

# Możliwości i ograniczenia pozaustrojowych metod uzyskiwania oocytów i zarodków ssaków

Lucyna Kątska

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt  
Instytut Zootechniki  
Balice k. Kraków

Jednym z głównych czynników limitujących produkcję oraz postęp hodowlany u bydła, a także innych samic jednorodnych, jest ich stosunkowo niska rozrodczość. Obecnie istnieją dwie metody pozwalające na zwiększenie wykorzystania potencjału rozrodczego samicy. Pierwszą z nich jest superowulacja, kiedy zwiększony poziom hormonów gonadotropowych we krwi chroni część jajnikowych pęcherzyków antralnych przed atrezją. Stosując standardowe metody superowulacji u bydła, w połączeniu z niechirurgicznym wyplukiwaniem, można podczas jednego cyklu uzyskać od dawczni średnio około pięciu przydatnych do przeniesienia zarodków. Zakładając 50–70% skuteczność zabiegu i zastosowanie cztero-, pięciokrotnej stymulacji w ciągu roku można oczekiwać uzyskania od 8 do 17 cieląt/dawczynię/rok (24). W porównaniu do rozrodu naturalnego, gdzie od jednej krowy uzyskuje się od 4 do 6 cieląt w ciągu życia, jest to już znaczący postęp w wykorzystaniu możliwości rozrodczych samicy. Mimo że metoda superowulacji pozwala na znacznie szersze wykorzystanie potencjału rozrodczego samicy i znalazła już zastosowanie praktyczne w programach hodowlanych MOET, ma ona wiele ograniczeń. Jest metodą drogą (koszty preparatów hormonalnych), a powtarzalność, szczególnie kolejnych zabiegów superowulacji, często nie jest zadowalająca.

Drugą metodą zwiększającą wykorzystanie potencjału rozrodczego samicy jest pozaustrojowa produkcja zarodków. Jest to metoda kompleksowa obejmująca dojrzewanie oocytów *in vitro*, zapłodnienie *in vitro* oraz kilkudniową hodowlę *in vitro* zarodków do stadium blastocysty. Intensywne badania, prowadzone w okresie ostatnich kilkunastu lat w wielu ośrodkach naukowych, w tym również w Instytucie Zootechniki, doprowadziły do znacznego opanowania metody. Opracowanie wydajnej technologii produkcji zarodków metodami laboratoryjnymi zwiększa wykorzystanie potencjału rozrodczego samicy, otwierając równocześnie szereg możliwości praktycznych. Jednym z głównych zastosowań zarodków uzyskanych za pomocą metod *in vitro* jest ich wykorzystanie na potrzeby przenoszenia zarodków, co stanowić może rozwiązanie

alternatywne dla superowulacji. Metoda może zatem służyć do lepszego wykorzystania potencjału rozrodczego samic wartościowych z genetycznego punktu widzenia, a także dostarczać zarodków do produkcji towarowej, w tym również dla uzyskiwania ciąży bliźniaczych.

Następną rysującą się możliwością zastosowania metody jest produkcja zarodków o ściśle określonym stadium rozwoju w celu mikroiniekcji egzogenego DNA dla uzyskania transgenicznego potomstwa.

Wyprodukowane *in vitro* zarodki, a także dojrzewające *in vitro* oocyty znajdują już coraz szersze zastosowanie w pracach z zakresu klonowania zarodków metodą transplantacji jąder komórek zarodkowych do enukleowanych oocytów.

Ponadto, metoda może znaleźć zastosowanie w ocenie biologicznej wartości gamet męskich, tj. w ocenie kariotypu samca oraz w ocenie zdolności zapładniającej nasienia przy użyciu testu penetracji pozbawionych osłonki przejrzystej jaj chemicznych.

Inna możliwość wykorzystania metody to przydatność w praktyce klinicznej przy niektórych zaburzeniach płodności związanych z niedrożnością jajowodów lub stanami zapalnymi macicy.

Zwiększenie wydajności rozrodczej samicy (praktycznie odnosi się ono głównie do bydła), pozwala na przyspieszenie postępu hodowlanego dzięki lepszemu wykorzystaniu jej potencjału genetycznego. Potencjał ten zdeteminowany zostaje jeszcze przed urodzeniem osobnika, w czasie życia płodowego. W tym czasie następuje bowiem zapoczątkowanie procesów oogenezy i follikulogenezy.

Oogeneza zapoczątkowana zostaje, jak już wcześniej wspomniano, w okresie rozwoju płodowego i trwa przez całe życie dojrzałe, do czasu ustania czynności jajnika. Najistotniejszą rolę odgrywa tu proces mejozy, będący w pewnym sensie przeciwieństwem zapłodnienia, gdyż zmniejsza on o połowę liczbę chromosomów, podczas gdy zapłodnienie przywraca ich diploidalny zespół. Mejotyczny podział komórkowy zachodzi w kilku etapach, których granice są ustalone raczej umownie, ponieważ cały proces ma charakter dynamiczny i przebiega z niewieloma zahamowaniami prowadząc do powstania dojrzałej komórki jajowej. Wyjątek stanowi tu profaza pierwszego podziału mejotycznego: jest ona znacznie rozciągnięta w czasie, wysoce wyspecjalizowana i, u osobników żeńskich, na pewien czas zahamowana. U bydła na przykład pierwsze stadia profazy mejotycznej, tj. leptoten i zygoten zachodzą jeszcze przed utworzeniem pierwotnych pęcherzyków jajnikowych, czyli między 2. a 3. miesiącem życia płodowego. Powstawanie pęcherzyków pierwotnych obserwuje się w momencie, gdy oocyt wchodzi w stadium pachytenu, podczas którego profaza pierwszego podziału mejotycznego zostaje zahamowana, aż do chwili rozpoczęcia wzrostu pęcherzyka. Wzrost części pęcherzyków pierwotnych następuje podczas życia płodowego, tak że pęcherzyki rosnące i antralne można obserwować już w 8-miesięcznych jajnikach płodowych bydła (17). Przed urodzeniem cielęcia oogonia przekształcają się w oocyty, a wszystkie oocyty osiągają przynajmniej pachyten i są otoczone przez nabłonek pęcherzykowy tworzący pęcherzyk pier-

wotny. Natomiast oocyty w pęcherzykach rosnących i antralnych osiągają stadium diktiotenu. Dalsze dojrzewanie oocytu, wiążące się z progresją jądra oocytu od stadium diktiotenu I podziału mejotycznego do metafazy II podziału mejotycznego, następuje *in vivo* po przedowulacyjnym wyrzucie LH, ale tylko w pęcherzykach osiągających odpowiednią wielkość. Do tego momentu mejoza zostaje zablokowana, niekiedy na wiele lat.

Jajnik jest strukturą dynamiczną, w której zachodzi ciągła przemiana pęcherzyków pierwotnych w rosnące. U większości gatunków pierwsze rosnące pęcherzyki pojawiają się w jajniku w ciągu kilku dni po urodzeniu, chociaż u bydła i naczelnych można je wykryć przed urodzeniem osobnika. Kulminacja wzrostu pęcherzyków następuje jednak dopiero po osiągnięciu dojrzałości, wraz z ustanowieniem właściwej równowagi hormonalnej i cyklu płciowych.

Najwcześniejsze stadium w rozwoju pęcherzyka stanowi pęcherzyk pierwotny. Zawiera on oocyt otoczony jedną warstwą komórek nabłonkowych. Pierwsza fala wzrostu pęcherzyków, następująca zwykle wkrótce po urodzeniu, jest skorelowana ze wzrostem oocytu. Wzrost pęcherzyków pierwotnych prowadzi do utworzenia pęcherzyków rosnących. Ten termin odnosi się do pęcherzyka aż do momentu utworzenia antrum — jamy pęcherzyka. Wzrost pęcherzyka wiąże się ze wzrostem liczby komórek pęcherzykowych namnażających się w drodze mitozy, wskutek czego warstwa ziarnista staje się dwu-, trzy- i wreszcie czterowarstwowa. Kolejnym stadium w rozwoju pęcherzyka jest pęcherzyk antralny. Pęcherzyki te dzieli się również na grupy w zależności od wielkości (małe, średnie i duże). Spełniają one 2 główne funkcje jajnika: hormonalną i rozrodczą. Podczas gdy u gryzoni oocyt osiąga pełną wielkość przed utworzeniem antrum, u świń i bydła we wczesnoantralnych pęcherzykach stwierdza się oocyty rosnące (29). Antrum pęcherzykowe jest w pełni zróżnicowane w pęcherzykach o średnicy 0,4-0,8 mm u bydła i świń, a 0,11-0,20 mm u owiec, natomiast oocyt w takim pęcherzyku osiąga średnicę (bez osłonki przejrzystej) około 100 i 110  $\mu\text{m}$  odpowiednio u świń i bydła (1,29). Podsumowując, w czasie follikulogenezy zachodzą 3 istotne fazy: 1) bardzo wolny wzrost oocytu, w rezultacie którego osiąga on prawie maksimum wielkości, 2) tworzenie antrum — jamy pęcherzyka, 3) szybszy wzrost pęcherzyka.

W badaniach populacji pęcherzyków jajnikowych prowadzonych u dojrzałych płciowo owiec wykazano, że potrzeba około 6 miesięcy, aby pęcherzyk jajnikowy przeszedł przez fazę wzrostu, co świadczy o wolnej follikulogenezie u tego gatunku (1). Szczególnie wolno przebiega proces wzrostu pęcherzyków przed utworzeniem antrum (około 130 dni), po czym pęcherzyki wchodzi w fazę szybszego wzrostu (około 45 dni). Tak zatem pęcherzyki, które owulują w sezonie rozrodczym muszą rozpocząć swój wzrost w czasie anestrus, 6 miesięcy wcześniej.

Obserwacje tempa wzrostu średniej wielkości pęcherzyków antralnych do pęcherzyków dużych, prowadzone na jajnikach bydłecychoz pozwoliły na stwierdzenie, że tempo to jest bardziej gwałtowne przy końcu cyklu niż na jego początku, a 5-dniowy okres jest wystarczający na zastąpienie dużych pęcherzyków przez średniej wielkości (27). W ultrasonograficznych obserwacjach jajników bydłecychoz w czasie cyklu rujowego, przed osiągnięciem dojrzałości

ściowej, czy podczas poporodowego anestrus wykazano, że wzrost pęcherzyków przedowulacyjnych występuje falami. Fale wzrostu pęcherzyków występują również u owiec i mają charakter ciągły (7).

Pierwotne komórki płciowe w jajniku mają ograniczony czas życia i ulegają ograniczonej liczbie podziałów mitotycznych. W wyniku tego u osobników żeńskich wcześniej ustala się górna granica liczebności populacji komórek płciowych. Wraz z znikaniem oogoniów granica ta — w miarę starzenia się osobnika — zaczyna się szybko obniżać na skutek atrezji, np. u płodu ludzkiego liczba komórek płciowych wynosząca około 7 milionów w piątym miesiącu ciąży maleje do dwóch milionów w momencie narodzin, z czego połowę stanowią komórki zdegenerowane. Do siódmego roku życia w jajniku pozostaje około 300 tys. komórek płciowych. Konsekwentnie dokonuje się stopniowy spadek całkowitej liczby tych komórek tak dalece, że w okresie menopauzy trudno znaleźć w jajniku rozrodcze elementy płciowe. Podobną sytuację obserwuje się u innych ssaków, na przykład z 3,5 miliona komórek płciowych w jajniku małpy pozostaje w momencie narodzin około 1 miliona, a w jajniku szczura ze 150 tys. pozostaje około 100 tys. komórek płciowych. Spadek ten jest w głównej mierze wynikiem eliminacji dużej liczby komórek przez proces atrezji. Z szacunkowych obliczeń wynika, że ponad 99% pęcherzyków w jajniku ludzkim, a około 77% u myszy ulega eliminacji w wyniku atrezji (14). Czynniki odpowiedzialne za tak szerokie rozmiary procesu atrezji nie są znane, prawdopodobnie w czasie życia płodowego pewien wpływ mogą mieć błędy genetyczne i zaburzenia metabolizmu. Po urodzeniu osobnika atrezja w dalszym ciągu zmniejsza populację oocytów w jajnikach ssaków. Liczebność tej populacji gwałtownie spada w okresie poprzedzającym dojrzewanie i później, w wolniejszym tempie, przez całe życie dojrzale. Pęcherzyki jajnikowe mogą ulegać atrezji w każdym stadium rozwoju. Pęcherzyk wchodzący do puli pęcherzyków rosnących owuluje lub ulega atrezji. Degenerują również pęcherzyki w puli pęcherzyków nierosnących. Dokładne określenie potencjału rozrodczego, a zatem liczb pęcherzyków jajnikowych poszczególnych stadiów rozwoju, jest zadaniem trudnym i z reguły opiera się na obliczeniach teoretycznych, ze względu na konieczność oceny seryjnych skrawków histologicznych całego jajnika i stosunkowo małe rozmiary pęcherzyków pierwotnych. Znacznie prostsza jest ocena liczby pęcherzyków antralnych widocznych na powierzchni jajnika. Na podstawie liczby tych pęcherzyków oraz jakości morfologicznej zawartych w nich oocytów można pośrednio wnioskować o możliwościach gametotwórczych jajnika ssaka. Stosunkowo najwięcej danych zgromadzono na temat potencjału rozrodczego bydła i owiec, dlatego te dwa gatunki zostaną szerzej omówione.

## 1. Bydło

Jajnik bydlęcy zawiera średnio około 130 tys. pęcherzyków pierwotnych. Liczba ta pozostaje na względnie stałym poziomie do czwartego roku życia, po czym zdecydowanie maleje (9). Liczba pęcherzyków rosnących (o średni-

cy>70  $\mu\text{m}$ ) może się wahać od 53 do 881 (28). Tylko 0,05% tych pęcherzyków osiąga stadium przedowulacyjne.

W przeprowadzonych własnych badaniach (16) nad możliwościami gametotórczymi jajników bydłych w aspekcie wieku bydła porównano 3 grupy wiekowe zwierząt, tj. jałówki w wieku 18-24 miesięcy, krowy w wieku 3-8 lat i krowy w wieku 9-17 lat. Należy jednak nadmienić, że analiza dotyczyła tylko pęcherzyków antralnych, które podzielono na 3 grupy wielkości: 2-6 mm, 7-20 mm i powyżej 21 mm. Szczególną uwagę zwrócono na pęcherzyki o średnicy 2-6 mm ze względu na przydatność uzyskiwanych z nich oocytów do hodowli *in vitro*. Ocenie poddawano nie tylko liczbę pęcherzyków poszczególnych klas wielkości, lecz również liczbę i jakość morfologiczną uzyskiwanych z nich oocytów. Podsumowując wyniki tych doświadczeń można wyciągnąć następujące wnioski: 1) średnia liczba pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2-6 mm wynosi około 23 na sztukę; 2) liczba pęcherzyków jajnikowych, a także prawidłowych morfologicznie oocytów utrzymuje się na podobnym poziomie u jałówek i krów w wieku 3-8 lat, natomiast u krów w wieku powyżej 9 lat obserwuje się niewielką tendencję spadkową; 3) nie stwierdza się zależności między liczbą pęcherzyków jajnikowych a jakością uzyskiwanych oocytów (16).

Te spostrzeżenia potwierdzają w zasadzie wcześniejsze obserwacje Ericksona (9), który wykazał, że liczba pęcherzyków antralnych u bydła w wieku od 8 miesięcy do 10-14 lat utrzymuje się na zbliżonym poziomie, a wyraźną redukcję populacji obserwował dopiero u zwierząt 15-letnich. Przy wyrównanej liczebności 2-6 mm pęcherzyków jajnikowych i liczbie uzyskiwanych oocytów, w grupach wiekowych bydła stwierdziliśmy (16) występowanie znacznych różnic indywidualnych. Zjawisko to obserwowali również inni autorzy (16). Można przypuszczać, że konsekwencją tego zjawiska są zróżnicowane wyniki superowulacji u bydła.

Uzyskiwanie przydatnych do hodowli oocytów, także od zwierząt starszych, stwarza możliwość wykorzystania tych samic jako źródła oocytów, a w konsekwencji zarodków, co może mieć szczególne znaczenie w odniesieniu do krów o wysokiej i sprawdzonej wartości. Efektywność takiego postępowania byłaby jednakże niewielka przy jednokrotnym wykorzystaniu potencjalnych dawców, co może mieć miejsce w przypadku uboju. Rozwiązaniem umożliwiającym uzyskiwanie znacznej liczby oocytów od bydła wartościowego pod względem genetycznym jest wielokrotne, przyżyciowe pobieranie oocytów. Pierwsze próby przyżyciowego pozyskiwania oocytów przeprowadzane były przy użyciu laparoskopii. Technika ta ma jednak ograniczoną powtarzalność na skutek tworzenia się blizn i zrostów w miejscu operacji. Inną metodą, lecz posiadającą podobne jak laparoscopia ograniczenia, jest aspiracja oocytów z pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą USG dokonywana przez powłoki ciała (2). W ostatnich latach opracowywana jest metoda aspiracji pęcherzyków pod kontrolą USG przy zastosowaniu dopochwowej sondy sprężonej z igłą (23,32,33). Opanowanie transwaginalnej techniki aspiracji pozwala na uzyskanie ponad 50% oocytów w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków (24). Ostatnie obserwacje Kruipa i Boniego (24) wskazują na możliwość po-

wtarzania zabiegu aspiracji dwukrotnie w ciągu jednego tygodnia, przez okres kilku miesięcy. W efekcie takiego postępowania możliwe jest uzyskanie od jałowki około 13 przydatnych do hodowli oocytów/dawczynię/tydzień — co w przeliczeniu na zarodki produkowane *in vitro* prowadzi do uzyskania od 80 do 100 zarodków, a w konsekwencji 40 cieląt/dawczynię/rok (6,24). Wspomnieć również należy, że przy zastosowaniu transwaginalnej techniki pobierania oocytów nie obserwowano żadnych problemów zdrowotnych czy uszkodzeń dróg rodnych dawczyń, co pozwala na długotrwałe stosowanie metody u wartościowych genetycznie zwierząt. Technika ta może być również stosowana u samic we wczesnej ciąży (24).

## 2. Owce

Jajnik dojrzałej płciowo owcy zawiera od 12 tys. do 86 tys. pęcherzyków pierwotnych, od 100 do 400 pęcherzyków rosnących oraz od 10 do 40 pęcherzyków antralnych widocznych na powierzchni jajnika (1). Należy jednak wspomnieć, że nie wszystkie pęcherzyki zawierają oocyty o prawidłowym wyglądzie morfologicznym, czyli nie wszystkie są potencjalnym źródłem oocytów, a w konsekwencji zarodków. Stwierdzono bowiem (7), że duża część populacji jest objęta atrezją, której występowanie wyraźnie wiąże się z długością dnia świetlnego, ponieważ po okresie długiego dnia obserwowano znaczną redukcję w występowaniu atrezji. Ponadto, atrezja w znacznie większym stopniu redukuje liczbę dużych pęcherzyków antralnych niż pęcherzyków małych.

Badania nad pozaustrojowym uzyskiwaniem zarodków są najszerzej prowadzone u bydła. Badania te prowadzone są również od szeregu lat w Instytucie Zootechniki. Efektem tych doświadczeń było urodzenie się w 1990 r. (18) pierwszego w kraju cielęcia — buhajka (fot.1). Obecnie możliwe jest uzyskanie ponad 90% dojrzałych *in vitro* oocytów, z których ponad 80% ulega zapłodnieniu, ponad 70% podejmuje rozwój zarodkowy, a około 40% uzyskanych zarodków rozwija się do stadium blastocysty, co w przeliczeniu na liczbę oocytów użytych do zapłodnienia prowadzi do uzyskania od 30 do 40% blastocyst (19,20,21). Mimo licznych doświadczeń, obserwuje się znaczne różnice w wynikach osiągniętych nie tylko przez poszczególne zespoły badawcze, lecz nawet między kolejnymi próbami. Jedną z przyczyn jest znaczna różnica w podatności nasienia na kapacytację *in vitro*, obserwowana nie tylko między poszczególnymi osobnikami, lecz nawet między ejakulatami tego samego buhaja (21,36). Narzuca to konieczność selekcji buhajów, a nawet ejakulatów, przeznaczanych do zapłodnienia pozaustrojowego. Tym samym eliminuje się z rozrodu wiele reproduktorów. Obecnie rysuje się możliwość przewyciężenia, przynajmniej w pewnym stopniu, tych ograniczeń poprzez odpowiednie przygotowanie nasienia przeznaczanego do zapłodnienia pozaustrojowego. Z ostatnio przeprowadzonych przez nas badań (22) wynika bowiem, że usunięcie osocza z ejakulatu bezpośrednio po pobraniu i przed jego zamrożeniem, a zatem eliminacja czynników dekapacytujących z nasienia, wpływa korzystnie



Fot. 1. Opis w tekście (fot. A. Turczański)

na jego zdolność zapładniająca, co w konsekwencji prowadzi do uzyskania większej liczby blastocyst niż przy użyciu nasienia standardowo zamrażanego (22). Również różnice w procedurach stosowanych w poszczególnych etapach metody pozaustrojowego uzyskiwania zarodków rzutują na jej końcową efektywność. Mimo wspomnianych ograniczeń, metoda pozaustrojowej produkcji zarodków bydłych stosowana jest już na znaczną skalę w celach komercyjnych (6). Osiągana wydajność metody (w przeliczeniu na dawczynię/rok) jest wyższa niż przy użyciu superowulacji, a koszt wyprodukowania zarodka *in vitro* jest zdecydowanie niższy.

Stosowane obecnie metody pozaustrojowego uzyskiwania zarodków owczych pozwalają, podobnie jak u bydła, na uzyskanie ponad 80% zapłodnionych oocytów i ponad 70% dzielących się zarodków, a po przeniesieniu do dróg rodnych zsynchronizowanych biorczyń około 50% zakoczeń (3). Zygoty owcze hodowane *in vitro* rozwijają się do stadium blastocysty w stopniu porównywalnym czy nawet wyższym niż w warunkach *in vivo*. Jednakże stosowane dotychczas metody hodowli *in vitro* prowadzą do powstania szeregu anomalii rozwojowych, które obejmują fragmentację cytoplazmy, zbyt wczesne powstawanie jamy blastocysty oraz znacznie zredukowaną liczbę komórek blastocysty (37).

Zastosowanie metod pozaustrojowego uzyskiwania zarodków u kóz, podobnie jak u owiec, pozwala na uzyskanie ok. 60% zapłodnionych oocytów (4). Badania te są stosunkowo nieliczne co nie pozwala na pełniejszą ocenę możliwości stosowania tej metody u tego gatunku.

Prace nad pozaustrojową produkcją zarodków u świń doprowadziły do opanowania dwóch etapów metody, a mianowicie dojrzewania oocytów oraz hodowli *in vitro* zarodków. Możliwe jest bowiem uzyskanie ok. 70% morul i blastocyst z rozwijających się *in vitro* zygot (35). Nie opanowano natomiast w zadowalający sposób zapłodnienia pozaustrojowego, głównie z powodu niedostatecznie opracowanych metod kapacytacji nasienia. Nie rozwiązany problemem, przy zapłodnieniu pozaustrojowym u tego gatunku, jest częstotliwość występowania polispermii (34).

Obecnie stosowane metody pozaustrojowego uzyskiwania zarodków kłaczy pozwalają na zapłodnienie oocytów dojrzałych *in vivo* na poziomie 20-30% (31). Użycie oocytów dojrzewających *in vitro* prowadzi do zapłodnienia tylko w nielicznych przypadkach (5). Opanowania wymagają zatem zarówno metody dojrzewania oocytów jak i kapacytacji nasienia, a także hodowli wczesnych zarodków.

Podsumowując, mimo osiągniętego postępu w rozwoju technik pozaustrojowego uzyskiwania zarodków zwierząt gospodarskich, a szczególnie bydła i owiec, a także wydajności pozwalającej już na praktyczne stosowanie metody u tych dwóch gatunków, doskonalenie opracowanych technik i zwiększenie efektywności poszczególnych etapów metody wymaga dalszych badań.

Zarówno superowulacja jak i pozaustrojowa produkcja zarodków istotnie zwiększają możliwości wykorzystania potencjału rozrodczego bydła, a zastosowane w praktyce prowadzą do przyspieszenia postępu hodowlanego. Opisane metody pozwalają na wykorzystanie zaledwie nieznacznego odsetka gamet produkowanych przez jajnik.

Jajnik bydłecy, jak to już omawiano, podobnie jak innych ssaków, zawiera tysiące czy setki tysięcy pęcherzyków w różnych stadiach rozwoju. Ogromna większość (>99%) tych pęcherzyków ginie, podobnie jak u innych gatunków, w wyniku atrezji w różnych stadiach rozwoju *in vivo*, a tylko 0,05% pęcherzyków dojrzewa do owulacji (25,26). Możliwość uratowania pęcherzyków przed degradacją jaką niesie proces atrezji poprzez uzyskiwanie bardzo wczesnych stadiów rozwojowych i hodowlę *in vitro* otworzyłaby wprost nieograniczone źródło gamet żeńskich. Tym samym zostałaby przełamana bariera niskiej płodności samic jednorodnych, a potencjał gametotwórczy jajnika byłby maksymalnie wykorzystany. W tym kierunku zmierza się w prowadzonych najnowszych badaniach biotechnologicznych, polegających na opanowaniu metod uzyskiwania i hodowli pęcherzyków przedantralnych. Obecnie najbardziej zaawansowane są badania u myszy, co wynika stąd, że przedantralne pęcherzyki mysie stanowią doskonały model badawczy — stosunkowo łatwo dają się wyizolować z jajnika, nie wymagają zbyt długiego okresu hodowli, w warunkach *in vitro* mogą rosnąć, osiągać pełny potencjał rozwojowy, a nawet owulować (8,13).



Opracowanie metod hodowli pęcherzyków *in vitro* od stadium pęcherzyka pierwotnego do stadium pęcherzyka antralnego w pełni rozwiniętego wymaga rozwiązania wielu zagadnień. Jednym z pierwszych, a zarazem bardzo istotnym, jest opanowanie metod izolacji pęcherzyków. W przeciwieństwie do gryzoni, izolacja pęcherzyków z jajników bydłęcych nastęrcza spore trudności, głównie ze względu na włóknistą strukturę jajnika. Podejmowane są też próby uzyskiwania pęcherzyków poprzez homogenizację jajnika lub za pomocą metody enzymatycznej (10,30). Może to jednak prowadzić do uszkodzenia delikatnej struktury pęcherzyka, a także do mechanicznego zniszczenia większych pęcherzyków rosnących. Gosden i współ. (13) uważają, że najbardziej przydatnym sposobem izolacji pęcherzyków przedantralnych z jajników zwierząt gospodarskich byłoby sporządzanie cienkich skrawków warstwy korowej, z których pęcherzyki byłyby izolowane mechanicznie, pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego. Ten sposób uzyskiwania byłby najdogodniejszy w przypadku użycia jajników o delikatniejszej strukturze, a zatem płodów i cieląt. Dotychczasowe próby izolacji pęcherzyków przedantralnych o średnicy  $\geq 70 \mu\text{m}$  wykazały możliwość uzyskania  $2142 \pm 254$ ;  $512 \pm 92$  i  $298 \pm 54$  pęcherzyków odpowiednio z jajników płodu, jałówki i krowy (10).

Kolejnym istotnym problemem jest określenie warunków hodowli pęcherzyków przedantralnych. Pamiętać przy tym należy o znacznym zróżnicowaniu komórek pęcherzyka, jak również niedostatecznej, jak dotychczas, znajomości wymagań odżywczych wczesnych stadiów rozwojowych pęcherzyka i oocytu. Nie wyjaśniono również czy w przypadku bydła bardziej przydatne do hodowli *in vitro* są całe pęcherzyki przedantralne, otoczone komórkami osłonki-theca (najbardziej przydatne do hodowli w przypadku hodowli pęcherzyków przedantralnych z jajnika myszy) czy też tylko kompleksy oocyt+ komórki wzgórkajajonośnego. Osłonka pęcherzyka bydłęcego-theca jest znacznie grubsza niż u gryzoni, co może hamować penetrację tlenu i związków odżywczych do pęcherzyka, a tym samym prowadzić do zmian nekrotycznych, jak to ma miejsce w przypadku hodowli pęcherzyków przedantralnych świni (Telfer, 1994 — informacja ustna). Ponadto, pełny rozwój pęcherzyka od momentu zapoczątkowania wzrostu do osiągnięcia stadium przedowulacyjnego, trwający u myszy 21 dni, u zwierząt większych jest znacznie dłuższy i może trwać nawet kilka miesięcy, przy czym najwolniej przebiega wzrost wczesnych stadiów rozwojowych. Tempo wzrostu pęcherzyka i czas trwania poszczególnych stadiów rozwoju są również bardzo istotnymi czynnikami, które muszą być brane pod uwagę przy poszukiwaniu odpowiednich warunków hodowli.

Badania nad uzyskiwaniem i hodowlą pęcherzyków przedantralnych u bydła zapoczątkowane zostały w 1991 r., a ich wyniki ograniczają się do kilku publikacji (10,11,12,15,30) dotyczących głównie sposobów uzyskiwania i wstępnych prób kilkudniowej hodowli. Ostatnio jednak coraz więcej zespołów podejmuje tę tematykę badawczą. Można zatem oczekiwać, że już w niedalekiej przyszłości będziemy świadkami znaczącego postępu w rozwoju metod uzyskiwania i dojrzewania *in vitro* oocytów bydłęcych pochodzących z pęcherzyków przedantralnych.

## Literatura

1. Cahill L. P., Mauleon P., (1980), *J. Reprod. Fert.*, 58, 321-328.
2. Callesen H., Greve T., Christensen F., (1987), *Theriogenology*, 27, 217.
3. Crozet N., (1991), *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 43, 235-243.
4. De Smedt V., Crozet N., Ahmed-Ali M., Martino A., Cognie Y., (1992), *Theriogenology*, 37, 1049-1060.
5. Del Campo M. R., Donoso M. X., Parrish J. J., Ginther O. J., (1990), *Equine Vet. Sci.*, 10, 18-22.
6. Den Daas N., Merton S., (1994), *Proc. 10<sup>th</sup> Sci. Meeting EETA, Lyon*, 117-124.
7. Diancourt M. A., (1991), *Theriogenology*, 35, 55-79.
8. Eppig J. J., Schoeder A. C., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 268-276.
9. Erickson B. H., (1966), *J. Anim. Sci.*, 25, 800-805.
10. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., van den Hurk R., Ectors F. J., Fontes R. S., Nusgens B., Bevers M. M., Beckers J. F., (1993), *Theriogenology*, 40, 789-799.
11. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., van den Hurk R., Ectors F. J., Fontes R. S., Nusgens B., Bevers M. M., Beckers J. F., (1994a), *Theriogenology*, 41, 1333-1346.
12. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., Thiry M., Nusgens B., van den Hurk R., Ectors F. J., Bevers M. M., Beckers J.F., (1994b), *Proc. 10<sup>th</sup> Sci. Meeting EETA, Lyon*, 172.
13. Gosden R. G., Boland N. I., Spears N., Murray A. A., Chapman M., Wade J. C., Zohdy N. I., Brown N., (1993), *Reprod. Med. Review*, 2, 129-152.
14. Greenwald G. S., Terranova P. F., (1988), *The Physiology of Reproduction*, Eds. Knobil E., Neill J. D., Raven Press, Ltd., New York, 1, 387-445.
15. Jewgenow K., Pitra C., (1991), *Reprod. Dom. Anim.*, 26, 281-289.
16. Kańska L., Smoraż Z., (1984), *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 451-460.
17. Kańska L., (1985), *Rocz. Nauk. Zoot., Monografie i Rozprawy*, 23, 83-116.
18. Kańska L., Smoraż Z., Bak M., Wierzbowski S., (1990), *Przegląd Hodowlany*, 23-24, 10-11.
19. Kańska L., Ryńska B., (1993), *Anim. Sci. Papers and Reports*, 11, 121-126.
20. Kańska L., Ryńska B., (1993), *Mat. Symp. Biotechnologia Zwierząt*, 60.
21. Kańska L., Ryńska B., (1994), *Proc. Eur. Conf. Embryo Techn. & Genet. Engin. in Cattle & Sheep*, 215, Kraków.
22. Kańska L., Ryńska B., Smoraż Z., (1994), *Proc. 10<sup>th</sup> Sci. Meeting EETA, Lyon*, 190.
23. Kruip Th. A. M., Pieterse M. C., van Beneden Th. H., Vos P. L. A. M., Wurth Y. A., Taverne M. A. M., (1991), *Vet. Rec.*, 128, 208-210.
24. Kruip T. A. M., Boni R., (1994), *Proc. Eur. Conf. Embryo Techn. & Genetic Engin. in Cattle & Sheep, Kraków*, 117-126.
25. Mariana J. C., Nguyen Huy N., (1973), *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 13, 211-221.
26. Marion G. B., Gier H. B., Choudary J. B., (1968), *J. Anim. Sci.*, 27, 451-465.
27. Matton P., Adelkoun V., Couture Y., Dufour J. J., (1981), *J. Anim. Sci.*, 52, 813-820.
28. Monniaux D., Chupin D., Saumande J., (1983), *Theriogenology*, 19, 55-86.
29. Motlik J., Fulka J., (1986), *Theriogenology*, 25, 87-96.
30. Nuttack F., Mermillod P., Massip A., Dessy F., (1993), *Theriogenology*, 39, 811-821.
31. Palmer E., Bezaud J., Magistrini M., Duchamp G., (1991), *J. Reprod. Fert., Suppl.* 44, 375-384.
32. Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruip Th. A. M., Taverne M. A. M., (1988), *Theriogenology*, 30, 751-762.
33. Pieterse M. C., Vos P. L. A. M., Kruip Th. A. M., Wurth Y. A., van Beneden Th. H., Willemsse A. H., Taverne M. A. M., (1991), *Theriogenology*, 35, 857-862.
34. Rath D., (1992), *Theriogenology*, 37, 885-896.
35. Reed M. L., Illera M. J., Petters R. M., (1992), *Theriogenology*, 37, 95-109.
36. van Langendonck A., Lebrun N., Massip A., Dessy F., (1994), *Proc. 10<sup>th</sup> Sci. Meeting EETA, Lyon*, 250.
37. Walker S. K., Heard T. M., Seamark R. F., (1992), *Theriogenology*, 37, 111-126.

## Methods for obtaining *in vitro* oocytes and embryos in mammals — possibilities and limitations

### Summary

The authors discuss methods through which the reproductive potential in cattle may be increased. Two procedures for mass production of embryos to be used in cattle breeding schemes are now available, namely superovulation and embryo transfer, and more recently *in vitro* embryo production. Hormonal treatment for multiple ovulation, nonsurgical embryo collection and embryo transfer are widespread techniques to obtain more offspring from genetically superior cattle (MOET program). However, the costs can be high and the yield of embryos is unpredictable.

### Key words:

ovarian follicles, oocytes, recovery, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, embryo culture and transfer.

### Adres dla korespondencji:

Lucyna Kańska, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa.