

# *In vitro* to sposób na postęp hodowlany

Pobierają komórki jajowe wprost z jajników najcenniejszych jałówek, inkubują je i zapładniają *in vitro*, a następnie hodują i zamrażają. W ten sposób uzyskują zarodki o wysokim potencjale genetycznym.

Stadnina Koni „Nowe Jankowice Sp. z o.o.” jest położona na terenie województwa kujawsko-pomorskiego. Spółka zajmuje się hodowlą koni i bydła mlecznego oraz produkcją kwalifikowanego materiału siewnego. W gospodarstwie znajduje się łącznie 1800 sztuk bydła, w tym około 715 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej. Zwierzęta są utrzymywane w trzech lokalizacjach: w Nowych Jankowicach (325 krów), Szarnosiu (85 krów) i Lisnowie (305 krów). Obora w Nowych Jankowicach zajęła trzecie miejsce w kraju wśród gospodarstw o przeciętnej liczbie od 300 do 500 krów za wydajność 13 293 kg mleka o parametrach 3,97% tłuszczu i 3,38% białka uzyskaną w 2019 r.

Spółka odniosła również wiele sukcesów na krajowych wystawach zwierząt hodowlanych.

## **Inwestycja w nowoczesność**

Gospodarstwo realizuje plan hodowlany, którego celem jest osiągnięcie jak największego postępu hodowlanego z zachowaniem zmienności genetycznej. W gospodarstwie od wielu lat trwają prace nad poprawą cech produkcyjnych i funkcjonalnych bydła. Aby przyspieszyć ten proces, dr inż. Adam Oler, prezes zarządu spółki, postanowił zastosować metodę przyżyciowego pozyskiwania oocytów Oocyte Pick-Up (OPU) i zapłodnienia *in vitro*. W tym celu spółka nawiązała współpracę z prof. dr hab.

n. wet. Izabelą Woćławek-Potocką, współwłaścicielką firmy Invivet.

– Po raz pierwszy zastosowaliśmy tę metodę 3 lata temu w gospodarstwie należącym do Stacji Dydaktyczno-Badawczej Bałdy oraz na fermie bydła mięsnego Masurian Farm w Gieraliszkach. Od roku prężnie współpracujemy z Gospodarstwem Rolnym Agrofarm w Jurkowicach Pierwszych – tłumaczy Izabela Woćławek-Potocka, dodając: – W efekcie naszych prac urodziło się już kilkanaście cieląt. W większości są to jałówki.

## **Genomowanie dawczyń**

Zespół profesor Potockiej rozpoczął współpracę z SK Nowe Jankowice



Pobieranie oocytów z pęcherzyków jajnikowych odbywa się pod kontrolą USG.



Sonda aparatu USG wyposażona w igłę punkcyjną jest umieszczana w pochwie jałowki.

### Produkcja zarodków w pięciu krokach:

1. Przyżyciowe pobieranie oocytów od dawczyń.
2. Dojrzewanie oocytów – IVM – *in vitro maturation*.
3. Zapłodnienie oocytów *in vitro* – IVF – *in vitro fertilisation*.
4. Hodowla zapłodnionych komórek do blastocyst – IVC – *in vitro culture*.
5. Embriotransfer świeżych zarodków do biorczyń lub ich mrożenie.

w maju bieżącego roku. Zabieg pobierania niedojrzałych komórek jajowych, czyli oocytów, wprost z jajników dawczyń jest wykonywany w gospodarstwie Lisnowo w odstępach siedmiodniowych. Do pozyskiwania komórek jajowych nie jest potrzebna żadna stymulacja hormonalna, faza cyklu jajnikowego nie ma tu żadnego znaczenia. W projekcie biorą udział cztery jałowki w wieku 11-12 miesięcy o wysokiej wartości hodowlanej, która była potwierdzona przez genotypowanie. Zwierzęta są unieruchamiane w poskromie, a następnie znieczulane miejscowo. W celu zachowania higieny okolice sromu i odbytu przemywa się czystą wodą i dezynfekuje. Do macicy

wprowadzana jest głowica aparatu USG, a następnie pod kontrolą ultrasonograficzną przeprowadzane jest pobranie oocytów.

### Pobieranie oocytów

– *Po przebiciu się przez mięsz jajnika przy użyciu specjalnej pompy zasysamy komórki jajowe wraz z płynem. Znajdują się one w niedojrzałych pęcherzykach, które następnie wyptukiwane są za pomocą specjalnego płynu o temperaturze 38,5 stopnia Celsjusza do pojemnika* – tłumaczy profesor, dodając: – *Cały zabieg trwa około 15 minut. Średnio od biorczyń uzyskujemy 8 nadających się do dalszej hodowli oocytów. Nierzadko komórki*

*jajowych jest nawet kilkanaście. Kolejny etap odbywa się w mobilnym laboratorium umieszczonym w busie. Z pozyskanego podczas zabiegu płynie oddziela się oocyty od komórek krwi. Wszystkie pozyskane komórki jajowe umieszcza się na szalce Petriego. Przy pomocy mikroskopu są one klasyfikowane i opisywane względem ich jakości. Następnie oocyty są przenoszone do tzw. pożywki (albo medium) i umieszczane w inkubatorze. Cały proces wymaga zapewnienia odpowiednich warunków laboratoryjnych i infrastruktury sprzętowej.*

– *Nie usuwamy komórek jajowych słabej jakości, ale dojrzewamy je razem z innymi* – tłumaczy ekspertka, dodając: – *Mówimy, że komórki bydłęce lubią towarzystwo.*

Każdy prawidłowy oocyt powinien być otoczony specyficznymi komórkami, które pozwalają dojrzeć i dostarczają energii dla plemników.

### Zapłodnienie *in vitro*

Komórki jajowe na tym etapie nie są jeszcze dojrzałe, a więc nie są zdolne do zapłodnienia. Dlatego przez odpowiedni czas i we właściwych

warunkach muszą być inkubowane w specjalnym płynie. Po tym czasie są one zapładniane *in vitro* przy wykorzystaniu nasienia seksowanego. – *Rozmrażamy nasienie i sprawdzamy jego parametry, a więc koncentrację plemników, ich ruchliwość oraz budowę morfologiczną. Jeżeli preparat spełnia normy, trafia do pożywki, gdzie plemniki muszą same przedostać się do wnętrza komórek jajowych, co nazywamy zapłodnieniem klasycznym* – tłumaczy Izabela Wocławek-Potocka.

Po upływie około doby wybiera się zapłodnione komórki jajowe (tzw. zygoty), które są przekładane do pożywki umożliwiającej dalszy ich rozwój i wzrost. Są one hodowane aż osiągną stadium blastocysty. Forma ta jest już zdolna do zagnieżdżenia się w macicy, posiada węzeł zarodkowy, z którego powstaje ciało zarodka oraz trofoblast odpowiedzialny za budowę błon płodowych i łożyska.



**Widoczne na ekranie w lewym górnym rogu ciemne plamki to pęcherzyki jajnikowe wypełnione oocytami.**

### Mrożenie zarodków

Takie zarodki mogą być bezpośrednio wszczepiane do bioczyń lub zamrażane i przechowywane w ciekłym azocie. Zespół profesor Potockiej większość zarodków zamraża, wykorzystując do tego metodę witrifikacji. Dzięki temu skuteczność

uzyskania ciąży jest taka sama jak w przypadku świeżych zarodków, ponieważ każdorazowo można ocenić żywotność blastocysty..

– *Tradycyjna metoda, nazywana slow freezing, jest mało efektywna. My stosujemy witrifikację, która jest nazywana też zeszkleniem. Dzięki użyciu specjalnych substancji chroniących zarodki unikamy wytrącania się kryształków lodu, które mogłyby uszkodzić komórki* – tłumaczy profesor.

Proces trwa nie dłużej niż 30 sekund. Zarodki są umieszczane pojedynczo w słomkach i tak zabezpieczone mogą być przechowywane przez długi czas.

### Ostatnia kontrola zarodków

Zarodki przed implantacją są rozmrażane, nawadniane i umieszczane w inkubatorze, aby się rozprężyły i „doszły do siebie”. Następnie pod mikroskopem sprawdza się, czy żyją i czy nie uległy uszkodzeniu. Dopiero tak skontrolowane zarodki przenosi się do bioczyń. Proces ten jest identyczny jak w przypadku transferu tradycyjnie pozyskanych zarodków. Należy przygotować grupę bioczyń, które są w odpowiednim momencie cyklu, a błony śluzowe ich macic są gotowe do przyjęcia zarodków. *W tym celu stosuje się synchronizację hormonalną* – mówi profesor Potocki. – *W Nowych Jankowicach jest to nasze trzecie podejście, podczas którego od czterech jałówek uzyskaliśmy łącznie 91 oocytów.*

Z reguły zespoły zajmujące się pobieraniem oocytów i biotransferem rozliczają się z hodowcami nie za samo wykonanie zabiegu, ale za pozyskanie zarodków w stadium blastocysty lub za uzyskanie ciąży.

### Wielkość rezerwy jajnikowej

Metoda pobierania niedojrzałych komórek jajowych wprost z jajników dawczyń nie wymaga zastosowania kosztownej i długotrwałej stymulacji hormonalnej i może być przeprowadzana już 40 dni po wycieleniu. Znajduje również zastosowanie u młodych jałowic przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. Czynnikiem ograniczającym możliwość wykorzystania tej metody u młodych sztuk są rozmiary sond USG oraz grubość ręki lekarza wykonującego zabieg. Liczba pozyskiwa-

nych komórek jajowych od młodych jałowic oraz ich jakość są niższe niż u samic dojrzałych płciowo. Podczas jednego zabiegu można pobrać od kilku do nawet 30 oocytów. Jednak największą ich liczbę uzyskuje się od krów mięsnych.

– *Parametrem świadczącym o wielkości rezerwy jajnikowej, czyli liczby oocytów, jest poziom hormonu antymüllerowskiego (AMH). Wypożyczenie naszego laboratorium pozwala na oznaczenie poziomu AMH u wybranych do zabiegów zwierząt* – podkreśla profesor Potocka, dodając: – *Jednak jest to zabieg stosunkowo kosztowny.*

### Bez hormonów

Zabieg OPU wykonuje się bez wcześniejszej stymulacji hormonalnej dawczyń, a więc nie wywołuje się superowulacji, tak jak przy tradycyjnym pobieraniu zarodków. Konieczność stosowania hormonów generuje dodatkowe koszty, wymaga dużego zaangażowania obsługi i przestrzegania terminu ich podawania oraz nieporównywalnie dłuższego czasu potrzebnego do powrotu samic do prawidłowego cyklu. Dlatego metoda pozyskiwania oocytów i hodowli zarodków *in vitro* już dawno w Stanach Zjednoczonych zastąpiła klasyczne zabiegi ET wykonywane przy użyciu zarodków wyptukanych, a teraz i w Europie zdobywa coraz większe uznanie nie tylko hodowców bydła mlecznego, ale także mięsnego, dla których przepędzanie zwierząt przez poskrom i podawanie hormonów jest pracołłonne.

### Efektywna metoda

Pobieranie oocytów od tych samych dawczyń można przeprowadzić kilkakrotnie. Metoda ta, mimo wkłuwania się w miąższ jajników, jest mało inwazyjna, a samice powracają do normalnego cyklu rujowego w ciągu kilku dni od zakończenia tego procesu. Regularne pobieranie komórek jajowych hamuje wystąpienie owulacji, ponieważ rezerwa jajnikowa jest wykorzystywana na bieżąco. Efektywność metody OPU jest znacznie wyższa niż w przypadku tradycyjnego pozyskiwania zarodków, ponieważ ich wyptukiwanie może być stosowane



**Prof. Izabela Wocławek-Potocka sprawdza pod mikroskopem liczbę uzyskanych oocytów.**

jedynie u sztuk dojrziałych płciowo nie częściej niż co 45-60 dni. Przy pozyskiwaniu oocytów zabieg ten można przeprowadzić około ośmiu razy w ciągu miesiąca.

### **Oszczędność nasienia**

Metoda pobierania komórek jajowych dobrze sprawdza się u krów wysokowydajnych. Zwierzęta te z uwagi na szybki metabolizm słabo reagują na hormony i trudno wywołać u nich superowulację niezbędną do uzyskania dużej liczby zarodków pożądaných w tradycyjnej metodzie

transplantacji. Zabieg OPU wykonuje się również u cennych krów, które z różnych przyczyn mają zaburzenia płodności i nie można ich zacielić. Metodę tę wykorzystuje się także u sztuk cielnych do momentu, kiedy macica opadnie na tyle, że nie można dosięgnąć do jajników. Pobieranie oocytów można stosować również u krów kontuzjowanych, które z przyczyn losowych muszą być wyeliminowane ze stada, a nawet u samic, które padną lub są skierowane do rzeźni. W takim przypadku wystarczy pobrać od nich jajniki,

z których bezpośrednio uzyskuje się komórki jajowe. Dużą zaletą jest również mniejsze zużycie nasienia niż w metodzie pozyskiwania gotowych zarodków. Przy metodzie hodowli *in vitro* do zapłodnienia komórek jajowych pobranych od dwóch dawczyń przeznaczą się jedną porcję nasienia seksowanego. Jedną sromkę nasienia konwencjonalnego przeznaczą się nawet na oocyty pobrane od ośmiu samic. W przypadku zapłodnienia dawczyń w tradycyjnej metodzie pozyskiwania zarodków na samicę po superowulacji wykorzystuje się nawet 6 porcji nasienia, co znacznie zwiększa koszty zabiegu.

### **Bezpośrednia sprzedaż zakazana**

Oocyty pozyskane od jałowic z gospodarstwa w Lisnowie po dojrzeniu są zapładniane topowymi buhajami pochodzącymi z Polski oraz z zagranicy, a uzyskane potomstwo będzie genomowane.

– *Gotowe zarodki w pierwszej kolejności będziemy wykorzystywać na własne potrzeby. Planujemy je przetransportować raz w miesiącu, a biorczyniami będą jałowki o niższej wartości hodowlanej* – mówi zootechnik Paweł Łangowski, dodając: – *W planach mamy również sprzedaż zarodków, ale obecnie obowiązujące prawo uniemożliwia nam bezpośredni handel nimi, więc będziemy musieli robić to przez pośrednika.* ■

**Remigiusz Kryszewski**