

EMBRYOTRANSPLANTATIE BIJ HET VARKEN

G. Hoflack, B. Mateusen, D. Maes, A. Van Soom, M. Verdonck, A. de Kruif

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde
Faculteit Diergeneeskunde, Salisburylaan 133, B 9820 Merelbeke
geert.hoflack@rug.ac.be

SAMENVATTING

Embryotransplantatie is een techniek die bij meerdere diersoorten reeds lang in de belangstelling staat. Ook bij het varken is men reeds sinds de jaren zestig met deze materie bezig. Bij het varken zijn er echter soortspecifieke problemen die de snelle ontwikkeling en wereldwijde toepassing van embryotransplantatie, zoals bij het rund, in de weg staan. De anatomie van het geslachtsstelsel van de zeug, alsook de gevoeligheid voor chirurgische ingrepen belemmeren het op punt stellen van een eenvoudige, vlot reproduceerbare techniek. Het invriezen van varkensembryo's blijkt ook nog steeds een struikelblok bij deze techniek.

In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de meest recente ontwikkelingen betreffende embryotransplantatie bij het varken.

INLEIDING

Reeds sinds de jaren zestig is er interesse voor embryotransplantatie (ET) bij het varken (Hancock en Hovell, 1962). In tegenstelling tot het rund breekt de techniek bij het varken slechts langzaam door. Daar waar ET bij runderen reeds jaren in de praktijk toegepast wordt met bevredigende resultaten is dit bij varkens veel minder het geval. Dit is onder meer te wijten aan een aantal soortspecifieke problemen die ET bij varkens bemoeilijken, zoals de aard van het varken die manipulatie zonder sedatie moeilijk maakt en de anatomie van het genitaalstelsel van de zeug. Bij zeugen is de cervix tot 25 cm lang en bovendien zeer goed gesloten, wat transcervicale methoden van ET bemoeilijkt. De gekronkelde baarmoederhoornen zijn zeer lang en zijn aan de binnenzijde bekleed met vele villi (Sack, 1982). Dit impliceert dat het bijna onmogelijk is om transcervicaal (ver) in de baarmoederhoornen door te dringen. Bij het collecteren van embryo's ter hoogte van de cervix bekomt men tegenvallende resultaten, doordat veel embryo's hogerop in de baarmoeder blijven hangen tussen de vele endometriale villi. Vandaar dat ET bij varkens lange tijd een experimenteel gebeuren geweest is dat gepaard ging met ingrijpende chirurgische handelingen. Slechts vrij recent zijn transcervicale methoden ontwikkeld, die tot op de dag van vandaag verder verfijnd

worden om binnen afzienbare tijd in de praktijk bruikbaar te zijn.

TOEPASSINGSMOGELIJKHEDEN

Naast de louter wetenschappelijke interesse voor het op punt stellen van een bruikbaar procédé zijn er de voordelen voor de dierenziektebestrijding van een dergelijke techniek. Aangezien de zona pellucida als een betrouwbare barrière tegen infecties beschouwd mag worden (Wrathall, 1984), is het mogelijk om door middel van zona-intacte embryo's, met een minimale kost, varkensgenetica naar gesloten bedrijven te transporteren zonder risico op ziekteoverdracht en zonder problemen betreffende het dierwelzijn. In het kader van de internationale handel en de daarbij gestelde sanitaire eisen is dit zonder twijfel de belangrijkste indicatie.

De techniek leent zich bijgevolg ook om biggen te produceren voor specific pathogen free (SPF) bedrijven (Curnock *et al.*, 1976). Meestal worden SPF biggen bekomen na keizersnede of hysterectomie, maar aangezien een aantal pathogenen de biggen transcervicaal kan besmetten, is deze methode niet waterdicht. ET kan ook hier een waardig alternatief bieden.

Bovendien kan een bepaald genetisch potentieel (door cryopreservatie) bewaard worden wanneer een beslag dient opgeruimd te worden bij uitbraken van

wettelijk bestreden ziekten (Bolin *et al.*, 1979; James *et al.*, 1983). De uitbraak van Mond en Klauwzeer in het Verenigd Koninkrijk is een schoolvoorbeeld daarvan.

Daarnaast is ET ook een noodzakelijk onderdeel van de transgenese. Transgene varkens kunnen gebruikt worden voor de productie van bepaalde humane eiwitten, zoals groeihormoon, of zelfs weefsels voor xenotransplantatie (Wilmot *et al.*, 1988). De genetische manipulatie die hierbij komt kijken, gebeurt in vitro op het niveau van de pasbevruchte eicel, waarbij een paar honderd kopieën van het te transfereren gen in de kern van een bevruchte eicel geïnjecteerd worden, in de hoop dat een aantal kopieën in het genoom geïncorporeerd wordt. Bijgevolg is hiervoor een op punt staande in vitro productie en ET vereist.

Tenslotte is het via ET mogelijk een groter aantal nakomelingen te produceren van genetisch uitmuntende moederdieren. Aangezien zeugen meermaals per jaar werpen en meerdere biggen per worp grootbrengen, is dit de minst belangrijke indicatie.

COLLECTIE VAN HET UITGANGSMATERIAAL

De collectie van eicellen: in vitro embryo's

Bij het in vitro opkweken van varkensembryo's kunnen de eicellen gecollecteerd worden door de ovaria van de donorzeug te verzamelen na *slachten*. Men kan de eicellen dan collecteren door de follicels in de ovaria aan te prikken en leeg te zuigen (aspireren) of door de ovaria volledig te disseceren en zo de eicellen te collecteren (Stancic *et al.*, 1992).

Een alternatieve wijze om eicellen van zeugen te bekomen zonder dat deze dienen geslacht te worden en zonder ingrijpende chirurgische technieken is de laparoscopische eicelcollectie of "ovum pick-up" methode. Hierbij gaat men de ovaria via een endoscoop, die langs een steekopening ingebracht wordt in de buikholte, aanprikken om de eicellen te aspireren (Brüssow en Ratky, 1994a,b; Brüssow *et al.*, 1995). Het ontwikkelen van een niet-laparoscopische, transvaginale "ovum pick-up" methode onder echografische begeleiding, zoals bij het rund (Bols *et al.*, 1994), is een nog minder ingrijpend alternatief. Preliminaire resultaten van een dergelijke techniek werden heel recent beschreven door Bellow *et al.* (2001). Zeugen worden in een metalen kooi geplaatst en vastgeklemd om afweerreacties te vermijden. De ovaria worden rectaal gepalpeerd en gepositioneerd voor de vaginaal ingebrachte 5 MHz sectoriële transducer. Deze is

voorzien van een aangepast handvat en een aspiratiesysteem. Daarna worden follicels die groter zijn dan 4 - 6 mm diameter mits een bepaalde onderdruk leeggezogen en worden de eventueel aanwezige eicellen opgevangen. Bij 60 % van de zeugen werden op die manier 2 of meer eicellen per collectie bekomen. Bij gelten en zeer nauwe zeugen is het correct rectaal positioneren van de ovaria echter moeilijk en soms zelfs onmogelijk. Twee van de 25 zeugen stierven als gevolg van ovariële bloedingen die de auteurs wijten aan afweerreacties van de zeugen wanneer ze onvoldoende gefixeerd worden (Bellow *et al.*, 2001).

Van zodra men de eicellen verzameld heeft, moeten die in het laboratorium rijpen (in vitro maturatie), bevrucht worden (in vitro fertilisatie) en uiteindelijk opgekweekt worden tot een transplanteerbaar embryo (in vitro cultuur). Deze opeenvolging van processen wordt de in vitro productie van varkensembryo's genoemd.

De collectie van embryo's: in vivo embryo's

Het is ook mogelijk om embryo's in plaats van eicellen bij de donorzeug weg te halen. Vooreerst kan men de zeug na inseminatie laten *slachten* en uit de geslachtsstelsels de embryo's spoelen. Op basis van het aantal corpora lutea heeft men een idee omtrent het aantal embryo's dat men kan verwachten. De embryo's komen ongeveer 2 dagen na de ovulatie of 4 dagen na de aanvang van de oestrus, op het vier- of zes-cellig stadium in de uterus terecht (Oxenreider en Day, 1965; Hunter, 1974). Op dat ogenblik hoeven alleen de eileiders en de toppen van de uterusshoornen gespoeld te worden. Meerdere auteurs melden dat de bekomen resultaten even goed zijn als wanneer de embryo's verzameld worden bij levende varkens, op voorwaarde dat het 'flushen' onmiddellijk na het slachten gebeurt (Schlieper en Holtz, 1986; Wollenberg *et al.*, 1990). Daarnaast werden ook methoden ontwikkeld waarbij de donordieren gespaard blijven, zoals de chirurgische, de laparoscopische en de transcervicale methode.

Bij de *chirurgische methode*, die reeds sinds de zestiger jaren aangewend wordt (Hancock en Hovell, 1962), wordt de zeug onder volledige anesthesie gebracht. Ter hoogte van de linea alba wordt een incisie gemaakt waarlangs de baarmoeder en de ovaria naar buiten gebracht worden. Nu kan men de embryo's uit de eileiders en de uterus spoelen. Men kan retrograad spoelen; dit is van de uterotubale junctie naar het infundibulum van de eileider toe (Day, 1979). Het nadeel van deze techniek is dat embryo's die zich reeds

in de baarmoeder bevinden, verloren gaan (Day, 1979; Martin, 1986). Spoelen vanuit de uterus naar de eileider lukt niet, aangezien de uterotubale junctie het terugvloeien van inhoud uit de uterus naar de eileider belet. Een mogelijke oplossing is dat men gaat spoelen vanuit de eileider naar de uterus toe en dat de embryo's in het bovenste segment van de uterus gecollec-teerd worden (Martin, 1986). Meerdere procedures zijn hiervoor ontwikkeld, waarbij, wanneer ze toege-past worden binnen 6 dagen na de ovulatie, 80-90% van de embryo's teruggevonden wordt (Day, 1979).

Om de ingrijpende chirurgische procedure te voor-komen maar toch dezelfde efficiëntie te behouden, werd de *laparoscopische methode* ontwikkeld (Brüssow en Ratky, 1996). Hierbij worden de var-kens 5 dagen na het insemineren geanestheesd en onderste boven gehangen. Op dit tijdstip bevinden alle embryo's zich normaliter reeds in de uterustop. Er wordt een pneumoperitoneum geïnduceerd. Er wor-den 5 openingen gemaakt waarlangs het instrumenta-rium in de buikholte gebracht wordt. De uterus wordt met twee atraumatische forceps gefixeerd, juist onder en een 15-tal centimeter onder de uterotubale junctie. Boven de onderste forceps wordt een steekopening in de uterus gemaakt waarlangs een ballonkatheter in de uterus gebracht wordt die opgeblazen wordt. Onder de bovenste forceps wordt nu, via een steekwonde, een aspiratiecanule in de uterus gebracht waarlangs 70 ml medium doorheen de uterus gespoeld wordt, gevolgd door 30 ml lucht om het afgesloten uterus-deel volledig te ledigen. Meestal wordt 60-65 ml me-dium gerecupereerd en gemiddeld wordt 53,6 % em-bryo's ten opzichte van het aantal corpora lutea gerecupereerd.

Besenfelder *et al.* (1997) beschrijven het eerste volledige laparoscopische scenario voor de collectie én transfer van embryo's, waarbij levende biggen ge-boren werden. Zij maken slechts 3 openingen in de buikwand voor het instrumentarium en flushen via een flexibele polypropyleen katheter die via het in-fundibulum 5 cm diep in de eileider geschoven wordt. Hiervoor wordt de eileider gefixeerd met een atrau-matische forceps. De uterus wordt 15-20 cm caudaal van de uterotubale junctie met een atraumatische for-ceps gefixeerd waarna een metalen katheter met daar-in een afvoertube wordt ingebracht. Via deze forceps wordt de uterus dichtgeknepen. Nu wordt 3 tot 4 keer 20 ml medium via de eileider ingebracht en met een 20 ml-spuut via de afvoertube opgezogen.

Door de moeilijk doorgankelijke zeugencervix en de lange gekronkelde uterus werd lang aangenomen dat het *transcervicaal flushen* van embryo's niet mo-

gelijk was. Hazeleger *et al.* (1989) ontwikkelden ech-ter een methode waardoor dit toch mogelijk werd. Vooreerst diende de cervixbarrière overwonnen te worden. Hazeleger en Van der Lende (1987) ontwik-kelden daarvoor het volgende instrumentarium: een PVC-inbrenghaak, een PVC-geleidestaaf en een PVC-inbrenghuls met daarop een 2 cm lang siliconen-slangetje gelijmd. De inbrenghaak wordt in tegenwij-zerzin doorheen de cervixplooiën geschroefd, nadat de cervixopening eerst manueel gelokaliseerd is om zeker niet in de vaginaplooiën verstrikt te geraken. Zodra men geen weerstand meer voelt bij het draaien wordt de geleidestaaf naast de inbrenghaak doorheen de cervix geschoven. De inbrenghaak wordt nu ver-wijderd en over de geleidestaaf wordt de PVC-buis met het siliconenslangetje naar binnen geschoven om zo een tunnel aan te leggen tussen de vulva en de baar-moeder. Het siliconenslangetje is gebogen en zorgt ervoor dat men één bepaalde baarmoederhoorn kan kiezen. Hierdoor wordt een nylon-slangetje met afge-sloten tip en zijdelingse openingen tot in de baarmoe-der geschoven waarop een spuit kan aangesloten wor-den om embryo's uit de baarmoeder te zuigen of in de baarmoeder te flushen. De zeugen worden hiervoor in een kleine kooi gebracht en na vasten gevoederd, zo-dat deze manipulaties zonder al te veel afweerreacties en zonder sedatie of anesthesie kunnen gebeuren. Aangezien de catheterisatie bij gelten met een zeer nauwe cervix niet steeds mogelijk is, worden het best primipare of multipare dieren gebruikt.

Eens de cervixbarrière was overwonnen restte er nog het probleem de embryo's uit de lange gekronkel-de baarmoeder te flushen. Ook hiervoor ontwikkel-den Hazeleger *et al.* (1989) een techniek waarbij eerst een groot deel van beide uterushoornen geresecerd wordt, 5-10 cm van de ovaria en enkele cm van de cer-vix vandaan. Het geresecerde deel wordt dichtge-hecht en in de buikholte gelaten. De tippen van de ute-rushoornen worden daarna aangesloten op het corpus uteri (Fig. 1). Zo wordt het toch mogelijk om, eens de cervixbarrière gepasseerd is, transcervicaal embryo's te collecteren (Hazeleger *et al.*, 1989; Fig. 1). Dit wordt gedaan door 5 à 6 dagen na de inseminatie 10 tot 20 ml medium herhaaldelijk in de baarmoeder te flushen en daarna opnieuw te aspireren. Het nadeel van deze methode is dat nog steeds een voorafgaande in-grijpende chirurgische procedure, weliswaar slechts eenmalig, vereist is en dat het aantal transcervicaal bekomen embryo's gemiddeld slechts $3,0 \pm 1,22$ (1-4 embryo's) bedraagt. Hazeleger *et al.* (1994) modifi-ceerden daarom hun techniek: de PVC-inbrenghuls werd vervangen door een polyethyleen (PE) tube met

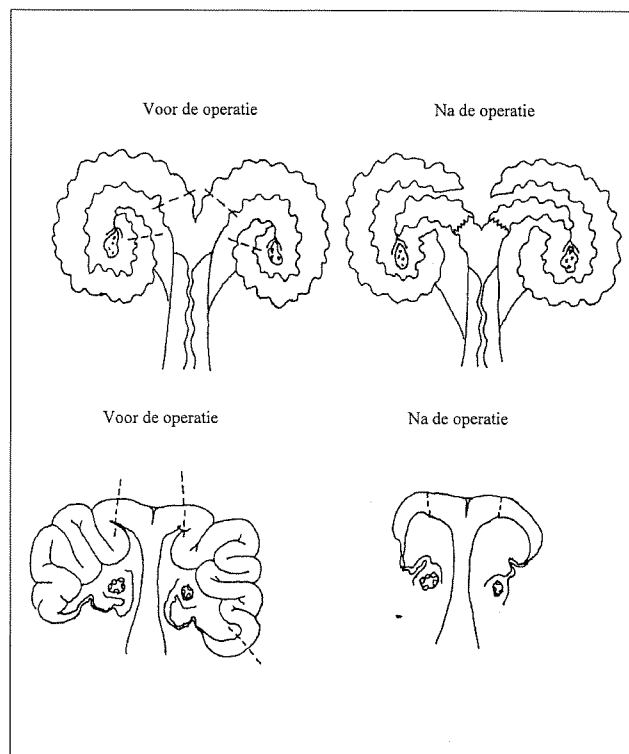


Fig. 1. Verkorte baarmoeders voor transcervicale embryocollectie.

Schematische voorstelling van de techniek van Hazeleger *et al.* (1989, boven) en Kobayashi *et al.* (1989, onder) waarbij de baarmoeder van de donorzeugen verkort wordt om het transcervicaal collecteren van embryo's mogelijk te maken. Bij de techniek van Hazeleger *et al.* wordt het verwijderde stuk baarmoeder dichtgehecht en ter plaatse gelaten, wat een regelmatigere cycleren van de donorzeugen na de ingreep met zich meebrengt

een opblaasbare latex cuff (vlak onder de gebogen top). Eens in de uterus wordt de ballon opgeblazen en de katheter tot tegen de cervix getrokken om verlies van spoelvocht te vermijden. Nu wordt een PE-katheter met verscheidene openingen nabij de afgeronde top doorheen die PE-tube ingebracht en, door de ge-

bogen top van de PE-tube naar één kant te richten, in één hoorn opgeschoven. Door iedere hoorn wordt een 150 ml medium geflusht in porties van 10 ml die geïnjecteerd en daarna weer opgezogen worden. Op die manier wordt per collectie een achttal embryo's bekomen, na superovulatie zelfs tot 18 embryo's (Hazeleger *et al.*, 1994).

Onafhankelijk van Hazeleger *et al.* (1989) ontwikkelden Kobayashi *et al.* (1989) een gelijkaardige techniek. Hierbij werd de uterus ook verkort maar het gereseeerde deel werd verwijderd. Hierdoor werden de dieren trager en minder frequent bronstig en werden tengevolge van de ondermaatse prostaglandineproductie door het resterende endometriumweefsel frequent persisterende corpora lutea vastgesteld. Zij brachten een tweewegs Foley katheter met daarin een stilet onder rectale begeleiding doorheen de cervix tot in het corpus uteri. Het stilet werd verwijderd, de ballon van de tweewegs Foley katheter opgeblazen en 500 tot 1000 ml medium werd doorheen de uterus gespoeld om zo de embryo's naar buiten te flushen. De collecties gebeurden 4 tot 6 dagen na de inseminatie en gemiddeld werden $6,3 \pm 6,0$ embryo's bekomen (0-28 embryo's).

De mogelijkheden en succespercentages betreffende het verzamelen van eicellen of embryo's zijn weergegeven in Tabel 1.

HET INVRIEZEN VAN VARKENSEMBRYO'S

Polge (1977b) beschreef dat viercellige varkens-embryo's goed bewaarbaar zijn gedurende 24 uren bij 20°C in verschillende media. Hij stelde dat eens men onder de kritische temperatuur van 15°C komt, de embryo's tengevolge van hun hoge lipideninhoud niet meer overleven (Polge *et al.*, 1974). Uit onderzoek

Tabel 1. Verschillende methoden om eicellen of embryo's te verzamelen met de bijhorende succespercentages (= het aantal terug gevonden eicellen of embryo's gedeeld door het aantal corpora lutea maal 100).

Uitgangsmateriaal	Methode	Succespercentage
Eicellen	Slachten	100 %
	Laparoscopisch: OPU	?
Embryo's	Slachten	100 %
	Chirurgisch	80 - 90%
	Laparoscopisch	53,6 %
	Transcervicaal	?

blijkt dat geëxpandeerde en uitgekijpte blastocysten veel minder schade ondervinden bij lage temperaturen dan de jongere embryonale stadia, dit deels door hun lagere lipideninhoud (Nagashima *et al.*, 1988). Deze blastocysten bleven vitaal na blootstelling aan 11°C en konden gedurende korte tijd ingevroren worden bij -20°C mits gebruik werd gemaakt van een cryoprotectans, zoals dimethylsulfoxide (Nagashima *et al.*, 1989 a,b). Dit resulteerde in de geboorte van biggen na transfer (Hayashi *et al.*, 1989; Feng *et al.*, 1991). Uiteindelijk werd het ook mogelijk om embryo's te bewaren bij veel lagere temperaturen in vloeibare stikstof (-196°C) en om na transfer levende biggen te produceren (Kameyama *et al.*, 1990; Kashiwazaki *et al.*, 1991). Nagashima *et al.* (1994) melden overlevingspercentages na ontdooien tussen 17 en 50% en tussen 38 en 96% voor respectievelijk geëxpandeerde en uitgekijpte blastocysten. Als cryoprotectans werd glycerol gebruikt, later een combinatie van glycerol en sucrose (Nagashima *et al.*, 1995a,b) of beter nog ethyleenglycol (Weber en Youngs, 1994). Conventionele trage koeling (0,3°C per minuut tussen -7 en -35°C) werd bij het invriezen toegepast. Het ontdooien gebeurde snel in een warmwaterbad (35-37°C) waarna het cryoprotectans stapsgewijs werd verdund. Met deze methode werden 4 biggen uit 66 embryo's geboren. Jongere varkensembryo's (1-8-cellige) kunnen geschikt gemaakt worden voor traag invriezen door ze na centrifugatie micromanipulatorisch te ontvetten (Nagashima *et al.*, 1994, 1995a,b).

Een andere invriesprocedure, beschreven door Dobrinsky en Johnson (1994) alsook door Nagashima *et al.* (1996), is de vitrificatie. Onder vitrificatie verstaat men het snel afkoelen van het embryodragende medium, zodat geen ijskristallen gevormd worden en bijgevolg geen fysische beschadiging van de embryo's optreedt. Hierbij kunnen eventueel antivriesglycoproteïnen gebruikt worden om ijskristalvorming te vermijden. Dobrinsky en Johnson (1994) slaagden er als eersten in na vitrificatie en ontdooien een verdere ontwikkeling van de varkensembryo's te bekomen. Nagashima *et al.* (1996) beschrijven dat invriezen door vitrificatie van vooraf na centrifugatie ontvette embryo's eveneens mogelijk is. Centrifugerend zonder ontvetten leverde slechtere resultaten op. Vajta *et al.* (1997a,b) gebruikten, naar analogie met het rund, de "open pulled straw" techniek (OPS), die een aangepaste vorm van vitrificatie is. Bij deze techniek worden de embryo's via opengetrokken rietjes met zeer kleine diameter, door capillaire vulling samen met het medium, opgezogen. Als cryoprotectans wordt een combinatie van dimethylsulfoxide, ethy-

leenglycol en sucrose gebruikt, doch door het kleine volume en de dunne wand van deze vernauwde rietjes kan de concentratie van het potentieel toxische cryoprotectans gereduceerd worden. De rietjes worden dan verticaal in vloeibare stikstof gebracht, zodat ze direct bevroren. Dit resulteert in een minimale fysische beschadiging van de ingevroren embryo's (Vajta *et al.*, 1997a). Ontdooien gebeurt in verwarmd medium (39°C) waarin het rietje verticaal gehouden wordt zodat het embryo en het omgevende medium in het rietje snel ontdooien, waarna het medium in het rietje verdund wordt met het ontdooiemedium en het embryo uiteindelijk uit het rietje glijdt. Na ontdooien werden aanvaardbare resultaten bekomen wat betreft de verdere ontwikkeling van de embryo's tot blastocysten en het uitkippen ervan; alleen het invriezen via deze methode van 8- tot 16- cellige varkensembryo's, met andere woorden het morula stadium, bleek problematisch (Vajta *et al.*, 1997b). Het stapsgewijs verdunnen van het gebruikte cryoprotectans bij ontdooien blijkt ook bij vitrificatie voordelig te zijn voor de verdere ontwikkeling van de ontdooide embryo's (Kobayashi *et al.*, 1998).

Dobrinsky *et al.* (2000) benadrukken dat bij vitrificeren het cytoskelet van de varkensembryo's moet beschermd worden tegen beschadigingen. Dit kan gebeuren door het toevoegen van microfilamentstabilisatoren, zoals cytochalazine-B. Zij slaagden erin geëxpandeerde en uitgekijpte blastocysten, na stabilisatie, vitrificatie en ontdooien verder te laten ontwikkelen. Na transfer van dergelijke embryo's werd een drachtigheidpercentage van 60 % bekomen met een gemiddelde worpgrootte van 7,25 biggen. Vitrificeren na microfilamentstabilisatie van morula's en vroege blastocysten leverde echter teleurstellende resultaten op (Dobrinsky *et al.*, 2000). Beebe *et al.* (2000) slaagden er echter in om met een vergelijkbaar protocol na centrifugeren zonder micromanipulatie, vitrificeren na toevoegen van cytochalazine-B via de OPS-techniek en ontdooien een verdere ontwikkeling te krijgen bij zona-intacte jonge blastocysten. Dit is een grote stap vooruit, aangezien op deze manier relatief jonge stadia ingevroren kunnen worden via vitrificatie zonder verlies van de zona pellucida. Dit zou internationaal handelsverkeer van ingevroren varkensembryo's in de toekomst mogelijk kunnen maken.

HET SYNCHRONISEREN VAN DONOR EN RECEPTOR

Donorzeugen gaat men meestal hormonaal behandelen om superovulatie te induceren. Hierbij neemt

het aantal gecollecteerde eicellen of embryo's toe. De vruchtbaarheid van eicellen bekomen na superovulatie, blijkt niet lager te zijn dan anders (Guthrie *et al.*, 1974).

Webel *et al.* (1970) stelden dat chirurgisch transplanteren het best naar gesynchroniseerde zeugen gebeurt. Wanneer de receptor reeds verder in de cyclus gevorderd is dan de donor, heeft dit duidelijk nefaste gevolgen voor de drachtresultaten (Polge, 1982; Jarrell *et al.*, 1990). Het verschil in chronologie tussen de cyclus van de donor en de receptor bedraagt beter niet meer dan 24 uren (Polge, 1982).

Postpuberale dieren

Bij cyclerende donordieren volstaat meestal één enkele injectie met gonadotrofinen (pregnant mare serum gonadotrophine: PMSG, Folligon, Intervet) tijdens de folliculaire fase van de cyclus; dit is dag 15 à 16. Om zeker te zijn dat de folliculaire fase van de cyclus bereikt is, kan men na de bronstdetectie 16 dagen wachten alvorens te superovuleren of kan men de dieren met prostaglandines injecteren van zodra de corpora lutea ervoor gevoelig zijn (Kang en Wu, 1991). Dit dient te gebeuren na dag 12 indien de bronstdatum gekend is, of met behulp van 2 prostaglandine-injecties met 12 dagen tussentijd indien de bronstdatum niet gekend is. Twee dagen daarna kan men dan de superovulatietherapie starten. Indien men meerdere zeugen terzelfdertijd wil superovuleren, kan men de dieren, los van hun cyclus, ook gedurende 17 à 18 dagen een progesteronderivaat per os toedienen, zoals altrenogest (Regumate, Janssen). Op die manier loopt de cyclus verder tot de folliculaire fase bereikt is om op dat punt te stagneren. Na 17 à 18 dagen zijn alle zeugen aan die folliculaire fase; het superovuleren kan nu beginnen (Kang en Wu, 1991; Bolamba en Sirard, 1996).

Meestal wordt een gestandaardiseerde hoeveelheid van 1000 IU PMSG toegediend (Kim *et al.*, 1990; Galvin *et al.*, 1994), hoewel sommige onderzoekers hiervan afwijken (Bolamba en Sirard, 1996; Besenfelder *et al.*, 1997). Dit hormoon is verantwoordelijk voor de groei en de rijping van de follikels en in mindere mate voor de uiteindelijke ovulatie. Deze inspuiting wordt soms gecombineerd met een injectie met human chorionic gonadotrophine (hCG, Chorulon, Intervet). Deze tweede injectie kan ofwel terzelfdertijd (Kim *et al.*, 1990), ofwel drie dagen na de eerste injectie (Galvin *et al.*, 1994) toegediend worden. Uit een studie van Bolamba en Sirard (1996) bleek dat het superovuleren van postpuberale gelten resulteerde in

meer embryo's dan wanneer prepuberale gelten werden gebruikt. De embryo's gecollecteerd bij de prepuberale gelten ontwikkelden echter beter in vitro. Aangezien de prepuberale dieren goedkoper zijn dan cyclerende gelten wordt meestal met prepuberale gelten gewerkt.

Prepuberale dieren

Bij nog niet cyclerende gelten is het superovuleren eenvoudiger, omdat men gelijk wanneer kan beginnen en met een cyclus nog geen rekening hoeft te houden. Een minimum lichaamsgewicht van de gelten van 80 kg is wel vereist (Baker, 1979). Volgens Day (1979) is er een duidelijk seizoengebonden respons op de superovulatie: in zijn onderzoek lag het aantal ovulaties gedurende de lente dubbel zo hoog als tijdens de overige seizoenen.

Het schema voor het superovuleren komt overeen met dat bij cyclerende dieren, namelijk 1000 IU PMSG, gevolgd door 500 IU hCG 48 tot 72 uren later (Baker en Coggins, 1968; Baker, 1979; Kang en Wu, 1991). Ook hier wijzigen sommige auteurs enigzins deze doseringen (Baker en Coggins, 1968; Springmann *et al.*, 1988; Reichenbach *et al.*, 1993; Wallenhorst en Holtz, 1999).

Bolamba en Sirard (1996) vonden dat het stimuleren van de ovaria, vooraleer met superovulatie begonnen wordt, een groter aantal embryo's oplevert. Zij concludeerden dat het beste schema het volgende was: op dag 0 een injectie met PG 600 (Intervet), op dag 3 een injectie met 750 IU hCG, van dag 16-19 350 mg cloprostenol per dag en daarna het superovuleren met 1500 IU PMSG op dag 19 gevolgd door 1000 IU hCG 84 uren later. De inseminatie van de donoren gebeurt het best tweemaal, namelijk 24 en 36 uren na de laatste hCG-injectie.

Hazeleger *et al.* (2000b) vermelden dat de dosis PMSG bij het superovuleren van donoren de kwaliteit van de bekomen embryo's beïnvloedt: bij gebruik van 1500 IU PMSG was het aantal bekomen embryo's significant hoger dan bij 1000 IU PMSG, maar de bekomen blastocysten vertoonden significant minder cellen bij hogere PMSG doses. Hayashi *et al.* (1994) meldden vroeger reeds dat het percentage normale embryo's afneemt bij PMSG-doses hoger dan 1000 IU.

HET TRANSPLANTEREN VAN VARKENS-EMBRYO'S

Doordat in vitro fertilisatie nu beter op punt staat, kunnen embryo's in verschillende ontwikkelingssta-

dia getransplanteerd worden. Het spreekt voor zich dat er steeds zal gepoogd worden om de embryo's op de plaats in te brengen waar ze zich normaal in het vrouwelijk geslachtsstelsel bevinden in het ontwikkelingsstadium waarbij de transfer plaatsvindt.

Omwille van transuteriene migratie van embryo's volstaat het om slechts in één eileider of uterusshoorn-top te transplanteren (Polge en Dziuk, 1970; Martin, 1986).

Wanneer er rekening gehouden wordt met een overlevingspercentage van 60 – 65 % wordt het best een zestiental embryo's ingeplant, als men een toomgrootte van een tiental biggen wenst te bekomen (Polge, 1980). Het blijkt trouwens dat het overlevingspercentage van de embryo's negatief beïnvloed wordt wanneer er meer dan 16 embryo's ingebracht worden (Brüssow, 1990). In ieder geval moet er minstens 4 embryo's ingebracht worden om de dracht in stand te houden (Polge *et al.*, 1966).

De chirurgische methode

De chirurgische transfer, hetzij naar de eileiders, hetzij naar de uterus, alnaargelang het ontwikkelingsstadium van de te transfereren embryo's, werd voor het eerst toegepast in 1962 (Hancock en Hovell) en daarna door meerdere onderzoekers gebruikt (Stein-Stefani en Holtz, 1987; Cameron *et al.*, 1989). Pas toen minder ingrijpende methoden met een aanvaardbare efficiëntie ontwikkeld werden, met name de laparoscopische benadering, werd deze drastische methode verlaten.

Pope *et al.* (1972) transplanteerden één- tot tweecellige embryo's met succes, langs het infundibulum, in de eileiders van gesynchroniseerde receptorzeugen. Vanaf het viercellige stadium bevinden de embryo's zich *in vivo* in de baarmoeder zodat van dan af beter naar de baarmoeder getransplanteerd wordt. Polge (1977a) beschreef de transplantatie van viercellige- en oudere embryo's naar de uterusstop. Dit kan door de baarmoedertop te punteren en de embryo's daarna naar binnen te spoelen. De punctieplaats wordt niet gehecht. Stein-Stefani en Holtz (1987) beschrijven een gelijkaardige chirurgische techniek waarbij een naald in de uterus geprikt wordt en waardoorheen een katheter geschoven wordt om zo de embryo's intra-uterien te deponeren. De potentiële bloedingen bij het punteren van de uterus kunnen omzeild worden door de embryo's in de baarmoeder te flushen via de eileider. Hierbij wordt de eileider gepuncteerd of wordt een kleine incisie gemaakt aan de basis van de eileider. Op die manier worden de embryo's voorbij

de uterotubale junctie in de uterus gedeponereerd (Polge, 1982). Een alternatief is het sonderen van de eileider door een canule diep in de eileider te brengen langs het infundibulum en met een spuit de embryo's doorheen de uterotubale junctie in de uterus te spoelen (Martin, 1986).

De drachtigheidpercentages blijken achteruit te gaan wanneer men 6 tot 9 dagen oude embryo's, dus na het expanderen van de blastocyst, transplanteert (Hunter *et al.*, 1966; Webel *et al.*, 1970; Polge, 1982).

Wat de lokalisatie van deponeren in de uterus betreft, merkten Stein-Stefani en Holtz (1987) geen verschil tussen de uterusstip en het midden van de uterusshoorn bij chirurgische transfer (drachtigheidpercentages van respectievelijk 80 % en 78,5 %).

Het grote nadeel van de chirurgische benadering is het optreden van verklevingen van de oviducten en de uterus, met verminderde vruchtbaarheid tot gevolg (Hazeleger *et al.*, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989).

De laparoscopische methode

Besenfelder *et al.* (1997) beschrijven hiervoor een procedure die grotendeels overeenkomt met hun procedure voor de collectie van embryo's. De varkens worden geanestheiseerd en in ruglig benaderd. Via 3 openingen wordt de transfer laparoscopisch uitgevoerd, hetzij naar de eileider wanneer 2 tot 4-cellige embryo's overgeplant worden, hetzij naar de uterusstop wanneer 4-cellige en oudere embryo's getransfereerd worden. De eileider wordt met een atraumatische forceps gefixeerd en langs het infundibulum wordt een katheter in de ampulla van de eileider opgeschoven. Hierlangs worden de embryo's dan in de eileider gedeponereerd. Wanneer naar de uterus getransfereerd wordt, wordt deze ook met een atraumatische forceps gefixeerd, juist onder de uterotubale junctie en wordt via een steekopening de aanvoerbuis in een metalen katheter 5 - 7 cm diep in het lumen gebracht. Na transfer van de embryo's in de uterus worden alle openingen, zowel in de uterus als in de huid, gehecht. Tegenwoordig worden reeds drachtigheidpercentages van 90 % vermeld (Besenfelder *et al.*, 1998).

De transcervicale methode

Hier moeten de embryo's reeds voldoende ver ontwikkeld zijn, zodat niet meer naar de oviduct maar reeds in de uterus mag getransfereerd worden.

De eerste onderzoekers die erin slaagden transcervicaal één dracht tot stand te brengen, waren Polge en Day (1968). Voortbouwend op hun techniek slaagden

Reichenbach *et al.* (1993) erin meerdere drachten tot stand te brengen en zelfs levend geboren biggen te verwerven. De gebruikte techniek bestaat erin dat de zeugen onder algemene anesthesie gebracht worden en daarna opgehangen worden, zodat de zeugen met de kop naar de grond gericht is en de achterpoten omhoog gericht zijn. Dit wordt gedaan om het geslachtsstelsel van de zeugen te verstrijken en om zo een vlottere doorgang doorheen de cervix te bewerkstelligen en het transport van de embryo's in de uterus, dankzij de zwaartekracht, te bevorderen. Er wordt een steriele wegwerpKI-katheter zo diep mogelijk in de cervix geschroefd. Daarna wordt een steriele embryotransfercanule beladen met 25 tot 40 embryo's tussen het achtcellig en het uitgekijpte blastocyststadium in een klein volume medium zo ver mogelijk doorheen de inseminatiekatheter in de cervix en eventueel tot in het corpus uteri gebracht. De embryo's worden nu in de cervix of de uterus gedeponed, de canule wordt verwijderd en de embryo's worden verder tot in de baarmoeder geflusht door de inseminatiepipet te spoelen met (10-20 ml) vloeistof.

Met deze techniek bekwamen Reichenbach *et al.* (1993) 10% drachten met een gemiddelde worpgrootte van $5,0 \pm 2,6$ biggen.

Galvin *et al.* (1994) ontwikkelden eveneens een techniek voor transcervicale embryotransfer en verzeleken die met de chirurgische manier. Hun transcervicale methode bestond erin bij uitgevaste, lichtgeseleerde zeugen een steriele, wegwerpKI-pipet met daarop een driewegkraan in tegenwijzerzin zo diep mogelijk in de cervix te schroeven. Een tomcat katheter geladen met embryo's in een beperkt volume medium werd dan in deze inseminatiepipet geleidigd en verwijderd. Daarna werd 10 tot 12 ml medium gevolgd door 10 tot 15 ml lucht in de inseminatiepipet gespoten om de embryo's doorheen de cervix in de uterus te flushen.

Zij bekwamen 26,1 % drachtigheidpercentage, 21,7 % à terme gedragen drachten met een gemiddelde worpgrootte van $4,3 \pm 0,7$ biggen bij de transcervicale, versus 63,2 % drachtigheidpercentage, 63,2 % worpen met $7,1 \pm 0,6$ biggen gemiddelde worpgrootte bij de chirurgische embryotransfer.

Een techniek om de cervixbarrière op een elegante manier, zonder sedatie van de zeugen, te overwinnen en aldus embryo's in een klein volume medium in de baarmoeder van receptorzeugen te brengen, werd ontwikkeld door Hazeleger en van der Lende (1987).

Zij bekwamen na transcervicale transfer tot 55 % drachtigheidpercentage en een worppcentage van

33 % met een gemiddelde worpgrootte van $6,7 \pm 1,6$ biggen (Hazeleger en Kemp, 1994). Later werden drachtigheidpercentages tot 59% vermeld (Hazeleger en Kemp, 1999).

Daarnaast werd ook een instrumentarium ontworpen dat toelaat embryo's in de baarmoederhoornen en niet in het corpus uteri te deponeren (Li *et al.*, 1996). Zij anestheseren de varkens en leggen ze op hun rug alvorens de pipet in de uterus te manoeuvreren. Voor eerst is er een aangepaste KI-pipet nodig die in de cervix dient geschroefd te worden om een verankering in de distale cervixplooiën te bekomen en de cervix als het ware af te sluiten, te strekken en te immobiliseren. Daarin zit een stalen buisje met een speciaal ontworpen tip die nu verder doorheen de cervixplooiën geschroefd wordt tot in het corpus uteri. Doorheen dit buisje is een soort voelstaaf ingebracht om het geheel voorbij de uterusbifurcatie in één van de baarmoederhoornen te manoeuvreren. Eens de gewenste lokatie bereikt is, wordt de voelstaaf verwijderd en wordt de embryodrager beladen met embryo's in een zeer klein volume medium ingebracht om zo de embryo's atraumatisch in een uterushoorn te deponeren. Deze drager is zodanig ontworpen dat die verder in de uterushoorn kan geduwd worden waardoor de embryo's atraumatisch en tamelijk diep in de uterushoorn gedeponed worden. Het kleine volume medium in de embryodrager zorgt ervoor dat het uteriene milieu qua samenstelling quasi ongewijzigd blijft.

Met dit instrumentarium slaagden zij erin 5 van de 16 receptorzeugen (31%) drachtig te krijgen, met een gemiddelde worpgrootte van $6,2 \pm 3,1$ biggen.

In Tabel 2 is een overzicht gegeven van de mogelijke transfertechnieken, de bekomen drachtigheidpercentages en de betrokken onderzoeksgroepen.

Hazelzegeer en Kemp (1999) stellen dat de beste resultaten bekomen worden zonder sedatie van de receptorzeugen (hogere drachtigheidpercentages) en waarbij de embryo's in een klein volume medium in de uterus worden gebracht (hogere worpgrootte). Dezelfde auteurs stellen eveneens dat goede resultaten na transcervicale transfer veel meer afhangen van de kwaliteit van de getransfereerde embryo's dan van de uteriene kwaliteit van de receptorzeug. Het hygiënisch te werk gaan, ter preventie van endometritis, wordt echter eveneens als belangrijk ervaren. In dit opzicht adviseren Hazeleger en Kemp (1999) niet alleen omhulsels over het steriele materiaal aan te brengen, om contaminatie van het uteriene milieu door vaginale flora te vermijden, maar ook om antibiotica toe te dienen

Tabel 2. Verschillende mogelijkheden van embryo transfer, de bekomen drachtigheidpercentages en de auteur(s).

Methode	Drachtigheidpercentage	Auteur(s)
Chirurgisch	± 80 %	Stein-Stefani en Holtz, 1987
Laparoscopisch	90 %	Besenfelder <i>et al.</i> , 1998
Cervicaal	10 %	Reichenbach <i>et al.</i> , 1993
Transcervicaal	26,1 %	Galvin <i>et al.</i> , 1994
	31 %	Li <i>et al.</i> , 1996
	59 %	Hazeleger <i>et al.</i> , 1999

van 5 dagen vóór tot 5 dagen na transfer alsook in het transfermedium.

De plaats waar de embryo's in de uterus gedeponeerd worden, blijkt van belang te zijn voor de uiteindelijke resultaten. Galvin *et al.* (1994) bekwamen 63,2 % drachtigheidpercentage en een gemiddelde worpgrootte van 7,1 biggen na chirurgische transfer in één uterushoorn versus 21,7 % drachtigheidpercentage en een gemiddelde worpgrootte van 4,3 biggen na transcervicale transfer. De oorzaak van deze verschillen was volgens hen onder meer te wijten aan de plaats van deponeren van de embryo's. Deze theorie werd nadien door meerdere onderzoeken bevestigd (Modl, 1994; Wallenhorst en Holtz, 1999). Wallenhorst en Holtz (1999) deponerden de embryo's via chirurgische transfer ofwel in het middenste gedeelte van één uterushoorn, ofwel in het caudale gedeelte van één uterushoorn of in het corpus uteri. De bekomen drachtigheidpercentages waren respectievelijk 88, 81 en 12 %. De gemiddelde overlevingspercentages van de ingeplante embryo's bedroegen respectievelijk 41, 29 en 3 %. Dit verschil in resultaten zou medeverantwoordelijk zijn voor de betere resultaten bekomen na chirurgische transfer, aangezien de embryo's bij transcervicale embryo transfer meestal in het corpus uteri gedeponeerd worden (Galvin *et al.*, 1994; Hazeleger en Kemp, 1994). In dit opzicht is het instrumentarium van Li *et al.* (1996) voor transcervicale transfer het beste, aangezien de embryo's hier niet in het corpus uteri maar in het caudale gedeelte van de uterushoornen kunnen gedeponeerd worden.

Daarnaast blijkt ook het ontwikkelingsstadium van de ingebrachte embryo's van belang bij de transcervi-

cale methode: Hazeleger en Kemp (1994) melden een drachtigheidpercentage van 55 % wanneer blastocysten gebruikt worden versus 10 % wanneer alleen morula's ingebracht worden.

Ook de synchronisatie van donor en receptor blijkt hier belangrijker te zijn dan bij de chirurgische methode: asynchrone transfer levert zelden drachten op (Hazeleger *et al.*, 1995). Aanvaardbare resultaten worden nog bekomen wanneer de receptorzeug tussen 24 uren vóór tot 12 uren na de donorzeug ovuleert. Wanneer de receptorzeug meer dan 18 uren na de donorzeug ovuleert komt het zelden tot drachten (Hazeleger *et al.*, 2000a).

DE TOEKOMST

Uit het bovenstaande blijkt duidelijk dat ET de laatste jaren veel praktischer geworden is aangezien drastische chirurgische ingrepen en/of anesthesie bij laparoscopie, dank zij de ontwikkelde transcervicale methoden van transplantatie, niet meer nodig zijn. Het transcervicaal collecteren van embryo's blijkt echter nog steeds onmogelijk te zijn zonder voorafgaande chirurgie. Om dit probleem te overbruggen zijn 2 mogelijke alternatieven voorhanden.

Ofwel poogt men het verzamelen van de eicellen via OPU praktischer te maken. Het verder verfijnen van de transvaginale OPU-methode onder rectale echografische begeleiding, zoals beschreven door Bellow *et al.* (2001), kan hier een oplossing bieden. Wanneer deze collectie gepaard kan gaan met een op punt staande in vitro productie (maturing, fertilisatie

en cultuur tot het 4 – 8 cellig stadium) en het transcervicaal transfereren naar receptoren zou dit een praktisch haalbaar protocol kunnen zijn. Hierbij zouden zowel de (genetisch hoogwaardige) donoren als de receptoren gespaard blijven en zou de techniek zonder anesthesie met een minimum aan instrumentarium en infrastructuur haalbaar zijn.

Een andere mogelijkheid is na te gaan in welke mate de endoscopische techniek van Martinez *et al.* (2000), gebruikt voor diepe intra-uteriene inseminatie met lage dosissen (gesekst) sperma, bruikbaar is om een (Foley) katheter transcervicaal tot bij de uterotubale junctie te manoeuvreren en zo zonder voorafgaande chirurgische kunstgrepen embryo's op dag 5 na inseminatie uit de baarmoeder van de donor te spoelen. Hierbij wordt eerst de cervix overwonnen met een aangepaste inseminatiepipet waarna een zeer dunne endoscoop via de inseminatiepipet doorheen de baarmoederhoorn gemanipuleerd wordt. Deze auteurs vermelden dat zij er, zonder sedatie, bij 90 % van de zeugen in slagen om in minstens één baarmoederhoorn door te dringen tot in de omgeving van de uterotubale junctie binnen 3 – 7 minuten. Aangezien met deze inseminatietechniek 89 % drachten bekomen wordt, mogen we vermoeden dat het veroorzaakte

trauma verwaarloosbaar is. Dezelfde auteurs modificeerden deze techniek waarbij de breekbare endoscoop vervangen werd door een speciaal voor dit doel ontwikkelde inseminatiekatheter. Zij slagen erin om deze katheter tot gemiddeld $25,5 \pm 6,67$ cm van de uterotubale junctie in de baarmoederhoornen te manoeuvreren (Martinez *et al.*, 2001). Mits de katheter in dit opzet te vervangen door een ballonkatheter kan de top van de uterushoorn afgesloten worden, wat veelbelovende perspectieven opent voor het transcervicaal flushen van embryo's uit de uterushoortoppen zonder voorafgaande chirurgie.

++++Hieruit mag blijken dat de techniek steeds verder evolueert en verfijnd wordt en dat het binnen afzienbare tijd wel degelijk mogelijk zal zijn om onder veldomstandigheden en met een beperkt instrumentarium embryo's te flushen bij donorzeugen en te transfereren naar receptorzeugen zonder ingrijpende technieken en zonder chirurgie, resulterend in drachten waarbij normale tomen geboren worden.

LITERATUURLIJST

Een uitgebreide literatuurlijst kan bekomen worden bij de auteurs.