

KROK MIŁOWY W ZAPŁODNIENIU IN VITRO U KONI

Joanna Kochan¹, Katarzyna Kostarczyk¹, Magdalena Profaska^{2,3}

¹Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im H. Kołłątaja w Krakowie

²Katedra Diagnostyki i Nauk klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Rolniczego im H. Kołłątaja w Krakowie

³Equibiotech sp. z o.o., Nowa Iwiczna

66

Hodowcy wartościowych koni od lat interesują się technikami wspomaganego rozrodu ART (Assisted reproduction techniques), ponieważ dzięki tym metodom mogą jednocześnie wykorzystywać wybitne konie w sporcie i uzyskiwać od nich maksymalną liczbę potomstwa. Techniki wspomaganego rozrodu dają również szansę na uzyskanie potomstwa od osobników z zaburzeniami płodności, od osobników starych lub nawet wiele lat po ich śmierci. Niestety rozwój biotechnik rozrodu u koni postępuje znacznie wolniej niż u innych gatunków zwierząt gospodarskich. Ma to związek przede wszystkim z brakiem możliwości wywołania superowulacji u klaczy, a co za tym idzie ograniczonym dostępem do oocytów i zarodków. Sytuację komplikuje również ograniczony dostęp do materiału rzeźnego i możliwość prowadzenia badań naukowych na szeroką skalę z wykorzystaniem izolowanych jajników, ze względu na kontrowersje etyczne związane z ubojem koni i malejącą liczbą rzeźni końskich, zarówno w Polsce, jak i na całym świecie.

Początek rozwoju biotechnologii rozrodu koni datuje się na 1898 rok, w którym pojawiło się pierwsze oficjalne doniesienie o skutecznej inseminacji klaczy (5). Od tego czasu nastąpił znaczący postęp w rozwoju technik wspomaganego rozrodu koni, ale niewspółmiernie mały w stosunku do innych gatunków zwierząt gospodarskich. Obecnie najpopularniej-

sze i najszerzej wykorzystywane w praktyce hodowlanej metody wspomaganego rozrodu to inseminacja, zarówno nasieniem świeżym, jak i mrożonym oraz transplantacja zarodków świeżych lub przechowywanych krótkotrwale. Natomiast technologie związane z produkcją zarodków końskich *in vitro* rozwinęły się dopiero w ostatnich latach, w momencie, gdy podobne techniki u innych gatunków zwierząt osiągnęły znaczący postęp i znalazły już zastosowanie w praktyce na szeroką skalę. Możliwość skutecznego zapłodnienia *in vitro* i uzyskiwanie zarodków w warunkach pozaustrojowych ma wiele korzyści, zarówno hodowlanych, jak i ekonomicznych (8). Dzięki zapłodnieniu *in vitro* możemy uzyskiwać wiele zarodków od jednej klaczy, od klaczy ze schorzeniami macicy, klaczy roniących, starszych, aktywnych w sporcie. Ponadto, do zapłodnienia *in vitro* może zostać wykorzystane nasienie nawet bardzo złej jakości. Uzyskane zarodki w wyniku procedury zapłodnienia *in vitro* mogą być wykorzystane do transferu bezpośrednio po procedurze lub magazynowane w bankach zarodków, sprzedawane i wysyłane na duże odległości. Zarodki mogą być transferowane do macicy klaczy dawczyni oocytów lub do innej klaczy biorczyni.

Przez wiele lat, jedyną skuteczną metodą zapłodnienia *in vitro* oocytów klaczy była metoda docyt oplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI – intracytoplasmic sperm injection). Pierwsze źrebię uzyska-

ne tą metodą przyszło na świat w 1996 roku w USA (11). Od tamtej pory jedynie kilka ośrodków na świecie oferuje komercyjną usługę zapłodnienia *in vitro* u koni tą metodą. Jest to spowodowane przede wszystkim trudnościami technicznymi związanymi z przeprowadzeniem ICSI. Do wykonania mikroiniekcji plemnika do oocytu (ICSI) niezbędny jest miromanipulator, urządzenie, które jest bardzo drogie, a do jego obsługi konieczny jest wykwalifikowany embriolog z dużym doświadczeniem w manualnym wykonywaniu mikromanipulacji na gametach. Tak więc przez wiele lat hodowcy koni zmuszeni byli wysyłać oocyty pobrane od swoich klaczy do wybranych ośrodków, często drogą lotniczą. Następnie uzyskane zarodki transportowane były z powrotem do hodowcy, co generowało dodatkowe koszty i wymagało dopilnowania wielu formalności dotyczących transportu materiału biologicznego.

Alternatywą dla docyt oplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI) jest tak zwana klasyczna metoda zapłodnienia *in vitro* (IVF – *in vitro fertilisation*). Jest to metoda łatwa i tania, przez co z powodzeniem stosowana u większości gatunków zwierząt na szeroką skalę. Jednakże w przypadku koni przez wiele lat nie udawało się w powtarzalny sposób uzyskiwać źrebiąt, a nawet zarodków w wyniku klasycznego zapłodnienia *in vitro* (IVF). Na przestrzeni lat tylko dwukrotnie, w 1989 i w 1991 roku, pojawiły się doniesienia o urodzeniu źrebiąt w wyniku



ADOBE STOCK

A milestone in equine *in vitro* fertilization

Assisted reproduction techniques for horses are developing relatively slowly, compared to those for other domestic animals, because of a wide range of species-specific barriers. For many years methods for standard *in vitro* fertilization have been difficult to establish in the horse. In 2022, a breakthrough occurred and the first foal after standard IVF was born.

The aim of this review article is to discuss the problem of *in vitro* embryo production in horses and describe a new method of *in vitro* fertilisation (IVF).

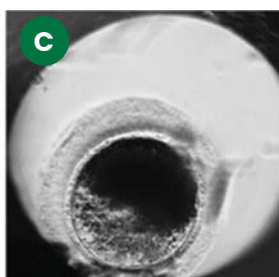
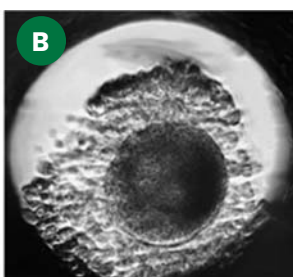
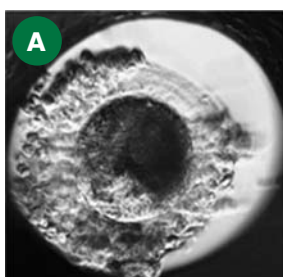
Keywords: horses, fertilization, *in vitro*.

zastosowania tej metody (1, 10). Przez wiele lat w wielu ośrodkach bezskutecznie próbowano odtworzyć protokoły, w wyniku których urodziły się powyżej opisane źrebięta. Dodatkowo, w obu przypadkach wykorzystano oocyty dojrzewające *in vivo*, pobrane z pęcherzyków przedowulacyjnych, a nie oocyty dojrzewające *in vitro*. Przyczyn niepowodzeń szukano zarówno w przygotowaniu oocytów, jak i nasienia, a także w warunkach hodowli *in vitro* zarodków. Przypuszczano, że przyczyną niepowodzeń mogą być zaburzenia podczas dojrzewania *in vitro* oocytów. Około 40-70 % oocytów kłaczy osiąga metafazę II po dojrzewaniu *in vitro*, podczas gdy oocyty świń, krów czy kóz osiągają metafazę II aż w 90 %, (4). Ponadto osłonka przejrzysta ulega specyficznym zmianom podczas hodowli *in vitro*, utrudniając penetrację plemników. Zakładano także, że brak zadowalających wyników ma związek z niewłaściwą procedurą kapacytacji plemników ogiera w warunkach *in vitro*, przez co plemniki nie są zdolne do wnikięcia do oocytu bez pomocy mikromanipulatora. W świetle obecnych badań i opracowaniu protokołów pozwalających uzyskiwać źrebięta w wyniku IVF, ta hipoteza wydaje się najbardziej prawdopodobna.

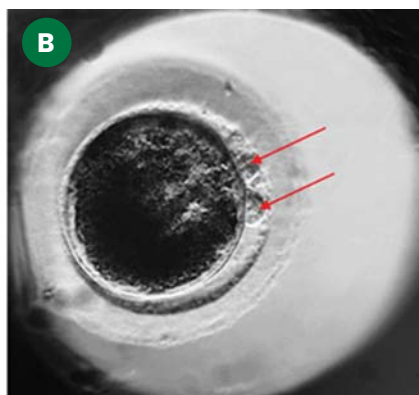
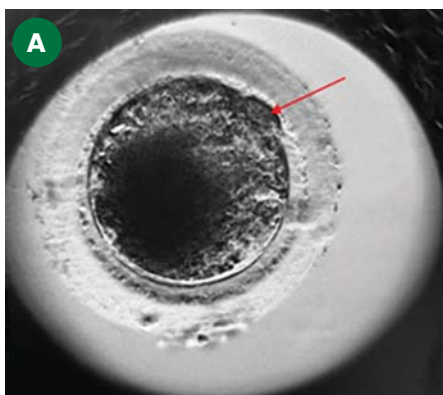
W 2022 roku nastąpił wielki przełom i przełamanie bariery uniemożliwiającej klasyczne zapłodnienie *in vitro* u koni (IVF). Po wielu latach prób, naukowcom z Uniwersytetów w Pensylwanii i Teksasie w USA udało się uzyskać bardzo wysokie wskaźniki rozwoju zarodków po zapłodnieniu IVF: 90 % zapłodnionych oocytów, z czego 74 % rozwinęło się do stadium blastocysty. Trzy zarodki transferowano do kłaczy biorczyń



Ryc. 6. Źrebięta urodzone w wyniku zapłodnienia *in vitro* (IVF). A – pierwsze źrebięta na świecie po IVF, US Pensylwania, USA, 2022. B – pierwsze źrebię urodzone po IVF z wykorzystaniem nasienia mrożonego, US Davis, USA 2024. C – pierwsze źrebię w Europie urodzone w wyniku IVF, Uniwersytet w Ghent, Belgia, 2023.



Ryc. 3. A, B – oocyty klaczy otoczone komórkami ziarnistymi. C – oocyty klaczy oczyszczone z komórek ziarnistych.



Ryc. 4. A – oocyt klaczy z widocznym pierwszym ciałkiem kierunkowym. B – oocyt klaczy po zapłodnieniu z widocznymi dwoma ciałkami kierunkowymi.



Ryc. 1. Przyżyciowe pozyskiwanie oocytów od klaczy (OPU – ovum pick-up).

i wszystkie trzy klacze urodziły zdrowe źrebięta (2), (ryc. 6). Kluczem do sukcesu okazało się wydłużenie czasu kapacytacji plemników. Świeże plemniki poddano wstępnej inkubacji z PHE (penicillamine, hypotaurine, epinephrine) przez 22 godziny. Następnie inkubowano wspólnie plemniki i oocyty otoczone komórkami ziarnistymi przez 6 godzin. Kolejnym krokiem milowym było opracowanie skutecznego protokołu zapłodnienia IVF z wykorzystaniem nasienia mrożonego (3).

Pozyskanie i przygotowanie oocytów do zapłodnienia *in vitro*

Warunkiem koniecznym, decydującym o sukcesie IVF jest uzyskanie dobrej jakości oocytów zdolnych do zapłodnienia. Oocyty, a dokładniej kompleksy oocyt-cumulus (COC-oocyt otoczony wieloma warstwami komórek ziarnistych tworzących wzgórek jajonośny) (ryc. 3), muszą być dojrzałe do zapłodnienia, czyli w metafazie II podziału mejozy. Oocyty takie charakteryzują się obecnością pierwszego ciałka kierunkowego w przestrzeni okołoołtkowej (ryc. 4), charakterystycznym zbiegunowaniem cytoplazmy (ciemna część cytoplazmy układa się na jednym biegunie oocyty) i otoczone rozproszonym wzgórkem jajonośnym. Takie oocyty można uzyskać po dojrzewaniu *in vivo* z pęcherzyków przedowulacyjnych lub z mniejszych pęcherzyków, które następnie muszą zostać

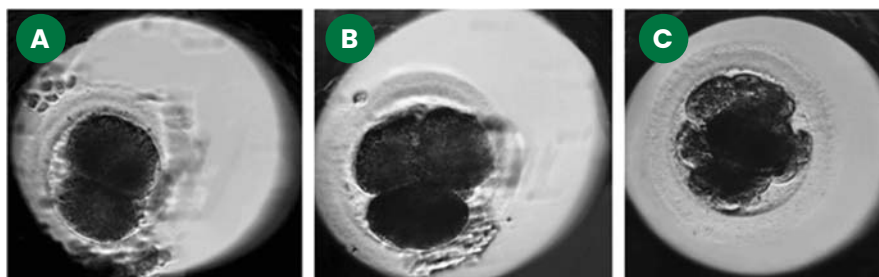


Ryc. 2. A – jajnik klaczy z pęcherzykiem przedowulacyjnym. B – pobieranie oocytów metodą łyżeczkowania z wyizolowanych jajników. C – hodowla *in vitro* oocytów.

poddane dojrzewaniu *in vitro* (IVM – *in vitro maturation*). Istnieje również możliwość pozyskania oocytów z wyizolowanych jajników np. po śmierci klaczy. Optymalną strategią wydaje się pozyskiwanie oocytów dojrzewających *in vivo*, gdyż nigdy nie jesteśmy w stanie idealnie odtworzyć w warunkach *in vitro* środowiska panującego w jajniku. Jednakże, ze względu na morfologię jajnika klaczy i braku możliwości wywołania u niej superowulacji, w ciągu jednego cyklu można pozyskać od niej tylko jeden lub dwa oocyty przedowulacyjne (9). W związku z tym preferuje się pozyskiwanie większej liczby oocytów z mniejszych pęcherzyków, a następnie poddawanie ich dojrzewaniu *in vitro*. Do pozyskania oocytów, zarówno z pęcherzyków przedowulacyjnych jak i mniejszych, stosuje się powszechnie metodę OPU (ovum pick-up), polegającą na transwaginalnej aspiracji płynu pęcherzykowego z pęcherzyków jajnikowych przy użyciu głowicy USG wyposażonej w igłę aspiracyjną i pompę (ryc. 1).

Uzyskane oocyty powinny być otoczone wieloma warstwami komórek ziarnistych, których stopień rozproszenia zależy od stopnia dojrzałości oocyty i wielkości pęcherzyka, z którego został pobrany. Takie kompleksy oocyt-cumulus zostają następnie przepłukane i podane bezpośrednio dojrzewaniu *in vitro* lub wysłane w specjalnym medium „holdingowym” do ośrodka wykonującego procedurę IVF lub ICSI. Przed rozpoczęciem hodowli *in vitro* oocytów, komórki dzielone są ze względu na stopień rozproszenia wzgórka jajonośnego na EX – expanding cumulus (rozproszony wzgórek jajonośny) lub CP – compact cumulus (zbity wzgórek jajonośny).

Dojrzewanie *in vitro* przeprowadza się wg wybranego protokołu. Można wykorzystać do tego celu komercyjne media, co jest bardzo wygodne lub można samodzielnie przygotować pożywkę hodowla-



Ryc. 5. Zarodki końskie po zapłodnieniu *in vitro*. A – zarodek dwukomórkowy. B – zarodek trzykomórkowy. C – zarodek ośmiokomórkowy.

ną, zazwyczaj na bazie TCM 199, uzupełnioną surowicą, hormonami, antybiotykami. Oocyty dojrzewają w specjalnych szalkach czterodołkowych (ryc. 2 C) w inkubatorze w atmosferze 5 % CO₂, w temperaturze 38°C, przez 30-36 h. Czas hodowli *in vitro* zależy od stopnia rozproszenia komórek ziarnistych. Oocyty EX wymagają krótszego czasu hodowli (30 h) natomiast oocyty CP potrzebują 6 godzin więcej.

Spodziewana skuteczność IVM u koni wynosi około 60 %, przy czym należy pamiętać, że oocyty EX mają większe kompetencje do osiągnięcia stadium MII, niż oocyty CP (6).

Po wymaganym czasie inkubacji należy częściowo lub całkowicie usunąć komórki ziarniste w zależności od metody zapłodnienia. Do zapłodnienia metodą mikroiniekcji konieczne było usunięcie oocyty otoczonego jedynie osłonką przejrzystą. Usunięcie wszystkich komórek ziarnistych jest skomplikowanym zabiegiem wymagającym inkubacji w hialuronidazie, a następnie mechanicznym usunięciu komórek poprzez wielokrotne i precyzyjne pipetowanie, co wymaga dużych umiejętności manualnych. Podczas tego zabiegu dochodzi do dużych strat w ilości i jakości oocytów. Natomiast w przypadku zapłodnienia *in vitro* metodą klasyczną (IVF) usuwa się jedynie niewielką ilość komórek, co niewątpliwie jest zabiegiem dużo łatwiejszym i szybszym.

Następnie oocyty podlegają wstępnej ocenie stadium dojrzałości i kwalifikowane są do zapłodnienia.

Przygotowanie nasienia do zapłodnienia *in vitro*

Do klasycznego zapłodnienia *in vitro* można wykorzystać zarówno nasienie świeże, jak i mrożone. Pierwszym etapem preparatyki nasienia jest usunięcie jego osocza lub osocza i rozrzedzalnika. W tym celu nasienie jest inkubowane w wybranej komercyjnej pożywce przez ok. 20 minut, a następnie zebrany supernatant zostaje odwirowany (700×g przez 5 min). Kluczem do opracowania skutecznej metody IVF była preinkubacja plemników w PHE (0.23 mM hypotaurine, 0.46 mM penicillamine i 0.046 mM epinephrine). W tym celu należy przygotować szalkę z kroplami 50μl FT-PHE (Fertil TALP +PHE), do których należy dodać plemniki tak, aby ich koncentracja wynosiła 1 × 10⁶/m. Po wielu próbach ustalono, że optymalny czas preinkubacji plemników z FT-PHE powinien wynosić 22 godziny w temperaturze 38,2°C w atmosferze 5 % CO₂.

Zapłodnienie i hodowla *in vitro* zarodków

Zapłodnienie IVF odbywa się poprzez koinkubację kompleksów oocyt-cumulus w kroplach FT-PHE z preinkubowanymi



plemnikami. Należy tak zsynchronizować czas preinkubacji, aby zakończyć tę procedurę wraz z zakończeniem dojrzewania *in vitro* oocytów. Wg Felix i wsp. optymalny czas konikubacji powinien wynosić 3 godziny. Następnie oocyty (przypuszczalne zygoty) należy przenieść do mniejszych kropli z pożywką do hodowli zarodków. Jeżeli zapłodnionych zostało więcej oocytów, zarodki mogą być hodowane grupowo w większych kroplach (5 zarodków/50µl) lub indywidualnie w mniejszych kroplach (1 zarodek/5-10µl) (Ryc. 5). Na rynku obecnie dostępnych jest wiele komercyjnych mediów do hodowli zarodków. Należy jednak pamiętać, że większość nowoczesnych mediów wymaga atmosfery 6 % CO₂ i 5 % O₂ (poziom tlenu regulowany jest poziomem azotu-N). Po ok. 36 godzinach hodowli zaleca się usunięcie resztek komórek ziarnistych z zapłodnionych oocytów i przeniesienie dzielących się zarodków do świeżych kropli pożywki. Po kolejnych trzech dobach hodowli *in vitro* zarodków należy po raz kolejny przenieść zarodki do świeżych kropli pożywki. Zarodki powinny osiągnąć stadium blastocysty ok. 8 dnia hodowli *in vitro* w zależności

od zastosowanej pożywki i warunków hodowli.

Po osiągnięciu stadium blastocysty zarodki mogą zostać przeniesione bezpośrednio do macicy kłaczy biorczyń metodą standardowo stosowaną w embriotransferze. W przypadku tzw. transferu odroczonego zarodki mogą zostać podane kriokonserwacji i przechowywane/transportowane w ciekłym azocie. W przypadku kriokonserwacji należy pamiętać, że zabieg ten lepiej przeżywają wczesne blastocysty, które nie mają jeszcze wykształconej dużej jamy blastocysty z dużą objętością płynu (7).

Podsumowanie

Po dekadach poszukiwań, wielu nieudanych próbach, latach pracy wielu wiodących ośrodków na świecie, zapłodnienie *in vitro* klasyczną metodą stało się możliwe u koni. Ten krok milowy rozpoczął nowy rozdział we wspomaganym rozrodzie koni dla naukowców, lekarzy weterynarii i hodowców. ●

Piśmiennictwo

1. Bezard J., Magistrini M., Duchamp G., Palmer E.: Chronology of equine fertilization and embryonic

development in vivo and in vitro. „Equine Vet. J.”, 1989, 8, 105-110.

2. Felix R., Turner R. M., Dobbie T., Hinrichs K.: Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. „Biol Reprod.”, 2022, 10, 1551-1564.
3. Felix R., Hinrichs K.: Selection of frozen-thawed semen for standard in vitro fertilization. „J. Equine Vet. Sci.”, 2023, 104648.
4. Goudet G., Belin F., Młodawska W., Bezard J.: Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. „J. Reprod. Fertil.”, 2000, 56, 483-492.
5. Heape W.: On the artificial insemination of mares. „Veterinarian”, 1989, 71, 202-212.
6. Hinrichs K.: In Vitro Production of Equine Embryos: State of the Art. „Reprod. Dom. Anim.”, 2010, 45, 3-8.
7. Hinrichs K., Advances in Holding and Cryopreservation of Equine Oocytes and Embryos. „J. Equine Vet.”, 2020, 89, 102990.
8. Kochan J., Nowak A., Migdał A., Witkowski M.: Biotechnologia w rozrodzie koni – perspektywy i ograniczenia. „Med. Wet.”, 2016, 226-230.
9. Maclellan L. J., Carnevale E. M., Coutinho da Silva M. A., Scoggin C. F., Bruemmer J. E., Squires E. L.: Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. „Theriogenology”, 2002, 58, 911-919.
10. Palmer E., Bezard J., Magistrini M., Duchamp G.: In vitro fertilization in the horse: A retrospective study. „J. Reprod. Fert.”, 1991, 44, 375-584.
11. Squires E. L., Wilson J. M., Kato H.: A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. „Theriogenology”, 1996, 45, 306 (Abstr.)

Joanna Kochan, e-mail: joanna.kochan@urk.edu.pl