

Ocena jałówek jako dawczyń oocytów wykorzystywanych do uzyskania zarodków w warunkach *in vitro*

ANNA M. DUSZEWSKA, ZYGMUNT REKLEWSKI*, JAROSŁAW WOJDAN*, WITOLD GAWRON*, MACIEJ KORWIN-KOSSAKOWSKI, MAŁGORZATA CYBULSKA

Zakład Embriologii Doświadczalnej, *Zakład Genetyki i Hodowli Bydła IGiHZ PAN, Jastrzębiec, ul. Postępu, 05-552 Wólka Kosowska

Duszevska A. M., Reklewski Z., Wojdan J., Gawron W., Korwin-Kossakowski M., Cybulska M.
Evaluating heifers used for embryo production by OPU-IVM-IVF-IVC

Summary

The objective of this study was to evaluate heifers used for production of embryos by OPU-IVM-IVF-IVC. Oocytes were isolated by OPU from five 14-month heifers (Aberdeen Angus) twice a week during the course of 8 weeks (16 sessions). The highest number of isolated oocytes were found in donors 4 and 5, but the highest percentage of isolated oocytes (ratio between the number of isolated oocytes and punctured follicles) were found in donor 3. The percentage of qualified oocytes and cleavage embryos were similar in all donors. The highest number of morulae/blastocysts was found in donor 3 (31), as was the percentage of morulae/blastocysts (ratio between the number of morulae/blastocysts and qualified oocytes) (45.58). The lowest number was found in donor 1 (15), but the lowest percentage was found in donor 5 (26.25). The evaluation of these parameters allows for the selection of the best donor of embryos.

Keywords: OPU, IVM, IVF, IVC, embryos, heifers

Jednym ze sposobów przyspieszenia postępu w hodowli bydła jest wykorzystanie jałówek jako dawczyń oocytów. Oocyty izolowane są od samic w stadium profazy I podziału mejotycznego (niedojrzałe oocyty) poprzez punkcję pęcherzyków jajnikowych (OPU – *vum pick-up*). Następnie oocyty są dojrzewane w warunkach *in vitro* (IVM – *in vitro* maturation) i zapłodniane (IVF – *in vitro* fertilization). Uzyskane zygoty są hodowane do stadium moruli bądź blastocysty (IVC – *in vitro* culture). Zarodki w tym stadium mogą być przeniesione do biorczyń lub też mogą być zamrożone (ET) (schemat 1).

OPU-IVM-IVF-IVC-ET pozwala na przyspieszenie postępu w hodowli bydła poprzez zmniejszenie odstępu międzypokoleniowego oraz poprzez wykorzystanie jako dawczyń oocytów samic najlepszych pod względem wybranych cech użytkowych.

Od dawczyni oocytów można tą techniką uzyskać o wiele więcej zarodków niż w przypadku innych biotechnik. Stosując program MOET, od dawczyni w ciągu roku można uzyskać 18 zarodków natomiast w przypadku OPU-IVM-IVF-IVC 60 zarodków. OPU-IVM-IVF-IVC-ET ma ogromne znaczenie w klonowaniu bydła, tworzeniu osobników transgenicznych, klonowaniu osobników transgenicznych oraz tworzeniu chimer (4). Jednym z istotnych elementów niniejszej techniki jest wybór ze stada samic na dawczynie oocytów. Ocenę samicy przeprowadza się na podstawie wielu parametrów. Oprócz liczby izolowanych i zakwalifikowanych oocytów oceniana jest również liczba zarodków podzielonych i liczba morul i blastocyst. Do-

piero kompleksowa analiza wszystkich parametrów pozwala na wybór ze stada samic na dawczynie oocytów. Stąd też celem niniejszych badań była ocena jałówek jako dawczyń oocytów wykorzystywanych do uzyskania zarodków techniką OPU-IVM-IVF-IVC.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 5 jałówkach w wieku 14 miesięcy rasy aberdeen angus. Niedojrzałe oocyty izolowane były techniką OPU (18, 19, 20), dwa razy w tygodniu przez 8 tygodni (16 sesji).

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 (18 G). Punkcję wykonano po podaniu dożylnym 0,4 ml Demosedanu (Pfizer) oraz podaniu nadoponowo 3 ml 2% polokainy z adrenaliną (Biowet-Drwalew).

Niedojrzałe oocyty izolowano techniką OPU z pęcherzyków jajnikowych o średnicy od 2 do 6 mm, a następnie trzykrotnie płukane w płynie TCM199 buforowanym Hesper 25 mM (GIBCO) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (FBS) (GIBCO), 50 µg gentamycyny (SIGMA) 100 IU penicyliny (SIGMA) i 50 µg/ml streptomycyny (SIGMA) i doprowadzane do pH 7,4. Izolowane oocyty dojrzewały w warunkach *in vitro* w płynie TCM199 buforowanym Hesper z dodatkiem 10% (FBS), 0,02 IU/ml pFSH (SIGMA), 17β-estradolu (SIGMA), 0,2 mM pirogromianu sodu (MERCK) oraz 50 µg/ml gentamycyny (SIGMA), 100 IU penicyliny (SIGMA) i 50 µg/ml streptomycyny (SIGMA) i doprowadzane do pH 7,4. Oocyty hodowane były przez 24 godziny w temperaturze 38,5°C i 5% CO₂ w powietrzu (16).

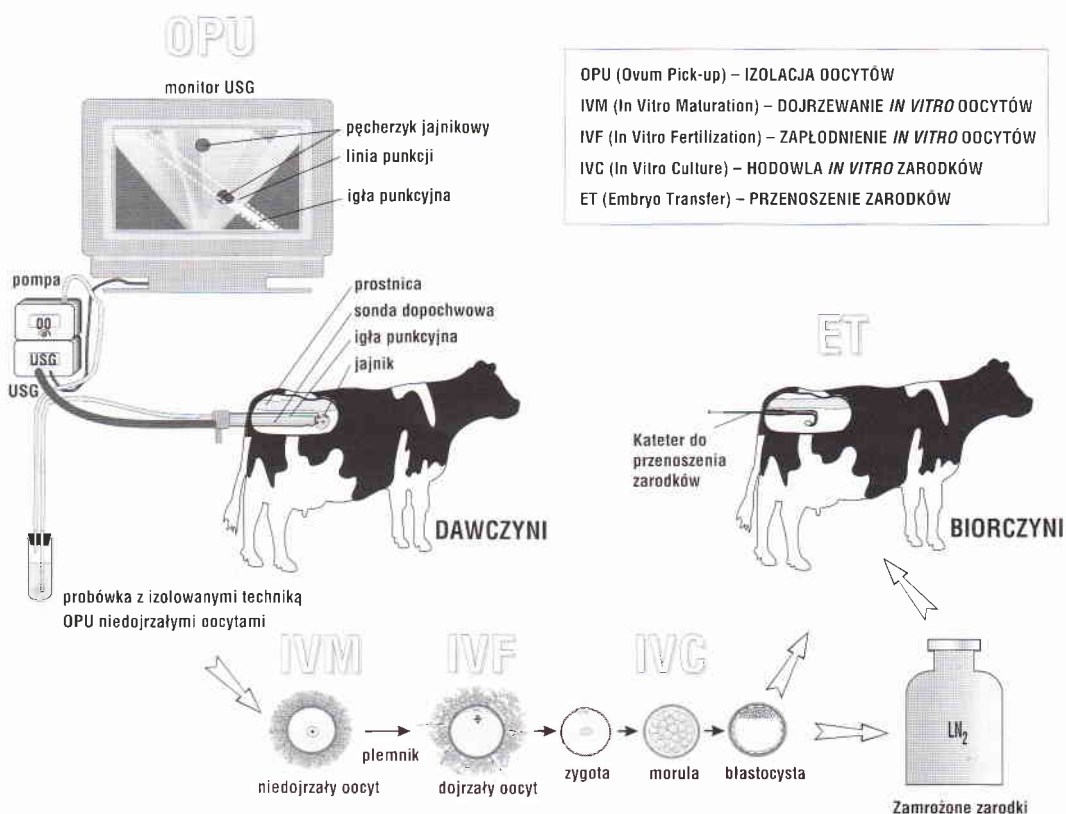
Do zapłodnienia *in vitro* użyto nasienia jednego buhaja (BONUS) rasy aberdeen angus.

Zamrożone nasienie rozmrażano w temperaturze 37°C, a następnie wirowano (200×G) przez 10 min. i poddawano procesowi kapacytacji techniką swim-up w płynie Sp-TALP z dodatkiem 6 mg/ml BSA frakcja V (SIGMA). Dojrzałe oocyty były zapładniane w warunkach *in vitro* w płynie TALP z dodatkiem 6 mg/ml BSA FAF (SIGMA), 40 µl/ml PHE (SIGMA) i 2 µg/ml heparyny (SIGMA) (17). Po 18 godzinnej hodowli, zapłodnione oocyty były hodowane w obecności komórek Vero i BRL (hodowla mieszana) w 40 µl kroplach utworzonych z płynu Menezo B2 z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydłowej (FBS) i 100 IU penicyliny (SIGMA) i 50 µg/ml streptomycyny (SIGMA) (5). Hodowlę prowadzono przez 7 dni w temperaturze 38,5°C i 5% CO₂ w powietrzu. Uzyskane zarodki w stadium późnej moruli i blastocysty były przenoszone do biorczyń lub zamrażane.

Każdą z dawczyń oocytów oceniano pod kątem: liczby nakłuwanych pęcherzyków, izolowanych oocytów, oocytów zakwalifikowanych do IVF, morul i blastocyst. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono dla każdej dawczynie: odsetek izolowanych oocytów (stosunek liczby izolowanych oocytów do liczby nakłuć), odsetek oocytów zakwalifikowanych do IVM (stosunek liczby oocytów zakwalifikowanych do liczby izolowanych oocytów), odsetek zarodków podzielonych (stosunek liczby zarodków podzielonych do liczby oocytów zakwalifikowanych do IVM), odsetek morul i blastocyst (stosunek liczby morul i blastocyst do liczby oocytów zakwalifikowanych do IVM). Ponadto podano liczbę zarodków od dawczynie z sesji (16 sesji).

Wyniki i omówienie

Wyniki badań zamieszczono w tab. 1. Najwyższy odsetek izolowanych oocytów stwierdzono w przypadku dawczynie 3, chociaż największą liczbę nakłuć wykonano w przypadku dawczynie 5 jednak wyizolowano od



Ryc. 1. Technika OPU-IVM-IVF-IVC-ET polega na przyżyciowej izolacji oocytów poprzez punkcję pęcherzyków jajnikowych (OPU). Izolowane oocyty dojrzewają w warunkach *in vitro* (IVM). Dojrzałe oocyty są zapładniane (IVF), a powstałe zarodki hodowane (IVC) do stadium moruli bądź blastocysty. Zarodki w tym stadium są przenoszone do biorczyń bądź mrożone (ET).

niej o wiele mniej oocytów. Najniższy odsetek uzyskano w przypadku dawczynie 2. Występujące między dawczyniami różnice (od 38,74% do 68,89%) wskazują na indywidualne predyspozycje do OPU czego potwierdzeniem mogą być wyniki uzyskane we wcześniejszych badaniach prowadzonych na 14 miesięcznych jałówkach aberdeen angus (od 42,20% do 66,39% – 3). Autorzy innych badań wskazują na istniejące

Tab. 1. Efektywność kolejnych etapów OPU-IVM-IVF-IVC u jałówek rasy aberdeen angus (n = 16)

| Oceniane parametry | Numer dawczynie | | | | |
|----------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Liczba nakłuć | 101 | 111 | 125 | 135 | 189 |
| Liczba izolowanych oocytów | 52 | 43 | 89 | 93 | 93 |
| % izolowanych oocytów | 51,48 | 38,74 | 71,20 | 68,89 | 49,20 |
| Liczba oocytów zakwalifikowanych | 38 | 32 | 68 | 73 | 69 |
| % oocytów zakwalifikowanych | 73,08 | 74,42 | 76,40 | 78,49 | 74,19 |
| Liczba zarodków podzielonych | 30 | 25 | 55 | 60 | 63 |
| % zarodków podzielonych | 78,95 | 78,12 | 80,88 | 82,19 | 81,82 |
| Liczba morul i blastocyst | 15 | 12 | 31 | 30 | 21 |
| % morul i blastocyst | 39,47 | 37,50 | 45,58 | 41,09 | 26,25 |
| Liczba zarodków z sesji (n = 16) | 0,94 | 0,75 | 1,94 | 1,87 | 1,31 |

między dawczyniami różnice w odsetku izolowanych oocytów (8, 14, 15, 19). Niniejszy wskaźnik ma szczególne znaczenie dla zespołu lekarzy weterynarii izolujących oocyty z pęcherzyków jajnikowych ponieważ wskazuje na ich umiejętności praktyczne (11). Również do istotnych czynników można zaliczyć wielkość podciśnienia (1) oraz ułożenie układu rozrodczego, a tym samym na dostępność do jajnika i możliwość ułożenia go względem sondy.

Oceniając dawczynię pod kątem odsetka oocytów zakwalifikowanych do IVM nie stwierdzono istotnych różnic (od 73,08% do 78,49%). Należy jednak podkreślić, że uzyskany w niniejszych badaniach odsetek oocytów zakwalifikowanych do IVM był niższy niż w przypadku wcześniejszych badań prowadzonych również na jałówkach rasy aberdeen angus (od 80,24% do 93,75% – 3) oraz na cielnych jałówkach rasy HF (od 89,10% do 95,40% – 7).

Oceniane pod kątem odsetek zarodków podzielnym dawczynię nie różniły się istotnie (od 78,12% do 82,19%), a uzyskane wyniki są porównywalne do wyników wcześniejszych badań również prowadzonych na jałówkach tej samej rasy (3). Liczba zarodków podzielonych jest istotnym parametrem z dwóch powodów. Po pierwsze w sposób pośredni mówi nam o wydajności zapłodnienia ponieważ ze względu na specyfikę gatunkową nie ma możliwości obserwacji procesu zapłodnienia w warunkach *in vitro* tak jak jest to możliwe w przypadku myszy czy ludzi. Po drugie w przypadku tworzenia transgenicznego bydła poprzez iniekcję transgeny do przedjądra niniejszy parametr wskazuje nam na powodzenie i wydajność niniejszej techniki (12, 13, 21).

Najistotniejszym ocenianym parametrem jest liczba morul i blastocyst uzyskanych od poszczególnych dawczyń. Uzyskane wyniki zawierały się w przedziale od 12 do 31 zarodków z 16 sesji. Tak duża różnica między dawczyniami obserwowana była również we wcześniejszych badaniach, w których uzyskano od 12 do 33 zarodków (3). Również autorzy innych badań wskazują na dużą rozpiętość między dawczyniami (2, 6, 9, 10, 22). Najwięcej morul i blastocyst uzyskano od dawczyny 3. Najmniej morul i blastocyst uzyskano od dawczyny 2. Jednak biorąc pod uwagę odsetek morul i blastocyst to najniższy uzyskano u dawczyny 5. Pomimo, że wykonano u niej najwięcej nakłuć pęcherzyków jajnikowych jak i izolowano, i zakwalifikowano od niej najwięcej oocytów do hodowli. W tab. 1 podano również liczbę zarodków od dawczyny z sesji co ma praktyczne znaczenie gdyż pozwala na zaplanowanie i przygotowanie odpowiedniej liczby bioczystych zarodków.

Wyniki powyższych badań wskazują na indywidualne predyspozycje dawczyń do OPU-IVM i IVF oraz IVC. Stąd też ich przeprowadzenie było niezbędne do wytypowania jałówek i stworzenia z nich grupy dawczyń, które będą wykorzystywane do dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. 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.
2. Duszewska A. M.: Produkcja zarodków bydłecych *in vitro*. *Przegl. Hod.* 1997, 8, 25-27.
3. Duszewska A. M., Wojdan J., Kolodziejki Z., Buczek P., Gawron W., Cymbulska M., Pieńkowski M.: The preliminary results of OPU-IVF-ET of bovine embryos. *Anim. Sci. Papers Reports* 1998, 16, supl. 1, 67-68.
4. Duszewska A. M.: Od inseminacji do klonowania bydła. *Przegl. Hod.* 2000, 8, 18-20.
5. Duszewska A. M., Reklewski Z., Pieńkowski M., Karasiewicz J., Modliński J. A.: Development of bovine embryos on VERO/BRL cell monolayers (mixed co-culture). *Theriogenology* 2000, 54, 1239-1247.
6. Duszewska A. M., Reklewski Z., Wojdan J., Pieńkowski M., Modliński J. A.: Development of bovine embryos obtained by Ovum Pick-Up, IVM-IVF and IVC on VERO/BRL cell monolayers (mixed co-culture). *Theriogenology* 2000, 53, 294.
7. Duszewska A. M., Reklewski Z.: Izolacja oocytów od cielnych jałówek techniką OPU. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 41-42.
8. Fry R., Simpson T., Squires T., Parr R., Damanik R.: Factors affecting transvaginal oocyte pick-up in heifers. *Theriogenology* 1994, 41, 197.
9. Hasler J. F., Henderson W. B., Hurtgen P. J., Jin Z. Q., McCauley A. D., Mower S. A., Neely B., Shuey L. S., Stokes J. E., Trimmer S. A.: Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995, 43, 141-152.
10. Kanishi M., Aoyagi Y., Takedomi T., Itakura H., Itoh T., Yazawa S.: Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology* 1996, 45, 573-581.
11. Kanitz W., Becker F., Spitschak M., Torner H.: Method and results of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. *Proc. 9th Sci. AETE Meeting*, Lyon 1993, abs. 218.
12. Kozikova L. B., Rosochacki S., Duszewska A. M., Jakowliw A. F.: Wybór zarodków z genami reporterowymi. II Międzynarodowa Konferencja Naukowa Biotechnologia Roślin, Zwierząt i Weterynarii, Moskwa 18-19 października 2000, Materiały Kongresowe 2000, 142-144.
13. Kozikova L., Duszewska A. M., Rosochacki S. J.: Wprowadzanie GFP do zygot bydłecych uzyskanych *in vitro*. *Rosyjska Akademia Nauk Rolniczych, Sankt-Petersburg, Materiały Kongresowe Konferencji Naukowej Biotechnologii* 2001, 148-153.
14. Krupi Th., Boni R., Roelofsens M., Wurth Y., Pieterse M.: Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 1993, 39, 251.
15. 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.
16. Marguant-Le Guienne B., Gerard M., Solari A., Thibault C.: *In vitro* culture of bovine eggs fertilized either *in vivo* or *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.* 1989, 29, 559-568.
17. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., Leibfried-Rutledge M. L., Critse E. S., Eyestone W. H., First N. L.: Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986, 25, 591-600.
18. Pieterse M. C., Taverne M. A. M. and Kruij T. A. M.: Collection of bovine oocytes by means of transvaginal ultrasound guided puncture technique. *Proc. 11th Internat. Congress Anim. Reprod. Artif. Insemi., Dublin* 1988, 3, 348.
19. 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.
20. Pietrase M. C., Vos P. L. A. M., Krupi T. A. M., Wurth Y. A., Van Beneden T. H., Wilmense A. H., Taverne M. A. M.: Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991, 35, 19-24.
21. Rosochacki S. J., Duszewska A. M., Kozikova L., Olszewski R.: Expression of GFP in microinjected bovine embryos. *Anim. Sci. Papers Reports* 2001, 19, 193-202.
22. Santl B., Wenigerkind H., Scherthaner W., Modl J., Stojkovic M., Prella K., Holtz W., Brem G., Wolf E.: Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology* 1998, 50, 89-100.