

ROZRÓD ZWIERZĄT

ADAM OKÓLSKI, GUY DUCHAMP*, MARIAN TISCHNER, WIESŁAWA MŁODAWSKA

Przyżyciowe pozyskiwanie oocytów z przedowulacyjnych pęcherzyków jajnikowych klaczy*)

Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR im. H. Kołłątaja,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

* Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Monnaie, Nouzilly, France

Summary

Oocyte recovery from preovulatory follicles of the mare

Mares were prepared for oocyte recovery by estrus synchronization with PGF_{2α} and HCG. Oocytes from 12 mares were recovered after 36.7 hours since HCG injection. The oocytes were obtained after manual location of the ovaries through the rectum and puncture the follicle through the ventral integument in the flank area. The follicle fluid was aspirated into a syringe connected by a plastic tubing with a needle approx. 15 cm long. Out of six oocytes recovered (50%) five were morphologically normal.

U klaczy dotychczas nie udało się wywołać superowulacji. Dlatego też coraz częściej szuka się innych metod, które pozwoliłyby na uzyskanie większej liczby potomstwa, aniżeli to jest możliwe w warunkach naturalnych. Potencjalnym źródłem komórek rozrodczych są oocyty. W każdym jajniku znajduje się zawsze o wiele więcej oocytów niż samica mogłaby wydać potomstwa w ciągu swego życia. U wielu gatunków zwierząt, a także u ludzi otrzymano już potomstwo po zapłodnieniu oocytów *in vitro*. U koni jednak dotąd jeszcze nikomu nie udało się uzyskać na tej drodze źrebiąt. Trudności napotyka się już przy pozyskiwaniu oocytów. Specyficzna budowa morfologiczna jajników, trudny dostęp do pęcherzyków jajnikowych, wrażliwość klaczy na zakażenia są głównymi przeszkodami pozyskiwania oocytów i badań nad ich zapłodnieniem *in vitro* (3, 6).

Dotychczas stosowano kilka sposobów pozyskiwania oocytów od klaczy, jednak żaden z nich nie jest jeszcze w pełni opanowany. Celem przeprowadzonych badań była próba pozyskania oocytów od klaczy w cyklu synchronizowanym, metodą zaproponowaną przez Palmera i wsp. (8).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w jesieni 1988 r. na 16 klaczach w wieku 4—18 lat, w tym 10 rasy konik polski i 6 w typie pogrubionym. Celem pozyskiwania oocytów w zaplanowanym terminie przeprowadzono u klaczy synchronizację cyklu wg schematu zaproponowanego przez Palmera i wsp. (7). Zastosowano na przemian preparat syntetycznej prostaglandyny i HCG wg następującej kolejności:
dzień 0 — prostaglandyna F_{2α} (Estrophan — Spopha CSSR) 250 µg i.m.,
dzień 7 — HCG — choriogonadotropina (Chorulon — Intervet Holandia) 2000—3000 j.m. i.v.,
dzień 14, 15 — prostaglandyna F_{2α} jak w dniu „0”,
dzień 21 — HCG, jak w dniu 7,
dzień 23 — pozyskiwanie oocytów.

Ruję u klaczy wykrywano ogierem próbnikiem, a następnie badaniem przez prosthę kontrolowano rozwój pęcherzyków jajnikowych. Wielkość i kształt pęcherzyków określano przy pomocy ultrasonografu z głowicą 5 MHz (Sony Layer, firmy Toshiba). HCG podawano, gdy średnica pęcherzyka przedowulacyjnego wynosiła średnio 38 mm z wahaniami od 34—42 (tab. 2). Pozyskiwanie oocytów przeprowadzono po 37 godz. od chwili podania HCG, gdy konsystencja

pęcherzyków była miękka lub bardzo miękka i fluktuująca. Przed zabiegiem klacze wprowadzano do poskromu i premedytowano stosując i.m. Domosedann (prod. fińskiej) w ilości 1—1,5 ml. Nadoponowo stosowano 2% polokainę (Polfa) w ilościach 12—18 ml. Do aspiracji płynu pęcherzykowego używano igły o długości 15 cm, które łączono przy pomocy plastikowego wężyka ze strzykawką o pojemności 60 ml. Zestaw ten bezpośrednio przed użyciem przepłukiwano roztworem PBS z dodatkiem heparyny (100 j.m./ml) i antybiotyków (penicylina 100 j.m./ml i streptomycyna 1 mg/ml).

U każdej klaczy skórę w słabiznie po stronie pęcherzyka owulacyjnego golono, myto, dezynfekowano i miejscowo znieczulano 2% polokainą. Następnie ręką wprowadzoną do prostnicy ustalano jajnik tak, aby pęcherzykiem zwrócony był do ściany powłok brzusznych w okolicy słabizny. Drugą ręką wyznaczano punkt nakłucia i nacinano w tym miejscu skalpelem skórę. Bezpośrednio po przecięciu skóry nakłuwano igłą ścianę brzucha i pęcherzyka jajnikowego. Z reguły zaraz po wprowadzeniu igły do pęcherzyka ukazywał się w wężyku i strzykawce żółtawy płyn jajnikowy. Objętość płynu z pojedynczego pęcherzyka wynosiła około 30 ml. Po odciągnięciu płynu pęcherzyk przepłukiwano czterokrotnie stosując świeży roztwór PBS z dodatkiem heparyny. Oocyty odszukiwano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego.

Wyniki i omówienie

Zastosowana metoda prowokowania rui i owulacji przy pomocy prostaglandyny F_{2α} i HCG podawanych w odstępach 6—8-dniowych okazała się bardzo pomocna, gdyż pozwoliła na synchronizację owulacji w zaplanowanym terminie u około 80% klaczy. Spośród 16 klaczy, którym podano pierwszy zastrzyk PGF_{2α} objawy rui wystąpiły w okresie 2—6 dni u 13 (tab. 1). U trzech klaczy nie wystąpiła ruja. U jednej z nich (nr 10) stwierdzono jednak na jajniku obecność pęcherzyka. Dwie pozostałe klacze (nr 15 i 16) były w tym czasie w okresie laktacyjnym. Badaniem rektalnym i ultrasonograficznym jajników nie stwierdzono u nich również wzrostu pęcherzyków i obecności ciałek żółtych. Drugi zastrzyk prostaglandyny zastosowany u 14 klaczy spowodował wystąpienie normalnych objawów rujowych po około 5,5 dnia u 11 klaczy (tab. 1).

Do pozyskiwania oocytów wytypowano ostatecznie 12 klaczy (tab. 2). Dwie z nich (nr 6 i 11) były po pojedynczej synchronizacji rui, pozostałe po podwójnej. Około 24 godziny przed podaniem HCG średnica pęcherzyków wynosiła średnio 34,6 mm z wahaniami od 28 do 38 mm, a ich konsystencję określano w tym czasie jako oporną. Po 24 godzinach po podaniu HCG średnica pęcherzyków zwiększyła się średnio do 40,2 mm z wahaniami od 35 do 46 mm. W następnych godzinach rui zmieniała się jedynie konsystencja pęcherzyka, natomiast jego objętość pozostawała mniej więcej na tym samym poziomie. Tempo wzrostu pęcherzyków w okresie rui wynosiło około 4 mm na dobę. Około 36 godzin po zastrzyku HCG, bezpośrednio przed aspiracją, średnica pęcherzyków wynosiła średnio 39,7 mm, z wahaniami od 37 do 48 mm. Zbliżone wyniki uzyskali McKinnon i wsp. (5).

W wyniku przeprowadzonej aspiracji i dodatkowego płukania pęcherzyków uzyskano od 12 klaczy 6 oocytów (50%).

*) Praca wykonana w ramach problemu CPBP 05.06.3.1.4.

Tab. 1. Wyniki synchronizacji rui

Klacz	Rasa	Liczba dni od pierwszego zastrzyku prostaglandyny do:							Obecność oocytu	Liczba dni od aspiracji do wystąpienia rui
		rui	1-szej iniekcji HCG	owulacji	2-giej iniekcji prostagl.	rui	2-giej iniekcji HCG	aspiracji pęcherzyka		
1.	k.p.	6	7	9	14	20	20	22	+	18
2.	k.p.	3	—	5	16	21	23	25	+	18
3.	k.p.	6	8	10	15	21	23	25	+	17
4.	k.p.	4	7	12	16	22	26	28	+	15
5.	pogr.	3	—	7	15	18	19	21	+	20
6.	k.p.	4	6	—	—	—	—	8	+	po 90 dniach
7.	k.p.	2	8	12	18	24	—	—	0	—
8.	k.p.	2	—	6	14	18	21	23	—	17
9.	k.p.	4	7	10	14	15	—	—	0	—
10.	k.p.	—	—	—	14	—	21	22	—	—
11.	k.p.	4	6	—	—	—	—	8	—	17
12.	pogr.	4	7	10	15	21	24	26	—	18
13.	pogr.	5	7	8	14	21	21	23	—	19
14.	pogr.	6	8	10	15	18	22	24	—	15
15.	pogr.	—	—	—	14	—	—	—	0	—
16.	pogr.	—	—	—	11	—	—	—	0	—
średnio		4	7,1	9	14,6	19,9	22	23,9		17,4

Objaśnienia: k.p. — rasa konik polski, pogr. — konie w typie pogrubionym, + — znalezienie oocytu, — — brak oocytu, 0 — pęcherzyk nie aspirowany.

Tab. 2. Ultrasonograficzna kontrola wzrostu pęcherzyków

Nr klaczy	Średnica pęcherzyka w mm				Pozyskiwanie oocytów po podaniu HCG (godz.)	Objętość płynu pęcherzykowego (ml)	Obecność oocytu
	24 godz. przed iniekcją HCG	w dniu iniekcji	po 12 godz.	po 36 godz.			
1.	—	40	42	40	40	20	+
2.	—	36	35	37	35,5	37,5	+
3.	32	37	36	37	35	26	+
4.	28	35	38	37	36	35	+
5.	37	42	45	48	39,5	40	+
6.	—	37	39	37	35	25	+
8.	—	38	—	39	46	40	—
10.	—	43	46	—	24	45	—
11.	—	34	—	42	38	24	—
12.	38	37	—	41	36	34	—
13.	36	37	41	39	37	24	—
14.	37	40	40	40	39	25	—
Średnio	34,6	38	40,2	39,7	36,7	31,29	

Pięć oocytów oceniono jako morfologicznie normalne, z wyraźną dyspersją komórek wzgórka charakterystyczną dla oocytów owulacyjnych. Jeden oocyt, który odszukano w płynie z czwartego piukania pęcherzyka okazał się zdegenerowany. Od 8 klaczy rasy konik polski uzyskano 5 oocytów, co stanowi 62%, natomiast od 4 klaczy typu pogrubionego zaledwie 1 oocyt.

Prowokowanie owulacji przy użyciu HCG nie zawsze podnosi stopień odzysku oocytów (4, 5), ułatwia jednak organizacyjnie zabiegi, gdyż pozyskiwanie oocytów można przeprowadzać w zaplanowanym terminie. Uzyskane przez nas wyniki okazały się zbliżone do wyników otrzymanych przez innych autorów. Vogelsang i wsp. (9) po wykonaniu 72 zabiegów uzyskał łącznie 18 oocytów (25%), w tym 6 po przeprowadzeniu laparatomii u 10 klaczy. Palmer i wsp. (8) podają, że na 59 zabiegów aspiracji uzyskali 37 oocytów (62,7%). Również bardzo dobre wyniki (71,3%) otrzymano, gdy do zabiegu aspiracji zastosowano podwójną igłę i pompę podciśnieniową. W doświadczeniu tym spośród 45 pozyskanych oocytów otrzymano jednak 27% oocytów uszkodzonych (5). Henrichs i Kenney (4) uzyskali 73% oocytów po przecięciu sklepienia pochwy i ustaleniu jajników ręką wprowadzoną poprzez laparotomię do jamy brzusznej.

U żadnej klaczy użytej przez nas do prób pozyskiwania oocytów nie stwierdzono powikłań. Po zabiegach klacze

przejawiały normalny cykl rujowy, a owulacja u większości z nich wystąpiła około 17 dni po aspiracji oocytów. U klaczy nr 6 obserwowano jedynie zahamowanie cyklu, co mogło być spowodowane laktacyjnym lub zimowym obniżeniem aktywności jajnikowej. Regularny cykl wystąpił u niej dopiero po 90 dniach w następnym sezonie.

Reasumując należy podkreślić, że istnieje możliwość przyżyciowego pozyskania dojrzałych oocytów od klaczy w cyklu synchronizowanym. Oocyty takie mogą być w pełni przydatne do prób zapłodnienia *in vitro*. Metoda przyżyciowego pozyskiwania oocytów z przedowulacyjnych pęcherzyków może być zatem istotnym etapem w uzyskaniu zapłodnienia *in vitro* oocytów klaczy.

Piśmiennictwo

- Fulka J., Okólski A.: J. Reprod. Fert. 61, 213, 1981.
- Henrichs K., Kenney R. M.: Theriogenology 27, 237, 1987.
- McKinnon A. O., Squires E. L., Carnevale E. M., Voss J. L., Seidel G. E. Jr.: Theriogenology 29, 278, 1988.
- Okólski A.: Medycyna Wet. 41, 492, 1985.
- Palmer E., Jousset B.: J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 269, 1975.
- Palmer E., Duchamp G., Bezar J., Magistrini M., King W. A., Bousquet D., Betteridge K. J.: J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 689, 1987.
- Vogelsang M. M., Kreider J. L., Bowen M. J., Potter G. D., Forrest D. W., Kreamer D. C.: Theriogenology 29, 1007, 1988.
- Wood C., Lenton J. F., Talbot J., Mc., Trounson A. O.: Br. J. Obstet. Gynaecol. 88, 756, 1981.

Adres autora: doc. dr hab. Adam Okólski, ul. Koniewa 61/13, 30-150 Kraków