

Dojrzewanie płciowe klaczy i perspektywy skracania okresu międzypokoleniowego u koni

WIESŁAWA MŁODAWSKA, MARIAN TISCHNER*

Instytut Nauk Weterynaryjnych, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
*Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Otrzymano 25.06.2018

Zaakceptowano 19.11.2018

Młodawska W., Tischner M.

Sexual maturity of mares and prospects for shortening the intergenerational period in horses

Summary

The aim of the study is to present current knowledge on the mechanisms regulating puberty in mares and the possibility of shortening the intergenerational period in horses through modern animal reproduction biotechnology. The study discusses fetal sex recognition in horses by means of ultrasound, pre- and postnatal development of mare gonads, oogenesis and folliculogenesis, as well as the process of selection and elimination of oocytes. It also describes the role of gonadotropins, ovarian hormonal activity and morphological changes occurring during sexual maturation. It has been shown that about 37% of mares attain sexual maturity in the first year of life. It has also been documented that one-year and two-year-old fillies produce normal embryos that can be used for transplantation and give offspring. It has also been proved that embryos can be produced *in vitro* from oocytes of juvenile mares. There is hope that acquiring preantral follicles from the ovary and their *in vitro* culture until the oocyte reaches full maturity for fertilization will permit us to obtain embryos and offspring from mares, including those sexually immature. These methods, combined with *in vitro* fertilization and embryo transfer techniques, have already made it possible to obtain normal embryos and even live-born offspring in other mammals.

Keywords: mares, sexual maturity, oocytes, embryos, intergenerational period

W hodowli zwierząt gospodarskich coraz częściej dąży się do skracania okresu międzypokoleniowego, aby w ten sposób uzyskać szybszy postęp genetyczny. U koni okres międzypokoleniowy jest długi i wynosi od 7 do 10 lat. Nic dziwnego, iż wielu hodowcom zależy na skróceniu tego czasu, w taki jednak sposób, by nie narażać młodocianych klaczy na negatywne skutki wczesnej ciąży i porodu. Zbyt wczesne zażrebiecie opóźnia, a nawet hamuje rozwój fizyczny klaczek, niesie również ryzyko ciężkich porodów i rodzenia niedorozwiniętych lub martwych źrebiąt.

Celem niniejszego opracowania było przedstawienie aktualnych informacji nt. mechanizmów regulujących dojrzewanie płciowe klaczy oraz możliwości skracania okresu międzypokoleniowego u koni poprzez wykorzystanie nowoczesnych biotechnik stosowanych w rozrodzie zwierząt.

Prenatalny rozwój gonad i dróg rodnych

Oznaki różnicowania płci są początkowo podobne zarówno w zarodkach męskich, jak i żeńskich. Uważa się, iż rozwój płci żeńskiej jest procesem biernym i za-

chodzi tylko w przypadku braku czynników męskich, uwarunkowanych obecnością chromosomu Y, a ściślej ekspresją genu SRY (*sex determination region Y*) w komórkach somatycznych niezróżnicowanych płciowo gonad (34). U koni proces ten ma miejsce pomiędzy 39. a 45. dniem ciąży (32).

Rozpoznawanie płci płodu. Strukturą anatomiczną pozwalającą na rozpoznanie płci płodu jest guzek płciowy, z którego u samca rozwinię się prącie, a u samicy łechtaczka. U 30-dniowego płodu konia ma on około 1 mm długości, w 36. dniu jest już wyraźnie wykształcony i znajduje się między tylnymi kończynami, w połowie długości pomiędzy ogonem a sznurem pępowinowym. U płodu żeńskiego w trakcie dalszego rozwoju guzek płciowy migruje do okolicy odbytu, a u samca przesuwa się ku pępowinie. U koni za pomocą badania USG przez prostnicę, położenie guzka płciowego (tym samym płęć płodu) można rozpoznać najwcześniej w 40.-45. dniu, a najłatwiej w 59.-68. dniu ciąży (11, 16). Pomiędzy 90. a 150. dniem u większości płodów męskich (73%) widoczne jest już prącie i napletek, zaś u żeńskich (70%) gona-

dy. Kotoyori i wsp. (15) przedstawili trójwymiarowy obraz USG narządów płciowych płodów koni obu płci pomiędzy 63.-76. i 90.-150. dniem ciąży. Warto zaznaczyć, iż po 70 dniu ciąży płód wykazuje tendencję do głębszego ułożenia w macicy i jego ultrasonograficzna lokalizacja jest utrudniona, a często wręcz niemożliwa (16). Po 100. dniu, płód znów jest widoczny w macicy i może być diagnozowany za pomocą USG zarówno *per rectum*, jak i przez powłoki brzuszne. Optymalnym okresem rozpoznania płci płodu u koni przy pomocy USG jest 120.-210. dzień ciąży.

Rozwój gonad. U koni rozwój gonad płodowych wiąże się ściśle ze stanem jajników matki i stężeniem steroidów płciowych w jej organizmie. Wzrost gonad płodu obu płci następuje równocześnie ze zmniejszaniem się wielkości jajników matki. Jajniki płodów i źrebiąt nie przypominają gonad klaczy dorosłych. W 40.-45. dniu ciąży są one niewielkie ($1,4 \times 0,5 \times 0,5$ mm; waga < 1 g), owalne i żółto-białe, natomiast u starszych płodów obu płci przyjmują barwę brązową. W dniu 60., kiedy jajniki matki osiągają maksymalne rozmiary, gonady płodów są nadal małe. Ich szybki rozwój następuje po 100. dniu ciąży i osiąga szczyt pomiędzy dniem 220. a 250. (11). Tanaka i wsp. (30) podają, że pomiędzy 150. a 200. dniem ciąży średnia masa jajników płodów koni ras szlachetnych wynosi średnio 90 g i wzrasta do 115 g pomiędzy 200.-250. dniem. W tym czasie masa gonad matki wynosi, odpowiednio, 49 i 44 g.

Wzrost wielkości gonad płodu spowodowany jest przez hipertrofię i hiperplazję komórek śródmiąższowych. Komórki te znajdują się w warstwie rdzennej gonady, mają cechy komórek steroidogennych i prawdopodobnie biorą udział w produkcji estrogenów obecnych w tym okresie ciąży w ustroju matki (26). Obustronne usunięcie gonad płodu pomiędzy 197. a 250. dniem ciąży powoduje gwałtowny spadek stężenia estrogenów w krwiobiegu matki do poziomu podstawowego, nie wywiera jednak wpływu na stężenie progesteronu w surowicy krwi klaczy i ciąża kontynuowana jest do porodu (25). Masa gonad płodowych maleje po 250. dniu ciąży i u noworodków waha się, w zależności od rasy koni od 5 do 20 g.

Warstwa rdzenna i korowa w jajnikach klaczy. Rozrost komórek śródmiąższowych w jajnikach płodu sprawia, iż warstwa korowa zostaje zepchnięta do warstwy brzusznej, a w toku dalszego rozwoju – do wewnętrznej części jajnika. Można przyjąć, iż zjawiska te mają swe konsekwencje w budowie anatomicznej gonad klaczy dorosłej, w których położona powierzchownie warstwa rdzenna prawie całkowicie pokrywa warstwę korową. Pęcherzyki jamiste (zwane antralnymi) wzrastają więc wewnątrz jajnika i podczas dojrzewania przemieszczają się w kierunku podścielonego błoną białawą dołu owulacyjnego (miejsca kontaktu warstwy korowej z powierzchnią jajnika), w obrębie którego u klaczy następuje owulacja. Od zewnątrz

dół owulacyjny pokrywa nabłonek powierzchniowy, pozostała część gonady okryta jest otrzewną. Ta specyficzna budowa anatomiczna jajnika, jak również mała liczba pęcherzyków jamistych wzrastających w cyklu rujowym sprawiają, iż u klaczy z reguły występują pojedyncze owulacje i u tego gatunku nie udało się dotychczas wywołać superowulacji w takim stopniu, jak np. u przeżuwaczy.

Rozwój dróg rodnych. Równoległe z rozwojem jajników rozwijają się drogi rodne i zewnętrzne narządy płciowe. Przemianom w jajowody, macicę i pochwę właściwą ulegają parzyste przewody pranerczowe (kanały Müllera). Przedśionek pochwy i zewnętrzne narządy płciowe rozwijają się ze steku. W 100. dniu ciąży rogi maciczne płodu osiągają średnicę około $1,0 \times 0,5$ cm. Komórki zrębu i mięśni gładkich macicy nie są jeszcze całkowicie zróżnicowane, zaznaczają się jednak dwie warstwy błony mięśniowej macicy. Nabłonek jest wysoki, kolumnowy pokryty warstwą śluzową. Od 150. do 160. dnia życia płodu średnica rogów macicy wynosi około $2,0 \times 3,0$ cm. Warstwa mięśniowa ulega dalszemu zróżnicowaniu i uwidaczniają się naczynia krwionośne. W 180.-200. dniu ciąży rogi i macica płodu są nadal niewielkie, lecz swą budową coraz bardziej przypominają macicę klaczy dorosłych. Sutki w postaci białych kropek o wielkości 0,25 mm dostrzegalne są w okolicy pachwinowej u obu płci w 55. dniu ciąży. Łechtaczka, w 100.-120. dniu uzyskuje już swoją ostateczną lokalizację wewnątrz dolnego spojenia warg sromowych, a gruczoły mlekowe uwidaczniają się w 300. dniu życia płodowego klaczki (11).

Oogeneza i folikulogeneza

Oogenezę można podzielić na dwa etapy, pierwszy z nich zachodzi w życiu płodowym, a drugi u dojrzałej płciowo samicy. Wraz z różnicowaniem grzebieni płciowych (zawiązki gonad) w jajniki, pierwotne komórki płciowe przekształcają się w oogonia, które namnażają się mitotycznie. Około 60.-70. dnia ciąży oogonia stopniowo podejmują mejozę (profaza pierwszego podziału mejotycznego) i od tego momenty zwane są oocytami I rzędu. W toku rozwoju oocyty otaczają się pojedynczą warstwą płaskich komórek nabłonkowych, na zewnątrz których widnieje błona podstawna. W ten sposób około 100. dnia ciąży w jajnikach płodu pojawiają się pierwsze pęcherzyki pierwotne. Pomiędzy dniem 180. a 200., kiedy oocyty znajdują się w stadium diplotenu profazy mejotycznej, następuje zatrzymanie mejozy. Ta faza oogenezy jest najdłuższym trwającym stadium i w zależności od gatunku, może trwać nawet kilkadziesiąt lat (do momentu wznowienia mejozy przez oocyt). Zwana jest również diktietenem, obejmuje proces wzrostu i aktywności metabolicznej oocyty.

W chwili narodzin, w jajnikach znajduje się już zdeterminowana liczba oocytów zamkniętych w pę-

cherzykach, w różnych stadiach rozwoju. Najwięcej z nich znajduje się w pęcherzykach przedjamistych, głównie w pierwotnych, znacznie mniej w pęcherzykach pierwszego i drugiego rzędu, a proporcjonalnie najmniej w pęcherzykach jamistych. Pęcherzyk jajnikowy tworzy odpowiednie środowisko dla oocytu, jest miejscem jego wzrostu, dojrzewania i chroni przed wpływem szkodliwych czynników. Komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej pęcherzyka zawierają receptory dla czynników wzrostu i hormonów, które modulują rozwój oocytu i pęcherzyka, biorą również udział w procesie dojrzewania płciowego samicy i regulacji neuhormonalnej cyklu rujowego.

Selekcja i eliminacja oocytów. Uważa się, iż w okresie okołourodzeniowym zdecydowana większość (od 58-95%, zależnie od gatunku) oocytów ulega atrezji, kolejne 30% z pozostałej puli ulegnie degeneracji zanim samica uzyska dojrzałość płciową, a tylko niewielki odsetek wznowi mejozę (13). Oszacowano, że w jajniku 6-9-miesięcznych klaczek znajduje się od 9800 do 129 000 pęcherzyków pierwotnych (19), a w jajniku 2-4-letnich klaczy w zależności od cech osobniczych liczba ta maleje do 5600-75 000 (7). Proces eliminacji pęcherzyków pierwotnych przebiega inaczej w jajnikach płodowych niż po urodzeniu i prawdopodobnie nie zachodzi na drodze apoptozy (31). Obejmuje on nie tylko pęcherzyki, ale również pierwotne komórki płciowe (przed rozpoczęciem mejozy) i przebiega przypuszczalnie na drodze autofagii lub nekrozy. Proces ten jest bardzo słabo poznany.

Wznowienie mejozy. W jajnikach już dojrzałych płciowo samic, w wyniku wylewu LH i pobudzenia rozwoju wyselekcjonowanych pęcherzyków antralnych następuje wznowienie mejozy. Za mechanizm selekcji odpowiada FSH. U klaczy wybór pęcherzyka, który będzie się rozwijał jako dominujący i uzyska stadium przedowulacyjne następuje, gdy osiąga on średnicę około 23 mm (10). Wznowienie mejozy polega na progresji jądra oocytu ze stadium diplotenu (profaza pierwszego podziału mejotycznego), do stadium metafazy II, w którym dochodzi do powtórnego zatrzymania mejozy. W wyniku zakończenia pierwszego podziału mejotycznego i „wyrzucenia” pierwszego ciała kierunkowego, zachodzi redukcja liczby chromosomów i zawartości DNA w oocycie, z wartości $2n4c$ do $1n2c$. Kolejne wznowienie mejozy następuje dopiero po owulacji (w jajowodzie), po wnikięciu plemnika i aktywacji oocytu. Ten ostatni dzieląc się, „wyrzuca” drugie ciało kierunkowe, a z nim połowę DNA. Ostatecznie, pozostała w komórce jajowej zawartość żeńskiego materiału genetycznego wynosi $1n1cDNA$. Niezapłodniona komórka jajowa (oocyt) ulega degeneracji. Oogeneza zapoczątkowana w czasie rozwoju płodowego, trwa zatem przez całe życie klaczy. Każdy oocyt przechodzi swoją własną mejozę, a pęcherzyk folikulogenezę i tylko niewielka liczba

pęcherzyków i zawartych w nich oocytów dojrzewa do owulacji.

Gonadotropiny i aktywność hormonalna jajników dojrzewających klaczy

Zasadniczy wpływ na dojrzewanie płciowe wywiera GnRH i hormony gonadotropowe przysadki mózgowej. U nowo narodzonych źrebiąt poziom LH i FSH w surowicy krwi jest niski (< 2 ng/ml). Jednak u klaczek w pierwszym dniu po urodzeniu stężenie LH jest nieco wyższe niż w dniach następnych i w porównaniu do stężenia obserwowanego u ogierków. Stężenie FSH z kolei, w pierwszych 9 dniach życia u klaczek i ogierków utrzymuje się na tym samym poziomie. Około miesiąca przed pierwszą owulacją rozpoczyna się stopniowy wzrost stężenia LH u klaczek od poziomu ok. 2 ng/ml. Stężenie FSH u klaczek urodzonych w maju wzrasta w miesiącach letnich i maleje jesienią, po czym ponownie wzrasta w styczniu. Ta tendencja wzrostu utrzymuje się do kwietnia-maja, do czasu wystąpienia pierwszej owulacji (6, 11).

W pierwszym dniu po urodzeniu się, stężenie progesteronu i estradiolu w plazmie krwi obwodowej źrebięcia jest wysokie, wynosi około 5,52 ng/ml i 154 pg/ml, odpowiednio, po czym stopniowo maleje osiągając już od około drugiego tygodnia życia bardzo niskie wartości (6, 23). Uważa się, że hormony obecne we krwi nowo narodzonych źrebiąt są pochodzenia łożyskowego, co potwierdza immunokspresja podstawowych enzymów steroidogenezy, stwierdzona w drugiej połowie ciąży w łożysku klaczy (1). Ostatnie badania wskazują iż jajniki niedojrzałych płciowo klaczy są zdolne do steroidogenezy. Stwierdzono immunokspresję aromatazy (enzym niezbędny w biosyntezie estrogenów) w warstwie ziarnistej pęcherzyków antralnych oraz receptorów androgenowych w jajnika niedojrzałych i dojrzałych płciowo klaczy (19, 20, 22). U niedojrzałych płciowo klaczek poziom estradiolu w płynie pęcherzykowym (20), jak i estradiolu oraz progesteronu w surowicy krwi obwodowej (6) są jednak niskie i wzrastają dopiero w trakcie pierwszego cyklu rujowego, uzyskując wartości zbliżone do obserwowanych u klaczy dorosłych.

Zmiany w jajnikach w trakcie dojrzewania płciowego klaczy

Jajniki nowo narodzonych źrebiąt mają gładką powierzchnię i symetryczny, owalny kształt. W miarę dojrzewania klaczki, jajniki stają się nerkowate z wyraźnie zaznaczonym dołem owulacyjnym. U trzymiesięcznych źrebiąt, jajnik w górnej części (mniej więcej do połowy) pokryty jest otrzewną, natomiast jego brzuszna powierzchnię okrywa nabłonek powierzchniowy. Warstwa korowa znajduje się wówczas w brzusznej części jajnika, powyżej zagłębienia, w którym pomiędzy 5. a 7. miesiącem życia klaczki powstanie dół owulacyjny (32). Pozbawiona otrzewnej

powierzchna jajnika stopniowo zmniejsza się i ostatecznie u dojrzałej klaczy pozostaje tylko w obszarze dołu owulacyjnego. Na przekroju poprzecznym, w okolicy wielkiej krzywizny tkanka jajnika klaczki jest miękka i ciemnobrunatna, a w okolicy dołu owulacyjnego przechodzi w twardą, żółtawą strukturę. Barwa ciemnobrunatna jest prawdopodobnie wynikiem przerostu tkanki śródmiąższowej lub nagromadzenia w tej okolicy zbędnych komórek pochodzenia śródmiąższowego (pozostałych z okresu płodowego) albo makrofagów. Zabarwienie to zanika w ciągu kolejnych 2-3 lat, w konsekwencji gonady klaczy dorosłej stają się jednolicie cielisto-żółtawe (11).

Pierwsza owulacja w życiu klaczy wyznacza jej dojrzałość płciową. Młodawska i Okólski (21) na podstawie oceny morfologii jajników (obecności ciałek żółtych) klacek różnych ras poddanych ubojowi w wieku około < 10, 12 i 18 miesięcy wykazali, że 36,7% klaczy uzyskuje dojrzałość płciową w pierwszym roku życia. Masa jajników dziesięciomiesięcznych klacek wynosiła średnio 23,7 g, rocznych 27,2 g, a osiemnastomiesięcznych 37,4 g. Liczba pęcherzyków antralnych, zwłaszcza małych (≤ 10 mm) była nieco wyższa (11,4/jajnik) u dziesięciomiesięcznych niż starszych klacek (7-7,8/jajnik). Natomiast odsetek par jajników (tym samym klacek) z pęcherzykiem przedowulacyjnym lub ciałkiem żółtych wzrastał z wiekiem i wynosił 7,0 i 9,3% dla dziesięciomiesięcznych klacek oraz 42,6 i 59,6%, odpowiednio, dla klacek w wieku około 18 miesięcy (21). Wśród oocytów pobranych z jajników źrebięcych, 36,3% miało wielowarstwowy zwarty wzgórek jajonośny, a 48,8% rozproszony. Z pozostałych, 7% otoczonych było tylko wieńcem promienistym, a 7,9% wykazywało oznaki degeneracji (zbita cytoplazma, ciemne grudki, fragmentacja, brak komórek pęcherzykowych). Budowa morfologiczna oocytów źrebiąt nie różniła się od oocytów klaczy dorosłych. Oocyty młodocianych klaczy były głównie w stadium diktiotenu i miały jądro w formie tzw. pęcherzyka zarodkowego (GV: Germinal Vesicle) lub w stadium jego rozpadu (21).

Okres dojrzewania płciowego uważa się za zakończony w chwili, gdy cykl rujowy samicy jest już regularny i w większości kończy się owulacją. Wiek osiągnięcia dojrzałości płciowej przez klacze jest różny i zależy od sezonu, warunków utrzymania, żywienia, rasy. U dobrze odżywionych i zdrowych klacek urodzonych w pierwszej połowie roku (styczeń-czerwiec) pierwsza owulacja pojawia się na wiosnę następnego roku. Natomiast klaczki urodzone w drugiej połowie roku (lipiec-grudzień) najczęściej uzyskują dojrzałość płciową później (w wieku > 20 miesięcy), jednak te bardzo dobrze żywione mogą uzyskać dojrzałość płciową już w pierwszym sezonie rozrodczym, tj. w wieku około 8-10 miesięcy (4, 11). Stres związany z chorobami może spowodować opóźnienie dojrzałości płciowej. Klacze ras zimnokrwistych i prymitywnych uzyskują

dojrzałość płciową w sprzyjających warunkach krótko po ukończeniu pierwszego roku życia.

Skracanie okresu międzypokoleniowego u koni

Mitchell i Allen (18) badali płodność klacek roczniaków. Spośród 137 klacek utrzymywanych wolno na pastwisku pokrytych przez ogiery tabunowe u 95 (69%) stwierdzili ciążę, jednak tylko 18 (19%) z nich urodziło żywe źrebięta, a u pozostałych wystąpiła resorpcja wczesnej ciąży, ronienie lub urodzenie martwego potomka.

Transplantacja zarodków. Panzani i wsp. (24) użyli 12-16-miesięcznych, dwuletnich i 3-12-letnich klaczy jako dawczyń zarodków, które transplutowali do klaczy biorczyń. Od najmłodszych klacek uzyskiwali (w stosunku do liczby wykonanych zabiegów) około 48% zarodków, od 2-letnich 75%, a od starszych 85%. Jednak, niezależnie od wieku klaczy dawczyń, po transferze zarodków, uzyskali około 56% żrebnych biorczyń. Wyniki te wskazują, że młode, rozwijające się klaczki produkują normalne zarodki, które można wykorzystać do transplantacji i uzyskać po nich potomstwo. Istnieje również możliwość uzyskania w jednym sezonie od młodocianych klacek kilku zarodków po różnych ogierach, tym samym sprawdzenia, który z nich daje najlepsze potomstwo.

Pozaustrojowa produkcja zarodków młodocianych samic. Armstrong i wsp. (2) po stymulacji hormonalnej jajników, pobrali poprzez laparotomię i punkcję pęcherzyków jajnikowych oocyty od 10-12-tygodniowych cieląt oraz 6-8-tygodniowych jagniąt. Uzyskane oocyty poddali dojrzewaniu oraz zapłodnieniu *in vitro*. Otrzymali prawidłowo rozwinięte zarodki, z których po transplantacji do biorczyń urodziło się normalne potomstwo. Kolejne badania (14) wykazały, że można również uzyskać potomstwo z oocytów pozyskanych z pęcherzyków jajnikowy 56- i 59-dniowych cieląt, których nie poddano wcześniej żadnej stymulacji hormonalnej. Ci sami autorzy sugerują, że wielkość pęcherzyków jajnikowych nie ma istotnego wpływu na kompetencje rozwojowe *in vitro* oocytów i zarodków.

Bezstresowe przyżyciowe pozyskiwanie oocytów od bardzo młodych klacek jest jednak technicznie trudne do wykonania. Młodawska i Okólski (21) badali kompetencje rozwojowe oocytów uzyskanych po uboju od 6-18-miesięcznych klacek. Oocyty te po hodowli i dojrzewaniu *in vitro* osiągały stadium metafazy II w zakresie od 31% do 44%.

Od starszych klaczy oocyty pobiera się przyżyciowo pod kontrolą USG, metodą OPU (ovum pic-up). Zabieg wykonywany jest na klaczy stojącej w poskromie, po uprzedniej sedacji. Istnieją dwie alternatywne metody postępowania w pozyskiwaniu oocytów metodą OPU. Jedną jest pobieranie poprzez aspirację płynu z pęcherzyka przedowulacyjnego dojrzałych oocytów tuż przed owulacją (w metafazie II). Druga metoda

polega na aspiracji oocytów ze wszystkich pęcherzyków antralnych obecnych w jajniku i widocznych na obrazie monitora USG, niezależnie od ich wielkości. Tak pozyskane oocyty muszą być jednak poddane dojrzewaniu *in vitro* do stadium metafazy II.

Z powodu niezadowalających wyników klasycznego zapłodnienia *in vitro* (IVF) oocytów klaczy coraz częściej wykorzystywana jest metoda zapłodnienia wspomaganego tzw. ICSI (intracytoplasmic sperm injection) (9, 12). Zapłodnienie wspomagane wykonuje się przy użyciu mikroskopu wyposażonego w mikromanipulator pozwalający na kontrolowane wprowadzenie plemnika do oocytu (komórki jajowej). Po iniekcji plemnika komórka hodowana jest w inkubatorze, a oznaką prawidłowego zapłodnienia są jej podziały i dalszy rozwój. Po 6-8 dniach hodowli zarodki powinny osiągnąć stadium moruli lub wczesnej blastocysty i wówczas są gotowe do transplantacji.

Sanchez i wsp. (27) porównywali kompetencje rozwojowe zarodków uzyskiwanych technikami OPU-ICSI z oocytów pobieranych od klaczy w wieku do 3 lat i klaczy starszych > 3-24 lat. Aspirowano wszystkie pęcherzyki jajnikowe o średnicy powyżej 5 mm co 14-21 dni. Pozyskane oocyty hodowano *in vitro* do stadium metafazy II, następnie zapładniano metodą ICSI i hodowano kolejne 6-8 dni. Łącznie u 16 klaczy w wieku do 3 lat i 5 klaczy starszych, wykonano 30 sesji OPU. Podczas jednej sesji uzyskano taką samą liczbę oocytów od klaczy młodych i starszych (odpowiednio: 10,2 i 11,8/klacz). Również odsetek dojrzałych oocytów i dzielących się zarodków oraz blastocyst był podobny w obu grupach i wynosił, odpowiednio, 57,5% 72,3% i 14,6% dla klaczy młodych oraz 65,2% 80,6% i 11,2%, dla klaczy starszych. Wyniki te wskazują, że klacze młode w wieku do 3 lat można wykorzystać w programie OPU-ICSI jako dawczynię oocytów.

Ostatnio Choi i wsp (5) pobrali metodą OPU oocyty od dwuletnich klaczek i po dojrzewaniu *in vitro* wykorzystali w klonowaniu somatycznym koni. Uzyskali jedną klonalną blastocystę. Pomimo iż po transplantacji zarodka nie stwierdzili ciąży, eksperyment ten wskazuje na potencjalne możliwości wykorzystania oocytów młodocianych klaczy również w programach klonowania koni.

Pozyskiwanie i hodowla *in vitro* pęcherzyków przedjamistych. W ostatnich latach zarysowała się możliwość pozyskania pęcherzyków przedjamistych i ich hodowli w warunkach *in vitro*, aż do momentu osiągnięcia przez oocyt pełnej dojrzałości. Metody te w połączeniu z techniką zapłodnienia *in vitro* i embriotransferem stwarzają nowe możliwości uzyskania wielu zarodków od cennych genetycznie osobników i potomstwa od niedojrzałych płciowo samic, a tym samym skracania okresu międzypokoleniowego. U myszy procedury te zostały opracowane już do tego stopnia, że możliwe było warunkach *in vitro* dopro-

wadzenie pęcherzyków przedjamistych do owulacji i zapłodnienia oocytów, a nawet oocytów z pęcherzyków przedjamistych pobranych z jajników podanych kriokonserwacji. Otrzymane zarodki transplantowano biorczyniom, w wyniku czego uzyskano żywo urodzone myszy (8, 33). U świń (35), owiec (3) i kóz (17) z oocytów pochodzących z pęcherzyków przedjamistych uzyskanych poprzez biopsję jajnika otrzymano normalnie rozwijające się zarodki.

Próby pozyskiwania i dojrzewania *in vitro* pęcherzyków przedjamistych klaczy zapoczątkowane przez Szlachtę i Tischnera (28, 29) i kontynuowane w ostatnich latach przez innych autorów okazały się trudnym zadaniem. Główna przeszkoda to wrażliwość pęcherzyków przedjamistych na enzymatyczne sposoby izolacji z tkanki jajnika. Fakt, że badania te budzą coraz większe zainteresowanie, pozwala mieć nadzieję na optymalizację metod pozyskiwania i hodowli pęcherzyków przedjamistych, co w przyszłości umożliwi jeszcze pełniejsze wykorzystanie potencjału rozrodczego klaczy.

Piśmiennictwo

1. Arai K. Y., Tanaka Y., Taniyama H., Tsunoda N., Nambo Y., Nagamine N., Watanabe G., Taya K.: Expression of inhibins, activins, insulin-like growth factor-I and steroidogenic enzymes in the equine placenta. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2006, 31, 19-34.
2. Armstrong D. T., Kotaras P. J., Earl C. R.: Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997, 9, 333-339.
3. Arunakumari G., Shanmugasundaram N., Rao V. H.: Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology* 2010, 74, 884-894.
4. Brown-Douglas C. G., Firth E. C., Parkinson T. J., Fennessy P. F.: Onset of puberty in pasture-raised Thoroughbreds born in southern hemisphere spring and autumn. *EquineVet. J.* 2004, 36, 499-504.
5. Choi Y. H., Ritthaler J., Hinrichs K.: Production of a mitochondrial-DNA identical cloned foal using oocytes recovered from immature follicles of selected mares. *Theriogenology* 2014, 82, 411-417.
6. Dhakal P., Hirama A., Nambo Y., Harada T., Sato F., Nagaoka K., Watanabe G., Taya K.: Circulating pituitary and gonadal hormones in spring-born Thoroughbred fillies and colts from birth to puberty. *J. Reprod. Dev.* 2012, 58, 522-530.
7. Driancourt M. A., Paris A., Roux C., Mariana J. C., Palmer E.: Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reprod. Nutr. Dev.* 1982, 22, 1035-1042.
8. Eppig J. J., Schoeder A. C.: Capacity of mouse oocyte from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1989, 41, 268-276.
9. Galli C., Duchi R., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G.: Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 2014, 81, 138-151.
10. Gastal E. L., Gastal M. O., Bergfeldt D. R., Ginther O. J.: Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 1320-1327.
11. Ginther O. J.: *Reproductive Biology of the Mare. Basic and applied aspects.* Equiservice, Wisconsin, USA 1992.
12. Hinrichs K.: Assisted reproduction techniques in the horses. *Reprod. Fert. Dev.* 2012, 25, 80-93.
13. Hurk R. van den, Zhao J.: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005, 63, 1717-1751.
14. Kauffold J., Amer H. A., Bergfeldt U., Müller F., Weber W., Sobiraj A.: Offspring from non-stimulated calves at an age younger than two months: a preliminary report. *J. Reprod. Dev.* 2005, 51, 527-532.

15. Kotoyori Y., Yokoo N., Ito K., Murase H., Sato F., Korosue K., Nambo Y.: Three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. *Theriogenology* 2012, 77, 1480-1486.
16. Livini M.: Determination of fetal gender by transrectal ultrasound examination: Field's Experience. *AAEP Proceedings* 2010, 56, 323-327.
17. Magalhães D. M., Duarte A. B. G., Araújo V. R., Brito I. R., Soares T. G., Lima I. M., Lopes C. A., Campello C. C., Rodrigues A. P., Figueiredo J. R.: In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology* 2011, 75, 182-188.
18. Mitchell D., Allen W. R.: Observation on reproductive performance in the yearling mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1975, 23, 531-136.
19. Młodawska W.: Struktura i aktywność jajników oraz kompetencja mejotyczna oocytów w okresie dojrzewania płciowego klaczy. Rozprawa hab. Zeszyt 379. Wyd. UR w Krakowie. 2013, 502, 1-109.
20. Młodawska W., Grzesiak M., Kochan J., Nowak A.: Intrafollicular level of steroid hormones and the expression of androgen receptor in the equine ovary at puberty. *Theriogenology* 2018, 121, 13-20.
21. Młodawska W., Okólski A.: Morphological characterization and meiotic competence of oocytes collected from filly ovaries. *Theriogenology* 2009, 71, 1046-1053.
22. Młodawska W., Słomczyńska M.: Immunohistochemical localization of aromatase during the development and atresia of and atresia of ovarian follicles in prepubertal horses. *Theriogenology* 2010, 74, 1707-1712.
23. Nakai R., Weng Q., Tanaka Y., Tsunoda N., Taniyama H., Haramaki S., Nambo Y., Watanabe G., Taya K.: Change in circulating follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, immunoreactive inhibin, progesterone, testosterone and estradiol-17 β in fillies from birth to 6 months of age. *J. Equine Sci.* 2007, 18, 85-91.
24. Panzani D., Rota A., Pacini M., Vannozzi I., Camillo F.: One year old fillies can be successfully used as embryo donors. *Theriogenology* 2007, 67, 367-371.
25. Pashen R. L., Sheldrick E. L., Allen W. R., Flint A. P. F.: Dehydroepiandrosterone synthesis by the fetal foal and its importance as an oestrogen precursor. *J. Reprod. Fert.* 1982, Suppl. 32, 389-397.
26. Raeside J. I., Renaud R. L., Christie H. L.: Postnatal decline in gonadal secretion of dehydroepiandrosterone and 3 beta-hydroxyandrost-5,7-dien-17-one in the newborn foal. *J. Endocrinol.* 1997, 155, 277-282.
27. Sanchez R., Herrera C., Blanco M., Rosati I., Lazzari G., Colleoni S., Sieme H., Galli C.: In vitro production of equine embryos by ovum pick up and intracytoplasmic sperm injection in young mares. *J. Equine Sci.* 2016, 41, 77.
28. Szlachta M., Tischner M.: Isolation and short-term culture of preantral follicles from mare ovaries. *Proc. 14th Int. Con. Animal Reprod.*, Stockholm, Sweden 2000, 2, 224.
29. Szlachta M., Tischner M.: Morfologia i rozmieszczenie pęcherzyków przedjamistych w jajnikach klaczy. *Med. Weter.* 1998, 54, 679-682.
30. Tanaka Y., Taniyama H., Tsunoda N., Herath C. B., Nakai R., Shinbo H., Nagamine N., Nambo Y., Nagata S., Watanabe G., Groome N. P., Taya K.: Localization and secretion of inhibins in equine fetal ovary. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 328-335.
31. Tingen C. M., Bristol-Gould S. K., Kiesewetter S. E., Wellington J. T., Shea L., Woodruff T. K.: Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol. Reprod.* 2009, 81, 16-25.
32. Walt M. L., Stabenfeldt G. H., Hughes J. P., Neely D. P., Bradbury R.: Development of the equine ovary and ovulation fossa. *J. Reprod. Fert.* 1997, Suppl. 27, 471-477.
33. Wang X., Catt S., Pangestu M., Temple-Smith P.: Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction* 2011, 141, 183-191.
34. Wilhelm D., Palmer S., Koopman P.: Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 2007, 87, 1-28.
35. Wu J., Carrell D. T., Wilcox A. L.: Development of in vitro – matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 1579-1585.

Adres autora: dr hab. Wiesława Młodawska, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; e-mail: rzmlodaw@cyf-kr.edu.pl