

GRAŻYNA PTAK, MARIAN TISCHNER*

Postęp w rozrodzie owiec poprzez pozaustrojowe zapłodnienie oocytów^{*})

Istituto Zootechnico e Caseario, 04070 Olmedo (SS), Sardynia, Włochy

*Katedra Rozrodu Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Ptak G., Tischner M.

Progress in sheep reproduction due to in vitro fertilization

Summary

The aim of the study was to improve the methods of recovery, maturation and fertilization in vitro (IVM/IVF) of lamb oocytes in order to get offspring from prepubertal donors. Oocytes were obtained from 4-9-week-old lambs, oocytes from slaughtered adult ewes were run in parallel as control. Ewe lambs received subcutaneous implants (1 mg norgestomet) for 5 days. At the time of implant removal the animals were injected with FSH and PMSG. After 24 h oocytes (60 per donor) were collected by laparotomy under general anesthesia. Oocytes were matured and fertilized in vitro 24 hours after IVE, presumptive zygotes were transferred to the intermediate recipients for 6 days. From 9 definitive recipients which received 18 blastocysts, 8 were confirmed pregnant by scanning performed on days 35 and 60. One sheep has already delivered two normal lambs.

Użycie oocytów od niedojrzałych płciowo samic do produkcji zarodków i potomstwa może mieć w przyszłości duże znaczenie w hodowli. W ten sposób powstaje szansa znacznego skrócenia czasu pomiędzy pokoleniami i przyspieszenia tempa doskonalenia genetycznego zwierząt, a także uzyskania większej liczby potomstwa od osobników o określonej wartości. Jajniki nowo narodzonego jagnięcia podobnie jak i innych samic zwierząt domowych zawierają kilkadziesiąt tysięcy oocytów, które z wiekiem ulegają atrezji i resorpcji.

Pierwsze udane próby zapłodnienia oocytów od niedojrzałych płciowo samic przeprowadzono na oocytach ciążących. W 1971 r. Seidel i wsp. (9) uzyskali ciążę zakończoną urodzeniem zdrowego cielęcia po transplantacji do dorosłych krów biorczyń zarodków uzyskanych od 1-3-miesięcznych cieląt po uprzednim sprowokowaniu u nich superowulacji i wykonaniu inseminacji. Pomimo, że zapłodnienie miało miejsce w warunkach *in vivo*, to jednak eksperyment ten już wówczas wykazał, że niektóre oocyty niedojrzałych płciowo samic są zdolne do prawidłowego zapłodnienia i dalszego rozwoju. Około 20 lat później Armstrong i wsp. (1) uzyskali w Australii po raz pierwszy potomstwo po zapłodnieniu *in vitro* oocytów 6-tygodniowych cieląt. Dwa lata później w tym samym ośrodku uzyskano potomstwo w wyniku dojrzewania i zapłodnienia *in vitro* oocytów 6-9-tygodniowych jagniąt (6). Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że jest to dotychczas jedyny udany eksperyment uzyskania jagniąt po zapłodnieniu *in vitro* oocytów pobranych od niedojrzałych płciowo owiec.

Celem badań była próba usprawnienia i opanowania metody uzyskiwania, dojrzewania i zapłodnienia pozaustrojowego oocytów jagnięcych oraz otrzymania na tej drodze potomstwa. Oceniano również wpływ zastosowanych metod biotechnologicznych na czas trwania ciąży, przebieg porodu i rozwój urodzonych jagniąt.

Materiał i metody

Oocyty do badań pobierano z jajników od 4-9-tygodniowych jagniąt po uboju i przyżyciowo oraz kontrolnie od owiec macierek. Około 2 godziny po uboju zwierząt oocyty uzyskiwano przez dysekcję jajników, a przyżyciowo poprzez aspirację pęcherzyków po uprzedniej laparotomii wykonanej podczas pełnej narkozy zwierząt. Celem zwiększenia liczby pęcherzyków jamistych umieszczano u jagniąt podskórne implanty (norgestomet 1 mg) na 5-6 dni. W dniu usunięcia implantu podawano im w formie iniekcji PMSG (150 j.m.) i FSH (4,5 mg Ovagen). Oocyty aspirowano około 24 godziny po iniekcji hormonów.

Dojrzewanie oocytów *in vitro*. Zastosowano pożywkę TCM 199 z dodatkiem: FSH i LH po 10 µg/ml, estradiolu 1 µg/ml, pirogromianu sodu 0,3 mM i 10% FCS (surowica płodów ciążących). Pożywkę wzbogacano cystaminą tj. związkami tiolowymi, który powoduje wzmożenie syntezy glutationu odgrywającego ważną rolę ochronną komórek przed niszczącym działaniem tlenu (oxidative stres) (5). Po odszukaniu oocytów hodowano je w pożywce o objętości 0,5 ml w systemie stabilnym w liczbie po około 30 oocytów w jednym dołku w 4-dołkowej płytce (Nunc, Nuncklon, Denmark). Hodowlę oocytów kontynuowano przez 24 godz. w temp. 3°C przy wilgotności 95% i stężeniu CO₂ 5% w powietrzu.

Kapacytacja plemników i zapłodnienie *in vitro*. Świeże nasienie tryka o sprawdzonej płodności poddawano

^{*}) Praca częściowo wykonana w ramach projektu 5 PO6D 011 12

rutynowej ocenie makro i mikroskopowej. Następnie rozrzedzano plemniki pożywką SOF (Synthetic Oviductal Fluid) (11) z dodatkiem 20 mM Hepes i 4 mg/ml albuminy bydlęcej (BSA) i wirowano dwukrotnie z siłą 200 g przez 5 min. Po wirowaniu nakrywano 1 ml nasienia 2 ml roztworu SOF z dodatkiem 20% inaktywowanej surowicy owczej pobranej w dniu owulacji i poddawano nasienie krótkotrwałej inkubacji (15 min.) w temp. 3°C przy kontrolowanym przepływie powietrza. Nasienie o koncentracji plemników $1 \times 10^6/\text{ml}$ dodawano do poszczególnych kropli (50 ml) zbuforowanej NaHCO_3 pożywki SOF (11) z dodatkiem 20% surowicy owczej. W każdej kropli znajdowało się po 15-20 oocytów.

Hodowla zarodków *in vitro* i *in vivo*. Około 17 godz. po inseminacji oocytów przenoszono je do kropli (4 oocyty/1 kropla) złożonej z 20 μl pożywki SOF wzbogaconej o 8 mg/ml BSA-FAF (Bovine Serum Albumin-Fatty Acid Free), 1% MEMaa (Minimum Essential Medium amino acids) i 2% BMEaa (Basal Medium Eagle amino acids, Sigma Chemical Co) i hodowano w warunkach O_2 5%, CO_2 5%, N_2 90% w 3°C. Następnie dwukomórkowe zarodki po 30 godzinach od chwili inseminacji oocytów umieszczano na 6 dni w podwiązanych jajowodach odpowiednio zsynchronizowanych macioerek biorecznych pośrednich. Po tym czasie wypłukiwano zarodki z jajowodów, poddawano ocenie i selekcji. Zarodki, które osiągnęły stadium blastocysty transplantowano do rogów macicy macioerek biorecznych ostatecznych.

Po upływie około 1 miesiąca od dnia transplantacji zarodków biorecznie badano w kierunku ciąży przy użyciu ultrasonografu. Maciorki, u których stwierdzono ciążę pozostawały pod stałą kontrolą weterynaryjną i kontrolowano u nich przebieg ciąży i porodu. Po porodzie określano masę ciała urodzonych jagniąt, ich rozwój i stan zdrowotny.

Wyniki i omówienie

Badania nad zapłodnieniem pozaustrojowym oocytów owiec mają krótką historię. Pierwsze potomstwo po zapłodnieniu *in vitro* i hodowli zygot w podwiązanych jajowodach owiec biorecznych pośrednich otrzymano w 1986 r. w Anglii (2), a następne w 1987 r. we Francji (3). Kilka lat później dwie niezależne grupy naukowców w Polsce (4) i w Nowej Zelandii (8) uzyskały potomstwo z oocytów owiec poddanych dojrzewaniu, zapłodnieniu i hodowli zygot w warunkach *in vitro*. W Polsce hodowlę zarodków prowadzono w pożywce PBS 199 z dodatkiem komórek nabłonka jajowodu owcy maciorki, natomiast w Nowej Zelandii w pożywce SOF z dodatkiem 20% surowicy ludzkiej w warunkach O_2 5%, CO_2 5% i N_2 90%.

Jajniki nówo narodzonych jagniąt posiadają już zdefiniowaną liczbę oocytów. Dotychczas nie określono jednak dokładnie warunków ich hodowli i

Tab. 1. Wyniki dojrzewania i zapłodnienia *in vitro* oocytów 4-9-tyg. jagniąt i owiec macioerek (6 powtórzeń)

Oocyty	Dojrzewanie <i>in vitro</i> 24-26 godz.		Zapłodnienie (5 godz.) i hodowla <i>in vitro</i> (25 godz.)	
	liczba (%)		liczba (%)	
	oocytów	dojrzałych do metafazy II	oocytów	zarodków dwukomórkowych
Jagniąt	89*	69 (78)	206**	97 (47)
Owiec macioerek	92*	76 (83)	187*	95 (51)

Objaśnienia: * – oocyty pobrane po uboju zwierząt, ** – oocyty pobrane przyżyciowo lub po uboju zwierząt.

Tab. 2. Rozwój ciąży u macioerek biorecznych po transplantacji zarodków uzyskanych w wyniku dojrzewania i zapłodnienia oocytów *in vitro*

Oocyty	Liczba			
	zarodków przeniesionych do biorecznych pośrednich na 6 dni	uzyskanych blastocyst (%)	blastocyst transplantowanych do biorecznych ostatecznych/liczba biorecznych	biorecznych ciężarnych w 40 dniu
Jagniąt	89	19 (35,4)	18/9	7 w tym jedna ciąża zakończona urodzeniem 2 jagniąt
Owiec macioerek	63	23 (36,4)	2/1	1

dojrzewania *in vitro*. Zaraz po urodzeniu w jajnikach występują pojedyncze małe pęcherzyki. Burzliwy wzrost pęcherzyków następuje w 2 tygodniu, osiągając maksimum w 4 tygodniu życia. Jajniki powiększają wówczas swe wymiary i przybierają kształt groniasty (10). Wydaje się zatem, że dogodnym początkowym okresem uzyskiwania oocytów jagnięcych jest wiek 4 tygodni. Prestymulacja jajników jagniąt hormonami gonadotropowymi mająca na celu zwiększenie liczby pęcherzyków jajnikowych, była już stosowana przez badaczy australijskich, którzy wykazali możliwość uzyskiwania średnio po 29 blastocyst z oocytów 8-9-tygodniowych jagniąt (7). W naszych badaniach po stymulacji hormonalnej PMSG i FSH uzyskiwano przyżyciowo średnio po 60 oocytów od jednego jagnięcia. Nie zaobserwowano ubocznych powikłań u jagniąt, od których uzyskiwano oocyty przyżyciowo. Być może w przyszłości będzie można zabiegi te powtarzać co 2-3 tygodnie, a także udoskonalić metody prestymulacji hormonalnej jagniąt. Pozwoli to prawdopodobnie na zwiększenie liczby aspirowanych oocytów przydatnych do zapłodnienia pozaustrojowego.

Wyniki hodowli i zapłodnienia oocytów jagnięcych oraz owiec maciorek przedstawiono w tab. 1 i 2. Otrzymano bardzo zbliżone rezultaty zarówno hodowli, jak i zapłodnienia *in vitro* u obu grup zwierząt. Wydaje się, że dodatek cystaminy do pożywki wywarł korzystny wpływ na rozwój zarodków do stadium blastocysty (5). Również procent uzyskanych blastocyst z zarodków dwukomórkowych przeniesionych do biorczyń pośrednich na 6 dni był zbliżony i wynosił około 36%. Spośród 18 blastocyst uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro* oocytów jagnięcych transplantowanych do 9 biorczyń ostatecznych u 8 stwierdzono ciążę, z których jedna zakończyła się urodzeniem w terminie 2 normalnie rozwiniętych jagniąt (ryc. 1). Rozwój ciąży u pozostałych maciorek w chwili przygotowywania opracowania do druku przebiega normalnie.

Ze względu na koszt badań transplantowano tylko dwa zarodki uzyskane po zapłodnieniu *in vitro* oocytów dorosłych owiec do jednej maciorki biorczyni ostatecznej, u której badaniem USG w 40 i 60 dniu potwierdzono rozwój ciąży bliźniaczej. Kosztowny i czasochłonny okazał się również system hodowli zarodków w jajowodach owiec maciorek pośrednich. Być może system ten będzie można zastąpić hodowlą zarodków w warunkach *in vitro* w pożywkach o zdefiniowanym składzie. Walker i wsp. (12, 13) wykazali jednak, że metody hodowli zarodków owiec w warunkach *in vitro* mogą prowadzić do szeregu anomalii rozwojowych zarodków i płodów. Obserwowano fragmentację cytoplazmy, zbyt wczesne kształtowanie się jamki oraz zredukowanie liczby komórek blastocysty. W przypadkach gdy hodowla zarodków była wydłużona występowały również takie nieprawidłowości jak dłuższy czas ciąży, zwiększenie masy ciała płodów i śmiertelności jagniąt w okresie okołoporodowym. Przypuszcza się, że nieprawidłowości te określane jako



Ryc. 1. Potomstwo wraz z maciorką biorczynią urodzone w wyniku dojrzewania i zapłodnienia pozaustrojowego oocytów pobranych od 4 tygodniowych jagniąt

„large lamb syndrom” związane były z użyciem 20% surowicy ludzkiej w systemie hodowli zarodków. Inne sposoby hodowli zarodków, np. z dodatkiem do pożywek różnych komórek wspomagających lub albuminy bydlęcej (BSA) i aminokwasów nie powodowały opisanych zaburzeń rozwojowych płodów owiec.

Trudno jest obecnie przewidzieć wyniki dalszych badań nad zapłodnieniem i hodowlą zarodków owczych w warunkach *in vitro*. Uzyskane przez nas wstępne wyniki zapłodnienia pozaustrojowego oocytów jagnięcych wskazują na prawidłowy rozwój zarodków, ciąży i potomstwa. Można zatem przypuszczać, że zastosowane metody biotechnologiczne roszą szersze wykorzystanie w dalszych badaniach i praktyce.

Piśmiennictwo

1. Armstrong D. T., Holm P., Irvine B., Petersen B. A., Stubbings R. B., McLean D., Stevens G., Seamark R. F.: *Theriogenology* 38, 667, 1992.
2. Cheng W. T. K., Mooer R. M., Polge C.: *Theriogenology* 25, 146, 1986.
3. Crozet N., Huneau D., Desmedt V., Theron M.-C., Szollosi D., Torres S., Sevellec C.: *Gamete Res.* 16, 159, 1987.
4. Członkowska M., Eysymont U., Gusiewicz A., Kossakowski M., Dziak J.: *Mol. Reprod. Dev.* 30, 34, 1991.
5. De Matos D. G., Furnus C. C., Moses D. F., Baldassarre H.: *Mol. Reprod. Dev.* 42, 432, 1995.
6. Earl C. R., Irvine B. J., Armstrong D. T.: *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 20, 428, 1994.
7. Earl C. R., Irvine B. J., Kelly J. M., Rowe J. P., Armstrong D. T.: *Theriogenology* 43, 203, 1995.
8. Pugh P. A., Fukui Y., Tervit H. R., Thompson J. G.: *Theriogenology* 36, 771, 1991.
9. Seidel G. E. jr., Larson L. L., Spilman C. H., Hahn J., Foote R. H.: *J. Dairy Sci.* 54, 923, 1971.
10. Tassel R., Chamley W. A., Kennedy J. P.: *Aust. J. Biol. Sci.* 31, 267, 1978.
11. Tervit H. R., Whittingham D. G., Rowson L. E. A.: *J. Reprod. Fert.* 30, 493, 1972.
12. Walker K. S., Heard T. M., Bee C. A., Frensham A. B., Warnes D. M., Seamark R. F.: *Culture of embryos of farm animals. W: Embryonic Development and Manipulation in Animal Reproduction*, Lauria A., Gandolfi F., Portland Press, London, 1992, s. 77-92.
13. Walker S. K., Harwich K. M., Seamark R. F.: *Theriogenology* 45, 111, 1996.

Adres autora: mgr Grażyna Ptak, s.s. Sassari-Fertilia 163, 07040 Olmedo (SS), Sardegna, Włochy