

IN VITRO FERTILISATIE BIJ HET VARKEN

G. Hoflack, B. Mateusen, A. Van Soom, D. Maes, M. Verdonck, A. de Kruif

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
geert.hoflack@rug.ac.be

SAMENVATTING

In het voorgaand artikel werd de techniek van embryo-transplantatie bij het varken uitgebreid behandeld. Het spreekt voor zich dat deze techniek onvoldoende tot zijn recht zou komen indien ze niet gepaard kan gaan met de mogelijkheid de nodige tussenstappen in de ontwikkeling van een embryo in het laboratorium uit te voeren. Vandaar dat we nu iets dieper ingaan op de verschillende stappen die eicellen of embryo's, verzameld bij donorzeugen, in het labo dienen te ondergaan alvorens te transfereren naar receptorzeugen. Achtereenvolgens komen de *in vitro* maturatie, de *in vitro* fertilisatie en de *in vitro* cultuur aan bod.

De bedoeling van dit artikel is een overzicht te geven van de huidige stand van zaken betreffende de *in vitro* productie van varkensembryo's.

INLEIDING

Reeds sinds de jaren zestig is er interesse voor embryo-transplantatie (ET) bij het varken (Hancock en Hovell, 1962). Aangezien het praktisch niet steeds haalbaar is om embryo's na spoelen uit een donorzeug onmiddellijk te transfereren naar een receptorzeug, is het in cultuur houden van embryo's gedurende beperkte tijd, of het invriezen gedurende langere tijd een noodzaak. Dit impliceert dus dat *in vitro* cultuur op punt moet staan.

In een poging om nieuwe reproductieve technologieën te ontwikkelen, collecteert men eicellen bij zeugen (hetzij direct na het slachten van de donor, hetzij bij levende zeugen via "ovum pick-up") die men daarna in het laboratorium alle verdere ontwikkelingsprocessen die zij normaal *in vivo* bij de zeug meemaken, laat doorlopen. Hierbij moeten de gecollecteerde eicellen eerst rijpen (*in vitro* maturatie; IVM), daarna bevrucht worden (*in vitro* fertilisatie; IVF) en tenslotte opgekweekt worden tot een transfereerbaar stadium (*in vitro* cultuur; IVC). Het geheel van handelingen om vertrekkende van verzamelde eicellen tot een transfereerbaar embryo te komen, wordt *in vitro* productie (IVP) genoemd.

Bij de mens, het rund en het schaap staat deze techniek reeds goed op punt. Bij het varken zijn er echter struikelblokken, zoals het viercellenblok en polyspermie, die het op punt stellen van de *in vitro* cultuur afremmen. Deze problemen komen verder in dit overzichtsartikel aan bod.

In de praktijk is er weinig ruimte voor *in vitro* geproduceerde varkensembryo's, omdat varkens van nature hoogproductieve dieren zijn. In het onderzoek daarentegen wil men deze techniek echter zeer graag onder de knie krijgen om meerdere redenen. Ten eerste kan het varken gebruikt worden als orgaandonor voor xenotransplantaten (Veraart, 1999). Daartoe moet men het varken eerst "transgeen" maken, om de kans op afstotingsverschijnselen te reduceren. Bij transgenese wordt een bevruchte eicel genetisch gemanipuleerd, waarbij een paar honderd kopieën van het te transfereren gen in de kern van een bevruchte eicel geïnjecteerd worden, in de hoop dat een aantal kopieën in het genoom geïncorporeerd wordt (Wilmot *et al.*, 1988). Het massaal kunnen aanleveren van bevruchte eicellen is gezien de lage slaagkansen bij transgenese een absolute vereiste. Dit aanmaken van grote aantallen bevruchte eicellen kan het eenvoudigst en goedkoopst gebeuren via de *in vitro* productie.

Ten tweede is er veel interesse in het klonen van transgene varkens, omdat op die manier zeer snel een kern van productiedieren kan aangemaakt worden. Om efficiënt te kunnen klonen heeft men *in vitro* gerijpte eicellen nodig. In die eicellen wordt dan een kern van een transgeen varkensembryo getransplanteerd. Het gekloonde embryo wordt dan nog enkele dagen *in vitro* opgekweekt vooraleer het in een receptorzeug overgeplant wordt. Het spreekt voor zich dat voor dergelijke geavanceerde technologieën IVP bij het varken vereist is. Ethische vragen kunnen daarbij aan de orde komen (Van Ling, 2001), maar het is de be-

doeling in dit overzichtsartikel vooral aandacht te besteden aan de techniek van IVP bij varkensembryo's.

IN VITRO MATURATIE (IVM)

Wanneer men eicellen gaat collecteren spreekt het voor zich dat een aantal daarvan nog niet rijp zal zijn, aangezien meestal alle follikels van een ovarium, dus ook de immature, geoogst worden. Dit impliceert dat die eicellen nog een proces van rijping in het laboratorium, of "in vitro maturatie", dienen te ondergaan, waarbij de kern, het cytoplasma en de membraan van de eicellen matureren alvorens ze bevrucht kunnen worden. De bedoeling hiervan is dat alle gecollecteerde eicellen hierdoor op hetzelfde ontwikkelingsstadium terechtkomen, zodat men gestandaardiseerd uitgangsmateriaal bekomt.

Een eicel ondergaat tijdens de rijping 2 meiotische delingen, waarbij na de eerste deling het eerste poollichaam en de secundaire eicel en na de tweede deling, die pas plaats vindt bij de bevruchting, het tweede poollichaam en het eitje gevormd worden. Dit is de rijping van de kern die na beide delingen een haploid aantal chromosomen bevat. De beide poollichamen gaan uiteindelijk degenereren.

Tijdens de fertilisatie wordt de zaadcel opgenomen door de eicel en gaat het haploïde genetisch materiaal in de kern van de bevruchtende spermacelkop decondenseren - een proces dat alleen mogelijk is als het cytoplasma van de eicel voldoende gerijpt is en voldoende glutathione bevat - en de paternale pronucleus vormen. Deze versmelt met de maternale pronucleus, ontstaan uit de kern van het eitje (syngamie), waar-

door een diploïde nucleus ontstaat. Nu kunnen de mitotische delingen beginnen om de uiteindelijke blastocyst te vormen. Tussen deze delingen is geen rustfase voorzien waardoor de cellen niet kunnen aangroeien en steeds kleiner worden. Het oorspronkelijk volume van de zygote blijft daardoor behouden: men spreekt daarom van opeenvolgende "klevingen" (Alberts *et al.*, 1994).

De eicellen of embryo's

Uit een studie van Bolamba en Sirard (1996) bleek dat het superovuleren van postpuberale gelten resulteerde in meer embryo's dan wanneer prepuberale gelten werden gebruikt. De embryo's gecollecteerd bij de prepuberale gelten ontwikkelden echter beter in vitro. Aangezien de prepuberale dieren bovendien ook goedkoper zijn dan cyclerende gelten, wordt meestal met prepuberale gelten gewerkt.

Om goede resultaten te bekomen bij de maturatie is de kwaliteit van het uitgangsmateriaal, de cumulus-oöcyte complexen, van groot belang (Foto 1 en 2). Bij het collecteren van de eicellen moet men dus steeds proberen een intacte corona radiata en meerdere compacte cellagen van de cumulus oöphorus rond de eicel te behouden. Daarnaast zijn meestal ook andere somatische cellen vereist, namelijk stukken follikelwand (Mattioli *et al.*, 1988) of de follikelschil (Nagai *et al.*, 1993) of delen daarvan (Abeydeera *et al.*, 1998a) om de maturatie tot een goed einde te brengen. Alleen deze granulocellen secreteren bepaalde producten die noodzakelijk zijn voor de eicelrijping.



Foto 1. Varkens cumulus-oöcyte complex: eicel met daarrond de zona pellucida en cumuluscellen. De eicel zelf ziet er gedeukt uit tengevolge van schade na invriezen.

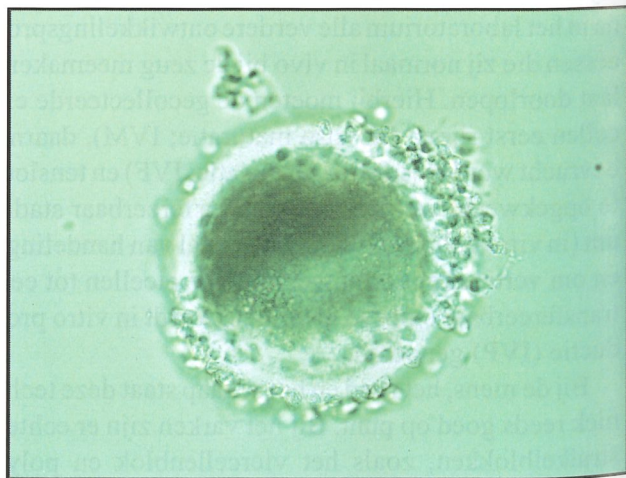


Foto 2. Varkens cumulus-oöcyte complex: varkens-eicel met daarrond de zona pellucida en een beperkt aantal cumuluscellen.

Media

Het maturatiemedium is meestal een eenvoudig medium, zoals mTALP (Tyrodemedium met albumine, lactaat en pyruvaat erbij; Nagai, 1994) of Whitten's medium (Funahashi *et al.*, 1994b) gesupplementeerd met varkensfollikelvloeistof, cysteïne en eventueel andere stoffen om de maturatie vlotter te laten verlopen. Funahashi *et al.* (1994a) vonden dat de cytoplasmarijping van de eicellen beter was in gemodificeerd Whitten's medium dan in gemodificeerd Tissue Culture Medium 199 (TCM-199), aangezien een hogere glutathione inhoud een betere pronucleus vorming en een betere ontwikkeling na fertilisatie waargenomen werden. Wang *et al.* (1997) bekwamen de beste resultaten in North Carolina State University 23 medium (NCSU 23) voor de maturatie van eicellen in vitro wanneer ze dit medium vergeleken met TCM-199 en met gemodificeerd Whitten's medium. In de drie testmedia werden cysteïne en varkensfollikelvloeistof gesupplementeerd. Varkensfollikelvloeistof blijkt een positieve invloed uit te oefenen op de cytoplasma- en kernrijping van de cumulus-oöcyte complexen (Rath *et al.*, 1995a). Ook cysteïnesupplementatie is voordelig: bij eicellen gematureerd in een cysteïnegesupplementeerd medium wordt na de bevruchting een verhoogde vorming van paternale pronuclei, die te danken is aan een betere rijping van het eicelcytoplasma, waargenomen (Yoshida *et al.*, 1992).

Daarnaast kunnen eventueel ook bepaalde hormonen, zoals gonadotrofines en oestradiol, worden toegevoegd om een betere rijping van de eicellen te bekomen (Wang *et al.*, 1992; Nagai *et al.*, 1993). Zo melden Funahashi en Day (1993a) een vlotte paternale pronucleusvorming na fertilisatie wanneer de eicellen eerst gedurende 20 uren in een medium gesupplementeerd met beide hormonen en daarna 20 uren in een hormonen vrij medium gematureerd werden. Bij maturatie gedurende 20 uren in bovien serum albumine (BSA) vrij Whitten's medium gesupplementeerd met 10 % varkensfollikelvloeistof en met beide hormonen, gevolgd door maturatie gedurende 20 uren in hetzelfde medium zonder de hormonen, bleek ook de natriumchlorideconcentratie van het medium van belang voor de cytoplasmarijping. Indien de natriumchlorideconcentratie lager dan normaal (normaal is 68.49 mM voor Whitten's medium) gehouden werd, werden hogere glutathione inhoud, minder polyspermie en meer paternale pronucleusvorming na fertilisatie waargenomen dan bij normale en hoge natriumchlorideconcentraties. Dit duidt op een betere rijping van het cytoplasma (Funahashi *et al.*, 1994b).

Funahashi *et al.* (1997a,b) toonden aan dat het preïncuberen van de cumulus-oöcyte complexen ge-

durende 12 uren in een gonadotrofinevrij medium, evenals het blootstellen van de eicellen gedurende de eerste 20 uren van de (44 uren durende) maturatie aan dibutyryl cyclisch adenosine 3',5'-monofosfaat, de uiteindelijke ontwikkeling van de eicellen ten goede komt. Deze beide ingrepen zouden ervoor zorgen dat de graad van maturatie van de kern van de verschillende eicellen als het ware gelijkgeschakeld wordt door synchronisatie van de eicellen in het kiemblasstadium (germinaal vesikel stadium).

Het supplementeren van de media met de hogergevoemde producten (hormonen, cysteïne, varkensfollikelvloeistof) zou ervoor zorgen dat aan het eind van de maturatie in de eicel hoge hoeveelheden glutathione aanwezig zijn, wat wijst op een voldoende rijping van het eicelcytoplasma. Dit glutathione is verantwoordelijk voor het initiëren van de decondensatie van het genetisch materiaal in de spermakop en dus voor de paternale pronucleusvorming (Prather en Day, 1998).

Het toevoegen van epidermale groeifactor (EGF) aan het maturatiemedium zou het degenereren van de germinale vesikels met als gevolg het condenseren van het vrouwelijk genetisch materiaal, de eicelkernrijping bevorderen (Singh *et al.*, 1993). Ongeveer één derde van de geïncubeerde eicellen ontwikkelt zich aldus tot blastocysten. Dit positieve effect van de toevoeging van (1-10 ng/ml) EGF, (zowel aan maturatiemedium gesupplementeerd met varkensfollikelvloeistof als aan proteïnevrij maturatiemedium) werd later door andere auteurs bevestigd (Abeydeera *et al.*, 1998b,1999). Abeydeera *et al.* (1999) slaagden erin de maturatie succesvol te laten doorgaan in een (proteïnevrij) medium dat geen somatische cellen of secreties vereist. Zij bekwamen gelijkaardige resultaten voor maturatie wanneer zij NCSU-23 medium gesupplementeerd met varkensfollikelvloeistof vergeleken met TCM-199 medium waaraan polyvinylalcohol in plaats van varkensfollikelvloeistof toegevoegd werd. Dit is een grote vooruitgang, omdat dit perspectieven opent voor het ontwikkelen van een standaard maturatiemedium, vrij van biologische materialen en dus onbeperkt reproduceerbaar.

Maturatieduur

Omtrent de vereiste tijdsduur van het rijpingsproces zijn de meningen verdeeld. Daar waar vroeger een maturatieduur van 44 uren werd aanbevolen (Prather en Day, 1998), blijkt uit onderzoek van Grupen *et al.* (1996) dat het verkorten van de maturatieduur tot 36 uren beter is, aangezien dan minder polyspermie na bevruchting waargenomen werd: zij vonden dat het voorkomen van polyspermie van 34 % naar 5 % daalde wanneer de maturatie respectievelijk 44 en 36 uren

duurde. Zij beweren dat het polyspermieprobleem bij in vitro fertilisatie het gevolg is van het verouderen van rijpe eicellen door de te lang durende maturatie. Ook Wang *et al.* (1992) stellen dat de meest geschikte maturatieduur 32 tot 36 uren bedraagt. Bij hun experimenten verliepen de klievingen van de embryonale cellen moeizamer wanneer een kortere of langere maturatieduur gehanteerd werd. Een maturatieduur tussen 36 en 40 uren wordt daarom aanbevolen.

IN VITRO FERTILISATIE (IVF)

Bij in vitro fertilisatie brengt men het sperma bij de gematureerde eicellen onder laboratoriumomstandigheden. In vivo mechanismen, zoals de capacitatie, moeten daarbij nagebootst worden. Deze capacitatie dient om beschermlagen die rond de spermacel gelegd werden tijdens de ontwikkeling in het mannelijk dier, te verwijderen, zodat de acrosoomreactie en uiteindelijk de fusie van de spermacel en de eicel kunnen doorgaan. Meerdere procedures werden ontwikkeld om de capacitatie in vitro te laten geschieden.

Capacitatiemedia

Cheng (1985) toonde aan dat incuberen van berensperma in (gemodificeerd TCM-199) medium met pH 7,8 bij 37°C gevolgd door fertilisatie in medium met pH 7,4 bij 39°C goede resultaten opleverde. Ook lang incuberen van de spermacellen gedurende 24-48 uren in een commerciële spermaverdunner aan 4×10^7 spermacellen/ml bij 16°C, gevolgd door Percoll centrifugatie om de motiele spermatozoa te selecteren, leverde hoge penetratiepercentages op bij IVF (Mattioli *et al.*, 1989).

Calcium (Ca)-ionoforen (A23187) kunnen eveneens gebruikt worden, omdat zij een Ca-influx in de spermacel bewerkstelligen. Deze Ca-influx is nodig om de acrosoomreactie, het finaal stadium van het capacitatieproces, te laten doorgaan. Lei *et al.* (1992) vergeleken een aantal capacitatiemethoden. Uit hun bevindingen bleken goede resultaten bij het gebruik van het Ca-ionofoor A23187 gevolgd door toediening van cafeïne, alsook bij het gebruik van heparine, routinematig gebruikt bij de capacitatie van rundersperma, gevolgd door cafeïne. Cafeïne dient om de motiliteit van het sperma te bevorderen. Bij de meeste IVF-systemen wordt vers sperma in een bicarbonaatgebufferd medium met hoge pH gebruikt voor het preincuberen van het berensperma, waarna cafeïne en een hoge calciumhoeveelheid toegevoegd worden om de capacitatie van de spermatozoa te induceren en zo de fertilisatie te bevorderen (Prather en Day, 1998). Recent werd aangetoond dat het incuberen van vers

varkenssperma met progesteron de acrosoomreactie bevordert en dus het capacitatieproces versnelt (Vazquez *et al.*, 2000).

Invloed van berensperma

Vers sperma versus diepvriessperma

Ook het gebruikte berensperma beïnvloedt de IVF-resultaten. Berensperma is namelijk moeilijk invriesbaar en de procedure gaat gepaard met ernstige kwaliteitsverliezen (Clarke en Johnson, 1987; Nagai *et al.*, 1988). Na het ontdooien worden daarom het best scheidingstechnieken aangewend om de goed beweeglijke spermatozoa voor IVF te isoleren (Zheng *et al.*, 1992). Alhoewel ook goede resultaten bekomen werden met diepvriessperma (Wang *et al.*, 1991), wordt om redenen van deze kwaliteitsverliezen bij varkens IVF toch meestal met vers sperma gewerkt. Dit is echter geen absolute oplossing, aangezien te lang bewaard vers sperma ook snel zijn bevruchtende capaciteit verliest (Hamano *et al.*, 1990). Bovendien bestaan er grote verschillen tussen beren wat de geschiktheid voor gebruik bij IVF-experimenten betreft (Foxcroft *et al.*, 1995). Ook het voorkomen van eicelpenetratie, polyspermie en paternale pronucleusvorming zou ten dele van de beer afhankelijk zijn (Xu *et al.*, 1996a, b).

Aantal spermacellen

Het bepalen van de ideale hoeveelheid spermacellen per eicel bij IVF is hierdoor moeilijk, omdat deze verschilt van beer tot beer. Wat de te gebruiken spermadosering betreft, blijkt over het algemeen wel dat een hoger aantal spermacellen per eicel aanleiding geeft tot een hoger percentage fertilisatie, wat echter dikwijls gepaard gaat met een hoog percentage polyspermie. Anderzijds brengen lagere aantallen een minder goede bevruchting teweeg, terwijl het polyspermie probleem niet opgelost wordt (Xu *et al.*, 1996b). Een dosis van 1×10^6 spermatozoa/ml, wat overeenkomt met 200.000 spermatozoa per eicel, werd aangeraden door Behalova *et al.* (1993). Rath *et al.* (1995b) daarentegen werken bij IVF standaard met 4000 spermatozoa per eicel. Wang *et al.* (1995) bekwamen de beste resultaten wanneer de eicellen 2 keer gedurende 3 à 4 uren in contact gebracht werden met (in heparine gecapaciteerde) berenspermatozoa.

Polyspermie

Het grote probleem bij in vitro fertilisatie bij het varken is polyspermie. Dit is een toestand waardoor

meer dan één spermacel de eicel binnendringt en genetisch materiaal aanvoert. Daardoor ontstaan niet-diploïde cellen met quasi altijd het stilvallen van de verdere foetale ontwikkeling tot gevolg. De eicel beschikt over 2 natuurlijke afweermechanismen tegen polyspermie. Normaal is het zo dat wanneer één spermacel doorheen de zona pellucida dringt en versmelt met de eicel plasmamembraan, er een snelle depolarisatie van die plasmamembraan optreedt waardoor geen andere spermacellen de fusie nog kunnen aangaan. Dit is het eerste blokkeringsmechanisme tegen polyspermie. De plasmamembraanpotentiaal stabiliseert echter snel waardoor een tweede blokkeringsmechanisme vereist is: de corticale reactie. Juist onder de eicelplasmamembraan bevindt zich een aantal granules. Bij fertilisatie ontstaat een lokale Ca-stijging in het eicelcytoplasma. Deze Ca-stijging loopt als een golf door het eicelcytoplasma en activeert de corticale granules die daarop door exocytose hun inhoud vrijstellen. Dit veroorzaakt een structurele wijziging van de zona pellucida die als het ware gaat "verharden" en geen andere spermacellen nog laat binnendringen. Wanneer men kunstmatig een Ca-stijging van het eicelcytoplasma teweegbrengt, hetzij door onmiddellijke injectie van Ca in de eicel, hetzij door gebruik te maken van Ca-dragende ionoforen, dan worden deze eicellen geactiveerd en treedt de corticale reactie op (Alberts *et al.*, 1994).

Fertilisatieduur

Polyspermie zou meer voorkomen bij varkens IVF dan bij runder IVF, omdat de reacties ter preventie van polyspermie bij het varken trager op gang zouden komen (Coy *et al.*, 1993). Meerdere strategieën zijn voorgesteld om het voorkomen van polyspermie zoveel mogelijk te verwijderen. Cheng *et al.* (1986) stelden dat een langdurige blootstelling (>8 uren) van eicellen aan berensperma duidelijk het voorkomen van polyspermie in de hand werkt. Mattioli *et al.* (1989) stellen, aanvullend op de bevinding van Cheng *et al.* (1986), voor om na 6-8 uren co-incubatie van de gameten overtollige spermacellen die gebonden zijn aan de zona pellucida, te verwijderen. Recent toonden Grupen en Nottle (2000) aan dat één van de spermacellen die binnen de eerste tien minuten na het samenbrengen van sperma en eicellen in vitro aan de zona bindt, verantwoordelijk is voor de uiteindelijke bevruchting. Zij stellen daarom dat het langdurig contact van de eicellen met grote hoeveelheden spermatozoa moet vermeden worden. Contact van de eicellen met de totale spermahoeveelheid gedurende 10 minuten (in plaats van gedurende 5 uren), gevolgd door het gedurende 5 uren incuberen van de eicel met

alleen de reeds aan de zona gebonden spermacellen, leverde een hoger percentage fertilisatie, een betere klieving en meer blastocysten op dag 7 op.

Mediatoren

Het preïncuberen van berensperma in varkensfollikelvloeistof, dat gekend staat om zijn capaciterende eigenschappen bij runder IVF, zou ook de incidentie van polyspermie reduceren (Niwa, 1993). Ook in vivo zou dit een beschermingsmechanisme zijn tegen polyspermie (Funahashi en Day, 1993b). Daarnaast is ook het co-incuberen van de spermacellen met oviductvloeistof (Kim *et al.*, 1996) of cellen (Nagai en Moor, 1990) uit de varkensoviduct beschreven om de frequentie van voorkomen van polyspermie te reduceren. Na co-cultuur van spermatozoa met varkensoviductcellen bij IVF zagen Dubuc en Sirard (1995) dat aan de oviductcellen gebonden spermacellen na loslaten een betere penetratie, minder polyspermie, betere pronucleusvorming en een betere motiliteit vertoonden dan niet aan de oviductcellen gebonden spermatozoa. Dit positief effect van varkensoviductcellen werd recent bevestigd door Bureau *et al.* (2000), die aantoonde dat contact met varkensoviductcellen van zowel de eicellen als de spermacellen, vóór de fertilisatie, minder polyspermie en een betere ontwikkeling van de gevormde embryo's teweegbrengt. Contact van de eicellen met de oviduct van een oestrische zeug blijkt morfologische en fysische veranderingen bij de eicellen teweeg te brengen met minder polyspermie na fertilisatie tot gevolg (Day *et al.*, 2000).

Invloed van de eicel op polyspermie

Niwa (1993) meldt dat het voorkomen van polyspermie kan gereduceerd worden, zonder negatief effect op de kernrijping, door de eicellen tijdens de maturatie eerst gedurende 24 uren in een medium met foetaal kalfserum (FCS) te cultiveren gevolgd door 24 uren cultuur in een BSA-aangerijkt medium. Grupen *et al.* (1996) daarentegen vermelden dat een te lange eicelmaturatie polyspermie in de hand werkt, omdat de verouderende, rijpe eicellen dan te zwak geworden zijn in hun blokkeringsmechanismen. Hunter meldde reeds in 1991 dat het verouderen van eicellen in vivo, na ovulatie en vóór fertilisatie, polyspermie in de hand werkt. Wang *et al.* (1998) suggereerden ook dat het rijpingsproces van de eicellen zeer belangrijk is om polyspermie te voorkomen, aangezien in vivo gematureerde eicellen morfologisch verschillen en effectievere blokkeringsmechanismen hebben na IVF dan in vitro gematureerde eicellen. Funahashi *et al.* (2000) toonden aan dat het beïnvloeden van sper-

ma via bepaalde receptoren de frequentie van polyspermie bij IVF kan reduceren. Zij slagen erin om, via de werking van het adenosinemechanisme, capacitatie en acrosoomreactie zo te beïnvloeden dat hoge percentages fertilisatie met lage percentages polyspermie bekomen worden.

Desalniettemin blijft polyspermie het grote obstakel bij de IVF van varkenscellen, resulterend in verlaagde ontwikkelingspercentages van bevruchte eicellen tot blastocysten.

IN VITRO CULTUUR (IVC)

In het geval men embryo's bij een zeug verzamelt, worden die meestal uitgespoeld op het vier- tot acht-cellig stadium (Day, 1979). Indien men één- of tweecellige embryo's gaat collecteren (Pope *et al.*, 1972) kan men ze ook in cultuur houden om ze op een later stadium of na transport te transplanteren.

Wanneer men de embryo's in vitro produceert uitgaande van eicellen is het vanzelfsprekend dat de embryo's tot het viercellig stadium in bepaalde media in cultuur gehouden worden (Yoshida *et al.*, 1993).

Het viercellenblok

Het grootste probleem bij in vitro cultuur dat door meerdere auteurs vermeld wordt is de slechte ontwikkeling van één- en tweecellige embryo's tot het viercellig stadium en dit los van het gebruikte cultuurmedium (Pope en Day, 1977; Wright, 1977). Schoenbeck *et al.* (1993) noemden deze ontwikkelingsstilstand het "viercellenblok".

Ook in vivo kan een ontwikkelingsstilstand op het viercellig stadium waargenomen worden (Davis, 1985). Wanneer men embryo's uit een donorzeug 'flusht' 70 tot 80 uren na ovulatie, worden naast achten zestien cellige embryo's nog steeds viercellige embryo's waargenomen. Deze stilstand zou tussen de 20 en de 48 uren duren, waarna de embryo's afzonderlijk hun ontwikkeling verderzetten (Polge, 1977; Kronnie en Boer, 1993; Schoenbeck *et al.*, 1993). Deze vertraging zou te wijten zijn aan de overdracht van de controle van de ontwikkeling van het moederdier naar de zygote zelf (Jarrell *et al.*, 1991; Kronnie en Boer, 1993).

Orgaan- en oviductculturen

Naar analogie met andere diersoorten bleek het mogelijk om het probleem van het moeilijk opkweken van één- en tweecellige embryo's in vitro te omzeilen door de jonge embryo's in te planten in de afgebonden eileiders van pseudodrachtige konijnen. Na 2 dagen

werden de embryo's dan overgeplant in receptorzeugen met 90% overleving (Polge *et al.*, 1972). Krisher *et al.* (1989a,b) gingen nog verder en slaagden erin één- en tweecellige varkensembryo's in vitro te cultiveren tot het morula- of blastocyststadium met behulp van een orgaancultuur van muizenoviductcellen. Het was nu slechts een kleine stap om in dit opzet de orgaancultuur van oviductcellen van muizen te vervangen door oviductcellen van varkens. De cocultuur met varkensoviductcellen, met goede resultaten qua embryonale ontwikkeling tot gevolg, was een feit (White *et al.*, 1989). Ook het supplementeren van het gebruikte cultuurmedium met de vloeistof die aanwezig is in varkens eileiders resulteerde in een even snelle ontwikkeling van de jonge varkensembryo's als in vivo: van één- tot viercellig in 48 uren, van twee- tot viercellig in 24 uren (Archibong *et al.*, 1989).

Media

Op de vraag welk medium nu het best gebruikt kan worden voor de in vitro embryocultuur is het antwoord niet zo eenvoudig. De bedoeling van een cultuurmedium is de lichaamscondities waarin cellen normaal groeien, na te bootsen. Daarom bestaat het medium meestal uit lichaamsvochten of chemische vervangingsmiddelen. De pH van dergelijke media evenaart die van het lichaam: 7,4. Om de zuurtegraad van de media binnen de perken te houden, worden deze gebufferd, hetzij met CO₂ en natriumbicarbonaat wanneer gewerkt wordt in (5%) CO₂ atmosfeer, hetzij met het krachtige doch dure HEPES. Soms worden beide buffers in hetzelfde medium gebruikt. Naargelang de cultuur eisen de cellen een bepaalde zuurstofspanning, doch opgeloste zuurstof kan aanleiding geven tot de vorming van vrije radicalen die toxisch zijn. Daarom worden vrije radicaalvangers, zoals glutathione, β-mercaptoethanol of dithiothreitol in de media geïncorporeerd. De osmolaliteit van cultuurmedia ligt meestal tussen 260 en 320 mOsm/kg en wordt vooral bewerkstelligd door de aanwezigheid van zouten. Meestal wordt een temperatuur van 37°C gehanteerd. Dit is iets lager dan de lichaamstemperatuur van zoogdieren, omdat voor de embryo's oververhitting veel schadelijker is dan koeling. Bij het varken wordt echter dikwijls gewerkt aan een temperatuur van 39°C, omdat dit de beste ontwikkeling bewerkstelligt (Funahashi *et al.*, 1994b; Rath *et al.*, 1995b). Ook aan de oppervlaktespanning en de viscositeit van media wordt belang gehecht: de aanwezigheid van serum in het medium voorkomt meestal problemen met deze parameters. Indien nodig kan serum hiervoor ook vervangen worden door carboxymethylcellulose of polyvinylpyrrolidone. Andere stoffen die door serum

sowieso aan het medium toegevoegd worden, zijn groeifactoren, adhesiefactoren, mineralen, lipiden en hormonen, dikwijls gebonden aan proteïnen. Het meest gebruikte serum in cultuurmedia is "fetal calf serum" (FCS). Andere extra bouwstenen worden dikwijls toegevoegd, zoals essentiële (en soms andere) aminozuren, een energiebron (glucose of glutamine) en soms ook antibiotica (ter voorkoming van bacteriële contaminatie), groeifactoren, hormonen en vitamines (Freshney, 2000). Aangezien sera vele stoffen bevatten die een moeilijk te kwantificeren invloed kunnen uitoefenen op de celgroei en aangezien contaminatie via (besmette) sera steeds een risico inhoudt, wordt steeds meer de voorkeur gegeven aan serumvrije media voor de embryocultuur (Vanroose *et al.*, 2001). Het serum wordt dan vervangen door een aantal gekende stoffen waardoor de media gestandaardiseerd raken en vlot te reproducieren zijn.

Meerdere media voor de cultuur van embryo's zijn beschreven en werden nadien dikwijls gemodificeerd door supplementatie met bepaalde stoffen. Mits cultuur in gemodificeerd Whittens's cultuurmedium kon het viercellenblok sporadisch doorbroken worden (Menino en Wright, 1982). In een Krebs's Ringer bicarbonaatformulering bleek het eveneens sporadisch mogelijk te zijn om het viercellenblok te doorbreken (Davis, 1985). De toevoeging van BSA aan het medium bleek gunstig te zijn om de ontwikkeling van één- en tweecellige embryo's tot aan het viercellig stadium en zelfs doorheen het viercellenblok te bevorderen (Wright, 1977). Eens het viercellenblok achter de rug is, kunnen de embryo's tot het blastocyststadium gecultiveerd worden, met regelmatige delingen om de 12 uren. Dit gaat echter gepaard met verminderde leefbaarheid van de embryo's na transfer (Davis en Day, 1978; Polge, 1982). Rath *et al.* (1995b) raden daarom eveneens aan de embryo's niet in in vitro cultuur te kweken tot het blastocyststadium maar reeds vroeger over te planten. Ook Kikuchi *et al.* (1999) toonden aan dat, niettegenstaande de gemaakte vorderingen wat betreft de condities en media voor in vitro cultuur, de leefbaarheid van de embryo's afneemt na IVC en dat dit effect meer uitgesproken is bij toenemende duur van IVC na IVF.

Hagen *et al.* (1991) beschrijven de succesvolle ontwikkeling van jonge embryo's doorheen het viercellenblok tot op het blastocyststadium in 3 verschillende eenvoudige HEPES gebufferde, met lactaat en pyruvaat gesupplementeerde, gemodificeerde en aan de lucht blootgestelde Tyrodemedia. Tot vóór deze bevindingen werden lactaat en pyruvaat als schadelijk voor de vroege embryonale ontwikkeling in vitro beschouwd (Davis en Day, 1978). Als energiebron kan glutamine, alleen of samen met glucose, toege-

voegd worden om de cultuur van jonge embryo's tot op het blastocyststadium te bevorderen (Petters *et al.*, 1990). Naast glutamine hebben ook taurine en hypotaurine een positieve invloed op de ontwikkeling van de varkensembryo's (in NCSU-23 medium) (Reed *et al.*, 1992). Ook in Whitten's medium kan de volledige cultuur met succes uitgevoerd worden (Beckmann en Day, 1993). Dit zou deels te danken zijn aan de relatief lage natriumchloride (NaCl) concentratie van dit medium. Volgens Galvin *et al.* (1993) is een hoge NaCl-concentratie in vele cultuurmedia verantwoordelijk voor het viercellenblok. De supplementatie met glutamine zou dit probleem helpen omzeilen. Supplementeren van Whitten's medium met hyaluronzuur zou eveneens bevorderlijk zijn voor de ontwikkeling van de varkensembryo's (Miyano *et al.*, 1994). Dezelfde auteurs stelden ook dat Whitten's medium beter is voor de in vitro cultuur dan TCM 199. Andere veel en met succes gebruikte media voor de cultuur van varkensembryo's zijn het NCSU-23 medium, dat beter zou zijn dan Whitten's medium (Rath *et al.*, 1995b) en het Beltsville Embryo Culture Medium n° 3 (BECM-3; Dobrinsky *et al.*, 1996). Bij dit laatste medium vonden Dobrinsky *et al.* (1996) dat de beste methode die is waarbij op dag 5,5 FCS toegevoegd werd en waarbij geen BSA gebruikt werd. Dit resulteerde niet alleen in een goede ontwikkeling van ééncellige embryo's tot blastocysten maar ook in een hoog uitkippingspercentage van de blastocysten (80% van de oorspronkelijke één- tot tweecellige embryo's ontwikkelden zich tot uitgekijpte blastocysten). Zonder die adaptaties waren de resultaten in BECM-3 niet veel beter dan die bekomen in NCSU-23 medium. Long *et al.* (1999) bekwamen dan weer de beste resultaten in NCSU-23 medium, in vergelijking met BECM-6, BECM-7 en NCSU-23aa medium.

In Tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de bekomen resultaten met de meest courant gebruikte media bij in vitro cultuur.

BESLUIT

Momenteel is de "know-how" omtrent het in vitro produceren van varkensembryo's reeds zo ver gevorderd, dat ongeveer 35 % van de immature oöcyten die rijpen en bevrucht worden in vitro, zich verder ontwikkelen tot het blastocyststadium (Day, 2000).

Van alle besproken media zijn er maar van enkele media gegevens voorhanden waaruit blijkt dat niet alleen in vitro cultuur van één- of tweecellige embryo's tot het blastocyststadium mogelijk is, maar waarbij nadien ook drachten of nakomelingen bekomen zijn,

Tabel 1. Overzicht van de resultaten bekomen met de meest courant gebruikte media bij in vitro cultuur.

Medium	Supplementen	Procent blastocysten	Drachten	Biggen geboren	Referentie
TCM 199	25% varkensfollikelvloeistof idem + cysteamine	1% 12%	-	-	Grupen <i>et al.</i> , 1995
Whitten's	BSA BSA + hyaluronzuur	15% 70%	+	+	Miyano <i>et al.</i> , 1994
NCSU 23	10% varkensfollikelvloeistof	18-21%	+	+	Day, 2000
BECM 3	BSA-vrij + FCS op dag 5,5	74%	-	-	Dobrinsky <i>et al.</i> , 1996

zoals Whitten's medium en NCSU-23 medium (Prather en Day, 1998).

Verder uitgebreid onderzoek naar de vitaliteit van de biggen geboren na IVP en ET, het al dan niet voorkomen van bepaalde afwijkingen, de groeiprestaties en de verdere vruchtbaarheid verdienen in de toekomst zeker de volle aandacht. Aangezien bij het begin van de IVP bij het rund veel problemen voorkwamen, zoals doodgeboorten, overgewicht en aangeboren afwijkingen (Young *et al.*, 1998), dient hieraan bij

het varken terdege aandacht besteed te worden. Het laboratoriumgedeelte staat, zoals uit dit artikel mag blijken, reeds vrij goed op punt. Nu dient het geheel nog getoetst te worden aan de praktijk...

LITERATUUR

De referentielijst kan aangevraagd worden bij de auteurs.