

Transplantacja zarodków koni*

Marian Tischner

Transplantacja zarodków polega na pobraniu zarodka od klaczy zwanej dawczynią i wprowadzeniu go do macicy klaczy nazywanej biorczynią. Klacz biorczymi pełni rolę matki zastępczej, która rodzi i odchowuje źrebię klaczy dawczyni. Natomiast klacz dawczyni może zostać ponownie zażrebiona w następnym cyklu i urodzić swoje źrebię lub może być wykorzystana jako dawczyni kolejnych zarodków.

Rozwój metody

Pierwsze źrebięta po transplantacji zarodków urodziły się niemal równocześnie w Anglii i Japonii w 1973 r. Następnym udanym zabiegiem transplantacji zarodków był eksperyment międzynarodowej wymiany zarodków pomiędzy Anglią a Polską w 1975 r. W tym czasie nie znano jeszcze metody konserwacji zarodków i na czas podróży jako inkubatory dla zarodków wykorzystano króliki. W Anglii od klaczy rasy Walijski Kuc Górski pobrano zarodki i umieszczono je w podwiązanych jajowodach trzech żywych królic. Następnie króliki te przywieziono samochodem z Cambridge do Krakowa a z ich jajowodów wypłukano zarodki, które transplutowano do odpowiednio przygotowanych klaczy biorczyń. W wyniku tego eksperymentu urodziły się w Krakowie w 1976 r. dwa ogierki rasy Walijski Kuc Górski (Fot. 1). Ogierki te w 1983 i 1984 r. zostały sprowadzone przez prof. E. Sasimowskiego do Felina i z powodzeniem zostały wykorzystane w programie produkcji kuców felińskich. Kolejne udane zabiegi transplantacji zarodków przeprowadzono w USA w 1979 r. Pierwsze polskie źrebięta po transplantacji zarodków urodziły się w Krakowie w 1982 r.

*/Artykuł opublikowany: Araby, nr. 12, 4, str.82-87, 2008 i nr.13,1 str. 64-66, 2009



Fot. 1. Żrebięta ur. w 1976 r. w Polsce w wyniku transplantacji zarodków przywiezionych samochodem z Anglii w podwiązanych jajowodach żywych królic. A – Twink Allen (Cambridge), Marian Tischner – stoi (Kraków), klacz biorczyni „Mrożonka” pierwszy koń urodzony w Polsce, w 1969 r w wyniku inseminacji nasieniem mrożonym. Po bezkrwawej transplantacji zarodka urodziła ogierka „Sopelka” zdjęcie „B”. C – ogierek „Szarak” wraz z klaczą biorczynią „Morfina” rasy kp.

Pomimo wielu prób konserwacji zarodków w ciekłym azocie podejmowanych pod koniec lata siedemdziesiątych również w Polsce, nie udało się wówczas uzyskać na tej drodze źrebiąt. Pierwsze dwa źrebięta po zamrożonych/rozmrożonych zarodkach urodziły się w Japonii dopiero w 1982 r. W Anglii w 1985 r. urodziły się dwa źrebięta rasy konik polski po transplantacji metodą chirurgiczną zarodków zamrożonych w Krakowie (Fig. 2, A). W 2005 r. urodziło się z kolei źrebię w Krakowie w wyniku niechirurgicznej transplantacji zarodka zamrożonego w Newmarket, Anglia (Fig. 2, B i C



Fig. 2. A ogierek „Winston” rasy konik polski urodzony 1985 r. w Cambridge w wyniku chirurgicznej transplantacji mrożonego zarodka w Krakowie i przywiezionego do Anglii drogą lotniczą, B - klaczka „Mrożona Róża” (zarodek od Welsh Pony po XX) urodzona w Krakowie w 2005 r. w wyniku niechirurgicznej transplantacji mrożonego zarodka przywiezionego z Newmarket (Anglie) wraz z klaczą biorczynią rasy konik polski, C – „Mrożona Róża” w wieku 3 lat.

Ze względu na stosunkowo łatwe i nie szkodzące zdrowiu klaczy pozyskiwanie zarodków, transplantację zarodków zaakceptowało już wiele związków hodowlanych. Od 1983 r. tą metodę rozrodu na skale praktyczną zaczęto stosować w niektórych krajach. Obecnie transplantacja zarodków jest szeroko stosowana w Argentynie, gdzie pobierane są zarodki od wybitnych klaczy używanych do gry w polo, a także w USA, Brazylii i w Europie Zachodniej gdzie z kolei dawczyniami zarodków są klacze sportowe oraz klacze czystej krwi arabskiej. W Argentynie pierwsza komercyjna stacja transplantowała w 1989 r. 75 zarodków, a w sezonie 2007/08 funkcjonowało już 11 dużych stacji i w wyniku transplantacji urodziło się ponad 5,500 źrebiąt.

Korzyści transplantacji zarodków

1. Uzyskanie większej liczby źrebiąt od wybitnych klaczy i tym samym przyspieszenie postępu hodowlanego. W jednym roku można uzyskać dodatkowo od klaczy 2-4 źrebięta.
2. Otrzymywanie źrebiąt od klaczy sportowych bez konieczności przerywania ich udziału w zawodach lub pokazach.
3. Uzyskanie źrebiąt od starszych, wartościowych klaczy, które z różnych względów nie mogą już rodzić np. chronicznie ronią (jednak szansa otrzymania potomstwa od tych klaczy jest znacznie mniejsza w porównaniu do zdrowych klaczy).
4. Otrzymania źrebiąt od bardzo młodych klaczy np. dwuletnich, a więc około 1-2 lat wcześniej zanim osiągną dojrzałość somatyczną i zostaną włączone do rozrodu. (skrócenie międzypokoleniowego odstępu i tym samym przyspieszenie postępu genetycznego).
5. Przez odpowiedni dobór klaczy biorczyni można wywierać wpływ na rozwój i ostateczny wzrost koni urodzonych po transplantacji zarodków.
6. Transplantacja zarodków daje możliwość szerokiej międzynarodowej wymiany materiału genetycznego (eksport-import) w postaci zarodków konserwowanych bez konieczności uciekania się do bardzo kosztownego transportu zwierząt.
7. Właścicielowi wartościowej klaczy dawczyni umożliwia uzyskanie dodatkowych korzyści finansowych ze sprzedaży zarodków.
8. Poprzez zamrażanie zarodków istnieje możliwość tworzenia rezerwy genetycznej wartościowych linii lub zagrożonych ras koni. Należy jednak brać pod uwagę dużą wrażliwość zarodków koni na zamrażanie-rozmrażanie i znacznie mniejszy procent urodzeń źrebiąt po transplantacji zarodków mrożonych w porównaniu do zarodków świeżych.

Przeszkody szerokiego rozwoju metody transplantacji zarodków u koni.

1. Brak skutecznych metod wywoływania superowulacji u klaczy, co znacznie ogranicza uzyskiwanie tak szybkiego postępu genetycznego jak np. w hodowli bydła. W ciągu jednego sezonu można uzyskać maksymalnie 7-8 zarodków od jednej klaczy, średnio 3-4 zarodki.
2. Niektóre związki hodowlane nie wyrażają zgody na rejestrację źrebiąt urodzonych po transplantacji zarodków.
3. Dużą wrażliwość zarodków na zamrażanie/rozmrózanie.

Jak powstaje i rozwija się zarodek?

Na wiosnę, gdy rozpoczyna się u koni sezon rozrodowy klacze zaczynają przejawiać cyklicznie ruje. W czasie rui, która trwa 4-8 dni, na jajniku rośnie pęcherzyk, wewnątrz którego dojrzewa oocyt (gameta żeńska), po owulacji nazywana już komórką jajową. Pod koniec rui pęcherzyk pęka "wyrzucając" do jajowodu komórkę jajową. Jeżeli w tym czasie klacz zostanie pokryta lub unasieniona dochodzi do zapłodnienia komórki jajowej i tworzy się jednokomórkowy zarodek zwany zygotą. Zygota otoczona jest przez sprężystą osłonkę przejrzystą. Po około 24 godzinach od chwili zapłodnienia zygota dzieli się na dwie komórki zwane blastomerami. Dalszy podział blastomerów następuje co kilkanaście godzin w wyniku czego powstaje zarodek 4, 8 i 16 blastomerowy. Po 4-5 dniach 32 komórkowy zarodek, swym kształtem przypomina owoc morwy lub maliny i nazywany jest morulą, rozpoczyna produkcję hormonu $PGE_2\alpha$. Hormon ten powoduje skurcze jajowodu przesuwając zarodek przez jajowód i umożliwia przedostanie się do macicy. Zarodek opuszczający jajowód nie jest widoczny "gołym okiem", jego średnica wynosi zaledwie 0,15 mm. Około 7 dnia po zapłodnieniu zaczyna tworzyć się na zarodku kapsuła, która bezpośrednio przylega do zarodka. Jest to dodatkowa sprężysta osłona otaczająca zarodek. Zarodek 7-8 dniowy otoczony jest zatem przez kapsułę i osłonkę przejrzystą. Wewnątrz zarodka tworzy się jamka środkowa wypełniona płynem i morula przekształca się w blastocystę. Na biegunie blastocysty powstaje tarczka zarodkowa, z której rozwinie się później płód a z pozostałych komórek otaczających zarodek łożysko (Fig. 3). Średnica zarodka 8-dniowego może się wahać od 0,4 do 0,9 mm, średnio wynosi 0,4 mm i zarodek w tym stadium rozwojowym może już być dostrzegany "gołym okiem"

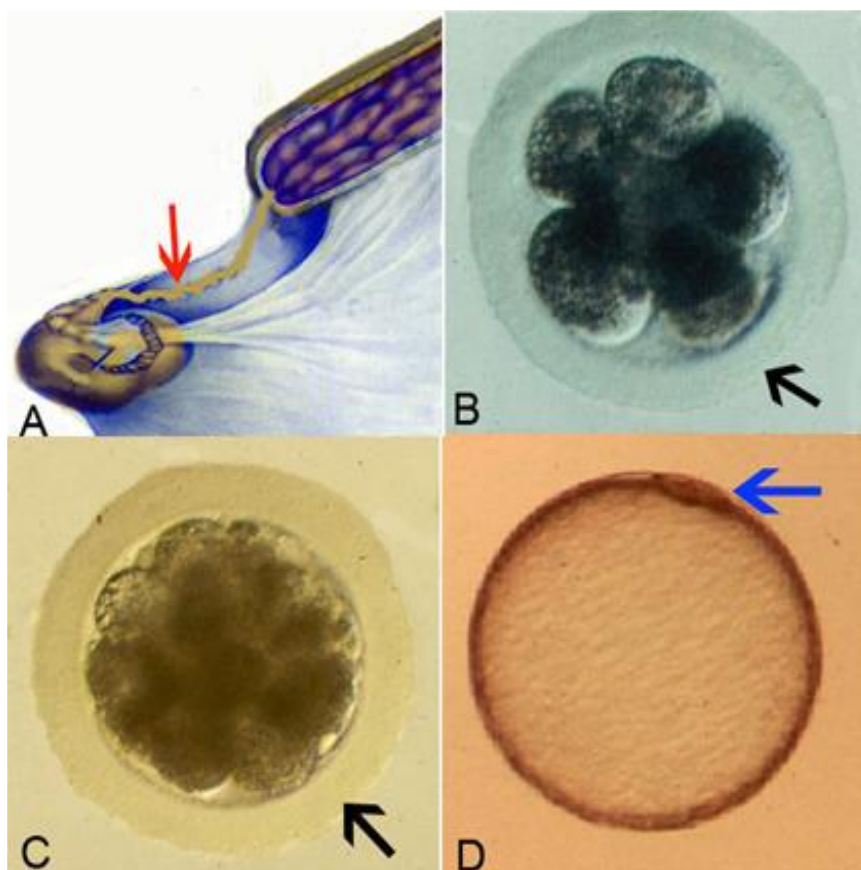


Fig.3. A- schemat jajnika, jajowodu i rogu macicznego klaczy. Strzałką zaznaczono miejsce zapłodnienia. B- zarodek 6-cio blastomerowy, C- morula. Strzałkami zaznaczono osłonkę przejrzystą. C – blastocysta. Strzałką zaznaczono węzeł zarodkowy.

W 8-9 dniu po zapłodnieniu osłonka przejrzysta zostaje zrzucana z zarodka, pozostaje natomiast nadal kapsuła, która utrzymuje się na zarodku do około 26-28 dnia. Rola kapsuły nie jest całkiem wyjaśniona. Przypuszcza się, że podobnie jak osłonka przejrzysta ochrania zarodek przed infekcjami drobnoustrojów, a także stanowi filtr w wymianie substancji odżywczych pomiędzy matką a rozwijającym się płodem.

Po około 6 dniach od chwili zapłodnienia zarodek przedostaje się do macicy i rozpoczyna migrację wewnątrzmaciczną. przechodząc stale z jednego rogu macicy do drugiego. Podczas jednego dnia zarodek może 10 do 20 razy przechodzić z jednego rogu macicy do drugiego. W czasie tej wędrówki wysyła prawdopodobnie wyraźne sygnały, których celem jest informowanie matki o swej obecności w macicy. W 16-17 dniu zarodek kończy swą wędrówkę, lecz nie zagnieżdża się a dzięki napięciu ścian macicy pozostaje nieruchomo u podstawy jednego z rogów macicy.

Wybór klaczy dawczyni zarodków

Wyboru dawczyni zarodków dokonuje najczęściej właściciel klaczy, lub potencjalny nabywca zarodka. Niezależnie jednak od wartości hodowlanych i użytkowych należy również

przy wyborze dawczyni uwzględnić zdrowie i wiek klaczy. Z punktu widzenia skuteczności zabiegu, najlepiej jeżeli dawczyni jest w dobrej kondycji fizycznej i wykazuje regularne cykle rujowe.

Wybór klaczy biorczyni zarodków

Wybór zdrowej klaczy na biorczynię jest podstawowym warunkiem powodzenia transplantacji zarodków. Wybór klaczy biorczyni winien być oparty na dokładnym wywiadzie i badaniu klaczy. Klacz biorczyni nie może budzić żadnych podejrzeń zdrowotnych ze szczególnym uwzględnieniem układu rozrodczego. Z reguły dobiera się klacze biorczynie o podobnej masie ciała do klaczy dawczyni. Najczęściej wybierane są klacze w wieku 3-10 lat, które rokują, że będą dobrymi matkami. Podczas badania zwraca się szczególną uwagę na stan macicy. Napięcie ścian macicy powinno być dobrze wyczuwalne. Rogi macicy na obrazie ultrasonograficznym winny być echogeniczne, jednolite, nie wykazywać zbyt dużych różnic pomiędzy warstwą błony śluzowej i mięśniowej oraz charakteryzować się okrągłym, rurowatym kształtem. Bardzo pomocne mogą być również wyniki oceny bakteriologicznej i cytologicznej wymazów z macicy, a także wyniki histologicznej oceny biopsji błony śluzowej macicy.

Wpływ stopnia synchronizacji cyklu pomiędzy klaczami dawczyniami zarodków a biorczyniami na wyniki zażrebień

Stopień synchronizacji owulacji pomiędzy klaczami dawczyniami zarodków a biorczyniami ma istotne znaczenie dla uzyskania zadawalających wyników transplantacji zarodków. Cykl rujowy obejmuje dni, w którym klacz przejawia ruje i okres międzyrujowy. Cykl ten przeciętnie u koni trwa 21-22 dni. Jako dzień „0” przyjmuje się datę wystąpienia owulacji. Jeżeli klacz biorczyni owuluje w tym samym dniu, co klacz dawczyni stopień synchronizacji oznacza się „0”. Natomiast, gdy u klaczy biorczyni owulacja wystąpiła jeden, dwa lub trzy dni wcześniej stopień synchronizacji oznacza się +1, +2, +3. W przypadku, gdy owulacja u klaczy biorczyni wystąpiła jeden, dwa lub trzy dni później stopień synchronizacji oznacza się -1, -2, -3.

Stosując niechirurgiczny sposób transplantacji zarodków optymalnym stopniem synchronizacji jest -1 lub -2, tzn. gdy owulacja u klaczy biorczyni wystąpiła 1 do 2 dni później w stosunku do klaczy dawczyni. W przypadku większych różnicy synchronizacji cyklu pomiędzy klaczami dawczyniami a biorczyniami uzyskuje się coraz bardziej obniżone wyniki zażrebień lub następuje resorpcja zarodków do 30 dnia po owulacji.

W praktyce może się zdarzyć, że synchronizacja cyklu i owulacji klaczy dawczyni i biorczyni wystąpi spontanicznie. Niemniej, gdy dysponuje się małą liczbą zwierząt, lekarz

weterynarii może zastosować synchronizację cyklu podając w różnych kombinacjach pojedyncze lub dwukrotne zastrzyki prostaglandyny lub progestageny oraz hCG lub GnRH. W ten sposób najczęściej dla jednej klaczy dawczyni synchronizuje się dwie lub trzy klacze biorycznie.

Ośrodki transplantacji zarodków z reguły utrzymują od kilkudziesięciu do kilkuset klaczy biorczyń, u których przebieg cyklu jest systematycznie kontrolowany i w razie potrzeby wybierana jest odpowiednia klacz, której cykl jest zsynchronizowany z cyklem klaczy dawczyni. W Argentynie mniejsze ośrodki transplantacji zarodków dla 15 klaczy dawczyń utrzymują 35 klaczy biorczyń, a duże ośrodki dla 250 klaczy dawczyń utrzymują aż 700 klaczy biorczyń. Wskaźnik żrebności biorczyń w mniejszych ośrodkach często przekracza 90%, a w dużych 85%.

Metody uzyskiwania zarodków

a. Metoda chirurgiczna

Metoda chirurgiczna pozwala na uzyskanie zarodków we wczesnych stadiach rozwojowych wprost z jajowodu. Zabieg przeprowadza się po uprzednim wywołaniu głębokiej narkozy i ułożeniu klaczy w pozycji grzbietowej. Następnie przygotowuje się pole operacyjne i wykonuje laparotomie, odszukuje jajowody i poprzez płukanie jajowodu po stronie jajnika, na którym wcześniej stwierdzono owulację, wypłukuje zarodek. Ze względu na pewne ryzyko ogólnych i miejscowych powikłań pooperacyjnych metoda ta jest stosowana tylko w wyjątkowych przypadkach.

b. Metoda bezkrwawa

Metodę bezkrwawą pozyskiwania zarodków zastosowali po raz pierwszy Japończycy w 1972 r. Zasadniczą zaletą tej metody jest możliwość wielokrotnego powtarzania zabiegu bez ujemnego wpływu na dalszą płodność klaczy. Bez względu na liczbę zabiegów i pozyskanych zarodków, klacze dawczynie łatwo zażrebiają się w kolejnych cyklach, dają normalne zarodki lub donoszą ciążę rodząc zdrowe żrebięta.

Metoda ta jest stosunkowo prosta. Szyjka macicy klaczy jest krótka i znacznie łatwiej można przeprowadzić przez jej kanał cewnik do płukania macicy aniżeli np. u bydła. Zabieg uzyskiwania zarodków metodą bezkrwawą przeprowadza się najczęściej w 6-9 dniu po owulacji. Do płukania macicy stosowany jest płyn zwany Dulbecco

W handlu spotyka się gotowe zestawy płynów do wypłukiwania oraz krótkotrwałego przechowywania zarodków. Klacz przed zabiegiem wprowadzana jest do poskromu, gdzie usuwa się z jej prostnicy zalegający kał. Następnie ogon klaczy owija się czystym bandażem,

a srom i okolice dokładnie myje czystą wodą, mydłem, środkiem dezynfekcyjnym, spłukuje się kilka razy bieżącą wodą i wysusza jałowym ręcznikiem.

Płyn do macicy wprowadzany jest przy pomocy jałowego, dwudrożnego gumowego lub plastikowego cewnika długości ok. 0,8 do 1,5 m, posiadającego na końcu gumowy balonik. Cewnik wprowadzany jest do trzonu macicy na głębokość około 4-5 cm przy pomocy ręki ochronionej jałową rękawicą. Celem uszczelnienia ujścia macicy napełnia się gumowy balonik powietrzem o objętości ok. 60-80 ml. Podgrzany płyn do temperatury ciała klaczy wprowadzany jest do macicy pod niewielkim ciśnieniem. Objętość wlewanego płynu waha się od zależnie od wielkości klaczy od 500 ml do 1000 ml. Charakterystycznym objawem wypełnienia macicy jest lekki niepokój klaczy. Płyn z macicy lewarowany jest bezpośrednio do sterylnego naczynia np. o kształcie gruszki lub podłużnego cylindra (Fig. 4). Obecnie stosuje się specjalne filtry przez które przepuszczany jest płyn lewarowany z macicy, które zatrzymują zarodki i następnie ułatwiają ich odnalezienie. Po prawidłowo wykonanym zabiegu płukania winno uzyskać się od 90 do 95% klarownego i bez żadnych domieszek śluzu, nabłonka lub krwi płynu wprowadzonego do macicy. Jeżeli płyn zalega w macicy należy klaczy podać dożylnie 20 j.m. oksytocyny lub wykonać delikatny masaż macicy przez prostnicę. Zabieg płukania macicy może być powtarzany dwu lub trzykrotnie.

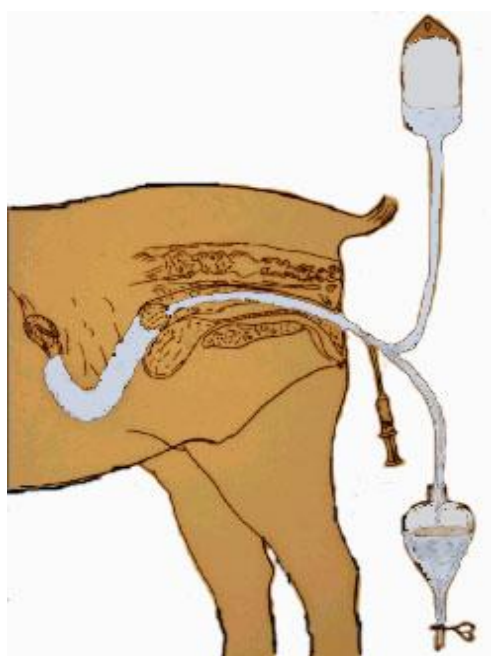


Fig. 4. Pozyskiwanie zarodków metodą bezkrwawą (Newmarket 2002)

Po zabiegu pozyskania zarodków z reguły podajemy klaczy prostaglandynę $\text{PGF}_{2\alpha}$, co stymuluje jej powrót do normalnego cyklu.

Jak odszukujemy zarodki?

Masa zarodków jest większa od ciężaru właściwego płynu używanego do płukania macicy i z reguły po 15-20 minutach opadają na dno naczynia. Jeżeli płyn jest klarowny i czysty, większe zarodki można zauważyć gołym okiem podczas ich opadania, mniejsze odszukujemy przy pomocy mikroskopu stereoskopowego. Pomieszczenie, w którym odszukujemy zarodki winno być sterylne, a temperatura powinna wynosić ok. 18-20°C. Jeżeli płyn z macicy lewarowany był do podłużnego cylindra zlewamy jego górną część przez odsysanie, a pozostałą część płynu przepuszczamy przez filtr zatrzymujący zarodek, końcową zaś partię płynu o objętości około 50 ml rozlewamy do naczynek, w których później odszykujemy zarodki. Natomiast przy posługiwaniu się naczyniem w kształcie gruszki niewielka objętość płynu jest zlewana do małych jałowych naczyń i w nich odszukuje się zarodki (Fig. 5).



Fig.5. Odszukiwanie zarodka (Newmarket 2002).

Po znalezieniu zarodka przenosimy go do pożywki Dulbecco z dodatkiem 10% surowicy płodów bydlęcych (FSC) przesączonej przez mikrofiltr (0.2 μm). Można również przenieść zarodki do pożywki transportowej tzw. holding medium, która jest udostępniana przez firmy zajmujące się produkcją sprzętu i pożywek do transplantacji zarodków. Dalszą czynnością jest oczyszczenie/przepłukiwanie zarodka kilka razy (5x). W tym celu przenosi się go do kolejnych świeżych pożywek. Podczas tych czynności należy zwrócić szczególną uwagę, aby nie dopuścić

do wtórnego zanieczyszczenia pożywki i zarodka. Następnie zarodek umieszczamy w słonce o poj. 0,5 ml. W pierwszej kolejności zasysamy pożywkę, następnie powietrze i pożywkę wraz z zarodkiem i ponownie powietrze. Jeżeli zarodki są natychmiast transplutowane umieszczamy słomkę w pistolecie transplatacyjnym. W przypadku, gdy zamierzamy przechowywać zarodki, słomka winna być oznakowana i jej drugi koniec zamknięty (Fig. 6).

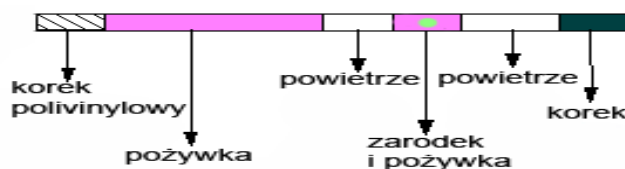


Fig. 6. Sposób umieszczenia zarodka w słonce.

Co decyduje o powodzeniu w uzyskiwaniu zarodków ?

Istnieje szereg czynników, które mają wpływ na wyniki uzyskiwania zarodków. Do najważniejszych należy:

1. Klacze. Od klaczy młodych, zdrowych, przejawiających regularne cykle procent uzyskiwanych zarodków jest prawie dwukrotnie wyższy w porównaniu do klaczy starych i jałowiejących.
2. Ogier i sposób przechowywania nasienia. Stosując krycie naturalne ogierem o sprawdzonej płodności lub inseminację nasieniem świeżym uzyskuje się znacznie większy procent zarodków w porównaniu, gdy do krycia klaczy używano ogierów o obniżonej płodności. Różnice uzyskiwanych zarodków uzależnione od ogiera używanego do krycia klaczy mogą wynosić od 36 do 72%. Stosując do inseminacji nasienie mrożone otrzymuje się również niższe wyniki w porównaniu z wynikami inseminacji nasieniem świeżym.
3. Wiek zarodków. Wyniki uzyskiwania zarodków w 7-9 dnia po owulacji są mniej więcej jednakowe i wynoszą około 60%. Natomiast w 6 dniu po owulacji uzyskuje się z reguły o połowę mniej zarodków. Mniejszą liczbę zarodków uzyskiwanych w 6 dniu po owulacji przypisuje się opóźnionemu zejściu zarodka z jajowodu lub niezbyt dokładnemu określeniu momentu owulacji. Rozwój zarodków uzyskanych w wyniku inseminacji nasieniem mrożonym jest nieco wolniejszy, dlatego od klaczy dawczyń inseminowanych nasieniem mrożonym zaleca się pozyskiwać zarodki w 8-9 dniu po owulacji.
4. Technika uzyskiwania zarodków. Niektórzy autorzy uważają, że wyniki można znacznie poprawić, jeśli płukanie macicy wykonuje się trzykrotnie. Zaleca, się aby po każdym

wprowadzeniu płynu do macicy odczekać około 3 minuty i dopiero po tym czasie lewarować płyn z macicy.

5. Wpływ sezonu. Najwięcej zarodków uzyskuje się późną wiosną, na początku lata i w jesieni.

Ocena zarodków

Ocena jakości zarodków oparta jest głównie na badaniu mikroskopowym przy użyciu różnych powiększeń. Brane są pod uwagę takie cechy jak wielkość, kształt, barwa, rozmiar przestrzeni okołoośrodkowej, ilość zdegenerowanych i zniszczonych blastomerów, a także stadia rozwojowe zarodka. Zarodki klasyfikuje się w skali 5-cio stopniowej. Zarodek sklasyfikowany jako bardzo dobry lub dobry winien być okrągły, posiadać komórki jednakowej wielkości, barwy i struktury. Zarodki zaklasyfikowane, jako słabe lub niedostateczne mogą posiadać liczne odrzucone blastomery, zdegenerowane komórki itp. Po transplantacji zarodków zaliczanych do grupy bardzo dobrych i dobrych stwierdzano ciążę u około 70% klaczy. Natomiast, gdy transplutowano zarodki, które uzyskały ocenę dostateczną lub niższą wskaźnik żrebności wynosił zaledwie 17%.

Przechowywanie zarodków

1. **Krótkotrwale przechowywanie zarodków.** Do krótkotrwałego (do 6 godz.) przechowywania zarodków w temp. 17-20°C stosuje się płyn Dulbecco i PBS z dodatkiem 10-20% surowicy płodów cielących lub pożywkę transportową „EquiPRO™ Holding Medium” produkowaną przez firmę MiniTube.
2. **Przechowywanie zarodków w obniżonej temperaturze.** Istnieje możliwość przedłużenia czasu życia zarodków do około 24 godzin podczas ich transportu w temperaturze około +5°C. Tuż przed wysłaniem zarodki należy umieścić w specjalnej pożywce Hamsa F10 z dodatkiem 10% surowicy płodów cielących i w atmosferze 5% CO₂, 5% O₂ i 90% N₂. Gdy w tych warunkach przechowywano i transportowano młodsze zarodki, których średnica nie przekraczała 0,3 mm uzyskiwano po ich transplantacji zadawalające wyniki zażrebień. Natomiast w przypadku przechowywania zarodków starszych i ich transplantacji u większości klaczy biorczyń występowała resorpcja zarodków lub zamieranie płodów we wczesnych stadiach rozwojowych.
3. **Konserwacja zarodków w ciekłym azocie.** Konserwacja zarodków koni w ciekłym azocie napotyka na wiele trudności i na świecie rodzi się niewiele żrebiąt po zamrożonych-rozmrożonych zarodkach. Zarodki koni okazały się bardziej wrażliwe na działanie niskich temperatur w porównaniu do zarodków innych gatunków zwierząt. Barierą, która utrudnia przechodzenie do wnętrza zarodka substancji dodawanych do

pożywek (krioprotektorów), które chronią komórki zarodka przed uszkodzeniami podczas zamrażania/rozmrażania jest kapsuła. Dlatego, młode 6-cio dniowe zarodki, o średnicy nie przekraczającej 0,3 mm, gdy są w stadium moruli lub wczesnej blastocysty lepiej zanoszą proces zamrażania-rozmrażania, w porównaniu do zarodków starszych.

Zależnie od używanych substancji ochraniających stosowane są 3 metody zamrażania zarodków. Proces mrożenia zarodków odbywa się etapami. Klasyczna metoda polega na dodawaniu do pożywki wzrastających stężeń glicerolu (substancja, która chroni komórki zarodka przed uszkodzeniami podczas zamrażania/rozmrażania). Gdy stężenie glicerolu osiągnie 10% zarodki umieszcza się w słomce. Schładzanie i zamrażanie zarodków przeprowadza się w specjalnej zamrażarce (freezer) z kontrolowanym komputerowo spadkiem temperatury. Rozmrażanie zarodków należy wykonać w dwu etapach. Po wyjęciu słomki z zarodkiem z ciekłego azotu przetrzymuje się ją temperaturze pokojowej przez 10-15 sek. Następnie słomkę szybko rozmraża się w łaźni wodnej przez o temp. 38°C przez 20 sek.

Metody transplantacji zarodków

Istnieją dwa sposoby wprowadzania zarodków do macicy klaczy; metoda chirurgiczna (krwawa) w linii białej lub w słaźźnie i niechirurgiczna (bezkrwawa). Metody chirurgiczne, pomimo, że są czasochłonne, kosztowne a także ryzykowne dla klaczy biorczyń, pozwalają na uzyskanie regularnych zażrebień w granicach 60-80%. Metoda bezkrwawa ze względu na charakterystyczną budowę szyjki macicznej jest łatwa do opanowania u klaczy. Jednak wyniki transplantacji zarodków tą metodą przez wiele lat były nierówne i wahały się od 12.5% do 71%. W ostatnich latach dokonano jednak wiele usprawnień, dzięki czemu uzyskuje się wyniki, które niewiele odbiegają od wyników zażrebień po transplantacji zarodków metodą chirurgiczną.

1. Metoda chirurgiczna (krwawa)

a. W linii białej.

Zabieg przeprowadzany jest podczas pełnej narkozy klaczy i ułożeniu jej w pozycji grzbietowej. Po przygotowaniu pola operacyjnego i po przecięciu ścian brzucha wprowadza się rękę do jamy brzusznej odszukując macicę. Róg macicy po stronie jajnika, na którym stwierdzono wcześniej owulację delikatnie podciąga się na zewnątrz. Następnie w miejscu gdzie nie ma widocznych naczyń krwionośnych tęym końcem igły chirurgicznej przebija się ścianę rogu macicy. W powstały otwór wprowadza się koniec pipety i deponuje zarodek w świetle rogu macicy. Otwór w ścianie macicy po wprowadzeniu zarodka z reguły bardzo szybko zasklepia się samoistnie. Mięśnie brzuszne zaszywa się kilkoma warstwami szwów i zasypuje zasypką antybiotykową. Zabieg operacyjnego

wprowadzenia zarodka w linii białej trwa przeciętnie 1.5-2 godz. Dodatkowo należy poświęcić uwagę klaczy podczas pierwszych godz. i dni po operacji, aż do całkowitego wygojenia rany (Fig. 7).

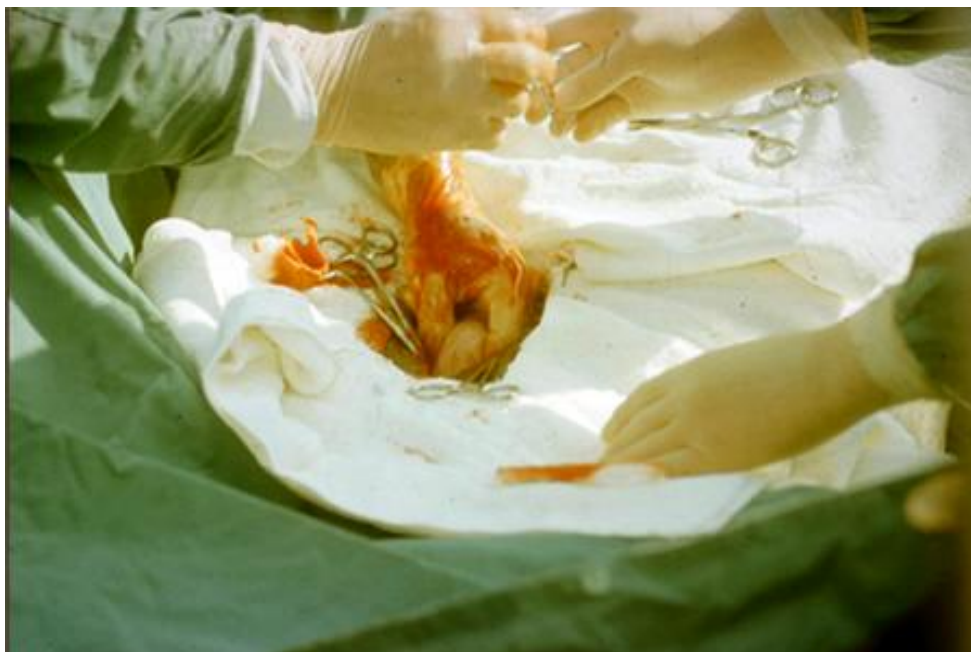


Fig. 7. Transplantacja zarodków metoda chirurgiczną w linii białej. Operator lewą ręką podtrzymuje róg macicy, ręką prawą odbiera od asystenta pipetę szklaną z zarodkiem.

b. w słabiźnie.

Metoda ta została adoptowana z praktyki transplantacji zarodków bydła. Zabieg wykonuje się w poskromie, w pozycji stojącej klaczy przy ogólnej sedacji po znieczuleniu miejscowym. Po przygotowaniu pola operacyjnego i po przecięciu ścian brzucha na długości 15-20 cm poniżej guza biodrowego w dół wprowadza się rękę do jamy brzusznej i odszukuje macicę, wysuwając jej róg lekko na zewnątrz. Zarodek deponowany jest w 1/3 dolnej długości rogu macicy podobnie jak podczas zabiegu transplantacji w linii białej. Po wprowadzeniu zarodka, mięśnie, tkanki podskórne i skórę łączy się szwem pojedynczym wg ogólnych zasad stosowanych w chirurgii (Fig. 8).

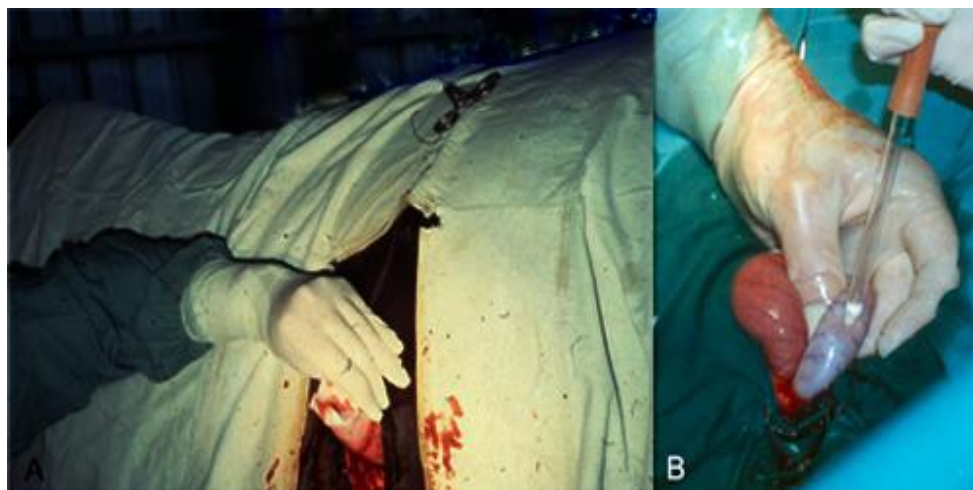


Fig.8. Chirurgiczna metoda transplantacji zarodka w słabiznie. A – wyizolowany róg macicy klaczy, B- wprowadzanie zarodka do rogu macicy.

2. Metoda niechirurgiczna (bezkrwawa)

Klacz wprowadzana jest do poskromu, ogon dokładnie owija się czystym bandażem, a okolice sromu myje mydłem i nietoksycznymi środkami odkażającym, spłukuje letnią czystą wodą i wysusza jałowymi serwetami. Do wprowadzania zarodka używane są pistolety inseminacyjne typu Cassou, podobne do tych, które stosuje się podczas inseminacji bydła nasieniem mrożonym. Po wprowadzeniu słomki z zarodkiem do pistoletu, na pistolet naciąga się jałową koszulkę plastikową, którą przerywa się później po wprowadzeniu pistoletu do trzonu macicy przez podciągnięcie jej końca zewnętrznego. Wykonujący zabieg nakłada jałową rękawicę na rękę i po lekkim rozchyleniu warg sromowych klaczy wprowadza rękę do pochwy klaczy i odszukuje szyjkę macicy i lekko rozwiera jej kanał kierując do niego koniec pistoletu, który wprowadza się powoli do trzonu lub rogu macicy. Po upewnieniu się o właściwym położeniu pistoletu wewnątrz macicy deponuje zarodek. Niekiedy celem lepszego ustalenia pipety w macicy, przed zdeponowaniem zarodka kontroluje się przez prostnicę i ustala położenie końca pistoletu w macicy lub rogu. Zabieg wprowadzania zarodka do macicy klaczy winien być przeprowadzony w sposób jałowy i szybko bez dodatkowych niepotrzebnych manipulacji w drogach rodnych klaczy (Fig. 9).

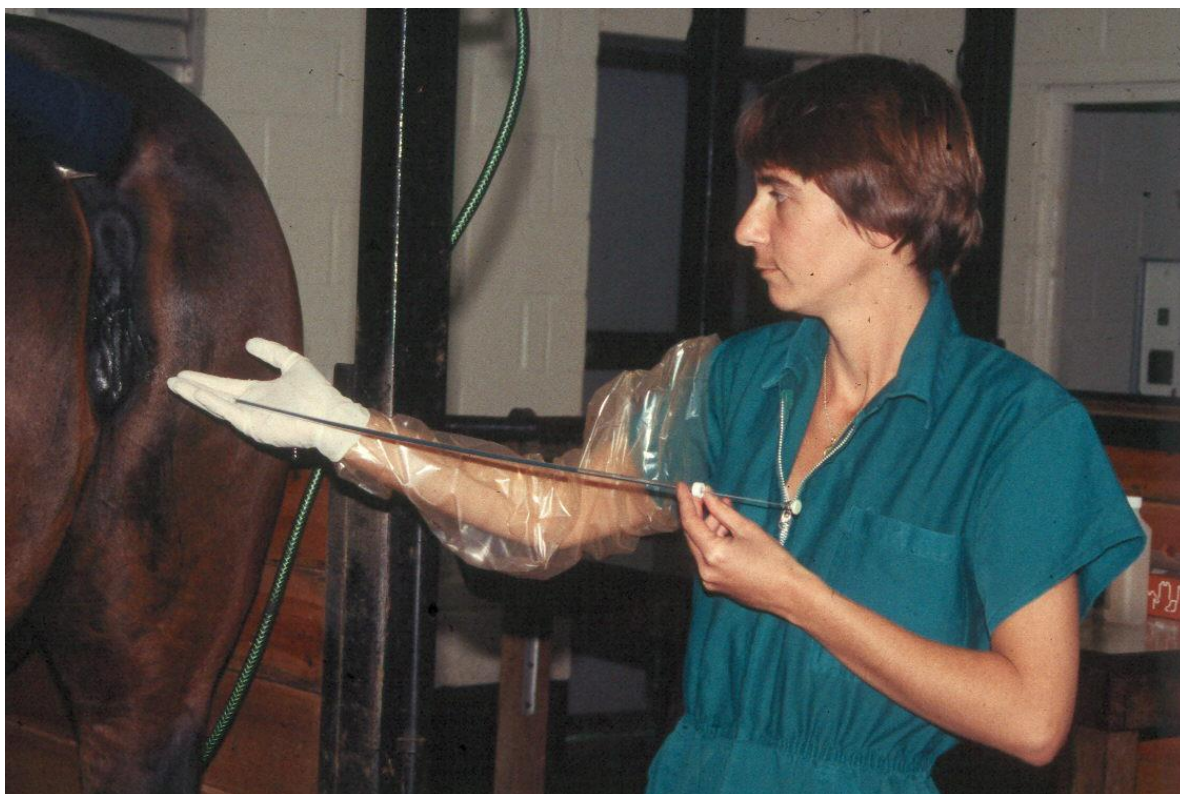


Fig. 9. Przed zdeponowaniem zarodka w macicy klaczy biorczyni (Newmarket, 2002).

Jaki jest wpływ klaczy biorczyni na źrebię urodzone po transplantacji zarodków?

Ciąża u klaczy trwa 11 miesięcy, okres oseskowy, w którym źrebię przebywa pod bezpośrednią opieką matki ok. 6 miesięcy. Jest to, zatem długi czas, w którym klacz może oddziaływać na soje potomstwo. Nic też dziwnego, że hodowcy zainteresowani transplantacją zarodków zadają coraz częściej pytania, jaki jest wpływ klaczy biorczyni na źrebię urodzone po transplantacji.

W połowie lat osiemdziesiątych przeprowadzono w Krakowie eksperyment międzyrasowej transplantacji zarodków, którego celem było określenie wpływu klaczy biorczyni na rozwój źrebiąt i ostateczną wielkość koni. Zarodki pobierano od małych klaczy rasy konik polski, o średniej masie ciała 380 kg i transplantowano je do dużych klaczy typu zimnokrwistego o masie ciała ok. 720 kg (Fig. 10).



Fig. 10. Kłacz dawczyni zarodka nr.16 rasy konik polski i kłacz biorczyni typu zimnokrwistego.

Po stwierdzeniu ciąży u klaczy biorczyń, dawczynie zarodków ponownie zażrebiano tym samym ogierem. Otrzymano w ten sposób w odstępie 1-2 miesięcy dwie pary klacek pełnych sióstr i jedną parę ogierków pełnych braci. Kilka lat później podobny eksperyment międzyrasowej transplantacji zarodków pomiędzy końmi pełnej krwi angielskiej i pony przeprowadzono Anglii.

Wyniki tych eksperymentów wykazały, że kłacz największy wpływ wywiera na swoje potomstwo w okresie ciąży. Istnieje bardzo duża zależność pomiędzy powierzchnią łożyska a ciężarem płodu, co oznacza, że im większa jest powierzchnia łożyska, tym większa będzie masa płodu i noworodka. Nieco mniejsza zależność występuje pomiędzy ciężarem matki a ciężarem płodu, niemniej i w tym przypadku zaznacza się tendencja, że im cięższa i większa jest kłacz, tym większe będzie urodzone przez nią źrebię. W okresie oseskowym i później wyraźnie zaznaczają się dziedziczne uwarunkowania intensywności wzrostu źrebiąt. Pomimo, że źrebięta urodzone po transplantacji przez duże klacze wysysały od 300 do 600 kg mleka więcej i przybyło ich w okresie oseskowym o 30-67 kg. więcej w porównaniu do źrebiąt urodzonych przez klacze konik polski to jednak tempo ich wzrostu w tym czasie było wolniejsze w stosunku do źrebiąt kontrolnych. Po odsadzeniu źrebiąt od matek, nastąpiła dalsza rekompensata wzrostu uwarunkowana cechami genetycznymi koni, jednak konie kontrolne, które urodziły się mniejsze nie nadrobiły całkowicie strat rozwojowych z okresu płodowego. Źrebięta urodzone przez duże klacze typu zimnokrwistego, w wieku dojrzałym były wyższe (o około 2-5%) i miały dłuższe kości długie kończyn w porównaniu do koni kontrolnych urodzonych przez genetyczne matki

rasy konik polski. Największe różnice zaznaczyły się w długości kości długich kończyn, które kostnieją najwcześniej tj. kości pęciny (ok. 9%) i śródreżca III (ok. 6%), (Fig. 10). Pozostałe części ciała koni nie różniły się pomiędzy osobnikami urodzonymi po transplantacji przez duże klacze a osobnikami urodzonymi przez genetyczne matki. Badania te wykazały, że niezależnie od genetycznych uwarunkowań istotny wpływ na ostateczny wzrost koni wywiera odżywianie płodu podczas ciąży oraz w mniejszym stopniu mleczność matki w okresie oseskowemu źrebiąt.

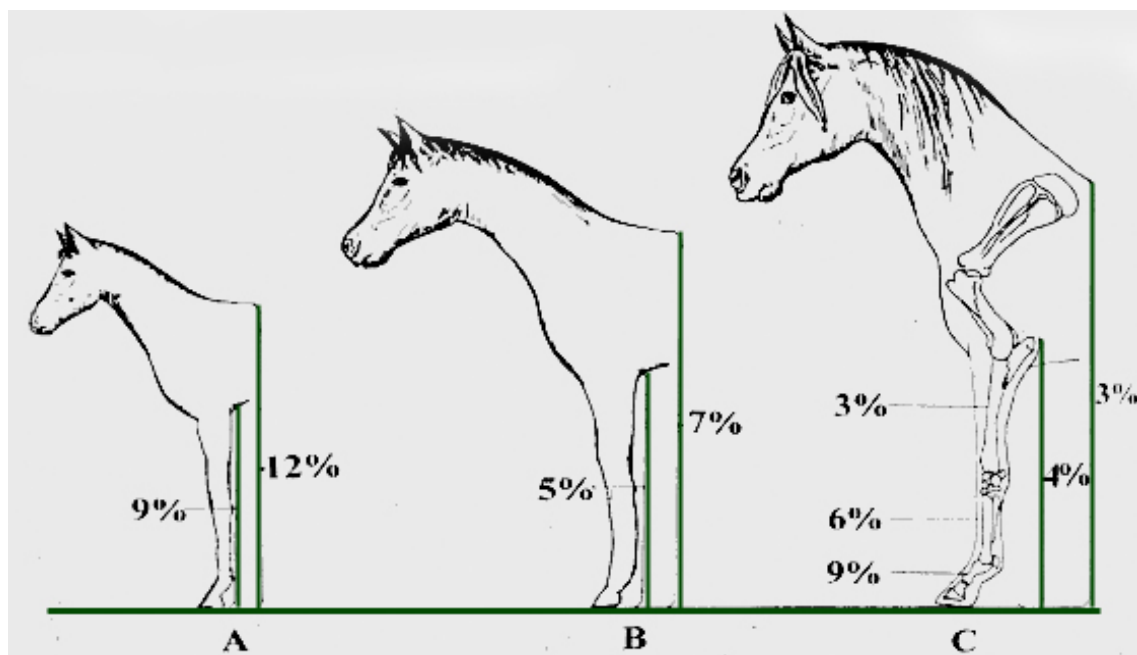


Fig. 10. Efekt matczynej dużej klaczy bioreczny zarodków na wzrost i długość kości kończyn „transplantowanych” źrebiąt rasy koniki polski. Różnice pomiędzy „transplantowanymi” a kontrolnymi źrebiętami podano w procentach. A- po urodzeniu, B – po odsadzeniu, C- w wieku dojrzałym (9 i 13 lat).

Ciekawe obserwacje wpływu klaczy bioreczny na wielkość i charakter sportowych koni gorącokrwistych przeprowadzono ostatnio w Szwajcarii i Austrii. Badano 10 reakcji emocjonalnych m.in., zdolność do przystosowania się do życia w stadzie, ogólny poziom aktywności, poziom reakcji stresowych, zdolność uczenia się, reakcje na ludzi, reakcje stereotypowe, itp. Jedynym zaobserwowanym efektem klaczy bioreczny była lepsza zdolność uczenia się do przystosowania się do życia w stadzie potomstwa uzyskanego w wyniku transplantacji zarodków. Natomiast pozostałe cechy zachowania były uwarunkowane cechami genetycznymi ojca lub genetycznej matki. Zaobserwowano również, że tej samej rasy klacze biorecznie co dawczynie nie wywierają istotnego wpływu na wielkość, budowę i charakterystyczne cechy urodzonych koni po transplantacji zarodków. Większość badanych cech u koni urodzonych po transplantacji zarodków była uzależniona od genetycznych właściwości

rodziców. Niezależnie jednak od tych obserwacji prawie 74% hodowców niemieckich, szwajcarskich i austriackich wybiera dla zarodków pozyskiwanych od klaczy sportowych klacze biorczynie gorącokrwiste.

Koszt transplantacji

Koszty transplantacji zarodków są zróżnicowane i zależą od wielu czynników. Jeżeli hodowca posiada własne klacze dawczynie i biorczynie koszty transplantacji będą uzależnione od ceny usług weterynaryjnych (badanie i synchronizacja cyklu klaczy dawczyni i biorczyń) oraz ceny usługi specjalisty wykonującego pozyskiwanie, odszukiwanie, ocenę i transplantację zarodków a także kosztów pożywek i sprzętu używanego do pozyskiwania i transplantacji zarodków. Niezależnie zatem od wyników uzyskiwania i transplantacji koszt pojedynczej próby może się wahać od 3000 do 4000 zł. Jeżeli hodowca zdecyduje się na transport klaczy do ośrodka transplantacji zarodków dodatkowo należy uwzględnić cenę transportu i utrzymania koni.

Niektóre ośrodki transplantacji zarodków podpisują ze swoimi klientami umowy, w których uwzględnia się koszt nasienia, zarodka i usługi oraz ciążę u klaczy biorczyni stwierdzaną w 16 i 40 dniu po zabiegu transplantacji. Po czym klient odbiera żrebną klacz biorczynię z ośrodka. Zależnie od wartości ogiera i klaczy dawczyni, cena takiej usługi może być bardzo wysoka i sięgać kilkudziesięciu tysięcy dolarów.