

Navorsingsbrief

Suksesvolle transservikale muisembrio-oorplasing tussen geneties verskillende muisrasse

UITTREKSEL

Twee muisrasse ('n swart Balb/C x C5 BL-ras en 'n wit NMRI-ras) is tot superovulasie gestimuleer en daarna toegelaat om met mannetjies van dieselfde ras te kopuleer. Die swart skenkermuis is 3,5 dae na kopulering deur servikale dislokering gedood en 'n totaal van 460 blastosiste is vanuit die fallopiaanse buise gespoel. Ses blastosiste afkomstig van die swart skenkerras is transservikaal in elk van die 71 wit ontvangermuis teruggeplaas 2,5 dae na kopulering. 'n Totaal van 51 geboortes na terugplasing is gedokumenteer met 31,4% voorkoms van swart fenotipiese afstammelinge.

ABSTRACT

Successful transcervical embryo transfer in two strains of mice

Two strains of mice (a black Balb/C x C5 BL and a white NMRI strain) were stimulated to superovulate and allowed to copulate with males of a similar strain. Blastocysts were obtained from black donor animals after cervical dislocation and flushing of the fallopian tubes 3,5 days after copulation. A total of 460 blastocysts were flushed and 6 blastocysts were transferred to each of the 71 white surrogate individuals which had copulated 2,5 days previously. A total of 51 births were documented with a 31,4% occurrence of black phenotypic animals in the litter.

Sedert Heape¹ die eerste suksesvolle embrio-oorplasing op konyne in 1890 uitgevoer het, word die embrio-oorplasingstechniek intensief en algemeen in 'n verskeidenheid dierspesies toegepas.^{2,3} Toepassing en kennis in die hantering van eksperimentele laboratoriumdierembrio's vind inslag in sowel die veeartsenykunde as mediese dissiplines waar *in vitro*-bevrugting en embrio-oorplasingprosedures (I.V.B. en E.T.) beoefen word.

Huidige navorsing⁴ dui op 'n hoë *in vitro*-oorlewingspotensiaal nadat mikromanipulering op 2- tot 4-sel-muisembrio's uitgevoer is. Uitsluitel aangaande *in vivo*-oorlewing na manipulering is die volgende stap om die lewensvatbaarheid van embrio's wat blootgestel was aan bv. bevriesing en ontdooiing, blastomeerbeskadiging of kunsmatig gemanipuleerde bevrugting, te bepaal. Ook kan moontlike abnormaliteite van nakomelinge wat na eksperimentele ingrepe mag ontstaan, *in vivo* nagegaan word. Hiervoor word die tegniek van nonsjirurgiese embrio-oorplasing nagevolg, wat 'n laer trauma- en risikovoorkoms as die sjirurgiese alternatief^{5,6} het.

Hierdie studie was dus gerig op die bemeesting van die transservikale embrio-oorplasingstechniek in muis, met gebruikmaking van 'n genetiese merker. Alhoewel wye meningsverskil bestaan aangaande die geskikste muisras wat gebruik kan word,^{5,7} is daar in hierdie studie van swart Balb/C x C5 BL-skenkermuis gebruikgemaak, terwyl surrogaatmoeders van 'n wit NMRI-ras se F1-generasie gebruik is. Beide groepe muis was 8-10 weke oud en is aan 'n daaglikse fotoperiode en omgewingstemperatuur van 12 uur en 18-24 °C respektiewelik blootgestel.

Die hormonale stimulasieprosedure was identies vir beide groepe en het soos volg verloop: 10 I.E. dragtige-

merrieserum (DMS-Folligon, Intervet International B.V., Boxmeer, Holland) is binnespiers toegedien en is na 48 uur met 'n inspuiting van 10 I.E. menslike chorioniese gonadotropien (hCG-Organon, Benmore, R.S.A.) opgevolg. Agt ure later is 5 mannetjies by 10 wyfies (1:2 per hok) geplaas vir paring. Na 'n verdere 16 uur is die wyfies geïnspekteer vir sekresie van servikale mukus as teken van kopulasie.⁸

Sinkronisasie van skenker- en ontvangermuis was van so 'n aard dat skenkermuis 3,5 dae na kopulering gespoel is vir die embrio's. Die blastosiste wat so verkry is, is oorgeplaas in die ontvangermuis wat 2,5 dae vantevore gekopuleer het. Skenkermuis is deur servikale dislokering gedood en die ovidukte is so steriel moontlik uitgedissekteer en in fosfaatgebufferde soutoplossing geplaas. Die ovidukte is hierna in 'n Labcon laminêre vloekas onder stereomikroskopie (Nikon SM 210) met 'n 2ml-glasspuit gekoppel aan 'n 0,3G-naald met fosfaatgebufferde soutoplossing bespoel. 'n Totaal van 461 blastosiste is vanuit die swart Balb/C x C5 BL-skenkermuis herwin en ses blastosiste is transservikaal in elk van 71 wit (swanger) NMRI-surrogaatmuis oorgeplaas.

Vir oorplasing is die surrogaatmuis gesedeer deur 'n binnespiers toediening van 0,1ml/kg Innovarvet (Fentaniël-droperidol-kombinasie, Janssen Pharmaceutica, Randburg, R.S.A.). Die embrio-oorplasing geskied transservikaal met behulp van 'n selfontwerpte mikropipet, 15 minute na toediening van die sedeer-middel.

Die mikropipet bestaan uit 'n glasbuisie (2 mm deursnee) wat kommersieel as 'n los onderdeel vir 'n mikrosput beskikbaar is. Binne-in die glasmantel is 'n suier met 'n plastiekpunt wat met 'n dun, vlekvrystaalstaaf beweeg word. Aan die voerpunt van die

glasmantel word 'n dungetrekte gomlastiekbuisie aangeblyng (10 mm lank) om moontlike intrauteriene skade tydens die embrio-oorplasing te beperk. 'n Sagte, nie-toksiese en gesteriliseerde gomlastiekspekulum (3 mm deursnee, 10 mm lank) word intravaginaal in posisie geplaas om die uterus te lokaliseer.

Ses skenkerblastosiste in fosfaatbuffer word vanuit 'n orgaankulturbakkie (Falconware 3037) opgesuig in ongeveer 10ul buffer. Deur versigtige palpering word die gomlastiekpunt van die mikropipet deur die servikale ostium tot in 'n uteriene horing gedruk, waar die blastosiste en die buffer uitgespoel word.

Die muise is hierna individueel in hokke teruggeplaas en met geboorte is die werpsel so gou moontlik vir tekens van swart fenotipiese afstammeling ondersoek. Totale kannibalisme het in 28,2% van surrogaatbarings voorgekom en van die 51 oorblywende NMRI-wyfies het 16 muise (31,4%) gemengde werpsels gehad (tabel 1).

TABEL 1

Resultate van transservikale embrioterugplasing tussen twee muisrasse

	N
Aantal blastosiste verkry vanuit swart skenkers	460
Aantal wit surrogaatwyfies	71
Totale aantal gedokumenteerde geboortes	51
Aantal geboortes met swart fenotipes in werpsel	16 (31,4%)

Alhoewel die swangerskapsukses wat in hierdie eksperiment behaal is, bemoedigend is, kan hierdie syfer waarskynlik verbeter word indien meer aandag aan 'n meer geskikte muisras,^{2,5} die ouderdom van die dier⁹ en die moontlike nadelige effekte van superstimulasie^{10,11} en die gebruik van narkosemiddels⁶ geskenk word. Sinkronisering tussen die ouderdom van die ontvangerendometrium en dié van die skenkerembrio is ook van belang, aangesien hierdie aspek veral in die menslike program ter sprake kom na bevruiing/ontdooiing van embrio's.¹²

Opsommenderwys is die suksesyfer wat in hierdie studie behaal is, vergelykbaar met resultate soos reeds gedokumenteer.² Kannibalisme is 'n probleem, maar dit kan verminder word deur die surrogaatmoeders na embrio-oorplasing bymekaar te hou (3 per hok) en hulle nie in individuele hokkies te plaas nie. Die metode van embrio-oorplasing vergelyk ook goed met die sjirurgiese tegniek,¹³ met die voordele van sowel 'n laer traumatiese blootstelling as besparing van tyd en koste. 'n Voorvereiste vir sukses is egter die inoefening van handvaardigheid by die navorsers.

Ontvang 21 Jan. 1988; aanvaar 1 Febr. 1988.

VERWYSINGS

1. Heape, W. (1890). Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother, *Proc. Roy. Soc.*, 48, 457-458.
2. Marsh, L. & Larson, K.S. (1974). A simple method for non-surgical blastocyst transfer in mice, *J. Reprod. Fertil.*, 37, 393-398.
3. Vickery, B.H., Erickson, G.I. & Bennett, J.P. (1969). Nonsurgical transfer of eggs through the cervix in rats, *Endocrinology*, 85, 1202-1230.
4. Janse van Rensburg, H., Van der Merwe, J.V. & Fourie, F. le R. (in druk). Micromanipulation of two and four-cell mouse embryos, *S. Afr. Med. J.*
5. McLaren, A. & Mitchie, D. (1956). Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster mothers, *J. Exp. Biol.*, 33, 394-416.
6. Moler, T.L., Donahue, S.E. & Anderson, G.B. (1979). A simple technique for nonsurgical embryo transfer in mice, *Lab. Anim. Sci.*, 29, 353-356.
7. Doyle, L.L., Gates, A.H. & Noyes, R.W. (1963). Asynchronous transfer of mouse ova, *Fertil. Steril.*, 14, 215.
8. Brande, A.W.H. (1957). The relationship between the diurnal light cycle and the time of ovulation in mice, *J. Exp. Biol.*, 34, 177.
9. Franks, L.M. & Payne, J. (1970). The influence of age on reproductive capacity in C57 BL mice, *J. Reprod. Fertil.*, 21, 563-565.
10. McLaren, A. (1975). Blastocysts in the mouse uterus: the effect of ovariectomy, progesterone and oestrogen, *J. Endocrinol.*, 50, 515-526.
11. McLaren, A. & Mitchie, D. (1959). Superpregnancy in the mouse. I Implantation of foetal mortality after induced superovulation in females of various ages, *J. Exp. Biol.*, 36, 281-300.
12. Cohen, J., Simons, R.S., Fehilly, C.B. & Edwards, R.G. (1986). Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J. In Vitro Fertil. Embr. Tr.*, 3, 46-52.
13. Carp, H.J.A., Shalgi, R., Mashach, S., Sherr, D.M. & Nebel, L. (1982). Comparison of cornual transfer via laparoscopy with utero-cervical transfer of cultured pre-implantation rat embryos, *Gynaecol. Obstet. Invest.*, 14, 121-126.

Christine de Milander, Marie S.E. Wimmers, J.V. van der Merwe en F. le R. Fourie*

Reproduktiewe-Biologie-Navorsingseenheid, Departement Obstetrie en Ginekologie, Universiteit van Pretoria

* Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.