

Trębusiewicz B., Wartenberg L., Preś J. — **Stability of a fat component of a fodder concentrate „Celat” in various conditions of storage.**

It was found that a fat concentrate „Celat”, produced in Poland for caloric enrichment of concentrate revealed a remarkable stability in definite storage con-

ditions. After above 3 months storage at 20—25°C and 4°C in darkness, the indices of fat freshness pointed to very slow oxidative and hydrolytic changes of fat fraction. Storage in raised temperature and sunlight diminished stability of a fat component of concentrate. In this conditions the shield of antioxidant did not play any protective role.

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

ZDZISŁAW SMORAĞ, STEFAN WIERZBOWSKI, EDWARD WIERZCHOŚ,  
WIESŁAW KARETA, BARBARA GAJDA

### Wyniki transplantacji zamrożonych zarodków owiec

Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Instytutu Zootechniki, Balice k. Krakowa

Zamrażanie zarodków ssaków — poza ogólnobiologicznym aspektem, jakim jest możliwość okresowego zatrzymania rozwoju organizmu, a następnie przetrzymywania go w stanie zamrożonym — otwiera równocześnie możliwość znacznych uproszczeń w zakresie transplantacji. W praktyce transplantacji u bydła stosuje się przetrzymywanie zarodków w temperaturze pokojowej. W warunkach eksperymentalnych przetrzymywano zarodki owcy do 10 dni (1). Natomiast zarodki krowy przechowuje się na skalę doświadczalną przez okres około 2 dni (3, 9). Z kolei konieczność stosowania synchronizacji cyklu płciowego dawcy i biorcy stwarza szereg dodatkowych utrudnień technicznych przy bardzo ograniczonym czasie przechowywania zarodków poza organizmem. Z tego powodu badania nad przechowywaniem zarodków w stanie zamrożonym mają tak istotne znaczenie dla możliwości stosowania transplantacji w praktyce.

Pierwsze cielę po transplantacji zamrożonego zarodka urodziło się w 1973 r. (11), a kilka następnych urodziło się jedynie w Cambridge i w Australii (2, 10). Pierwsze jagnięta po transplantacji zamrożonych zarodków uzyskano także w Cambridge (7, 8), a następnie w Australii (2). Uzyskano tam również pierwsze wykoty kóz. \*)

Pierwsze transplantacje zamrożonych zarodków owcy autorzy przeprowadzili w 1975 r. Jednak po transplantacji u żadnej z 4 biorczyń, którym transplantowano 6 zarodków, ciąża się nie rozwinęła.

#### Materiał i metody

a) Przygotowanie zwierząt i uzyskanie zarodków.

Jako dawczyni zapłodnionych komórek jajowych używano owiec rasy merynos i cakiel w wieku od 3 do

7 lat. Owce były przygotowywane do superowulacji, a następnie kryte lub inseminowane trykami rasy merynos lub karakuł.

Superowulację wywoływano podając 1000 j.m. PMSC w 13 dniu cyklu. Po wystąpieniu pierwszych objawów rui podawano i. v. 1000 j.m. HCG. Równocześnie rozpoczęto krycie. Owce były kryte lub inseminowane 2—3 razy w odstępach 8—10 godzin. Zarodniki wypłukiwano pomiędzy 3 a 7 dniem. Jamy brzuszne otwierano w linii białej u zwierząt znajdujących się w stanie pełnej narkozy operacyjnej. Owce były używane 1 lub 2, a w niektórych wypadkach 3 razy. Zarodki zarówno z roku macicy jak i z jajowodu wypłukiwano kierując przepływ płynu od macicy do lejka jajowodu. Płukaniem obejmowano róg macicy od miejsca przyczepu *lig. intercornualae*. Do płukania używano około 20 ml uzupełnionego płynu Dulbecco (6) w temperaturze ok. 37°C. Od pobrania zarodków do rozpoczęcia mrożenia upływały ok. 2 godz. Był to czas potrzebny na wyszukanie, ocenę i pozostałe czynności związane z przygotowaniem do mrożenia.

b) Zamrażanie i rozmrażanie.

Metody zamrażania i rozmrażania zarodków były zbliżone do stosowanych przez Willadsena i wsp. (7, 8). Komórki jajowe po ich uzyskaniu i ocenie morfologicznej przeprowadzano przez kolejno wzrastające stężenia DMSO w uzupełnionym roztworze Dulbecco (6), 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 i 1,5 M. W każdym z wymienionych stężeń komórki jajowe były przetrzymywane przez 5 min., a w stężeniu 1,5 M pozostawały przez 20 minut. W ostatnim etapie zarodki były umieszczane w szklanych probówkach o wymiarach 0,6×5 cm zawierających ok. 0,2 ml i 1,5 M DMSO w roztworze Dulbecco. Wszystkie te czynności przeprowadzano w temp. 20—24°C. Następnie próbki z zarodkami przenoszono do lodówki o temperaturze 2—4°C na okres 10 minut, a po tym przenoszono na okres 5 min. do łaźni lodowo-wodnej. Następnie próbki przenoszono do łaźni alkoholowej o temp. —6°C. Po 2—3 minutach dokonywano posiewania kryształków lodu (5), po czym pozostawiano je w tej temperaturze na okres dalszych 5 minut. Mrożenie przeprowadzano ze stałą szybkością 0,27°C/min. do temp. —80°C. Po osiągnięciu tej temperatury próbki przekładano do ciekłego azotu, gdzie były przechowywane przez okres ok. 2 miesięcy.

Rozmrażanie przeprowadzano z szybkością 12—14°C/min. Po całkowitym rozmrożeniu, zawartość próbek przenoszono na szkiełka zegarkowe, gdzie wyszukiwano a następnie przeprowadzano ocenę morfologiczną zarodków. Czynności te pochłaniały zazwyczaj

\*) Szczegółowy przegląd piśmiennictwa obejmującego badania z tego zakresu został opublikowany w *Medycynie Wet.* 32, 210, 1976.

ok. 10 minut. Następnie przeprowadzano zarodki przez analogiczne stężenia DMSO jak przed mrożeniem ale w odwrotnej kolejności. W każdym ze stężeń zarodki przetrzymywano przez 10 minut. Czynności te również były przeprowadzane w temperaturze pokojowej. Transplantacja zarodków następowała w przedziale 1 godziny od momentu rozmrożenia.

#### c) Transplantacja.

Zarodki były transplantowane maciorkom znajdującym się w naturalnym cyklu płciowym w dniu odpowiadającym wiekowi transplantowanego zarodka lub dzień wcześniej. Operacje przeprowadzano w analogiczny sposób jak przy uzyskiwaniu zarodków. Komórki jajowe w zależności od stadium rozwoju były wprowadzane do jajowodu (8—16 blastometrów) lub do macicy (morule i wczesne blastocysty). Wprowadzenia zarodków dokonywano przy pomocy szklanej pipety po uprzednim przebicciu ściany macicy metalową igłą. Większości bioreczni transplantowano po 2 zarodki. Były one umieszczane w jednym lub obydwu rogach (tab. 2).

Na 8 bioreczni, którym transplantowano 15 morul i wczesnych blastocyst, 3 zostały ciężarne, jedna weszła w ruję po trzech miesiącach, a cztery wykazały ruję w regularnych odstępach. Dwie z ciężarnych maciorek urodziły po 2 jagnięta a trzecia jedno jagnię. Wszystkie porody odbyły się w terminie.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość konserwacji w stanie zamrożonym 6 i 7 dniowych zarodków owcy. Natomiast brak pozytywnych rezultatów zamrażania 3-dniowych zarodków świadczy, że stosowana metoda nie jest odpowiednia dla zamrażania komórki jajowej owcy znajdującej się we wczesnym stadium rozwojowym. Nie zmieniony wygląd morfologiczny większości komórek jajowych stadium 8—16 blastomerów wskazywałby, że proces zamraża-

Tab. 1. Stan morfologiczny zarodków owcy po rozmrożeniu

Stadium rozwoju zarodka	Liczba komórek jajowych		Ocena morfologiczna po rozmrożeniu	
	zamrożonych	rozmrożonych	morfologicznie normalne	częściowo uszkodzone
8—16 blastomerów	9	8	7	1
Morula i wczesne blastocysty	22	20	19	1

### Wyniki i omówienie

Ogółem zamrożono 31 zarodków, z czego rozmrożono 28 (tab. 1). Na 8 rozmrożonych zarodków znajdujących się w stadium 8—16 blastomerów w ocenie morfologicznej stwierdzono częściowe uszkodzenie jednego zarodka. Również na 20 rozmrożonych morul i wczesnych blastocyst zmiany morfologiczne stwierdzono tylko w jednym przypadku.

W żadnym z rozmrożonych zarodków, niezależnie od stadium rozwoju, nie stwierdzono uszkodzenia *zona pellucida*.

Z 4 bioreczni, którym transplantowano 6 zarodków w stadium 8—16 blastomerów, żadna nie była ciężarna. Wszystkie maciorki weszły w następną ruję w regularnych odstępach.

nia i rozmrażania nie wywiera na nie negatywnego wpływu, a zmiany prowadzące do utraty zdolności rozwojowych *in vivo* mogły nastąpić w okresie poprzedzającym zamrażanie lub też po rozmrożeniu. Wiadomo bowiem, że zarodki owcy w tym stadium rozwoju są wrażliwsze na schładzanie do temperatury 0°C (7).

Zarodki 6—7 dniowe są mniej wrażliwe na zmiany związane ze schładzaniem. Jednakże i w tym wypadku skuteczność transplantacji wynosiła 50% \*) mimo, że wszystkie transplantowane zarodki posiadały nie zmieniony wygląd morfologiczny. Można by i w tym przypadku przypuszczać, że utrata zdolności rozwojowych części zarodków tego stadium jest związana z

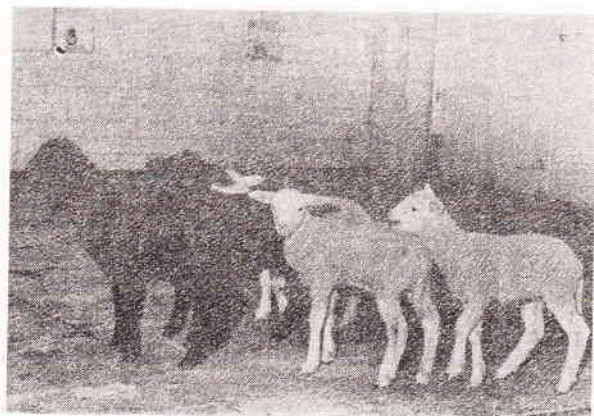
\*) Zakładamy, że maciorka, która wykazała ruję po 3 miesiącach była kotna ale nastąpiło obumarcie płodu.

Tab. 2. Wyniki transplantacji zamrożonych morul i wczesnych blastocyst u owiec

Liczba ciałek żółtych u bioreczni		Liczba transplantowanych zarodków		Rasa bioreczni	Termin transplantacji	Wyniki
lewy	jajnik prawy	po stronie lewej	po stronie prawej			
2	0	2	0	merynos	wrzesień	Ruja po upływie ponad 3 mies.
0	1	0	2	merynos	wrzesień	Poród w terminie, 2 ♀♀
2	0	1	1	merynos	wrzesień	Poród w terminie, 1 ♀ + 1 ♂
2	0	2	0	merynos	wrzesień	Poród w terminie, 1 ♀
1	0	1	0	cakiel	grudzień	Wejście w ruję w regularnym odstępie czasu
1	0	1	1	merynos	listopad	Wejście w ruję w regularnym odstępie czasu
1	1	1	1	merynos	grudzień	Wejście w ruję w regularnym odstępie czasu
0	1	0	2	merynos	listopad	Wejście w ruję w regularnym odstępie czasu

warunkami poprzedzającymi zamrażanie lub też po rozmrożeniu.

Pewien wpływ na wyniki transplantacji mogły mieć czynniki nie związane z zamrażaniem zarodków, a mianowicie okres sezonu, w którym przeprowadzano transplantację. Wszystkie nieskuteczne transplantacje zarodków 6 i 7 dniowych miały bowiem miejsce pod koniec sezonu rozplodowego owiec rasy merynos (tab. 2).



Ryc. 1. Grupa jagniąt urodzonych w styczniu—lutym 1977 r. po transplantacji zamrożonych zarodków

Foto.: A. Turczański

Wejście 1 owcy w ruję po 3 miesiącach od momentu transplantacji wskazywałoby na obumarciu płodu w drugiej połowie ciąży. Trudno jednak sądzić, czy to może mieć związek z faktem, że transplantomano zamrożone zarodki.

Wyniki tej pracy oraz rezultaty uzyskane przez Willadsena i wsp. (7, 8) pozwalają na stwierdzenie, że obecnie stosowana metoda zamrażania 6 i 7 dniowych zarodków owcy pozwala na osiągnięcie skuteczności transplantacji w granicach 50%.

#### Piśmiennictwo

1. Kardymowicz O.: Proc. VIIIth Inter. Congr. Anim. Reprod. Monachium 1, 499, 1972.
2. Moore N. W., Bilton R. J.: Proc. VIIIth Inter. Congr. Anim. Reprod. Kraków 3, 306, 1976.
3. Renard J. P., du Mesnil du Buisson F.: Proc. VIIIth Inter. Congr. Anim. Reprod. Kraków 3, 309, 1976.
4. Smorąg Z.: Medycyna Wet. 32, 210, 1976.
5. Smorąg Z., Kątska L., Wierzbowski S.: Roczniki Nauk Zoot. 3, 21, 1976.
6. Whittingham D. G.: Nature 233, 125, 1971.
7. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A., Moor R. M.: J. Reprod. Fert. 46, 151, 1975.
8. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A., Moor R. M.: Society for Cryobiology 11 annual meeting. London 1974.
9. Willadsen S. M., Trounson A. O., Rowson L. E. A., Polge C., Newcomb R.: Proc. VIIIth Inter. Congr. Anim. Reprod. Kraków 3, 329, 1976.
10. Willadsen S. M., Trounson A. O., Polge C., Rowson L. E. A., Newcomb R.: w Egg transfer in cattle. Agricultural Research Seminary 117, 1976.
11. Wilmut I., Rowson L. E. A.: Vet. Rec. 92, 686, 1973.

Adres autora: mgr Zdzisław Smorąg, 32-083 Balice 1, k. Krakowa.

**ILTIS J. P., DANIELS B. S., WYAND D. S.:** Wykazanie udziału adenowirusów płasich w etiologii choroby marmurkowej śledziony. (Demonstration of an avian adenovirus as the causative agent of marbled spleen disease). Amer. J. vet. Res. 38, 95—100, 1977 (1).

Wirus choroby marmurkowej śledziony wyizolowano ze śledziony chorych indyków i oczyszczono na drodze ekstrahowania chloroformem lub czterochlorkiem węgla, różnicowego wirowania w gradiencie chlorku cezu. U indyków zakażonych na drodze doświadczalnej oczyszczonym wirusem wystąpiły typowe dla tej choroby objawy i makroskopowe oraz mikroskopowe zmiany. Polegały one na obrzuku śledziony i rozplemie komórek siateczki limfatycznej. W śledzionie występował również specyficzny antygen wirusowy wykrywalny w odczynie precypitacji dyfuzyjnej w żelu agarowym. W preparatach histologicznych śledziony występowały specyficzne wtęty wirusowe. Występowanie hiperplazji komórek siateczki limfatycznej śledziony można uznać za zmianę patognomoniczną dla choroby marmurkowej śledziony. Metodą immunofluorescencji bezpośredniej wykazano przy tym specyficzną immunofluorescencję jąder komórek śledziony.

G.

**KUTTLER K. L., ADAMS L. G., TODOROVIC R. A.:** Porównanie odczynu wiązania dopełniacza i odczynu immunofluorescencji pośredniej w wykrywaniu babeszjozy u bydła. (Comparisons of the complement fixation and indirect fluorescent antibody reaction in the detection of bovine babesiosis). Amer. J. vet. Res. 38, 153—156, 1977 (1).

Antygeny do odczynu wiązania dopełniacza (OWD) i odczynu immunofluorescencji pośredniej (IFA) przygotowano ze szczepów Babesia bigemina izolowanych od chorego bydła. Badania porównawcze nad przydatnością obydwu odczynów w rozpoznawaniu babeszjozy wykonano z surowicami krów w wieku ponad 5 lat, za-

każonych sztucznie. Miano surowicy w odczynie wiązania dopełniacza 1 : 5 i w IFA 1 : 40 przyjmowano za dodatnie. Obydwa testy umożliwiają wykrycie swoistych przeciwciał u zakażonego bydła w okresie pierwszych 87 dni po zakażeniu. W tym okresie 95% próbek surowicy reagowało dodatnio w OWD i 100% w IFA. Między 87—175 dniem po zakażeniu 40% surowic badanych reagowało dodatnio w OWD i 95% w IFA. Utrzymywanie się wysokiego miana przeciwciał w odczynie IFA po 87 dni od zakażenia wskazuje na udział w tym odczynie bardziej stabilnych przeciwciał aniżeli w odczynie OWD.

G.

**HOLLEY D. C., EVANS J. W.:** Określanie poziomu wapnia całkowitego i ultraprzesączalnego i magnezu w surowicy zdrowych koni. (Determination of total and ultrafilterable calcium and magnesium in normal equine serum). Amer. J. vet. Res. 38, 259—262, 1977 (2).

Wapń i magnez występują w surowicy zwierząt w trzech zasadniczych formach: zjonizowanej, związanej z białkami surowicy oraz pod postacią kompleksów lub chelatów z niektórymi składnikami surowicy np. cytrynianami, fosforanami i dwuwęglanem. Autorzy oznaczyli ultraprzesączalną frakcję (forma zjonizowana, kompleksowa i chelatowa) oraz frakcję związaną z białkami surowicy wapnia i magnezu w surowicy koni i szetlandzkich kucyków oraz u kłaczy w okresie ciąży i okresie międzyciążowym. Badane parametry w surowicy ogierów i kłaczy ciężarnych nie wykazywały statystycznie znamiennych różnic. Ultraprzesączalny wapń wynosił u koni  $63,4 \pm 1,7\%$ , u kucyków  $64,8 \pm 2,2\%$  wapnia całkowitego. Utraprzesączalny magnez wynosił u koni  $75,6 \pm 1,5\%$ , u kucyków  $77,0 \pm 1,7\%$  magnezu całkowitego. Całkowita zawartość wapnia w surowicy koni wynosiła  $12,56 \pm 0,26$  mg/dl, u kucyków  $12,43 \pm 0,32$  mg/dl, magnezu odpowiednio  $2,18 \pm 0,29$  mg/dl i  $2,49 \pm 0,6$  mg/dl.

G.