

8. Garm O.: Acta Endocrinol. Sup. 3, 1, 1949.
9. Henricson B.: Acta Agric. Scand. 7, 1, 1956.
10. Hinze P. M.: J. Am. vet. med. Ass.: 134, 302, 1959.
11. Holy L.: Vet. Med. Praga, 38, 443, 1965.
12. Holy L.: Proc. IV-Int. Congr. An. Reprod. (Hague), 657, 1961.
13. Jaśkowski L.: Pol. Arch. wet. 14, 359, 1971.
14. Lotthammer K. H., Rigelnik L.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 77, 445, 1970.
15. Marx F.: Ovarialzysten beim Rind und ihre Therapie mit Gestafortin und Prolan-Präparaten. Praca doktorska. Hannover 1964.
16. Pogge S. A.: Untersuchungen über das Lebensschicksal von Rindern mit Ovarialsystem in 14 Herden der sauerländischen Rotbuntzucht. Praca doktorska. Hannover 1971.
17. Pribyl E., Holy L.: Mh. Vet.-Med. 17, 63, 1962.
18. Roberts S. J.: Cornell Vet. 45, 497, 1955.
19. Roberts S. J.: Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. 1-st ed. Edwards Brothers, Ann. Arbor, Mich. 1956.
20. Romaniuk J.: Bull. vet. Inst. Pulawy, 16, 98, 1972.
21. Romaniuk J.: Bull. vet. Inst. Pulawy, 18, 101, 1974.
22. Schjerven L.: Nord. Vet.-Med. 17, 382, 1965.
23. Tenschert H.: Tierärztl. Umsch. 20, 286, 1965.
24. Theodore H., Belling Jr.: Vet. Med. Small Anim. Clin. 59, 477, 1964.
25. Vandeplassche M.: Vlaams diergeneesk. Tijdschr. 20, 176, 1951.
26. Zacchi B.: Proc. IV-Int. Congr. An. Reprod. (Hague) 701, 1961.
27. Zemjanis R., Larson L. L., Bhalla R. P. S.: J. Am. vet. med. Ass. 139, 1015, 1961.

Adres autora: doc. dr habil. Józef Romaniuk, ul. Świerczewskiego 35, 85-224 Bydgoszcz.

Романиук Ю. — Исследования по кистозному поражению яичников у коров в крупных скотоводческих хозяйствах.

Многолетние наблюдения в десяти скотных дворах с учетом 6463 половых циклов у 2198 коров

установили у 667 коров (30,3%) кистозное поражение яичников. В среднем кисты яичников появились при 13% отёлов. Признаки нимфомании зарегистрировали только в 11,7% случаев. У 439 коров (52,3%) поражен был правый яичник, а у 287 (34,2%) левый; двустороннее поражение яичников выступило у 114 коров (13,6%). Заболевание чаще всего в 53,2% появлялось между 61 а 150 днем после отёла. Автор подчеркивает, что кистозное поражение яичников является частой причиной бесплодия и выбраковки коров из стада; 51,5% выбракованных коров становили коровы, больные кистозным поражением яичников.

Romaniuk J. — The investigations on the incidence of ovarian cysts in cows at large farms.

The investigations of 6463 reproductive cycles in 2198 cows at 10 farms carried out through many years showed that 667 (30.3%) cows were affected with ovarian cysts. They occurred on the average following 13.0% of parturitions. The symptoms of nymphomania appeared only in 11.7% of cases. In 439 (52.3%), 287 (34.2%) and 114 (13.6%) animals ovarian cysts were found on the right, left and both ovaries, respectively. The disease occurred most frequently between 61—150 days after parturition; in this period ovarian cysts were found in 447 (53.2%) animals. The disease was the main cause of disposal of cows due to infertility, 51.5% of cows culled as sterile were affected by ovarian cysts.

ZDZISŁAW SMORAĞ

Konserwacja komórek jajowych w niskich temperaturach*)

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

Badania nad zamrażaniem komórek jajowych datują się od 1776 r., kiedy Spallanzani zamrażając jaja jedwabników do temp. —50°C uzyskiwał po czterogodzinnym przechowywaniu ich normalny rozwój (cyt. za 7). Data ta otwiera pierwszy okres w historii zamrażania komórek jajowych trwający do 1949 r. czyli do odkrycia osłaniającej roli glicerolu przy zamrażaniu. W okresie tym stwierdzono, że komórki jajowe są bardziej wrażliwe na uszkodzenia w czasie obniżania temperatury niż plemniki. Stwierdzono ponadto zróżnicowaną odporność na schładzanie komórek jajowych różnych gatunków zwierząt, m. in. wykazano, że jaja niektórych pasożytów i owadów dobrze znoszą mrożenie. Po odkryciu osłaniającej roli glicerolu w procesie zamrażania plemników, próby zastosowania tego związku do konserwacji komórek jajowych przyniosły stosunkowo jeszcze mało zachęcające rezultaty. Powodem niepowodzeń były liczne strukturalne uszkodzenia przypisywane tworzeniu się krysz-

tałów lodu wewnątrz lub w otoczeniu zamrażanych komórek jajowych. Najbardziej wartościowy wynik pochodzący z tego okresu uzyskałi Ferdows i wsp. (2). Zamrażali oni zapłodnione jaja królicze według następującej procedury: przed zamrożeniem zarodki były ekwilibrowane w 10% glicerolu w roztworze solnym przez 10 minut w temp. +2°C. Zamrażanie odbywało się w trzech etapach, a poszczególne etapy różniły się szybkością schładzania. W pierwszym od temp. +2°C do —15°C, szybkość schładzania wynosiła 1°C/10 min., w drugim od temp. —15°C do —30°C spadek temperatury wynosił 1°C/min., a w trzecim etapie zamrażania od —35°C do —79°C schładzanie odbywało się w tempie 1°C/2,5 min. Zamrożone do tej temperatury komórki jajowe były przechowywane w zestalonym CO₂. Rozmrażanie następowało w temperaturze pokojowej. Skuteczność zamrażania oceniano na podstawie transplantacji. Transplantowano 65 zarodków ośmiu samicom, z których u dwu stwierdzono dalszy rozwój zarodków. U jednej samicy

*) Praca wykonana w ramach problemu 132-E.

stwierdzono osiem a u drugiej dziesięć rozwijających się płodów. Na uwagę zasługują również badania Shermana i Theh Ping Lin (6) oraz Shermana (7). Wymienieni autorzy stwierdzili dodatni wpływ wolnego schładzania na przeżywanie nie zapłodnionych komórek jajowych myszy.

W 1971 r. ukazała się praca Whittinghama (9) donosząca o uzyskaniu dobrych wyników przeżywania zamrożonych zarodków myszy przy użyciu poliwinylpyrolidyny (PVP) jako czynnika osłaniającego. Rezultaty nie zostały jednak powtórzone, a sam autor podaje (10), że wysoki wynik udało się uzyskać jedynie przy półgodzinnym przechowywaniu komórek w temperaturze -79°C .

Podstawą do opracowania teoretycznych założeń dla zamrażania komórek jajowych obecnie stosowanymi metodami stały się osiągnięcia kriobiologii ostatnich lat (3, 4). Autorzy ci dokonali wyliczeń, z których wynikało, że dla mrożenia komórek tej wielkości jakimi są zarodki ssaków przy użyciu dwumetylosulfotlenku jako czynnika ochronnego, wymagana jest szybkość schładzania wynosząca ok. $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Bazując na tych założeniach Whittingham i wsp. (10) oraz Wilmut (18) jako pierwsi uzyskali ponad 50% przeżywających po rozmrożeniu zarodków myszy. Z badań wyżej wymienionych autorów wynikało, że najważniejszymi czynnikami decydującymi o wysokim stopniu przeżywania zamrożonych zarodków myszy jest wolne schładzanie, wynoszące od 0,2 do $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$., (przy czym wiadomo już teraz, że optymalna szybkość schładzania wynosi 0,2 do $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$.), rozmrażanie utrzymujące się w granicach od 4 do $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$. oraz użycie DMSO jako czynnika ochronnego.

W dalszych doświadczeniach nad zamrażaniem zapłodnionych komórek jajowych myszy badano wpływ szeregu innych czynników na rezultaty zamrażania. I tak Whittingham (11) badał wpływ temperatury rozcieńczania DMSO stwierdzając, że temp. 37°C jest najkorzystniejsza. Również Whittingham i Whitten (12) badali wpływ czasu przechowywania na przeżywalność zamrożonych zarodków nie stwierdzając ujemnego wpływu ośmiomiesięcznego przechowywania w ciekłym azocie na ich późniejszy rozwój. Wilmut (17) potwierdził konieczność wolnego zamrażania (od 0,2 do $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.) oraz szybkość rozmrażania od 4 do $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. dla uzyskania optymalnych wyników zamrażania. Smorąg i wsp. (8) w badaniach nad temperaturami posiewania stwierdzili, że minimalną temperaturą posiewania przy zamrażaniu zapłodnionych komórek jajowych myszy jest temperatura -8°C . Dalsze obniżanie temperatury posiewania pociąga za sobą spadek przeżywania zapłodnionych komórek jajowych.

Prowadzono też badania nad zamrażaniem komórek jajowych szczura i królika. Whittingham (14) mroząc zarodki szczura uzyskiwał odsetek nieuszkodzonych zarodków sięgających

do 84%. Autor otrzymywał najlepsze wyniki przy szybkości mrożenia wynoszącej od 0,6 do $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Niską efektywność transplantacji zamrożonych zarodków szczura (ok. 10%) autor przypisuje błędom przy samej transplantacji. Również najlepsze wyniki zamrażania komórek jajowych królika uzyskiwano przy wyższych niż w przypadku zamrażania zarodków myszy szybkościach chłodzenia. Whittingham i Adams (13) mroząc zarodki tego gatunku otrzymali najlepsze wyniki przy szybkości schładzania $0,76$ i $0,86^{\circ}\text{C}/\text{min}$. oraz rozmrażania $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (odpowiednio 83 i 77% rozwijających się zarodków do stadium blastocysty). Autorzy ci stwierdzili ponadto, że schładzanie zarodków do temperatury od -110 do -120°C zamiast do -80°C przed przeniesieniem ich do ciekłego azotu, istotnie polepszało rezultaty zamrażania. Na 22 transplantowane bezpośrednio po rozmrożeniu komórki jajowe urodziły się 4 młode (17%). Natomiast transplantacja 34 zarodków hodowanych po rozmrożeniu przez 48 godzin nie przyniosła pozytywnych rezultatów z tym, że dwa implantanty stwierdzone w ósmym dniu zostały zresorbowane w 13 dniu ciąży. Bank i Maurer (1) mroząc zarodki królicze również z szybkością $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. otrzymywali wyniki w granicach 50% zdolnych do dalszego rozwoju komórek jajowych, przy czym oceny przeżywalności dokonywali na podstawie dalszego rozwoju do stadium blastocysty lub na podstawie transplantacji.

Z praktycznego punktu widzenia najistotniejszym problemem jest opanowanie zamrażania zarodków zwierząt gospodarskich, a szczególnie krowy. Skuteczne zamrażanie komórek jajowych rozwiązałoby bowiem jeden z głównych problemów w transplantacji, jakim jest konserwacja zygot. Mimo dużej wagi problemu stosunkowo niewiele jeszcze prac wykonano z tego zakresu. Dotychczas uzyskane wyniki jakkolwiek odbiegają znacznie od tych, jakie uzyskuje się przy zamrażaniu zarodków zwierząt laboratoryjnych a szczególnie myszy, jednak roszą nadzieję na rozwiązanie tego problemu. Pierwsze doświadczenie nad zamrażaniem zapłodnionej komórki jajowej krowy przeprowadzili Wilmut i Rowson (16). Zamrażali oni zarodki w stadium późnej blastocysty uzyskane między 10 a 13 dniem ciąży. Jako czynnika kriochronnego używali PVP, cukrów oraz DMSO. Najkorzystniejszym związkiem osłaniającym okazał się DMSO użyty w stężeniu 2 M. Mrożenie odbywało się z szybkością $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$., a rozmrażanie z szybkością $360^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Rozmrażane z mniejszą szybkością zarodki ($60^{\circ}\text{C}/\text{min}$.) okazały się całkowicie zniszczone. Konieczność stosowania tak dużej szybkości rozmrażania jest związana według opinii autorów z brakiem otoczki przejrzystej, której blastocysty znajdujące się w tym stadium rozwoju już nie posiadają. Po sześciodniowym przechowywaniu w temp. -196°C transplantowano następnie 21 w ten sposób zamrożonych blasto-

cyst 11 krowom. Część zarodków (7 sztuk) była transplantowana po 24-godzinnej hodowli *in vitro*, a część (14) bezpośrednio po rozmrożeniu. W wyniku przeprowadzonych transplantacji urodził się jeden buhajek. W następnym próbach zamrażania zarodków krwi osiągnięto podobne rezultaty. Na 26 zamrożonych morul 2 rozwinęły się po ich transplantacji (5).

Dotychczasowe doświadczenia przeprowadzane nad zamrażaniem zarodków owcy wskazują na ich większą odporność na przechowywanie w obniżonej temperaturze w porównaniu z zapłodnionymi komórkami jajowymi krwi. Polge i wsp. (5) stwierdzili rozwój w jajowodzie królika wszystkich morul owczych uprzednio schłodzonych do temp. 0°C. Natomiast Willadsen i wsp. (15) zamrażając 5—8 dniowe zarodki tego gatunku przy użyciu metod zbliżonych do stosowanych przy zamrażaniu komórek jajowych myszy uzyskali również zachęcające rezultaty. Na 51 odzyskanych po zamrożeniu zarodków tylko 6 było całkowicie zniszczonych. Z pozostałych 45 uznanych za morfologicznie normalne 35 zarodków przeniesiono do jajowodów królika. Po 1—2 dniach przebywania w jajowodzie 9 z 35 odzyskanych komórek posiadało normalny wygląd i były transplantowane 7 owcom. U pięciu owiec, którym wszczepiono 6 zarodków stwierdzono w dwa i pół do trzech miesięcy później zawartość progesteronu w krwi sugerującą ciążę. Natomiast 9 zarodków transplantowano bezpośrednio po rozmrożeniu czterem biorczyniom. W trzecim miesiącu u dwu owiec, z których każda otrzymała po dwa zarodki, stwierdzono również zawartość progesteronu w krwi sugerującą ciążę.

RICHARDSON A., PARKE J. A. C.: Test skórny do wykrywania latentnych zakażeń *Salmonella dublin* u cieląt. (A skin test to identify latent *S. dublin* infection in calves). Vet. Rec. 97, 15—16, 1975 (1).

Występowanie w zakażeniach salmonelowych odporności typu komórkowego na antygeny rybosomalne wskazuje na możliwość wykorzystania reakcji typu nadwrażliwości późnej do wykrywania zakażeń latentnych wywoływanych u cieląt przez *Salmonella dublin*. Odczyny skórne wykonano u cieląt zaszczepionych na 21 dni przed wykonaniem zabiegu żywą szczepionką *S. dublin* (szczep HWS 51). Jako alergeny stosowano trzy preparaty uzyskane z rybosomów *S. dublin* wg metody Venneman i Bigley. Alergen w ilości 0,1 ml podawano śródskórnie w okolicy szyi i wyniki odczytywano po 6, 12, 24, 30, 48, 54 i 72 godzinach. U wszystkich szczepionych sztuk stwierdzono bardzo wyraźne różnice w grubości fałdu skórniego przed i po zabiegu. Różnice te były zaznaczone najwyraźniej po 30 godzinach. Ponadto w miejscu iniekcji alergenu występowały nacieki złożone z makrofagów, limfocytów i komórek wielojądrowych.

G.

ASNANI P. J., AGARVAL S. C.: Patogenność serotypów mikoplazm izolowanych od kur dla zarodków jaja kurzego. (Pathogenicity of avian mycoplasma serotypes for embryonated chicken eggs). Acta microbiol. hung. 22, 241—243, 1975 (3).

Przebadano patogenność 47 szczepów *Mycoplasma gallisepticum* należących do jednego z 8 serotypów (A, B, S, E, L, M, P i R) dla 7-dniowych zarodków ku-

Najbardziej wrażliwymi na ochłodzenie komórkami jajowymi ze wszystkich dotychczas badanych wydają się być zarodki świni. Żaden z ochłodzonych zarodków tego gatunku nie przeżywał bowiem obniżenia temperatury do 0°C, a śmierć ich następowała już między +10 a +15°C (6).

Reasumując można stwierdzić, że dotychczasowe metody w zakresie zamrażania zarodków zwierząt gospodarskich nie zabezpieczają jeszcze wyników na poziomie umożliwiającym ich praktyczne zastosowanie. Jednakże pozytywne rezultaty uzyskane w wyniku już przeprowadzonych nielicznych jeszcze doświadczeń wskazują na możliwość dalszego postępu.

Piśmiennictwo

1. Bank H., Maurer R.: Expl. Cell Res. 89, 188, 1974.
2. Ferdows M., Moore C. L., Dracy A. E.: J. Dairy Sci. 41, 739, 1958.
3. Mazur P., Schmidt J.: Cryobiology 5, Nr 1, 1968.
4. Mazur P.: Science 168, 939, 1970.
5. Polge C., Wilmut J., Rowson L. E. A.: Society for Cryobiology. 11 annual meeting, London 1974.
6. Sherman J. K., Theh Ping Lin: Fert. Steril. 10, 384, 1959.
7. Sherman J. K.: Cryobiology 1, Nr 2, 1964.
8. Smorąg Z., Kątska L., Wierzbowski S.: Roczniki Naukowe Zootechniki (w druku).
9. Whittingham D. G.: Nature 23, 125, 1971.
10. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P.: Science 178, 411, 1972.
11. Whittingham D. G.: J. Reprod. Fert. 37, 159, 1974.
12. Whittingham D. G., Whitten W. K.: J. Reprod. Fert. 36, 433, 1974.
13. Whittingham D. G., Adams C. E.: Society for Cryobiology. 11 annual meeting, London 1974.
14. Whittingham D. G.: J. Reprod. Fert. 43, 575, 1975.
15. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A., Moore R. M.: Society for Cryobiology. 11 annual meeting, London 1974.
16. Wilmut I., Rowson L. E. A.: Vet. Record, June 30th, 686, 1973.
17. Wilmut I.: Society for Cryobiology. 11 annual meeting, London 1974.
18. Wilmut I.: Life Sciences 11, 1071, 1972.

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

rzycz. Przed przystąpieniem do określania patogenności szczepy mikoplazm przepasazowano trzykrotnie przez 7-dniowe zarodki kurze, które zakażano 0,2 ml hodowli płynnej do woreczka żółtkowego. Badania przeprowadzone na zarodkach wykazały, że szczepy należące do serotypów B, E, G, C M i P nie były patogene. Wszystkie zakażone zarodki przeżywały przez okres 12 dni. Wśród 27 szczepów należących do serotypu A jedynie 2 szczepy nie były patogene. Pozostałe szczepy powodowały śmierć zarodków w 75—100% w ciągu 9 dni po zakażeniu. Ponadto 1 szczep należący do serotypu C i 4 szczepy należące do serotypu R powodowały śmierć 50% zakażonych zarodków w ciągu 3—7 dni. U zamarłych zarodków obserwowano powiększenie wątroby, wybroczyny na skórze i obrzęki. Z serowatych złogów nagromadzonych w jamie brzusznej izolowano w czystej kulturze mikoplazmy.

G.

ANDERSON M. G.: Wpływ wysiłku na poziom metabolitów krwi u koni. (The effect of exercise on blood metabolite levels in the horse). Equine vet. J. 7, 27—33, 1975 (1).

Prześlędzono na 9 klinicznie zdrowych koniach w wieku 4—15 lat wpływ wysiłku na poziom glukozy, mleczanu, pirogronianu, wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu w surowicy krwi. Stężenie pirogronianu i mleczanu oraz stosunek mleczan:pirogronian wzrastały w sposób istotny w trakcie wysiłku, szczególnie po galopie. Zmiany te pojawiały się już w ciągu 12—15 sekund. Wzrost stężenia glicerolu przemawiał za szybkim uczynnieniem w trakcie wysiłku lipidów.

G.