

# MEDYCYNA WETERYNARYJNA

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POŚWIĘCONE NAUCE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ  
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

## REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,  
prof. dr Abdon STRYSZAK, prof. dr Stanisław WOŁOSZYN

Sekretarz naukowy: dr Elżbieta PEŁCZYŃSKA

## RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr Stanisław CAKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Lech JAŚKOWSKI, plk. doc. dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, doc. dr Władysław LUTYŃSKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO, prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

STEFAN WIERZBOWSKI, ZDZISŁAW SMORAĞ, EDWARD WIERZCHOŚ

### Transplantacja zarodków u bydła; obecny stan i możliwości metody

Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Szucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki, Balice k. Krakowa

W badaniach nad rozrodem zwierząt nastąpił w ciągu ostatnich lat wyraźny wzrost zainteresowania samicą. Wydaje się to wynikać z kilku okoliczności. Do zasadniczych można zaliczyć zmieniające się warunki utrzymania zwierząt, które niejako zmuszają do kierowania rozrodem, aby utrzymać odpowiednią wydajność rozrodczą samic przy zwiększającym się dystansie między obsługującym a zwierzęciem. Przykładem są tu wszystkie poczynania z zakresu synchronizacji rui, synchronizacji rui i owulacji, wywoływania rui poza sezonem rozplodowym i kierowania terminem porodu.

Innym kierunkiem prowadzącym w założeniu do zwiększania wydajności reprodukcyjnej samic jest transplantacja zarodków. Jakkolwiek, jak podaje Betteridge (3), jest to metoda podejmowana w skali laboratoryjnej już od 1890 r., której pionierem był Heape z Cambridge, zastosowanie w praktyce znalazła dopiero w ostatnich latach. Bodźcem stało się stwierdzenie w Anglii, a potem w USA lepszych przyrostów u niektórych ras bydła mięsnego, głównie fran-

cuskich i włoskich w stosunku do hodowanych tam tradycyjnie mięsnych ras pochodzenia angielskiego. Stwierdzenie to wywołało ogromne zainteresowanie i modę na „egzotyczne” rasy, jak je w krajach anglosaskich nazywano. Skutkiem jednak obowiązujących przepisów weterynaryjnych, które ze względów prewencyjnych ograniczają możliwość importu żywych zwierząt, sięgnięto do transplantacji, jako metody szybkiej multiplikacji tych nielicznych posiadanych już stad modnych ras. Podstawą uzasadniającą posłużenie się tą metodą było uzyskanie w doświadczeniu przeprowadzonym w 1969 r. w Cambridge przez Rowsona i wsp. (8) 65% cielności po transplantacji przeprowadzonej u 20 jałówek.

Tutaj dla porządku można zaznaczyć, że jak się wydaje, pierwsza udana transplantacja zarodka bydłęcego była przeprowadzona w 1951 r. w USA przez Willeta i wsp. (19).

W latach 1974—1975 praktykowało w USA ok. 20 zespołów lekarzy nastawionych na transplantację zarodków u bydła, 3 w Australii, 6 w

Nowej Zelandii, 8 w Anglii, 2 w Irlandii i kilka w Kanadzie. Doszło nawet do utworzenia Międzynarodowego Towarzystwa Transplantacji Zarodków. Uzyskanie cielnej krwi po transplantacji było jednak dosyć kosztowne. W USA wynosiło ok. 3000 dol., a w Anglii ok. 2100 funtów. Mimo tak wysokich kosztów, transplantowano zarodki co najmniej 5—10 tysiącom biorczyń. Możliwy jest jedynie tak gruby szacunek, bowiem zespoły działające na zasadach komercyjnych, w większości nie publikowały swoich danych statystycznych ani wyników. Jednym z niewielu, które podawały swoje wyniki jest kanadyjski zespół Alberta Livestock Transplants. Otóż według Church i Shea (2) skuteczność wykonywanych TPT\*) przez ten zespół wzrosła z 40% w 1971 do 70% w 1975 r. Od jednej dawczyni uzyskiwano średnio 4,4 cielęta. Rekordowy przypadek zespół miał w 1974 r., gdy od jednej dawczyni uzyskano 32 cielęta urodzone po TPT.

W 1976 r. zaznaczył się już wyraźny spadek zainteresowania, gdyż okazało się, że w szerszej praktyce nie jest to jeszcze ani taka łatwa, ani skuteczna metoda, jak się w początkowym okresie wydawało, a przy tym jeszcze bardzo kosztowna. Zmniejszyło się też, względnie zostało zaspokojone zainteresowanie hodowców nowymi rasami. W rezultacie pozostały tylko pojedyncze zespoły nastawione na stosowanie TPT, natomiast metoda, jej elementy i możliwości w coraz szerszym zakresie absorbują zakłady naukowe. Za niewątpliwą korzyść poczyniła z lat 1974—1975 należy uważać sprawdzenie TPT w szerokiej praktyce. Pozwoliło to bowiem na wyraźne wyeksponowanie jej obecnych słabych stron i odpowiednie ukierunkowanie prac badawczych.

#### Wyda j no ś ć d a w c z y ń

Rozważania na temat transplantacji zarodków, wydaje się, należy zacząć od określenia wydajności dawcy. Dysponowanie odpowiednią ilością zarodków decyduje bowiem o wszelkich pracach zarówno w skali badawczej, jak i stosowanej. Tak więc należy rozpocząć od oceny wyników superowulacji. Na obecnym etapie doświadczeń i praktyki wywoływania superowulacji, wydaje się, że najskuteczniejsze jest podawanie PMSG w połowie fazy lutealnej czyli między 8 a 12 dniem cyklu (dzień 0 = pierwszy dzień rui) w kombinacji z prostaglandyną (PG) lub jej analogami podawanymi 48 h później. Dawki PMSG wahają się najczęściej w granicach 1500 do 3000 j. zwykle w małej ilości płynu podawane domięśniowo. PG podaje się najczęściej w ilości 500—1000 µg również i.m. Nadal też szeroko stosuje się, i z dobrymi skutkami, podawanie tylko PMSG najczęściej w 16 dniu cyklu.

\*) transplantacja w umownym skrócie.

Opierając się na danych, jakie zestawili Beteridge (3), a obejmujących wyniki prac różnych ośrodków w latach 1974—1977 można wyliczyć, że rezultatem superowulacji przeprowadzonej u 1779 zwierząt było uzyskanie średnio 11,7 owulacji od sztuki. Poszczególne autorzy otrzymywali od 3,5 do 18,5 owulacji średnio od zwierzęcia. Liczba zarodków wypłukanych i ocenionych jako normalne była oczywiście znacznie niższa i wynosiła ok. 4,5 od zwierzęcia. Tutaj znowu różnice były bardzo znaczne, bo wynosiły od 2 do 9,6 zarodków od dawcy. Są to wyniki oparte na chirurgicznych metodach pozyskiwania, a częściowo również poubojowych.

Stosowana w naszym Zakładzie metoda wywoływania superowulacji polega na podaniu 2000 j. PMSG (Serogonadotropina, Biowet, Drwalew) w 9—10 dniu cyklu. (1000 i.m. a 1000 j. i.v.). Po 48 godzinach podawano Prostin (Upjohn) 25 mg lub Estrumate (ICI) 0,5 mg. Estrumate podawano 2/3 dawki po 40 godzinach a pozostałą 1/3 po kolejnych 8 godzinach. Wszystkie przygotowywane w ten sposób zwierzęta zareagowały dodatnio. Średnia ilość owulacji wynosiła 12,1 z wahaniami od 3 do 32. Od jednej dawczyni uzyskiwano średnio 6,2 (1—26) zarodków ocenianych jako normalne (Wierzbowski i wsp., w przygot. do druku).

Pewien wpływ na wartość zwierzęcia jako dawcy wydaje się wywierać wiek i rasa. Pogląd, że krowy reagują na pobudzenie znacznie mniej regularnie od jałówek jest przytaczany stosunkowo często i potwierdza się również w naszych obserwacjach. Również i czynniki rasowe wydają się odgrywać pewną rolę. Zwierzęta rasy ncb wydają się być mniej podatne na superowulację w porównaniu z Charolaise, Hereford, rasą cp czy też różnymi krzyżówkami.

Znamienna jest stosunkowo znaczna różnica między liczbą owulacji a ilością uzyskiwanych zarodków. Średnio uzyskuje się 60% zarodków, które, biorąc pod uwagę liczbę stwierdzonych owulacji (na podstawie stwierdzonych ciałek żółtych), mogłyby być do uzyskania. Otwiera to pole dla różnych kalkulacji. Zachęcającą hipotezą może być domniemanie, że na skutek bardzo znacznego powiększenia jajnika, do jakiego dochodzi w czasie superowulacji, nie wszystkie komórki jajowe zostają wychwyteane przez bursa ovarica i część ich wpada do jamy brzusznej.

Wydaje się też, że prowokowanie superowulacji może również zaburzać mechanizm transportu jaj przez jajowód. Objawia się to czasem w występowaniu sporego odsetka nie zapłodnionych komórek jajowych, a także niekiedy wypłukiwaniem z macicy równocześnie z niezapłodnionymi komórkami jajowymi, zarodków znajdujących się w różnych stadiach rozwoju.

Metodykę przygotowywania zwierząt do superowulacji w jej obecnej postaci można oceniać jako stosunkowo prostą i łatwą, przy czym istotne znaczenie posiada precyzyjna kontrola cyklu płciowego. Uzyskiwane ilości zarodków

są jednak jeszcze zbyt małe jak na ewentualne potrzeby stosowania TPT w szerokiej praktyce.

Wydaje się też, że z powyższego przeglądu można wyciągnąć konkluzję o konieczności rozwijania badań z zakresu endokrynologii owulacji i superowulacji, a także fizjologii jajowodów jako drogi do zwiększenia ilości zarodków możliwych do uzyskania. Również hodowla oocytów musi być brana pod uwagę jako droga do uzyskiwania komórek jajowych.

#### Uzyskiwanie zarodków

Uzyskiwanie zarodków jest kolejnym kluczowym elementem praktycznego stosowania TPT. Metoda chirurgiczna była podstawową, a w skali praktycznej dotychczas wyłączną metodą uzyskiwania zarodków. Najpowszechniej stosowane jest postępowanie opisane przez Rowsona i wsp. (8) z późniejszymi drobnymi modyfikacjami. Praktyka stosowana w naszym Zakładzie wyglądała następująco.

Po przeglądzeniu i nie pojeniu w ciągu co najmniej 24 godz. (lepiej 48 h do 72 h) zwierzę było kładzione w pozycji grzbietowej. Podawano pełną narkozę chirurgiczną. Dogodniejsza, ze względów technicznych, od halotanowej okazała się narkoza uzyskiwana przy dożylnym podawaniu barbituranów (Thiopental, Vetbutal, Eunarcon) po uprzednim premedykowaniu zwierzęcia.

Jamę brzuszną otwierano w linii białej cięciem długości ok. 15 cm. U krów dochodzono do wymienia, a u jałówek dogodniejsze było poprowadzenie cięcia do wysokości pierwszej pary strzyków. Ułatwiało to dostęp do macicy, która u jałówek jest jeszcze na krótkich wiązadłach. Z kolei macicę podciągano do góry i podwiązywano na wys. trzonu do metalowego pręta wspartego poprzecznie na brzegach rany operacyjnej.

Wychodząc z założenia, że w 7—8 dniu normalnie rozwijające się zarodki znajdują się już w macicy, płukano tylko rogi macicy. Na wysokości przyczepu wiązadła międzyroznego, wprowadzano rurkę szklaną długości ok. 7 cm z wywinętymi brzegami do średnicy 13 mm. Na drugi koniec rurki nasadzony był wężyk gumowy. Kołnierz rurki był uszczelniany przez obcisnięcie ściany rogu klemą jelitową zakładaną z zewnątrz na tej samej wysokości. Następnie ostrą igłą wkłuwano się do rogu macicy na granicy przejścia jajowodu w róg macicy. Do płukania każdego rogu używano ok. 50—60 ml uzupełnionego płynu Dulbecco o temp. 35—37°C. Przepływ płynu kierowano od końca rogu do trzonu. Stosując opisany sposób postępowania, uzyskano średnio od jałówki 7,4 zarodków i nie zapłodnionych jaj, co stanowiło ok. 60,7 stwierdzonych owulacji. Otrzewną i rozściętno szyto następnie katgutem nr 4 lub 5. Jeżeli występowała grubsza warstwa tkanki tłuszczowej pod skórę, szyto ją oddzielnie, również katgutem, szwem ciągłym. Jeżeli postępo-

wanie operacyjne naruszało gruczoł mleczny szyto go również katgutem. Skórę szyto szwem pojedynczym węzełkowym używając nici styłońowej monofil lub plecionki nr 4. Przestrzegając możliwie starannie aseptyki całego postępowania, ale bez stosowania osłony antybiotykami, rejestrowano ok. 20% raczej niewielkich komplikacji w gojeniu się rany (Wierzchoś i wsp. — w opracowaniu).

Niewątpliwą zaletą metody chirurgicznej jest to, że wypłukiwanie zarodków odbywa się pod kontrolą wzroku, a cały narząd jest dogodnie dostępny. Jest to też dotychczas najbardziej wydajna metoda. Wadą jest tworzenie się zrostów, co jest prawie nieuniknione i możliwość używania tej samej dawczyni nie więcej jak 2—3 razy. Odnośnie dalszej przydatności rozplodowej dawczyń mało jest informacji. Co prawda Betteridge (3) przytacza dane z prac w Colorado State University, z których wynika, że 78 do 89% dawczyń się zacięła, ale było to rozpoznanie po 3 miesiącach od inseminacji, a wydaje się, że interesujące mogłoby być rozpoznanie dot. przebiegu późniejszych ciąży i porodów. Takich informacji nie spotkano jeszcze. Jest to też metoda dosyć kosztowna i wymagająca zespołu przygotowanych ludzi.

Niewątpliwie rozwiązaniem prostszym, a według jego autora również wysoce skutecznym, jest postępowanie opracowane przez Holy'ego (4). Operację przeprowadza się na zwierzęciu stojącym. Wejście do jamy brzusznej cięciem w lewym lub prawym dole głodowym, skośnie mniej więcej na linii biegnącej od łokcia do *tuber coxae*. Następnie jedna ręka ustala macicę, a druga wkłwa igłę możliwie blisko końca rogu. Przez tę igłę skierowuje się prąd cieczy płuczającej w kierunku trzonu. Odpływ cieczy odbywa się przez cewnik wprowadzony do rogu z zewnątrz przez szyjkę. Holy stwierdza, że postępując w ten sposób, uzyskiwano stosunkowo bardzo dobre rezultaty.

Odmienny sposób postępowania został przyjęty w ośrodku badań nad rozrodem zwierząt Akademii Nauk Rolniczych NRD w Dummerstorfie. Mianowicie, mając możliwości korzystania z ogromnej ilości materiału opasowego, pobiera się całą macicę wraz z jajnikami i wypłukuje zarodki z amputowanego narządu. Operację przeprowadza się na stojącym zwierzęciu, wchodząc do jamy brzusznej przez podłużne cięcie w *fornix dors. vaginae*. Oczywiście jest to metoda dobra tylko w odniesieniu do materiału rzeźnego.

Wszystkie dotychczas opisane sposoby postępowania wymagają wkroczenia chirurgicznego. Wiąże się to z dysponowaniem zespołem operacyjnym i kosztami. Dawcę używa się w najlepszym razie 2—3 razy, a ryzyko komplikacji pooperacyjnych rzutujących na późniejszą płodność zwierzęcia jest w pewnym procencie wypadków nieuniknione. Podstawową zaletą metody jest wysoki stopień niezawodności.

Zasadniczym udogodnieniem, decydującym o dalszym rozwoju badań nad zarodkami bydła i stosowaniu TPT w praktyce, będzie opanowanie bezkrwawej metody uzyskiwania zarodków. Wydaje się, że będą tu decydowały dwa elementy, a mianowicie instrument i umiejętność posługiwania się nim. Od czasu jako Rowson i Dowling (7) skontrolowali pierwszy kateter do tego celu, powstało szereg rozwiązań i modyfikacji, dzięki którym zaczęto w latach 1976—1977 uzyskiwać wydajność odpowiadającą otrzymywanej metodami chirurgicznymi. Przedtem jednak był długi okres niepowodzeń i dopiero wyniki jakie podał Sugie i wsp. (12) wskazały na praktyczne możliwości tej metody.

Koncepcja postępowania polega na wprowadzeniu katetera do macicy, uszczelnieniu końca w rogu macicy a następnie płukaniu. Postępowanie powtarza się kolejno w obu rogach.

Wspólną cechą wszystkich rozwiązań jest uszczelnianie końca katetera w rogu macicy. Uzyskuje się to przez wdmuchiwanie do kołnierza gumowego opasującego koniec katetera ok. 10—20 cm<sup>3</sup> powietrza. Ręka operatora znajdująca się w prostnicy kontroluje stopień wypełnienia kołnierza. Następnym wskaźnikiem jest unieruchomienie katetera w określonej pozycji. Technika płukania wiąże się z konstrukcją katetera. W kateterach 2 przewodowych (jeden przewód do nadmuchiwania kołnierza, drugi służący dla przepływu cieczy) wprowadza się jednorazowo 20—50 ml płynu i następnie ściąga go strzykawką. Zabieg powtarza się szereg razy, używając nawet kilkuset ml płynu (300—500 ml).

Najlepsze wyniki przy użyciu takiego sposobu uzyskał Ayalon i wsp. (1), gdyż odzysk płynu wynosił 96% a zarodki uzyskano od 57% krów poddawanych płukaniu. Używany kateter był sporządzony ze zwykłej plastikowej pipety inseminacyjnej, do której przyklejono lateksowy kołnierz.

Przy kateterach trójprzewodowych (jeden do nadmuchiwania uszczelniającego kołnierza, drugi do wprowadzania a trzeci do odprowadzania płynu), występują pewne drobne różnice pomiędzy poszczególnymi modelami. Jeden z przewodów może być wysuwany głębiej, tak aby dochodził prawie do samego końca rogu. Przepływ cieczy może być kierowany do końca rogu, względnie od końca rogu do trzonu. Najczęściej instrumenty te są oparte na kateterach Foley'a uzupełnianych giętym metalowym przewodem centralnym i ewentualnie rurką usztywniającą. Trudności konstrukcyjne wynikają ze stawianych założeń. Muszą to być przyrządy dostatecznie sztywne, aby można było je przeprowadzać przez szyjkę maciczną. Równocześnie nie mogą być zbyt grube, żeby mogły być również używane u jałówek, względnie muszą być odrębne modele dla jałówek. Przewód środkowy winien być wysuwalny możliwie daleko do końca rogu. Równocześnie nie może być sztywny, aby nie uszkadzał endometrium.

Przy tego typu kateterach przepływ cieczy odbywa się w sposób ciągły. Z naczynia umieszczonego ok. 1 m powyżej poziomu macicy, płyn spływa do macicy jednym przewodem, a wypływa drugim do naczynia umieszczonego na podłodze. Używa się stosunkowo znacznych ilości płynu, bo 500—800 ml na jeden róg, a nawet więcej. Na przykład Sugie i wsp. (13) używali nawet 2000—3000 ml płynu. Zabieg wykonuje się w znieczuleniu epiduralnym. Podczas całego postępowania, operator stara się ułatwić przebieg płukania. Ręką przez prostrnicę podciąga macicę do jamy miednicowej, unosi ku górze, zwłaszcza rogi i masuje aby ułatwić spływ płynu. Jednocześnie jednak takie postępowanie niewątpliwie sprzyja odklejaniu się względnie zdrapywaniu komórek nabłonka końcem katetera i stąd prawie zawsze przy tej metodzie w płynie znajdują się znacznie większe ilości złuszczonego nabłonka, niż przy płukaniu chirurgicznym. Czasem dochodzi do głębszego uszkodzenia i pokazuje się krew. To wszystko z kolei utrudnia a nawet czasem uniemożliwia odszukanie zarodków. Złuszczone nabłonki i śluz niekiedy też zatykają małe otwory przewodu odprowadzającego. Jest oczywiste, że w miarę nabierania wprawy efekty stają się jednak coraz lepsze.

Niewątpliwym obciążeniem tej metody jest jeszcze trudność zachowania jałowego toku postępowania. O ile u dawcy ewentualne niedostatki w tym zakresie mogą być kompensowane infuzją płynu Lugola co i tak jest wskazane dla niedopuszczenia do ewentualnego rozwoju ciąży z niedopłukanych zarodków, o tyle posługiwanie się tym sposobem przy TPT niewątpliwie wymaga zwrócenia szczególnie uwagi na aseptykę zabiegu. Koncepcja wynikająca z techniki inseminacyjnej wg Cassou wydaje się tu być najprostszym i już stosowanym rozwiązaniem jałowego postępowania.

Mimo przedstawionych tu słabych jeszcze stron bezkrwawych metod wypłukiwania zarodków nie ulega wątpliwości, że tylko ta droga może prowadzić do zasadniczego uproszczenia postępowania, obniżenia kosztów a w końcowym rezultacie do uprządkowania metody. Powtarzalność zabiegu na tym samym zwierzęciu, oszczędność czasu i pracy, możliwość wykonywania w oborze, są szczególnie istotne przy wykorzystaniu tej metody do TPT, a wreszcie eliminacja ryzyka operacyjnego, to wszystko niewątpliwie i decydujące zalety tego sposobu postępowania. Słabą stroną metody jest niemożność penetracji szyjki macicznej u niektórych jałówek.

#### Przechowywanie zarodków

Od uzyskania zarodka do transplantowania go biorcy upływa pewien okres czasu. Im będzie to mógł być dłuższy termin, tym przymusy organizacyjne będą łagodniejsze, stopień wyko-

rzystania wyższy i odpowiednio niższe koszty. Odnosi się to w pierwszym rzędzie do stosowania TPT w praktyce, ale jest również istotne w wielu poczynaniach doświadczalnych przy użyciu zarodków.

W dotychczasowej praktyce transplantacyjnej przechowywano zarodki wyłącznie w temperaturach dodatnich, starając się, aby czas przetrzymywania poza organizmem był jak najkrótszy. Sprowadzało się to do przetrzymywania zarodków najwyżej w ciągu kilku godzin. Przy transplantacji zarodków przechowywanych do 2 h Sreenan i wsp. (11) uzyskiwali 72% rozwijających się płodów, natomiast już tylko 42% z zarodków przechowywanych 2—8 h. Jednak Trounson i wsp. (14) wykazali, że 6—7 dniowe morule, które rozwijały się normalnie w ciągu 48 godzinnej hodowli w zbuforowanym roztworze fosforanowym z dodatkiem 20% surowicy z płodów bydłych rozwijały się dalej po transplantacji u 61% biorców. Wskazuje to na interesującą już ze względów praktycznych możliwość przechowywania zarodków bydłych *in vitro* w ciągu 48 h. Jeszcze dłużej 6 i 7 dniowe zarodki przechowywali Renard i wsp. (6) używając płynu B2 wg Menezo. Dwa zarodki transplantowane po 4 dniach przetrzymywania *in vitro* rozwijały się dalej. W powyższym przeglądzie uwzględniono tylko te doświadczenia, w których sprawdzianem żywotności zarodków po pewnym okresie przechowywania *in vitro* był dalszy rozwój u biorcy.

Jest też publikacja Wright'a i wsp. (21), która wskazuje na możliwość przechowywania zarodka *in vitro* w ciągu nawet 156 h, jednak nie poparta jeszcze sprawdzianem dalszego rozwoju po TPT. Oczywiście próby długiego przechowywania dotyczą wczesnych zarodków, dotychczas bowiem nie udało się jeszcze prowadzić hodowli dłużej jak do stadium blastocysty.

Możliwe jest również przechowywanie zarodków w jajowodzie królika. Dobre wyniki TPT po 4 dniach przetrzymywania zarodków tym sposobem uzyskał Lawson i wsp. (5), gdyż 6 na 12 biorczyń się zacieliło. Również Seidel (9) uzyskał zacielenie po zarodkach przetrzymywanych w ciągu 2 dni w jajowodzie królika. Aczkolwiek jest to jak widać wcale skuteczny sposób przetrzymywania, stwarza jednak zbyt wiele dodatkowych trudnień aby mógł znaleźć szersze zastosowanie w praktyce.

Stwierdzenie w 1972 r. przez Wittinghama i wsp. (16), że zarodki myszy znoszą zamrożenie do temp. —196°C, a następnie urodzenie się w 1973 r. w Cambridge pierwszego cielęcia z zarodka przechowywanego przez tydzień w ciekłym azocie i transplantowanego przez Wilmuta i Rowsona (20) otworzyło nowe perspektywy w zakresie konserwacji zarodków. Możliwość zachowania substancji genetycznej w stanie nie zmienionym przez nieograniczony czas otworzyła też możliwości nowych poczynaniach w zakresie genetyki. Możliwe stało się bowiem prze-

chowywanie szczególnie wartościowych materiałów genetycznych, kontrola postępu wzgl. stabilizacji genetycznej itp.

Od strony dalszych manipulacji z zarodkiem, głównie pod kątem TPT, możliwość długotrwałej konserwacji posiada szereg zasadniczych walorów. Cała liczba zarodków uzyskana od dawcy może zostać zakonserwowana i wykorzystana również w pełni i w sposób dogodny organizacyjnie. Odpada tym samym przymus synchronizowania nie dającej się nigdy optymalnie określić liczby biorczyń. Odpada również koszt synchronizowania dawczyń. Poprawia się ekonomiczna strona całej metody. Pod uwagę należy też brać możliwość przewożenia zamrożonych zarodków na dalsze odległości, a tym samym wykorzystanie metody w eksporcie materiału zwierzęcego. Oczywiście to wszystko przy założeniu, że wyniki uzyskiwane po transplantacji zamrożonych zarodków są nie gorsze od tych, jakie uzyskiwano po świeżych.

O ile można wnioskować z co prawda stosunkowo jeszcze bardzo nielicznych doświadczeń, istnieje możliwość uzyskiwania ponad 50% rozwijających się płodów po TPT zamrożonych zarodków. W jednym doświadczeniu przeprowadzonym w Cambridge przez Willadsena i wsp. (17) transplantowano 23 zamrożone zarodki 11 jałówkom. Uzyskano 12 rozwijających się płodów u 8 zwierząt. W drugim doświadczeniu transplantowano 9 jałówkom po 1 zarodku. Na 60 dzień ciążę rozpoznano u 6 zwierząt. W naszych doświadczeniach po transplantacji zamrożonych zarodków przechowywanych od kilku dni do kilkunastu miesięcy rozpoznano 6 cielnich jałówek po 60 do 120 dniach. (Wierzbowski i wsp. — dane nie publikowane).

W dotychczasowej praktyce zamrażania zarodków bydłych, dwumetylosulfotlenek (DMSO) okazał się najlepszym środkiem osłaniającym. Drugim czynnikiem o decydującym znaczeniu jest stosunkowo wolne tempo obniżania temperatury. Według Whittinghama (16) to bardzo wolne obniżanie temperatury umożliwia odwodnienie zarodka zanim zostanie zamrożony. Zapobiega to krystalizacji drobiny wody w obrębie komórek, co jest uważane za jeden z głównych czynników niszczących zarodki w procesie zamrażania. Z szybkością 0,13 do 0,3°C/min. obniża się temperaturę do —80°C a nawet do —100°C i dopiero wówczas przekłada do ciekłego azotu. Rozmrażanie odbywa się znacznie prędzej, bo z szybkością 12—14°C/min. Dosyć istotnym momentem jest temperatura, w której rozpoczyna się proces krystalizacji wody. Roztwór DMSO pozostawiony w spokoju zamarza dopiero w temp. ok. —20°C. Tak duże przechłodzenie było niekorzystne dla zarodków i konieczne okazało się stosowanie tzw. posiewania, czyli inicjowania procesu krystalizacji. Jak wynika z pracy Smorąga i wsp. (10) najlepsze wyniki zamrażania otrzymywano, przeprowadzając posiewanie w temp. od —6 do —8°C.

Do mrożenia używa się zarodków 6—7 dniowych, gdyż jak stwierdzili Willadsen i wsp. (18) a także Wilmut i wsp. (20), zarodki krowy w stadium moruli i wczesnej blastocysty lepiej znoszą zamrażanie niż wcześniejsze stadia rozwojowe.

Metoda zamrażania zarodków jest w obecnej swojej postaci niewątpliwie żmudna i czasochłonna. Konieczność przeprowadzania zarodków przez kolejno wzrastające stężenia DMSO od 0,25 do 1,5 M przed mrożeniem, a w odwrotnej kolejności po rozmrożeniu, związane z tym precyzyjne manipulacje, a także sama procedura zamrażania, długotrwała i wymagająca starannego prowadzenia sprawiają, że na pewno nie jest to jeszcze metoda gotowa do wprowadzenia do praktyki. Nie ma jednak wątpliwości, że szybko będzie upraszczana, na co wskazują kierunki obecnie prowadzonych prac.

Dotychczas stosunkowo niewielka ilość zarodków bydłych była zamrożona. Whittingham (15) przyjmuje, że do 1976 r. tylko około 250 bydłych i 54 owczych zarodków było mrożonych. Nawet dodając do tego 139 bydłych i 87 owczych mrożonych w naszym Zakładzie, są to rzeczywiście stosunkowo niewielkie liczby. Oceniając jednak efekty w postaci już co najmniej kilkunastu cieląt urodzonych w Cambridge, kilku w Australii i kilku cielnych krów w Instytucie Zootechniki, można nabierać przekonania, że zarodki bydłce i owcze są stosunkowo dosyć podatne na konserwację w niskich temperaturach.

Aczkolwiek dalszy rozwój zarodka po TPT u biorcy jest najpewniejszym sprawdzianem jego nienaruszonej sprawności rozwojowej po zamrożeniu i rozmrożeniu, to sama transplantacja, wobec jej jeszcze licznych słabych stron, nie może być dostatecznie pewną metodą oceny. Chcemy tu powiedzieć, że faktyczna zdolność do dalszego rozwoju zarodków bydłych, które przeszły mrożenie, może być wyższa, niż na to wskazują dotychczasowe wyniki TPT.

Możliwość wnioskowania o wartości rozmrożonego zarodka na podstawie jego wyglądu jest też dosyć ograniczona. Rozpoznaje się uszkodzenia osłonki przejrzystej oraz zmiany wyglądu morfologicznego wynikające z uszkodzenia struktury blastomerów. Oczywiście nic jeszcze nie można powiedzieć o głębszych zmianach strukturalnych, a i te stwierdzane mogą czasem budzić wątpliwości. Stosując jednak tylko dostępne kryteria oceny morfologicznej, na ogólną ilość 75 rozmrożonych zarodków bydłych 61 (81%) oceniono jako normalne, 10 (13%) jako morfologicznie normalne, ale z pękniętą osłonką przejrzystą, 2 (3%) jako częściowo uszkodzone, a 2 (3%) jako częściowo uszkodzone z pękniętą *zona pellucida* (Smorąg i wsp. — dane nie opublikowane). Ten stosunkowo bardzo wysoki odsetek nie uszkodzonych zarodków stanowi następny czynnik napawający optymizmem co do przyszłej wartości metody, ale też wska-

zuje na bardzo jeszcze nikłe możliwości oceny wartości zarodka, który przeszedł zamrażanie i rozmrażanie.

Na końcu powstaje pytanie, jakie możliwości oferuje metoda transplantacji zarodków u bydła na obecnym etapie swojego rozwoju. Otóż wydaje się, że już teraz można stwierdzić, że zainteresowanie możliwością przenoszenia zarodków z jednego zwierzęcia do drugiego stanowi impuls, który już doprowadził do bardzo znacznego rozszerzenia wiadomości dotyczących pierwszych stadiów rozwoju zarodka, a dalej będzie prowadził do rozwoju chyba nowego kierunku w postaci stosowanej embriologii.

Praktyczne możliwości stosowania TPT w hodowli bydła są jeszcze ciągle ograniczone tymi niedostatkami metody, o których poprzednio była już mowa. Tak więc, przy obecnych możliwościach metody, zastosowanie u nas można widzieć jedynie w próbach TPT zarodków od szczególnie cennych zwierząt, które z takich czy innych powodów muszą być wybrakowywane. Jest to bowiem jeszcze jedyna szansa uzyskania w takich wypadkach przychówka, który może mieć jakieś istotne walory hodowlane. Mogą to być poczynania bez określonego planu, a wynikające jedynie z powstających jednostkowych sytuacji.

Można tu też brać pod uwagę TPT jako metodę ułatwiającą tworzenie niewielkich populacji wyjściowych do prac selekcyjnych w kierunku pewnych specjalnych cech użytkowych jak np. skłonności do dawania bliźniąt (sugestia dr Konopki, ZZD Pawłowice).

Oczywiście transplantacja zarodków będzie służyła jako metoda mająca nader istotne znaczenie w badaniach z zakresu embriologii, a niewątpliwie też w pewnych aspektach epizootiologii. W pracach z zakresu genetyki może oczywiście już teraz mieć zastosowanie, zakładając, że z zarodków zamrożonych dostępnymi obecnie metodami będzie można uzyskać dostateczną ilość cieląt za 5 czy 10 lat.

Najbardziej atrakcyjne zastosowanie ze względów praktycznych, a mianowicie w celu zwiększenia wydajności rozrodczej bydła, przez uzyskiwanie bliźniąt, wymaga jeszcze dalszego doskonalenia metody. Najważniejszymi punktami są: zwiększenie wydajności dawców, uzyskiwanie i transplantacja metodami bezkrwawymi i długotrwała konserwacja zarodków.

#### Piśmiennictwo

1. Ayalon N., Krieger Y., Lewis I.: Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. AI, Kraków, 3, 233, 1976.
2. Church R. B., Shea B. F.: Can. J. Anim. Sci. 57, 33, 1977.
3. Betteridge K. J.: „Embryo transfer in farm animals”. Canada Dept. of Agriculture, Monograph 16, 1977.
4. Holy L.: Vysoká Škola Veterinární v Brnie (Informacja ustna), 1977.
5. Lawson R. A. S., Rowson L. E. A., Adams C. E.: J. Reprod. Fert. 28, 313, 1972.
6. Renard J. P., du Mesnil du Buisson F., Wintemberger-Torres S., Menezo Y.: „Egg Transfer in Cattle” pod red. L. E. A. Rowson. Commission of the European Communities, Luxembourg, EUR 5491, 159, 1976.
7. Rowson L. E. A., Dowling D. P.: Vet. Rec. 61, 191, 1949 (cyt. za Betteridge, poz. 3).
8. Rowson L. E. A., Moor R. M., Lawson R. A. S.: J. Reprod. Fert. 18, 517, 1969.

9. Seidel G. E. (Jr.): Proc. Soc. Study Breeding Soundness, 9, 1974 (cyt. za Betteridge poz. 3).
10. Smorąg Z., Kętska L., Wierzbowski S.: Roczn. Nauk. Zoot. 3, 21, 1976.
11. Sreenan J. M., Beehan D., Mulvehill P.: J. Reprod. Fert. 44, 77, 1975.
12. Sugie T.: J. Reprod. Fert. 10, 197, 1965.
13. Sugie T., Soma T., Fukumitsu S., Otsuki K.: Natl Inst. Anim. Ind. Bull. 25, 27, 1972. (cyt. za Betteridge poz. 3).
14. Trounson A. O., Willadsen S. M., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 47, 367, 1978.
15. Whittingham D. G.: w „Embryo Transfer in Farm Animals” pod red. K. J. Betteridge, Canada Dept of Agriculture, Monograph, 16, 50, 1977.
16. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P.: Science (Wash.) 178, 411, 1972.
17. Willadsen S. M., Polge C., Trounson A. O., Rowson L. E. A.: w „The Freezing of Mammalian Embryos”. Ciba Foundation Symposium 52, Elsevier 190, 1977.
18. Willadsen S. M., Trounson A. O., Polge C., Rowson L. E. A., Newcomb R.: „Egg Transfer in Cattle” pod red. L. E. A. Rowson, Commission of the European Communities, Luxembourg, EUR 5491, 117, 1976.
19. Willet E. L., Black W. G., Casida L. E., Stone W. H., Buckner P. J.: Science 113, 247, 1951.
20. Wilmut I., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 33, 352, 1973.
21. Wright R. W., Anderson G. B., Cupps P. T., Drost M.: J. Anim. Sci., 43, 170, 1976.

Adres autora: prof. dr Stefan Wierzbowski, Instytut Zootechniki, 32-003 Balice k/Krakowa.

TADEUSZ ZARSKI

## Nowe aspekty etiopatogenezy zalegania poporodowego u krów mlecznych

Z Instytutu Zoohigieny i Profilaktyki w Produkcji Zwierzęcej SGGW-AR w Warszawie

Zaleganie poporodowe (gorączka mleczna) jest zaburzeniem metabolicznym, występującym w okresie porodowym i z początkiem laktacji u wysokoprodukcyjnych krów wieloródek. Twierdzenie, że zaleganie poporodowe jest chorobą produkcyjną znajduje poparcie w fakcie, że wraz ze wzrostem produktywności krów wzrasta również wydatnie liczba przypadków tego schorzenia. Na przykład w USA w Stanie Wisconsin w 1970 r. obserwowano przypadki tej choroby u 10% krów po porodzie. Około 86% krów w tym stanie to krowy rasy Holstein o bardzo wysokiej wydajności mlecznej (13). Mimo, że leczenie w tym przypadku jest na ogół skuteczne — jest jednak kosztowne i niewygodne, a ponadto choroba może redukować okres produkcyjny krów, jak wynika z badań Payne (25), średnio o trzy do czterech lat. Wzrost produktywności krów w naszym kraju uzyskiwany dzięki prowadzonej od wielu lat pracy hodowlanej oraz zmianie w systemach żywienia powoduje, że schorzenie to może stanowić coraz ważniejszy problem gospodarczy.

Do chwili obecnej dopracowano się około 30 teorii wyjaśniających etiopatogenezę zalegania poporodowego, nie wszystkie jednak wytrzymały próbę czasu, niemniej jeszcze w chwili obecnej, mimo wyjaśnienia szeregu ważnych faktów, etiologia tego schorzenia nie jest jeszcze dostatecznie poznana. Narządami związanymi z utrzymaniem prawidłowego poziomu wapnia w organizmie są: kości, jelita, gruczoły dokrewne, gruczoł mleczny, wątroba, nerki i tkanka tłuszczowa. Zadaniem mechanizmów homeostatycznej adaptacji do laktacji jest wyrównanie różnic między zapotrzebowaniem na wapń w tym okresie, a zapotrzebowaniem w okresie poprzedzającym poród, kiedy pierwiastek ten, poza zapotrzebowaniem bytowym, był jedynie potrzebny na budowę płodu. Istnieje dość duża różnica między zapotrzebowaniem na wapń dla

płodu — 5,3 g dziennie, a ilością wapnia wydzielanego z siałą lub mlekiem: 13—18 g dziennie. Różnica ta przewyższa całkowitą zawartość wapnia w surowicy, która wynosi 6—10 g. Ta dysproporcja musi być wyrównana poprzez wzrost dopływu wapnia do surowicy drogą zwiększenia wchłaniania wapnia z jelit i uruchomienia rezerwy kostnej lub też zmniejszenie odpływu wapnia z organizmu (z wyjątkiem mleka) głównie przez zmniejszenie wydalania wapnia endogennego z kałem i moczem oraz obniżenie odkładania wapnia w kośćcu i tkance tłuszczowej (29).

Rozpoczęcie laktacji jest głównym czynnikiem prowadzącym do spadku wapnia w surowicy, a w konsekwencji do wystąpienia objawów hipocalcemii u krów po porodzie, z których jednym jest zaleganie (13). Fizjologiczny spadek poziomu wapnia przy porodzie wynosi 2 mg% (np. z 10 do 8 mg%), fosforu 1—2 mg% przy trzeciej laktacji i u krów starszych (13, 20). Stopień hipocalcemii traktować należy jako średni przy poziomie Ca w surowicy 7,5—8,5 mg% i duży przy poziomie 5—6 mg%. Nie wszystkie krowy, u których występuje nawet duży spadek poziomu wapnia muszą wykazywać objawy zalegania (16, 23). Jednak przy poziomie wapnia niższym jak 5 mg% schorzenie to występuje zawsze. Wskazuje to na załamanie się mechanizmów adaptacyjnych i w przypadku nieleczenia śmiertelność może wynosić 60—70%. Obniżenie poziomu wapnia i fosforu nieorganicznego przy porodzie potęguje się z wiekiem i kolejnymi laktacjami (20).

### Czynniki sprzyjające występowaniu zalegania poporodowego

Jak już wspomniano we wstępie rozpoczęcie laktacji i związane z tym przekazywanie dużych ilości wapnia do mleka jest głównym czynnikiem prowadzącym do obniżenia poziomu