



Analiza transkryptów jako narzędzie w ocenie jakości oocytów i zarodków bydła

Dorota Lechniak, Ewelina Warzych, Emilia Pers-Kamczyc
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

Gene expression as a tool for quality assessment of bovine oocytes and embryos

Summary

Suboptimal conditions of oocyte maturation and embryo culture *in vitro* reduce their developmental competence as compared to *in vivo* development. It is well known now that some IVF blastocysts, despite a proper morphology, are not able to hatch and implant after transfer. Therefore, it is suggested that during *in vitro* culture embryos show an ability to adjust to suboptimal conditions, which is however accompanied by changes in gene expression pattern resulting in reduced quality. Although gene expression analysis, as an invasive method, is considered as an indirect way of embryo quality evaluation, it provides valuable data on the processes crucial for growth and development.

Key words:

cattle, embryo, transcriptomics, developmental potential, *in vitro*.

Adres do korespondencji

Dorota Lechniak,
Katedra Genetyki
i Podstaw Hodowli
Zwierząt,
Akademia Rolnicza
im. Augusta
Cieszkowskiego,
ul. Wołyńska 33,
60-637 Poznań;
e-mail:
lechniak@jay.au.poznan.pl

1. Wprowadzenie

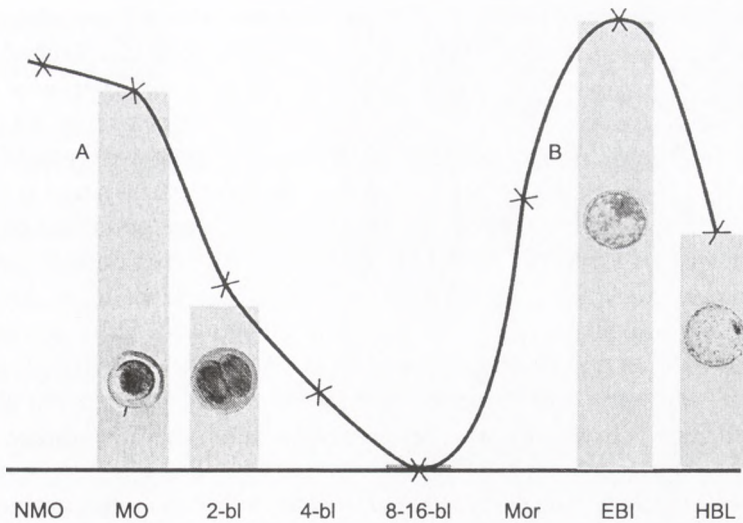
Powszechnie wiadomo, że potencjał rozwojowy zarodków bydła uzyskiwanych w warunkach laboratoryjnych jest znacznie niższy w porównaniu z zarodkami rozwijającymi się *in vivo*. Prawidłowe morfologicznie blastocysty pozyskane *in vitro* po przeniesieniu do bioczyni charakteryzują się istotnie niższym potencjałem rozwojowym, a różnice te są szczególnie widoczne po przeniesieniu do macicy blastocyst poddanych uprzednio mrożeniu (efektywność implantacji 10-40% *in vitro*, 40-70% *in vivo*) (1).

Pomimo wieloletnich badań i optymalizacji procedur, tylko 30-40% niedojrzałych oocytów bydłych osiąga stadium blastocysty po zapłodnieniu w warunkach *in vitro*. Oznacza to, że średnio co drugi zarodek 2-blastomerowy zatrzymuje się w rozwoju zwykle nie przekraczając stadium 8-16-blastomerów. Wykazano, że procent zygot osiagających stadium blastocysty zależy głównie od jakości zapładnianych oocytów, podczas gdy na jakość uzyskiwanych blastocyst, a pośrednio na efektywność implantacji, wpływają głównie warunki hodowli zarodków *in vitro* (2,3). Jakość oocytu/zarodka jest pojęciem złożonym i trudnym do zdefiniowania. Generalnie oznacza ona zdolność oocytu do uruchomienia mejozy, prawidłowego zapłodnienia i wczesnego rozwoju zygoty, a następnie zdolność zarodka do osiągnięcia stadium blastocysty, jej implantacji w macicy i rozwoju w prawidłowy organizm (3,4). Zawężając jednak zakres omawianego pojęcia do warunków laboratoryjnych, jakość oocytu/zarodka wyraża potencjał rozwojowy do uruchomienia mejozy, zapłodnienia oraz zdolność do osiągnięcia stadium blastocysty i opuszczenia przez nią osłonki przejrzystej. Celem opracowania jest podsumowanie obecnego stanu badań i przedstawienie opinii dotyczących zakresu wykorzystania analizy transkryptów zawartych w oocytach i zarodkach bydła do oceny ich jakości.

2. Krótka charakterystyka specyfiki badań transkryptów w oocytach i zarodkach

Przeciętna zawartość całkowitego RNA w oocytach i blastocystach bydła wynosi odpowiednio 2400 pg i 5300 pg (5), podczas gdy w komórce somatycznej około 10 pg. Różnica ta nie jest proporcjonalna do istotnego zwiększenia się liczby komórek blastocysty (średnio 120) w porównaniu z oocytom (1 komórka). Przyjmując, że mRNA stanowi 10-15% całkowitego RNA komórki i jest mieszaniną poliadenylowanych sekwencji o różnej długości, pula transkryptów będąca przedmiotem analizy jest bardzo zróżnicowana i ograniczona. Oocyty ssaków, w porównaniu z pojedynczymi komórkami somatycznymi posiadają zatem znacznie więcej transkryptów. RNA pochodzenia matczynego nagromadzony w oocycie podczas oogenezy pełni ważne funkcje podczas zapłodnienia i pierwszych podziałów bruzdkowania. Obecnie wiadomo, że niektóre transkrypty matczyne są obecne w zarodkach 8-blastomerowych (6), a nawet w blastocystach (7).

Liczba transkryptów podczas przedimplantacyjnego rozwoju zarodków bydła (od oocytu do blastocysty) ulega istotnym wahaniom odpowiadającym zwykle następującemu wzorcowi: wysoki poziom w niedojrzałych oocytach, stopniowy zanik do stadium 8-16-blastomerów (uruchomienie genomu zarodka – MET) i ponowny wzrost do stadium blastocysty (rys.). Należy pamiętać, że zmiany ilościowe niektórych transkryptów mogą odbiegać od podanego wzorca (8). Opisane wahania ilości RNA należy uwzględnić już na etapie planowania doświadczenia, gdyż w celu uzyskania niezbędnej ilości matrycy, mRNA należy pozyskać z odpowiednio licznej grupy oocy-



Rys. Zmiany ilości transkryptów w oocytach i przedimplantacyjnych zarodkach bydła na przykładzie ekspresji genu leptyny (68). Objaśnienia: NMO (nieodojrzały oocyt), MO (dojrzały oocyt), 2-bl (zarodek 2-blastomerowy), 4-bl (zarodek 4-blastomerowy), 8-16-bl (zarodek 8-16-blastomerowy), Mor (morula), EBL (ekspandująca blastocysta), HBL (wylęgła blastocysta).

tów/zarodków. Poza tym konieczne jest uwzględnienie dużej zmienności liczby transkryptów poszczególnych genów w różnych stadiach rozwoju. Analizując geny charakteryzujące się względnie wysoką ekspresją (np. *Hsp70*) amplifikacja oczekiwanego fragmentu może się powieść już przy niewielkiej liczbie oocytów, podczas gdy badanie genów o niskiej ekspresji (np. *GH*, *IGF1*) wymaga nie tylko znacznie większej liczby oocytów/zarodków w próbce, ale często zastosowania techniki *nested* PCR (9,10). Świadczy to oczywiście o śladowej zawartości matrycy w badanym materiale. Ze względu na ograniczoną dostępność materiału, doświadczenia na oocytach i zarodkach oparte są zwykle na łączonych próbach, zawierających 50-200 oocytów oraz od kilku do kilkudziesięciu zarodków w zależności od stadium rozwojowego. Zakładając dobry odzysk z pojedynczego jajnika bydła na poziomie 10 oocytów i analizę transkryptów w danym projekcie badawczym zarówno w oocytach jak i blastocystach (2-3 grupy doświadczalne), przeciętne doświadczenie obejmuje materiał pozyskany z 1500-2000 jajników. Badania oocytów/zarodków pozyskanych od dawczyń (*in vivo*) są jeszcze bardziej skomplikowane i nieporównywalnie bardziej kosztowne. Ponieważ przy analizie oocytów i zarodków ilość transkryptów jest rzeczywiście niewielka, istotnym przełomem w omawianych badaniach z technicznego punktu widzenia było opracowanie łańcuchowej reakcji polimerazy połączonej z odwrotną transkrypcją (RT-PCR). Od wielu lat jest to podstawowy protokół modyfikowany przez bardziej zaawansowane metodyki (np. PCR w czasie rzeczywistym) wykorzystujące barwniki fluorescencyjne (11). Wprowadzenie *real time* PCR pozwoliło

na efektywną amplifikację niewielkiej liczby transkryptów odpowiadającej nawet pojedynczemu zarodkowi, oocytowi czy blastomerowi (12-15). Technika ta jest obecnie najczęściej stosowana do ilościowej analizy transkryptów w oocytach i zarodkach. Podstawową zasadą oceny ilościowej jest założenie, że im więcej kopii badanego transkryptu znajduje się w próbie, tym mniej cykli amplifikacji jest koniecznych do jego detekcji. Jeżeli jednak badany transkrypt wystąpi w liczbie kopii poniżej 1000, jego wykrycie przy użyciu tradycyjnych metod będzie utrudnione. Wówczas proces jego amplifikacji może być blokowany przez liczniej występujące transkrypty i uzyskany wynik nie odzwierciedla jego faktycznej liczby. Może być to efektem konkurowania matryc o substraty (np. nukleotydy), które wyczerpują się zanim dojdzie do wystarczającego namnożenia tych nielicznych transkryptów lub też słabszego dostępu polimerazy do cDNA. Jednym z najważniejszych elementów ilościowej analizy mRNA jest normalizacja uzyskanych wyników poprzez odniesienie wartości wyrażającej względny poziom transkryptu (RA, ang. *relative abundance*) dla genu analizowanego do analogicznej wartości RA dla genu referencyjnego. Takie podejście niweluje ewentualne wahania związane z samą procedurą. Gen referencyjny musi charakteryzować się stałym poziomem ekspresji niezależnym od stadium rozwojowego zarodka ani zastosowanego układu doświadczalnego. Z dotychczasowych prac jasno wynika, że nadal nie zidentyfikowano genu, który spełniałby omawiane warunki w odniesieniu do oocytów i zarodków, a co więcej, poddaje się w wątpliwość istnienie takiego genu (16). Coraz częściej podważa się przydatność genów dotychczas uważanych za referencyjne (17-19). Vigneault i wsp. (20) przeprowadzili dokładną ocenę wykorzystania genu podjednostki histonowej H2a jako genu referencyjnego wykazując, że wiarygodność uzyskanych wyników zależy bezpośrednio od struktury starterów i miejsca ich lokalizacji w sekwencji genu. Okazuje się, że niektóre z par starterów amplifikują fragment innego wariantu genu podjednostki H2a, który wskutek deadenylacji może charakteryzować się istotnymi wahaniami poziomu transkryptu.

Dodatkowym elementem wpływającym na zmienność uzyskiwanych wyników jest liczba blastomerów w badanych zarodkach. Dotyczy to zwłaszcza analizy pojedynczych blastocyst pozyskanych *in vitro*, które mogą zawierać skrajne liczby komórek (od 30 do 250 blastomerów 8 dnia pi; Warzych i wsp. dane nie publikowane). Wiadomo też, że zarodki o wyższym potencjale rozwojowym posiadają zwykle większą liczbę blastomerów, a przez to więcej transkryptów genów regulujących podstawowy metabolizm (ang. *housekeeping genes*), które to są najczęściej wybierane jako referencyjne. W tej sytuacji sugeruje się równoczesne użycie kilku genów referencyjnych.

3. Środowisko rozwoju zarodków (*in vitro*, *in vivo*), a ich jakość w świetle badań transkryptów

Ważnym aspektem oceny prawidłowości rozwoju zarodków jest określenie swojego standardu, będącego punktem odniesienia podczas interpretacji wyników. Stwierdzono, że zarodki we wczesnych stadiach rozwoju charakteryzują się szczególnie wrażliwością w suboptymalnych warunkach hodowli (21). Van Soom i wsp. (22) wprowadzili pojęcie tzw. złotego standardu (ang. *gold standard*) w stosunku do zarodków o prawidłowej morfologii rozwijających się *in vivo*. W praktyce oznacza to odnoszenie wyników oceny danej grupy zarodków do parametrów charakteryzujących *gold standard* i określenie ewentualnych odchyień. Badania transkryptów prowadzone są w dwóch aspektach – jakościowym (obecność lub brak) lub ilościowym (względny poziom). Oczywiście jedynie badania ilościowe w pełni charakteryzują analizowany materiał, jednakże stwierdzenie obecności danego transkryptu stanowi niezbędny wstęp do tych badań. Istnieje bardzo bogata literatura charakteryzująca jakościową analizę transkryptów w zarodkach bydłowych. Najcenniejszy dorobek w tym zakresie prezentuje zespół C. Wrenzycki i H. Niemann (Mariensee, Niemcy), który opublikował wyjątkowo bogaty cykl prac. Wykazano, że zarodki rozwijające się *in vivo* i *in vitro* różnią się nie tylko zmiennym profilem jakościowym analizowanych transkryptów, ale także – a może i przede wszystkim – istotnymi różnicami w ilości mRNA genów regulujących wczesny rozwój zarodkowy (tab.). Stwierdzono jednoznacznie, że środowisko rozwoju ma decydujący wpływ na prawidłowość ekspresji genów w zarodku. Jednym z pierwszych zaskakujących odkryć w tym zakresie było stwierdzenie braku transkryptu genu *Cx43* regulującego powstawanie złączy szczelinowych między blastomerami, w blastocystach rozwijających się *in vitro* (23). Przy pewnym uogólnieniu można stwierdzić, że zarodki rozwijające się w macicy charakteryzuje wyższy poziom transkryptów genów stymulujących wzrost i procesy kompaktacji oraz kawitacji (np. *IGF2*, *Cx43*) i niższe wartości RA dla genów związanych ze stresem komórkowym i apoptozą (np. *Hsp70*, *Bax*) (tab.). Ponadto zaobserwowano istotne różnice w ilości transkryptów między zarodkami wywodzącymi się z różnych systemów hodowli *in vitro* (24). Duże znaczenie odgrywa obecność surowicy w podłożu, trudno jednak jednoznacznie stwierdzić, czy jej wpływ na rozwój zarodków jest negatywny, gdyż w opublikowanych pracach nie są przedstawione zgodne wyniki (25-28). Należy podkreślić, że zarodki bardzo szybko reagują na zmieniające się warunki hodowli. Lonergan i wsp. (29) monitorowali poziom mRNA genu *Bax* w zarodkach bydłowych inkubowanych *in vitro* po uprzedniej 4-dniowej hodowli w jajowodzie owcy. Już w pierwszym dniu hodowli *in vitro* stwierdzono istotne zmiany poziomu transkryptu w porównaniu z zarodkami pozostawionymi w jajowodzie owcy. W innym doświadczeniu wykazano, że już jednodniowa hodowla *in vitro* zmieniała ekspresję genu *SOX* (czynnik transkrypcyjny zaangażowany w odpowiedź na stres) w porównaniu z zarodkami hodowanymi *in vivo* (30).

Tabela

Ilościowa i jakościowa charakterystyka wybranych transkryptów w przedimplantacyjnych zarodkach bydłych

Gen	Funkcja w embriogenezie	Warunki hodowli	Wynik	Literatura
analiza jakościowa				
koneksyna 43 (<i>Cx43</i>)	tworzenie złączy szczelinowych	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	+ -	(23)
czynnik hamujący białaczkę (<i>BLIF</i>)	udział w implantacji	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	- +	(67)
analiza ilościowa				
<i>Cx43</i>	tworzenie złączy szczelinowych	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	+ -	(2)
<i>Bax</i>	indukcja apoptozy	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	- +	(2)
interferon tau (<i>IFτ</i>)	rozpoznanie ciąży	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	- +	(32)
<i>SOX</i>	czynnik transkrypcyjny	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	- +	(32)
<i>IGF2</i>	stymulacja rozwoju zarodkowego	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	+ -	(32)
<i>Hsp70</i>	reakcja na stres białko opiekuńcze	<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	- +	(28)

Objaśnienia:

+ obecność/wyższy poziom transkryptów; - brak/nniższy poziom transkryptów.

Bardzo ciekawym zagadnieniem jest swoista zdolność (plastyczność) zarodków bydła do szybkiego przystosowywania się do suboptymalnych warunków hodowli (21). Omawiana zdolność przystosowawcza oznacza jednak istotne zmiany profilu ekspresji genów, które nie pozostają bez wpływu na potencjał rozwojowy zarodka pomimo zachowania prawidłowej morfologii. Nadal nie jest poznana granica tej tolerancji, po przekroczeniu której zarodek zatrzymuje się w rozwoju i stopniowo obumiera. Niektóre zarodki, pomimo istotnych zmian profilu ekspresji genów zachowują zdolność do implantacji i rozwoju, jednakże te nieprawidłowości ujawniają się później podczas rozwoju płodowego m.in. w postaci tzw. syndromu dużego potomstwa (LOS, ang. *large offspring syndrome*) (31). Lazzari i wsp. (32) wykazali związek pomiędzy wysokim stężeniem albuminy w pożywce, a zaburzeniami w rozwoju płodu (wysoka masa okołourodzeniowa, zmiany metaboliczne itp.). Literatura dotycząca badań zarodków rozwijających się w macicy oraz wpływu wybranych czynników na ich jakość (np. żywienie samic, stan zdrowotny, warunki utrzymania) jest

nadal skromna, co oczywiście odzwierciedla trudność w uzyskiwaniu takiego materiału. Stwierdzono, że żywienie jałówek poddawanych stymulacji hormonalnej istotnie modyfikowało poziom mRNA genów zaangażowanych w metabolizm pirogonianu (33).

4. Wykorzystanie analizy transkryptów wybranych genów markerowych w ocenie warunków hodowli zarodków

Suboptymalne warunki hodowli *in vitro* powodują zaburzenia metabolizmu zarodków, a w konsekwencji aktywację procesów zmierzających do naruszenia homeostazy i zatrzymania ich rozwoju (34). Dotychczas scharakteryzowano ekspresję szeregu genów wykorzystywanych do oceny stopnia przystosowania warunków hodowli do wymagań wczesnych zarodków bydła (11). Ogólnie geny te reprezentują dwie kategorie: 1) geny odpowiedzialne za kontrolę wzrostu i przeżywalność (markery wysokiego potencjału rozwojowego) oraz 2) geny związane ze stresem komórkowym i apoptozą (markery obniżonej jakości zarodków). Geny kodujące insulinopodobne czynniki wzrostu 1 i 2 (*IGF1* i 2) oraz ich receptory są uznawane za przedstawicieli pierwszej grupy. Stymulują one transport aminokwasów i glukozy, syntezę białek i kwasów nukleinowych oraz pobudzają podziały komórkowe. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy poziomem mRNA tych genów a morfologią zarodków człowieka (35). Lonergan i wsp. (3) zaobserwowali wyższy poziom transkryptów tych genów w warunkach *in vivo* oraz związek pomiędzy podwyższoną wartością RA genów *IGF2* i *IGF1R* a dobrą jakością zarodków bydła. Ponadto, wyższy poziom mRNA 3 genów z tej rodziny (*IGF1R*, *IGF2* i *IGF2R*) został powiązany z istotnie niższą częstością apoptozy w blastocystach bydła (25,26). Jednak nie wszystkie doniesienia są zgodne z opisanymi zależnościami, co jedynie potwierdza istotny wpływ zastosowanego systemu hodowli. Lim i wsp. (36) oraz Lazzari i wsp. (32) stwierdzili, że obecność BSA, surowicy lub PVA w podłożu nie wpływa na poziom transkryptu genu *IGF2R* w zarodkach. Natomiast Yaseen i wsp. (37) w tych samych warunkach zanotowali zmieniony poziom mRNA genu *IGF2R* przy stałej ilości transkryptu genów *IGF1R* oraz *IGF2*.

Druga grupa genów (związanych ze stresem komórkowym i apoptozą) jest reprezentowana przez gen kodujący białko szoku cieplnego (*Hsp70*) oraz gen o działaniu proapoptotycznym z rodziny białek Bcl2 – *Bax*. *Hsp70* posiada właściwości białek opiekuńczych (ang. *chaperones*), które biorą udział w syntezie białek i zapobiegają ich rozkładowi (38). Sugeruje się, że podwyższona ekspresja genu *Hsp70* w zarodkach może być uznawana z jednej strony za marker działania czynników stresowych, a z drugiej może świadczyć o zdolności zarodka do zapobiegania negatywnym skutkom takich czynników. Bazując na wynikach dotychczasowych badań trudno jest określić jednoznaczną zależność pomiędzy warunkami rozwoju zarodków (*in vivo* lub *in vitro*), a poziomem transkryptu tego genu. Wrenzycki i wsp. (28)

stwierdzili wyższy RA w zarodkach pozyskanych *in vitro*, podczas gdy Knijn i wsp. (39) nie wykazali różnic. Ponadto, Wrenzycki i wsp. (28) zanotowali istotny wpływ rodzaju podłoża do hodowli zarodków (TCM199 lub SOF) oraz czynników je uzupełniających (surowica, odtłuszczona albumina – faβBSA lub PVA) na względny poziom mRNA w blastocystach. Nie tylko skład pożywki do hodowli zarodków, ale także pożywki do dojrzewania oocytów (dodatek surowicy, albuminy lub syntetycznych polimerów) miał istotny wpływ na RA genu *Hsp70* w blastocystach (26,40,41). O jednoznacznym związku ekspresji genu *Hsp70* z występowaniem czynników stresowych w środowisku rozwoju zarodka świadczy istotnie wyższy poziom mRNA tego genu w zarodkach poddanych mrożeniu i rozmrażaniu (42).

Bcl2 i *Bax* pełnią główne funkcje w procesie apoptozy uznawanym za podstawowy mechanizm atrezji pęcherzyków jajnikowych ssaków (42) oraz obumierania poszczególnych blastomerów zarodka. O losie komórki decyduje wzajemny stosunek ilości mRNA i białka obu tych genów, przewaga produktu genu *Bax* indukuje apoptozę, natomiast przewaga białka *Bcl2* proces ten hamuje (44). Transkrypty dla genów *Bax* i *Bcl-2* stwierdzono w oocytach i przedimplantacyjnych zarodkach bydła (26). Ekspresja genu *Bax* może ulegać modyfikacjom podczas inkubacji *in vitro*, wiadomo także, że wyższy poziom transkryptu charakteryzuje zarodki gorszej jakości, często opóźnione w rozwoju (45). Ponadto warunki hodowli zarodków (*in vivo* lub *in vitro*) mają istotny wpływ na moment pojawienia się mRNA genu *Bax* podczas rozwoju przedimplantacyjnego; *in vitro* transkrypty zaobserwowano już w stadium 8 blastomerów, podczas gdy *in vivo* w stadium 16-komórkowym (30). Również więcej mRNA genu *Bax* zaobserwowano w wolniej rozwijających się zarodkach *in vitro* (46). Wysokie stężenie białka Bcl-2 zanotowano w oocytach i zarodkach dobrej jakości, a niezwykle niski poziom ekspresji w oocytach pozbawionych komórek pęcherzykowych oraz zdegenerowanych zarodkach (47). Poziom transkryptu genu *Bax* w zarodkach bydłych był także uzależniony od podłoża (TCM199, SOF) i jego uzupełnienia (FCS, BSA, PVP) (2,24). Ilość białka Bcl-2, jak się wydaje, jest niższa w zdegenerowanych blastocystach, potwierdzając hipotezę, że stosunek ekspresji *Bcl-2* do *Bax* ulega zmianie w apoptotycznych zarodkach. Niektórzy autorzy zaobserwowali stały poziom mRNA tego genu w blastocystach wywodzących się z oocytów o różnej jakości (48), a także brak różnic w tym zakresie mimo zastosowania pożywek do dojrzewania oocytów o różnym składzie, który to czynnik miał istotny związek z występowaniem apoptozy w zarodkach (25,26).

Do grupy genów związanych z przeżywalnością zarodków zaliczono także interferon tau (*IFτ*), który pełni szczególne funkcje w procesie rozpoznawania ciąży u bydła. Kubisch i wsp. (49) zidentyfikowali zależność pomiędzy syntezą białka IFτ, a efektywnością implantacji ekspandujących blastocyst bydłych. Zarodki charakteryzujące się mniejszą ilością białka istotnie częściej ulegały implantacji w macicy. Transkrypt tego genu stwierdzono w komórkach trofoblastu blastocyst bydłych (50), przy czym w warunkach *in vitro* transkrypcję zanotowano już w stadium moruli (30). Wcześniejsze uruchomienie ekspresji genu *IFτ* oraz więcej transkryptu w bla-

stocystach może stanowić reakcję zarodków na suboptymalne środowisko rozwoju w porównaniu z warunkami *in vivo*. Dotąd brakuje jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy wysoki poziom mRNA genu *IFτ* świadczy o dobrej czy obniżonej jakości zarodków. Rizos i wsp. (24) sugerują, że więcej transkryptu tego genu odpowiada dobrej jakości zarodków, podczas gdy Wrenzycki i wsp. (51) oraz Kubisch i wsp. (52) są odmiennego zdania twierdząc, że wysoka ekspresja tego genu jest powiązana z obniżoną jakością. Ponieważ na ekspresję genu *IFτ* mają wpływ również inne czynniki, takie jak np. czas tworzenia blastocysty (52), płeć zarodka (53), czy skład pożywki (24, 40), wnioskowanie oparte na ilości mRNA genu *IFτ* może być niewiarygodne.

5. Aktualne kierunki badań

Obecnie zainteresowanie naukowców skupia się wokół **analizy pojedynczych zarodków** (13). Korzyścią płynącą z takiego podejścia jest przede wszystkim możliwość powiązania oceny morfologicznej z poziomem transkryptów. Ocena jakości w klasycznym ujęciu opiera się przede wszystkim na nieinwazyjnej ocenie morfologii (liczba blastomerów, ich wielkość, występowanie fragmentacji cytoplazmy, prawidłowość kompaktacji itp., 22). Wykazano jednak, że skoro zarodki o prawidłowej morfologii mogą charakteryzować się obniżoną żywotnością, ocena morfologii dokonywana pod mikroskopem stereoskopowym jest niewystarczająca do pełnego scharakteryzowania jakości zarodka (54). Analiza transkryptów uważana jest za pośrednią metodę oceny jakości, gdyż jej wartość wyraża się poprzez odniesienie względnego poziomu mRNA do wcześniej obserwowanych: potencjału rozwojowego i prawidłowości budowy zarodka. Ze względu na inwazyjny charakter i ograniczenia metodyczne, jak dotąd, opublikowano niewiele doniesień na temat oceny poziomu mRNA zarodka na podstawie wcześniej pobranej biopsji kilku blastomerów (12). Ponadto istnieje tutaj niebezpieczeństwo uzyskania wyników, które nie będą reprezentatywne dla całego zarodka, gdyż w wyniku polaryzacji blastomerów dochodzi do nierównomiernego rozdziału materiału zawartego w cytoplazmie (55).

Istotne znaczenie dla postępu badań z zakresu transkryptomiki zarodków miało wprowadzenie **mikromacierzy** (ang. *microarray*) umożliwiających objęcie jednoczesną analizą wielu tysięcy sekwencji. Obecnie przyjmuje się, że tylko w stadium blastocysty dochodzi do ekspresji około 10 000 genów (56). Misirlioglu i wsp. (6) przeanalizowali 24 072 sekwencji w dojrzałych oocytach i 8-blastomerowych zarodkach bydłych charakteryzując pulę transkryptów w obu stadiach rozwojowych. W dotychczasowych doniesieniach wskazujących na istotne zmiany ekspresji genów w zarodkach pozyskanych *in vitro* potwierdzono analizą 3888 sekwencji w blastocystach bydła (53). Różnice w ilości mRNA między blastocystami rozwijającymi się *in vivo* i *in vitro* stwierdzono w przypadku 384 genów. W wyniku precyzyjnej analizy zidentyfikowano 16 genów związanych z procesami transkrypcji i translacji, które

w istotnym stopniu mogą determinować jakość zarodków i stanowić podstawowe źródło zaburzeń rozwoju w warunkach *in vitro*. Wyjątkowo ciekawy układ doświadczalny przedstawili Somers i wsp. (13). Analizą objęto blastocysty klonalne uzyskane metodą transplantacji jąder (NT) oraz blastocysty kontrolne, których ojcem był buhaj – dawca fibroblastów użytych do klonowania. Uzyskano w ten sposób swoiste półrodzeństwo. Przebadano 5000 sekwencji cDNA bydła typowych dla stadium blastocysty wykazując niewielkie (<2x) różnice między zarodkami klonalnymi i kontrolnymi w poziomie transkryptów zaledwie 135 genów. Na tej podstawie autorzy podają w wątpliwość powszechnie panującą opinię o licznych zaburzeniach procesu reprogramowania cyklu komórkowego podczas klonowania zarodków ssaków.

Technika mikromacierzy umożliwia równoległe monitorowanie wielu transkryptów specyficznych np. dla danego stadium rozwojowego, a uzyskiwanie olbrzymiej ilości danych wymaga dodatkowo użycia zaawansowanych metod bioinformatycznych. Bardzo ważnym elementem w analizie oocytów i zarodków jest ponadto uwzględnienie istotnych wahań zawartości całkowitego RNA w poszczególnych stadiach przy ustalaniu ilości materiału nanoszonego na mikromacierz (ang. *loading artifact*). Jednak podobnie jak w innych technikach, użycie mikromacierzy wymaga łączenia wielu zarodków (np. 50 blastocyst) w celu uzyskania próby badawczej. Stąd badania pojedynczych zarodków tą metodą są nadal niemożliwe (7).

Analiza transkryptów stanowi pierwszy etap badania ekspresji genów. Jednakże zdecydowanie więcej informacji uzyskuje się analizując **funkcje genów za pomocą np. techniki interferencji RNA (RNAi)**. Wykorzystuje ona naturalny proces wyciszania ekspresji genów przez dwuniciowy RNA. W skrócie, liniowe, dwuniciowe fragmenty RNA są degradowane przez rybonukleazę o aktywności RNazyIII (Dicer) do cząstek siRNA (ang. *small interfering RNA*). Następnie za pomocą kompleksu RISC dochodzi do łączenia odcinków siRNA komplementarnych do mRNA oraz degradacji transkryptu, a tym samym zablokowania ekspresji na tym etapie. Technika RNAi została już z powodzeniem zastosowana w badaniach oocytów i zarodków ssaków (58,59). Badania te polegają na wprowadzeniu do oocytów/zarodków, najczęściej drogą mikroiniekcji, zsyntetyzowanych fragmentów RNA o sekwencji odpowiadającej siRNA komplementarnych do transkryptów genów, np. regulujących rozwój zarodka, a następnie monitorowanie zmian transkrypcji genomu zarodkowego przy zablokowaniu ekspresji wybranego genu. Schellander i wsp. (59) zaobserwowali istotny spadek ilości RNA i białka Cx43 tylko w zarodkach bydła rozwijających się *in vivo*, podczas gdy nie stwierdzono zmian w zarodkach inkubowanych *in vitro*. Autorzy sugerują, że ma to związek ze znacznie niższą zawartością mRNA genu *Cx43* w zarodkach uzyskanych metodą IVF, a jak wiadomo, efektywność techniki RNAi wiąże się ściśle z liczbą transkryptów. Jednak największe nadzieje w zastosowaniu omawianej techniki wiąże się z pozyskiwaniem zwierząt transgenicznych charakteryzujących się stałym blokowaniem ekspresji określonego genu, np. białka prionowego u kóz (60).

Metabolomika w powiązaniu z jakością zarodków cieszy się obecnie rosnącym zainteresowaniem embriologów (61). Dotychczasowe analizy skupiają się wokół

określonych metabolitów (np. aminokwasy) lub dotyczą one profilowania metabolitów w badanym materiale (ang. *biochemical fingerprints*). Omawiane niskocząsteczkowe związki (poniżej 1000 Da) stanowią końcowy etap przemian metabolicznych, przez co odzwierciedlają biologiczną odpowiedź zarodków na szereg czynników genetycznych i środowiskowych. Mogą być zatem markerem dobrostanu zarodka rozwijającego się w danym środowisku. Uważa się, że uzyskane w ten sposób dane o wiele precyzyjniej charakteryzują jakość zarodków w porównaniu z analizą transkryptów czy białek. Wynika to m.in. z faktu, że stwierdzenie mRNA w komórce nie jest jednoznaczne z powstawaniem białek i ich funkcjonalnością. Analiza metabolitów wymaga zaangażowania szeregu czułych metod detekcji, takich jak np. masowa chromatografia gazowa (GC-MS), chromatografia cieczowa (LC-MS) czy też jądrowy rezonans magnetyczny (NMR), przy zastosowaniu których można wykryć setki związków chemicznych w pojedynczej próbie. Niewątpliwie bardzo ważną zaletą badań metabolitów jest ich nieinwazyjność, gdyż analizie można poddawać płyn pęcherzykowy (oocyty) lub pożywkę, w której zarodki się rozwijały (61,62). Jednakże w niektórych przypadkach (np. analiza kwasów tłuszczowych) badaniom poddaje się sam zarodek (63). Brison i wsp. (62) prowadzili hodowlę zygot człowieka przez 24 h w niewielkich (4 μ l) indywidualnych kroplach pożywki. Wykazali oni istotne korelacje pomiędzy zawartością 3 aminokwasów (asparagina, glicyna, leucyna) w pożywce hodowlanej a procentem cięż i żywo urodzonych noworodków. Podobnie, prawidłowo rozwijające się zarodki człowieka charakteryzowały się istotnie większą koncentracją nienasyconych kwasów tłuszczowych przy niższym udziale kwasów nasyconych, w porównaniu z zarodkami, które nie rozwinęły się poza stadium 4 blastomerów (63).

Badania pojedynczych blastomerów pobranych drogą biopsji z rozwijających się zarodków byłyby bardzo cennym narzędziem w ocenie ich jakości, gdyż nie tylko pozwoliłyby skonfrontować uzyskane wyniki z morfologią zarodków, ale – co ważniejsze – ułatwiłyby selekcję zarodków przed ich mrożeniem lub przeniesieniem do biorczyni. Pomimo swojej atrakcyjności, analiza pojedynczych komórek zarodka obciążona jest dużym błędem i w niewielkim stopniu odzwierciedla sytuację w całym zarodku. Składa się na to kilka opisanych już zjawisk. Pierwszym z nich jest fakt, że blastomery przedimplantacyjnego zarodka różnią się istotnie co do zawartości różnych substancji, w tym transkryptów, białek itp. ze względu na występowanie zjawiska polaryzacji. Manifestuje się ono m.in. nierównomiernym rozdziałem czynników zawartych w cytoplazmie między blastomery potomne, co wiąże się także z różnicowaniem blastomerów w rozwijającym się zarodku (64). Innym argumentem przemawiającym przeciwko takiemu podejściu jest dobrze udokumentowane zjawisko zaburzeń liczby chromosomów typu miksploidii, które polega na występowaniu w obrębie zarodka linii komórkowych różniących się ploidalnością jądra (np. $2n/4n$). Blastomery o zmienionej liczbie chromosomów są zlokalizowane głównie w trofoblaście blastocysty (65). Wiadomo, że analiza pojedynczych blastomerów stanowi podstawę przedimplantacyjnej diagnostyki genetycznej (PGD) w progra-

mach wspomaganego rozrodu człowieka. Jednakże liczba komórek we wczesnych stadiach rozwojowych zarodka (2-3 dzień pi) jest niewielka i nie pozwala na pobranie większej ich liczby do analiz (66).

6. Podsumowanie

Analiza transkryptów, pomimo swej inwazyjności, znajduje coraz szersze wykorzystanie w kontroli jakości oocytów/zarodków i pomaga w wyjaśnianiu zmian obserwowanych na poziomie morfologicznym. PCR w czasie rzeczywistym jest obecnie najczęściej wybieraną techniką ilościowej analizy mRNA. W przypadku oocytów/zarodków należy uwzględnić szereg ograniczeń wynikających ze specyfiki tego materiału. Badania pojedynczych zarodków cieszą się dużym zainteresowaniem, gdyż pozwalają na odniesienie poziomu transkryptów do uprzednio ocenionej morfologii zarodka oraz jego potencjału rozwojowego. Analiza mRNA w pojedynczych blastomerach ma nadal liczne ograniczenia (śladowe ilości mRNA, jego nierównomierne rozmieszczenie w komórkach zarodka – polaryzacja, wątpliwości co do reprezentatywności wyników). Natomiast wprowadzanie nowoczesnych metod detekcji do badań z zakresu embriologii (mikromacierze, RNAi) sprawiło, że analiza transkryptów znajduje się w centrum zainteresowania wielu zespołów badawczych na całym świecie, co skutkuje w lawinowo rosnącej ilości informacji pomagających wyjaśnić procesy zachodzące w przedimplantacyjnych zarodkach.

Praca naukowa finansowana ze środków MNiSW w latach 2006-2009 (autorski projekt badawczy nr 3780/P01/2006/31). Publikacja powstała przy wsparciu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Literatura

1. Holm P., Callesen H., (1998), *Reprod Nutr Dev.*, 38(6), 579-594.
2. Rizos D., Lonergan P., Boland M. P., Arroyo-Garcia R., Pintado B., de la Fuente J., Gutiérrez-Adán A., (2002), *Biol Reprod.*, 66(3), 589-595.
3. Lonergan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Fair T., Boland M. P., (2003a), *Reprod. Domest. Anim.*, 38(4), 259-267.
4. Sirard M. A., Richard F., Blondin P., Robert C., (2006), *Theriogenology*, 65(1), 126-136.
5. Bilodeau-Goeseels S., Schultz G. A., (1997), *Biol. Reprod.*, 56(5), 1323-1329.
6. Misirlioglu M., Page G. P., Sagirkaya H., Kaya A., Parrish J. J., First N. L., Memili E., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(50), 18905-18910.
7. Niemann H., Carnwath J. W., Kues W., (2007), *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S165-S177.
8. Temeles G. L., Ram P. T., Rothstein J. L., Schultz R. M., (1994), *Mol. Reprod. Dev.*, 37(2), 121-129.
9. Joudrey E. M., Lechniak D., Petrik J., King W. A., (2003), *Mol. Reprod. Dev.*, 64(3), 275-283.
10. Lonergan P., Gutiérrez-Adán A., Pintado B., Fair T., Ward F., de la Fuente J., Boland M. P., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 57, 146-152.
11. Wrenzycki C., Herrmann D., Lucas-Hahn A., Korsawe K., Lemme E., Niemann H., (2005), *Reprod. Fertil. Dev.*, 17, 23-35.

12. Steuerwald N., Cohen J., Herrera R. J., Brenner C. A., (1999), *Mol. Hum. Reprod.*, 5(11), 1034-1039.
13. Somers J., Smith C., Donnison M., Wells D. N., Henderson H., McLeay L., Pfeffer P. L., (2006), *Reproduction*, 131(6), 1073-1084.
14. Pedersen M. E., Ozdas O. B., Farstad W., Tverdal A., Olsaker I., (2005), *Reprod. Fertil. Dev.*, 17(8), 751-757.
15. Hartshorn C., Rice J. E., Wangh L. J., (2003), *Mol. Reprod. Dev.*, 64(1), 41-51.
16. Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W., (2005), *J. Mol. Endocrinol.*, 34(3), 597-601.
17. Dode M. A., Dufort I., Massicotte L., Sirard M. A., (2006), *Mol. Reprod. Dev.*, 73(3), 288-297.
18. Robert C., McGraw S., Massicotte L., Pravetoni M., Gandolfi F., Sirard M. A., (2002), *Biol. Reprod.*, 67, 1465-1472.
19. Donnison M., Pfeffer P. L., (2004), *Biol. Reprod.*, 71(6), 1813-1821.
20. Vigneault C., Gilbert I., Sirard M. A., Robert C., (2007), *Mol. Reprod. Dev.*, 74(6), 703-715.
21. Gardner D. K., Lane M., (2005), *Reprod. Fertil. Dev.*, 17, 361-370.
22. van Soom A., Mateusen B., Leroy J., de Kruif A., (2003), *Reprod. Biomed. Online*, 7(6), 664-670.
23. Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H., (1996), *J. Reprod. Fertil.*, 108(1), 17-24.
24. Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Perez-Garnelo S., de la Fuente J., Boland M. P., Lonergan P., (2003), *Biol. Reprod.*, 68, 236-243.
25. Warzych E., Peippo J., Szydlowski M., Lechniak D., (2007a), *Anim. Reprod. Sci.*, 97(3-4), 334-343.
26. Warzych E., Wrenzycki C., Peippo J., Lechniak D., (2007b), *Mol. Reprod. Dev.*, 74(3), 280-289.
27. Russell D. F., Baqir S., Bordignon J., Betts D. H., (2006), *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 1255-1270.
28. Wrenzycki C., Herrmann D., Keskinetepe L., Martins Jr A., Sirisathien S., Brackett B., Niemann H., (2001a), *Hum. Reprod.*, 16(5), 893-901.
29. Lonergan P., Rizos D., Kanka J., Nemcova L., Mbaye A. M., Kingston M., Wade M., Duffy P., Boland M. P., (2003b), *Reproduction*, 126(3), 337-346.
30. Lonergan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Moreira P. M., Pintado B., de la Fuente J., Boland M. P., (2003c), *Biol. Reprod.*, 69, 1424-1431.
31. Young L. E., Sinclair K. D., Wilmut I., (1998), *Rev. Reprod.*, 3(3), 155-163.
32. Lazzari G., Wrenzycki C., Herrmann D., Duchi R., Kruip T., Niemann H., Galli C., (2002), *Biol. Reprod.*, 67(3), 767-775.
33. Wrenzycki C., de Sousa P., Overström E. W., Dudy R. T., Herrmann D., Watson A. J., Niemann H., O'Callaghan D., Boland M. P., (2000), *J. Reprod. Fertil.*, 118(1), 69-78.
34. Fleming T. P., Kwong W. Y., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D. J., Watkins A. J., Eckert J. J., (2004), *Biol. Reprod.*, 71(4), 1046-1054.
35. Liu H. C., He Z. Y., Mele C. A., Veeck L. L., Davis O. K., Rosenwaks Z., (1997), *Am. J. Reprod. Immunol.*, 38, 237-245.
36. Lim K. T., Jang G., Ko K. H., Lee W. W., Park H. J., Kim J. J., Lee S. H., Hwang W. S., Lee B. C., Kang S. K., (2007), *Theriogenology*, 67(2), 293-302.
37. Yaseen M. A., Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H., (2001), *Reproduction*, 122, 601-610.
38. Levy R., (2001), *Int. Rev. Cytol.*, 210, 1-37.
39. Knijn H. M., Wrenzycki C., Hendriksen P. J. M., Vos P. L. A. M., Herrmann D., van der Weijden G. C., Niemann H., Dieleman S. J., (2002), *Reproduction*, 124(3), 365-375.
40. Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H., (1999), *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 8-18.
41. Russell D. F., Baqir S., Bordignon J., Betts D. H., (2006), *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 1255-1270.
42. Park S. Y., Kim E. Y., Cui X. S., Tae J. C., Lee W. D., Kim N. H., Park S. P., Lim J. H., (2006), *Zygote*, 14(2), 125-131.
43. Opiela J., Kańska-Książkiewicz L., (2006), *Biotechnologia*, 1(72), 90-96.
44. Yang E., Korsmeyer S. J., (1996), *Blood*, 88(2), 386-401.
45. Warzych E., Lechniak D., (2005), *Biotechnologia*, 1(68), 172-182.
46. Gutiérrez-Adán A., Rizos D., Fair T., Moreira P. N., Pintado B., de la Fuente J., Boland M. P., Lonergan P., (2004 Aug), *Mol. Reprod. Dev.*, 68(4), 441-448.
47. Yang M. Y., Rajamahendran R., (2002), *Anim. Reprod. Sci.*, 70(3-4), 159-169.

48. Nemcova L., Machatkova M., Hanzalova K., Horakova J., Kanka J., (2006), *Theriogenology*, 65(7), 1254-1264.
49. Kubisch H. M., Sirisathien S., Bosch P., Hernandez-Fonseca H. J., Clements G., Liukkonen J. R., Brackett B. G., (2004), *Reprod. Domest. Anim.*, 39(2), 120-124.
50. Roberts R. M., Cross J. C., Leaman D. W., (1992), *Endocr. Rev.*, 13(3), 432-452.
51. Wrenzycki C., Wells D., Herrmann D., Miller A., Oliver J., Tervit R., Niemann H., (2001), *Biol. Reprod.*, 65(1), 309-317.
52. Kubisch H. M., Larson M. A., Roberts R. M., (1998), *Mol. Reprod. Dev.*, 49(3), 254-260.
53. Larson M. A., Kimura K., Kubisch H. M., Roberts R. M., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98(17), 9677-9682.
54. Aguilar M. M., Galina C. S., Merchant H., Montiel F., Canseco R., Marquez Y. C., (2002), *Reprod. Domest. Anim.*, 37(6), 341-346.
55. Edwards R. G., (2005), *Reprod. Biomed. Online*, 11(1), 104-114.
56. Zeng F., Baldwin D. A., Schultz R. M., (2004), *Dev. Biol.*, 272(2), 483-496.
57. Corcoran D., Fair T., Park S., Rizos D., Patel O. V., Smith G. W., Coussens P. M., Ireland J. J., Boland M. P., Evans A. C., Lonergan P., (2006), *Reproduction*, 131(4), 651-660.
58. Paradis F., Vigneault C., Robert C., Sirard M. A., (2005), *Mol. Reprod. Dev.*, 70(2), 111-121.
59. Schellander K., Hoelker M., Tesfaye D., (2007), *Theriogenology*, 68 Suppl 1, S107-115.
60. Golding M. C., Long C. R., Carmell M. A., Hannon G. J., Westhusin M. E., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(14), 5285-5290.
61. Singh R., Sinclair K. D., (2007), *Theriogenology*, (in press).
62. Brison D. R., Houghton F. D., Falconer D., Roberts S. A., Hawkhead J., Humpherson P. G., Lieberman B. A., Leese H. J., (2004), *Hum. Reprod.*, 19(10), 2319-2324.
63. Haggarty P., Wood M., Ferguson E., Hoad G., Srikantharajah A., Milne E., Hamilton M., Bhattacharya S., (2006), *Hum. Reprod.*, 21(3), 766-773.
64. Antczak M., van Blerkom J., (1999), *Hum. Reprod.*, 14(2), 429-447.
65. Viuff D., Palsgaard A., Rickords L., Lawson L. G., Greve T., Schmidt M., Avery B., Hyttel P., Thomsen P. D., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 62(4), 483-488.
66. Sermon K., de Rycke M., (2007), *Single cell diagnostics. Methods and protocols*, Ed. Thornhill A., 31-42, Human Press, Totowa, New Jersey.
67. Eckert J., Niemann H., (1998), *Mol. Hum. Reprod.*, 4(10), 957-965.
68. Madeja Z., (2005), rozprawa doktorska AR, Poznań.