transplantowano 72 zarodki. Potomstwo uzyskano od 9 maciorek, tj. 75% bioreczni, które urodziły 14 jagniąt: 3 z pojedynczych wykotów, 4 podwójnych i 1 trojaczny. Należy podkreślić, że w dwóch grupach doświadczalnych wykociło się 100% owiec biorecznych, a w jednej 25% (tab. 1). W tym samym czasie w grupie kontrolnej z 20 pokrytych owiec wykociło się 18, tj. 90% maciorek dając 29 jagniąt (161%), tj. 12 jedynek oraz 7 bliźniąt (tab. 2).

Przedstawione w tab. 1 wyniki wskazują na możliwość pozaustrojowej produkcji i transplantacji zarodków w stadium dwóch przedjądrzy, a tym samym skrócenie do minimum ich pozaustrojowej hodowli. Przyjmując, iż z 72 transplantowanych zarodków ok. 50 (70%) było prawidłowo zapłodnionych urodzenie się więc 14 sztuk potomstwa stanowiło prawie 28% możliwych do uzyskania jagniąt.

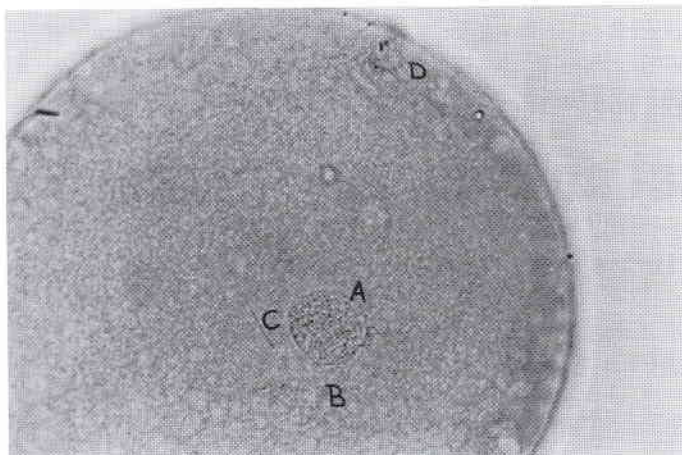
Wyliczając hipotetyczną wydajność metody przy zastosowaniu proponowanych rozwiązań można zauważyć, iż z 100 oocytów zakwalifikowanych do zapłodnienia *in vitro* istnieje prawdopodobieństwo, że po przejściu tego procesu i transplantacji zarodków w stadium dwóch przedjądrzy można uzyskać około 19

Tab. 1. Wyniki transplantacji zarodków owiec (w stadium dwóch przedjądrzy) uzyskanych metodą *in vitro*

Grupa	Liczba				Wykoty		
	bioreczni	transplantowanych zarodków/biorecznie	wykończonych bioreczni (%)	urodzonych jagniąt	pojedyncze	dwojaczne	trojaczne
1	4	6	4 (100)	7	1	3	-
2	4	6	1 (25)	2	-	1	-
3	4	6	4 (100)	5	2	-	1
Razem	12	72	9 (75)	14	3	4	1

Tab. 2. Wyniki wykotów maciorek po naturalnym kryciu

matek	Liczba		Wykoty	
	wykończonych matek (%)	urodzonych jagniąt	pojedyncze	dwojaczne
20	18 (90)	29	13	8



Ryc. 1. Zarodek w stadium dwóch przedjądrzy około 20 godz. po zapłodnieniu *in vitro*. Pow. 600×; A. przedjądrze męskie, B. przedjądrze żeńskie, C. witka plemnika, D. ciałko kierunkowe

sztuk jagniąt. Przy postępowaniu jakie wypracowali Ptak i wsp. (6) liczba ta wynosi 15 sztuk, a według O'Brien i wsp. (4) 16 sztuk. Natomiast utrzymanie się ciąży zakończonych porodem 9 bioreczyń tj. 75% z 12, którym transplantomowano zarodki w stadium dwóch przedjądrzy jest wynikiem zadowalającym i przekraczającym prawie o 10% rezultaty uzyskane przez O'Brien i wsp. (4), i o 25% przez Ptak i wsp. (6) po transplatacji zarodków w stadium blastocysty.

Przeprowadzone badania wykazały, że transplatacja zarodków w stadium dwóch przedjądrzy umożliwia skrócenie czasu inkubacji *in vitro* zapłodnionych pozaustrojowo zarodków. Tym samym więc, minimalizuje ryzyko wystąpienia anomalii rozwojowych spowodowanych wydłużoną hodowlą poza organizmem

matki zarodków do stadium moruli/blastocysty. Potwierdzeniem tych obserwacji może być liczba uzyskanych na tej drodze ciężarnych macierek, która porównywalna jest z wynikami dotyczącymi transplatacji zarodków w wyższych stadiach rozwojowych.

Piśmiennictwo

1. Cheng W.T.K., Moor R.M., Polge C.: In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and vitro. *Theriogenology* 1986, 25, 146 abstr.
2. Crozet N., Huneau D., Desmedt V., Theron M.C., Szollosi D., Torres S., Sevellec C.: In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res.* 1987, 16, 159-170.
3. Członkowska M.: Rozwój i przeżywalność zarodków owiec poddanych zamrażaniu oraz zabiegom mikrochirurgii. Praca hab. PAN, Wrocław Ossolineum, 1991, s.96.
4. O'Brien J.K., Dware D., Ryan J.P., Maxwell W.M.C., Evans G.: Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996, 8, 1029-1037.
5. Pavlok A., Torner H., Motlik J., Fulka J., Kauffold P., Duschinski U.: Fertilization of bovine oocytes in vitro: effect of different sources of gametes on fertilization rate and frequency of fertilization anomalies. *Anim. Reprod. Sci.* 1988, 16, 207-213.
6. Ptak G., Loi P., Dattena M., Tischner M., Cappai P.: Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod.* 1999, 61, 1568-1574.
7. Pugh P.A., Fukui Y., Tervit H.R., Thompson J.G.: Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen. *Theriogenology* 1991, 36, 771-778.
8. Slavik T., Fulka J., Goll I.: Pregnancy rate after the transfer of sheep embryos originated from randomly chosen oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1992, 38, 749-756.
9. Walker K.S., Heard T.M., Bee C.A., Frensham A.B., Wames D.M., Seamark R.F.: Embryonic Development and Manipulation in Animal Reproduction. Portland Press, London, 1992, s.77-92
10. Walker K.S., Harwich K.M., Seamark R.F.: The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* 1996, 45, 11-120.

Adres autora: mgr Małgorzata Libik, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; e-mail: glibik@wp.pl

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych PIWet. i Sekcja Parazytologii PTNW

uprzejmie zapraszają na konferencję naukową na temat:

PASOŻYTNICZE PIERWOTNIKI – ZAGROŻENIEM ZDROWIA ZWIERZĄT

która odbędzie się w dniach 10-11 października 2002 r.
w Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Podyplomowego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

Osoby zainteresowane udziałem w Konferencji
proszone są o kontakt telefoniczny, listowny lub e-mail:
Dr Tomasz Cencek, Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych PIWet.,
Al. Partyzantów 57, 24-100 PUŁAWY
tel. 0-prefix-81 886 30 51 w. 281, e-mail: tcencek@piwet.pulawy.pl