

Wyniki pozyskiwania oocytów od klaczy techniką transwaginalnej aspiracji pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą ultrasonograficzną (TVA-OPU) w celu wykorzystania ich do zapłodnienia metodą docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI)

ROBERTO SANCHEZ¹, MAGDALENA PROFASKA², SYLWESTER ZAJĄC³,
PIOTR SKUP⁴, MACIEJ WITKOWSKI²

¹Embryosanchez, Bogota, Colombia

²Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, Instytut Nauk Weterynaryjnych,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

³Centrum Rozrodu Koni GFE Polska, ul. Imbirowa 9, 05-504 Henryków Urocz

⁴Weterynaryjne Centrum In Vitro Bovisvet, Kosierady Wielkie, 08-300 Sokołów Podlaski

Otrzymano 02.05.2022

Zaakceptowano 01.06.2022

Sanchez R., Profaska M., Zajac S., Skup P., Witkowski M.

Results of ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes (TVA-OPU) from mares to be fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

Summary

The aim of this study was to present the results of transvaginal ultrasound-guided collection of oocytes (TVA-OPU) from 21 mares to be fertilized *in vitro* by the ICSI method. One week before the planned OPU, the mares underwent a gynecological examination with particular emphasis on the functional status of the ovaries. The recommendation for the procedure was the presence of at least 12 ovarian follicles with a diameter of at least 4 mm on both ovaries. The selected mares were given PGF_{2α} in a luteolytic dose 3 days before the planned OPU, so that the mares were in the early proestrus stage during the procedure and did not have a corpus luteum on the ovary. If PGF_{2α} administration was believed to increase the risk of estrus on the day of the OPU procedure, the hormone was not administered. Immediately prior to OPU, the mares were premedicated with detomidine and butorphanol. During the procedure, symptoms of anxiety or pain were controlled using the bolus agents listed above, plus flunixin as needed. A mixture of hyascin butylbromide and sodium metamizole was also used in order to eliminate an excessive tension of the rectum. After each treatment, the mares were administered procaine penicillin, benzathine penicillin, and streptomycin. All mares underwent the OPU treatment without complications. During 24 OPU procedures (3 mares underwent the procedure twice), a total of 239 oocytes (an average of 10 oocytes from 1 mare) were obtained, 137 of which were qualified for the ICSI procedure (57% of the total). After fertilization, embryonic division occurred in 95 (70% of the oocytes qualified for ICSI). Ultimately, 23 embryos were grown and preserved in liquid nitrogen (which resulted in an average of 1 embryo per 1 OPU treatment in mares) and accounted for 17% of oocytes qualified for the treatment. According to the authors' best knowledge, it was the first project of this type in our country.

Keywords: transvaginal oocyte aspiration, mare

Przyżyciowe pozyskiwanie oocytów polega na aspiracji płynu z pęcherzyków jajnikowych wraz z zawartą w nich komórką jajową. Pionierskie prace, mające na celu pobranie w ten sposób komórek jajowych, prowadzone były na początku lat 70. ubiegłego wieku u ludzi, początkowo przy zastosowaniu techniki laparoskopowej (33). W 1978 r., po zapłodnieniu *in*

vitro tak pobranej komórki jajowej, uzyskano u kobiety pierwszą ciążę zakończoną porodem (32). W 1982 r. przeprowadzono z kolei po raz pierwszy punkcję jajnika pod kontrolą ultrasonograficzną z dojścia przez pochwę (transvaginal ultrasound guided oocyte aspiration – TVA) (25). Opisane metody pobierania oocytów szybko zostały wprowadzone do medycyny weterynaryjnej.

ryjnej. W 1983 r. opisano po raz pierwszy udaną próbę pozyskania oocytów od krowy techniką laparoskopową, poprzez dojście do jajników przez prawą słabiznę (23). Kilka lat później zespół duński opisał metodę pobierania oocytów u tego gatunku, również z dojścia przez słabiznę, tym razem pod kontrolą ultrasonograficzną (4), a następnie, podobnie jak w przypadku medycyny ludzkiej, zaczęto pobierać oocyty pod kontrolą ultrasonografu z dojścia przez pochwę (31). Ponieważ w tym czasie osiągnęto dobre wyniki w zapłodnieniu *in vitro* u bydła (2), OPU u tego gatunku szybko znalazło szerokie zastosowanie w praktyce (15, 16). Odmiennie wyglądała natomiast sytuacja w przypadku koni. Ze względu na słabe wyniki hodowli i dojrzewania oocytów końskich *in vitro* i w związku z tym również zapłodnienia *in vitro* na tej drodze uzyskano jedynie 2 źrebięta (1, 29), OPU u klaczy było wprawdzie przeprowadzane doświadczalnie (3, 9), wciąż nie znalazło jednak zastosowania w praktyce. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że znaczący wkład w światowy dorobek badań nad dojrzewaniem końskich oocytów wniósł zespół Katedry Rozrodu Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach UR w Krakowie (27-29). Dopiero po pierwszych sukcesach w zapłodnieniu pozaustrojowym u koni po przeprowadzeniu docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI) (24, 35), połączenie OPU z tą techniką stworzyło możliwość pozaustrojowej produkcji zarodków u koni. Co istotne, produkowane na drodze ICSI zarodki, ze względu na brak kapsuły zarodkowej (ta nie rozwija się podczas zapłodnienia pozaustrojowego) oraz mniejsze rozmiary (24) lepiej znoszą proces konserwacji w niskich temperaturach niż zarodki zamrażane po wypłukaniu z dróg rodnych i dają podobne wyniki zażrebień jak zarodki świeże,

przenoszone *in situ* do biocytry podczas klasycznego transferu (około 70% powodzenia) (8). Celem powyższej pracy jest prezentacja wyników TVA przeprowadzanego po raz pierwszy w kraju na dużą, komercyjną skalę oraz prześledzenie skuteczności pozaustrojowego zapłodnienia pozyskanych w ten sposób oocytów, techniką ICSI, które przeprowadzane było przez jedną z wiodących w tej dziedzinie jednostek na świecie we Włoszech (Avantea).

Materiał i metody

Zebrane dane dotyczą 24 zabiegów TVA wykonanych u 21 klaczy (3 klacze przechodziły zabiegi dwukrotnie) (tab. 1). Wszystkie klacze reprezentowały szlachetną półkrew i były w wieku od 6 do 15 lat. Warunkiem zakwalifikowania do zabiegu był nie budzący zastrzeżeń ogólny stan zdrowia klaczy oraz ujemne wyniki testów w kierunku niedokrwistości zakaźnej koni oraz zakaźnego zapalenia macicy. Na tydzień przed planowanym zabiegiem wstępnie zakwalifikowane klacze przechodziły badanie ginekologiczne ze szczególnym uwzględnieniem stanu czynnościowego jajników. Rekomendacją do zabiegu była obecność na obu jajnikach pęcherzyków jajnikowych o średnicy minimum 4 mm oraz większych, w liczbie co najmniej 12. W przypadku mniejszej liczby pęcherzyków decyzja o ewentualnym zabiegu TVA u klaczy podejmowana była wspólnie z właścicielem, ponieważ zbyt mała ilość spodziewanych oocytów zmniejsza szanse na ostateczny pozytywny wynik (wyhodowanie zarodka/zarodków). Wybranym klaczom na 3 dni przed planowanym OPU podano PGF2 α w postaci kloprostenolu (Genestranvet® Grovet) w dawce 37.5 pg *i.m.*, aby klacze podczas zabiegu znajdowały się we wczesnej fazie proestrus i nie miały ciała żółtego na jajniku. W przypadkach, w których uznano, że podanie PGF2 α zwiększy ryzyko wystąpienia rui w dniu zabiegu OPU, hormonu nie podawano. W dniu zabiegu ponownie przeprowadzano badanie ultrasonograficzne, ustalając ostatecznie liczbę pęcherzyków możliwych do punkcji w celu pobrania komórki jajowej.

Do zabiegów zakwalifikowano 25 klaczy (3 klacze miały wykonywany zabieg dwukrotnie, 1 klacz została wycofana po rozpoczęciu OPU ze względu na zbyt krótkie więzadła jajnikowe i związane z tym zbyt duże ryzyko samego zabiegu). Zabiegi wykonywano w 4 niezależnych sesjach, kolejno u 7, 7, 6 oraz 4 klaczy (tab. 1). Bezpośrednio przed zabiegiem klacz umieszczano w poskromie, bandażowano i wywiązywano ogon, opróżniano prostnicę z kału i dokładnie myto oraz dezynfekowano krocze. Na czas zabiegu u każdej klaczy cewnikowano pęcherz moczowy za pomocą kateteru Foleya. Zespół OPU składał się z 5 osób: 2 osoby wykonujące bezpośrednio zabieg, 1 anestezjolog oraz 2 kolejne osoby pracujące w laboratorium, odpowiedzialne za poszukiwanie



Ryc. 1. Klacz podczas zabiegu TVA-OPU. Na pierwszym planie widoczny stolik z przygotowanymi w strzykawkach bolusami leków do sedacji oraz kontroli bólu. Fot. M. Profaska

Tab. 1. Szczegółowe wyniki TVA-OPU oraz liczba zarodków wyhodowanych z pobranych oocytów po zapłodnieniu metodą ICSI

Kolejne sesje OPU	Numer klaczy	Liczba aspirowanych pęcherzyków (n)	Liczba pozyskanych oocytów (n)	Liczba oocytów poddanych ICSI (n)	Liczba podjętych podziałów zarodkowych (n)	Ostateczna liczba uzyskanych zarodków (n)
I	1		3	1	0	0
	2		6	5	2	0
	3		9	7	3	1
	4		8	4	3	1
	5		8	4	3	2
	6		17	11	6	2
	7 A		8	3	2	1
II	8		13	8	6	0
	9		8	1	1	0
	10		12	7	7	2
	11		27	15	11	0
	12		8	3	3	0
	13 A		5	3	1	0
	14		18	11	6	2
III	15	22	9	6	6	3
	7 B	13	11	3	3	1
	16	32	13	8	8	1
	17	31	14	10	9	4
	18	12	2	2	2	1
	19 A	29	7	4	1	0
IV	19 b	13	4	3	2	1
	20	16	9	5	2	0
	21	16	10	4	3	0
	13 B	15	10	7	5	1

oocytów oraz przygotowanie ich do transportu. Wszystkie zabiegi były każdorazowo wykonywane przez ten sam zespół i przy zachowaniu stałych warunków, szczególnie jeśli chodzi o temperaturę, w jakiej były wykonywane poszczególne etapy procedury. Na przeprowadzenie zabiegu u 1 klaczy przewidziano średnio 40 min. Logistyka miała w tym przypadku kluczowe znaczenie, ponieważ pozyskane komórki jajowe musiały być przygotowane do transportu i przekazane kurierowi o dokładnie ustalonej godzinie. Do zabiegów OPU wszystkie klacze miały założone kaniule do żyły jarzmowej w celu zapewnienia szybkiego dostępu do podawania leków. Klacze premedykowano za pomocą detomidyny (Domosedan® Orion Pharma) podawanej *i.v.* w dawce 5-8 mg/klacz (w zależności od zachowania zwierzęcia) oraz butorfanolu (Torbugesic vet® Zoetis) *i.v.* w dawce 5-8 mg/klacz. Podczas zabiegu niespokojne zachowanie i objawy bólu kontrolowano, stosując wymienione powyżej środki w postaci bolusów oraz dodatkowo, jeśli zaistniała potrzeba, fluniksyny (Vetaflunixin® Vetagro) w jednorazowej dawce od 350 do 500 mg *i.v.* W przypadku zbyt dużego napięcia ściany prostnicy stosowano również mieszanekę butylobromku hiascyny z metamizolem sodowym (Buscopan® Beringer Ingelheim) *i.v.*, w dawce, odpowiednio, (0.8 + 10000) mg. Zabiegi wykonywano przy pomocy ultrasonografu z głowicą typu microconvex o częstotliwości 7.5 MHz, umieszczoną w specjalnej dopochwowej prowadnicy, w której znajdował się tor dla

dwudrożnej igły punkcyjnej typu 12G × 25 (Minitube). Do aspiracji płynu z pęcherzyków jajnikowych stosowano pompę próżniową (BV-003D® WTA). Jako medium do płukania oocytów używano komercyjnego płynu Equiplus



Ryc. 2 TVA-OPU u klaczy. Operator wykonujący zabieg TVA-OPU. Widoczna sonda dopochwowa z prowadnicą dla dwudrożnej igły i przewodami do aspiracji i przeplukiwania pęcherzyków jajnikowych. Fot. M. Witkowski

OPU recovery medium z BSA lub PVA (Minitube). Do wypłukania oocytów używano filtra (E.T. EM-CON® Nifa) lub (EmSafe® Minitube) i następnie poszukiwano ich pod powiększeniem 20 ×. Tak pozyskane komórki jajowe były przepłukiwane i umieszczane w oryginalnym medium dostarczonym przez Avantea, a następnie pakowane do pojemników typu ATN4–Thermosafe® (Sonoco), zapewniających utrzymanie stałej temperatury podczas transportu. Wymogiem laboratorium ICSI było, aby komórki jajowe dotarły na miejsce w czasie nieprzekraczającym 24 godz. Zarówno OPU, jak i wszelkie czynności laboratoryjne oraz transport przeprowadzane były temperaturze w zakresie 22–24°C. Po wykonanych zabiegach każdej klaczy podawano domięśniowo benzylopenicylinę prokainową 200 000 j.m. wraz z siarczanem dihydrostreptomycyny 200 mg (Combi-Ject Dopharma B.V.). Jeśli klacze nie wykazywały żadnych niepokojących objawów, odbierane były po 48 godzinach od zabiegu przez właścicieli i transportowane do macierzystych stajni.

Wyniki i omówienie

Wszystkie klacze przeszły zabieg OPU bez komplikacji i zostały wydane właścicielom w planowanym czasie. Szczegółowe wyniki przyżyciowego pozyskiwania oocytów oraz hodowli i konserwacji zarodków po wykonaniu ICSI w rozbiciu na kolejne 4 sesje przedstawiono w tabeli 1. Oceniając całość wyników, przeprowadzono łącznie 24 zabiegi OPU, uzyskując 239 oocytów (średnio 10 oocytów od 1 klaczy podczas jednej sesji OPU), z których do procedury ICSI zakwalifikowano 137 oocytów (57% całości). Po zapłodnieniu podziały komórkowe podjęło 95 (70% wybranych zakwalifikowanych do ICSI oocytów). Ostatecznie wyhodowano i przeznaczono do konserwacji w ciekłym azocie 23 zarodki (co pozwoliło średnio uzyskać 1 zarodek na 1 zabieg) i stanowiło 17% oocytów zakwalifikowanych do zabiegu. Sam odsetek pozyskanych oocytów w stosunku do ilości aspirowanych pęcherzyków kontrolowany był jedynie podczas dwóch ostatnich sesji i wyniósł średnio 45% z wahaniami od 16% do 85%. Maksymalnie, od jednej dawczyni podczas jednej sesji OPU udało się pobrać 27 oocytów, jednak w jej przypadku brak jest danych co do liczby aspirowanych pęcherzyków. Warto zaznaczyć, że z tych 27 pobranych oocytów, 15 zostało zakwalifikowanych do ICSI, 11 podjęło podziały, natomiast ostatecznie nie udało się uzyskać ani jednego zarodka (tab. 1). Najlepsze wyniki uzyskano z kolei u klaczy nr 15 oraz 17. Powodzenie procedury ICSI przeprowadzonej na zakwalifikowanych oocytach wyniosło, odpowiednio, 30% oraz 40%, co pozwoliło w efekcie uzyskać od pierwszej z nich 3, a od drugiej 4 zarodki (tab. 1).

Jak wspomniano wcześniej, opisano jedynie dwa przypadki uzyskania źrebiąt po klasycznym zapłodnieniu *in vitro* (IVF) dojrzałych *in vivo* oocytów (1, 30). Zastosowanie techniki ICSI było natomiast rewolucją w rozrodzie wspomaganym u koni. W 1996 r. uzyskano w ten sposób pierwsze źrebię (35), natomiast

powtarzalne wyniki produkcji zarodków za pomocą tej metody opisano w 2002 r. (6, 24). Jak widać, przedstawione techniki wspomaganego rozrodu mają u koni stosunkowo krótką historię, szczególnie jeśli porównać je do człowieka czy też do wybranych gatunków zwierząt (11, 12), a ich wyniki wciąż nie są w pełni satysfakcjonujące. Na sukces w postaci urodzonego źrebięcia składa się wiele składowych, poczynając od OPU, poprzez ICSI, kriokonserwację uzyskanych zarodków, a kończąc na prawidłowym rozmrożeniu zarodka i jego transplantacji do odpowiednio przygotowanej, zdrowej bioreczeni. Prawidłowo przeprowadzone OPU to nie tylko pozyskanie odpowiedniej liczby oocytów, lecz również zapewnienie właściwych warunków podczas ich przygotowania do transportu. Istotny jest również czas, w jakim muszą one osiągnąć laboratorium gotowe do przeprowadzenia ICSI. Same oocyty mogą być również różnej jakości, na co wykonujący zabieg ma ograniczony wpływ. Generalnie istnieją dwa odrębne systemy pozyskiwania oocytów od żywych klaczy: pozyskiwanie dojrzewającego *in vivo* oocytu z dominującego pęcherzyka przedowulacyjnego, po wcześniej przeprowadzonej stymulacji hormonalnej za pomocą analogu GnRH lub hCG (Dominant Stimulated Follicle – DSF) lub pozyskiwanie niedojrzałych oocytów ze wszystkich widocznych na jajniku pęcherzyków (w przypadku autorów pracy było to min. 4–5 mm), a następnie przeprowadzenie ich dojrzewania *in vitro* (19–21). Metoda wykorzystująca pęcherzyki DSF pozwala na pobranie oocytu dojrzałego, co oznacza, że wznowił on mejozę i osiągnął metafazę II podziału mejotycznego. W porównaniu do aspiracji niedojrzałych pęcherzyków jajnikowych, aspiracja DSF jest łatwiejsza dzięki dużym rozmiarom pęcherzyka dominującego. Decydującym czynnikiem dla uzyskania wysokiego wskaźnika pozyskiwania takich oocytów (powinien wynosić on około 80%) (5, 18), jest oddzielenie oocytu od ściany pęcherzyka poprzez rozproszenie komórek wzgórka jajonośnego otaczających oocyt w wyniku opisanej powyżej stymulacji hormonalnej. Z kolei głównym ograniczeniem możliwości aspiracji dojrzałych oocytów jest obecność zazwyczaj jednego, ewentualnie dwóch pęcherzyków przedowulacyjnych w jednym cyklu, przy tym możliwości aspiracji takich pęcherzyków, ograniczone są do sezonu rozrodczego klaczy (15). Uzyskana w ten sposób komórka jajowa powinna być dostarczona do laboratorium ICSI do 12 godzin i dla osiągnięcia pełnych zdolności do zapłodnienia wymaga 16-godzinnej hodowli (15). Stosunkowo krótki czas inkubacji pozyskanych oocytów narzuca konieczność częstego monitorowania wzrostu pęcherzyka i dokładnego określenia czasu podania hCG/GnRH w celu stymulacji dominującego pęcherzyka oraz precyzyjnego skoordynowania jego pobrania z dostarczeniem do laboratorium ICSI, które musi wykonać zapłodnienie w ściśle określonym czasie. Aspiracja niedojrzałych oocytów z większości pęcherzyków widocznych na

jajnikach pozwala na pozyskanie oocytów, które są w trakcie profazy podziału mejotycznego i wymagają dłuższej hodowli *in vitro* niż w pierwszym przypadku (20, 21). Zabieg można wykonać według zaplanowanego wcześniej harmonogramu, np. raz na 14 dni, bez konieczności śledzenia aktywności jajników pomiędzy aspiracjami (22). Opcjonalnie klacze dawczyni mogą być monitorowane ultrasonograficznie, aby wybrać czas zabiegu, w momencie, kiedy obecna jest duża liczba drobnych pęcherzyków i nie ma pęcherzyka przedowulacyjnego ani ciała żółtego, które utrudniają zabieg (15). Zazwyczaj aspirowany jest płyn ze wszystkich pęcherzyków w jajniku o średnicy powyżej 5-8 mm, a liczba odzyskanych oocytów jest proporcjonalna do liczby obecnych pęcherzyków (10, 15, 21). Główną wadą aspiracji niedojrzałych pęcherzyków jest bardziej skomplikowana procedura ich pobierania w porównaniu do aspiracji DSF – pęcherzyki są małe i trudniej doprowadzić do ich prawidłowego nakłucia, a komórka jajowa jest w nich ściśle połączona ze ścianą pęcherzyka (17). To sprawia, że konieczne jest nawet 8-10-krotne przepłukiwanie pęcherzyka oraz „skrobanie” igłą jego wewnętrznej ściany w celu uzyskania oocytu. Wskaźnik odzysku oocytów w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków waha się przy tej metodzie w granicach 50%, chociaż należy pamiętać, że istnieje wiele czynników obiektywnych, które mogą wpływać na ostateczny wynik (14, 15, 20, 21, 26). Niewątpliwą korzyścią tej metody jest fakt, że istnieje duży margines czasu pracy z niedojrzałymi oocytami – mogą one być od razu umieszczane w podłożu hodowlanym lub przetrzymywane nawet dwie doby, bez utraty potencjału do zapłodnienia (13). Pozwala to na znacznie większą swobodę w zaplanowaniu terminu ICSI (21). Temperatura przechowywania/przeładunku oocytów powinna być utrzymywana przez cały czas w granicach 22°C (21). Aspiracja niedojrzałych pęcherzyków daje ostatecznie możliwość pozyskania większej liczby blastocyst na jedną procedurę OPU w porównaniu do aspiracji DSF (odpowiednio, 1 : 0,33 blastocysty/zabieg (22)). Można też jednocześnie wykonać aspirację niedojrzałych pęcherzyków oraz pęcherzyka dominującego, jednakże w tym przypadku, ze względu na różny wiek pozyskanych oocytów, konieczne będzie przeprowadzenie dwóch oddzielnych procedur ich dojrzewania *in vitro* (21).

Podczas zabiegów OPU wykonywanych przez nasz zespół, średnia liczba pobranych oocytów od jednej klaczy wyniosła 10 z bardzo dużymi wahaniami w przypadku poszczególnych klaczy w skrajnych przypadkach wynosząc od 2 do 27 (tab. 1). Co ciekawe w przypadku klaczy, od której pobrano jedynie 2 oocyty, udało się uzyskać zarodek, a jak opisano wcześniej u klaczy, od której pobrano aż 27 oocytów, zarodka nie udało się wyhodować. Potwierdza to jedynie fakt, że za ostateczny sukces odpowiada wiele dodatkowych czynników, a oczekiwania pozytywnych wyników w rozumieniu statystycznym mogą sprawdzać się

jedynie w przypadku dużej liczby zabiegów. Różnice w liczbie uzyskanych oocytów od poszczególnych klaczy wynikały przede wszystkim z różnej liczby pęcherzyków nadających się do aspiracji. Jak podano w metodyce, rekomendacją do wykonywania OPU była minimalna liczba 10-12 pęcherzyków jajnikowych zdiagnozowanych u klaczy przed zabiegiem. Mimo to, niektórzy właściciele zdecydowali się podjąć ryzyko zabiegu przy mniejszej liczbie pęcherzyków. Należy dodać, że w przypadku nakłuwania niewielkich tworów pęcherzykowych (w przypadku naszych zabiegów aspirowano pęcherzyki o średnicy od 4 mm), czasami pojawia się wątpliwość czy jest to w rzeczywistości prawidłowy pęcherzyk jajnikowy czy też drobna torbiel w której z natury rzeczy brak będzie oocytu (obserwacje własne). Wymienione trudności istotnie wpływają na ostateczny wynik OPU.

Autorzy tej pracy nie mogą szczegółowo analizować wyników samego ICSI, ponieważ przeprowadzane było przez odrębną jednostkę. Mimo to, warto tutaj podkreślić kilka istotnych szczegółów. Pomimo że ICSI wykonywane jest u koni z powodzeniem od około 20 lat, do dziś jest niewiele ośrodków na świecie, które osiągają na tyle dobre rezultaty, aby zdecydować się na zaproponowanie tej procedury jako usługi komercyjnej. Najlepsze ośrodki naukowe, które już lata temu uzyskiwały zarodki końskie na drodze ICSI, do dziś mają w tym zakresie zbyt niepowtarzalne wyniki, żeby wyjść z propozycją usługi zewnętrznej i ograniczają swoją aktywność do prac badawczych. Pierwszy autor tej pracy, który samodzielnie z powodzeniem przeprowadzał ICSI u koni, podkreśla, że od produkcji pierwszych zarodków do „ustawienia laboratorium” i uzyskania powtarzalnych wyników potrzebne są 2-3 lata wykonywania regularnych zabiegów (Roberto Sanchez, dane nieopublikowane).

Analizując trudności, jakie napotyka się podczas produkcji zarodków przy zastosowaniu technik OPU oraz ICSI, należy zwrócić również uwagę na niezaprzeczalne korzyści z niej płynące. Do wykonania zabiegu ICSI, potrzebny jest 1 plemnik, tak więc metoda ta daje ogromne możliwości w zakresie wykorzystania limitowanych dawek cennego nasienia, przy tym może to być nasienie słabej jakości, a nawet w niektórych sytuacjach martwe (7) (pod oczywistym warunkiem, że wybrany plemnik jest nośnikiem prawidłowego, nieuszkodzonego materiału genetycznego). Tak więc, przy dobrej koordynacji OPU i ICSI, jedną dawkę nasienia można wykorzystać do próby wyhodowania zarodków od wielu klaczy. W praktyce istnieje możliwość wykorzystania jednej słomki nasienia na 8-10 sesji OPU (24). Z kolei fakt, że zarodki wyprodukowane metodą ICSI dobrze znoszą proces konserwacji w ciekłym azocie, pozwala na nieograniczony okres ich przechowywania, tym samym eliminując konieczność synchronizacji rui i ograniczając liczbę potencjalnych biorczyń do jednej. Dodatkowo, w tej sytuacji moment przeniesienia zarodka może zostać precyzyjnie

wybrany przez wykonującego zabieg. Wymienione zalety powodują, że wyniki transferu mrożonych zarodków po ICSI przewyższają znacznie te uzyskiwane w wyniku transferu zarodków mrożonych po wypłukaniu ich z macicy klaczy i są porównywalne z wynikami bezpośredniego przenoszenia zarodków świeżych, wymagając przy tym, na etapie przenoszenia, mniejszych nakładów pracy i logistyki. Z wymienionych względów, pomimo że wyniki opisanych procedur wciąż dalekie są od doskonałości i obecnie zarezerwowane dla koni o dużej wartości, autorzy nie mają wątpliwości, że w najbliższej przyszłości wraz z udoskonaleniem i upowszechnieniem obu technik, OPU wraz z ICSI zajmą istotne miejsce w codziennej ofercie rozrodu wspomaganego u koni.

Piśmiennictwo

1. *Bezard J.*: In vitro fertilization in the mare (abstract). Proc. Int. Scientific Conference on Biotechnics in Horse Reproduction, Agricultural University of Cracow, Poland, 1992, s. 12.
2. *Brackett B. G., Bousquet D., Boice M. L., Donawick W. J., Evans J. F., Dressel M. A.*: Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 1982, 27, 147-158.
3. *Bruck I., Raun K., Synnestevedt B., Greve T.*: Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique (short communication). *Equine Vet. J.* 1992, 24, 58-59.
4. *Callesen H., Greve T., Christensen F.*: Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1987, 27, 217.
5. *Carnevale E. M., Ginther O. J.*: Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono.* 1995, 1, 209-214.
6. *Choi Y. H., Love C. C., Love L. B., Varner D. D., Brinsko S., Hinrichs K.*: Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed sperm. *Reproduction* 2002, 123, 455-465.
7. *Choi Y. H., Love C. C., Varner D. D., Hinrichs K.*: Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology* 2006, 65, 808-819.
8. *Claes A., Stout T. A. E.*: Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology* 2022, 187, 215-218, doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.04.019.
9. *Cook N. L., Squires E. L., Ray B. S., Jasko D. J.*: Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Vet. J.* 1993, Suppl. 15, 71-74.
10. *Duchamp G., Bezard J., Palmer E.*: Oocyte yield and consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. *Biol. Reprod. Mono.* 1995, 1, 233-241.
11. *Edwards R. G.*: Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965, 208, 349-351.
12. *Edwards R. G.*: The history of assisted human conception with a special reference to endocrinology. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 1996, 104, 183-204.
13. *Foss R., Ortis H., Hinrichs K.*: Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse. *Equine Vet. J.* 2013, 45, 39-43.
14. *Galli C., Colleoni S., Duchi R., Lagutina I., Lazzari G.*: Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 98, 39-55.
15. *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, 138-51.
16. *Gibbons J. R., Beal W. E., Krisher R. L., Faber E. G., Pearson R. E., Gwazdauskas F. C.*: Effects of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 1994, 42, 405-419.
17. *Hawley L. R., Enders A. C., Hinrichs K.*: Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol. Reprod. Mono.* 1995, 1, 243-252.
18. *Hinrichs K.*: Assisted reproductive techniques in mares. *Reprod. Domest. Anim.* 2018, 53 (2), 4-13.
19. *Hinrichs K.*: In vitro production of equine embryos: state of the art. *Reprod. Domest. Anim.* 2010, 45 (2), 3-8.
20. *Hinrichs K.*: Production of embryos by assisted reproduction in the horse. *Theriogenology* 1998, 49, 13-21.
21. *Hinrichs K., Matthews G. L., Freeman D. A., Torello E. M.*: Oocyte transfer in mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, 212, 982-986.
22. *Jacobson C. C., Choi Y. H., Hayden S. S., Hinrichs K.*: Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2010, 73, 1116-1126.
23. *Lambert R. D., Bernard C., Rioux J. E., Bèland R., D'Amours D., Montreuil A.*: Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology* 1983, 20, 149-161.
24. *Lazzari G., Crotti G., Turini P., Duchi R., Mari G., Zavaglia G., Barbacini S., Galli C.*: Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology* 2002, 58, 709-712.
25. *Lenz S., Lauritsen J. G.*: Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anesthesia: a new method of collecting oocytes for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 1982, 38 (6), 673-677.
26. *Meintjes M., Bellow M. S., Paul J. B., Broussard J. R., Li L. Y., Paccamonti D., Eilts B. E., Godke R. A.*: Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 1995, 52, 281-292.
27. *Młodawska W., Okólski A.*: Equine oocyte-cumulus morphology as affected by follicular size. *Equine Vet. J.* 1997, 25, 38-42.
28. *Młodawska W., Palmer E., Duchamp G., Okólski A., Bèzard J.*: Zona pellucida-sperm binding assay for equine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 2000, 56, 423-429.
29. *Okólski A., Bèzard J., Magistrini M., Palmer E.*: Maturation of oocytes from normal and atretic equine ovarian follicles as affected by steroid concentrations. *J. Reprod. Fertil.* 1991, 44, 385-392.
30. *Palmer E., Bezard J., Magistrini M., Duchamp G.*: In vitro fertilisation in the horse: a retrospective study. *J. Reprod. Fertil.* 1991, 44, 375-384.
31. *Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruip T. A., Taverne M. A.*: Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988, 30, 751-762.
32. *Steptoe P. C., Edwards R. G.*: Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978, 366.
33. *Steptoe P. C., Edwards R. G.*: Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotropins. *Lancet* 1970, 683-68.
34. *Steptoe P. C., Edwards R. G., Walters D. E.*: Observations on 767 clinical pregnancies and 500 births after human in-vitro fertilization. *Human Reprod.* 1986, 1, 89-94.
35. *Squires E., Wilson J., Kato H., Blaszczyk A. A.*: Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1996, 306.

Adres autora: dr hab. n. wet. Maciej Witkowski, ul. Melchiora Wańkowi-
cza 5B m. 80, 02-796 Warszawa; e-mail: mawitkow@gmail.com