

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENNIANIE

JACEK BŁASIAK

Metody oznaczania i regulacji płci zarodków ssaków

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt
Instytut Zootechniki, 32-043 Balice k/Krakowa

Stosowane w praktyce hodowlanej metody z zakresu biotechnologii rozrodu umożliwiają większe wykorzystanie potencjału rozrodczego najwartościowszych zwierząt. Sztuczne unasiennianie pozwala na uzyskanie większej liczby potomstwa po najcenniejszych samcach. Z kolei metoda przenoszenia zarodków oparta o superowulację sprawia, że można zwielokrotnić potencjał genetyczny samic. Metoda przenoszenia zarodków staje się bardziej atrakcyjna, jeżeli się ją wzbogaci metodami pomocniczymi.

Jedną z takich metod stosowaną już w pewnym stopniu w praktyce, jest bisekcja zarodków umożliwiająca uzyskiwanie zwiększonej liczby potomstwa z jednego zarodka. Kolejną metodą czyniącą przenoszenie zarodków bardziej atrakcyjnym, byłoby określenie płci zarodków przed ich przeniesieniem do dróg rodnych biorecipientów. W przypadku przeznaczenia potomstwa na opas byłaby w ten sposób możliwość produkcji buhajów, jako że przyrosty buhajków są o około 15% wyższe od przyrostu jałówek (11).

U ssaków o płci decyduje gameta męska. Jeżeli plemnik zapładniający komórkę jajową przenosi chromosom Y, wtedy powstająca zygota jest samcem, a gdy zapłodnienie plemnikiem posiadającym chromosom X — powstaje zarodek o genotypie żeńskim. Skuteczna metoda selekcji plemników ze względu na przenoszony chromosom płciowy pozwoliłaby oczywiście na uzyskiwanie potomstwa o pożądanej płci. W związku z różnicą wielkości chromosomów (chromosom X jest znacznie większy od chromosomu Y) prowadzono od lat pięćdziesiątych próby rozdzielania plemników na podstawie zakładanych różnic ich wielkości i ciężaru (4, 22). Gdy badania te nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, rozpoczęto poszukiwanie innych, bardziej efektywnych metod. Starano się rozdzielić plemniki na drodze elektroforezy lub poprzez analitycznej eliminacji jednego typu plemników przez zmianę pH lub ciśnienia osmotycznego. Ponadto szukano rozwiązania podając gamety działaniu hormonów lub przeciwciał oraz stosując sefadeksowe filtry (3, 30). Wyniki te nie zostały uwieńczone opracowaniem skutecznej metody rozdzielania plemników.

Metody cytologiczne

W związku z rozwojem metod przenoszenia zarodków, zainteresowanie zostało skierowane na określenie płci zarodka przed jego przeniesieniem do zsynchronizowanych biorecipientów. Pozyskane we wczesnym, przedimplantacyjnym stadium rozwoju zarodki mogą być poddawane analizie cytologicznej, a następnie przenoszone do dróg rodnych. Podstawę cytologicznych metod oceny płci zarodka jest dymorfizm chromosomów płciowych. Przeprowadzając analizę chromosomalną komórek zarodka, będących w stadium metafazy podziału mitotycznego, określa się jego kariotyp. Jednocześnie identyfikuje się chromosomy płciowe, co pozwala na określenie płci zarodka.

W połowie lat siedemdziesiątych Hare i wsp. (10), jako pierwsi opracowali cytologiczną metodę oceny płci 12—15-dniowych zarodków bydłych. W metodzie tej poprzez biopsję uzyskuje się komórki trofoblastu zarodka, które po krótkiej hodowli utrzymują się i barwią, a następnie przeprowadza ich analizę chromosomalną. Badając wpływ wielkości biopsji na przeżywalność zarodków zaobserwowano, że usunięcie nawet połowy trofoblastu zarodków 14-dniowych nie wpłynęło negatywnie na ich dalszy rozwój (18). Umożliwia to prowadzenie analizy chromosomalnej na stosunkowo dużej ilości pobranych komórkach zarodka, co sprawia, że prawdopodobieństwo oznaczenia płci tą metodą jest wysokie i wynosi około 70%. Metoda ta ma jednak poważne ograniczenia. Zarówno przy uzyskiwaniu zarodków, jak i przy przenoszeniu niezbędna jest interwencja chirurgiczna. Badane zarodki mogą być przetrzymywane lub hodowane, tylko kilka godzin oraz nie można ich skutecznie zamrażać. Podobnych mankamentów pozbawiona jest metoda oznaczania płci 6—7-dniowych zarodków bydłych. Zarodki w tym stadium mogą być bowiem niechirurgicznie pozyskiwane, przenoszone, a także zamrażane. Do określenia płci pobiera się jedynie 10—20 komórek, dlatego też indeks zarodka nie może być mniejszy niż 10%. W przeciwnym wypadku, prawdopodobieństwo oznaczenia płci takiego zarodka jest niewielkie. W dotychczasowych badaniach stwierdzono jednakże, że tylko około 45%

zarodków bydłych w stadium moruli miało mitotyczne indeksy równe 10% lub wyższe (23). Dlatego głównym czynnikiem limitującym stosowanie tej metody jest ilość oraz jakość obserwowanych metafaz w pobranych komórkach. Możliwość takiej hodowli wykazano już na zarodkach króliczych, świńskich i bydłych (19).

Interesującą próbą oceny płci jest metoda analizy cytologicznej połączona z bisekcją zarodków. W metodzie tej jedna z połówek zarodka poddawana jest analizie chromosomalnej, druga — przenoszona bezpośrednio, bądź zamrażana. Picard i wsp. (16, 17) wykazali, że płć może być oznaczona u 60-ciu% badanych, normalnych morfologicznie zarodków, z czego ponad połowa przeżywa po przeniesieniu w stanie świeżym, a około 20% po zamrożeniu. Czynnikiem ograniczającym skuteczność tej metody, podobnie jak w przypadku stosowania biopsji, jest przede wszystkim ilość oraz jakość występujących metafaz.

Kolejna cytologiczna metoda określania płci zarodków polega na identyfikacji w komórkach żeńskiego zarodka zainaktywowanego chromosomu X, przekształconego w pałeczkowaty twór, zwany ciałkiem Barra. Poprzez obserwacje chromatyny płciowej oznaczono dotychczas płć 5-dniowych zarodków króliczych (8). Chociaż skuteczność oznaczania płci zarodków króliczych wynosiła 75%, szersze zastosowanie tej metody jest niemożliwe, ponieważ u zarodków innych gatunków ssaków identyfikacja ciała Barra jest bardzo utrudniona. W przypadku zwierząt gospodarskich dokładną obserwację uniemożliwia natura cytoplazmy (21).

Reasumując trzeba stwierdzić, że wymienione powyżej cytologiczne metody oceny płci zarodków są w chwili obecnej zbyt skomplikowane, a ich skuteczność nie w pełni zadowalająca, aby mogły być stosowane w praktyce.

Metody immunologiczne

Oprócz analizy cytologicznej, stosowana jest także immunologiczna metoda określania płci zarodka. Opiera się ona na sposrżeniu, że w wysoko wsobnych szczepach myszy, przeszczepy skórne pomiędzy poszczególnymi osobnikami są w dużym stopniu udane. Jedynie fragmenty skóry samca transplantowane na samicę są z reguły odrzucane. W związku z tym, że genetyczną różnicą między dawcą przeszczepu a biorcą jest brak u tego ostatniego chromosomu Y, przyczyną tej immunologicznej reakcji jest pewien specyficzny męski antygen, występujący na powierzchni komórek samca, czyli antygen H-Y. Antygen ten wykryto dotychczas na komórkach samców szeregu gatunków ssaków (1). Uważa się, że jest to czynnik pobudzający rozwój embrionalnej gonady w kierunku jąder (25). Antygen H-Y nie jest specyficzny gatunkowo, dlatego produkując przeciwciała przeciwko niemu poprzez immunizację samic wysoko wsobnego szczepu myszy komórkami śledziony samców

tego samego szczepu oraz stosując metodę immunofluorescencyjną, można określić płć zarodka innego gatunku ssaków. Tym sposobem wykrywano antygen H-Y na zarodkach bydłych (1). Stosunkowo łatwo można go było zidentyfikować w stadium 8 komórkowym, był znajdowany na morulach, jednakże w stadium blastocysty identyfikacja antygeny H-Y była znacznie utrudniona (1). White i wsp. (27) określali metodą immunologiczną płć bydłych zarodków od stadium 16 komórkowego do stadium blastocysty i wykazali, że około 85% badanych zarodków może być skutecznie oznaczanych. Podobną skuteczność określania płci otrzymano badając zarodki mysie oraz owcze i świńskie (26, 28). Chociaż technika oznaczania płci metodą pośredniej reakcji immunofluorescencyjnej jest stosunkowo skuteczna oraz szybka, ze względu na możliwość sklasyfikowania dużej liczby zarodków w krótkim czasie, nie jest ona stosowana rutynowo. Jedną z przeszkód jest obserwowane obniżenie żywotności zarodków po ich ekspozycji w surowicy odpornościowej (1). Okazało się również, że jakość zarodka jest czynnikiem mającym wpływ na typ i stopień fluorescencji. Słabe jakościowo zarodki, częściowo zdegenerowane, wykazują fluorescencję, która jest niezwiązana z ekspresją antygeny H-Y. Również fakt stopniowego zmniejszania się ekspresji antygeny H-Y na zarodkach wraz z jego rozwojem, powoduje obniżenie praktycznej wartości metody.

Inne metody

Od pewnego czasu prowadzone są również próby oceny płci zarodka na podstawie analizy jego metabolizmu, gdyż stwierdzono zostały niewielkie różnice między zarodkami męskimi i żeńskimi w intensywności niektórych procesów biochemicznych. Różnicę tę przypisuje się odmiennemu kompletowi chromosomów płciowych, występującemu u poszczególnych płci. Na chromosomie X kodowanych jest wiele genów, których brak na chromosomie Y. Potencjalnie samica powinna zatem produkować podwójną ilość odpowiednich, sprzężonych z chromosomem X enzymów, w stosunku do wielkości spotykanej u samca. Ostatecznie jednak tak się nie dzieje, ponieważ w komórkach somatycznych samicy jeden z chromosomów X jest inaktywowany. Ponieważ inaktywacja ta ma miejsce dopiero w pewnym stadium rozwoju zarodka, do momentu jej wystąpienia zarodki żeńskie wykazują dwukrotnie wyższą aktywność enzymów sprzężonych z chromosomem X w porównaniu do zarodków męskich (13, 20). W zarodkach myszy poziom tych enzymów tzn. alfa-galaktozydazy (-gal), fosforybozylotransferazy guanozyno-hipoksantynowej (HGPRT) oraz dehydrogenazy glukozy-6-fosforowej (G6PD), jest zależny od liczby chromosomów X (7). Analiza aktywności HGPRT wykazała wyraźną różnicę metabolizmu zarodków mysich w stadiach: 8 komórkowym, moruli oraz wczesnej blastocysty

(13, 15). Różnice w koncentracji G6PD między zarodkami męskimi i żeńskimi u myszy stwierdzono od stadium 8 komórkowego do stadium blastocysty, przy czym wraz z postępującym rozwojem zarodka różnica ta stawała się coraz mniejsza (5). W stadium blastocysty, w związku z inaktywacją chromosomu X w komórkach zarodków żeńskich następuje wyrównanie aktywności enzymów sprzężonych z chromosomem X u obu płci.

Williams (29) zaproponował szybką i przyżywą metodą określania płci zarodków na podstawie analizy ich metabolizmu. Technika ta oparta na kolorymetrycznym oznaczeniu aktywności enzymu G6PD. Enzym ten katalizuje reakcję utleniania glukozy-6-fosforanu do 6-fosfoglukonianu redukując jednocześnie koenzym NADP. Zredukowany koenzym w teście stosowanym przez Williamsa redukował używany w doświadczeniu niebieski barwnik, zmieniając jednocześnie intensywność jego barwy. Zmiana ta była ostatecznie miarą poziomu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Metoda ta pozwalała na określenie płci około 65% czterodniowych zarodków mysich. Otrzymane rezultaty sugerują, że metoda kolorymetryczna oznaczania G6PD może być bardziej skuteczna w określaniu płci samicy w porównaniu do samców. Fakt ten spowodowany jest tym, że część zarodków żeńskich z już zinaktywowanym chromosomem X może być klasyfikowana jako zarodki męskie. Wydaje się, że metody oparte na analizie metabolizmu mogą w przyszłości znaleźć szersze zastosowanie w ocenie płci zarodka. Głównym problemem jest jednak stosowanie takich testów analizujących wybrane procesy biochemiczne, które nie wpływałyby negatywnie na żywotność badanych zarodków.

Ostatnio prowadzone są próby oznaczania płci zarodka przy wykorzystaniu metody polegającej na wykrywaniu męskich, specyficznych odcinków DNA (6, 14, 24). Chromosom płciowy Y posiada bowiem pewne specyficzne, wysoko powtarzalne odcinki kwasu DNA. Izolując te fragmenty DNA, a następnie namnażając, uzyskano matrycę porównawczą, pozwalającą na drodze hybrydizacji ustalić, czy DNA wyizolowany z komórek zarodka posiada charakterystyczne, powtarzalne sekwencje i jest płci męskiej, czy też hybrydizacja nie występuje i badana zygota posiada dwa chromosomy X. Ellis i wsp. (6) stosując do przeprowadzenia testu wyekstrahowany DNA oznaczali płeć u ponad 70% 6—7 dniowych zarodków bydłych. Z kolei Vaimanowi i wsp. (24) nie udało się powtórzyć tych wyników. W sumie jednakże oznaczanie płci zarodka na drodze hybrydizacji DNA wydaje się być interesujące i zachęca do kontynuacji badań w tym kierunku.

Przedstawione powyżej metody umożliwiają w większym lub mniejszym stopniu określanie płci zarodków ssaków. Z pewnością jednak, najbardziej interesującą z praktycznego punktu

widzenia byłaby metoda pozwalająca na skuteczny rozdział plemników ze względu na przenoszony chromosom płciowy. Możliwość „determinowania płci” na poziomie gamet i zapłodnienie *in vitro*, pozwoliłyby na faktyczne decydowanie o płci zygoty.

Piśmiennictwo

1. Anderson G. B.: *Theriogenology* 27, 81, 1987.
2. Beatty R. A.: *Vet. Rec.* 90, 1, 1972.
3. Bennett D., Boyse E. A.: *Nature* 246, 308, 1973.
4. Bhattacharya B. C.: *Zuchtungsbiol.* 72, 250, 1958.
5. Brinster R. L.: *Biochem. J.* 101, 161, 1966.
6. Ellis S. B., Bondioli K. R., Williams M. E., Pryor I. H., Harpold M. M.: *Theriogenology* 29, 242, 1988.
7. Epstein C. J., Smith S., Travis B., Tucker G.: *Nature* 274, 500, 1978.
8. Goodall H., Roberts A. M.: *J. Reprod. Fert.* 48, 433, 1976.
9. Hare W. C. D., Mitchell D., Betteridge K. J., Eaglesome M. D., Randall G. C. B.: *Theriogenology* 5, 243, 1976.
10. Kaczmarek A.: *Opas bydła*, PWRiL, Warszawa 1978, s. 55.
11. King W. A.: *Theriogenology* 21, 7, 1984.
12. Kraizer P. G., Gantler S. M.: *Nature* 274, 503, 1978.
13. Leonard M., Kirszenbaum M., Cotinot L., Chesne P., Heyman Y., Stinnakre M. G., Bishop C., Delouis C., Vaiman M., Fellous M.: *Theriogenology* 27, 248, 1987.
14. Monk M., Kathuria H.: *Nature* 270, 601, 1977.
15. Picard L., King W. A., Betteridge K. J.: *Theriogenology* 21, 252, 1984.
16. Picard L., King W. A., Betteridge K. J.: *Vet. Rec.* 117, 603, 1985.
17. Plante C., Bousquet D., Guay P., Goff A. K.: *Theriogenology* 21, 253, 1984.
18. Popescu C., Boscher J., Cribb E. P.: *J. Hered.* 73, 147, 1982.
19. Rieger D.: *Theriogenology* 21, 138, 1984.
20. Rousson L. E. A.: *Vet. Rec.* 95, 276, 1974.
21. Schilling E., Thormahlen D.: *Proc. VIIIth Inter. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem.*, Cracow 4, 931, 1976.
22. Shing E. L., Hare W. C. D.: *Theriogenology* 14, 421, 1980.
23. Vaiman M., Cotinot C., Kirszenbaum M., Leonard M., Chesne P., Heyman Y., Stinnakre M. G., Bishop C., Fellous M.: *3 Congress Mondial de Reproduction et Selection des Ains et Bovins a Viande* 19—23.VI.1988, Paris.
24. Wahtel S. S., Ohno S., Koo G. C., Boyse E. A.: *Nature* 257, 235, 1975.
25. White K. L., Lindner G. M., Anderson G. B., Bon Durant R. H.: *Theriogenology* 17, 112, 1982.
26. White K. L., Bradbury M. W., Anderson G. B., Bon Durant R. H.: *Theriogenology* 21, 275, 1984.
27. White K. L., Anderson G. B., Pashen R. L., Bon Durant R. H.: *J. Reprod. Immunol.* 10, 27, 1987.
28. Williams T. J.: *Theriogenology* 25, 733, 1986.
29. Zavos P. M.: *Theriogenology* 20, 235, 1983.

Adres autora: mgr Jacek Błasiak, 32-083 Balice 1 k/Kraków ZFRISUZ

ANJUM A. D., SABRI M. A., IQBAL Z.: Syndrom hydropericarditis u kurcząt brojlerów w Pakistanie. (Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan). *Vet. Rec.* 124, 247-248, 1989 (10)

W październiku 1987 r. w Karaczi, zaś w lutym 1988 r. w Faisalabadzie wystąpił u kurcząt brojlerów syndrom hydropericarditis cechujący się wysoką śmiertelnością. Obecnie choroba występuje powszechnie na terenie całego Pakistanu, z reguły u brojlerów w wieku 3 tygodni, przy czym padnięciom nie towarzyszą objawy chorobowe. Maksymalne nasilenie upadków notuje się u brojlerów 4—5 tygodniowych. W okresie 15 dni pada w stadzie od 20 do 75% ptaków. Badanie pośmiertne wykazało hydropericarditis u 90% ptaków, obrzęk włókien mięśnia serca i ich naciek komórki jednojądrzastymi, martwicę w nieznacznie obrzęklej wątrobie, obecność dużych bazofilnych wtęrtów w jądrach komórek wątroby, zwrodnienie kanalików nerkowych i obrzęk płuc. U 20—30% padłych ptaków wystąpiło zażółcenie tkanki podskórnej i tłuszczu. Chorobę przeniesiono na 7—10 dniowe brojlery za pośrednictwem homogenatów wątroby pochodzących od padłych ptaków, które podano iniekcji. Dotychczas nie udało się jednak jednoznacznie ustalić przyczyny choroby, chociaż nie można wykluczyć jej natury wirusowej.

G.