

spośród 14 zachorowało 12 (86%). Zmiany grzybicze występowały nie tylko na rękach i twarzy (ryc. 3), ale również na skórze brzucha i udach. Warto podkreślić, że w toku kilkunastoletnich badań własnych w fermach lisów zapowietrzonych trychofitozą obserwowano z reguły pojedyncze zachorowania osób z obsługi. Można domniemywać, że tak wysoka zachorowalność pracowników ferm króliczych była związana z dużą ekspozycją na zakażenie w halach produkcyjnych oraz bliskim, bezpośrednim kontaktem ze zwierzętami. W fermach lisów klatki są usytuowane na wolnym powietrzu. Źródło zakażenia dla ludzi stanowią nie tylko króliki chore, ale również bezobjawowi nosiciele spor dermatofitów. Balsari i wsp. (1) poszukując źródła zakażenia dla personelu laboratorium przeprowadził badania 215 królików i wykazał nosicielstwo *T. mentagrophytes* u 0,5% zwierząt. Króliki mogą być również źródłem zakażenia *M. canis*, przy czym zakażenie tym dermatofitem, jak podaje Nikiforov (13), bardzo często u zwierząt przebiega bezobjawowo. Przeprowadzone badania wykazały zadowalającą skuteczność szczepionek żywej i inaktywowanej w zwalczaniu grzybic skórnych królików.

#### Piśmiennictwo

1. Balsari A., Bianchi S., Socilovo A., Dragoni J., Poll S., Ponti W.: Lab. Anim. 15, 75, 1981.
2. Bourdji-Hatiopoulou E., Kanto B.: Bull. Hellenic vet. med. Soc. 34, 72, 1983.
3. Chimakadze S. A.: Trudy Vsesojuz. Inst. eksp. Vet. 65, 32, 1987.

4. Cutsem J. Van., Serven F. Van., Gerrits H., Rochette F.: Mykosen 28, 400, 1985.
5. Franklin C. Z., Gibson S. V., Caffrey C. J., Wagner J. E., Steffen E. K.: J. Am. vet. med. Ass. 198, 1625, 1991.
6. Hajsig M., Naglic T., Hajsig D., Horvat V., Lukman P., Covic A.: Vet. Arch. 53, 251, 1983.
7. Hironaga M., Fujigaki I., Watanabe S.: Mycopathologia 73, 101, 1981.
8. Kasatkina N. V., Gotodova O. A.: Trudy Vsesojuz. Inst. eksp. Vet. 65, 88, 1987.
9. Koroleva N. V., Ivanova L. G.: Trudy Vsesojuz. Inst. eksp. Vet. 65, 32, 1987.
10. Kostro K., Wołoszyn S.: Medycyna Wet. 52, 255, 1996.
11. Kuzneva O. W.: Bjul. Vsesojuz. Inst. eksp. Vet. 32, 29, 1978.
12. Nikiforov L. I., Chuchina T. V.: Bjul. Vsesojuz. Inst. eksp. Vet. 65, 28, 1988.
13. Nikiforov L. I., Zarkov I. I., Slugin V. S., Chuchina T. V., Noginov V. K., Bordasova O. V., Mukhamesthin V. K.: Krolikovodstvo 2, 28, 1990.
14. Ožegovic L., Krilic M., Ožegovic T., Veljo V.: Veterinaria (Sarajewo) 39, 477, 1990.
15. Saxena S. P., Rhodes H. E.: Sabouraudia 8, 235, 1970.
16. Simaljakova M., Buchvald J., Olexova B.: Mykosen 32, 93, 1989.
17. Slonickaja N. N., Michajlec G. A.: Antibiotiki 18, 655, 1973.
18. Szili M., Köhalmi J.: Mykosen 24, 412, 1981.
19. Wawrzkiwicz J., Wawrzkiwicz K., Sadzikowski Z.: Medycyna Wet. 47, 317, 1991.
20. Wołoszyn S., Andrychiewicz J., Kostro K., Grądzki Z.: Medycyna Wet. 39, 387, 1983.
21. Wołoszyn S.: Pol. Arch. Wet. 27, 4, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Stanisław Wołoszyn, ul. Sowińskiego 8/23, 20-040 Lublin

MARIAN TISCHNER, MAREK TISCHNER

## Uzyskiwanie, dzielenie i transplantacja zarodków koni\*)

Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-150 Kraków

### Summary

#### Collection, splitting and transfer of equine embryos

The aim of the studies was the collection, splitting and transfer of halves of equine embryos in order to obtain monozygote twins. Experiments were carried out on 27 mares including 19 Polish pony and 8 heavy-type mares. Out of the total number of 134 collections, 55 (41%) embryos were obtained: on days 5.5–6.5 after ovulation, 12 embryos were collected; on day 7, the number was 32; and on day 8, there were 11 embryos. Among the embryos obtained there were 8 morulas, 11 early blastocysts and 36 blastocysts. Ten embryos were split into halves, 14 of which were transferred non-surgically and 2 using surgery in the flank. None of the transferred embryo halves resulted in pregnancy. From among 16 control mares to whom whole embryos were transferred 10 were found pregnant on day 20 and 7 of them gave birth to healthy foals.

The best results were obtained when the degree of synchronization of the estrus cycle between the donor and recipient mares was minus 2, e.g. when the recipient mare ovulated two days later than the donor mare.

Urodzenia bliźniąt jednojajowych u zwierząt, podobnie jak u ludzi, spotyka się bardzo rzadko, a u koni w ogóle dotychczas nie stwierdzono takiego przypadku (4). Rodzenie się bliźniąt monozygotycznych stało się jednak możliwe dopiero po opanowaniu metod dzielenia zarodków i ich transplantacji. Metody te stosuje się rutynowo w hodowli bydła uzyskując wysoki procent urodzeń bliźniąt jednojajowych. Willadsen i wsp. (11) po podzieleniu 14 zarodków bydłecych uzyskali 10 par monozygotycznych cieląt. U koni uzyskanie bliźniąt monozygotycznych napotyka jednak na wiele trudności i pomimo licznych eksperymentów prowadzonych już od wielu lat urodziło się zaledwie kilka par źrebiąt bliźniąt monozygotycznych, 4 w Anglii (1, 7) i jedna w USA (8). Główną barierą jest mała liczba zarodków, jakie uzyskuje się od klaczy i wynikające z tego ograniczenia eksperymentowania.

\*) Praca finansowana przez KBN nr projektu 5 0698 91 01

U klaczy nadal nie udaje się bowiem wywołać superowulacji, a krótki okres sezonowej aktywności rozrodczej dodatkowo ogranicza możliwość częstego uzyskiwania zarodków. Kolejną barierą jest specyficzna kapsuła zarodka rozwijająca się po wewnętrznej stronie osłonki przejrzystej około 6-7 dnia po zapłodnieniu. Uszkodzenie kapsuły podczas dzielenia zarodka hamuje jego dalszy rozwój *in vivo*. Uzyskanie zaś zarodków we wcześniejszych stadiach rozwojowych napotyka na trudności. Pierwszą parę bliźniąt monozygotycznych otrzymano z zarodków wypłukanych metodą chirurgiczną z jajowodu klaczy pomiędzy 1 a 3 dniem po owulacji (1). Metoda ta nie może być jednak zalecana, gdyż powoduje często powikłania, które uniemożliwiają ponowne użycie klaczy jako dawczyni zarodków. Slade i wsp. (8) oraz Skidmore i wsp. (7) uzyskali źrebięta monozygotyczne po podzieleniu zarodków pozyskanych metodą niechirurgiczną z macicy klaczy w 5,5-6,5 dniu po owulacji. Do dzielenia i transplantacji przeznaczali tylko te, które były w fazie moruli. „Połówkowe” zarodki transplantowano klaczom biorecznym sposobem chirurgicznym w słaźni (8) lub w linii białej (7).

Celem badań było pozyskanie zarodków we wczesnych stadiach rozwojowych, ich dzielenie, krótkotrwała hodowla i transplantacja zarodków „połówkowych”. Kontrolnie przeprowadzono również transplantacje całych zarodków.

#### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 27 klaczach, w tym 19 rasy konik polski i 8 klaczach typu pogrubionego utrzymywanych w Stacji Doświadczalnej Katedry Rozrodu AR w Krakowie w latach 1992-1994. Wszystkie klacze przebywały w jednakowych warunkach utrzymania i żywienia (siano, owies, woda *ad libitum*, latem pastwisko 4-6 godzin dziennie, zimą marchew). Klacze rasy konik polski wykorzystywano jako dawczynie i bioreczynie zarodków. Natomiast klacze typu pogrubionego używano głównie jako bioreczynie.

Celem określenia fazy cyklu rujowego, klacze badano codziennie ogierem próbnikiem i rejestrowano ich zachowanie płciowe. Moment owulacji określano badaniem jajników przez próstnicę palpacyjnie i przy pomocy USG (Ultra vision, z głowicą 5 MHz). Po stwierdzeniu pęcherzyka jajnikowego wielkości powyżej 2,5 cm badanie jajników przeprowadzano 2 razy dziennie tj. rano i wieczorem.

Klacz dawczyni były kryte lub inseminowane nasieniem jednego ogiera rasy konik polski o sprawdzonej płodności. W jednym przypadku klacz dawczyni typu pogrubionego została pokryta ogierem rasy śląskiej.

#### Uzyskiwanie zarodków

Uzyskiwanie zarodków przeprowadzono metodą bezkrwawą. Do płukania macicy używano płynu Dulbecco (zbufoformowany roztwór soli fizjologicznej DPBS) sporządzony na wodzie podwójnie destylowanej i zdejonizowanej z dodatkiem 1% surowicy płodów bydłych (FSC) lub inaktywowanej surowicy cielęcej oraz z dodatkiem penicyliny i streptomycyny. W pierwszej kolejności zarodki odszukiwano w niewielkiej objętości płynu zlewającego z dolnej części naczynia. Gdy nie znaleziono zarodka w tej części płynu, cały płyn przepuszczano przez specjalny filtr i poszukiwanie zarodka powtarzano. W przypadku gdy nie znaleziono zarodka zabieg płukania macicy powtarzano dwu lub trzykrotnie (2).

Po odszukaniu zarodka przenoszono go do wzbogaconej pożywki Dulbecco z dodatkiem 10% surowicy płodów bydłych (FSC) przesączonej przez mikrofiltr (0,2  $\mu$ m). Dalsze czynności polegały na kilkukrotnym (5x) przepłukaniu za-

rodka tj. przenoszeniu do kolejnych naczyń z niewielką ilością pożywki.

#### Dzielenie i hodowla zarodków

Dzielenie zarodków przeprowadzono przy użyciu odpowiednio wyprofilowanego ostrza żyłki podłączonego do mikro-manipulatora zamontowanego do mikroskopu Nomarskiego. Zarodek umieszczono w kilku kroplach pożywki i po odpowiednim ustaleniu dzielono go na dwie części.

Hodowlę zarodków „połówkowych” jak i całych przeprowadzano w pożywce DPBS z dodatkiem 10% surowicy płodów cielęcych i niewielkiej ilości antybiotyków w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C.

#### Transplantacja zarodków

Jako bioreczynie zarodków używano klacze, u których stopień synchronizacji owulacji w stosunku do klaczy dawczyni wahał się  $\pm 3$  dni. Transplantację zarodków dokonano w dwójki sposób – metodą niechirurgiczną i 2 zarodki „połówkowe” transplantowano chirurgicznie. Metodą niechirurgiczną wprowadzano zarodki do trzonu lub rogu macicy przy użyciu metalowego lub plastikowego pistoletu typu Cassou. Tuż przed wprowadzeniem pistoletu do pochwy klaczy, nakładano na niego sterylną osłonkę plastikową. Zabieg deponowania zarodków w drogach rodnych klaczy bioreczni wykonywała zawsze ta sama osoba. Po wprowadzeniu ręki wraz z pistoletem osłoniętym osłonką plastikową do pochwy klaczy odszukiwano kanał szyjki i wprowadzano na głębokość kilku cm pistolet, po czym przerywano osłonkę plastikową przez podciągnięcie jej końca zewnętrznego. Następnie rękę wysuwano z pochwy klaczy i wprowadzano do prostopnie. Ustalano i korygowano miejsce położenia końca pistoletu i deponowano zarodek w pobliżu rozwidlenia trzonu lub w rogu macicy po stronie jajnika, na którym wcześniej stwierdzono owulację (2, 10).

Transplantację zarodków metodą chirurgiczną wykonywano w słaźni po prawej stronie wg metody opisanej przez Squires i wsp. (9). Po odpowiednim znieczuleniu, przecięciu powłok brzusznych i odszukaniu macicy, przebijano tępą igłą ścianę rogu macicy na wysokości 1/3 dolnej długości rogu, w miejscu, gdzie nie stwierdzano wyraźnych naczyń i w powstały otwór wprowadzano zarodek przy pomocy pipety pasterowskiej.

#### Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskiwania zarodków przedstawiono w tab. 1. Obserwacje te potwierdzają ograniczone możliwości uzyskania większej liczby zarodków od klaczy w ciągu roku. W zimie u ponad 70% klaczy, z wahaniami od 43% w 1993 r. do 92% w 1992 r. nastąpił zanik aktywności jajnikowej (zimowe *anestrus*), który trwał przeciętnie 114 dni. W sezonie owulacja u klaczy występowała średnio 9 razy.

Podczas 3 sezonów przeprowadzono ogółem 134 zabiegi pozyskiwania zarodków, uzyskując ich 55 (41%). Średnio od jednej klaczy dawczyni uzyskano po 3,9 zarodka. Najmniej zarodków (27%) uzyskano wówczas, gdy zabiegi przeprowadzono w 5,5-6,5 dniu po owulacji. W 7 i 8 dniu uzyskiwano odpowiednio 46% i 55% zarodków (tab. 2). Otrzymane wyniki są zbliżone do wyników Boyle'a i wsp. (3). Są jednak nieco niższe od wyników uzyskanych przez Huhtinen i wsp. (5).

Do dzielenia i transplantacji przeznaczono 10 zarodków, z których 8 było w stadium moruli i 2 wczesnej blastocysty. Po podzieleniu i krótkotrwałej hodowli 14 zarodków „połówkowych” transplantowano metodą niechirurgiczną i 2 metodą chirurgiczną. Dwukrotnie jednej klaczy bioreczni wprowadzono jednocześnie po 2 zarodki „połówkowe”. Jednak u żadnej klaczy nie otrzymano ciąży po transplantacji tych zarodków.

Kontrolnie przeprowadzono metodą niechirurgiczną transplantację 16 całych zarodków, które były w stadium wczesnej

Tab. 1. Aktywność rozrodcza klaczy i wyniki uzyskiwania zarodków (n=19)

Rok: liczba klaczy	Liczba dni obserwacji (średnio/klacz)	Anestrus zimowe (dni)	Ogólna liczba owulacji w roku (średnio/klacz)	Liczba pozyskiwań zarodków (średnio od klaczy)	Liczba uzyskanych zarodków (%) średnio od klaczy
1992: 12	3985 (332)	92%* (128)**	98 (8,2)	32 (2,7)	10 (31%) 0,8
1993: 16	4910 (306)	43%* (108)**	132 (8,2)	65 (4,1)	25 (38%) 1,6
1994: 14	4950 (353)	86%* (104)**	140 : 14 (10,0)	37 (2,6)	20 (54%) 1,4
Razem za 3 lata	13 845 (329)	71%* (114)**	370 : 42 (8,8)	134 (9,6)	55 (41%) 3,9

Objaśnienia: \* – klacze z zimowym anestrus, \*\* – średni czas trwania zimowego anestrus.

blastocysty i blastocysty. Jednej klaczy typu zimnokrwistego zdeponowano jednocześnie 3 zarodki pozyskane w 7 dniu po owulacji od 3 różnych klaczy rasy konik polski, a w jednym przypadku przeniesiono zarodek pozyskany od klaczy typu pogrubionego klaczy rasy konik polski. Uzyskano ogółem 10 przypadków ciąży rozpoznanych USG w 20 dniu po owulacji. U klaczy, która otrzymała 3 zarodki nastąpiła jednak w 23 i 26 dniu po owulacji resorpcja 2 z nich, a jeden rozwijał się normalnie. Klacz ta urodziła zdrowe źrebię. Zanotowano również resorpcję zarodka w 25 dniu po owulacji u klaczy rasy konik polski, która otrzymała zarodek od klaczy typu pogrubionego. Pozostałe ciąży rozwijały się normalnie. Ogółem po

transplantacji uzyskano 7 źrebiąt. Najlepsze wyniki transplantacji otrzymano, gdy stopień synchronizacji owulacji pomiędzy klaczami dawczyniami a biorczyniami wynosił – 2, tzn., gdy u klaczy biorczyń owulacja wystąpiła dwa dni później niż u dawczyń zarodków (tab. 3).

Huhtinen i wsp. (5) przeprowadzili w Finlandii podobne obserwacje na 50 klaczach, od których uzyskali 45 zarodków. Do dzielenia przeznaczono tylko te, których średnica nie przekraczała 185  $\mu$ m. Dzielenie zarodków przeprowadzano w pożywe z dodatkiem cytochalazyny B, która zapobiega rozpuczeniu jąder komórkowych i jest często dodawana do pożywek używanych przy tego rodzaju zabiegach. „Połówkowe” zarodki transplantowano metodą niechirurgiczną 24 klaczom biorczyniom, jednak nie uzyskano ciąży u żadnej z nich. Kontrolnie dokonano transplantacji 8 całych zarodków uzyskując 7 przypadków ciąży.

Specyficzne właściwości rozwojowe zarodków klaczy były badane przez szereg autorów (6, 7). Celem ich było zwiększenie możliwości uzyskania źrebiąt bliźniąt monozygotycznych. Wyniki badań wykazały, że bez względu na fazę rozwojową zarodka, kapsuła nie powstaje na „połówkowych” zarodkach hodowanych *in vitro*. Potomstwo po zarodkach „połówkowych” uzyskano tylko w tych przypadkach, gdy zostały podzielone przed lub w początkowej fazie tworzenia kapsuły.

#### Piśmiennictwo

- Allen W. R., Pashen R. L.: J. Reprod. Fert. 71, 607, 1984.
- Bielaniński A., Tischner M.: Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich. Universitas, Kraków 1993, s. 455.
- Boyle M. S., Sanderson M. W., Skidmore J., Allen W. R.: Equine vet. J. Suppl. 8, 10, 1989.
- Jeffcott L. B., Whitwell K. F.: J. comp. Path 83, 91, 1973.
- Huhtinen M., Bredbacka P., Kotilainen T.: Sixth Inter. Symp. on Equine Reprod. Brasil, 1994, s. 81.
- McKinnon A. O., Carnevale E. M., Squires E. L., Carney N. J., Seidel G. E. Jr.: Equine Vet. J. Suppl. 8, 129, 1989.
- Skidmore J., Boyle M. S., Cran D., Allen W. R.: Equine Vet. J. suppl. 8, 126, 1989.
- Slade N. P., Williams T. J., Squires E. L., Seidel G. E. Jr.: Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. 2, 241, 1984.
- Squires E. L., Cooc V. M., Voss J. L.: Collection and transfer of equine embryos. Anim. Reprod. Lab. Bull. 01, Colorado State University, Fort Collins, 1988, s. 70.
- Tischner M.: Equine Vet. J. Suppl. 3, 96, 1985.
- Willadsen S., Lehn-Jensen H., Fehilly C. B., Newcomb R.: Theriogenology 15, 23, 1981.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Tischner, ul. Armii Krajowej 87/20, 30-150 Kraków

Tab. 2. Wyniki uzyskiwania zarodków metodą bezkrwawą w poszczególnych dniach po owulacji

Dzień po owulacji	Liczba pozyskiwań	Stadium rozwojowe zarodka				
		moruła	wczesna blastocysta	blastocysta	ogółem	
					liczba zarodków	%
5,5–6,5	44	5	6	1	12	27
6,5–7,5	70	3	4	25	32	46
7,5–8,5	20	–	1	10	11	55
Razem	134	8	11	36	55	41

Tab. 3. Wyniki transplantacji całych zarodków

Synchronizacja cyklu pomiędzy dawczyniami i biorczyniami (dni)	Liczba zabiegów transplantacji	Ciąża do 20 dni	Ciąża zakończona porodem
-3	5	4*	2
-2	4	3	3
-1	–	–	–
0	5	1	1
+1	1	1**	–
+2	–	–	–
+3	1	1	1
Razem	16	10 (63%)	7 (44%)

Objaśnienia: \* – resorpcja 2 zarodków spośród 3 transplantowanych równocześnie do jednej klaczy typu zimnokrwistego, \*\* – resorpcja zarodka pochodzącego od klaczy typu pogrubionego i transplantowanego do klaczy rasy konik polski.