

Kiev's diluent for several days. It was found that at the moment of dilution of ejaculate appear some biochemical changes of spermatozoons manifesting by „a leak” of aspartic aminotransferase (AspAT) and hyaluronidase (HL). Besides a continuous decrease of spermatozoon's movement, decreased a percent of cells with normal acrosomes and increased the number of spermatozoons with vesiculizing acrosomes. At a successive time intervals, 60 h of conservation, the above mentioned changes progress. As the results

of biochemical and morphological disorders was a progressing decrease of biological value of spermatozoons (after 12 h NR/60 was 85.2%, after 24—36 h — 74.8% and after 48—60 h — 60.9%). A relatively low values of a correlation coefficient between the parameters of semen quality and its fertilizing value point to the need of the application of the AspAT test for the evaluation of biological value of preserved boar's semen (correlation coefficient with Nr/CO  $r = -0.50$ ,  $p \leq 0.01$ ).

LUCYNA KAŃSKA, ZDZISŁAW SMORAĞ

## Możliwości uzyskiwania oocytów bydłych<sup>\*)</sup>

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieleniania Zwierząt Instytutu Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa

Dotychczasowe badania z zakresu mikromorfologii systemu pęcherzykowego jajników bydłych dotyczyły indywidualnych wahań ilości i jakości pęcherzyków (10), związku między stadium cyklu płciowego a jakością pęcherzyków (2), zależności między wielkością pęcherzyka i obecnością otaczających oocyt komórek wzgórka jajonośnego a procesem dojrzewania *in vitro* (3, 7), czy też zagadnień metodycznych uzyskiwania oocytów pęcherzykowych (4).

Interesującym zagadnieniem byłoby ustalenie, czy występuje zależność między ilością pęcherzyków jajnikowych i jakością znajdujących się w nich oocytów a wiekiem samic. Jest to interesujące w aspekcie hodowli niedojrzałych oocytów *in vitro* \*\*) oraz podatności bydła na superowulację. Uzyskiwanie morfologicznie normalnych oocytów, także od zwierząt starszych, stwarza możliwość wykorzystania tych zwierząt jako źródła zarodków.

Stosowana metoda pobierania oocytów, w drodze aspiracji zawartości pęcherzyków, pozwala na uzyskanie od 30 do 60% oocytów w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków (4, 6, 7). Jedną z przyczyn niskiego stopnia uzysku mogą być trudności w oddzieleniu niektórych oocytów od przylegających komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego. Można zakładać, że są to oocyty najlepsze z punktu widzenia ich przydatności do hodowli *in vitro*, gdyż otaczające je komórki ziarniste stanowią wciąż trudną do oddzielenia, ścisłą i spoiwą warstwę. Zastosowanie bardziej efektywnej metody uzyskiwania oocytów przyczyniłoby się do lepszego wykorzystania samic — dawczyń.

Celem podjętych badań było: 1. określenie relacji między wiekiem zwierzęcia a ilością i jakością uzyskanych oocytów, 2. porównanie wydajności uzyskiwania oocytów metodą aspiracji zawartości pęcherzyków z metodą polegającą na rozrywaniu izolowanych pęcherzyków jajnikowych.

<sup>\*)</sup> Praca wykonana w ramach podproblemu węzłowego 09.5.5 koordynowanego przez Instytut Zootechniki.  
<sup>\*\*)</sup> Przegląd piśmiennictwa z zakresu dojrzewania *in vitro* oocytów ssaków — Medycyna Wet. 34, 740, 1978.

### Materiał i metody

Jajniki pobierano od jałówek i krów rzeźnych. Zwierzęta podzielono na trzy grupy wiekowe, a mianowicie: 18 do 24 mies. — 67 jałówek; 3 do 8 lat — 75 krów; 9 do 17 lat — 70 krów.

Dla porównania dwóch metod uzyskiwania oocytów użyto jajników pobranych od 17 jałówek i krów rzeźnych, przy czym nie wprowadzono podziału na grupy wiekowe, jako nie mającego znaczenia w tej części doświadczenia. Obserwacje prowadzono w lutym i marcu.

Jajniki uzyskiwano bezpośrednio po uboju, po uprzednim określeniu przybliżonego wieku zwierzęcia. Następnie przewożono je w temp. 20—25°C do laboratorium, gdzie po 1½ do 5 godz. od pobrania określano liczbę pęcherzyków jajnikowych, które następnie kwalifikowano do jednej z trzech grup wielkości: 2—6 mm; 7—20 mm i powyżej 20 mm.

Oocyty wraz z płynem pęcherzykowym aspirowano przy pomocy strzykawki i igły. Wyszukane oocyty umieszczano w płynie Dulbecco (12), a następnie poddawano ocenie morfologicznej w mikroskopie stereoskopowym.

W doświadczeniu, w którym przeprowadzono porównanie dwóch metod uzyskiwania oocytów, pobierano oocyty tylko z pęcherzyków 2—6 mm. Pobieranie oocytów z jednego jajnika z pary przeprowadzono metodą aspiracji, natomiast z drugiego wycinano pęcherzyki jajnikowe i umieszczano każdą na oddzielnym szkiełku zegarkowym w płynie Dulbecco. Następnie pęcherzyki rozrywano przy pomocy igieł preparacyjnych.

Kryteria oceny jakości oocytów obejmowały obecność i stan komórek wzgórka jajonośnego otaczających oocyt oraz wygląd morfologiczny cytoplazmy oocytu. Oocyt oceniano jako morfologicznie normalny wówczas, gdy nie wykazywał zmian w cytoplazmie i otaczała go gęsta i spoiwa warstwa komórek wzgórka jajonośnego (5).

Uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej testem Duncana oraz testem  $X^2$ .

### Wyniki i omówienie

Liczba pęcherzyków jajnikowych o śred. 2—6 mm u jałówek i krów w wieku 3—8 lat były zbliżone i wynosiły odpowiednio  $22,66 \pm 12,56$  i  $23,08 \pm 13,95$  (tab. 1). Natomiast u krów w wieku 9—17 lat stwierdzono średnio  $18,03 \pm 10,83$  ( $p < 0,05$ ) pęcherzyków tej wielkości. Liczby pęcherzyków większych (7—20 mm) były po-

Tab. 1. Odzysk i ocena morfologiczna oocytów bydłych

Grupa zwierząt (Nr grupy)	Liczba zwierząt	Średnica pęcherzyka mm	Klasa pęcherzyków	Liczba stwierdzonych pęcherzyków $\bar{x} \pm s$	Liczba uzyskanych oocytów $\bar{x} \pm s$	Liczba oocytów morfologicznie normalnych $\bar{x} \pm s$
Jałówki (1)	67	2-6 7-20 ≥ 21	a	22,66 ± 12,56 3a *)	10,22 ± 6,17	4,63 ± 3,98
			b	1,22 ± 0,85	0,60 ± 0,70	0,13 ± 0,34
			c	0,06 ± 0,24	—	—
Krowy 3-8 lat (2)	75	2-6 7-20 ≥ 21	a	23,08 ± 13,95 3a *)	9,88 ± 6,24	5,24 ± 4,03
			b	1,39 ± 1,00	0,77 ± 0,85	0,24 ± 0,49
			c	0,29 ± 0,85	0,08 ± 0,36	0,03 ± 0,16
Krowy ≥ 9 lat (3)	70	2-6 7-20 ≥ 21	a	18,03 ± 10,83 1a *)	8,37 ± 5,87	3,89 ± 3,73
			b	1,10 ± 1,02 2a *)	0,57 ± 0,79	0,17 ± 0,42
			c	0,36 ± 1,01	0,03 ± 0,17	—

Objaśnienie: \*) —  $p < 0,05$ .

Tab. 2. Rozkład liczbowy 2-6 mm pęcherzyków jajnikowych u jałówek i krów

Liczba pęcherzyków	Grupa zwierząt (nr grupy)								
	(1) Jałówki			(2) Krowy 3-8 lat			(3) Krowy 9 lat		
	n	%	$\chi^2$	n	%	$\chi^2$	n	%	$\chi^2$
≤ 10	11	16,4	3*	12	16,0	3*	22	31,4	1*, 2*
11-20	24	35,8	—	24	32,0	—	25	35,7	—
21-30	13	19,4	—	20	26,7	—	11	15,7	—
31-40	12	17,9	—	13	17,3	—	8	11,4	—
≥ 41	7	10,4	—	6	8,0	—	4	5,7	—

Objaśnienie: \* —  $p < 0,05$ .

Tab. 3. Populacja 2-6 mm pęcherzyków a jakość uzyskiwanych oocytów

Grupa zwierząt	Liczba pęcherzyków (oba jajniki)	Liczba zwierząt		Liczba aspirowanych pęcherzyków	Liczba uzyskanych oocytów		Liczba oocytów morfologicznie normalnych		
		n	%		n	%	n	%	test $\chi^2$
1	≤ 10	45	21,2	339	151	44,5	72	47,7	—
2	11-20	73	34,4	1120	531	47,4	239	45,0	3* 4*
3	21-30	44	20,8	1062	482	45,4	255	52,9	2* 5**
4	31-40	33	15,6	1166	518	44,4	266	51,3	2*, 5*
5	≥ 41	17	8,0	824	330	40,0	143	43,3	3** 4*
Ogółem		212	100	4511	2012	44,6	975	48,5	—

Objaśnienia: \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ .

Tab. 4. Odzysk i ocena morfologiczna oocytów bydłych pobieranych przez aspirację lub rozrywanie 2-6 mm pęcherzyków

Metoda uzysku	Liczba pęcherzyków	Liczba uzyskanych oocytów			Liczba oocytów morfologicznie normalnych		
		n	%	$\chi^2$	n	%	$\chi^2$
Aspiracja płynu pęcherzykowego	185	80	43,2	××	36	45,0	××
Rozrywanie izolowanych pęcherzyków	154	155	100,6	××	98	63,2	××

Objaśnienie: ×× —  $p \leq 0,01$ .

dobne we wszystkich grupach wiekowych i wynosiły  $1,22 \pm 0,85$ ;  $1,39 \pm 1,00$  i  $1,10 \pm 1,02$  odpowiednio dla jałówek, krów młodszych i starszych. W przypadku pęcherzyków o śred. powyżej 21 mm stwierdzono wzrost ich liczebności w obydwu grupach krów w porównaniu z grupą jałówek. Różnice te nie były jednak statystycznie istotne (tab. 1).

Analiza materiału dokonywana pod kątem rozkładu liczbowego 2—6 mm pęcherzyków jajnikowych (tab. 2) wykazała, iż we wszystkich grupach wiekowych najliczniej reprezentowane były zwierzęta, u których na obu jajnikach stwierdzono obecność 11—20 pęcherzyków. Stwierdzono, że odsetek zwierząt o tej liczbie pęcherzyków wynosił 35,8; 32,0 i 35,7% odpowiednio w trzech grupach wiekowych. Równocześnie w grupie jałówek i krów 3—8 lat obserwowano niemal identyczne ilości zwierząt, u których na obu jajnikach stwierdzano do 10 pęcherzyków o śred. 2—6 mm (odpowiednio 16,4 i 16,0%). Natomiast w grupie krów w wieku powyżej 9 lat obserwowano prawie dwukrotny wzrost odsetka zwierząt o tej liczbie pęcherzyków ( $p < 0,05$ ). Ponadto stwierdzono, że odsetek zwierząt z największą liczbą 2—6 mm pęcherzyków (powyżej 41) wykazywał wraz z wiekiem tendencje malejące wynoszące odpowiednio 10,4; 8,0 i 5,7% w kolejnych grupach wiekowych. Różnice te nie były jednak statystycznie istotne.

Z pęcherzyków o średnicy 2—6 mm uzyskano średnio  $10,22 \pm 6,17$ ;  $9,88 \pm 6,24$  i  $8,37 \pm 5,87$  oocytów odpowiednio od jałówek, krów młodszych i starszych. Liczby te, jakkolwiek wykazywały tendencje malejące wraz z wiekiem zwierząt, nie różniły się jednak statystycznie (tab. 1).

Około 50% oocytów uzyskanych z 2—6 mm pęcherzyków oceniono jako morfologicznie normalne (ryc. 1). Uzyskano średnio  $4,63 \pm 3,98$ ;  $5,24 \pm 4,03$  i  $3,89 \pm 3,73$  oocytów normalnych odpowiednio od jałówek, krów młodszych i starszych (tab. 1).

W celu stwierdzenia ewentualnego związku między liczbą 2—6 mm pęcherzyków a jakością

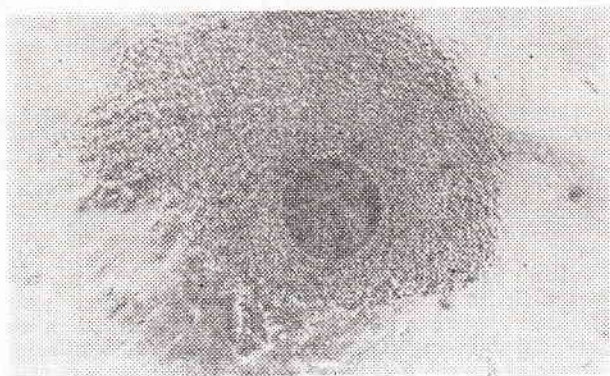
uzyskiwanych z nich oocytów materiał doświadczalny podzielono na grupy różniące się liczbą pęcherzyków stwierdzanych na obu jajnikach (tab. 3). Wykazano, że odsetek oocytów normalnych był najwyższy (52,9%) u zwierząt posiadających na obu jajnikach 21—30 pęcherzyków, a najniższy (43,3%) u zwierząt o najwyższej (powyżej 41) liczbie pęcherzyków ( $p < 0,01$ ). Wysoki odsetek oocytów normalnych (51,3%) obserwowano również u zwierząt grupy IV, u których na obydwu jajnikach stwierdzano 31—40 pęcherzyków. Nie zanotowano statystycznie istotnych różnic w odsetku oocytów normalnych między grupą zwierząt o najmniejszej liczbie pęcherzyków na obu jajnikach ( $\leq 10$ ), a pozostałymi grupami (tab. 3).

Porównanie dwóch metod uzyskiwania oocytów wykazało, że przy stosowaniu aspiracji ze 185 pęcherzyków 2—6 mm uzyskano 80 oocytów, podczas gdy przez rozrywanie 154 izolowanych pęcherzyków uzyskano 155 oocytów ( $p < 0,01$ ). W 4 izolowanych pęcherzykach nie stwierdzono obecności oocytów, podczas gdy w 3 pęcherzykach stwierdzono po 2, a w jednym pęcherzyku 3 oocyty (tab. 4).

Ocena morfologiczna wykazała, że 45% oocytów uzyskanych metodą aspiracji posiadało normalny wygląd morfologiczny, podczas gdy z izolowanych pęcherzyków uzyskano 63,2% oocytów tej klasy ( $p < 0,01$ ) (tab. 4).

Próbując ocenić możliwości uzyskiwania oocytów w aspekcie wieku bydła znamienna wydaje się podobna wartość tych parametrów we wszystkich badanych grupach zwierząt. Obserwowano wprowadzenie oznaki zmniejszonej aktywności jajników w grupie bydła w wieku 9—17 lat, przejawiające się nieco mniejszą liczbą pęcherzyków, czy też nieco wyższym odsetkiem zwierząt ze średnią liczbą pęcherzyków, wynoszącą poniżej 10, to jednak skala tego zjawiska nie wskazuje na znaczniejsze obniżenie potencjału rozrodczego w tej grupie bydła. Spostrzeżenia te potwierdzają w zasadzie wcześniejsze obserwacje Ericksona (1), który stwierdził, że liczba pęcherzyków antralnych u bydła w wieku 8 mies. do 10—14 lat utrzymuje się na zbliżonym poziomie, a wyraźną redukcję populacji obserwował dopiero u zwierząt 15-letnich. Przy wyrównanej liczebności 2—6 mm pęcherzyków i liczby uzyskiwanych oocytów, w grupach wiekowych bydła stwierdzano występowanie znacznych różnic indywidualnych. Zjawisko to obserwowali już wcześniej u jałówek Rajakoski (10), Mariana i wsp. (8) oraz Saumande i wsp. (11). Autorzy ci (8, 11) uważają, że konsekwencją tego zjawiska są zróżnicowane wyniki superowulacji u bydła.

Obserwowane przypadki występowania dwóch, czy nawet trzech oocytów w jednym pęcherzyku potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia Rajakoskiego (10), który stwierdzał obecność nawet 5 oocytów w jednym pęcherzyku pierwotnym. Wskazuje to na możliwość rozwo-



Ryc. 1. Oocyt morfologicznie normalny, bez zmian w cytoplazmie, otoczony gęstą i spoiwą warstwą komórek wzgórka jajonośnego

ju ciąży bliźniaczych po owulacji jednego pęcherzyka.

Uzyskane wyniki świadczą, że przy pobieraniu oocytów metodą aspiracji wykorzystuje się do hodowli *in vitro* tylko 25% ogólnej populacji 2—6 mm pęcherzyków. Wynika to z jednej strony z uzysku wynoszącego ok. 50%, a z drugiej, z odsetka oocytów morfologicznie normalnych, stanowiącego również ok. 50% uzyskanych oocytów. Rozważając możliwość zwiększenia końcowej efektywności metody należy przede wszystkim zwrócić uwagę na zwiększenie uzysku oocytów. Wydaje się, że nie jest to możliwe przy stosowaniu aspiracji, gdyż również inni autorzy (4, 6, 7, 9) uzyskują wyniki na podobnym, czy nawet niższym poziomie. Zwiększenie efektywności uzysku oocytów rozwiązuje zastosowanie rozrywania izolowanych pęcherzyków. Należy tu również podkreślić, że odsetek oocytów morfologicznie normalnych uzyskiwanych tym sposobem był o ponad 20% wyższy niż przy użyciu aspiracji. W rezultacie prawie 100% uzysku oraz zwiększonego odsetka oocytów morfologicznie normalnych postępowanie to jest około 2,5-krotnie bardziej efektywne niż aspiracja. Jednakże pracochłonność tej metody stanowi jej względną wadę.

### Wnioski

1. Nie stwierdzono wyraźnego związku między wiekiem zwierzęcia a ilością i jakością uzyskanych oocytów.
2. Uzyskiwanie oocytów przez rozrywanie izolowanych pęcherzyków jest 2,5-krotnie bardziej wydajne w porównaniu z aspiracją zawartości pęcherzyków.

### Piśmiennictwo

1. Erickson G. F.: J. Anim. Sci. 25, 800, 1966.
2. Choudary J. B., Gier H. T., Marton G. B.: J. Anim. Sci. 27, 468, 1968.
3. Fukui Y., Sakuma Y.: Biol. Reprod. 22, 669, 1980.
4. Kanagawa H.: Jap. J. Vet. Res. 27, 72, 1979.
5. Kątska L., Smorąg Z.: Anim. Reprod. Sci. (przyjęte do druku, 1984).
6. Kuehl T. J., Dukelow W. R.: Biol. Reprod. 21, 545, 1979.
7. Leibfried L., First N. L.: J. Anim. Sci. 48, 76, 1979.
8. Mariana J. C., Mauleon P., Benoit M., Chupin D.: Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. Suppl. 1, 47, 1970.

**KROGH H. V.: Występowanie enterotoksynogennych szczepów *Escherichia coli* u cieląt noworodków z ostrą biegunką. (Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal diarrhoea).** Nord. Vet. Med. 35, 346—352, 1983 (10).

W okresie 30 miesięcy przebadano 1814 próbek (1113 próbek kału, 701 wycinków narządów wewnętrznych) pochodzących od cieląt z objawami biegunki. Enterotoksynogenne szczepy *Escherichia coli* wyosobniono od 14,6% cieląt w wieku do 30 dni życia, 45% cieląt w wieku 1—2 dni, 4,9% w wieku 8 dni. 195 z 268 przypadków biegunki wywoływały wyłącznie szczepy *E. coli*. W pozostałych przypadkach oprócz enterotoksynogennych szczepów *E. coli* izolowano rotawirusy i koronawirusy. Zakażenia enterotoksynogennymi szczepami *E. coli* występowały najczęściej u cieląt rasy jersey (40%) w porównaniu do cieląt rasy duńskiej (16%).

G.

9. Morgenstern L. L., Soupart P.: Fert. Steril. 23, 751, 1972.
  10. Rajakoski E.: Acta Endocrinol. Suppl. 52, 1, 1960.
  11. Saumande J., Chupin D., Mariana J. C., Ortavant R., Mauleon P.: Control of reproduction in the cow. Martinus Nijhoff, 1978.
  12. Whittingham D. G.: Nature 233, 125, 1971.
- Adres autora: dr Lucyna Kątska, ul. Zamkowa 12 m 4, 30-301 Kraków.

**Конская Л., Сморог З. — Возможности получения овоцитов скота**

Наблюдения относились к определению связи между возрастом животного и количеством, а также качеством полученных овоцитов и сравнению получения овоцитов методом аспирации содержания фолликулов с методом, заключающимся в разрыве изолированных фолликулов.

У телок отмечали в среднем  $22,66 \pm 12,56$  фолликулов 2—6 мм, из которых получали  $10,22 \pm 6,17$  овоцитов, в том  $4,63 \pm 3,98$  морфологически нормальных. Похожие величины наблюдали у коров в возрасте 3—8 лет. Зато у коров в возрасте  $\geq 9$  лет отмечали  $18,03 \pm 10,83$  ( $p \leq 0,05$ ) фолликулов;  $8,37 \pm 5,87$  овоцитов и  $3,89 \pm 3,73$  нормальных овоцитов. Не отметили зависимости между количеством фолликулов и качеством полученных овоцитов.

Применяли аспирацию из 185 фолликулов, получили 80 овоцитов, в то время, когда путем разрыва 154 изолированных фолликулов получили 155 овоцитов ( $p \leq 0,01$ ). Нормальный морфологический вид показано 45% полученных путем аспирации овоцитов, по сравнению с 63,2% морфологически нормальных овоцитов, полученных из изолированных фолликулов ( $p \leq 0,01$ ).

**Katska L., Smorąg Z. — Oocytes collection from cattle**

The features of ovarian follicles and follicular oocytes depending on the age of cattle were examined. There was compared the system of oocytes collection by aspiration of the follicular content with the method of follicles rupture. In heifers out of  $22,66 \pm 12,56$  oocytes contained in 2—6 mm follicles  $10,22 \pm 6,17$  oocytes were recovered;  $4,63 \pm 3,98$  were morphologically normal. Similar values were observed in 3—8 year old cows. In cows 9 years old  $18,03 \pm 10,83$  ( $p < 0,05$ ) follicles were noted. There were obtained  $8,37 \pm 5,87$  oocytes and normal ones —  $3,89 \pm 3,73$ . No relationship was found between the number of ovarian follicles and the quality of oocytes recovered. Using aspiration 80 oocytes out of 185 ovarian follicles were got, while by rupture of 154 follicles 155 oocytes were obtained ( $p < 0,01$ ). Forty five per cent of the oocytes recovered by aspiration were normal morphologically, while from ruptured follicles — 63,2%.

**RICK R. F.: Epidemiologia i przenoszenie *Theileria* sp. u bydła w Australii. (Epidemiology and transmission of *Theileria* sp. of cattle in Australia).** Aust. Vet. J. 59, 89—92, 1982 (3).

Celem badań było wykrycie przenosicieli teileriozy bydła na tych terenach w Australii, na których nie występuje *Boophilus microplus*. Ponieważ na terenach, na których u bydła występowała teilerioza występowały dwa gatunki kleszczy (*Haemophysalis longicornis* i *H. bancrofti*) przebadano je na nosicielstwo pasożytów. Obydwa gatunki kleszczy są wektorami teileriozy. Ponadto zarażenie można było przenieść za pośrednictwem *Ixodes holocyclus* i *Amblyomma triguttatum*. W warunkach naturalnych cielęta zarażały się najczęściej w wieku 4—5 miesięcy życia. Jednakże notowano również zarażenia u cieląt w wieku 1 miesiąca.

G.