

MAREK MALESZEWSKI

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii,

Uniwersytet Warszawski

Krakowskie Przedmieście 26/28,

00-927 Warszawa

E-mail: embryo@plearn.edu.pl

ZASTOSOWANIE METOD WSPOMAGANEGO ZAPŁODNIENIA W BADANIACH ROZRODU SSAKÓW

ZAPŁODNIENIE: POCZĄTEK ROZWOJU

Większość zwierząt, a pośród nich wszystkie strunowce, rozmnaża się na drodze płciowej. Oznacza to, że u organizmów tych zachodzą jednocześnie dwa zjawiska: rozmnażanie, czyli tworzenie się osobników następnej generacji i proces płciowy, czyli połączenie genomów pochodzących z dwóch osobników rodzicielskich, dające nową kombinację genów u osobnika potomnego. U początku rozwoju osobniczego każdego organizmu rozmnażającego się płciowo zachodzi zjawisko nazywane zapłodnieniem. Zapłodnienie rozpoczyna się wtedy, gdy komórka jajowa i plemnik wchodzi w kontakt ze sobą, a kończy się w chwili połączenia i wymieszania się materiału genetycznego pochodzącego od obojga rodziców. W trakcie zapłodnienia uczestniczące w nim dwie wyspecjalizowane komórki, gamety, łączą się i tworzą totipotencjalną zygotę. Ta nowa komórka będzie w stanie wytworzyć cały organizm z jego wszystkimi zróżnicowanymi liniami komórkowymi tworzącymi tkanki i narządy. Zachodzi to dzięki procesom rozwojowym, które są inicjowane w trakcie zapłodnienia. Zapłodnienie jest tym okresem w cyklu życiowym organizmu, w czasie którego realizowane są „cele” rozmnażania płciowego. Zarodek osobnika następnej generacji to powstająca w trakcie zapłodnienia zygota. W konsekwencji zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik

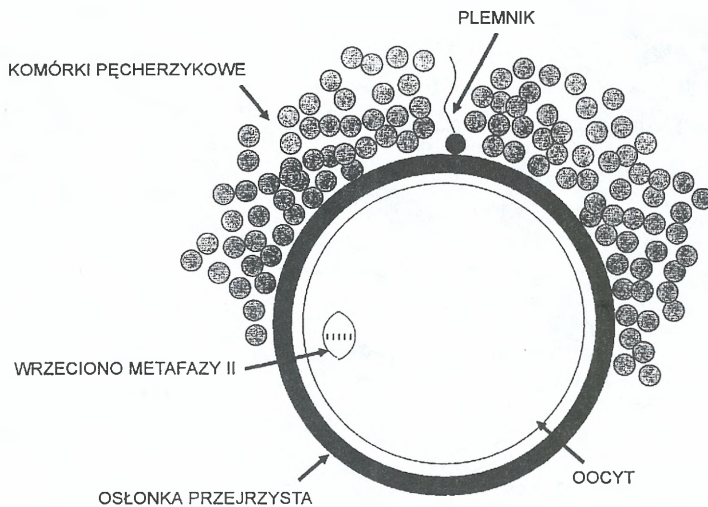
w zygocie zostaje odtworzona diploidalna liczba chromosomów. Fuzja gamet inicjuje aktywację komórki jajowej, niezbędną dla rozpoczęcia rozwoju zarodka.

W trakcie zapłodnienia, zanim dojdzie do połączenia plemnika z komórką jajową, plemnik musi pokonać szereg barier (ryc. 1). Owulowany oocyt ssaków zablokowany jest w metafazie II podziału meiotycznego. Jest on otoczony kilkoma warstwami komórek pochodzących z pęcherzyka jajnikowego; są to tzw. komórki pęcherzykowe. Plemnik musi przejść pomiędzy komórkami pęcherzykowymi, aby wejść w kontakt z glikoproteinową osłonką przejrzystą, która bezpośrednio otacza oocyt. Plemnik następnie wiąże się z osłonką przejrzystą i w wyniku tego wiązania zachodzą w nim zmiany, określane mianem reakcji akrosomowej, które umożliwiają przejście plemnika przez osłonkę przejrzystą. Dopiero po pokonaniu osłonki przejrzystej plemnik może związać się z błoną komórkową oocyta (oolemma). Kolejnym etapem zapłodnienia jest fuzja błon komórkowych plemnika i oocyta. Wniknięcie plemnika do oocyta powoduje dokończenie mejozy, wyrażające się zniesieniem bloku metafazowego i wyrzuceniem tak zwanego drugiego ciała kierunkowego — zapłodnione jajo przechodzi wtedy do pierwszej interfazy zygotycznej.

TECHNIKI MIKROCHIRURGICZNE WSPOMAGAJĄCE ZAPŁODNIENIE

W ciągu ostatnich lat nasza wiedza na temat zapłodnienia znacznie się rozszerzyła (YANAGI-

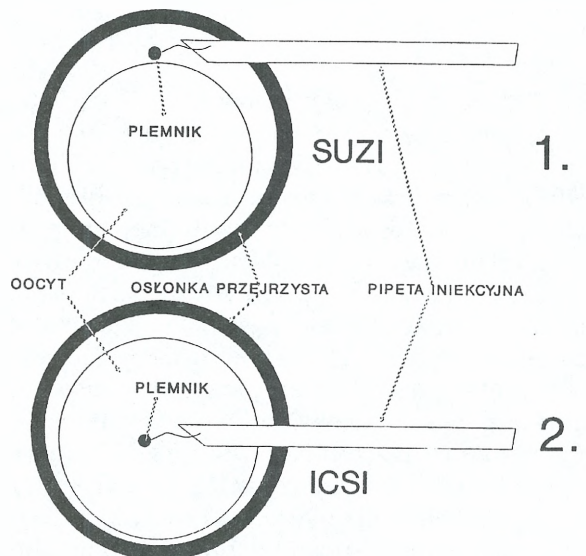
MACHI 1994). Duży udział mają w tym badania wykorzystujące techniki mikrochirurgiczne.



Ryc. 1. W trakcie zapłodnienia plemnik musi pokonać szereg barier zanim połączy się z komórką jajową. Na schemacie przedstawiono ten etap zapłodnienia, w którym plemnik po przejściu przez kilka warstw komórek pęcherzykowych został związany na powierzchni osłonki przejrzystej. Dopiero po przejściu przez osłonkę przejrzystą plemnik może połączyć się z oocytem. W wyniku fuzji gamet oocyt zostanie uwolniony z bloku metafazowego i po zakończeniu mejozy przejdzie do interfazy zygotycznej.

Doświadczenia te są wykonywane szklanymi mikropipetami poruszającymi przy pomocy manipulatorów zainstalowanych do mikroskopu. Dzięki tej technice możliwe jest między innymi przeprowadzanie mikrochirurgicznego zapłodnienia *in vitro* komórek jajowych. W trakcie doświadczeń tego typu zapłodnienie zachodzi z pominięciem samodzielnego przechodzenia plemnika przez bariery takie jak, osłonka przejrzysta otaczająca komórkę jajową i błona komórkowa (oolemma) jaja. Warto podkreślić, że prace te przynoszą nam nie tylko korzyści poznawcze: w oparciu o nie opracowano szereg technik mających znaczenie w leczeniu bezpłodności u ludzi.

W ostatnich latach wiele par mających problemy związane z zaburzeniami funkcji rozrodczych doczekało się własnych dzieci dzięki technologii zapłodnienia *in vitro*. Rutynowa procedura zapłodnienia *in vitro* sprawdza się w bardzo licznych, ale jednak nie wszystkich przypadkach bezpłodności. Zawiesić może na przykład wtedy, gdy plemniki pacjenta są nieliczne lub defektywne w taki sposób, że nie mogą same przejść przez osłonkę przejrzystą jaja. W takiej sytuacji mogą przyjść z pomocą techniki mikrochirurgiczne pozwalające na wstrzyknięcie plemnika pod osłonkę przejrzystą jaja (technika SUZI od ang. subzonal sperm injection, ryc.2.1) lub bezpośrednio do cytoplazmy jaja (ICSI, intracytoplasmic sperm injection, ryc. 2.2). W swoim artykule chciałbym skoncentrować się przede wszystkim na tym, co stosowanie



Ryc. 2. 1 – Wstrzykiwanie plemników pod osłonkę przejrzystą oocyta — SUZI (ang. subzonal sperm injection); 2 — Wstrzykiwanie plemników do cytoplazmy oocyta — ICSI (ang. intracytoplasmic sperm injection).

technik wspomaganego zapłodnienia wniosło do naszej wiedzy na temat biologii rozrodu ssaków. Wszędzie, gdzie opisywane doświadczenia mają również zastosowanie kliniczne, zostanie to podkreślone.

MIKROINIEKCJE DO JAJ CHOMIKA W BADANIACH NAD TRANSFORMACJĄ PLEMNIKA

Pierwsze doświadczenia polegające na mechanicznym wprowadzaniu plemnika do cytoplazmy oocyta przeprowadzone zostały przez

UEHARĘ I YANAGIMACHIEGO (1976). Wstrzykiwali oni plemniki do oocytów chomika i wykazali, że jądro plemnika, wprowadzone w ten sposób do

cytoplazmy komórki jajowej, ulega przekształceniu w normalne przedjądrze męskie. Jednym z pierwszych etapów przekształcenia plemnika, zarówno w czasie normalnego zapłodnienia, jak i po wstrzyknięciu plemnika do cytoplazmy komórki jajowej, jest dekondensacja chromatyny jego jądra. Technika mikroiniekcji plemników do oocytów chomika pozwoliła na badanie biochemicznych mechanizmów transformacji ich jąder w przedjądrze męskie. W doświadczeniach wykorzystujących tę metodę ZIRKIN i wsp.

(1985) wstrzykiwali do cytoplazmy oocyty plemniki, w których wcześniej *in vitro* zredukowano wiązania dwusiarczkowe (S-S) stabilizujące chromatynę. Plemniki takie dekondensowały po wstrzyknięciu do cytoplazmy oocyty szybciej niż plemniki kontrolne. Dowodzi to, że jednym z czynników kontrolujących dekondensację chromatyny plemnika w trakcie zapłodnienia jest aktywność cytoplazmy oocyty odpowiedzialna za redukcję wiązań S-S w jądrze plemnika.

TECHNIKA ICSI ZASTOSOWANA DO JAJ MYSZY UMOŻLIWIA BADANIA NAD ROZWOJEM

Doświadczenia wykorzystujące metodę polegającą na mikroiniekcji plemników do oocytów chomika dostarczyły wielu informacji na temat oddziaływań jądro-cytoplazmatycznych w trakcie zapłodnienia. Było to możliwe dlatego, że wstrzykiwanie plemników u tego gatunku jest względnie łatwe, a zastosowanie indukowanej superowulacji pozwala na uzyskiwanie dużej liczby oocytów. Rozwój *in vitro* zarodków chomika poza stadium 2-komórkowe zachodzi jednak z dużymi trudnościami. Obiekt ten nie jest więc szczególnie dogodny do badań nad potencjałem rozwojowym zarodków uzyskiwanych przez ICSI. Powstała więc konieczność prowadzenia doświadczeń, które pozwoliłyby na modelu zwierzęcym badać efekty mikrochirurgicznego zapłodnienia na rozwój zarodka. Chciano też zbadać czy występują jakieś efekty stosowania tej techniki zapłodnienia pozaustrojowego w pourodzeniowym okresie życia organizmów, które rozwinęły się z zarodków powstałych w wyniku iniekcji plemników. Wydarzeniem, które tak pobudziło rozwój badań nad zapłodnieniem mikrochirurgicznym było urodzenie się pierwszych dzieci w następstwie zastosowania ICSI dla przezwyciężenia niepłodności u ludzi (PALERMO i współaut. 1992). Okazało się, że wstrzykiwanie plemników do oocytów ludzkich przeprowadzać można przy pomocy tej samej techniki, jaka była stosowana dla mikrochirurgicznego wprowadzania plemników do oocytów chomika. Od tej pory technika ICSI stała się metodą wspomagania zapłodnienia, która jest stosowana powszechnie w wielu ośrodkach na świecie, w tym także i w Polsce. W trakcie prac nad zapłodnieniem *in vitro* u ludzi, prowadzonych z wykorzystaniem tej techniki, dokonano szeregu obserwacji poszerzających wiedzę na temat procesów inicjujących rozwój zarodkowy człowieka. Jest jednak wiele eksperymentów, których nie można wykonywać z wykorzystaniem materiału ludzkiego. Wynika to zarówno z przyczyn technicznych, jak i z

oczywistych powodów etycznych. Najlepszym modelem dla badań nad ICSI wydaje się być mysz. Za zastosowaniem tego gatunku przemawia krótki czas osiągnięcia zdolności do rozrodu przez osobniki kolejnej generacji (kilka tygodni) oraz fakt, że wśród ssaków żaden inny gatunek (poza człowiekiem) nie jest tak dobrze poznany pod względem biologii rozrodu i genetyki. Są również opracowane względnie proste metody pozwalające na hodowlę *in vitro* zarodków myszy od stadium zapłodnionej komórki jajowej aż do blastocysty. Umiemy także wprowadzać zarodki poddane manipulacjom *in vitro* z powrotem do dróg rodnych samicy. Przeniesione zarodki z dużą wydajnością implantują się w macicy samicy-biorkownicy i następnie przechodzą pełny rozwój aż do urodzenia. Niestety, próby zastosowania ICSI do oocytów myszy przez długi czas kończyły się niepowodzeniem. Wstrzyknięcie plemnika przy zastosowaniu standardowej metody, w której jest on wprowadzany do cytoplazmy jaja przy pomocy poruszanej ręcznie pipety szklanej (tak jak się to robi w czasie ICSI u chomika i u ludzi), okazało się u myszy bardzo trudne. Przeszkodą była tu wielka plastyczność błony komórkowej oocyty myszy, uniemożliwiająca przebicie jej pipetą, która w ten sposób nie mogła być wprowadzona do cytoplazmy. Jeżeli w wyniku bardzo energicznego manipulowania pipetą udawało się czasem przebić oolemmę jaja, to i tak najczęściej obumierało ono wkrótce potem w wyniku wycieku cytoplazmy przez otwór pozostający w błonie komórkowej po wycofaniu pipety. Problemy te zostały przezwyciężone dopiero niedawno, gdy Kimura i Yanagimachi z Uniwersytetu Hawajskiego w Honolulu zastosowali manipulator, w którym ruch postępowy pipety służącej do wprowadzania plemnika kontrolowany jest przy pomocy urządzenia piezoelektrycznego (KIMURA i YANAGIMACHI 1995a). Mikroiniektor piezoelektryczny przy skoku pipety rzędu 1 µm nadaje jej prędkość do 100 mm/sek., co pozwala na

przebicie błony komórkowej oocyty myszy. Zastosowano także obniżenie temperatury, w której jest przeprowadzana mikrochirurgia, do ok. 17–18°C, co ułatwia „gojenie się” oolemmy i znacznie zwiększa częstość przeżywania oocytów poddanych ICSI. Oocyty myszy zapładniane

w ten sposób rozpoczynały rozwój *in vitro*, a po przeszczepieniu do macicy matki zastępczej przechodziły pełny rozwój aż do urodzenia. Noworodki myszy powstałe w wyniku ICSI rozwinęły się następnie w normalne i płodne osobniki dorosłe.

CZY OPRÓCZ JĄDRA PLEMNIKA ZYGOTA POTRZEBUJE DLA ROZWOJU INNYCH JEGO SKŁADNIKÓW?

Gamety męskie (plemniki) różnią się od gamet żeńskich tym, że w czasie ich powstawania podział mejotyczny, a zatem i redukcja liczby chromosomów do poziomu haploidalnego poprzedza różnicowanie komórkowe. W trakcie różnicowania męskie komórki rozrodcze przechodzą przez cały szereg intensywnych zmian postmejotycznych, które prowadzą do przekształcenia haploidalnej spermatydy w zdolny do zapłodnienia plemnik (patrz artykuł przeglądowy: YANAGIMACHI 1994). Zmiany te obejmują przebudowę jądra komórkowego spermatydy w sposób, który umożliwia osiągnięcie bardzo gęstego upakowania chromosomów w główce plemnika. Zachodzi to dzięki zmianie struktury chromatyny komórki rozrodczej w czasie spermiogenezy: procesu zachodzącego po zakończeniu mejozy. W trakcie spermiogenezy białka histonowe budujące chromosomy spermatydy zostają wymienione na białka bardziej zasadowe zwane protaminami. Dzięki swym właściwościom protaminy pozwalają na gęściejsze upakowanie materiału genetycznego w jądrze komórkowym główki plemnika. W czasie spermiogenezy powstaje również witka plemnika, która umożliwia mu poruszanie się, oraz akrosom zawierający enzymy niezbędne dla skutecznego zapłodnienia. Plemnik opuszczający gonadę, choć morfologicznie w pełni ukształtowany, ciągle nie jest jeszcze zdolny do udziału w zapłodnieniu. Okazuje się, że konieczne są dalsze modyfikacje, takie jak stabilizacja chromatyny w jądrze plemnika poprzez powstawanie wiązań dwusiarczkowych i nabranie przez plemnik zdolności do ruchu. Obie te przemiany zachodzą w czasie, gdy plemnik przebywa w najądrzu. Dopiero dzięki tym modyfikacjom, uzupełnionym jeszcze przez tak zwaną kapacytację w drogach rodnych samicy, plemnik staje się zdolny do fuzji z komórką jajową. Natura postmejotycznej przebudowy męskich komórek rozrodczych jest od wielu lat obiektem intensywnych badań. Osobne zagadnienie stanowi jednak pytanie o znaczenie zmian zachodzących w czasie spermiogenezy i dojrzewania plemnika. Nie ulega wątpliwości, że haploidalne jądro plemnika jest tym elementem, który jest niezbędny

dla rozwoju zygoty. Pozostaje jednak pytanie, czy także jakieś inne niż jądro składniki gamety męskiej, które są przez nią wnoszone do komórki jajowej w trakcie zapłodnienia, mają znaczenie dla rozwoju zarodka. Jeżeli nie, to znaczy, że zmiany postmejotyczne zachodzące w męskich komórkach rozrodczych mają tylko umożliwić zapłodnienie i nie są istotne w późniejszych etapach rozwoju zygoty. Może być to prawdą również w przypadku modyfikacji budowy jądra komórkowego plemnika, która też może być potrzebna tylko dla ułatwienia dostarczenia genomu ojcowskiego do cytoplazmy jaja. Z powyższym problemem łączy się pytanie o żywotność plemnika. Czy jego śmierć jako komórki („śmierć cytologiczna”) jest zawsze jednoznaczna z utratą przez genom zdolności do uczestniczenia w rozwoju zarodka („śmierć genetyczna”)? Na oba przedstawione powyżej pytania można starać się odpowiedzieć badając rozwój zarodka, powstałego w następstwie mikrochirurgicznego wprowadzania do oocyty izolowanych jąder plemników lub całych „martwych” gamet męskich. Wstrzykiwanie plemników do oocytów myszy z użyciem iniektora piezoelektrycznego zastosowano do wyjaśnienia, czy plemniki martwe jako komórki, mogą służyć do zapłodnienia przez ICSI. W trakcie rutynowego postępowania przy stosowaniu ICSI u ludzi najczęściej wybiera się poruszające się plemniki, które są następnie unieruchamiane. Dokonuje się tego na przykład przez przyciśnięcie pipetą witki plemnika do dna szalki. Imobilizacja następuje prawdopodobnie w wyniku uszkodzenia błony komórkowej plemnika. Niektórzy autorzy uważają, że unieruchomienie plemników przed wstrzyknięciem zwiększa częstość zapłodnienia przez ICSI (DOZORTSEV i współaut. 1995). Jednocześnie pojawiły się doniesienia, że zaobserwowano znaczny spadek wydajności zapłodnienia w wyniku ICSI plemników „zabitych” na przykład przez zamrażanie (HOSHI i współaut. 1995). Rozstrzygnięcie tego problemu i wyjaśnienie, jak stan plemników wpływa na wydajność ICSI, ma zasadnicze znaczenie przy stosowaniu tej metody dla leczenia bezpłodności u ludzi. W celu stwierdzenia czy plemniki

muszą być nienaruszone i żywe, jeżeli mają być użyte do ICSI, KURETAKE i współaut. (1996a) wstrzykiwali do cytoplazmy oocytów myszy plemniki uszkodzane w różny sposób. Wstrzykiwano plemniki zamrażane w warunkach uniemożliwiających zachowanie integralności ich cytoplazmy, a także izolowane jądra plemników, uzyskiwane z główek oddzielanych od witek przez poddanie plemników działaniu ultradźwięków. Tak traktowane plemniki nie są zdolne do normalnego zapłodnienia. Okazało się jednak, że po wstrzyknięciu do oocyta, zarówno uszkodzone plemniki, jak i izolowane jądra plemników są w stanie uczestniczyć

w pełnym rozwoju aż do urodzenia. Oznacza to, że plemniki używane do ICSI mogą być uszkodzone i że, przynajmniej u myszy, takie składniki plemnika jak błona komórkowa, akrosom czy witka nie są konieczne dla normalnego rozwoju. Tak więc, śmierć plemnika jako komórki nie musi oznaczać, że jego genom utracił zdolność do uczestniczenia w rozwoju. Okazuje się także, że warunki zamrażania plemników wystarczające dla zachowania integralności ich materiału genetycznego są mniej ścisłe niż te, które są wymagane dla zachowania zamrożonych plemników przy życiu.

PLEMNIKI NORMALNIE NIEZDOLNE DO ZAPŁODNIENIA MOGĄ UCZESTNICZYĆ W ROZWOJU, GDY SĄ WSTRZYKNIĘTE DO OOCYTU

Niepłodność może mieć różne przyczyny. U myszy znamy sytuacje, w których związana jest ona z występowaniem określonej wady genetycznej. Na przykład samce myszy niosące dwa komplementarne haplotypy (allele) tak zwanego kompleksu t (t^x/t^y) zlokalizowanego na chromosomie 17 są sterylne. Ich plemniki mają typowy wygląd, są jednak niezdolne do ruchu i w rezultacie nie mogą uczestniczyć w normalnym zapłodnieniu (OLDS 1971). Myszy te mogą być przykładem sytuacji, w której czynniki genetyczne odpowiedzialne są za niepłodność. Zastosowanie ICSI pozwala stwierdzić, czy w wyniku wady genetycznej upośledzone są tylko funkcje plemników związane z zapłodnieniem, czy też wpływa ona także na późniejsze procesy rozwojowe. Okazuje się, że niepłodność myszy t^x/t^y może być przezwyciężona przez ICSI (KURETAKE i współaut. 1996b). Technika ICSI omija oddziaływanie gamet w czasie zapłodnienia, zaś zarodki powstałe po wstrzyknięciu do oocytów ple-

mników pochodzących od samców t^x/t^y rozwijały się normalnie. W ten sposób pokazano, że niepłodność osobników noszących przynajmniej niektóre wady genetyczne upośledzające udział plemników w zapłodnieniu mogą być przezwyciężone dzięki ICSI.

Do cytoplazmy oocyta wstrzykiwano także plemniki pochodzące ze szczepu myszy, w którym samce odznaczają się wytwarzaniem zdeformowanych plemników. Stwierdzono, że normalny rozwój aż do urodzenia, przechodzić mogą zarodki powstałe w wyniku ICSI takich nie-normalnych plemników (BURRUEL i współaut. 1996). Oznacza to, że analiza morfologii plemników nie dostarcza absolutnych podstaw dla określenia genetycznej normalności lub nienormalności gamet męskich. Ma to znaczenie przy ustalaniu płodności tych ludzi, w których jądrach wytwarzane są wyłącznie lub prawie wyłącznie plemniki o zaburzonej morfologii.

ZAPŁODNIENIE BEZ UDZIAŁU PLEMNIKA

Zadaniem plemnika jest zapłodnienie dojrzałej komórki jajowej i do tego jest on przygotowywany poprzez liczne zmiany strukturalne i biochemiczne, którym podlegają męskie komórki rozrodcze. Zmiany te zachodzą zarówno w czasie spermiogenezy w jądrze, jak i w czasie dojrzewania w najądrzu i w czasie kapacytacji w żeńskich drogach rozrodczych. Spermatydy to haploidalne komórki, które zakończyły podział mejotyczny. Występują one w kanalikach nasiennych jąder, ze spermatyd w trakcie spermiogenezy powstają plemniki. Wyizolowane spermatydy nie są zdolne do zapłodnienia, wykazano jednak, że mogą zastąpić plemnik, gdy zostaną wprowadzone do oocyta na drodze fuzji

komórkowej, to jest indukowanego polem elektrycznym połączenia dwóch komórek w jedną komórkę hybrydową. Stwierdzono bowiem, że normalne myszy mogą urodzić się po przetransplantowaniu tak uzyskanych zarodków do jajowodów samic-biorczyń (OGURA i YANAGIMACHI 1995). Jednakże doświadczenia z fuzjami spermatyd i oocytów myszy względnie rzadko kończyły się sukcesem ze względu na niską wydajność samej fuzji. Z pomocą przyszła tu technika mikrochirurgiczna. Zastosowano bezpośrednio wstrzykiwanie jąder spermatyd do komórki jajowej i uzyskano tą drogą liczne zarodki myszy, które mogły przechodzić pełny rozwój aż do urodzenia (KIMURA i YANAGIMACHI 1995b). Ple-

mnik wstrzyknięty do oocyty aktywuje go, czyli pobudza do rozwoju tak, jak dzieje się to w czasie normalnego zapłodnienia. Okazało się, że jądra spermatyd nie zawierają czynnika aktywującego i oocyty, do których są one wstrzykiwane, muszą być poddane sztucznej aktywacji. We wymienionej pracy oocyty aktywowano przez poddanie ich działaniu pola elektrycznego. W kolejnym doświadczeniu tego typu jako dawców jąder zastosowano spermatocyty drugorzędowe, czyli komórki spermatogeniczne wcześniejsze od spermatyd (KIMURA i YANAGIMACHI 1995c). Spermatocyty drugorzędowe mają za sobą tylko pierwszy podział mejotyczny i zawierają haploidalny zestaw dwuchromatydowych chromosomów. W wyniku drugiego podziału mejotycznego każdy spermatocyt dzieli się na dwie spermatydy, zawierające haploidalne zestawy jednochromatydowych chromosomów. Normalnie podział ten zachodzi w czasie spermatogenezy w kanalikach nasiennych. Okazało się jednak, że jądro spermatocytu drugorzędowego myszy może przejść ten podział także w cytoplazmie sztucznie aktywowanego oocyty. Po wstrzyknięciu jądra spermatocytu do oocyty i po jego sztucznej aktywacji oocyt wyrzuca drugie ciało kierunkowe tak, jak dzieje się to w czasie normalnego zapłodnienia. Równocześnie dokończenie mejozy zachodzi w jądrze spermatocytu, czego wyrazem jest wyrzucenie dodatkowego ciała kierunkowego, w którym zawarty jest jeden z haploidalnych zestawów chromosomów powstałych po podziale spermatocytu. W rezultacie powstaje diploidalna zygota, która może przejść pełen rozwój aż do urodzenia normalnego potomstwa.

Wyniki opisanych powyżej doświadczeń odgrywają dużą rolę w poznaniu jednego z najbardziej interesujących zjawisk zachodzących w czasie rozwoju ssaków. Zjawiskiem tym jest tak zwany imprinting genetyczny. Zaobserwowano, że gdy bada się aktywność niektórych genów w zarodku ssaka, to stwierdza się, że aktywne są tylko allele otrzymane od jednego z rodziców (BARLOW 1994). Oznacza to, że mamy do czynienia z odstępstwem od mendlowskich praw dziedziczenia, które zakładają pełną równocennność obu alleli danego genu w organizmie

diploidalnym. Zjawisko to nosi nazwę imprintingu, gdyż wynika z niego konieczność naznaczenia (imprintowania) niektórych genów jako takich, które przeszły gametogenezę męską lub żeńską. Oznacza to, że pewne geny na chromosomach odziedziczonych od matki i od ojca są w komórkach danego osobnika odmiennie naznaczone (imprintowane). Jednak w którymś momencie gametogenezy oryginalny imprinting musi ulegać zatarciu, a w jego miejsce nanoszony jest imprinting charakterystyczny dla płci danego osobnika. W rezultacie chromosomy plemnika uzyskują męski, a chromosomy oocyty żeński wzór imprintingu. Nanoszenie nowego wzoru imprintingu odbywa się w czasie gametogenezy, jednak dokładny moment zachodzenia tego zjawiska nie jest znany. Próba ustalenia tego, kiedy ma miejsce wytworzenie imprintingu w czasie rozwoju gamet męskich może być przeprowadzana przy pomocy technik mikrochirurgicznych. Jeżeli oocyt, który „zapłodniono” przez wstrzyknięcie jądra pobranego z komórki spermatogenicznej (np. spermatydy), jest w stanie przejść pełen rozwój aż do urodzenia, to oznacza, że w jądrze komórki dawcy zakończony już był imprinting charakterystyczny dla gametogenezy męskiej.

Opisane powyżej doświadczenia wykazują, że jądra spermatyd i spermatocytów drugorzędowych mogą zastąpić jądro plemnika, jeżeli zapłodnienie dokonywane jest przy użyciu techniki mikrochirurgicznej. Oznacza to, że wszystkie modyfikacje postmeiotyczne, zachodzące w czasie spermatogenezy, konieczne są tylko dla oddziaływania gamet w czasie zapłodnienia i nie odgrywają roli w rozwoju zarodka. Także imprinting chromosomów gamety męskiej jest prawdopodobnie zakończony w stadium spermatocytu drugorzędowego. Należy dodać także, że wstrzykiwanie spermatyd jest już stosowane jako metoda leczenia niepłodności u tych mężczyzn, u których nie udaje się znaleźć plemników nadających się do ICSI. Doniesiono już o ciążach, które zakończyły się szczęśliwym porodem u kobiet, którym wszczepiono zarodki powstałe w wyniku mikrochirurgicznego wstrzyknięcia spermatyd do pobranych oocytów (TESARIK i współaut. 1996).

NOWE METODY ZASTOSOWANE DO BADAŃ NAD PRZEKSZTAŁCENIAMI PLEMNIKA, AKTYWACJĄ OOCYTU I BLOKIEM PRZECIWKO POLISPERMII

Metody mikrochirurgiczne otwierają także nowe możliwości przed badaniami nad mechanizmami zapłodnienia u ssaków. Wspomniane już tu były doświadczenia nad tempem przekształcania się plemnika w przedjądrze męskie

w zależności od stanu jego chromatyny. Ostatnio obserwacje te zostały poszerzone dzięki połączeniu technik otrzymywania zwierząt transgenicznym z techniką ICSI. Uzyskano myszy transgeniczne, które miały wbudowany gen ko-

dujący protaminę (białko chromatyny plemnika) kury. Samce tych myszy produkują plemniki zawierające obce białko, różniące się właściwościami od protamin myszy (RHIM i współaut. 1995). Dzięki zastosowaniu mikroiniekcji zbadano zależność tempa przekształcania się tych plemników w przedjądrze męskie od budowy ich chromatyny (MALESZEWSKI i współaut. 1998). Wykazano między innymi, że plemniki, które ze względu na zaburzoną budowę chromatyny nie mogą samodzielnie zapładniać oocytów, mogą normalnie przekształcać się po wstrzyknięciu do cytoplazmy komórki jajowej.

Mikroiniekcja umożliwia też nowe podejście do innych kluczowych zjawisk zachodzących w trakcie zapłodnienia. Jednym z nich jest aktywacja oocytu przez wnikaający plemnik. Powszechnie akceptowany jest pogląd, że czynnikiem aktywującym oocyt w trakcie zapłodnienia jest wzrost stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Bez precyzyjnej odpowiedzi pozostaje jednak pytanie, jak plemnik indukuje uwalnianie jonów Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy. Jedną z hipotez zakłada, że za aktywację oocytu odpowiedzialne są receptory błony komórkowej, z którymi wiązałyby się plemniki w momencie zetknięcia się obu gamet. Drugą hipotezę przyjmuje, że plemnik wnosi do cytoplazmy oocytu czynnik, który powoduje aktywację komórki jajowej. W trakcie zapłodnienia przez ICSI pominięty jest, zachodzący w trakcie fizjologicznego zapłodnienia, kontakt plemnika z błoną komórkową oocytu. Mimo tego, po bezpośrednim wstrzyknięciu plemnika do cytoplazmy następuje normalna aktywacja oocytu, której towarzyszą zmiany stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Kinetyka tych zmian przypomina te, jakie towarzyszą normalnemu zapłodnieniu (TESARIK i współaut. 1994). Tak więc doświadczenia wykorzystujące technikę ICSI potwierdzają hipotezę plemnikowego czynnika aktywującego, wnoszonego w czasie zapłodnienia do cytoplazmy oocytu przez gametę męską (PARRINGTON i współaut. 1996). Czynniki te są obecne w plemnikach myszy zarówno pobranych z najądra jak i z kanalików nasiennych jąder, gdyż i jedno, i drugie aktywują oocyty po wstrzyknięciu do cytoplazmy (KIMURA i YANAGIMACHI 1995a, b). Wydaje się, że brak go w spermatydach i spermato cytach, ponieważ jest potrzebna dodatkowa sztuczna aktywacja oocytu, żeby po ich wstrzyknięciu rozpoczął się rozwój zarodka (KIMURA i YANAGIMACHI 1995b, c).

W trakcie zapłodnienia uruchamiane są mechanizmy chroniące zygotę przed polispermia,

czyli wniknięciem więcej niż jednego plemnika. Mechanizm bloku przeciwko polispermii najlepiej jest zbadany u myszy. Zasadniczy blok uruchamiany jest w trakcie aktywacji oocytu i w jego wyniku osłonka przejrzysta zapłodnionego jaja staje się nieprzepuszczalna dla dodatkowych plemników w rezultacie tak zwanej reakcji korowej oocytu. Zachodzi to dzięki temu, że po aktywacji uwalniane są enzymy z ziaren korowych, zlokalizowanych pod błoną komórkową oocytu. Enzymy te modyfikują osłonkę przejrzystą tak, że nie jest ona w stanie wiązać plemników na swej powierzchni. Wkrótce potem błona komórkowa oocytu traci zdolność do fuzji z plemnikami. Stwierdzono, że utrata przez oolemmę zdolności do fuzji z dodatkowymi plemnikami nie pojawia się w oocytach zapładnianych przez ICSI. MALESZEWSKI i współaut. (1996) stwierdzili, że w przeciwieństwie do zarodków powstałych w wyniku normalnego zapłodnienia, pozbawione osłonki przejrzystej zarodki myszy powstałe w wyniku ICSI mogą być penetrowane przez dodatkowe plemniki. Sugeruje to, że blok przeciwko fuzjom z plemnikami rozwija się w oocytach myszy nie wskutek ich aktywacji, ale po fuzji błon komórkowych gamet. Obserwacja ta jest istotna ze względów praktycznych, gdyż mimo, że w oocytach zapładnianych przez ICSI osłonka przejrzysta ulega modyfikacjom w rezultacie reakcji korowej, to nie stanowi ona skutecznej bariery dla plemników. W czasie wstrzykiwania plemnika zostaje ona bowiem uszkodzona, tak że zapłodnione przez ICSI komórki jajowe mogą być spenetrowane ponownie, jeżeli zostaną wystawione na działanie plemników.

Podsumowując, stwierdzić można, że techniki wspomaganego zapłodnienia takie jak ICSI, mają szersze znaczenie niż to, które wynika z ich zastosowania klinicznego dla leczenia niepłodności. Możliwość mechanicznego wprowadzania plemników, a także jąder innych komórek (np. spermatyd) do cytoplazmy oocytu otwiera szereg nowych perspektyw przed badaniami nad fizjologią zapłodnienia oraz nad mechanizmami rozwojowymi. Przedstawione w tym przeglądzie doświadczenia są tylko wybraną częścią prac wykorzystujących te techniki. Opisane metody mikrochirurgii dopiero zaczynają być powszechnie stosowane w badaniach nad rozrodem ssaków. Należy się spodziewać, że w najbliższej przyszłości zostaną one zastosowane do rozwiązywania coraz to nowych problemów biologii rozrodu i rozwoju.

TECHNIQUES OF ASSISTED FERTILIZATION IN MAMMALS

Summary

Recent development of the techniques of assisted fertilization has a great impact on our knowledge of the mechanisms of this process in mammals. Intracytoplasmic sperm injection technique (ICSI) was developed to assist fertilization of oocytes by sperm from subfertile men. In animal models like hamster and mouse ICSI has proved to be a useful tool to study various aspects of fertilization and early development, such as sperm decondensation, oocyte activation or mechanisms of the oolemma block to sperm penetration. Injection of isolated sperm nuclei into mouse oocytes was used to demonstrate that spermatozoa do not have to be structurally intact and alive for successful

embryo development. It was shown also that infertility of the genetically defective t^x/t^y mouse spermatozoa can be overcome by the ICSI procedure. Isolated nuclei of spermatids or secondary spermatocytes were injected into the mouse oocytes and produced zygotes which developed into normal offspring. This experiment demonstrated that these nuclei can substitute for the nuclei of spermatozoa when injected into oocyte. Thus, it would appear that (1) gametic imprinting in mouse spermatogenic cells is complete before the spermatogenesis is finished, and (2) post-meiotic modifications of male gametes are not important for embryo development.

LITERATURA

- BARLOW D. P., 1994. *Imprinting: a gamete's point of view*. Trends Genet. 10, 194-199.
- BURRUEL V. R., YANAGIMACHI R., WHITTEN W. K., 1996. *Normal mice develop from oocytes injected with spermatozoa with grossly misshapen heads*. Biol. Reprod. 55, 709-714.
- DOZORTSEV D., RYBOUCHKIN A., DE SUTTER P., DHONT M., 1995. *Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation*. Hum. Reprod. 10, 2960-2964.
- HOSHI K., YANAGIDA K., YAZAWA H., KATAYOSE H., SATO A., 1995. *Intracytoplasmic injection using immobilized or motile spermatozoa*. Fertil. Steril. 63, 1241-1245.
- KIMURA Y., YANAGIMACHI R., 1995a. *Intracytoplasmic sperm injection in the mouse*. Biol. Reprod. 52, 709-720.
- KIMURA Y., YANAGIMACHI R., 1995b. *Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring*. Development. 121, 2397-2405.
- KIMURA Y., YANAGIMACHI R., 1995c. *Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei*. Biol. Reprod. 53, 855-862.
- KURETAKE S., KIMURA Y., HOSHI K., YANAGIMACHI R., 1996a. *Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads*. Biol. Reprod. 55, 789-795.
- KURETAKE S., MALESZEWSKI M., TOKUMASU A., FUJIMOTO H., YANAGIMACHI R., 1996b. *Inadequate function of sterile t^{w5}/t^{w32} spermatozoa overcome by intracytoplasmic sperm injection*. Mol. Reprod. Dev., 44, 230-233.
- MALESZEWSKI M., KIMURA Y., YANAGIMACHI R., 1996. *Sperm membrane incorporation into oolemma contributes to oolemma block to sperm penetration: evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse*. Mol. Reprod. Dev. 44, 256-259.
- MALESZEWSKI M., KURETAKE S., EVENSON D., YANAGIMACHI H., BJORDAHL J., YANAGIMACHI R., 1998. *Behavior of transgenic mouse spermatozoa with galline protamine*. Biol. Reprod. 58, 8-14.
- OGURA A., YANAGIMACHI R., 1995. *Spermatids as male gametes*. Reprod. Fert. Dev. 7, 155-159.
- OLDS P. J., 1971. *Effects of T locus on fertilization in the house mouse*. J. Exp. Zool. 177, 417-434.
- PALERMO G., JORIS H., DEVROEY P., VAN STEIRTEGHEM A. C., 1992. *Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into oocyte*. Lancet. 340, 17-18.
- PARRINGTON J., SWANN K., SHEVCHENKO V. I., SESAY A. K., LAI F. A., 1996. *Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein*. Nature. 379, 364-368.
- RHIM J. A., CONNOR W., DIXON W. H., HARENDZA C., EVENSON D., PALMITER R. D., BRINSTER R. L., 1995. *Expression of an avian protamine in transgenic mice disrupts chromatin structure in spermatozoa*. Biol. Reprod. 52, 20-32.
- TESARIK J., SOUSA M., TESTART J., 1994. *Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection*. Hum. Reprod. 9, 511-518.
- TESARIK J., ROLET F., BRAMI Ch., SEDBON E., THOREL J., TIBI Ch., THEBAULT A., 1996. *Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to nonobstructive azoospermia*. Hum. Rep. 11, 780-783.
- UEHARA T., YANAGIMACHI R., 1976. *Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei*. Biol. Reprod. 15, 467-470.
- YANAGIMACHI R., 1994. *Mammalian fertilization*. [W:] KNOBIL E., NEILL J. D., (red.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York, p. p. 189-317.
- ZIRKIN B. R., SOUCEK D. A., CHANG T. S. K., PERREAULT S. D., 1985. *In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation*. Gamete Res. 11, 349-365.