

MARIA SKRZYSZOWSKA, RYSZARD ZNANIECKI*
STANISŁAW BYCHAWSKI*, ZDZISŁAW SMORĄG

Przenoszenie dzielonych zarodków bydlęcych*)

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa

* Wojewódzki Zakład Weterynarii, Ośrodek Przenoszenia Zarodków, ul. Boczna 8, 82-200 Malbork

W latach osiemdziesiątych wykonano szereg prac dotyczących bisekcji zarodków zwierząt gospodarskich, głównie bydlęcych (1, 2, 7, 12, 15, 20), a także owczych (3, 4, 5), kozich (16), świńskich (11) i końskich (14).

W większości przeprowadzonych prac przed zabiegiem bisekcji usuwano osłonki przejrzyste. Następnie otrzymane połówki ponownie umieszczano w zastępczych osłonkach przejrzystych. Uzyskiwano je z zarodków morfologicznie nieprawidłowych, bądź z pęcherzykowych oocytów bydlęcych lub świńskich. Wykorzystywano także macierzyste osłonki przejrzyste zarodków poddawanych bisekcji. Stosując ten sposób postępowania uzyskano u bydła efektywność przenoszenia połówek zarodków wahającą się od 16% do ok. 70% (1, 2, 7, 12, 15, 20).

Jak stwierdzono, rezultaty te otrzymano w wyniku przenoszenia połówek umieszczanych w zastępczych osłonkach przejrzystych. Jest to zabieg dość czasochłonny, stąd rosnące zainteresowanie próbami przenoszenia „nagich” połówek zarodków.

Jak dotychczas stosunkowo nieliczne obserwacje przeprowadzono nad przenoszeniem połówek pozbawionych osłonek przejrzystych. Wyniki pierwszych badań z tego zakresu były jednak zachęcające. Voelkel i wsp. (17) porównywali skuteczność przenoszenia „nagich” połówek zarodków bydlęcych z umieszczanymi w osłonkach stwierdzając, że odsetek ciężarnych biorczyń układał się na zbliżonym poziomie, gdyż efektywność przenoszenia „nagich” połówek wynosiła 42%, a umieszczanych w osłonkach 37%. Podobne rezultaty uzyskali ostatnio Warfield i wsp. (18) oraz Mc Evoy i wsp. (9).

Podjęte przez nas badania miały na celu określenie możliwości uzyskiwania monozygotycznego potomstwa u bydła po przeniesieniu „nagich” połówek otrzymanych w wyniku bisekcji zarodków.

Materiały i metody

Zarodki 7–8-dniowe (późne morule do ekspandujących blastocyst) uzyskiwano od dawczyń rasy ncb w wieku 5–8 lat o wydajności wynoszącej co najmniej 6 tys. litrów mleka przygotowywanych według następującego schematu.

Superowulację wywoływano podając w 9, 10 lub 11 dniu cyklu gonadotropiny (PMSG lub FSH). W przypadku PMSG podawano 3000 j.m. w dwu równych dawkach. Po dwóch dniach od iniekcji hormonu podawano 3 ml analogu prostaglandyny PGF_2 (Oestrophon). Po kolejnych dwóch dniach występowała ruja i wówczas krowy były dwukrotnie inseminowane w odstępach 12-godzinnych podwójną dawką nasienia

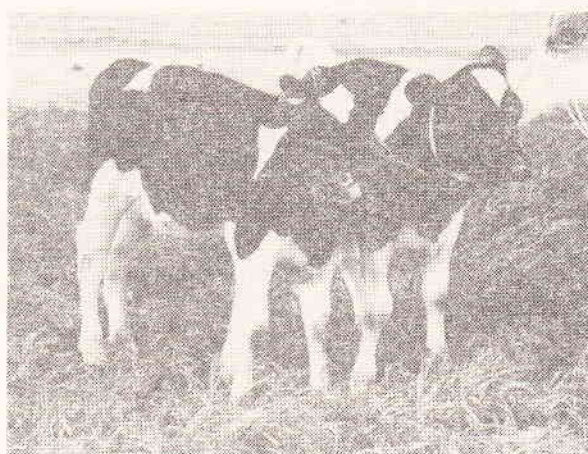
mrożonego. Zarodki uzyskiwano po 7–8 dniach od wystąpienia rui (dzień rui=dzień 0). Wyplukiwanie zarodków odbywało się na drodze niechirurgicznej, przy użyciu katetera Cassou.

Do wyplukiwania zarodków używano płynu Dulbecco uzupełnionego albuminą w ilości 1 g/litr. Zarodki po wyszukaniu i ocenie umieszczano w płynie Dulbecco z dodatkiem 20% surowicy płodów cielęcych (FCS).

Bisekcji poddawano wyselekcjonowane zarodki o prawidłowej budowie morfologicznej. W celu przeprowadzenia bisekcji zarodki umieszczano na szkiełku podstawowym w małej objętości płynu. Zabiegu dokonywano przy użyciu mikroskalpela umocowanego na ramieniu mikromanipulatora Prior. Zarodek dzielono w płaszczyźnie pionowej dokonując cięcia przez osłonkę przejrzystą w przybliżeniu na dwie równe części. Zwracano przy tym uwagę na prawidłowy podział komórek wężła zarodkowego i trofoblastu. Połówki zarodków uzyskane po bisekcji przetrzymywano w pożywce Manezo B_2 (10) pod olejem parafinowym w atmosferze 5% CO_2 w powietrzu, w temperaturze pokojowej (22–25°C) przez okres 2–3 godzin. Zarodki transportowano z laboratorium do obór biorczyń w słomkach wypełnionych także pożywką Manezo B_2 o temperaturze 20–25°C. Czas transportu zarodków wynosił od 30 do 60 min.

Połówki zarodków przenoszono zsynchronizowanym jałówkom rasy ncb w wieku 18 miesięcy, o ciężarze ok. 350 kg. Synchronizację cyklu rujowego z wiekiem przenoszonych zarodków uzyskiwano przez jednorazowe podanie 2 ml analogu prostaglandyny PGF_2 (Oestrophon). Kwalifikacja biorczyń była dokonywana na podstawie badania rektalnego narządów rodnych samicy, przeprowadzonego w przeddzień planowanego zabiegu. Zwracano szczególną uwagę na obecność prawidłowo wykształconego ciała żółtego. Przenoszenie zarodków odbywało się na drodze niechirurgicznej przy użyciu pistoletu Cassou. Oceny skuteczności przenoszenia dokonywano na podstawie wycieleń. W ocenie statystycznej wyników zastosowano test chi-kwadrat.

*) Praca wykonana w ramach programu CPBP 05.06.



Ryc. 1. Para monozygotycznych bliźniąt urodzonych po przeniesieniu zarodka poddanego bisekcji

Tab. 1. Wyniki przenoszenia połówek zarodków bydłych

Liczba przenoszonych połówek jednej biorczyń	Liczba zarodków poddanych bisekcji	Liczba biorczyń	Ogólna liczba przesienionych połówek lub zarodków całych	Liczba wycielonych biorczyń	% wycielonych biorczyń	% cieląt w stosunku do liczby zarodków
1	15	29	29	7*)	24	46,6
2	29	29	58	8**)	28	38
całe zarodki (kontrola)	—	72	72	26	36	36

Objaśnienia: *) stwierdzono 1 parę monozygotycznych bliźniąt, **) cztery porody bliźniacze

Wyniki i omówienie

29 biorczyńm przeniesiono 29 „nagich” połówek uzyskanych w wyniku bisekcji 15 blastocyst. Stwierdzono 7 ciężarnych biorczyń, z których dwie dały parę monozygotycznych bliźniąt (ryc. 1). Efektywności przenoszenia pojedynczych połówek oceniana na podstawie liczby przenoszonych połówek wynosiła więc 24%, natomiast oceniana na podstawie liczby uzyskanych cieląt w stosunku do wyjściowej liczby zarodków 46,6% (tab. 1).

Drugiej grupie biorczyń składającej się z 29 jałówek przeniesiono 29 par monozygotycznych połówek. Uzyskano 8 ciężarnych biorczyń (28%): w 4 przypadkach były to porody bliźniacze. Efektywność przenoszenia par połówek oceniana na podstawie liczby uzyskanych cieląt wynosiła 38%.

W grupie kontrolnej 72 biorczyńm przeniesiono zarodki całe, stwierdzając 26 wycielonych biorczyń (36%). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w odsetku ciężarnych biorczyń po przeniesieniu pojedynczych połówek i par połówek zarodków.

Uzyskane przez nas wyniki przenoszenia dzielonych zarodków są porównywalne ze średnimi wynikami otrzymywanymi przez innych autorów (2, 7, 12, 15, 20). Efektywność przenoszenia osiągnięta przez autorów wymienionych prac jest mocno zróżnicowana, gdyż waha się od 16 do 60%. Zachodzi tu więc pytanie o powody decydujące o takim zróżnicowaniu. Wydaje się, że nie należy ich widzieć w nieprawidłowo przebiegających procesach regulacji rozwoju zarodków posiadających zredukowaną liczbę komórek. Uzyskiwane bowiem przez niektórych autorów wyniki wskazują na możliwości osiągnięcia wysokiej efektywności przenoszenia połówek (1, 15, 20).

Uzyskane przez nas wyniki przenoszenia dzielonych zarodków bydłych otrzymano przenosząc połówki „nagie”, czyli pozbawione osłonek przejrzystych. Badania porównawcze (9, 17, 18) przeprowadzone na dzielonych zarodkach bydłych, przenoszonych po umieszczeniu ich w zastępczych osłonkach przejrzystych lub jako „na-

gie” połówki, nie wykazały istotnych różnic w efektywności implantacji. Można zatem przyjąć, że brak osłonki przejrzystej nie wpływa negatywnie na uzyskiwane wyniki przenoszenia.

W przeprowadzonych badaniach bisekcji poddawano jedynie zarodki o dobrym wyglądzie morfologicznym. Przyjmowano bowiem, że z punktu widzenia możliwości rozwojowych dzielonych zarodków, wyjściowa jego jakość odgrywa zasadniczą rolę. Dowodzą tego badania Brena i wsp. (2), z których wynika, że zadowalające rezultaty można uzyskać tylko po przeniesieniu połówek uzyskanych z zarodków ocenionych jako bardzo dobre.

Spśród czynników mogących wpływać na uzyskiwaną efektywność przenoszenia dzielonych zarodków należy rozważyć wpływ liczby przenoszonych połówek. W naszych badaniach stwierdzono tylko nieznacznie wyższą efektywność po przeniesieniu dwóch połówek w porównaniu z przeniesieniem jednej połówki. Inni autorzy stwierdzali na ogół większe różnice (8, 12). Najbardziej drastycznie stwierdził Lambeth (7), który po przeniesieniu pojedynczych połówek otrzymał tylko kilkanaście procent ciężarnych biorczyń, podczas gdy po przeniesieniu par połówek czterokrotnie więcej. Wydaje się, że niższe wyniki po przeniesieniu pojedynczych połówek są spowodowane między innymi niedostateczną masą komórkową. W rezultacie zarodek taki wysyła zbyt słaby sygnał ciążowy (6).

Rozpatrując problem efektywności przenoszenia dzielonych zarodków, należy uwzględnić również wybór właściwego stadium rozwoju zarodka poddawanego bisekcji. Z badań Williamsa i wsp. (19) wynika, że znacznie wyższą efektywność przenoszenia uzyskuje się po przeniesieniu połówek otrzymanych po bisekcji blastocyst w porównaniu z połówkami utrzymanymi w wyniku bisekcji morul.

Obserwacje te znajdują pośrednie potwierdzenie w naszych badaniach dotyczących określenia strat komórkowych powstałych w wyniku bisekcji (13). Stwierdzono bowiem, że odsetek niszczonych komórek uzależniony jest od stadium rozwoju poddawanego bisekcji zarodka. Niższy procent niszczonych komórek zano-

