

Metody uzyskiwania oocytów bydłęcych i ich wykorzystanie do produkcji zarodków *in vitro*

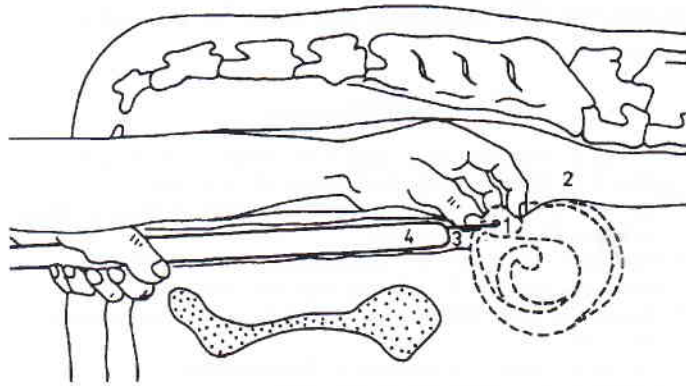
Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, 32-083 Balice

Hormonalna stymulacja superowulacji połączona z niechirurgicznym wypłukiwaniem i przenoszeniem zarodków jest stosowaną już od wielu lat metodą uzyskiwania zwiększonej liczby potomstwa od najbardziej wartościowych genetycznie krów. Zabieg superowulacji może być powtarzany około pięć razy w roku na tym samym zwierzęciu, co pozwala uzyskać od jednej krowy średnio około 25 zarodków nadających się do przenoszenia i w rezultacie około 12 cieląt (9). W porównaniu do rozrodu naturalnego, gdzie od jednej krowy uzyskuje się od 4 do 6 cieląt w ciągu życia, jest to znaczący wzrost wykorzystania możliwości rozrodczej bydła. Jeśli weźmie się pod uwagę, że w jajniku krowy znajduje się ponad 100 tys. gamet – w większości w przedantralnych pęcherzykach jajnikowych (13) – oznacza to, że jej potencjał rozrodczy jest wykorzystywany w bardzo niewielkim stopniu. W badaniach przeprowadzonych przez Kątską i wsp. (10) stwierdzono, że średnia liczba antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2-6 mm, a także prawidłowych morfologicznie oocytów utrzymuje się na podobnym poziomie u jałówek i krów w wieku 3-8 lat, natomiast u krów w wieku powyżej 9 lat występuje niewielka tendencja spadkowa. Spostrzeżenia te potwierdzają wcześniejsze obserwacje Ericksona (7), który wykazał, że liczba pęcherzyków antralnych u bydła w wieku od 8 miesięcy do 10-14 lat utrzymuje się na zbliżonym poziomie, a wyraźną redukcję populacji obserwował dopiero u zwierząt 15-letnich. Wynika z tego, że produkcję znacznej liczby przydatnych do hodowli *in vitro* oocytów można uzyskać nie tylko od zwierząt młodych, ale także od starszych. Może to mieć szczególne znaczenie w odniesieniu do krów o wysokiej i sprawdzonej już wartości.

W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w oparowaniu metod pozaustrojowej produkcji zarodków u bydła. Obecnie możliwe jest uzyskanie ponad 90% dojrzałych *in vitro* oocytów pobranych z antralnych pęcherzyków jajnikowych. Z tej liczby ponad 80% oocytów ulega zapłodnieniu, ponad 70% podejmuje rozwój zarodkowy, a około 40% rozwija się do stadium blastocysty (11). Tak więc w prze-

liczeniu na liczbę oocytów użytych do hodowli *in vitro*, możliwe jest uzyskanie od 20-30% blastocyst. Jest to już wydajność spełniająca warunki wykorzystania metody na skalę praktyczną. W większości przypadków oocyty do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro* uzyskiwano dotychczas z jajników jałówek lub krów po ich uboju. Aby wykorzystać pozaustrojową produkcję zarodków do realizacji programów genetycznych konieczne jest zastosowanie metody pozwalającej na wielokrotne pobieranie oocytów z jajnika tej samej krowy. Jedną z takich metod jest laparoscopia. Zabieg ten można powtarzać, jednak tylko w ograniczonym zakresie, gdyż może on powodować urazy u dawczyni oocytów. Ponadto powtarzalność laparoskopii jest ograniczona ze względu na tworzenie się blizn i zrostów w miejscu operacji. Inną metodą uzyskiwania oocytów jest ich aspiracja z pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą USG, dokonywana przez powłoki ciała (6). Podobnie jak laparoscopia jest to również metoda mogąca powodować urazy i z tego względu nie może być wielokrotnie i rutynowo stosowana, zwłaszcza w odniesieniu do wartościowych dawczyń (17).

Jakościową zmianę w uzyskiwaniu oocytów bydłęcych z pęcherzyków jajnikowych *in situ* stanowi rozwijana w ostatnich latach metoda aspiracji pęcherzyków pod kontrolą dopochwowej sondy USG sprzężonej z igłą. Technika ta została po raz pierwszy użyta do uzyskiwania oocytów ludzkich i opisana przez Wiklanda i wsp. (25) w 1987 r. Obecnie jest to rutynowo stosowana metoda w placówkach prowadzących zapłodnienie *in vitro* u ludzi. Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu transwaginalnej aspiracji pęcherzyków jajnikowych u bydła zostały opublikowane przez Pieterse i wsp. (16, 17) i Kruijpa i wsp. (12). Pozyskiwanie oocytów pod kontrolą USG wymaga zastosowania ultrasonografu o wysokiej rozdzielczości obrazu z sondą dopochwową wyposażoną w nasadkę do punkcji. Technika ta pozwala na aspirację oocytów z pęcherzyków jajnikowych o średnicy powyżej 2 mm. Podczas zabiegu sonda jest wprowadzana do pochwy, a następnie jajniki są ustalane naprzeciwko niej przy pomocy



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie położenia sondy USG i jajnika podczas transwaginalnej aspiracji pęcherzyków jajnikowych
 Objasnienia: 1 – jajnik, 2 – odbytница, 3 – szyjka macicy, 4 – sonda USG

manipulacji *per rectum* (ryc. 1). Po odpowiednim ustawieniu sondy i jajnika (pęcherzyk jajnikowy znajduje się na linii przejścia igły) igła jest popychana, przebija ścianę pochwy i wchodzi do pęcherzyka. Natychmiast po wejściu końcówki igły do pęcherzyka podłączane jest podciśnienie, co powoduje wyssanie płynu pęcherzykowego z oocytem. Zabieg wykonuje się po unieruchomieniu zwierzęcia w poskromie i znieczuleniu nadoponowym.

Metoda transwaginalnego uzyskiwania oocytów bydłecy pod kontrolą USG została w ciągu ostatnich kilku lat znacznie udoskonalona. Dąży się do wprowadzenia zmian umożliwiających obniżenie kosztów zabiegu, skrócenie jego czasu i zwiększenie kontroli operatora. Sukces aspiracji mierzony stosunkiem uzyskanych oocytów do aspirowanych pęcherzyków uzależniony jest od hormonalnej stymulacji zwierząt, częstości wykonywania punkcji, zastosowanej aparatury i doświadczenia operatorów. Po wstępnej adaptacji transwaginalnej aspiracji pęcherzyków jajnikowych u bydła, badania skoncentrowały się nad możliwością zwiększenia liczby uzyskiwanych oocytów. Dzięki zastosowanym modyfikacjom udało się uzyskać znaczny postęp. Procent pozyskiwanych oocytów w stosunku do aspirowanych pęcherzyków wzrósł z około 27% (16) do około 50% (12) i 69,6% (14). W efekcie możliwe stało się uzyskanie średnio około 16 oocytów od krowy w tygodniu, co pozwoliło wyhodować *in vitro* ponad 2 nadające się do przenoszenia zarodki (13). W ciągu sześciu miesięcy możliwe stało się wyprodukowanie ponad 50 zarodków, czyli czterokrotnie więcej niż przy metodzie superowulacji. Daje to szansę uzyskania około 25 cieląt rocznie.

Bardzo duży wpływ na efektywność metody ma częstość wykonywania aspiracji. Cykl rujowy bydła charakteryzuje się występowaniem 2 lub 3 fal wzrostu pęcherzyków jajnikowych (8, 19, 22). Każda fala trwa 6-7 dni i obejmuje początkową rekrutację grupy pęcherzyków, z których jeden zostaje wyse-

lekcjonowany do dalszego wzrostu (pęcherzyk dominujący) podczas gdy pozostałe ulegają regresji. Pęcherzyk dominujący hamuje wzrost pozostałych przez produkcję inhibin (1, 15). Aspiracje powtarzane w odstępie 3-4-dniowym zapobiegają selekcji pęcherzyka dominującego i podwajają liczbę fal wzrostu pęcherzyków w ciągu 21 dni. Cykl rujowy zanika. Przy pobieraniu oocytów w odstępach większych niż 3-4 dni liczba pęcherzyków nie zwiększa się, natomiast zwiększa się ich średnica. Po pięciu dniach pęcherzyk może osiągnąć wielkość przedowulacyjną i owulować. W takim wypadku cykl rujowy zostaje zachowany, jak to miało miejsce przy cotygodniowej aspiracji pęcherzyków w doświadczeniu Pieterse i wsp. (17).

W odniesieniu do możliwości polepszenia wyników aspiracji poprzez zastosowanie stymulacji hormonalnej zdania są podzielone. Walton i wsp. (24) podając FSH i przeprowadzając punkcję raz w tygodniu uzyskał więcej oocytów niż przy dwukrotnej punkcji w tygodniu od zwierząt niestymulowanych. Podobne wyniki uzyskał Pieterse i wsp. (18) porównując zwierzęta stymulowane PMSG z niestymulowanymi. Uzyskał on wzrost liczby aspirowanych pęcherzyków, ale po stymulacji hormonalnej procent pozyskiwanych oocytów zmniejszył się istotnie. Inni autorzy (5, 23) nie stwierdzili wzrostu liczby uzyskanych oocytów po zastosowaniu stymulacji hormonalnej. Stubbings i Walton (23) zaobserwowali, że podanie hormonów gonadotropowych może początkowo spowodować wzrost liczby aspirowanych pęcherzyków, lecz w dłuższym czasie średnia liczba uzyskanych oocytów od zwierząt stymulowanych i niestymulowanych nie różni się istotnie.

Ostatnio opublikowano szereg prac, których głównym obiektem zainteresowania jest techniczna strona metody (2, 20, 21). Badania dotyczą możliwości zastosowania różnych aparatów ultrasonograficznych, typów sond, igieł aspiracyjnych, przewodnic do igieł i systemów podciśnienia. Ich celem jest uproszczenie techniki tak, by stała się ona atrakcyjna z ekonomicznego punktu widzenia i mogła być stosowana w praktyce. Duże znaczenie ma możliwość użycia krótkich, łatwo wymienialnych igieł aspiracyjnych. Będąc wciąż jeszcze w użyciu długie igły mają szereg wad. Są drogie, bardzo szybko się tępią, a ich ponowne naostrzenie nigdy nie przywraca początkowej ostrości. Z uwagi na dużą przestrzeń martwą bardzo trudno jest pobierać płyn pęcherzykowy z poszczególnych pęcherzyków. Krótkie igły są tanie, pozwalają na użycie nowej igły dla każdego zwierzęcia, łatwo nimi manipulować. Dzięki małej przestrzeni martwej można uzyskiwać płyn pęcherzykowy z poszczególnych pęcherzyków.

Potencjalne możliwości metody transwaginalnej aspiracji pęcherzyków jajnikowych w połączeniu z produkcją zarodków *in vitro* sprawiają, że może stać się ona alternatywą lub uzupełnieniem super-

owulacji. Główną zaletą transwaginalnej metody uzyskiwania oocytów z pęcherzyków jajnikowych w stosunku do metody superowulacji jest znacznie wyższy stopień powtarzalności. Metoda może być wykorzystana do wspomagania superowulacji poprzez usunięcie pęcherzyka dominującego, które powoduje wzrost jednorodnej populacji mniejszych pęcherzyków jajnikowych. W ten sposób można uzyskać lepszą odpowiedź na superowulację u krów w laktacji (4). Można ją również wykorzystać do produkcji zarodków od zwierząt we wczesnej ciąży, samic nie reagujących na superowulację lub krów z niedroźnymi jajowodami (13). Ponieważ dotychczas nie obserwowano problemów zdrowotnych czy uszkodzeń dróg rodnych u dawczyń oocytów, nawet przy powtarzaniu zabiegów na tym samym zwierzęciu co 3-4 dni przez wiele tygodni, metoda może być stosowana bez ryzyka utraty zdolności rozrodczych krowy. Jeszcze jedną możliwością zastosowania metody jest uzyskiwanie oocytów od niedojrzałych płciowo zwierząt. Czynnione były już udane próby pobierania oocytów od 10-16-tygodniowych cieląt (13). Zastosowanie oocytów od tak młodych zwierząt do produkcji zarodków *in vitro* stanowi potencjalną możliwość znacznej redukcji odstepu międzypokoleniowego, który jest kluczowym elementem w programach genetycznego ulepszania populacji. Jego skrócenie prowadziło do szybszych zmian genetycznych.

Pomimo uzyskanego w ostatnich latach postępu dalsze prace są niezbędne, zarówno w odniesieniu do samej metody transwaginalnego uzyskiwania bydłych oocytów jajnikowych, jak też relacji między zastosowanym wariantem pobierania, a jakością uzyskiwanych oocytów. Kolejnym problemem do rozwiązania jest identyfikacja pęcherzyków atretycznych, w których oocyty mogą być już zdegenerowane w momencie pobierania. Badania powinny się

też skoncentrować nad jakością i potencjałem rozwojowym pozyskanych oocytów w warunkach *in vitro*.

Piśmiennictwo

1. Badinga L., Drancourt M. A., Savio J. D., Wolfenson D., Drost M., de la Sota R. L., Thatcher W. W.: Biol. Reprod. 47, 871, 1992.
2. Bols P. E. J., Vandenheede J. M. M., Van Soom A., de Kruijff A.: Theriogenology 43, 677, 1995.
3. Brogliatti G. M., Swan C. D.: Theriogenology 43, 177, 1995.
4. Bungartz L., Niemann H.: J. Reprod. Fert. 101, 583, 1994.
5. Bungartz L., Lucas-Hahn A., Rath D., Niemann H.: Theriogenology 43, 667, 1995.
6. Callesen H., Greve T., Christensen F.: Theriogenology 27, 217, 1987.
7. Erickson B. H.: J. Anim. Sci. 25, 800, 1966.
8. Ginther O. K., Knopf L., Kastelic J. P.: J. Reprod. Fert. 87, 223, 1989.
9. Hasler J. F.: J. Dairy Sci. 75, 2857, 1992.
10. Kątska L., Smorąg Z.: Anim. Reprod. Sci. 7, 451, 1984.
11. Kątska L., Ryńska V.: Anim. Sci. Papers Rep. 11, 121, 1993.
12. Kruip Th. A. M., Pieterse M. C., van Beneden Th. H., Vos P. L. A. M., Wurth Y. A., Taverne M. A. M.: Vet. Rec. 128, 208, 1991.
13. Kruip Th. A. M., Boni R.: Proc. First Europ. Conf. Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding, Kraków 1994, s. 117-125.
14. Looney C. R., Lindsey B. R., Gonseth C. L., Johnson D. L.: Theriogenology 41, 67, 1994.
15. Martin T. L., Fogwell R. L., Ireland J. J.: Biol. Reprod. 44, 693, 1991.
16. Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruip Th. A. M., Taverne M. A. M.: Theriogenology 30, 751, 1988.
17. Pieterse M. C., Vos P. L. A. M., Kruip Th. A. M., Wurth Y. A., Van Beneden Th. H., Willemse A. H., Taverne M. A. M.: Theriogenology 35, 857, 1991.
18. Pieterse M. C., Vos P. L. A. M., Kruip Th. A. M., Willemse A. H., Verne M. A. M.: Theriogenology 37, 273, 1992.
19. Savio J. D., Boland M. P., Roche J. F.: J. Reprod. Fert. 88, 581, 1990.
20. Scott C. A., Robertson L., de Moura R. T., Paterson C., Boyd J. S.: Vet. Rec. 134, 440, 1994.
21. Simon L., Bungartz L., Rath D., Niemann H.: Theriogenology 39, 312, 1993.
22. Sirois J., Fortune J. E.: Biol. Reprod. 39, 308, 1988.
23. Stubbings R. B., Walton J. S.: Theriogenology 43, 705, 1995.
24. Walton J. S., Christie K. A., Stubbings R. B.: Theriogenology 39, 336, 1993.
25. Wikland M., Enk L., Hammarberg K., Nilsson L.: J. Clin. Ultrasound 15, 245, 1987.

Adres autora: mgr inż. Piotr Gogol, ul. Zagrody 8a/20, 30-318 Kraków

FOSTER G., JOHANS K. L., REID R. J., ROSS H. M.: Izolacja *Brucella* z organizmu waleni, fok i wydr. (Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and otter). Vet. Rec. 138, 583-586, 1996 (24)

Przebadano bakteriologicznie wydry (*Lutra lutra*), 8 waleni (*Phocoena stenella*, *Delphinus delphis*, *Lagenorhynchus acutus*, *Stenella coeruleoalba*) i 9 fok (*Phoca vitulina*, *Cystophora cristata*, *Halichoerus grypus*) na nosicielstwo drobnoustrojów rodzaju *Brucella*. Po raz pierwszy *Brucella* sp. wyizolowano z jednego *L. acutus*, dwóch *S. coeruleoalba* i jednego *C. cristata*, *H. grypus* i *Lutra lutra*. Do izolacji bakterii wykorzystano posiewy ze zmian na skórze o rozległym charakterze, śledzionę, gruczoł mlekowy, macicę, krew, szyjkę macicy oraz węzły chłonne. *Brucella* sp. wyosobniono z 7 na 14 badanych śledzion oraz z gruczołu mlekowego, macicy, jąder i krwi oraz pachwinowych, żołądkowych, pachowych i lędźwiowych węzłów chłonnych. Identyfikację zarazka oparto o właściwości biochemiczne (test API 20NE).

G.

DIXON R. M., GRAHAM P. A., MOONEY C. T.: Określenie poziomu surowiczej tyreotropiny: nowy test diagnostyczny niedoczynności tarczycy u psów. (Serum thyrotropin concentrations: a new diagnostic test for canine hypothyroidism). Vet. Rec. 138, 594-595, 1996 (24)

Rozpoznanie niedoczynności tarczycy u psów opiera się o wywiad, badanie kliniczne i specjalistyczne badania laboratoryjne. Niski poziom surowiczej tyreotropiny (T4) sugeruje jedynie możliwość występowania niedoczynności tarczycy. Rozpoznanie choroby winno być potwierdzone brakiem odpowiedzi T4 na podanie egzogennej tyreotropiny (TSH). Test stymulacji przy użyciu TSH przeprowadzono u 31 psów, u których podejrzewano niedoczynność tarczycy. Całkowitą zawartość T4 oznaczono w czasie 0 oraz po 6 h po dożylniej iniekcji TSH (0,1 jμ/kg). Niedoczynność tarczycy wykluczono, gdy poziom T4 po stymulacji przekraczał 23 nmol/l, to jest był co najmniej 1,5 krotnie wyższy od poziomu wyjściowego. U 11 badanych psów potwierdzono istnienie niedoczynności tarczycy.

G.