

Przygotowanie i kwalifikacja krów biorczyń do transferu zarodków

JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, JANUSZ ZBYLUT

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

Jaśkowski J. M., Zbylut J.

Selection and qualification of cows recipient for embryo transfer

Summary

The purpose of this investigation was to estimate a percentage of recipients selected from hormonally prepared cows on the basis of clinical, ultrasonographical and endocrinological investigations, that were carried out on a day of embryo transfer. 294 recipient cows (177 heifers and 117 cows) were used in the experiment. All animals were divided into two groups. Group I (n = 216, program I) received i.m. injections of 0.5 mg of cloprostenol (Bioestrophan, Biowet Gorzów Wlkp), group II (n = 78, program II) – the same doses 14 days apart. Signs of heat between 24 and 120 hours after PGs injections were observed in 222 (76%) recipients. Maximally synchronized oestrus, i.e. between 48 and 96 days after PGs injections, were noted in 203 (69%) of the cows – 139 (64.4%) and 118 (82.1%) cows from group I and II respectively. As suitable for transfer after clinical and ultrasonographical investigations were 147 (50%) and 145 (49.3%) of the recipients. More cows suitable for transfer were obtained from animals that had started with program II ($p < 0.05$). In both groups, however, progesterone concentration in blood plasma higher than 1 ng/ml was determined in 61.7-79.5% cows.

Keywords: cows, recipients, clinical, ultrasonographical, endocrinological classification.

Jednym z istotnych czynników warunkujących powodzenie transferu zarodków u bydła jest odpowiedni wybór bioreczyń. Ostateczna kwalifikacja bioreczyń, spośród optymalnie zsynchronizowanych samic przeprowadzana jest z reguły w oparciu o szczegółowe badanie narządu rodowego, dokonywane w dniu transferu zarodków. We współczesnej dobie podjęcie odpowiedniej decyzji umożliwia wykonanie dodatkowych badań z zastosowaniem ultrasonografu (1,8).

Celem pracy było określenie jak wysoki jest udział bioreczyń kwalifikowanych do transferu spośród hormonalnie przygotowywanych samic, po przeprowadzeniu w dniu transplantacji badania klinicznego, ultrasonograficznego oraz endokrynologicznego.

Materiał i metody

Badaniom poddano 294 bioreczynie mieszańce $cb \times hf$ – w tym 177 jałowic w wieku 15-18 miesięcy i 117 krów w wieku 3-6 lat. Wszystkie miały regularny cykl rujowy oraz cechowała je dobra kondycja fizyczna. Ruję u bioreczyń synchronizowano przy pomocy analogu prostaglandyny według jednego z ogólnie przyjętych programów. Samice podzielono na dwie grupy. Grupie I (n = 216), po przed-

nim badaniu jajników i stwierdzeniu obecności ciała żółtego podawano jednokrotną domięśniową (i.m.) iniekcję 0,5 mg cloprostenolu (Bioestrophan-Biowet Gorzów Wlkp.), grupie drugiej (n = 78) natomiast dwukrotną iniekcję preparatu, aplikowanego w 14 dniowym odstępie. Po iniekcji cloprostenolu przez 5 kolejnych dni samice poddawano szczegółowej obserwacji, odnotowując termin wystąpienia rui. W dniu transferu zarodków (7 dzień cyklu rujowego) wszystkie bioreczynie, u których ruja wystąpiła między 48 a 96 godziną po iniekcji prostaglandyny badano klinicznie, oceniając *per rectum* stan narządu rodowego, wielkość jajników oraz rozmiary ciała żółtego. W celu potwierdzenia diagnozy klinicznej przeprowadzono dodatkowo ultrasonograficzne badanie jajników, wykorzystując do tego celu ultrasonograf Pie-Medical – 400, wyposażony w głowicę, emitującą falę dźwiękową o częstotliwości 5 MHz. Na podstawie tych badań do transferu kwalifikowano wyłącznie samice, u których na jajniku stwierdzano obecność dobrze rozwiniętych struktur ciała żółtego.

Do weryfikacji diagnozy klinicznej i ultrasonograficznej zastosowano ocenę stężenia progesteronu we krwi. W tym celu od wszystkich zakwalifikowanych do transferu bioreczyń w dniu transferu zarodków, pobierano na heparynowane próbówki krew z żyły jarzmowej, a po jej odwiro-

Tab. 1. Występowanie rui po jednokrotnej (grupa I) lub dwukrotnej iniekcji prostaglandyny (grupa II)

Ruja po upływie (dni)	Grupa I						Grupa II						Razem					
	Jałowice		Krowy		Razem		Jałowice		Krowy		Razem		Jałowice		Krowy		Razem	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
24	17	17,9	0	0	17	10,8	0	0	0	0	0	0	17	12,9	0	0	17	7,7
48	8	8,4	20	31,7	28	17,7	7	16,7	0	0	7	10,9	15	10,9	20	24,1	35	15,8
72	49	51,6	40	63,5	89	56,3	26	61,9	20	90,9	46	71,9	75	54,7	60	72,3	135	60,8
96	19	20,0	3	4,8	22	13,9	9	21,4	2	9,1	11	17,2	28	20,4	5	3,6	33	14,9
120	2	2,1	0	0	2	1,3	0	0	0	0	0	0	2	1,1	0	0	2	0,8
Razem	95	100,0	63	100,0	158	100,0	42	100,0	22	100,0	64	100,0	137	100,0	83	100,0	222	100,0

Tab. 2. Liczba (%) krów biorczyń zarodków zakwalifikowanych do transferu na podstawie obserwacji rui oraz badania klinicznego i ultrasonograficznego

Wyszczególnienie	Grupa I			Grupa II			Razem		
	Jałowice	Krowy	Razem	Jałowice	Krowy	Razem	Jałowice	Krowy	Razem
Hormon. przygotowane biorczynie	124 (100,0)	92 (100,0)	216 (100,0)	52 (100,0)	26 (100,0)	78 (100,0)	176 (100,0)	118 (100,0)	294 (100,0)
Ruja 48-96h po inj. PGs	76 (61,3)	63 (68,5)	139 (64,4) ^a	42 (80,8)	22 (84,6)	64 (82,1) ^A	118 (67,0)	85 (72,0)	203 (69,0)
Pozostaje po badaniu klinicznym	51 (41,1)	45 (48,9)	96 (44,4) ^a	32 (61,5)	19 (73,1)	51 (65,4) ^A	83 (47,2)	64 (54,2)	147 (50,0)
Pozostaje po badaniu USG	53 (42,7)	45 (48,9)	98 (45,4) ^b	28 (53,8)	19 (73,1)	47 (0,3) ^B	81 (46,0)	64 (54,2)	145 (49,3)

Objaśnienia: grupa I – jednokrotna inj. cloprostenolu, grupa II – dwie inj. cloprostenolu w 14 dniowym odstępie, ab – $p < 0,05$, AB – $p < 0,01$.

waniu oceniano w osoczu stężenie hormonu metodą EIA. Za niedostateczne przyjmowano stężenie progesteronu poniżej 1 ng/ml.

Wyniki opracowano statystycznie, korzystając z testu chi-kwadrat.

Wyniki i omówienie

Ruję spośród 294 użytych do doświadczenia biorczyń wykazało w terminie 24-120 godzin 222 (76%) biorczyń, przy czym w grupie otrzymującej jednokrotną iniekcję prostaglandyny 158 (73,1%) spośród 216 biorczyń, natomiast po zastosowaniu dwukrotnej iniekcji – 64 (82%) spośród 78 samic. U pozostałych krów rui nie obserwowano, względnie pojawiła się ona przed upływem pierwszej lub po upływie piątej doby po iniekcji prostaglandyny. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy po jedno- lub dwukrotnej iniekcji prostaglandyny obserwowali ruję u 42,4-70 lub 78,5-90% krów (6, 7).

Tab. 1 przedstawia występowanie rui po jednokrotnym (grupa I) oraz dwukrotnym (grupa II) podaniu prostaglandyny. Jak wynika z tabeli 60,8% ogółu synchronizowanych samic wykazywało ruję w optymalnym ter-

minie tj. po 72 godzinach po podaniu cloprostenolu. Wyższy stopień synchronizacji rui uzyskiwano po dwukrotnej iniekcji preparatu ($p < 0,01$). W trzeciej dobie po drugiej iniekcji cloprostenolu ruję wykazało 71,9% biorczyń podczas gdy w grupie I – 56,3% biorczyń.

Tab. 2. Przedstawia liczbę i odsetek krów biorczyń zarodków dyskwalifikowanych na podstawie obserwacji rui oraz badania klinicznego i ultrasonograficznego. Spośród 222 biorczyń wykazujących ruję w ciągu pięciu dni po podaniu prostaglandyny na biorczynie przeznaczono 203 tzn. wszystkie te, które przejawiały ruję między 48 a 96 godziną po iniekcji preparatu. Samice te stanowiły 69% spośród wszystkich przygotowywanych biorczyń zarodków. Z innych badań wynika, że odsetek samic, u których czas synchronizacji rui nie przekraczał +24 godzin wynosił 70,2% (6).

W grupie I na podstawie badania klinicznego spośród 139 samic zakwalifikowano 96 krów, co stanowiło 69,1% krów wykazujących ruję w ciągu 48-96 godzin po podaniu prostaglandyny oraz 44,4% wszystkich krów przygotowywanych do transferu. Do najczęstszych przyczyn eliminacji biorczyń należał brak wyraźnie uformowanego ciała żółtego, stwierdzony

u 19 samic, patologiczne wypływy z dróg rodnych (u krów biorczyń) – 12, torbiele jajnikowe – 5 oraz nieprawidłowości szyjki macicznej, uniemożliwiające penetrację kanału szyjki macicznej przy pomocy katektoru – 2.

W grupie II spośród 64 biorczyń zakwalifikowanych do transferu, po przeprowadzeniu badania klinicznego zdyskwalifikowano 13 samic. W ten sposób po przeprowadzeniu badania klinicznego pozostawiono 51 samic, tj. odp. 79,7 oraz 65,4% samic wykazujących ruję między 48 a 96 godziną po iniekcji prostaglandyny oraz ogółu samic przygotowywanych farmakologicznie do transferu. Głównymi przyczynami dyskwalifikacji były: brak wyczuwalnych struktur ciała żółtego zanotowany u 6 biorczyń, torbiele jajnikowe – 2, patologiczne wypływy z dróg rodnych – 1 oraz nieprawidłowości szyjki macicznej – 4.

Liczba zakwalifikowanych biorczyń zarodków po przeprowadzeniu badania klinicznego w porównaniu do liczby wszystkich biorczyń przygotowywanych do transferu była wyższa w II grupie samic ($p < 0,01$).

Badanie ultrasonograficzne jajników pozwoliło na dodatkową weryfikację wyników. Ponieważ pozwala ono na precyzyjniejszą ocenę stanu morfologicznego jajników niż badanie kliniczne, w grupie I do samic przydatnych do transferu zaliczono ponownie 5 spośród biorczyń, które wykluczono z powodu braku wyczuwalnych struktur ciała żółtego (8). U tych biorczyń, jak się okazało, ciała żółte położone było wewnątrz miąższu jajnikowego. Równocześnie wykluczono trzy kolejne samice, z powodu dysfunkcji jajników.

W ten sposób na podstawie obserwacji rui oraz badania klinicznego i ultrasonograficznego jajników do transferu zakwalifikowano ostatecznie w grupie I 98 biorczyń tj. 70,5% samic wykazujących ruję podczas 48-96 godzin po podaniu cloprostenolu oraz 45,4% ogółu samic przygotowywanych do transplantacji zarodków.

W grupie II w wyniku badań ultrasonograficznych wyeliminowano dalsze 4 zwierzęta, pozostawiając 47 zwierząt tj. 73,4% samic wykazujących ruję pomiędzy 48 a 96 godziną po drugiej iniekcji cloprostenolu oraz 60,3% ogółu samic przygotowywanych farmakologicznie do transferu.

Liczba zakwalifikowanych samic po przeprowadzeniu badania klinicznego i ultrasonograficznego w porównaniu do liczby wszystkich przygotowywanych do transferu samic była wyższa w grupie II ($p < 0,05$).

Dodatkowe badanie poziomu progesteronu potwierdziły diagnozę kliniczną i ultrasonograficzną u 78 samic w grupie I. W grupie II spośród 47 zakwalifikowanych do transplantacji biorczyń, prawidłowe stężenie progesteronu stwierdzono u 29 biorczyń.

Z powyższych badań wynika zatem, że spośród ogółu biorczyń przygotowywanych do transferu, po przeprowadzeniu badania klinicznego i ultrasonograficznego jajników za przydatne – to jest maksymalnie zsynchronizowane, wykazujące dobrze rozwinięte struk-

tury ciała żółtego – uznano odp. 45,4 i 60,3% samic z grup I i II. Z 10-ciu przygotowywanych farmakologicznie biorczyń, zakwalifikowanych było po jednokrotnej iniekcji prostaglandyny cztery do pięciu biorczyń, po dwukrotnej iniekcji sześć.

Podobnego zdania są Munar i wsp. (6), którzy uważają, że odsetek przydatnych do transferu biorczyń po podaniu dwóch iniekcji analogu prostaglandyny delprostenate oraz przeprowadzeniu badania klinicznego wynosi – 53,2%.

Przeprowadzone dodatkowo badanie endokrynologiczne wskazuje, że w rzeczywistości do transferu nadawałoby się 61,7-79,5% biorczyń uznanych za przydatne wyłącznie na podstawie badania klinicznego i ultrasonograficznego. Uwzględniając powyższe dane, za wartościowe biorczynie należałoby uznać jedynie 36,1% samic w grupie I i 37,2% samic w grupie II. Wartości te są w dużym stopniu zbliżone z uzyskiwanymi przez nas w badaniach wstępnych. Po przeprowadzeniu analogicznych badań do transferu zakwalifikowano 36% biorczyń przygotowywanych jedną iniekcją cloprostenolu i 46,9% otrzymujących dwukrotną iniekcję preparatu (2).

W konkluzji nasuwają się dwa wnioski. Po pierwsze, przygotowując biorczynie do transferu zarodków w warunkach terenowych, już na wstępie należy uwzględnić fakt, że około 50% z nich zostanie zdyskwalifikowanych po przeprowadzeniu rutynowego badania klinicznego, uzupełnionego oceną ultrasonograficzną jajników. W efekcie część biorczyń przygotowywana jest do transferu dwa i więcej razy, co m.in. wskutek ich starzenia się, może się przyczynić do obniżenia wyników zacieleń po transplantacji zarodków. Z kolei mała liczba biorczyń oraz niedostateczne wyniki zacieleń sprzyjają opóźnieniu realizacji programów MOET. Równocześnie wyższy stopień synchronizacji i zarazem – co godne podkreślenia – większą liczbę przydatnych do transferu samic gwarantuje program zakładający dwukrotną iniekcję prostaglandyny.

Po drugie, obniżona sekrecja progesteronu – stwierdzana u około 20,5-38,3% zakwalifikowanych do transferu biorczyń może być jedną z przyczyn nie zawsze satysfakcjonujących wyników zacieleń, uzyskiwanych przez niektóre krajowe zespoły transplantacji zarodków (3, 4, 5).

Piśmiennictwo

1. Jackson S. P., Forrest D. W., Bondioli K. R., Looney C. R.: J. Dairy Sci. 67, 355, 1989.
2. Jaśkowski J. M., Zbylut J., Chaberski R.: Konf. „Aktualne zagadnienia z zakresu embriotransferu, higieny mleka i rozrodu zwierząt domowych” Polanica Zdrój, 1, 104, 1998.
3. Jaśkowski J. M.: Medycyna Wet. (w druku).
4. Koper A.: Transplantacja zarodków bydłych w OHZ Osięcin w latach 1990-1994. Praca magist. ATR, Bydgoszcz, 1996.
5. Morstin J., Pakula A., Gruszczyńska J.: Przegląd Hod. 61, 5, 1993.
6. Munar C. J., Nigro M. A.: Theriogenology 25, 175, 1986.
7. Roslanowski K., Ciszewski J., Czapliski R.: Biul. ART., Olsztyn 14, 39, 1982.
8. Sprecher D. J., Nebel R. L., Whitman S. S.: Theriogenology 31, 1165, 1989.