

Wybrany artykuł

Wywoływanie mnogiej owulacji oraz chirurgiczne metody pozyskiwania i przenoszenia zarodków u świń

Paweł Antosik, Krzysztof Urbaniak, Jędrzej M. Jaśkowski

z Katedry Weterynarii Rolniczej Akademii Rolniczej w Poznaniu

Induction of superovulation and surgical methods of embryo recovery and transfer in pigs. Antosik M., Urbaniak K., Jaśkowski J. M., Department of Agricultural Veterinary, Faculty of Breeding and Biology of Animals, Agricultural University, Poznań.

Superovulation is a planned production of a number of ova from one dam at the same ovulation period and essential part of the technique of embryo transfer. Authors describe methods of collection of fertilized ova from superovulated donor females, either prepuberal and puberal gilts or sows. Females are prepared with 50 mg of altrenogest (Regumate) administered for 15 days. Then single dose of 1000–1500 IU PMSG and/or 750 IU hCG is given i.m. Donors are inseminated twice 24 h and 36 h after oestrus occurs. Four to six days later embryos are collected surgically. They are evaluated in terms of fertilization then stored carefully. Prepuberal gilts give more embryos than multiparous sows (27 and 20 embryos respectively). The recipients need to be in appropriate stage of uterine receptivity, effected by synchronizing the oestrus cycle with that of the donors. Embryos, at the number of 15–20, are transferred either into the oviduct or unilaterally into uterus horn. Efficacy of embryo transfer in pigs is high with 50–70% of pregnant recipients and 7–8 piglets in the litter.

Keywords: pigs, superovulation, embryo collection, embryo transfer.

Transfer zarodków u świń, w przeciwieństwie do transferu u bydła, wykorzystywany w celach komercyjnych i hodowlanych stosowany jest na niewielką skalę. Przykładowo liczba dawczyń, od których pozyskiwano zarodki w 2002 r., wynosiła na świecie około 250, a liczba przenoszonych zarodków natomiast około kilkunastu tysięcy (1). Umiarkowane zainteresowanie tą metodą biotechniczną spowodowane jest wysoką plennością świń oraz trudnymi do zastosowania na większą skalę metodami pozyskiwania i przenoszenia zarodków. Nie zmienia to faktu szerokiego zapotrzebowania na tę metodę do celów naukowych.

Pierwszy skuteczny zabieg transferu zarodków u świń przeprowadził na Ukrainie Kwasnicki w 1951 r. (2), uzyskując od jednej z czterech dawczyń 9 zarodków, z których urodziły się cztery prosięta. W latach 60. ubiegłego stulecia badania nad transferem zarodków kontynuował Pomeroy (3). Systematyczne badania nad metodami pozyskiwania i przenoszenia zarodków

w celu rozwoju technik oraz wyjaśnienia istotnych problemów reprodukcyjnych prowadzili m.in. Hancock i Howell (4) oraz Dziuk i wsp. (5). Natomiast problemy aplikacyjne związane z przenoszeniem i obrotem zarodkami oraz tworzeniem stad SPF prezentowali Wrathall i wsp. (6) oraz Curnock (7). W latach 80. w Niemczech oraz Szwajcarii przeprowadzano pierwsze praktyczne próby wykorzystania tej metody w terenie oraz w pracach genetycznych. Pierwsze próby przenoszenia zarodków w byłej NRD przeprowadzono w latach 1974 i 1975 (8). Obecnie zarodki od świń pozyskuje się w wielu krajach świata, poza Europą w Chinach oraz w Japonii. W niektórych krajach, jak na przykład w Holandii, transfer zarodków u świń ma charakter komercyjny (1).

W Polsce transferu zarodków u świń, jak dotąd, nie prowadzono. Wydaje się zatem celowe przedstawienie podstawowej techniki pozyskiwania, jak i przenoszenia zarodków.

Transfer zarodków u świń jest kompleksem zabiegów, obejmujących dobór i hormonalne przygotowanie dawczyń, pozyskiwanie zarodków, ich obróbkę *in vitro* (ocena, sortowanie, krótkotrwała hodowla, transport), jak również przenoszenie zarodków do biorczyń o cyklu rujowym możliwie optymalnie zsynchronizowanym z cyklem rujowym dawczyń.

Zarodki można pozyskiwać od niedojrzałych loszek – w zależności od tempa dojrzewania – w wieku od 160 do 180 dni, loszek dojrzałych płciowo, które miały dwie, trzy ruje oraz od świń wieloródek. Ruję u świń dawczyń synchronizuje się, podając wraz z paszą przez 15 dni, od 16 do 20 mg altrenogestu, zawartego w preparacie Regumate. Po zakończeniu podawania progestagenu podaje się domięśniowo 1500 j.m. PMSG, a następnie po 72–80 godzinach około 500 j.m. hCG. (8). Zamiast hCG dopuszczalne jest także podanie GnRH. Przedstawiony program stosowany jest u loszek dojrzałych płciowo. Natomiast loszki niedojrzałe płciowo nie otrzymują altrenogestu. Z kolei u świń wieloródek superowulację przeprowadza się bezpośrednio po odsadzeniu, przy czym zastosowana dawka PMSG jest niższa niż u loszek, inny jest także termin podania hCG. Wynik superowulacji w istotny sposób zależy od wysokości dawki PMSG, rodzaju PMSG oraz rasy świni. Z reguły im wyższa dawka hormonu, tym gorsza jakość pozyskiwanych zarodków. Nie wszystkie preparaty PMSG zawierają jednakową ilość hormonu w standardzie. Podawanie APMSG po PMSG, stosowane w programach superowulacji u krów, nie jest wykorzystywane u świń ze względu na gorszą jakość pozyskiwanych zarodków. Odnośnie do wysokości stosowanej dawki PMSG zbliżone rezultaty uzyskiwano, podając od 1000 do 1500 j.m. PMSG (1, 9, 10, 11). U świń prymitywnych dawka hormonu jest z reguły niższa niż u świń szlachetnych. Ratky (12), porównując efektywność superowulacji u świń rasy mangalica po iniekcji 750, 1000, 1250 j.m. PMSG oraz 750 j.m. hCG ustalił, że najlepsze efekty uzyskuje się, podając 1000 j.m. PMSG. Shimatsu (13), przeprowadzając badania na świniach miniaturowych, używał do wywoływania superowulacji preparatu PG 600 lub PG 600 w kombinacji z hCG.

W nielicznych badaniach do wywoływania superowulacji u świń stosowano serie iniekcji FSH. Opinie odnośnie do efektywności superowulacji są jednak podzielone. Niektórzy uważają, że podanie FSH pozwala zwiększyć liczbę wyplukiwanych zarodków nawet trzykrotnie. Inni z kolei wskazują na wysoką cenę preparatu i niską liczbę zarodków przydatnych do transferu. Przypuszczalnie gorsza jakość zarodków jest efektem zanieczyszczenia preparatów FSH hormonem luteinizującym. U dojrzałych płciowo loszek do synchronizacji rui stosowano także zamiast altrenogestu podskórne implanty norgestometu.

Świnie przeważnie są unasieniane dwukrotnie, przy czym pierwsza inseminacja następuje 24 godziny po podaniu hCG. Warto zaznaczyć, że w programach superowulacji preferowane jest sztuczne unasienianie świń. Naturalna inseminacja przeprowadzana jest wyłącznie w tych przypadkach, w których lochy cechuje agresja. Z badań wynika, że średnia liczba owulujących pęcherzyków wynosi od 24 do 40 i jest najwyższa u niedojrzałych płciowo loszek.

Sam zabieg chirurgicznego pozyskiwania zarodków metodą krwawą jest stosunkowo prosty. Świnie przygotowuje się farmakologicznie, podając dożylnie mieszaninę ksylazyny i ketaminy. Po przygotowaniu pola operacyjnego wykonuje się cięcie w kresie białej od pępka

do wysokości ostatniego sutka, a następnie preparuje się macicę wraz z jajnikami. Przy okazji można ocenić efektywność superowulacji, określając liczbę widocznych na jajnikach ciałek żółtych. W przypadku wyplukiwania jajowodu, po odnalezieniu wpustu do lejka jajowodu wprowadza się do niego kaniulę. Następnie igłę strzykawki wprowadza się do wierzchołkowej części rogu macicznego, kierując ją w stronę jajowodu. Do światła jajowodu wprowadza się około 20 ml płynu Dulbecco z dodatkiem BCS lub FCS, który zbierany jest do szklanego naczynia. Jeśli przewidywana jest kilkugodzinna hodowla zarodków, zalecana jest pożywka NCSU o ściśle ustalonej temperaturze. Jeśli wyplukiwana jest macica, igłę wprowadza się w końcowym (domacicznym) odcinku jajowodu, kierując ją w stronę macicy. W ścianie macicy, około 10–15 cm od jej końca, wykonuje się otwór, przez który do jej jamy wprowadza się kateter. Macicę wyplukuje się płynem, jak uprzednio podano, a następnie masując delikatnie palcami przesuwając ją w kierunku macicy. Ilość odzyskanego płynu nie może być mniejsza niż 40 ml. Trzecia metoda łączy opisane poprzednio i polega na jednoczesnym wyplukiwaniu jajowodów i macicy.

Zabieg przeprowadza się na drugim rogu macicy. Inne metody pozyskiwania zarodków zarówno z jajowodu, jak i macicy wymagają odmiennego wprowadzenia igły oraz ilości użytego płynu. Liczba w ten sposób pozyskiwanych zarodków wynosi od 19 do 32. Liczba odzyskanych zarodków powinna wynosić około 70% liczby stwierdzanych na jajnikach ciałek żółtych.

Dawczyni powinny być karmione karmą uboższą od przewidzianej normami żywieniowymi (1). Liczba pozyskiwanych zarodków zależy w dużym stopniu od dawki PMSG oraz wieku dawczyń. Najlepsze rezultaty uzyskiwano u niedojrzałych płciowo loszek, u których liczba pozyskiwanych zarodków wynosiła około 30. Mniejszą liczbę zarodków – około 20 pozyskiwano od loch (14).

Zarodki wyszukiwane są pod mikroskopem stereoskopowym i powiększeniem 60–80-krotnym. Do transferu wykorzystywane są wyłącznie zarodki o nieuszkodzonej osłonce przejrzystej i dobrej lub bardzo dobrej jakości. Ich ocenę morfologiczną umożliwia duże podobieństwo do zarodków bydłęcych. Następnie zarodki aspirowane są do pipety. Podczas krótkotrwałego przechowywania lub w czasie transportu umieszcza się ją wewnątrz zbiorniczka szklanego, z płaszczem wodnym o temperaturze 37°C, używanego podczas pobierania nasienia u buhajów. W pożywce do krótkotrwałej hodowli i konserwacji zarodki świń można przechowywać maksymalnie przez 6–8 godzin.

Do transferu najlepiej nadają się zarodki w stadium moruli lub wczesnej blastocysty. Do trzeciego dnia po inseminacji z jajowodów wyplukać można zarodki od jedno- do czterekomórkowych. W czwartym dniu zarodki w stadium 16-komórkowym osiagają macicę. W piątym i szóstym dniu rozwijają się do stadium moruli i blastocysty. Z tego powodu zarodki u świń wyplukuje się między 4 a 6 dniem po inseminacji. Powyżej 7 dnia po zapłodnieniu następuje wyklucie zarodka, co ogranicza znacząco możliwość jego wykorzystania do transferu.

Biorczyniami zarodków mogą być zdrowe, dojrzałe płciowo loszki lub lochy wieloródki przygotowywane w podobny sposób jak dawczyni. Uwzględniając liczbę wyplukiwanych zarodków, przeciętnie na jedną dawczynię przypada od jednej do dwóch biorczyń. Hormonalnie są one przygotowywane prawie tak samo jak dawczyni, z tą jednakże różnicą, że dawka PMSG podawana w celu stymulacji wzrostu pęcherzyków jajnikowych jest niższa (15). Ponieważ wzrost stężenia progesteronu po rui następuje u biorczyń później niż u świń dawczyń, podanie hormonu gonadotropowego u biorczyń można nieznacznie opóźnić.

Po farmakologicznym przygotowaniu biorczyń dokonuje się laparotomii. Jeśli zarodki wyplukiwane były wyłącznie z jajowodu, to powinny być przeniesione do jajowodu biorczyń. Po odseparowaniu jajowodu od jajnika zarodki wprowadza się delikatnie – za pomocą szklanej pipety o długości około 100 mm i średnicy 1 mm – bezpośrednio do lejka jajowodu wraz

z niewielką (0,3–0,4 ml) ilością pożywki, a następnie umieszcza się macicę w jamie brzusznej. Zarodki pozyskiwane między 4 a 7 dniem po zapłodnieniu, znajdujące się w stadium rozwoju od zarodka czteroblastomerowego do blastocysty, można wprowadzić bezpośrednio do macicy biorczyń. W tym celu po wypreparowaniu wierzchołkowej części rogów macicy, około 2 cm od miejsca ujścia jajowodu do macicy, perforuje się jej ścianę za pomocą plastikowej kaniuli, starając się nie uszkodzić widocznych naczyń krwionośnych. Następnie, kierując koniec pipety w stronę szyjki macicy, powoli deponuje się zarodki (5). Liczba deponowanych w macicy zarodków wynosi do 12 do 20.

Biorąc pod uwagę zjawisko migracji zarodków u świń w drogach rodnym, są one wprowadzane wyłącznie do jednego rogu macicy (5). Z badań Brüssow (16) wynika, że po wprowadzeniu zarodków do jednego lub do obu rogów macicy zarówno odsetek próśnych świń, jak i liczba rodzących się prosiąt nie różnią się.

Odsetek ciężarnych samic, liczba prosiąt w miocie oraz liczba prosiąt w porównaniu do liczby wprowadzonych do macicy zarodków są wyższe, jeśli zarodki wprowadzane są do macicy.

Zarówno metody pozyskiwania zarodków, jak i ich przenoszenia wymagają u świń dalszego doskonalenia. Należy przypuszczać, że milowym krokiem na drodze w upowszechnianiu tej metody biotechnicznej u świń będzie przede wszystkim opracowanie prostych, nieinwazyjnych i zarazem skutecznych metod transferu zarodków.

Piśmiennictwo

1. Brüssow K.-P., Torner H., Kanitz W., Rátky J.: In vitro technologies related to pig embryo transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* 2000, **40**, 469–480.
2. Kwasnicki A. W.: *Nowoje w fizjologii rozmnażenija żywotnych*. Sielskahażastwo, Moskwa 1951.
3. Pomeroy R.: Infertility and neonatal mortality in the sows. IV. Further observations and conclusions. *J. Agric. Sci.* 1960, **54**, 57–61.
4. Hancock J. L., Howell G. J. T.: Egg transfer in the sow. *J. Reprod. Fert.* 1962, **2**, 307–311.
5. Dziuk P. J., Polge C., Rowson L. A. A.: Intrauterine migration and mixing of embryos in swine following egg transfer. *J. Anim. Sci.* 1994, **23**, 37–40.
6. Wrathall A. E., Done J. T., Sturat P., Mitchell D., Bettrige K. J., Randal G. C. B.: Successful intercontinental pig conceptus transfer. *Vet. Rec.* 1970, **67**, 226–228.
7. Curnock R. M., Day B. N., Dziuk P. J.: Embryo transfer in pig. A method for introducing genetic material into primary a specific-pathogen-free herds. *Amer. J. Vet. Res.* 1976, **37**, 97–99.
8. Rátky J., Treuer A., Szabo P., Dobrentei B., Soos F.: Propagation of an endangered swine breed by laparoscopic transfer. *Theriogenology* 1997, **47**, 405.
9. O'Brnie J. K., Dwarto D., Ryan J. P., Maxwell W. M. C., Awans G.: Comparison of in vitro maturation, in vitro fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult pigs. *Reprod. Dom. Anim.* 2000, **35**, 101–107.
10. Holtz W., Schliper B.: Unsatisfactory results with the transfer of embryos from gilts superovulated with PMSG and hCG. *Theriogenology* 1991, **35**, 1237–1249.
11. Reichenbach H. D., Mödl C. A., Brem G.: Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts. *Vet. Rec.* 1993, **133**, 36–39.
12. Rátky J., Brüssow K.-P., Solti L., Torner H., Sarlós P.: Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in Hungarian native pig breed. *Theriogenology* 2000, **56**, 969–978.
13. Shimatsu Y., Uchida M., Niki R., Imai H.: Induction of superovulation and recovery of fertilized oocytes in prepubertal miniature pigs after treatment with PG 600. *Theriogenology* 2000, **53**, 1013–1022.
14. Brüssow K.-P., König L.: Ovarreaktion und Embryonenqualität bei Jungsauen nach Superovulationsstimulation für den Embryotransfer. *Mh. Vet. Med.* 1990, **45**, 143–149.
15. Brüssow K.-P., Schneider F.: Steroidhormonverläufe bei Jungsau-Donoren nach Superovulatioinduktion und ihr möglicher Einfluss auf Embryonenqualität und Transfererfolg. *Mh. Vet.-Med.* 1993, **48**, 405–411.
16. Brüssow K.-P.: Ergebnisse der Übertragung von Embryonen in den Eileiter und Uterus beim Schwein. *Mh. Vet.-Med.* 1990, **45**, 562–565.