

Transfer zarodków bydłych w Polsce w latach 1997-1998 – skala i skuteczność metody

JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

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

Jaśkowski J. M.

Transfer of bovine embryos in Poland – scale and efficiency of the method

Summary

The efficiency of embryo transfer in cattle in Poland has been described. The number of superovulated cows in the years 1997 and 1998 was 736 and 390 respectively. 15 to 35.9 percent of all flushed donor cows were meat breeds, especially Limousine, Chereford and Piemontese. The average number of total embryos and oocytes and/or transferable embryos in 1997 and 1998 was 5.95 and 6.79 and/or 3.37 and 3.81. Those results have been discussed. The number of the transferred fresh embryos was in the compared years 1127 and 627 respectively, and frozen 1651 and 945. Pregnancy results after the direct transfer and the transfer of fresh and traditionally frozen and thawed embryos were 42.9 to 43.7% and 47.0 to 55.0%. Perspectives of direct transfer and transfer of in vitro cultivated embryos have been presented.

Keywords: embryo transfer, cattle, superovulation results, fresh, frozen/thawed, direct transfer, pregnancy results.

W myśl rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej z dnia 11 lutego 1999 r. w sprawie szczegółowych warunków weterynaryjnych przy pozyskiwaniu, konserwacji, obróbce, przechowywaniu, wprowadzaniu do obrotu lub wykorzystywaniu materiału biologicznego oraz prowadzeniu punktów kopulacyjnych, podmiot tworzący zespół pozyskiwania zarodków (ET) powinien m.in. prowadzić odpowiednią dokumentację działalności z zakresu transplantacji zarodków. Część z nich gromadzona przez nas od dwóch lat, jest podstawą niniejszego opracowania. Jego celem było przedstawienie skali transplantacji zarodków w kraju oraz jej skuteczności.

W Polsce działa obecnie 9 zespołów ET. Składają się one z dwóch, rzadziej z trzech osób. Wszystkie kierowane są przez lekarzy weterynaryjnych, z których pięciu spełnia już w chwili obecnej warunki stawiane przez w/w rozporządzenie, nakładające na kierującego zespołem ET obowiązek posiadania specjalizacji z rozrodu zwierząt. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że w połowie lat osiemdziesiątych powołano początkowo pięć, krótko potem zaś kolejne 9 zespołów transplantacji zarodków (13). Z liczby 14 zespołów ET na początku lat dziewięćdziesiątych działało 7-9 (23). Do dnia dzisiejszego pozostało pięć.

W tab. 1 przedstawiono wyniki transferu zarodków bydłych w Polsce w latach 1997 i 1998. Dane te porównano do analogicznych zebranych z dostępnego piśmiennictwa (5, 17, 19-22). W 1998 r. superowulację wywoływano u 390 krów to jest o 346 mniej niż w 1997 r. Liczba zabiegów pozyskiwania zarodków wynosiła 393. Dla porównania w 1997 r. była ona niemal dwukrotnie wyższa i zamknęła się liczbą 758. Dysproporcja pomiędzy liczbą krów dawczyń a liczbą zabiegów pozyskiwania zarodków wynikała z faktu, że w odniesieniu do niektórych krów, zabiegi pozyskiwania zarodków przeprowadzano więcej niż jeden raz podczas jednego okresu międzyciążowego. Równocześnie, w porównaniu do lat ubiegłych wzrósł odsetek pozytywnie reagujących dawczyń zarodków. Spośród 100 dawczyń wyraźną reakcję na podane gonadotropiny notowano u blisko 86 krów. W latach poprzednich prawidłową reakcję na preparaty gonadotropowe przejawiała 78-85% samic. Utrzymujący się wysoki odsetek prawidłowo reagujących samic może być efektem podawania nowszych, skuteczniejszych preparatów FSH (10, 11, 25, 26). Na uwagę zasługuje stopniowy wzrost udziału – pośród dawczyń zarodków – krów ras mięsnych. O ile w 1997 r. krowy ras mięsnych stanowiły 15% ogółu dawczyń, o tyle w 1998 r. – 35,9%. Do preferowanych ras należało bydło limousine, piemontese, charolaise oraz hereford. Pośród dawczyń zarodków niewielki był odsetek matek buhajów. Przykładowo w 1997 r. zarodki pozyskiwano zaledwie od 137 matek buhajów, wykonując 177 zabiegów pozyskiwania zarodków, to jest 19% ogółu samic poddawanych superowulacji (18). Podobna sytuacja była w latach poprzednich, w których zarodki

cję wywoływano u 390 krów to jest o 346 mniej niż w 1997 r. Liczba zabiegów pozyskiwania zarodków wynosiła 393. Dla porównania w 1997 r. była ona niemal dwukrotnie wyższa i zamknęła się liczbą 758. Dysproporcja pomiędzy liczbą krów dawczyń a liczbą zabiegów pozyskiwania zarodków wynikała z faktu, że w odniesieniu do niektórych krów, zabiegi pozyskiwania zarodków przeprowadzano więcej niż jeden raz podczas jednego okresu międzyciążowego. Równocześnie, w porównaniu do lat ubiegłych wzrósł odsetek pozytywnie reagujących dawczyń zarodków. Spośród 100 dawczyń wyraźną reakcję na podane gonadotropiny notowano u blisko 86 krów. W latach poprzednich prawidłową reakcję na preparaty gonadotropowe przejawiała 78-85% samic. Utrzymujący się wysoki odsetek prawidłowo reagujących samic może być efektem podawania nowszych, skuteczniejszych preparatów FSH (10, 11, 25, 26). Na uwagę zasługuje stopniowy wzrost udziału – pośród dawczyń zarodków – krów ras mięsnych. O ile w 1997 r. krowy ras mięsnych stanowiły 15% ogółu dawczyń, o tyle w 1998 r. – 35,9%. Do preferowanych ras należało bydło limousine, piemontese, charolaise oraz hereford. Pośród dawczyń zarodków niewielki był odsetek matek buhajów. Przykładowo w 1997 r. zarodki pozyskiwano zaledwie od 137 matek buhajów, wykonując 177 zabiegów pozyskiwania zarodków, to jest 19% ogółu samic poddawanych superowulacji (18). Podobna sytuacja była w latach poprzednich, w których zarodki

Tab. 1. Wyniki transferu zarodków w Polsce w latach 1997 i 1998

Oceniane parametry	Lata		
	1986-1996 (zakres)	1997	1998
Liczba samic poddanych superowulacji	276-696	736	390 (250)
Liczba zabiegów pozyskiwania zarodków	170-556	758	393
Odsetek pozytywnie reagujących dawczyń	78,7-79,9	85,9	85,2
Średnia liczba pozyskanych zarodków i oocytów	4,48-7,27	5,95	6,79
Średnia liczba zarodków zakwalifikowanych do ET lub mrożenia	2,30-3,88	3,37	3,81
Liczba zarodków zamrożonych	43-365	1285	700
Liczba transplantowanych zarodków świeżych	546	1127	672
Wskaźnik zacieleń po transferze świeżych zarodków (%)	brak szczegółowych danych	47,0	57,0
Liczba transplantowanych zarodków mrożonych (metoda tradycyjna)		792	333
a) własnych	302	549	252
b) powierzonych		243	81
Wskaźnik zacieleń po transferze zarodków mrożonych (metoda tradycyjna) (w %)		46,0	51,2
a) własnych	brak szczegółowych danych	43,9	50,8
b) powierzonych		60,1	51,9
Wskaźnik ciąży po przeniesieniu zarodków świeżych i mrożonych ogółem	32,2-51,8	47,0	55,0
Liczba transplantowanych zarodków mrożonych (direct transfer)		769	612
a) własnych	metoda nie stosowana	567	497
b) powierzonych		202	115
Wskaźnik zacieleń po transferze zarodków mrożonych (direct transfer)		43	43,8
a) własnych	brak danych	44	39,8
b) powierzonych		40	60,9

pozyskiwano od 14 – 49% matek buhajów (19, 20). Liczba pozyskanych zarodków i oocytów ogółem wyniosła w 1997 r. 4507, a w 1998 r. 2671, przy czym przeciętna liczba zarodków przydatnych do transferu wynosiła odp. 5,95 i 6,79. Liczba ta jest nieznacznie niższa od analogicznych uzyskiwanych w krajach UE. Biorąc pod uwagę fakt rosnącego udziału pośród dawczyń zarodków, kilkunastomiesięcznych jałowic, od których z reguły pozyskuje się mniej zarodków niż od krów dorosłych, wynik ten należy uznać za satysfakcjonujący (12).

Efektywność pozyskiwania zarodków zależy od różnorodnych czynników (4-6, 24, 26). Z danych dostępnych w piśmiennictwie krajowym wynika, że do istotnych przyczyn niedostatecznej efektywności pozyskiwania zarodków należeć może nieterminowe podawanie hormonów gonadotropowych (22). Naszym zdaniem, co najmniej równie istotna jest nieprawidłowa selekcja krów polegająca – w imię złe pojętego interesu hodowcy – na wykorzystywaniu jako dawczyń za-

rodków, samic wykazujących wcześniej zaburzenia porodowe i poporodowe (14). Dopuszczane do krajowych programów MOET były także krowy jałowięjące (17). Do znaczących przyczyn niepowodzeń należy także, zwłaszcza w ośrodkach hodowlanych nie posiadających większego doświadczenia w zakresie transferu zarodków, niedostateczna obserwacja rui i nieterminowe unasienianie dawczyń (13). Należy jednocześnie pamiętać, że o sukcesach zagranicznych zespołów ET decyduje m.in. dokładna analiza danych i na ich podstawie wybór – spośród stawki wypłukanych dawczyń tych – u których wyniki pozyskiwania zarodków były ponad przeciętne.

W 1998 r. przeniesiono 672 świeżych zarodków to jest o 455 mniej niż w 1997 r. Przeciętny wskaźnik zacieleń wyniósł w latach 1997 i 1998 odp. 47 i 57%.

W latach 1997 i 1998 przeniesiono 1561 oraz 945 zarodków mrożonych ogółem, z tego mrożonych i rozmrażanych tradycyjną metodą wielostopniową, sporadycznie metodą „one step” odp. 792 i 333. Pozostałe

769 i 612 stanowiły zarodki mrożone przeznaczone do transferu bezpośredniego. Spośród transplantowanych, tradycyjnie mrożonych i rozmrażanych zarodków zacieliło się 46 i 51,2% biorecipientów. Lepsze wyniki zacielenia uzyskiwano, używając zarodków powierzchniowych. Równocześnie obserwowano znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi zespołami w skuteczności przenoszenia zarodków zarówno świeżych jak i mrożonych. Jak wiadomo przyczyny tych różnic mogą być rozmaite i niekoniecznie zależą od sprawności technicznej zespołów transplantacji zarodków (19, 26). Z własnych obserwacji wynika, że pewien wpływ na wysokość wskaźnika zacielenia mogą mieć także nie zawsze optymalne metody przygotowywania oraz selekcji biorecipientów w dniu transferu zarodków. Spośród uznanych za przydatne do transferu na podstawie badania klinicznego biorecipientów u 16 do 39% notowano obniżone stężenie progesteronu we krwi (15).

Zagadnieniem nowym, jest coraz częstsze korzystanie przez krajowe zespoły ET z zarodków mrożonych, podczas przygotowania których zamiast glicerolu używano glikolu propylenowego. Zarodki te nadają się do tzw. transferu bezpośredniego (direct transfer), tj. transplantacji bez konieczności stopniowego i pracochłonnego usuwania z zarodków środka osłaniającego. Udział zarodków mrożonych przeznaczonych do transferu bezpośredniego w latach 1997 i 1998 wyniósł odp. 49,3 i 64,8% wszystkich mrożonych zarodków. Jak wynika z danych tab. 1, niewielką część z nich zespoły otrzymywały z zakupu, większość przygotowywały samodzielnie. Wskaźnik zacielenia w porównywanych latach wyniósł dla zarodków mrożonych w glikolu propylenowym 43 i 43,8% i był niższy niż po zastosowaniu tradycyjnej metody mrożenia i rozmrażania zarodków. Badacze japońscy i francuscy porównując kilkutysięczną grupę biorecipientów zarodków nie stwierdzali istotnych różnic we wskaźniku zacielenia po zastosowaniu tej metody (1, 3, 7). Uwzględniając uproszczenie protokołu rozmrażania, a przede wszystkim dużą oszczędność czasu i obniżenie kosztów należy przypuszczać, że znaczenie tej metody będzie w kraju szybko rosnąć. Na podkreślenie zasługuje stała poprawa wskaźnika zacielenia zarówno po transferze zarodków świeżych jak i mrożonych. Jak wiadomo efektywność transferu zależy może od wielu czynników – jakości i stadium rozwoju zarodków, pory roku w której dokonywany był transfer, wieku biorecipientów, liczby dokonywanych na biorecipientce zabiegów transplantacji zarodków, stopnia zsynchronizowania biorecipientów oraz innych (27). Naszym zdaniem, rysująca się w ostatnich dwóch latach poprawa efektywności transferu – mierzona wysokością wskaźnika zacielenia – jest efektem wprowadzania obowiązku korzystania przez krajowe zespoły ET z uznanych i renomowanych pożywek do hodowli i konserwacji zarodków. Z danych krajowych wynika, że tylko profesjonalne pożywki zapewniają uzyskiwanie satysfakcjonujących wyników zacielenia (27). Nie bez znaczenia jest także rosnące doświad-

czenie zespołów, optymalizacje programów konserwacji zarodków oraz sumienny dobór biorecipientów i precyzyjne wykrywanie rui (3, 13).

Na początku lat 90-tych donoszono o narodzeniu w kraju cieląt pochodzących z zarodków wyhodowanych *in vitro*, a także skutecznym przeniesieniu importowanych zarodków mrożonych hodowanych w warunkach laboratoryjnych, tym niemniej transfer zarodków produkowanych w ten sposób nie ma w kraju na razie większego znaczenia praktycznego (2, 16). Z nowszych badań eksperymentalnych wynika, że po transferze dojrzałych zarodków, wyhodowanych *in vitro* z oocytów, pozyskanych drogą OPU (ovum pick up) – czyli ich aspiracji wraz z płynem pęcherzykowym przy pomocy ultrasonografu, którego głowica sprzężona jest z igłą punkcyjną – w ciążę zachodzić może 40% biorecipientów (7, 8).

Piśmiennictwo

1. Arreseigor C. J., Sisul A., Arreseigor A. E., Stahringer R. C.: *Theriogenology* 49, 160, 1998.
2. Chmielnik H., Sawa A.: *Przegląd Hod.* 64, 6, 1996.
3. Cseh S., Seregi J., Solti L.: *Theriogenology* 41, 185, 1994.
4. Członkowska M.: „Zastosowanie biotechnologii w produkcji zwierzęcej” *Pielno PAN W-wa*, 1, 57, 1988.
5. Członkowska M., Papis K., Kaźmierczak Z.: *Przegląd Hod.* 56, 18, 1988.
6. Dettler J., Schmidt T., Marlizius B.: *Theriogenology* 47, 169, 1997.
7. Dochi O., Yamamoto Y., Saga H., Yoshida N., Kano N., Maeda J., Miyata K., Yamauchi A., Tominaga K., Oda Y., Nakashima T., Inohae S.: *Theriogenology* 49, 1051, 1998.
8. Duszewska A. M.: *Przegląd Hod.* 65, 25, 1997.
9. Duszewska A. M., Wojdan J., Kolodziejki Z., Buczek P., Gawron W., Cybulska M., Pieńkowski M.: *Anim. Sci. Papers and Rep.* 16, 67, supl. 1, 1998.
10. Jaśkowski J. M., Hutnikiewicz I. M.: *Lek. Pol.* 1, 2, 1996.
11. Jaśkowski J. M., Zbylut J., Hutnikiewicz I. M.: *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 40, 41, 1996.
12. Jaśkowski J. M., Zbylut J., Urbaniak K.: *Życie wet.* 72, 137, 1997.
13. Jaśkowski J. M.: *Konf. Aktualne zagadnienia z zakresu embriotransferu, higieny mleka i rozrodu zwierząt domowych*, Polanica Zdr. 1, 19, 1998.
14. Jaśkowski J. M., Zbylut J., Urbaniak K.: *Medycyna Wet.* 1999 (w druku).
15. Jaśkowski J. M., Zbylut J.: *Medycyna Wet.* 56, 2000 (w druku).
16. Kątska L., Smorąg Z., Bąk M., Wierzbowski S.: *Medycyna Wet.* 47, 169, 1991.
17. Koper A.: *Transplantacja zarodków bydłowych w OHZ Osiecinie w latach 1990-1994*. Praca mag., ART Bydgoszcz, 1996.
18. Morawska K., Robak M., Poczynajło S.: *Ocena wartości użytkowej krów oraz ocena i selekcja buhajów*. Wyniki za 1998 rok. CSHZ., W-wa 1998.
19. Morstin J., Pakula A., Gruszczyńska J.: *Przegląd Hod.* 61, 5, 1993.
20. Pakula A., Bruś K., Skowron M., Ziomko M., Wojdan J.: *Przegląd Hod.* 17, 18, 1989.
21. Pakula A., Skowron M., Chmielowska M.: „Wybrane aspekty stosowania metody przenoszenia zarodków w hodowli bydła”, *Mat. Konf. Golejowko* 1996.
22. Tischner M., Boryczko Z.: *Nowa Weterynaria* 2, 78, 1997.
23. Wierchoś E.: *Praktyczne aspekty rozrodu zwierząt*. PAU, Kraków, 1, 97, 1993.
24. Wierzbowski S., Wierchoś E.: *Przegląd Hod.* 53, 6, 1985.
25. Zbylut J., Jaśkowski J. M., Rogoziewicz M.: *Byd. Biul. Wet.* 5, 11, 1995.
26. Znaniecki R., Jaśkowski J. M.: *Medycyna Wet.* 53, 454, 1997.
27. Znaniecki R., Jaśkowski J. M., Znaniecka E.: *Medycyna Wet.* 54, 550, 1998.