

Prosięta uzyskane po transplatacji wityfikowanych blastocyst

BARBARA GAJDA, ZDZISŁAW SMORAŁ, JAROSŁAW WIECZOREK

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Gajda B., Smorał Z., Wieczorek J.

Piglets obtained after transplantation of vitrified blastocysts

Summary

The aim of the present study was to determine whether vitrified pig blastocysts can fully develop *in vivo*. The experiment was carried out both with pig blastocysts obtained from 2-4-cell embryos produced *in vivo* after which they were cultured in NCSU-23 medium until the blastocyst stage, and with blastocyst-stage embryos obtained *in vivo*. Vitrification was performed in straws in a mixture of protective agents containing 40% ethylene glycol, 18% ficoll and 0.3 M saccharose. Thawing involved placing the straw with embryos in a water bath at 20°C. Protective agents were removed in single stages using 0.5 M sucrose. Thawed embryos were surgically transplanted into the oviduct or uterus of synchronized recipients.

Of the 8 recipients of which the oviducts were transplanted with 147 vitrified blastocysts, 5 were determined to be pregnant 30 days after the treatment. Pregnancy was confirmed in 3 (37.5%) gilts that gave birth to 18 piglets after farrowing during another examination approximately 60 days after the transplantation. The other two recipients were found non-pregnant during the second examination, probably due to fetal death. Of the 14 recipients the uteruses of which were transplanted with 274 vitrified blastocysts, 1 recipient was determined to be pregnant on day 30 after the transplantation. However, this pregnancy was not confirmed during another examination.

The results of our experiment indicate that one of the main factors affecting the full developmental capacity of vitrified pig embryos at the blastocyst stage is their oviductal transplantation.

Keywords: pig, vitrification, transplantation

Coraz większe zainteresowanie opracowaniem efektywnych metod kriokonserwacji zarodków świni powodowane jest zarówno względami praktycznymi, jak i teoretycznymi (3). Wprowadzenie bowiem nowych technologii w rozrodzie świń, takich jak pozaustrojowe zapłodnienie i produkcja zarodków *in vitro* czy też osiągnięcia biotechnologii rozrodu dotyczące możliwości uzyskiwania zwierząt transgenicznych i ich klonowania będzie się wiązało z większym zapotrzebowaniem na kriokonserwowane oocyty i zarodki. Mimo że dysponujemy już efektywnymi metodami kriokonserwacji gamet i zarodków większości zwierząt gospodarskich, wciąż niezadowolająco są one opanowane w odniesieniu do świń (10).

Pierwsze sukcesy, jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni były przede wszystkim rezultatem użycia do zamrażania zarodków w odpowiednim stadium rozwoju, tj. ekspandującej lub wylęgłej blastocysty (15, 17). W kolejnych pracach nad zamrażaniem zarodków świni liczba użytych do doświadczeń zarodków była stosunkowo mała, a przeżywalność zamrożonych ekspandujących i wylęgłych blastocyst oceniana najczęściej *in vitro* była niska. Natomiast nie przeżywały zamrażania zarodki w niższym niż wczesna blastocysta stadium rozwoju oraz wylęgłe blastocysty o średnicy większej niż 300 µm (18).

W ostatnich latach badania z zakresu kriokonserwacji zarodków świni koncentrują się głównie na ich wityfikacji (3, 10, 20). W metodzie tej zestalanie płynów odbywa się nie na drodze krystalizacji, ale poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania. Głównym problemem wityfikacji jest toksyczność związków osłaniających oraz uszkodzenia natury osmotycznej. Koncentracja związków osłaniających niezbędna do uzyskania wityfikacji jest stosunkowo wysoka i dlatego nie jest tolerowana przez większość materiałów biologicznych. Niemniej metoda wityfikacji pozwala już obecnie na uzyskanie znacznej, chociaż nie w pełni zadowolającej, efektywności w odniesieniu do zarodków mysich, szurzych, króliczych, owczych i bydłych (9, 20, 21). Natomiast w odniesieniu do zarodków świńskich do tej pory nie opracowano wydajnych metod zarówno ich zamrażania, jak i wityfikacji (10).

Znaczący postęp w metodzie wityfikacji został osiągnięty dzięki minimalizacji objętości płynu zawierającego wityfikowany zarodek (tzw. metoda OPS) (19, 22). Takie postępowanie pozwalające na uzyskanie wysokiego tempa schładzania w trakcie procesu wityfikacji zostało ostatnio z powodzeniem zastosowane do kriokonserwacji zarodków świńskich (1, 2). Wstępne badania własne potwierdziły pozytywny wpływ zminimalizowanej objętości wityfikowanej próbki na prze-

żywalność *in vitro* zarodków świni w stadium moruli i blastocysty (7).

Celem przeprowadzonych badań było określenie możliwości pełnego rozwoju *in vivo* wityfikowanych blastocyst świni.

Material i metody

Przygotowanie dawczyń zarodków. Dawczyniami zarodków były 6-miesięczne loszki linii 990 o masie ciała wynoszącej od 90 do 110 kg. Samice poddawano superowulacji przez domięśniową iniekcję 1500 j.m. preparatu PMSG (Serogonadotropin, Biowet). Po 72 godzinach podawano 1000 j.m. preparatu HCG (Biogonadyl, Biomed). W dniu wystąpienia rui (24 godz. od podania HCG) samice były inseminowane dwa razy w odstępach 12-godzinnych standardową dawką nasienia płynnego. Dawczyni poddawano ubojowi po 60-62 godz. lub po 6 dniach od inseminacji.

Uzyskiwanie zarodków. Zarodki uzyskiwano przepłukując jajowody (stadium 2- do 4-komórkowe) lub macicę uzupełnioną płynem PBS (Gibco, Invitrogen Corp.) o temp. 38°C. Płukanie powtarzano 2-krotnie używając łącznie ok. 20 ml płynu na 1 jajowód lub 500 ml na 1 róg macicy. Wyszukiwanie zarodków i ocenę morfologiczną przeprowadzano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (pow. 100 ×) z zamontowaną na stoliku płytką podgrzewaną do temperatury 38°C (f. SEMIC). Wyszukane zarodki przenoszono do płynu PBS uzupełnionego 20% surowicą płodów cielęcych – FCS (Sigma).

Hodowla zarodków do stadium blastocysty. Do hodowli przeznaczano zarodki, które osiągnęły stadium od 2 do 4 blastomerów i nie wykazywały zmian morfologicznych w cytoplazmie. Zarodki hodowano w pożywce NCSU-23 (5), w plastikowych naczynkach 4-oczkowych (Nunc, Dania). W jednym oczku naczynka znajdowało się ok. 10 zarodków w 1,0 ml pożywki. Hodowlę umieszczano w inkubatorze CO₂ (3,5% CO₂ w powietrzu, temp. 39°C) na okres od 4 do 6 dni. W czasie hodowli przeprowadzano co 48-72 godz. częściową wymianę pożywki (5).

Wityfikacja zarodków. Zarodki poddawano ekwilibracji przez 2 minuty w mieszaninie wityfikacyjnej EFS zawierają-

Tab. 1. Rozwój *in vivo* wityfikowanych blastocyst świńskich

Miejsce transplantacji	Liczba			
	bioczny	transplantowanych zarodków	bioczny próśnych w 30. dniu	bioczny wyproszonych (%)/prosiąt żywo urodzonych
Jajowód	8	147	5	3 (37,5)/18
Macica	14	274	1	0

cej 40% glikolu etylenowego (E) (Sigma), 18% fikolu (F) (Sigma) i 0,3 M sacharozy (S) (Sigma). Następnie zarodki w mieszaninie EFS przenoszono do słomek, które szybko schładzano, zanurzając w ciekłym azocie. Słomki z zarodkami przechowywano w ciekłym azocie od 3 do 6 miesięcy. Rozmrażanie zarodków odbywało się przez umieszczenie słomki z zarodkami w łaźni wodnej o temperaturze 20°C na ok. 8 sek. Usuwanie związków osłaniających było jednostopniowe za pomocą 0,5 M sacharozy (12).

Przygotowanie bioczny zarodków. Bioczyniami zarodków były 6-miesięczne loszki linii 990 o masie ciała ok. 85-95 kg. Samice synchronizowano przez domięśniową iniekcję 750 j.m. preparatu PMSG (Serogonadotropin, Biowet). Po 72 godz. bioczyniom podawano i.m. 500 j.m. preparatu HCG (Biogonadyl, Biomed) i po następnych 24 godz. sprawdzano objawy rui.

Transplantacja zarodków. Transplantacja odbywała się w 5. dniu po rui (dzień rui = dzień 0) synchronizowanej u bioczny zarodków o 1 dzień wcześniej (24 godz.) w stosunku do dawczyń, na drodze chirurgicznej, w pełnej narkozie operacyjnej. Zarodki bezpośrednio po rozmrożeniu, usunięciu związków osłaniających i ocenie morfologicznej, wprowadzano do jajowodu lub do macicy przy pomocy wężyka z dołączoną strzykawką. Liczba wprowadzonych zarodków przypadających na 1 biocznię wynosiła od 13 do 25. Oceny skuteczności transplantacji dokonywano na podstawie badania loszek-bioczny w 30. dniu po przeniesieniu, przy pomocy aparatu USG (CS 9100, f. Picker) oraz na podstawie liczby oproszonych bioczny i liczby uzyskanych prosiąt.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań podano w tab. 1. Z 8 bioczny, którym transplantowano do jajowodu 147 wityfikowanych blastocyst, u 5 stwierdzono ciążę w 30. dniu po zabiegu. W kolejnym badaniu, w ok. 60. dniu po transplantacji, ciążę potwierdzono u 3 (37,5%) loszek, od których po oproszeniu uzyskano 18 prosiąt (ryc. 1). Wszystkie porody odbyły się w normalnym terminie. U pozostałych 2 bioczny w drugim badaniu ciąży nie stwierdzono. Nastąpiło u nich prawdopodobnie zamarcie płodów, trudno jednak stwierdzić, czy miało to związek z faktem, że transplantowano zarodki kriokonserwowane. Z 14 bioczny, którym przeniesiono do macicy 274 wityfikowane blastocysty, u 1 bioczni stwierdzono ciążę w 30. dniu po transplantacji. W kolejnym badaniu, ciąża nie została jednak potwierdzona (tab. 1).

W przedstawionych badaniach po raz pierwszy zastosowano metodę transplantacji wityfikowanych blastocyst świni do jajowodu bioczni*. Dotychczas przy



Ryc. 1. Pierwsze w kraju prosięta uzyskane po transplantacji wityfikowanych blastocyst – ferma Kostkowice, „Bioinżynieria IŻ Sp. z o.o.” (fot. dr L. Mroczo)

* Metoda transplantacji wityfikowanych blastocyst świńskich została zgłoszona w Urzędzie Patentowym RP i zarejestrowana pod numerem P 359085.

transplantacji zarodków świńskich, jak również zarodków innych gatunków ssaków stosuje się wprowadzanie transplantowanego zarodka w to samo miejsce, skąd zarodek został uzyskany. Praktycznie oznacza to, że zarodki wczesnych stadiów rozwojowych, czyli te, które uzyskuje się z jajowodu (stadium od 1 do 8 komórek), wprowadza się do jajowodu, natomiast zarodki późniejszych stadiów rozwojowych, czyli te uzyskane z macicy (stadium moruli do blastocysty), transplantuje się do rogów macicy. Opisany sposób postępowania dotyczy zarówno zarodków świeżych, jak też kriokonserwowanych metodą witrifikacji. U świń w przypadku zarodków świeżych przynosi on dobre rezultaty. Natomiast w przypadku zarodków kriokonserwowanych, chociaż udało się uzyskać potomstwo, jednak efektywność jest nadal bardzo niska i zróżnicowana (10). Przypadki uzyskania wyższej efektywności związane były z użyciem np. specjalnej rasy świń o wyjątkowo wysokich zdolnościach implantacyjnych (1, 2). Wyniki zaprezentowane w tym doświadczeniu wykazały możliwość pełnego rozwoju *in vivo* witrifikowanych blastocyst świń pod warunkiem, że są one transplantowane do jajowodu. Natomiast w przypadku transplantacji witrifikowanych blastocyst do macicy, nie uzyskano ich pełnego rozwoju *in vivo*.

Zarodki poddawano witrifikacji w mieszaninie glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy (EFS). Mieszanka ta, opracowana przez Kasai i wsp. (16) dla zarodków mysich z powodzeniem była stosowana do witrifikacji innych gatunków ssaków, a mianowicie: szczura, królika, owcy, bydła, koni i ostatnio świni (6, 9, 14, 20, 21). Dobrinsky i Johnson (4) badając toksyczność mieszanin wykazali, że ekspandujące blastocysty rozwijały się najlepiej po ekspozycji w mieszaninach opartych na glicerolu i glikolu etylenowym, podczas gdy wylęte blastocysty rozwijały się tylko VS3 opartym na glicerolu. W badaniach własnych nad określeniem toksyczności związków osłaniających wchodzących w skład mieszanin witrifikacyjnych (8, 11) stosowaliśmy mieszaninę glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy (EFS) oraz glikolu etylenowego, fikolu i trehalozy (EFT). Stwierdzono, że w trakcie ekspozycji przed witrifikacją znaczny odsetek zarodków świni tracił zdolności do dalszego rozwoju *in vitro*. Utrata żywotności eksponowanych zarodków była uzależniona od stadium rozwoju zarodka oraz od składu mieszaniny witrifikacyjnej. W przypadku przetrzymywania zarodków w mieszaninie EFT obserwowano znacznie niższą przeżywalność blastocyst (22%) w porównaniu z morulami. Natomiast po przetrzymywaniu w mieszaninie EFS przeżywalność morul i blastocyst układała się na podobnym poziomie. Stosowane w niniejszych badaniach mieszaniny witrifikacyjne (EFS lub EFT) zawierały w swoim składzie 40% glikolu etylenowego. Z badań Webera i Youngsa (23) wynikało, że zarodki świńskie przetrzymywane w glicerolu lub glikolu propylenowym przeżywały znacznie gorzej niż przetrzymywane w glikolu etylenowym, zwłaszcza o koncentracji 40% lub wyższej.

Z badań dotyczących witrifikacji morul i blastocyst świńskich w mieszaninie EFS lub EFT (11) wynikało, że przeżywalność zarodków również uwarunkowana była stadium rozwoju zarodka poddawanego witrifikacji oraz składem mieszaniny witrifikacyjnej. Zarodki w stadium blastocysty przeżywały na poziomie ok. 30%, natomiast nie przeżył żaden z zarodków witrifikowanych w stadium moruli (11). W kolejnym doświadczeniu (13) mieszanina EFS okazała się bardziej toksyczna dla wylętych niż dla ekspandujących blastocyst, co z kolei znalazło odzwierciedlenie w rezultatach witrifikacji. Wydaje się, że stadium najbardziej podatnym na kriokonserwację jest blastocysta w stadium „peri-hatching”. Stąd też w przedstawionych badaniach używano zarodków świni w stadium blastocysty ekspandującej.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że jednym z głównych czynników decydujących o możliwościach pełnego rozwoju witrifikowanych zarodków świńskich w stadium blastocysty jest ich transplantacja do jajowodu.

Piśmiennictwo

- Berthelot F., Martinat-Boite F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M.: Piglets born after vitrification of embryo using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000, 41, 116-124.
- Berthelot F., Martinat-Boite F., Perreau C., Terqui M.: Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reprod. Nutr. Dev.* 2001, 41, 267-272.
- Dobrinsky J. R.: Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reprod. Suppl.* 2001, 58, 325-333.
- Dobrinsky J. R., Johnson L. A.: Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of *in vitro* development. *Theriogenology* 1994, 42, 25.
- Gajda B.: *In vitro* culture of pig embryos. *Ann. Anim. Sci.* 1998, 25, 31-38.
- Gajda B.: Vitrification of rabbit embryos at 1-cell to morula stage in an ethylene glycol-based solution. *CryoLett.* 1996, 17, 363-370.
- Gajda B., Smorag Z.: Efektywność witrifikacji zarodków świńskich w zależności od objętości kriokonserwowanej próbki. *Mat. II Zjazdu TBR, Warszawa, 2001, 5-8 czerwiec, P-IV-4.*
- Gajda B., Smorag Z.: *In vitro* survival of porcine embryos following exposure to vitrification solutions. *Anim. Sci. Papers Rep.* 1998, 16, suppl. 1, 59-60.
- Gajda B., Smorag Z.: Kriokonserwacja oocytów i zarodków ssaków. *Biotechnologia* 1998, 41, 10-32.
- Gajda B., Smorag Z.: Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni. *Biotechnologia* 2003, 60, 138-150.
- Gajda B., Smorag Z.: Survival of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. *CryoLett.* 2000, 21, 231-236.
- Gajda B., Smorag Z.: Viability of *in vivo* and *in vitro* produced porcine blastocyst vitrified in EFS solution. *Ann. Anim. Sci.* 1999, 26, 140-154.
- Gajda B., Smorag Z.: Vitrification of cultured and non-cultured expanded and hatched blastocysts. *CryoLett.* 2002, 23, 385-388.
- Han M. S., Niva K., Kasai M.: Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology* 2003, 59, 1851-1863.
- Hayashi S., Kobayashi K., Mizuno J., Saitoh K., Hirano S.: Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Rec.* 1989, 125, 43.
- Kasai M., Komi J. A., Takkamo A., Tsudera H., Sakurai T., Machida T.: A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.* 1990, 89, 91-97.
- Kashivazaki N., Ohtani S., Miyamoto K., Ogawa S.: Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Vet. Rec.* 1991, 128, 256.
- Nagashima H., Yamakawa H., Niemann H.: Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology* 1992, 37, 839-850.
- Papis K.: „Otwarte” metody witrifikacji komórek i ich zastosowanie do kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 547-551.
- Smorag Z., Gajda B.: Witrifikacja oocytów i zarodków ssaków. *Biotechnologia* 1995, 30, 68-83.
- Vajta G.: Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 2, 60-61, 357.
- Vajta G., Booth P. J., Holm P., Greve T., Callesen H.: Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw method. *CryoLetters* 1997, 18, 191-195.
- Weber P. K., Youngs C. R.: Investigations of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. *Theriogenology* 1994, 41, 1291.

Adres autora: dr inż. Barbara Gajda, ul. Garncarska 16/7, 31-115 Kraków; e-mail: bgajda@izoo.krakow.pl