

29. Hiwada K., Wachsmuth E. D.: Biochem. J., 141, 293, 1974.
 30. Inglis N. R., Kirley S., Stolbach L. D., Fishman W. M.: Cancer Res. 33, 1657, 1973.
 31. Johnson A. D., Gomes W. R., Vandemerck N. L.: The Testis vol. II, Academic Press, N. Y., London 1970.
 32. Linden G., Mazon P., Michalewski J. B., Alais C.: Biochim. biophys. Acta 358, 82, 1974.
 33. Montem K. A., Glover T. D.: J. Reprod. Fert., 29, 65, 1972.
 34. Moog F., Vire H. R., Grey R. D.: Biochim. biophys. Acta 113, 336, 1966.
 35. Nakayama T., Yoshida M., Kitamura M.: Clinica chim. Acta, 30, 546, 1970.
 36. Nowacki W.: Medycyna Wet. 32, 479, 1976.
 37. Opińska-Blauth J.: Post. Hig. 29, 665, 1975.
 38. Petkov Z. Z., Ivanov I. N., Kichev G. K.: C. r. Acad. bulg. agric. Sci. 26, 1553, 1973.
 39. Pivko J., Majerciak P., Smidt D.: Züchtungskunde 46, 351, 1974.
 40. Prasad M. R. N., Rajalakshmi M.: J. Reprod. Fert. 18, 215, 1973.
 41. Rajalakshmi M., Prasad M. R. N.: J. Endocr. 41, 471, 1968.
 42. Rajalakshmi M., Prasad M. R. N.: J. Endocr. 44, 879, 1969.
 43. Roussel J. D., Stallcup O. T.: J. Reprod. Fert. 12, 423, 1966.
 44. Sagen N., Haram K., Ramsto I.: Acta Obstet. gynecol. scand. 55, 207, 1976.
 45. Saini P. K., Done J.: Biochim. biophys. Acta 258, 147, 1972.
 46. Sakoyama Y.: Seibutsu Butsuri Kagaku 20, 31, 1976.
 47. Stallcup O. T.: J. Dairy Sci. 48, 752, 1965.
 48. Strzeżek J.: Zesz. nauk. ART Olsztyn, Zootechnika 7, 3, 1974.
 49. Strzeżek J., Glogowski J.: Proc. III-th Intern. Symp. Immunol. Warna 60, 1975.
 50. Strzeżek J., Wołos A.: Medycyna Wet., 28, 174, 1972.
 51. Strzeżek J., Wołos A.: Zesz. probl. Nauk roln., 176, 197, 1976.
 52. Sussman H. H., Bowman M.: Nature, Lond. 218, 359, 1969.
 53. Szczekliki E. (pod redakcją) Enzymologia kliniczna, PZWŁ Warszawa 1974.
 54. Wachsmuth E. D., Hiwada K.: Biochem. J., 141, 273, 1974.
 55. Wilson E. W. i wsp.: Fert. Steril. 27, 299, 1976.
 56. Zahariev Z., Kichev G., Ivanov I.: C. R. Acad. Sci. agric. Bulg. 7, 79, 1974.
 57. Zeneveld L., Dragoje B. M., Schumacher G. F. B.: Sciences 177, 702, 1972.
 58. Žilcov Z.: Sbornik naucz. trudov Dubrovicy 1, 1974.

Adres autora: dr Jan Glogowski, Bl. Zoot. p. 233, 10-718 Olsztyn-Kortowo.

STEEN M. WILLADSEN, MARIAN TISCHNER

Międzynarodowa wymiana zarodków owiec przechowywanych in vitro w ciągu 21 miesięcy

Z Zespołu Fizjologii i Biochemii Rozrodu Zwierząt Instytutu Fizjologii Zwierząt, ARC w Cambridge, Anglia
 Z Zespołu Rozrodu Zwierząt Instytutu Stosowanej Fizjologii Zwierząt AR w Krakowie

Bardzo cennym uzupełnieniem techniki transplatacji zarodków stała się w ostatnich latach możliwość ich długotrwałej konserwacji w ciekłym azocie (2). Dzięki tej metodzie została wyeliminowana konieczność stosowania synchronizacji cyklu rujowego u dawcy i biorecy a ponadto została ułatwiona wymiana embrionów na większą odległość.

Celem przeprowadzonego eksperymentu była próba międzynarodowej wymiany zarodków owiec zamrożonych w ciekłym azocie.

Materiał i metody

Maciorki rasy walijska owca górską, pokryte trykiem krzyżówką Jacobs'a użyto jako dawców zarodków. Wczesne zarodki uzyskiwano metodą chirurgiczną w pracowni Zespołu Fizjologii i Biochemii Rozrodu Zwierząt, Instytutu Fizjologii Zwierząt, ARC w Cambridge, Anglia w dniu 31 października 1976 r. Od jednej maciorki po hormonalnej superowulacji uzyskano w 6 dniu od początku rui jedenaście zarodków, w stadium późnej moruli (50–60 komórkowe).

Zarodki przechowywano przez kilka godzin w temperaturze pokojowej w roztworze buforu fosforano-

Tab. 1. Postępowanie przy zamrażaniu i rozmrażaniu zarodków owiec (wg S. M. Willadsena i wsp. (2))

A. Zamrażanie

1. Laparotomia i wypłukiwanie zarodków przy użyciu buforu fosforanowego (PBS), (1) z układu rodnego superowulowanych macierek,
2. Przechowywanie uzyskanych zarodków w PBS w temperaturze pokojowej do 3 godzin,
3. Stopniowe dodawanie w temperaturze pokojowej DMSO (dymetylosulfoleńku) tak, aby końcowa koncentracja DMSO wynosiła 1,5 M.
 Cztery etapy: 0,25 M DMSO w PBS : 5 minut
 0,5 M DMSO w PBS : 5 minut
 1,0 M DMSO w PBS : 10 minut
 1,5 M DMSO w PBS : 20 minut
4. Umieszczenie zarodków w probówkach (0,5 × 5,5 cm), zawierających 0,2 ml 1,5 M DMSO w PBS i schładzanie do temp. -7°C z szybkością 1°C/min.
5. Zapoczątkowanie krystalizacji poprzez „posiew” kryształków na mrożoną pożywkę,
6. Mrożenie z szybkością 0,3°C/min. do -65°C, a od temperatury -65°C do -120°C z szybkością 1°C/min.
7. Przeniesienie probówek do ciekłego azotu.

B. Rozmrażanie

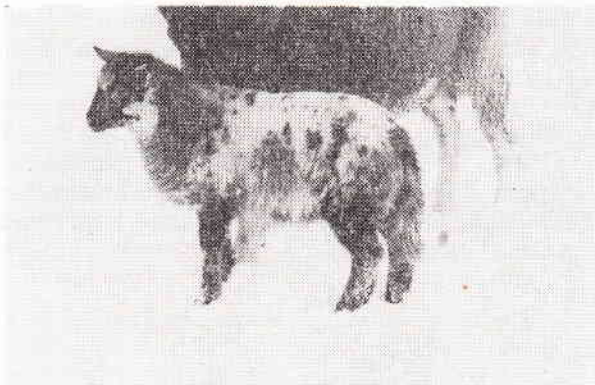
1. Przeniesienie probówek do temperatury -100°C i rozmrażanie z szybkością 10°C/min. do temperatury -10°C,
2. Natychmiastowe podgrzanie do temperatury pokojowej,
3. Usuwanie DMSO z PBS w temperaturze pokojowej:

Sześć etapów: 1,5 M DMSO w PBS : 5 minut
 1,25 M DMSO w PBS : 10 minut
 1,0 M DMSO w PBS : 10 minut
 0,75 M DMSO w PBS : 10 minut
 0,5 M DMSO w PBS : 10 minut
 0,25 M DMSO w PBS : 10 minut
 PBS DMSO w PBS : 10 minut

4. Hodowla in vitro przez 24 godziny w PBS + 20% surowicy owczej pod ciśnieniem powietrza w temp. +38°C lub transplantacja.

wego (phosphate buffered saline) PBS (1), a następnie przeprowadzono je przez kolejno wzrastające stężenia roztworu dwumetylosulfotlenku (dimethylsulfoxide) DMSO i umieszczono ostatecznie w zamkniętych próbkach zawierających roztwór PBS o stężeniu 1,5 M DMSO. Proces zamrażania przeprowadzono z szybkością 0,3°C/min. do temperatury -100°C, a następnie zanurzone próbki w ciekłym azocie, gdzie przebywały przez 21 miesięcy.

Proces zamrażania i rozmrażania zarodków przeprowadzono wg metody Willadsena i wsp. (2), podanej w tab. 1.



Ryc. 1. Jagnię urodzone w wyniku transplantacji zarodka przywiezionego z Anglii do Polski, przechowywanego *in vitro* przez 21 miesięcy. Ze względu na charakterystyczne umaszczenie (pstrokate) zostało nazwane „Biedronką”

Fot. L. Pizlo

W sierpniu 1977 r. zarodki zostały przewiezione samochodem z Anglii do Polski w kontenerze z płynnym azotem. Jako biorecipientów przygotowano 3 maciorki rasy długowłosej odmiany rząskowskiej, które zostały wybrane ze stada w okresie rui przez tryka próbniaka.

W dniu 10 sierpnia 1977 r. zarodki zostały rozmrożone z szybkością 12°C/min. Chirurgiczny zabieg transplantacji przeprowadzono w pracowni w Przegorzałkach w Zespole Rozrodu Zwierząt, Instytutu Stosowanej Fizjologii Zwierząt, AR w Krakowie.

Wyniki i omówienie

Po rozmrożeniu uzyskano 10 zarodków, z których 8 przeszło proces konserwacji w płynnym azocie prawidłowo i bez widocznych zmian. Po usunięciu DMSO, 6 zarodków przeszczepiono chirurgicznie do macierek biorecipientów. U jednej z macierek po wykonaniu laparotomii stwierdzono zmiany w macicy charakteryzujące się nadmiernym wypełnieniem płynem surowiczym i nastrożeniem naczyń krwionośnych. Cztery zarodki o zdecydowanym wyglądzie normalnych morul wszczepiono do macic dwóch macierek, które były w 6 dniu po rui. Do każdego rogu macicy transplantowano po jednej moruli.

Dwie maciarki zaszły w ciążę. Jedna z nich w dniu 20.XII.1977 r. urodziła martwe, normalnie rozwinięte bliźnięta (tryczek 3 kg, maciorka 3 kg). Druga natomiast urodziła zdrowe jedno jagnię (maciorkę) o ciężarze ciała 4,2 kg. Rozwój jagnięcia przebiegał prawidłowo, w wieku 6 miesięcy jego ciężar wynosił około 40 kg. Ze względu na umaszczenie (pstrokate) charakterystycz-

ne dla ras owiec angielskich zostało nazwane „Biedronką” (ryc. 1).

O ile nam wiadomo, jest to pierwsza udana próba wymiany międzynarodowej zamrożonych zarodków owiec. Także okres przechowywania zarodków w ciekłym azocie był dłuższy (21 miesięcy) niż we wcześniejszych doświadczeniach. Można zatem określić, że urodzone jagnię jest „młodsze” o 21 miesięcy.

Pomimo, że eksperyment został przeprowadzony na małą skalę, to jednak uzyskany wynik wskazuje, że użyte metody mogą być również wykorzystane dla szerszej wymiany materiału genetycznego nawet pomiędzy bardzo odległymi krajami.

Piśmiennictwo

1. Whittingham D. G.: Nature. Lond. 233, 125, 1971.
2. Willadsen S. M., Trounson A. O., Polge C., Rowson L. E. A., Neucomb R.: In egg transfer in cattle. E. E. C. Symposium, 117, 1976.

Adres autora: doc. dr habil. M. Tischner, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków.

Autorzy składają podziękowanie dr W. R. Allenowi za przywiezienie zarodków z Anglii do Polski oraz pomoc przy zabiegu transplantacji oraz prof. dr habil. W. Bielańskiemu za pomoc i cenne uwagi przy wykonywaniu zabiegu transplantacji, a także doc. dr habil. T. Piestrakowi za udostępnienie macierek biorecipientów.

Вилладсен С. М., Тишнер М. — Международный обмен зародками овец, хранимыми *in vitro* в течение 21 месяца.

В 1977 г. привезли из Англии в Польшу автомобилем зародки овец, замороженные в жидком азоте. Четыре нормальных эмбриона трансплантировали хирургически в матку двух овцематок на 6 день цикла охоты. Обе овцематки забеременели. Одна родила мертвых близнецов. Вторая же уже родила одного здорового ягненка.

Willadsen S. M., Tischner M. — International exchange of sheep embryos stored for 21 months *in vitro*.

Deep frozen embryos were transferred in 1977 from England to Poland by car. Four of them were transplanted surgically to the uterus of the ewes on day 6 of their oestrus cycles. Both ewes became pregnant. One delivered still-born twins, the other produced a healthy single lamb.

DIXON R. J., HARTLEY W. J., HUTCHINS D. R., LEPHERD E. E., FEILENTE JONES R. F., LORE D. N., SABINE M., WALLS A. L.: Wokółporodowa śmiertelność źrebiąt związana z zakażeniem herpeswirusami. (Perinatal foal mortality associated with a herpesvirus). Aust. vet. J. 54, 103—105, 1978 (3).

Opisano przypadek szybkiego padania (30 minut po urodzeniu) źrebiąt przedwcześnie urodzonych oraz liczne padnięcia u źrebiąt w wieku 18—24 godzin życia. Na czoło objawów klinicznych wysuwała się gorączka, przyśpieszenie oddechów i akcji serca, leukopenia i neutropenia. Badania sekcyjne wykazały obrzęk płuc oraz liczne wybroczyny pod opłucną i w śródpiersiu. U części padłych źrebiąt obserwowano wybroczyny i wylewy krwawe pod nasierdziem i w sierdziem komór serca, przekrwienie, obrzęk i wybroczyny w kręzkowych węzłach chłonnych i korze nadnerczy, wybroczyny pod torebką śledziony oraz przekrwienie bierne opon miękkich. Wirus o działaniu cytotoksycznym na komórki hodowli jednowarstwowej nerki psa wyizolowano z płuc, wątroby i popłuczyny oskrzeli.

G.