

Praktyczne metody konserwacji zarodków u bydła – transfer bezpośredni

JANUSZ ZBYLUT, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

Pracownia Biotechniki Rozrodu Zwierząt Państwowego Instytutu Weterynaryjnego Oddział w Bydgoszczy, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Zbylut J., Jaśkowski J. M.

Practical methods of cryopreservation of bovine embryos – direct transfer

Summary

This paper describes methods of cryopreservation with glycerol and sucrose and other crioprotectants as well as propylene glycol and ethylene glycol which facilitate the direct transfer of bovine embryos. The pregnancy results in recipients after direct transfer and some factors influencing the efficiency of this method are presented.

Keywords: cryopreservation, cryoprotectants, embryos, cattle.

W czołowych krajach Ameryki oraz Europy zachodniej transfer zarodków od dłuższego już czasu jest rutynową procedurą programów rozrodu bydła. Integralną część tych programów stanowi konserwacja zarodków w niskich temperaturach (6).

Powszechnie znanym i dobrze sprawdzonym krioprotektorem stosowanym podczas procesu mrożenia zarodków bydlęcych przez większość komercyjnych zespołów embriotransferu jest glicerol (17). Tradycyjny proces rozmrażania zarodków związany jest z koniecznością przeprowadzenia żmudnej procedury kilkustopniowego jego usuwania z rozmrożonych zarodków. W obecnej dobie metoda ta jest czasochłonna i mało praktyczna. Z drugiej strony transfer pojedynczych zarodków (a nawet kilku zarodków) przeprowadzany w różnych, nierzadko odległych od siebie miejscach sprawia, że efektywność wykonanej pracy jest niska (22). Dla przykładu tradycyjna procedura rozmrażania zarodków (czas niezbędny na przeniesienie zarodków z kąpieli o wyższym stężeniu krioprotektora do stężeń niższych, pakowanie zarodków do słomek, wprowadzanie do dróg rodnych biorczynie) wynosić może od 45 do 90 minut (13). Z myślą o komercyjnych stacjach transferu zarodków rozpoczęto poszukiwania nowych, prostych metod rozmrażania, zastępujących etapowe usuwanie krioprotektora jednokrokowym lub dającym możliwość przenoszenia (transfer) mrożonych zarodków do macicy biorczyń bezpośrednio po rozmrożeniu (22).

Początkowo, nie rezygnując z glicerolu – do konserwacji zarodków wprowadzono dodatkowo sacharozę. Stanowi ona osmotyczny bufor podczas jego usuwania. Jedną z metod zamrażania zarodków w glicerolu wraz z sacharozą przedstawił Leibo (13). Zarodki umieszczano w 1,5 M glicerolu, a następnie pakowano do słomek inseminacyjnych. Do słomek tych wprowadzano także kolumny 1,08 M sacharozy. Po rozmrożeniu słomki, kolumny sacharozy i glicerolu mie-

szano ze sobą i inkubowano w temp. 20-37°C przez 5-8 min., a następnie przenoszono do macicy biorczyń. Terenowe próby z zastosowaniem tej metody w latach 1981-1983 pozwalały na osiągnięcie nawet 26% wskaźnika zacielen. Podkreślano jednocześnie, że odsetek zacielenych biorczyń zależał także od stada, w którym dokonywano transferu i umiejętności operatorów (13). W innym doświadczeniu przenoszono 313 zarodków różniących się pod względem jakości oraz stadium rozwoju uzyskując 36,7% ciąży (12). Jednocześnie najwięcej zacielen uzyskano po przeniesieniu rozmrożonych wczesnych blastocyst – 42%, następnie morul – 36%, najmniej – ekspandujących blastocyst – 33%. Znaczący wpływ na wyniki zacielen ma również jakość zarodka. Przeniesienie zarodków bardzo dobrej jakości pozwala uzyskać 38-48,6% wskaźnik zacielen, dobrych – 44,6% natomiast dostatecznych 24,1-33% (12, 13, 14). Podobną metodę mrożenia z zastosowaniem sacharozy przedstawił Renard (19). Zarodki mrożono w słomkach, umieszczając w nich kolumny 1,5 M glicerolu z zarodkiem, 0,25 M sacharozy oraz podłoże hodowlane. Po rozmrożeniu słomkami należało tak manipulować, by zmieszać kolumnę sacharozy z kolumną zawierającą zarodek. Po 5-30 minutowej inkubacji w temp. 37°C zarodki były przenoszone do macicy biorczyń. Wskaźnik zacielen po zastosowaniu tej metody wyniósł 46,8% i był tylko nieznacznie niższy od uzyskiwanego po przeniesieniu świeżych zarodków. Chupin i wsp. (4) mrozili zarodki w 10% glicerolu (1,4 M) zawieszonym w PBS uzupełnionym surowicą owczą, z dodatkowymi dwoma kolumnami sacharozy (metoda B) lub sacharozy i pożywki do krótkotrwałej hodowli zarodków (metoda A). Stosując metodę A uzyskano 44,7% ciąży, metodę B natomiast 38,5%. Inni autorzy zamrażając zarodki w glicerolu z sacharozą osiągnęli zbliżone wyniki tj. od 38% do 48,5% (5, 18). Skracające czas

jednostopniowe rozmrażanie z użyciem PBS z 1,0 M sacharozą pozwalało na uzyskanie 47,2%, a nawet 63% skuteczności (1, 10). Prawdopodobieństwo nieprawidłowego zmieszania kolumn wewnątrz słomki wyeliminowano łącząc 0,25 M z 1,4 M glicerolem przed zamrożeniem zarodka. Zarodek umieszczano w tej mieszaninie i pakowano do słomki zawierającej dodatkową kolumnę pożywki hodowlanej. Zastosowanie tej procedury zamrażania i rozmrażania zarodków umożliwiło uzyskanie – niestety na nielicznym materiale doświadczalnym – 50% skuteczności zacielen (16).

W przedstawionych metodach niedostateczna szybkość przenikania glicerolu przez błony komórkowe zarodka była kompensowana przez wprowadzenie roztworów sacharozy, która stanowi osmotyczny bufor podczas procesu usuwania glicerolu. Jednocześnie prowadzono badania nad środkami osłaniającymi łatwo przenikającymi przez komórki zarodka, które nie wymagały stosowania sacharozy i kilkuetapowego usuwania krioprotektora.

Nowymi obiecującymi związkami okazały się glikol etylenowy (EG) oraz glikol propylenowy (PG). Łatwość ich przenikania obrazuje fakt, że objętość moruli i blastocyst w obecności 2,0 M EG ulega zredukowaniu o ok. 80% swojej pierwotnej objętości, podczas gdy w 2,0 M glicerolu tylko o 55%. Podobnie powrót zarodków do pierwotnej objętości jest szybszy w EG (10 min.) niż w glicerolu (30 min.) (3). Zarodki mrożone w EG i PG po rozmrożeniu mogą być uwadniane przez bezpośrednie umieszczenie w pożywce do krótkotrwałej hodowli, bez procedury wymagającej pośrednich kroków rozrzedzających krioprotektor lub mrożone w słomkach wraz z dodatkowymi kolumnami medium hodowlanego mogą być bezpośrednio po rozmrożeniu przenoszone do biorczyń. Skuteczność zacielen biorczyń po przeniesieniu mrożonych i rozmrażanych w ten sposób zarodków okazała się porównywalna do skuteczności przenoszenia zarodków mrożonych w glicerolu i rozmrażanych kilkuetapowo.

Voelkel i Hu (22) porównali *in vitro* przeżywalność zarodków bydlęcych, po bezpośredniej rehydratacji w pożywce hodowlanej, mrożonych w czterech różnych krioprotektorach. Do doświadczeń zastosowano 1,5 M EG, 1,5 M PG, 1,5 M DMSO i 1,4 M glicerol. Najwyższą przeżywalność wykazały zarodki mrożone w EG. Po 24 i 72h przeżywało w EG odp. 80 i 70% zarodków, w glicerolu odp. 60 i 30%, natomiast w PG odp. 16 i 11%. Dużo lepsze wyniki z zastosowaniem PG otrzymali Suzuki i wsp. (21), którzy zamrażali zarodki w 1,6 M PG oraz 1,4 M glicerolu, w słomkach zawierających dodatkowe kolumny PBS, bez lub z 0,2; 0,4; 0,8 M sacharozą. Po rozmrożeniu i hodowli przeżywalność zarodków mrożonych w PG z 0; 0,2; 0,4; 0,8 M sacharozą w PBS, oceniana na podstawie odsetka uwalnianych blastocyst, wynosiła odpowiednio 88, 89, 84 i 72%. Przy zamrażaniu w glicerolu lepszą przeżywalność notowano przy wyższych stężeniach sacharozy, przy 0,4 M – 82%, a przy 0,8 M 88%. W niższych stężeniach sacharozy następuje prawdopo-

dobnie zbyt szybki i duży obrzęk komórek indukujący zmiany strukturalne w błonach cytoplazmatycznych, a także wewnątrzkomórkowych organellach, zmniejszając tym samym zdolność zarodka do rozwoju i uwalniania się blastocysty (21).

Badania terenowe są nie do końca przekonujące. Wprawdzie dokonując transferu zarodków mrożonych w glikolu etylenowym z dodatkiem 0,2 M sacharozy uzyskiwano 61% wskaźnik zacielen, jednak wydaje się, że w odniesieniu do wyników zacielen nie bez znaczenia był fakt pakowania do słomek po dwa zarodki. Autorzy nie podają też liczby ciąży bliźniaczych (21). Na większym materiale 400 biorczyń Dochi (6) uzyskiwał 36% ciąży. Po rozmrożeniu nie było konieczne wstrząsanie słomkami oraz tradycyjne metody usuwania krioprotektora.

W badaniach *in vitro* 20 min. ekspozycja zarodków na 1,5 M EG i PG i następnie bezpośrednia rehydratacja nie miały jawnego toksycznego wpływu na zarodki bydlęce (22). Świadczyła o tym 100% przeżywalność zarodków po 48 godzinach hodowli. W bezpośrednim porównaniu 1,5 M EG i 1,6 M PG przy mrożeniu i bezpośrednim rozmrażaniu w pożywce hodowlanej, a następnie hodowli *in vitro*, po 24 godzinach przeżywało 59% zarodków mrożonych w EG i tylko 24% mrożonych w PG; po 48 godzinach odpowiednio 54% i 20% (21).

Wyniki badań *in vitro* zostały potwierdzone w serii badań terenowych. W pierwszym z nich zarodki mrożono w słomkach zawierających wyłącznie kolumny 1,5 M EG, a także glikolu oraz pożywkę hodowlaną we wzajemnym stosunku 1:3. Przenosząc zarodki mrożone wyłącznie w EG uzyskano 39% ciąży, natomiast w obecności kolumn z PBS odsetek zacielen wzrastał do 50% i był porównywalny z uzyskiwanym przy przenoszeniu zarodków mrożonych w glicerolu. Dodatkowa kolumna PBS spełnia podwójną funkcję. Ułatwia rehydratację zarodków po przeniesieniu do macicy biorczynie oraz zmniejsza objętość wprowadzonego krioprotektora, redukując tym samym jego miejscowy wpływ na śluzówkę macicy (22).

W kolejnych latach pojawiły się liczne doniesienia (1, 6, 11, 15, 17) o zadowalającej skuteczności przenoszenia zarodków mrożonych w EG. W niektórych doświadczeniach jednak rehydratacja po rozmrożeniu odbywała się nie bezpośrednio w słonce, lecz pod lupą w roztworze PBS z BSA (17). Po rehydratacji zarodki były ponownie pakowane w słomki i przenoszone do macicy biorczyń. Metoda ta pozwalała na skrócenie czasu usuwania krioprotektora przy zachowaniu wysokiej skuteczności transferu zarodków. Z 488 przeniesionych zarodków uzyskano 266 ciąży (59%), tj. porównywalnie do skuteczności przenoszenia zarodków mrożonych i rozmrażanych konwencjonalnie.

Ocenie praktycznych możliwości zastosowania metod bezpośredniego transferu zarodków bydlęcych zamrażanych i rozmrażanych w EG i PG, a także glicerolu w terenowych warunkach poświęcone były badania Dochi i wsp. (6). Zarodki w stadiach od moruli do ekspandującej blastocysty i różnych stopniach ja-

kości zamrażane były w 1,6 M PG i 1,8 M EG oraz równolegle w 1,4 M glicerolu, lub glicerolu z dodatkiem 0,3 M sacharozy (grupy kontrolne). Zarodki mrożone w EG i PG przenoszone były do macicy biorczyń z pominięciem procedury usuwania środka osłaniającego. Zarodki mrożone w glicerolu rozmrażane były konwencjonalnie przez stopniowe rozcieńczanie krioprotektora, natomiast usuwanie glicerolu z zarodków mrożonych wraz z 0,3 M sacharozą odbywało się po rozmrożeniu wewnątrz słomki. Biorczynami zarodków były jałowice, pierwiastki lub wieloródki różnorodnych mieszańców, po rui naturalnej lub synchronizowanej. Skuteczność zacielen po przeniesieniu zarodków mrożonych w PG była najniższa i wynosiła 36%. Lepsze wyniki dawały odp. EG, glicerol z sacharozą i glicerol (44,7, 48,6 i 46%).

Podobnie, porównywalne wskaźniki ciąży przy mrożeniu zarodków bydła domowego w glicerolu i rozrzedzanych w 3 lub 1 krokowej procedurze i mrożonych w EG uzyskał Arreseigor i wsp. (1). Ich zdaniem decydujący wpływ na wysokość wskaźnika zacielen ma jakość zarodka. Przy zarodkach bardzo dobrej jakości uzyskiwano 57,1% ciąży, odpowiednio mniej – 52,9 i 31,2% po przeniesieniu zarodków dobrych i dostatecznych. Stosując 1,5 M EG Looney i wsp. uzyskiwali 50% wskaźnik zacielen, w porównaniu do 69,6% po mrożeniu zarodków w 10% glicerolu i 3 stopniowym rozmrażaniu (15). Lange (11) zaś na 189 i 92 przeniesionych zarodków mrożonych w EG lub glicerolu uzyskał 110 i 45 (58,2% i 48,9%). Dzielone i mrożone w 1,5 M EG zarodki pozwalały na uzyskanie 37,5% skuteczności transferu.

Istotny wpływ na wyniki zacielen u biorczyń przypisywano nie tylko jakości zarodków ale także ich barwie. Koreluje ona ze stężeniem cholesterolu całkowitego w surowicy krwi dawczyń. Zarodki pozyskiwane w 7 dniu po rui dzielono na trzy kategorie: bardzo jasne – tzn. o jasnej cytoplazmie bez ciemnych wtrętów w cytoplazmie, jasne – z kilkoma ciemnymi wtrętami, przy jednolitym ich rozmieszczeniu w cytoplazmie oraz ciemne – z czarnymi wtrętami w więcej niż 1/3 cytoplazmy (8). Dawczynie również podzielono na trzy grupy, w zależności od poziomu cholesterolu w surowicy w dniu pozyskiwania zarodków. Zarodki mrożono w 1,5 M EG i przenoszono bezpośrednio po rozmrożeniu do macicy biorczyń. Średnia skuteczność zacielen po transferze morul wyniosła 44%, dla blastocyst 47%, przy czym najwyższy wskaźnik zacielen uzyskano dla jasnych blastocyst – 51%, a najniższy dla ciemnych morul – 27%. Biorąc pod uwagę stężenie cholesterolu w surowicy dawczyń, najlepsze wyniki zacielen uzyskiwano, przenosząc blastocysty od dawczyń, u których było ono wyższe od 5 mmol/l, najsłabsze zaś u tych, u których poziom cholesterolu był niższy niż 3 mmol/l.

O skuteczności transferu decydują też indywidualne cechy biorczyń, ich wiek, stan funkcjonalny ciała żółtego oraz sprawne, możliwie szybkie przeprowadzenie zabiegu (9, 23). Skuteczność przeniesienia zarodków obniżała się jeżeli czas od rozmrożenia zarodka do jego ulokowania w macicy był dłuższy niż 11 minut (6, 7).

Bezpośredni transfer zarodków umożliwia przeprowadzenie tego zabiegu przez inseminatorów. Nibart i wsp. (18) przedstawili wyniki zacielen po przeniesieniu zarodków zamrażanych w glicerolu i 0,25 M sacharozie lub 1,5 M EG, dla operatorów zespołów ET i inseminatorów. Wskaźnik zacielen dla wymienionych wyżej krioprotektorów wyniósł dla operatorów zespołów ET 49,7% i 51,5%, natomiast dla inseminatorów – 46,4% i 48,9%. Wyniki te porównywalne były do osiąganych wcześniej przy zastosowaniu konwencjonalnych metod mrożenia zarodków. Beal i wsp. (2) uważają, że znaczący wpływ na wynik zacielen ma głębokość zdeponowania zarodka w rogu macicy. Płytkie umieszczenie (w punkcie wyznaczonym przez zewnętrzne rozwidlenie rogów macicy) pozwalało na osiągnięcie tylko 29,6% ciąży, głębokie natomiast, (głębiej niż 2/3 odległości od zewnętrznego rozwidlenia rogów do zakończenia jajowodu) – 65,9% wskaźnika zacielen, a dla zarodków bardzo dobrej jakości nawet 72,2%. Równocześnie autorzy podkreślają, że wprawdzie umieszczenie przenoszonego zarodka głęboko w macicy znacząco podnosi wskaźnik ciąży, jednak dopiero odpowiednie wyszkolenie i doświadczenie operatora mogą być dostateczną gwarancją uzyskiwania satysfakcjonujących wyników zacielen.

Jak wynika z powyższego przeglądu piśmiennictwa ewolucja metod konserwacji zarodków zmierza w kierunku maksymalnego ich upraszczania. Odbywa się ona z jednej strony drogą testowania nowych krioprotektorów, pozwalających – z pominięciem procedur usuwania środka osłaniającego z zarodka na natychmiastowe jego wprowadzenie do macicy, z drugiej ustalenia warunków zapewniających maksymalną wydajność i skuteczność transferu.

Piśmiennictwo

1. Arreseigor C. J., Sisul A., Arreseigor A. E., Stahringer R. C.: *Theriogenology* 49, 160, 1998.
2. Beal W. E., Hinshaw R. H., Whitmann S. S.: *Theriogenology* 49, 241, 1998.
3. Bielański A., Tischner M.: *Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich*, Universitas, Kraków 1993.
4. Chupin D., Florin B., Procureur R.: *Theriogenology* 21, 455, 1984.
5. Cseh S., Seregi J., Solti L.: *Theriogenology* 41, 185, 1994.
6. Dochi O., Yamamoto Y., Saga H., Yoshihira N., Kano N., Maeda J., Miyata K., Yamauchi A., Tominaga K., Oda Y., Nakashima T., Inohae S.: *Theriogenology* 49, 1051, 1998.
7. Donaldson L. E.: *Theriogenology* 23, 188, 1985.
8. Hill B. R., Kuehner L. F.: *Theriogenology* 49, 168, 1998.
9. Jaśkowski J. M.: *Medycyna Wet.* 54, 236, 1998.
10. Landsverk K., Refsdal A. O., Vatn T.: *Theriogenology* 37, 241, 1992.
11. Lange H.: *Theriogenology* 43, 258, 1995.
12. Leibo S. P.: *Theriogenology* 19, 139, 1983.
13. Leibo S. P.: *Theriogenology* 21, 767, 1984.
14. Leibo S. P.: *Theriogenology* 25, 166, 1986.
15. Looney C. R., Broek D. M., Gue C. S., Funk D. J., Faber D. C.: *Theriogenology* 45, 170, 1996.
16. Massip A., Van Der Zwalmen P.: *Vet. Rec.* 115, 327, 1984.
17. McIntosh A., Hazeleger N. L.: *Theriogenology* 41, 253, 1994.
18. Nibart M., Humbolt P.: *Theriogenology* 47, 371, 1997.
19. Renard J. P., Heyman Y., Leymonie P., Plat J. C.: *Theriogenology* 19, 145, 1983.
20. Seidel G. E., Nelson L. D., Nelson C. F., DeGroff D., Brink Z.: *Theriogenology* 37, 294, 1992.
21. Suzuki T., Yamamoto M., Ooe M., Sakata A., Matsuoka M., Nishikata Y., Okamoto K.: *Theriogenology* 34, 1051, 1990.
22. Voelkel S. A., Hu Y. X.: *Theriogenology* 37, 23, 1992.
23. Znaniecki R., Jaśkowski J. M., Znaniecka E.: *Medycyna Wet.* 54, 550, 1998.

Adres autora: lek. wet. Janusz Zbylut, Al. Ossolińskich 4/1A, 85-093 Bydgoszcz, e-mail: piwetby@webmedia.pl