

Transwaginalna metoda uzyskiwania oocytów bydlęcych: efektywność aspiracji, możliwości rozwojowe oocytów oraz zastosowanie w hodowli

Zdzisław Smorąg¹

Piotr Gogol¹

Valery Kuznetsov²

¹Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt

Instytut Zootechniki

Balice k. Krakowa

²Instytut Hodowli Zwierząt i Genetyki

Kijów, Ukraina

1. Wstęp

Niska rozrodczość samic zwierząt gospodarskich jest głównym czynnikiem limitującym postęp hodowlany. Dotyczy to zwłaszcza gatunków, których samice w ciągu całego życia są w stanie urodzić jedynie kilka sztuk potomstwa. Do takiego gatunku należy bydło, gdzie w ciągu życia krowa rodzi od 4 do 6 sztuk cieląt. Wiadomo, że możliwości gametotwórcze jajników bydlęcych są nieporównywalnie większe, gdyż sięgają dziesiątek, a nawet setek tysięcy oocytów (14). Oznacza to, że wykorzystywany jest tylko ułamek procenta produkowanych przez jajniki gamet. Stymulacja hormonalna w połączeniu z przenoszeniem zarodków zwiększają wykorzystanie puli gamet, gdyż stosując te metody można w jednej rui uzyskać od 4 do 6 przydatnych do przenoszenia zarodków. Taka liczba uzyskiwanych zarodków sprawia, że metoda może być stosowana w praktyce. Jednakże skala jej stosowania jest ograniczona i nieporównywalna do sztucznego unasienniania.

Postęp, jaki zanotowano w ostatnich latach w opanowaniu metod pozaustrojowego uzyskiwania zarodków u bydła sprawił, że metoda ta zaczyna być wykorzystywana w praktycznej realizacji programów hodowlanych. Warunkiem zastosowania pozaustrojowego uzyskiwania zarodków do realizacji programów genetycznych jest przyżyciowe, wielokrotne pobieranie oocytów z jajnika tej samej krowy. Można to osiągnąć za pomocą metody aspiracji pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą USG (*Ovum Pick-up*, OPU).

Celem pracy jest przedstawienie aktualnych moŹliwoŹci oraz uwarunkowań metody w odniesieniu do iloŹci i jakoŹci uzyskiwanych oocytów oraz znaczenie metody dla hodowli bydła.

2. Uzyskiwanie oocytów

2.1. Sprzęt

Transwaginalne punkcje pęcherzyków jajnikowych wymagają zastosowania nowoczesnych ultrasonografów, które pozwalają uzyskać na ekranie monitora obraz o wysokiej rozdzielczoŹci. O jego jakoŹci decyduje rodzaj użytej jednostki głównej i typ sondy. W praktyce stosowane są sondy wytwarzające ultradźwięki o częŹotliwoŹci od 5 do 7,5 MHz. Jednak tylko sondy 6,5-7,5 MHz umoŹliwiają wizualizacj i punkcj małych pęcherzyków jajnikowych (o średnicy juŹ od 2 mm), z których uzyskuje się oocyty najlepszej jakoŹci. Oprócz aparatu USG i sondy niezbędnym jest zestaw aspiracyjny wyposaŹony w pompę podciŹnienia i prowadnic do igły. W naszych badaniach posługiwaliśmy się aparatem USG typ Picker (Modell CS 2000) z głowic konweksow 6,5 MHz pozwalającą osiągnąć zdolnoŹć rozdzielczą około 2 mm oraz zestawem aspiracyjnym produkcji niemieckiej (typ Mariensee).

2.2. Przygotowanie zwierząt

Przed przystąpieniem do zabiegu pobierania oocytów konieczne jest dobre unieruchomienie zwierzęcia. Uzyskuje się to stosując srodkie farmakologiczne i roŹnego rodzaju poskromy. Im lepiej unieruchomione jest zwierzę tym łatwiej aspirować pęcherzyki, szczególnie te o małej średnicy. W ZFR przed zabiegiem uzyskiwania oocytów zwierzętom podawano Rompun w iloŹci 0,3 ml/100 kg i znieczulano nadoponowo podając 4 ml Lignocainy. Po około 15 minutach od podania wymienionych specyfików zwierzę umieszczano w poskromie i przystępowano do właŹciwego zabiegu uzyskiwania.

2.3. Wiek i stan fizjologiczny zwierząt

Przewag metody OPU w stosunku do metody superowulacji jest moŹliwoŹć jej zastosowania praktycznie niezaleŹnie od wieku i stanu fizjologicznego samicy. W badaniach przeprowadzonych przez KaŹsk i Smoraǳa (12) stwierdzono, Źe średnia liczba antralnych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2-6 mm, a takŹe prawidłowych morfologicznie oocytów utrzymuje się na podobnym poziomie u jałówek oraz krów w wieku 3-8 lat i dopiero u krów w wieku powyŹej 9 lat występuje niewielka tendencja spadkowa. SpostrzeŹenia te potwierdzają wcześniejsze obserwacje Ericksona (8), który wykazał, Źe liczba pęcherzyków antralnych u bydła w wieku od 8 miesięcy do 10-14 lat utrzymuje się na zbliŹonym poziomie, a wyraŹną redukcj populacji ob-

serwował 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 znaczenie w odniesieniu do krów o wysokiej i sprawdzonej już wartości hodowlanej. Oocyty do produkcji zarodków *in vitro* można także uzyskiwać od zwierząt niedojrzałych płciowo (3,16,21), od samic we wczesnej ciąży (17) oraz od krów, które z jakiejś przyczyny nie mogą się zacielić lub nie są zdolne do produkcji zarodków *in vivo* (15). Metoda OPU może być ponadto wykorzystana do wspomagania superowulacji. Poprzez usunięcie pęcherzyka dominującego można bowiem spowodować wzrost jednorodnej populacji mniejszych pęcherzyków jajnikowych i w ten sposób uzyskać lepszą odpowiedź na superowulację u krów w laktacji (5). 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 samicy.

2.4. Czynniki warunkujące efektywność uzyskiwania

2.4.1. Czynniki techniczne

Spośród czynników technicznych warunkujących efektywność uzyskiwania oocytów najważniejsze to rodzaj użytej igły i wielkość podciśnienia. W ostatnich latach przetestowano szereg różnych typów igieł. Początkowo posługiwano się długimi igłami o średnicy 1,0-1,5 mm. Miały one jednak wiele wad. Były drogie i szybko się tępiły, a ich ponowne naostrzenie nigdy nie przywracało początkowej ostrości. Ponadto ze względu na dużą przestrzeń martwą trudno było pobierać płyn pęcherzykowy oddzielnie z poszczególnych pęcherzyków. Ostatnio w powszechnym użyciu są igły krótkie, stosunkowo tanie i łatwo wymienne. Dzięki temu możliwe jest użycie nowej igły dla każdego zwierzęcia, a manipulacja jest łatwiejsza. Rozmiar igieł stosowanych do aspiracji pęcherzyków waha się od 17 g do 21 g i zależy od praktyki danego autora (15,18,23). Dla wszystkich typów igieł obserwuje się prawidłowość polegającą na tym, że odsetek oocytów otoczonych komórkami wzgórka jajonośnego maleje wraz ze wzrostem podciśnienia (1). Oprócz średnicy igły ważny jest również jej skos. Bols i wsp. (2) przy zastosowaniu igły 20 g z długim skosem uzyskali wyższy procent oocytów w porównaniu z igłą z krótkim skosem, niezależnie od wielkości podciśnienia. Istotna jest również ostrość igły. Tępe i grube igły są mniej przydatne do punkcji najmniejszych pęcherzyków, gdyż mogą powodować ich uszkodzenie i wyciek płynu pęcherzykowego wraz z oocytem. Mogą być także przyczyną zwiększonego krwawienia powodującego dostanie się krwi do uzyskiwanego płynu. Igły cieńsze umożliwiają bardziej precyzyjną aspirację, ale należy pamiętać o tym, że zbyt mała średnica wewnętrzna igły może być przyczyną uszkodzenia oocytów.

Istotnym czynnikiem wpływającym na liczbę uzyskanych oocytów i ich jakość jest wielkość podciśnienia. Z tego względu każdy zestaw aspiracyjny

musi być wyposażony w precyzyjny mechanizm służący do regulacji tego parametru. Zakres wielkości podciśnienia podawany przez różnych autorów waha się od 35 (7) do 100-130 mm Hg (6). Należy jednak brać pod uwagę fakt, że rzeczywista wielkość podciśnienia na końcu igły zależy od zastosowanego systemu przewodów aspiracyjnych i rozmiaru igły. Z tego powodu często podawanym parametrem uwzględniającym te czynniki jest szybkość przepływu aspirowanego płynu. Przy zbyt dużej wartości podciśnienia (szybkości przepływu aspirowanego płynu) zwiększa się liczba morfologicznie uszkodzonych i ogołoconych oocytów.

W przeprowadzonych przez nas badaniach optymalna wielkość podciśnienia wynosiła 0,15 bara (ok. 110 mm Hg) (tab. 1).

TABELA 1

WPLYW ZASTOSOWANEGO PODCIŚNIENIA NA LICZBĘ I JAKOŚĆ OOCYTÓW UZYSKANYCH METODĄ OPU

Wielkość podciśnienia (bar)	Liczba aspirowanych pęcherzyków	Liczba uzyskanych oocytów (%)	Liczba oocytów zakwalifikowanych do hodowli (%)
0,1	182	53 (29,1)	47 (88,7)
0,15	87	35 (40,2)	32 (91,4)
0,2	172	61 (35,5)	36 (59,0)
Ogółem	441	149 (33,8)	115 (77,2)

2.4.2. Stymulacja hormonalna

W odniesieniu do możliwości zwiększenia efektywności metody OPU poprzez stymulację hormonalną samic zdania są podzielone. Walton i wsp. (28) podając FSH i przeprowadzając punkcje raz w tygodniu uzyskali więcej oocytów niż przy dwukrotnej punkcji w tygodniu od zwierząt nie stymulowanych. Podobne wyniki uzyskał Pieterse i wsp. (20) porównując zwierzęta stymulowane PMSG z nie stymulowanymi. Uzyskali oni wprawdzie wzrost liczby aspirowanych pęcherzyków po stymulacji hormonalnej, ale zaobserwowali jednocześnie, że procent otrzymywanych oocytów zmniejszył się istotnie. Nie potwierdzają tego otrzymane przez nas wyniki z przeprowadzonych własnych badań. Stymulacja hormonalna zastosowana przez nas w zasadzie nie spowodowała wzrostu populacji antralnych pęcherzyków kwalifikujących się do aspiracji (tab. 2). Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów (6,27), którzy nie stwierdzili wzrostu liczby uzyskanych oocytów po zastosowaniu stymulacji hormonalnej. Stubbings i Walton (27) zaobserwowali wprawdzie, że podawanie hormonów gonadotropowych może początkowo spowodować wzrost liczby aspirowanych pęcherzyków, lecz w dłuższym czasie średnia liczba uzyskanych oocytów od zwierząt stymulowanych i nie stymulowanych nie różni się istotnie. Wobec tych danych jednoznaczna ocena przydatności stymulacji hormonalnej dla zwiększenia efektywności transwaginalnej aspiracji pęcherzyków jajnikowych jest utrudniona. Biorąc jednak pod uwagę

z jednej strony koszty preparatów hormonalnych, z drugiej zaś w najlepszym przypadku jedynie ograniczony efekt poprawy wyników, należałoby się skłaniać do rezygnacji ze stosowania stymulacji hormonalnej dla potrzeb aspiracji oocytów jajnikowych u krów. Inaczej to się przedstawia w przypadku zwierząt niedojrzałych płciowo. Zastosowanie stymulacji hormonalnej u cieląt w sposób zdecydowany zwiększa liczbę aspirowanych pęcherzyków i uzyskanych oocytów (3).

TABELA 2

WYNIKI TRANSWAGINALNEGO UZYSKIWANIA OOCYTÓW OD NIE STYMULOWANYCH (NS)
I STYMULOWANYCH (S) JAŁÓWEK I KRÓW

Rodzaj dawcy	Liczba dawczyń	Liczba aspiracji	Liczba aspirowanych pęcherzyków		Uzyskane oocyty		
			Ogółem	X	Ogółem	X	%
jałówka NS	8	49	333	6,8	121	2,5	36,3
S	5	9	60	6,7	18	2,0	30,0
krowa NS	4	8	44	5,5	16	2,0	36,6
S	4	6	45	7,5	16	2,7	35,5

2.4.3. Częstotliwość uzysku

Częstotliwość pobierania oocytów, jak się wydaje, może mieć wpływ na sukces aspiracji. Znajduje to uzasadnienie w fizjologii jajnika. Cykl rujowy bydła charakteryzuje się bowiem występowaniem 2 lub 3 fal wzrostu pęcherzyków jajnikowych (10,11,25). Każda fala trwa 6-7 dni i obejmuje początkową rekrutację pęcherzyków, z których jeden zostaje wyselekcjonowany i jako pęcherzyk dominujący dalej wzrasta, podczas gdy pozostałe ulegają regresji. Punkcje powtarzane w odstępach 3-4-dniowych zapobiegają selekcji pęcherzyka dominującego, podwyższają liczbę fal wzrostu pęcherzyków w cyklu i prowadzą do pojawienia się relatywnie jednorodnej populacji małych pęcherzyków, które mogą być aspirowane. 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. Przeprowadzając punkcje dwa razy w tygodniu Gibbons i wsp. (9) oraz Reichenbach i wsp. (22) otrzymali wyższą liczbę oocytów w porównaniu z uzyskiwaniem w odstępach 7-dniowych. Uzyskane przez nas wyniki aspiracji pęcherzyków przy pobieraniu w odstępach 3-4-dniowych nie różnią się od tych, jakie zarejestrowano przy pobieraniu w odstępach 6-8-dniowych (tab. 3). Brak zakładanych różnic w liczbie uzyskiwanych oocytów w zależności od odstępu czasu między aspiracjami, jaki obserwowaliśmy w naszym doświadczeniu, świadczy, jak się wydaje, że wzrost pęcherzyków jajnikowych może być uwarunkowany jeszcze innymi czynnikami niż te, które opisano.

TABELA 3
WYNIKI TRANSWAGINALNEGO UZYSKIWANIA OOCYTÓW OD NIE STYMULOWANYCH JAJÓWEK
W RÓŻNYCH ODSTĘPACH CZASU

Odstęp czasu między aspiracjami	Liczba dawczyń	Liczba aspiracji	Liczba aspirowanych pęcherzyków		Uzyskane oocyty		
			Ogółem	X	Ogółem	X	%
3-4 dni	3	11	76	6,9	25	2,3	32,9
6-8 dni	3	19	154	8,1	48	2,5	31,2

3. Potencjał rozwojowy oocytów

Zdolność do rozwoju oocytów uzyskanych metodą OPU zależy od zachowania normalnej morfologii samych oocytów, jak również otaczających je komórek wzgórka jajonośnego. Dotychczasowe obserwacje dotyczące możliwości rozwojowych oocytów bydłych uzyskanych metodą OPU świadczą o ich obniżonej zdolności rozwojowej (19). Niski procent dzielących się po zapłodnieniu *in vitro* oocytów uzyskanych tą metodą i niski odsetek rozwijających się do stadium blastocysty stwierdzono w innych pracach (6,24) i w naszych wcześniejszych badaniach (26). Przyczyną tego może być fakt uzyskiwania mniejszej liczby oocytów otoczonych dużą liczbą komórek wzgórka jajonośnego, w porównaniu z oocytami uzyskanymi z jajników pochodzących z rzeźni (4,19). Pewną poprawę zdolności oocytów do rozwoju do stadium blastocysty po zapłodnieniu *in vitro* można uzyskać prowadząc wspólną hodowlę uzyskanych oocytów bydłych z komórkami granulozy metodą OPU (13). Jednakże w badaniach przeprowadzonych przez Brunzeela i wsp. (4) wykazano, że uszkodzenie części komórek wzgórka jajonośnego prawdopodobnie nie jest główną przyczyną obniżonego rozwoju oocytów po zapłodnieniu *in vitro*. Na podstawie danych otrzymanych przez nas z przeprowadzonych badań wynika, że potencjał rozwojowy oocytów jest wprawdzie obniżony, jednak odsetek uzyskanych blastocyst jest dość wysoki, bowiem sięga 18% (tab. 4). Można zatem zakładać, że w niedalekiej perspektywie problem obniżonej kompetencji rozwojowej oocytów bydłych uzyskiwanych przy użyciu metody OPU zostanie w pełni rozwiązany.

TABELA 4
POTENCJAŁ ROZWOJOWY OOCYTÓW BYDŁĘCYCH UZYSKANYCH METODĄ OPU

Pochodzenie oocytów	Liczba oocytów użytych do zapłodnienia	Liczba podzielonych komórek jajowych (%)	Liczba uzyskanych blastocyst (%)
OPU	113	83 (73,5)	19 (17,9)
rzeźnia	302	248 (82,1)	79 (26,2)

4. Wykorzystanie metody

OPU jest metodą umożliwiającą większe wykorzystanie potencjału rozrodczego bydła. Przyjmuje się, że dzięki jej zastosowaniu można uzyskać 2-3 razy więcej cieląt (14) niż stosując superowulację i przenoszenie zarodków. Metoda ta umożliwia ponadto pozyskiwanie oocytów i produkcję zarodków od niedojrzałego płciowo bydła. W dotychczasowych pracach z tego zakresu wykazano, że możliwość taka istnieje już w odniesieniu do cieląt w wieku 6 tygodni (3). Oznacza to znaczne skrócenie odstępu międzypokoleniowego a tym samym olbrzymie zwiększenie postępu hodowlanego. W przypadku ras mięsnych możliwy do osiągnięcia na tej drodze postęp hodowlany oceniany jest na około 22% (cyt. 3), podczas gdy postęp hodowlany uzyskiwany za pomocą konwencjonalnych metod rozrodu wynosi 1,5%, a w przypadku stosowania superowulacji i przenoszenia zarodków około 2,5%.

Inną możliwością, jaką stwarza metoda OPU, jest uzyskiwanie potomstwa od nie reagujących na stymulację hormonalną krów. Ocenia się, że 20% wykorzystywanych w programach MOET krów nie poddaje się superowulacji. Stosując metodę OPU od połowy z nich udaje się uzyskać oocyty i produkować przydatne do przenoszenia zarodki.

Zastosowanie OPU i pozaustrojowej produkcji zarodków jako alternatywy dla superowulacji może, jak się wydaje, przyczynić się do poprawienia warunków ekonomicznych metody przenoszenia zarodków. Pobieranie oocytów od nie stymulowanych samic redukuje koszty hormonów stanowiące znaczącą pozycję w strukturze kosztów metody superowulacji i przenoszenia zarodków. Pozaustrojowa produkcja zarodków z oocytów uzyskanych metodą OPU wymaga wprawdzie zorganizowania laboratorium z wysoko wykwalifikowanym personelem, jednak osiągnięcie zadowalającej efektywności uzyskiwania i zapłodnienia oocytów oraz jakości i liczbą uzyskanych zarodków będą mieć rozstrzygające znaczenie także pod względem ekonomicznym.

Praca była wykonana w ramach grantu nr 5-P06D-046-09 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Literatura

1. Bols P. E. J., van Soom A., Ysebaert M. T., Vandenheede J. M. M., de Kruif A., (1996), *Theriogenology*, 45, 1001-1014.
2. Bols P. E. J., Ysebaert M. T., van Soom A., de Kruif, (1997), *Theriogenology*, 47, 1221-1236.
3. Brogliatti G. M., Adams G. P., (1996), *Theriogenology*, 45, 1163-1176.
4. Brunzeel A. W., Merton J. S., Wijst J., Hazeleger W., Kemp B., (1997), *Theriogenology*, 47, 185.
5. Bungartz L., Niemann H., (1994), *J. Reprod. Fert.*, 101, 583-591.
6. Bungartz L., Lucas-Hahn A., Rath D., Niemann H., (1995), *Theriogenology*, 43, 667-675.
7. Donnay A., de Roover R., van Langendonck A., Massip A., Dessy F., (1997), *Theriogenology*, 47, 155.

8. Erickson B. H., (1966), *J. Anim. Sci.*, 25, 800.
9. Gibbons J. R., Beal W. E., Krisher R. L., Faber E. G., Pearson R. E., Gwazdauskas F. C., (1994), *Theriogenology*, 41, 206.
10. Ginther O. K., Knopf L., Kastelic J. P., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 223-230.
11. Hasler J. F., (1992), *J. Dairy Sci.*, 75, 2857-2879.
12. Kańska L., Smorąg Z., (1984), *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 451-460.
13. Koniski M., Aoyagi Y., Takedomi T., Atakura H., Waga T., (1995), *Theriogenology*, 43, 253.
14. Kruip Th. A. M., Boni R., (1994), *Proc. First Europ. Conf. Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding*, Kraków, 117-125.
15. Looney C. R., Lindsey B. R., Gonseth C. L., Johnson D. L., (1994), *Theriogenology*, 41, 67-72.
16. Looney C. R., Damiani P., Lindsey B. R., Long C. R., Gonseth C. R., Duby C. R., (1995), *Theriogenology*, 43, 269.
17. Meintjens M., Bellow M. S., Broussard J. R., Paul J. B., Godke R. A., (1993), *Theriogenology*, 39, 266.
18. Meintjens M., Bellow M. S., Broussard J. R., Paul J. B., Godke R. A., (1995), *J. Anim. Sci.*, 73, 967-974.
19. Palma G. A., Olivier N., Moedl J., Wenigerkind H., Brem G., (1996), *12th Scientific Meeting A.E.T.E.*, Lyon, 180.
20. Pieterse M. C., Vos P. L. A. M., Kruip Th. A. M., Willemse A. H., Verne M. A. M., (1992), *Theriogenology*, 37, 273.
21. Presicce G. A., Jiang S., Simkin M., Yang X., (1995), *Biol. Reprod.*, 52, 283.
22. Reichenbach H. D., Wiebke N. H., Wenigerkind H., Moedl J., Brem G., (1994), *Theriogenology*, 41, 283.
23. Scott C. A., Robertson L., de Moura R. T. D., Paterson C., Boyd J. S., (1994), *Veterinary Record*, 134, 440-443.
24. Simon L., Bungartz L., Rath D., Niemann H., (1993), *Theriogenology*, 39, 312.
25. Sirois J., Fortune J. E., (1988), *Biol. Rep.*, 39, 308-317.
26. Smorąg Z., Kańska L., Gogol P., Ryńska B., (1997), *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 35, suppl. 2, 42.
27. Stubbings R. B., Walton J. S., (1995), *Theriogenology*, 43, 705-712.
28. Walton J. S., Christie K. A., Stubbings R. B., (1993), *Theriogenology*, 39, 336.

Transvaginal method of bovine oocytes collection: aspiration efficiency, developmental competence of oocytes and application in breeding

Summary

This paper describes the ultrasound-guided transvaginal method of oocyte collection in cattle. Both technical and physiological aspects affecting the efficiency of the method are presented. The results of the author's experiments on oocytes collection and their developmental competence is also discussed.

Key words:

bovine, oocyte collection, OPU, IVM/IVF/IVC.

Adres do korespondencji:

Zdzisław Smorąg, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa.