

RYSZARD ZNANIECKI, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI*, EWA ZNANIECKA

Wpływ niektórych czynników na wyniki zacieleń u jałowic biorczyń świeżych zarodków

Prywatna Praktyka Weterynaryjna, ul. Wejhera 13, 82-200 Malbork
 *Pracownia Biotechniki Rozrodu Zwierząt Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,
 Oddział w Bydgoszczy, Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Znanięcki R., Jaśkowski J. M., Znanięcka E.

The influence of some factors on pregnancy results in recipient heifers of fresh embryos

Summary

The aim of this study was determining influence of some factors on pregnancy results in recipient heifers of fresh embryos. The analysis was carried out on 1641 animals (1847 embryo transfer interventions of an average age of 16–26 months. The mean pregnancy rate in heifers was 46.4% and was dependent ($p < 0.001$) on which the quality of embryos, kind of medium used to embryo collection, herds from recipients descended, number of interventions on one recipient, stage of embryo development, kind of medium to embryo culture and conservation, horn of uterus and the month. The best results were noted in recipients which received very good than poor quality embryos (60 resp. 26.1%). There was a big difference in pregnancy results between recipients coming from different herds (23 resp. 60%). When heifers were used as recipients two or more times the pregnancy results were lower than in heifers used only once (47.1 resp. 43.6% and 19.2%). A significant influence on pregnancy results was also the kind of medium used for the cultivation of embryos (Dulbecco (Menezo) or Dulbecco (Sigma) – 50.2 or 56.6% resp. OCM (Imperial – 26.8%). Likewise results of pregnancies were highest in October (62.2%) and lower in summer months (July 33.3%).

Wyniki transferu zarodków u krów są efektem działania szeregu czynników zależnych od właściwej organizacji, środowiska, indywidualnych cech biorczyń oraz jakości i stadium rozwoju zarodka (4, 9, 10, 12). W dotychczasowych badaniach jednak, z niewielkimi wyjątkami, określano wpływ jedynie wybranych, pojedynczych czynników. Nie próbowano natomiast szeregować znaczenia tych czynników, innymi słowy określać, które z nich odgrywają znaczenie pierwszoplanowe, znaczenie których natomiast nie jest istotne.

Celem badań było ustalenie istotności wpływu różnych czynników na wyniki zacieleń u jałowic biorczyń zarodków.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 1991-1994 na 1641 jałowicach w wieku od 16 do 36 miesięcy. Objęły one ogółem 1847 zabiegów przeniesienia zarodków do macicy biorczyń. Dobór biorczyń odbywał się w oparciu o powszechnie przyjęte kryteria (10). Wszystkie samice pochodziły z 6 stad, różniących się warunkami nadzoru, chowu i żywienia.

Jałowicom przeznaczonym na biorczynię zarodków, aplikowano jedno- lub dwukrotną (w odstępnie 10-12 dniowym) domięśniową dawkę prostaglandyny naturalnej lub jej syntetycznej pochodnej. Iniekcję prostaglandyn u biorczyń wykonywano z 12-19 godzinnym wyprzedzeniem w porównaniu do dawczyń zarodków.

Zarodki wprowadzono do macicy biorczyń między 6 a 7 dniem cyklu rujowego, przy pomocy katetera firmy Worrelein, wykluczając samice, u których stopień zsynchronizowania przekraczał 48 godzin. Zarodek wprowadzono zawsze do rogu macicy po stronie ciała żółtego.

Kliniczne rozpoznawanie ciąży przez prostnicę, przeprowadzono po upływie 6 tygodni po wprowadzeniu zarodka.

W analizie statystycznej uwzględniono wpływ następujących czynników na wyniki zacieleń u biorczyń zarodków: miesiąca, w którym dokonano zabiegu ET przeniesienia zarodka; stado macierzyste, z którego pochodziła biorczyni; liczbę zabiegów przeniesienia zarodka przeprowadzonych na jednej samicy, rogu macicznego, do którego wprowadzono zarodek; stadium rozwoju zarodka, jego jakości; rodzaju pożywki (medium) stosowanej do płukania oraz do hodowli i krótkotrwałej konserwacji zarodków; stopnia zsynchronizowania cyklu rujowego dawczyń i biorczyń.

Do badań statystycznych wykorzystano analizę dyskryminacji.

Wyniki i omówienie

Istotny ($p < 0,0001$) wpływ na wyniki zacieleń u jałowic biorczyń zarodków miały kolejno jakość zarodka, rodzaj pożywki użytej do wypłukiwania zarodków, stado, z których pochodziły biorczyni, liczba zabiegów transferu zarodków dokonywana na jednej biorczyni, stadium rozwoju zarodka, rodzaj pożywki do hodowli i konserwacji zarodka, róg macicy, do które-

go wprowadzano zarodek oraz miesiąc, w którym przenoszono zarodki do macicy bioreczeni.

W tab. 1. przedstawiono odsetek zacielenych bioreczeni w zależności od jakości zarodka. Przenosząc zarodki bardzo dobrej jakości uzyskiwano 60% ciąży, zarodków dobrej jakości – 43,8% ciąży, natomiast przeniesienie zarodków dostatecznej jakości pozwalało na zacielenie 26,1% jałowic. Jak wynika z danych tabeli wskaźnik zacielen u jałowic, po przeniesieniu zarodków bardzo dobrej jakości wynosił 60% i był ponad dwukrotnie wyższy niż po przeniesieniu zarodków dostatecznej jakości.

Na znaczenie odpowiedniej jakości zarodków zwracała uwagę wielu autorów (3, 5, 8). Schneider i wsp. (8) podają, że przeniesienie zarodków dobrej jakości gwarantowało ciążę u 70%, natomiast zarodków dostatecznej jakości – u 55% bioreczeni. Podobnie Donaldson (3) najwyższy 56,7% wskaźnik ciąży notował po przeniesieniu zarodków bardzo dobrej jakości, najniższy natomiast – 38,8% w odniesieniu do zarodków dostatecznej jakości. Tendencja ta była identyczna dla wszystkich kilkunastu technik laboratoryjnych, dokonujących subiektywnej oceny zarodków. Lindner i Wright (5) donoszą o nieistotnej różnicy we wskaźniku ciąży pomiędzy zarodkami o jakości zadowalającej i dostatecznej.

Wyniki zacielen po zastosowaniu jednego z pięciu używanych do wypłukiwania zarodków pożywek przedstawiono na ryc. 1. Jeśli wypłukiwania zarodków dokonywano z zastosowaniem gotowego płynu D-PBS firmy ICP, wzbogaconego 20 ml 20% koncentratu albuminy bydlęcej, zapłodnialność wynosiła 66,7%. Korzystając z fizjologicznego płynu Dulbecco firmy Sigma, z 1% dodatkiem surowicy bydlęcej, ciążę stwierdzano u 51,1% bioreczeni, natomiast po użyciu płynu D-PBS firmy Menezo przygotowanego *ex tempore* i wzbogaconego liofilizatorem albuminy bydlęcej (V frakcja Za451A) odsetek bioreczeni zachodzących w ciążę wynosił 47,2%. Z kolei użycie dwóch pozostałych pożywek tzn. płynów D-PBS firmy Biolab z 1% dodatkiem surowicy bydlęcej oraz Dulbecco PBS firmy Gibco z 0,4% dodatkiem albuminy surowicy bydlęcej (BSA), pozwalało na zacielenie odpowiednio 31,7 i 33,6% bioreczeni. Najlepsze wyniki zacielen u bioreczeni zarodków uzyskiwano po płukaniu macicy gotową pożywką produkcji ICP z dodatkiem 20% koncentratu albuminy bydlęcej oraz przygotowanym *ex tempore* płynem D-PBS produkcji firmy Sigma z 1% dodatkiem surowicy bydlęcej. Nie gwarantowało wysokiej skuteczności zacielen użycie PBS oraz surowicy bydlęcej produkcji krajowej oraz przygotowanego *ex tempore*, a także D-PBS firmy Gibco z 1% dodatkiem surowicy bydlęcej (ryc. 1).

Przedstawione wyniki dowodzą wyraźnej przewagi profesjonalnych mediów przeznaczonych do wypłukiwania zarodków, których przechowywanie nie wymaga niskich temperatur (poniżej minus 20 stopni Celsjusza).

Tab. 1. Odsetek zacielenych bioreczeni w zależności od jakości zarodka

Badane parametry	Jakość zarodka			
	bardzo dobry	dobry	dostateczny	Razem
Wskaźnik zacielen (%)	60,0	43,8	26,1	46,4
Liczba zarodków	483	1187	176	1847

Tab. 2. Wskaźnik zacielen (w %) w zależności od macierzystego stada bioreczeni

Stado						
A	B	C	D	E	F	Razem
49,3	45,7	33,3	32,5	23,7	60,0	46,4

Tab. 3. Wskaźnik zacielen w zależności od wielokrotności wykorzystania jałowic jako bioreczeni

Numer zabiegu	Liczba krów	Wskaźnik zacielen %
I	1641	47,1
II	140	43,6
III	26	19,3

Tab. 4. Wpływ stadium rozwoju zarodka na wyniki zacielen u bioreczeni

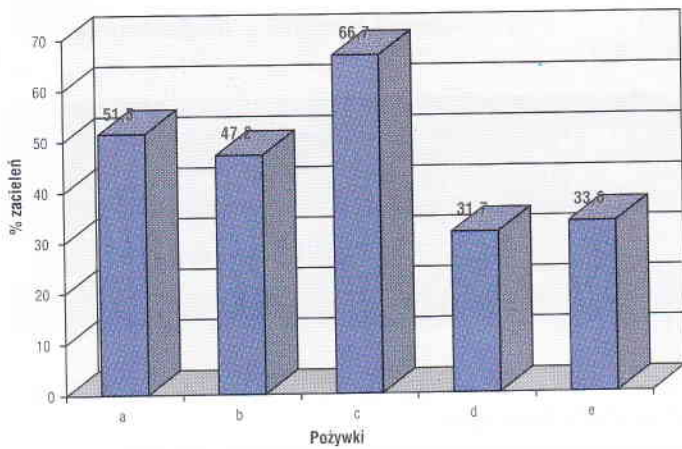
Grupa krów	Stadium rozwoju zarodka	
	Morula	Blastocysta
Nieciełna	64,9	35,1
Cielna	53,8	46,2

Tab. 5. Wyniki zacielen u bioreczeni po wprowadzeniu zarodka do lewego lub prawego rogu macicy

Róg macicy	Grupa krów	
	cielne (%)	niecielne (%)
Lewy	48,6	51,4
Prawy	44,7	55,3

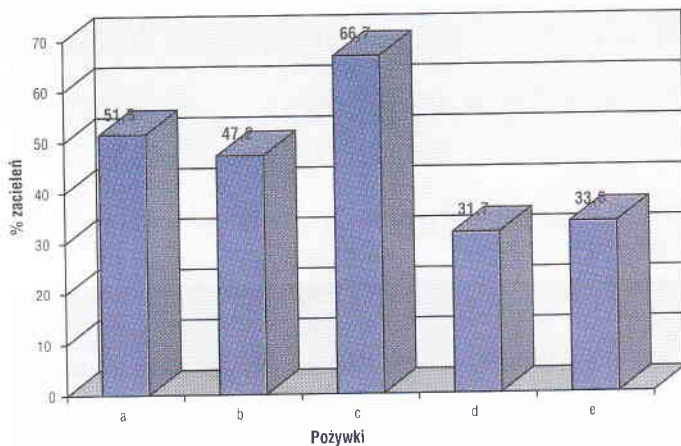
Tabela 2. przedstawia wskaźnik zacielen w zależności od macierzystego stada bioreczeni. W stadzie F uzyskiwano 60% skuteczności zacielen, w stadach A i B od 45 do 49%. Najśłabsze wyniki dotyczyły stad B i D, w których zacieleno się 23-32% jałowic. Wyniki zacielen bioreczeni w dużym stopniu zależały od stada, z którego pochodziły bioreczenin. W stadzie F uzyskiwano 60% skuteczności zabiegu, natomiast w stadzie E była ona około 2/3 niższa (tab. 2).

Przyczyny znacznego zróżnicowania wyników zacielen u jałowic, bioreczeni zarodków są złożone. Mapletoft i wsp. (6) podają, że wskaźnik zacielen u bioreczeni zarodków o dobrej kondycji wynosił 55%, nato-



Ryc. 1. Wpływ pożywki do wyplukiwania zarodków na wyniki zacielen u biorczyń

- a – D-PBS (Sigma) z 1% dodatkiem surowicy bydlęcej
- b – D-PBS (Menezo) z dodatkiem surowicy bydlęcej
- c – D-PBS (ICP) + koncentrat albuminy bydlęcej
- d – D-PBS (Biolab) z dodatkiem surowicy bydlęcej
- e – D-PBS (Gibco) z dodatkiem albuminy surowicy bydlęcej



Ryc. 2. Wpływ pożywki do krótkotrwałej hodowli i konserwacji zarodków na wyniki zacielen u biorczyń

- a – Płyn D-PBS (Sigma) z 20% dodatkiem surowicy płodów cielęcych
- b – D-PBS (Menezo) z 20% dodatkiem surowicy płodów cielęcych
- c – OCM (ICP)
- d – D-PBS z dodatkiem zliofilizowanej albuminy bydlęcej (frakcja V)
- e – OCM (Imperial)

miast u jałowic wychudzonych – 44%. Fakt istotnego wpływu kondycji fizycznej na wyniki przenoszenia zarodków dowodzi znaczenia czynnika żywieniowego. Nie ulega wątpliwości, że zwłaszcza w stadzie E pozostawiało ono sporo do życzenia. Równie istotny, choć nie zawsze doceniany jest także wpływ kiepskiego nadzoru nad stadem, sprowadzający się często do jednokrotnej obserwacji stada w ciągu doby. Tego rodzaju obserwacja nie może sprzyjać dobremu wykrywaniu rui u jałowic przeznaczonych na biorczynię zarodków, co w efekcie pozostaje nie bez wpływu na uzyskiwane u nich wyniki zacielen. O znaczeniu właściwego nadzoru nad rozrodem najlepiej przekonują bardzo dobre wyniki zacielen notowane w stadzie F,

w którym wykwalifikowany personel zootechniczny i oborowy prowadził całodobową obserwację rui. Na znaczenie czynnika organizacyjnego wskazują także badania Munara i wsp. (7), którzy uważają, że tylko 65% jałowic, zgłaszanych przez personel jako przejawiające ruję, nadaje się na biorczynię.

Wskaźnik zacielen w zależności od wielokrotności wykorzystania samicy jako biorczyni przedstawia tab. 3. Odsetek zacielenych jałowic, po ich jednokrotnym wykorzystaniu jako biorczyń wynosił 47,1%. Część nie zacielenych biorczyń została wykorzystana po raz wtóry. Wskaźnik zacielen w tym przypadku obniżał się nieznacznie do 43,6%. Niewielka grupa nie zacielenych po drugim zabiegu wprowadzenia zarodka przeznaczona została na biorczynię po raz trzeci. Wskaźnik zacielen u tych jałowic obniżał się do 19,2%. Z danych tab. 3. wynika, że jednorazowe wykorzystanie jałowicy jako biorczyni gwarantuje najwyższy wskaźnik zacielen. Powtórne wykorzystanie nie zacielenych biorczyń powoduje nieznaczne obniżenie odsetka zacielenych samic. Dopiero przy trzecim wykorzystaniu jałowic jako biorczyń dochodzi do drastycznego obniżenia skuteczności zacielen. Fakt ten wynikać może z kilku prostych przyczyn. Jedną z ważniejszych może być starzenie się biorczyń. Z obserwacji terenowych wiadomo, że najlepszymi biorczyniami są względnie młode jałowice. Zakładając, że pierwszy zabieg przeniesienia zarodków przeprowadzono u 16-18 miesięcznych jałowic, i że do momentu ich powtórnego wykorzystania, wliczając okres do badania na ciążę oraz powtórne przygotowanie biorczyń – miało przynajmniej 2-3 miesiące, wydaje się prawdopodobne, że jałowice używane jako biorczynię po raz trzeci znajdowały się już poza granicami optymalnego wieku, tj. były starsze niż 24 miesiące (3, 10, 11). Donaldson (3) podaje, że generalnie wyższy wskaźnik ciąży uzyskuje się po wprowadzeniu zarodków w stadium wczesnej lub późnej blastocysty niż wczesnej lub późnej moruli.

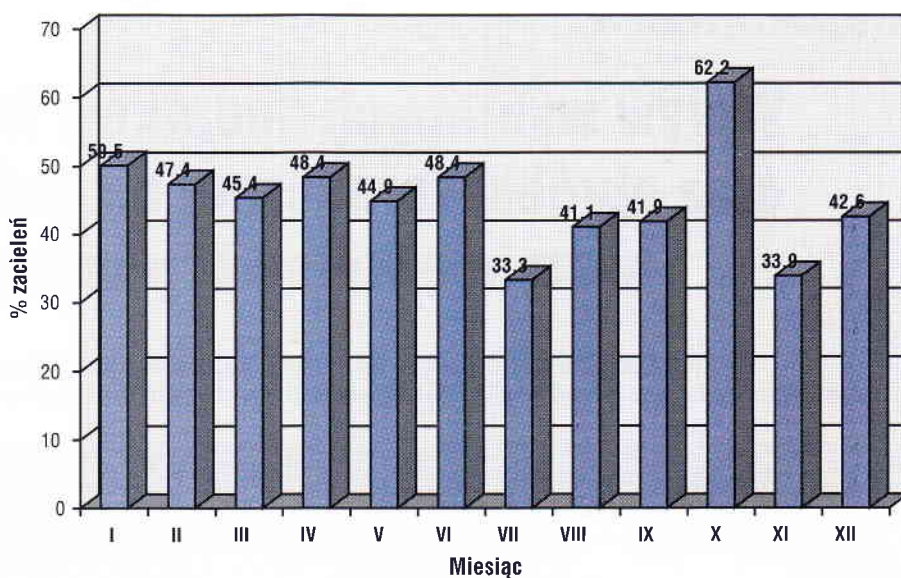
Spośród 857 cielnych jałowic, zarodek w stadium moruli wprowadzono 454 (53%), w stadium blastocysty natomiast 403 (47%). W tab. 4. przedstawiono wpływ stadium rozwoju zarodka na wyniki zacielen u biorczyń. Istotnie wyższy wskaźnik zacielen notowano w przypadku przeniesienia blastocysty niż moruli – 53,8 wobec 46,2%. Dokonując wyplukiwania zarodków między 6 a 8 dniem po unasiennianiu, niezależnie od stopnia zsynchronizowania cyklu rujowego u dawczyń i biorczyń, najlepsze wyniki uzyskiwano wprowadzając późne blastocysty, najgorsze natomiast, blastocysty wykluwające się (3).

Na ryc. 2. przedstawiono wpływ pożywek do krótkotrwałej hodowli i konserwacji zarodków na wyniki zacielen u biorczyń. Najwięcej samic zacielało się po zastosowaniu płynów Dulbeco firmy Menezo z 20% dodatkiem surowicy płodów bydlęcych oraz Dulbeco firmy Sigma z analogicznym dodatkiem surowicy – odp. 50,2 i 56,6%. Niewiele ustępowały im wyniki

uzyskiwane po zastosowaniu gotowego podłoża do hodowli komórek jajowych (OCM) firmy ICP oraz płynu Dulbecco z dodatkiem zliofilizowanej albuminy odp. 44,4 i 44,0%. Najniższy wskaźnik zacieleń (26,8%) notowano po zastosowaniu gotowego podłoża do hodowli komórek jajowych (OCM) firmy Imperial. Najlepsze wyniki zacieleń uzyskiwano po zastosowaniu do hodowli i konserwacji płynu Dulbecco firmy Menezes z 20% dodatkiem surowicy płodów bydłych, płynu Dulbecco firmy Sigma z analogicznym dodatkiem surowicy, słabsze prawie o połowę po zastosowaniu OCM firmy Imperial (ryc. 2). Uzyskane wyniki dowodzą istotnego wpływu rodzaju stosowanych mediów na wyniki zacieleń u biorczyń zarodków.

Tab. 5. ilustruje wyniki zacieleń u biorczyń zarodków po wprowadzeniu zarodka do lewego lub do prawego rogu macicy. Więcej ciąży 48,6 wobec 44,7% uzyskano wprowadzając zarodek do lewego rogu macicy. W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono na publikacje potwierdzające stwierdzoną prawidłowość. Niniejsze wyniki można próbować tłumaczyć większą dostępnością lewego rogu macicy podczas manipulacji kateterem dla osób wprowadzających go do światła macicy prawą ręką. Bardziej prawdopodobne wydaje się, że uzyskane różnice mogły wynikać z głębokości wprowadzenia zarodka do światła rogów macicy. Lokując zarodek zawsze w tym samym miejscu, tj. w okolicy krzywizny rogu macicznego, głębiej wprowadzony jest on do rogu lewego. Wpływ głębokości wprowadzenia zarodka na wyniki zacieleń opisuje Bielański i Tischner (2).

Rycina 3. przedstawia sezonową dystrybucję zacieleń u biorczyń. Przeciętny wskaźnik zacieleń w ciągu roku wynosił 46,4%. Wyniki powyżej przeciętnej notowano w styczniu i lutym (50,4 i 47,4%), następnie w kwietniu (48,7%), w czerwcu (48,4%) i październiku (62,2%). Wyniki niższe od średniej uzyskiwano w lipcu (33,3%) i listopadzie (33,9%). Najlepsze wyniki zacieleń uzyskiwano w październiku, czerwcu, kwietniu, styczniu i lutym, najgorsze natomiast w listopadzie oraz lipcu. Dobre wyniki zacieleń po przeniesieniu zarodków na początku jesieni i w miesiącach zimowych w warunkach krajowych tłumaczyć można dostatkami wartościowej i urozmaiconej paszy oraz jej stałym dowozem. W tym ujęciu nagły spadek zapłodnialności po transferze zarodków w listopadzie, mógł się zbiegać z przypadającą na ten okres zmianą żywienia z letniego na zimowe. Trudniej wytłumaczyć kiepskie wyniki zacieleń w lipcu. Być może ich przyczyną są panujące w tym okresie niesprzyjające warunki termiczne.



Ryc. 3. Sezonowa dystrybucja zacieleń u biorczyń zarodków

Poglądy odnośnie do zróżnicowania wyników zacieleń u biorczyń zarodków są dalece zróżnicowane. Shea i wsp. (9), porównujący skuteczność zacieleń w ciągu roku u ponad 14 tys. biorczyń notowali najlepsze wyniki w październiku oraz sierpniu, najslabsze w grudniu, styczniu i lutym, tj. miesiącach o najkrótszych i najchłodniejszych na północy USA dniach. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że w Stanach Zjednoczonych jako biorczyń zarodków używa się przeważnie jałowic mieszańców ras mięsnych, te zaś cechuje pewna sezonowość rozrodu – bliższe warunkom notowanym w Europie Środkowej są rezultaty podawane przez Bacha i Mullera (1) oraz Wiese (11), którzy w strefie klimatu umiarkowanego najwyższy wskaźnik zacieleń notowali po przeniesieniu zarodków w miesiącach jesienno-zimowych, z reguły gorsze wyniki uzyskując wiosną i wczesnym latem.

Piśmiennictwo

1. Bach S., Muller F.: Tierzucht 40, 209, 1986.
2. Bielański A., Tischner M.: Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich. Drukrol, Kraków, 1997.
3. Donaldson L. E.: Vet. Rec. 118, 661, 1986.
4. Jaśkowski J. M., Zbylut J., Urbaniak K.: Mat. Konf. Aktualne osiągnięcia w immunoprofilaktyce i terapii chorób gruźlicy i narządu rozrodczego zwierząt domowych. 1, 26, 1997.
5. Lindner G. M., Wright W. Jr.: Theriogenology 20, 407, 1983.
6. Mapletoft R. J., Lindsell C. E., Pawlyshyn V.: Theriogenology 25, 172, 1986.
7. Munar C. J., Nigro M. A.: Theriogenology 25, 1975, 1986.
8. Schneider U. I. J., Castelberry R. S., Griffin G. L.: Theriogenology 13, 73, 1980.
9. Shea B. F., Janzen R. E., McEemad D. P.: Theriogenology 31, 186, 1984.
10. Wierzbowski S., Smorag Z., Wierchoś E.: Przenoszenie zarodków u bydła. Balice Przysiek 1995.
11. Wiese M., Wallenburg J.: Byd. Biul. wet. 2, 9, 1992.
12. Wright J. M.: Theriogenology 15, 43, 1996.