Efektywność pozyskiwania zarodków w zależności od miejsca deponowania nasienia w rui indukowanej u krów dawczyń

**JUSTYNA ŻYCHLIŃSKA-BUCZEK, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI*,
ZYGUNT GIL, ZUZANNA HERÓD**

Instytut Nauk o Zwierzętach, Zakład Hodowli Bydła, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

*Instytut Weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Otrzymano 20.05.2015

Zaakceptowano 31.05.2016

Żychlińska-Buczek J., Jaśkowski J. M., Gil Z., Heród Z.

Influence of semen placement location and other factors on the number and morphological status of obtained embryos from donor cows

Summary

The aim of the study was to analyze the effectiveness of embryo collection depending on where semen in superovulation cow-donors in heat is deposited.

Research was carried out on 44 embryo donors, including 26 heifers and 18 cows of the Polish Holstein-Friesian breed. Manipulations were carried out with the participation of veterinary doctors who specialize in embryo transfer. The estrus cycle of the future donors was synchronized with the double intramuscular injection of 2 ml Cloprostenol (Oestrophan, Biofaktor Company), Dinolytic (Pfizer Polska Sp. z o.o.) 5 ml or Bioestrovet (0.5 mg of Cloprostenol – active substance) (Vetoquinol, Biowet Sp. z o.o.) 2 ml administered for 11 days.

Superovulation was initiated at day 10th of an estrus cycle – administered by injection of 10 ml of FSH (Pluset) during 4 consecutive days (in the morning and in the evening). Estrus was induced on the 3rd day of the superovulation treatment by providing 500 µg and 250 µg of Cloprostenol (Bioestrovet) twice – 2 ml in the morning and 1 ml in the evening. Subsequently, 25 donors were inseminated three times, another 19 were inseminated twice with single or double doses of semen deposited at different locations inside the uterus. Donors were inseminated with frozen semen which is used for standard AI.

Obtained results showed a significant influence of placement location of semen on the efficiency of embryos' collection. The highest ratio (40.4%) of embryos and oocytes was obtained in the case when semen was itself placed in the uterine horn. The lowest ratio (16.2%) was observed in the case when semen was placed in the uterus. Moreover, a difference in the number of obtained oocytes and embryos depends on the sequence of semen placement locations. In the case of location in the uterus body versus uterine horn 0.6 more embryos and oocytes were collected. The number of embryos suitable for transfer was the highest when semen was placed in the uterine horn.

Concluding, the uterine horn appeared to be the best place for semen location.

Keywords: heifer, cow, semen placement location, embryo

Przenoszenie zarodków ze względu na swoje walory znajduje zastosowanie w nowoczesnej hodowli, szczególnie w hodowli bydła. Obok inseminacji jest biotechniką rozrodu znacznie przyspieszającą postęp hodowlany. Metoda ta rozszerza możliwości wynikające z inseminacji, a w związku z zastosowaniem zaawansowanej techniki, wymaga zaangażowania bardziej wykwalifikowanego personelu, specjalistycznego sprzętu i odpowiedniego przygotowania zwierząt.

W rezultacie – w porównaniu do inseminacji – jest to metoda biotechniczna o wiele droższa.

Efektywność przenoszenia zarodków uwarunkowana jest wieloma czynnikami. Jednym z istotnych czynników mających wpływ na opłacalność tej metody jest liczba pozyskiwanych zarodków. Zależy ona m.in. od miejsca depozycji nasienia w drogach rodnych dawczyni. Na ogół uważa się, że głębokie, drogowe wprowadzenie nasienia (krzywizna duża macicy) lub

inseminacja w okolicie cieśni jajowodu może wpłynąć na zwiększenie odsetka zapłodnionych oocytów – w konsekwencji liczbę zarodków – stanowiąc rozwiązanie lepsze od metody standardowej polegającej na depozycji nasienia do trzonu macicy.

Celem badań była analiza efektywności pozyskiwania zarodków w zależności od miejsca deponowania nasienia w rui superowulujących krów dawczyń.

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone na 44 dawczyniach zarodków, w tym 26 jałówek i 18 krowach rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, znajdujących się w 12 ośrodkach hodowli bydła.

Wszystkie zabiegi wykonywane były przy współpracy lekarzy weterynarii, wyspecjalizowanych w przenoszeniu zarodków u bydła. Zwierzęta podczas kwalifikacji do superowulacji poddawane były selekcji pod względem wartości hodowlanej w oparciu o ścisłą analizę rodowodów, wyników produkcyjnych oraz eksterieru. Szczególną uwagę zwracano na stan zdrowia i dotychczasową przydatność do rozrodu.

Cykl rujowy przyszłych dawczyń synchronizowano za pomocą dwukrotnej domięśniowej iniekcji 500 µg kloprostenolu (2 ml preparatu Bioestrovit (Vetoquinol), względnie preparatów Oestrophan firmy Biofaktor, 25 mg dinoprostu podanego w postaci soli trometamolu (5 ml preparatu Dinolytic, firmy Pfizer Trading Polska Sp.) podanej w 11-dniowym odstępie. Superowulację wywoływano jedynie u samic, które po drugiej iniekcji kloprostenolu wykazywały pełnoobjawową ruję.

W 10. dniu cyklu rujowego rozpoczynano superowulację, podając przez 4 kolejne dni (rano i wieczorem) 250 IU FSHp oraz 250 IU LHp (10 ml preparatu Pluset® Carlier) w zmniejszających się dawkach. Ruję indukowano w trzecim dniu superowulacji, podając domięśniowo, rano a następnie wieczorem 500 µg i 250 µg (zawartych w 2 i 1 ml preparatu Bioestrovit, Vetoquinol). Następnie 25 samic unasienniano trzykrotnie, pozostałe 19 dwukrotnie podwójną lub pojedynczą dawką nasienia wprowadzaną do różnych miejsc światła macicy – dorogowo – do krzywizny dużej rogu macicy lub do jej trzonu. Schemat inseminacji przedstawiono w tab. 1 i 2. W badaniach wykorzystywano nasienie mrożone (słomki 0,25 ml, całkowita liczba plemników 10 mln).

W 7. dniu po inseminacji zarodki pozyskiwano metodą niechirurgiczną. Tuż przed zabiegiem samice znieczulano 1,12 mg podskórnie podanego chydrochlorku ksylazyny (0,5 ml na zwierzę (Xylavet 2%, Alfasan International BV, Holandia) oraz wykonywano znieczulenie nadoponowe polokainą 6-10 ml/szt. (Polocainum Hydrochloricum 2% cum Adrenalino 0,005% firmy Biowet Drwalew S.A.). Następnie oczyszczono okolice sromu i wprowadzono kateter. Do zabiegu używano kateteru Ruscha, tylko u dwóch krów użyto kateteru Foleya i u jednej kateteru Lamper. Balonik kateteru wypełniono 15 ml powietrza. Do jednego rogu deponowano łącznie 250 ml podgrzanego do temperatury ciała kompletnego płynu do wypłukiwania zarodków

Boviflash (Bioniche). Płyn zbierano do szklanego naczynia, a następnie wykonano analogiczny zabieg w drugim rogu.

Zarodki wyszukiwano oraz oceniano morfologicznie pod mikroskopem stereoskopowym (powiększenie 80 ×). Do oceny zarodków wykorzystywano 4-stopniową skalę, w której stopniowi pierwszemu odpowiadał zarodek bardzo dobrej jakości, natomiast czwartemu zarodek zdegenerowany (nieдостatecznej jakości).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej. Wpływ miejsca deponowania nasienia w rui indukowanej u krów dawczyń na odsetek uzyskanych zarodków oceniano przy pomocy testu χ^2 . Obliczono również wartość średnią oraz procentowy udział zarodków. Analizę przeprowadzono w programie Excel.

Wyniki i omówienie

Tabele 3 i 4 mają wyłącznie charakter informacyjny i przedstawiają liczbę samic poddanych zabiegowi inseminacji oraz liczbę pozyskanych zarodków ogółem.

Tab. 1. Schemat inseminacji z uwzględnieniem liczby wykonanych zabiegów

Liczba zabiegów inseminacji	Miejsce zdeponowania nasienia w macicy; liczba samic (n)			
	trzon	trzon/róg	róg/trzon	róg
2	1	10	2	4
3	2	–	–	1
3	–	–	6	–
3	16	–	–	–
2	2	–	–	–

Tab. 2. Schemat inseminacji z uwzględnieniem liczby porcji zużytego nasienia

Liczba zabiegów inseminacji i porcji nasienia*	Miejsce zdeponowania nasienia w macicy; liczba samic (n)			
	trzon	trzon/róg	róg/trzon	róg
2 (1/1)	1	10	2	4
3 (1/1/1)	2	–	–	1
4 (1/2/1)	–	–	6	–
4 (2/1/1)	16	–	–	–
3 (2/1)	2	–	–	–

Objaśnienia: *X (a/b/c) – liczba zużytych porcji nasienia ogółem, (a/b/c) – liczba zużytych porcji podczas jednego zabiegu

Tab. 3. Liczba samic poddanych zabiegowi inseminacji

Miejsce zdeponowania nasienia w macicy			
trzon	trzon/róg	róg/trzon	róg
21	10	8	5

Tab. 4. Liczba pozyskanych zarodków ogółem

Oznaczone parametry	Miejsce zdeponowania nasienia w macicy			
	trzon	trzon/róg	róg/trzon	róg
Liczba uzyskanych zarodków i komórek jajowych	68	40	37	40
Liczba uzyskanych zarodków	40	39	20	31
Zarodki przydatne do przeniesienia	33	28	19	23

Tab. 5. Efektywność pozyskiwania zarodków oraz ich odsetek w zależności od miejsca deponowania nasienia

Oznaczone parametry	Miejsce zdeponowania nasienia w macicy			
	trzon	trzon/róg	róg/trzon	róg
Uzyskane zarodki i komórki jajowe	3,2 (16,2)*	4 (20,2)	4,6 (23,2)	8 (40,4)
Uzyskane zarodki	1,9 (13,1)	3,9 (26,9)	2,5 (17,2)	6,2 (42,8)
Zarodki przydatne do transferu	1,6 (14,0)	2,8 (24,6)	2,4 (21,0)	4,6 (40,4)

Objaśnienia: * – odsetek uzyskanych zarodków

W tab. 5 przedstawiono efektywność pozyskiwania zarodków oraz ich odsetek w zależności od miejsca deponowania nasienia. Z danych wynika, iż najwięcej zarodków i komórek jajowych uzyskano po zdeponowaniu nasienia do rogu, a najmniej deponując nasienie do trzonu macicy, odpowiednio, 8 wobec 3,2. Podobnie najwyższą liczbę zarodków przydatnych do transferu uzyskiwano deponując nasienie do rogu macicy, najmniej wprowadzając je do trzonu macicy – odpowiednio, 4,6 wobec 1,6. Zaobserwowano również różnicę w liczbie pozyskanych zarodków i komórek jajowych oraz zarodków przydatnych do transferu przy zmianie kolejności miejsca deponowania nasienia, gdyż przy zachowaniu kolejności trzon – róg macicy można było uzyskać średnio o 0,6 zarodków i komórek jajowych więcej, co nie miało jednak odzwierciedlenia w liczbie zarodków przydatnych do transferu. Spostrzeżenie to wydaje się interesujące, jednak niedostateczna liczba obserwacji nie daje podstaw do szerszych wniosków. Konieczne są dalsze badania.

Analiza danych wskazuje na istotny wpływ miejsca deponowania nasienia na efektywność pozyskiwania zarodków. Potwierdza to również test χ^2 zgodności z rozkładem ($\chi^2 = 7,91$), który wykazał istotne różnice między miejscem zdeponowania nasienia a liczbą pozyskanych zarodków.

Wpływ miejsca zdeponowania nasienia na wyniki zacielen był przedmiotem wielu badań (5, 6, 9, 11, 12). Część z nich poświęcona jest efektywności superowulacji, mierzonej liczbą zarodków przydatnych do transferu po zastosowaniu nasienia sortowanego, o zmniejszonej w porównaniu do mrożonego nasienia konwencjonalnego liczbie plemników w dawce. W takim przypadku głębokie deponowanie nasienia było zabiegiem wskazanym, zwłaszcza przy stosunkowo małych dawkach nasienia (1). Mniej zapłodnionych komórek uzyskiwano stosując mrożone nasienie seksowane w porównaniu do nieseksowanego oraz przy zastosowaniu dawki 2×10^6 w porównaniu do dawek wyższych. Użycie dawki zawierającej 20×10^6 plemników sortowanych pozwalało uzyskiwać liczbę zarodków porównywalną do uzyskiwanej po zastosowaniu nieseksowanego nasienia zawierającego 40×10^6 plemników (8). Przy dawkach nasienia sortowanego stosowanego konwencjonalnie (około 2 mln), wystarcza wprowadzenie nasienia do trzonu macicy (4). Opinie odnośnie do istotności miejsca deponowania nasienia konwencjonalnego

są podzielone. Niektórzy autorzy (9, 11) uzyskiwali istotnie lepsze wyniki zacielen, deponując nasienie do rogów macicy, inni (3, 5, 9) efektu takiego nie uzyskiwali. Deponując nasienie w rogach macicy uzyskiwano wzrost liczby zarodków; efektu takiego nie notowano wprowadzając nasienie do trzonu macicy. Niezależnie od miejsca deponowania nasienia u krów, w przeciwieństwie do jałowic, nie uzyskiwano różnic w odniesieniu do liczby zapłodnionych komórek jajowych i zarodków. Stwierdzono natomiast, że istotny wpływ na jakość uzyskiwanych zarodków miały – stwierdzone cytologicznie – podkliniczne stany zapalenia błony śluzowej macicy (2). Wraz z badaniami nad miejscem deponowania nasienia, prowadzone są prace nad ulepszaniem sprzętu do głębokiej inseminacji (10), służącemu z założenia poprawie wyników zacielen. Prowadzone są również badania nad wpływem miejsca deponowania nasienia na płęć rodzących się cieląt. Zobel i wsp. (12) wykazali, że przy deponowaniu nasienia do rogów macicy rodziło się więcej cieliczek, natomiast jego wprowadzenie do trzonu macicy skutkowało większą liczbą buhajków. Jak wynika z powyższego, badania nad miejscem deponowania nasienia prowadzone są wieloaspektowo, a tematyka badań nadal pozostaje aktualna.

Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że – uwzględniając liczbę zarodków przydatnych do transferu – najbardziej wskazanym miejscem deponowania nasienia mrożonego pakowanego w standardowe słomki u krów dawczyń zarodków są rogi macicy.

Piśmiennictwo

1. An L., Wu Z. H., Wu Y. F., Zhang X. L., Liu X., Zhu Y. B., Cheng W. M., Gao H. M., Guo M., Tian J. H.: Fertility in single-ovulating and superovulated dairy heifers after insemination with low dose sex-sorted sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2010, 45, 344-350.
2. Carvalho P. D., Souza A. H., Sartori R., Hackbart K. S., Dresch A. R., Vieira L. M., Baruselli P. S., Guenther J. N., Fricke P. M., Shaver R. D., Wiltbank M. C.: Effects of deep-horn AI on fertilization and embryo production in superovulated cows and heifers. *Theriogenology* 2013, 80, 1074-1081.
3. Hawk H. W., Tanabe T. Y.: Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single ovulating cattle. *J. Anim. Sci.* 1986, 63, 551-560.
4. Kaimio I., Mikkola M., Lindeberg H., Heikkinen J., Hasler J. F., Taponen J.: Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* 2013, 80, 950-954.
5. Kurtyn J., Jaakma Ü., Jalakas M., Aidnik M., Waldmann A., Majas L.: Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* 2007, 67, 754-759.
6. Lopez-Gatius F.: Site of semen deposition in cattle: a review. *Theriogenology* 2000, 53, 1407-1414.
7. McKenna T., Lenz R. W., Fenton S. E., Ax R. L.: Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. *J. Dairy Sci.* 1990, 73, 1779-1783.
8. Schenk J. L., Suh T. K., Seidel G. E. Jr.: Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 2006, 65, 299-307.
9. Senger P. L., Becker W. C., Davidge S. T., Hillers J. K., Reeves J. J.: Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 1988, 66, 3010-3016.
10. Soom A. van, Verberckmoes S.: Deep intrauterine insemination in cattle. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2004, 32, 911-915.
11. Williams B. L., Gwazdauskas F. C., Whittier W. D., Pearson R. E., Nebel R. L.: Impact of site of inseminate deposition and environmental factors that influence reproduction of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1988, 71, 2278-2283.
12. Zobel R., Gereš D., Pipal I., Buić V., Gračner D., Tkalcic S.: Influence of the semen deposition site on the calves' sex ratio in Simmental dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 2011, 46, 595-601.

Adres autora: dr inż. Justyna Żychlińska-Buczek, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; e-mail: jzychlin@ar.krakow.pl