

zakresie inspirowania, rozwijania i upowszechniania prac naukowo-badawczych, wniosła trwałe wartości do polskiej medycyny weterynaryjnej i tym samym dobrze zasłużyła się dla polskiej nauki i zawodu weterynaryjnego. Uchwała jest równocześnie pochwałą czynu dla

tych, którzy uczestniczyli w powstaniu Sekcji, wchodzili w skład jej kierownictwa i wszystkich, którzy aktywnie przyczynili się do jej rozwoju”.

Adres autora: prof. dr hab. Kazimierz Roslanowski, Osiedle Przyjaźni 13/153, 61-687 Poznań

JACEK JURA

## Metody oceny zarodków ssaków

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt, Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa

Z zastosowaniem metody przenoszenia zarodków u ssaków wiąże się wiele oczekiwań. Przede wszystkim metoda ta stwarza szansę zwiększenia liczby potomstwa od samic o najwyższej wartości hodowlanej. Całość postępowania rozpoczyna się od pobrania możliwie dużej liczby zarodków i oceny ich przydatności do przenoszenia i dalszego rozwoju.

### Ogólna charakterystyka zarodków ssaków

Pobranie zwiększonej liczby zarodków umożliwia superowulacja, wywoływana odpowiednimi dawkami hormonów. W przypadku jałówek lub krów, którym podawano gonadotropiny, owulacja rozpoczyna się po upływie około 24 godzin, licząc od początku rui.

Pierwszy podział bruzdkowania rozpoczyna się w 48 godzinie po zapłodnieniu komórki jajowej (ryc. 1B). Bruzdkowanie u ssaków jest równomierne lub prawie równomierne, a formowanie się wrzecion podziałowych nie jest zsynchronizowane (13). W wyniku bruzdkowania asynchronicznego zarodek złożony jest z

parzystej lub nieparzystej liczby blastomerów: 2, 3, 5, 6... W około 78 godzinie rozwoju zarodek osiąga stadium 8 blastomerów (ryc. 1D). Blastomery w tym stadium są dobrze widoczne w mikroskopie świetlnym i dość luźno rozmieszczone pod osłoną przejrzystą. Po tym okresie zarodek podlega głębokim przeobrażeniom.

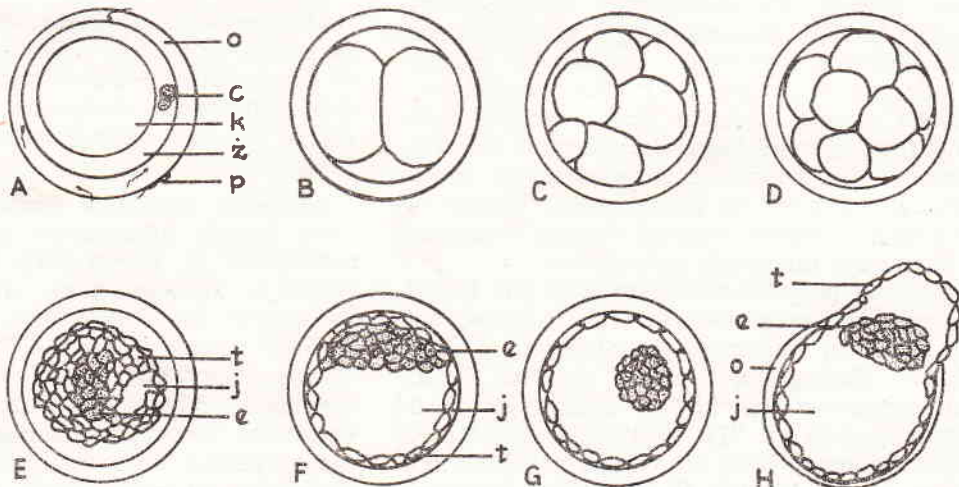
Blastomery skupiają się, nawiązują ściślejsze kontakty i segregują się w dwa zespoły: zewnętrzny i wewnętrzny. Zespół zewnętrzny złożony jest z liczniejszych blastomerów i o mniejszych rozmiarach niż zespół blastomerów wewnętrznych. W 6 dniu rozwoju zarodek osiąga stadium moruli, zbudowany jest wtedy z około 32 blastomerów. Zespół blastomerów wewnętrznych jest nieliczny, złożony z 3—5 komórek (6).

W kolejnych etapach blastomery dzielą się dalej, ale mniej intensywnie niż poprzednio i wydzielają płyn gromadzący się w przestrzeni pomiędzy zespołami blastomerów. Ciśnienie gromadzącego się płynu powoduje układanie się blastomerów zespołu zewnętrznego na obwodzie zarodka, a zespół blastomerów wew-

Lokalizacja:

jajowód

macica



Ryc. 1. Schematy kolejnych stadiów wczesnego rozwoju zarodka krowy

Objaśnienia: A — zapłodniona komórka jajowa; B — stadium 2 blastomerów, ok. 48 godz. rozwoju; C — stadium 6 blastomerów, ok. 72 godz. rozwoju; D — stadium 8 blastomerów, ok. 78 godz. rozwoju; E — wczesna blastocysta, 6—7 dzień rozwoju; F — blastocysta, 7—8 dzień rozwoju; G — późna blastocysta, 8 dzień rozwoju; H — uwalnianie się zarodka z osłony przejrzystej, 9 dzień rozwoju; c — ciało kierunkowe; e — embrioblast; j — jama blastocysty; k — komórka jajowa; o — osłona przejrzysta; p — plemnik; t — trofoblast; z — przestrzeń okołozótkkowa.

nętrnych zostaje zepchnięty na jeden z jego biegunów (ryc. 1E). W wyniku tych procesów, w 7—8 dniu rozwoju zarodek osiąga stadium blastocysty (ryc. 1F). Zespół blastomerów tworzących ścianę blastocysty określa się jako trofoblast, zespół komórek wewnętrznych jako węzeł zarodkowy albo embrioblast. Po upływie około 8—9 dni zarodek uwalnia się od osłony przejrzystej (ryc. 1H). Od początku bruzdkowania, aż do osiągnięcia stadium blastocysty, zarodek zachowuje kształt kulisty, po tym okresie wydłuża się i przyjmuje zarys nieregularnie owalny (6, 19). Lokalizację zarodka w układzie rozrodczym krowy, w określonym stadium rozwojowym, ilustruje ryc. 1. Średnica zarodka, od stadium 2-blastomerowego, do stadium blastocysty wynosi 0,14 do 0,17 mm, w stadium blastocysty — 0,18 do 0,20 mm. W okresie uwalniania się zarodka z osłony przejrzystej dłuższa jego oś mierzy 0,20 do 0,80 mm.

W przypadku bydła domowego, do zabiegów przenoszenia najbardziej przydatne są zarodki w wieku 7—8 dni, to jest w stadium moruli lub blastocysty, o kształcie kulistym (1, 23), ale pobiera się także zapłodnione komórki jajowe lub zarodki w okresie bruzdkowania.

#### Ocena morfologiczna

Ocenę przeprowadza się pod mikroskopem świetlnym stereoskopowym, przy użyciu powiększeń 50 do 100 $\times$ . Zarodek umieszcza się w naczyniu szklanym i zanurza w niewielkiej objętości płynu PBS, uzupełnionym albuminą z surowicy bydłowej, glukozą, penicyliną i pirogronianem sodu, o pH 7,2. Wszystkie czynności związane z oceną przeprowadza się w sterylnej komorze, w temperaturze 37°C.

Odróżnienie zapłodnionej komórki jajowej od niezapłodnionej, przed podziałami bruzdkowania, jest stosunkowo proste. Zapłodnioną komórkę jajową charakteryzuje występowanie drugiego ciała kierunkowego w przestrzeni okołoośłtkowej i obecność plemników w osłonie przejrzystej (ryc. 1A). Niezapłodnioną komórkę jajową cechuje brak wymienionych elementów, a prócz tego, obkurczanie się cytoplazmy i nieprawidłowe rozmieszczenie materiałów zapasowych w cytoplazmie. Degenerujące komórki jajowe cechują zwłaszcza skupienie barwnego materiału cytoplazmy.

Ocenianie przydatności zarodków już bruzdkujących do przeniesień jest trudniejsze, wymaga bardziej złożonego postępowania i dużej praktyki. Szczególną trudność sprawia odróżnienie zarodków prawidłowo bruzdkujących od degenerujących (7, 21). W tym przypadku, w różnych laboratoriach, stosowane są różne skale ocen (9, 10, 11, 19). W Zakładzie Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki w Balicach stosowana jest trzystopniowa skala oceny. Zarodki bydła, przeznaczone do przeniesień, klasyfikuje się do trzech grup (9, 23).

Pierwszy krok, to odróżnienie zarodków rozwijających się prawidłowo od rozwijających się nieprawidłowo. Do normalnie rozwijających się zarodków zalicza się te, które znajdują się w stadium rozwojowym zgodnym z okresem czasu, który upłynął od owulacji, o budowie symetrycznej, charakteryzujące się prawidłowym turgorem blastomerów, intensywnym i prawie równomiernym zabarwieniem cytoplazmy. W trzystopniowej skali ocen, najwyższą uzyskuje zarodki uznane za prawidłowe, o blastomerach regularnych i prawie równej wielkości. Niższą oceną obejmuje się zarodki, które mają blastomery nierównej wielkości, uszkodzone błony komórkowe i słabo wykształcony materiał barwny cytoplazmy. Za całkowicie odbiegające od normy uznaje się te zarodki, które są w stadium rozwojowym opóźnionym w odniesieniu do owulacji i wykazują nienormalności w morfologii. Analiza przeprowadzonych dotychczas przeniesień wykazała istotną zależność pomiędzy oceną a uzyskanymi wynikami przeniesień. Najlepsze wyniki uzyskano po przeniesieniu tych zarodków, które oceniono powyżej według omówionej trzystopniowej skali ocen. Należy jednak podkreślić, że jednoznaczna ocena zarodków bruzdkujących jest trudna. W niektórych przypadkach zarodki ocenione jako nienormalne, po przeniesieniu mogły się rozwijać w normalnie ukształtowane organizmy. Z badań wynika, że zarodki ocenione jako nienormalne są zdolne do prawidłowego rozwoju w proporcji 1:6 (20).

Omówiona dotychczas metoda oceny jest metodą podstawową, opartą o cechy morfologiczne, które często uzupełnia się jeszcze innymi sposobami klasyfikowania zarodków.

#### Hodowla zarodków *in vitro*

Możliwość oceny szczególnie poszerza hodowla zarodków *in vitro*. Hodowla *in vitro* stanowi sprawdzian zdolności rozwojowych zarodka, daje możliwość śledzenia procesów rozwojowych, a więc uzupełnia morfologiczną ocenę zarodków.

Hodowla zarodków bydłych i owczych *in vitro* została opanowana w 1972 r. Pierwszy zastosował ją Tervit (21). Posłużył się syntetycznym środowiskiem płynnym, o składzie zbliżonym do płynów występujących w jajoowodach owcy (SOF — Synthetic Oviduct Fluid), który nasycał 5% CO<sub>2</sub> lub mieszaniną o składzie: 90% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>. Środowisko wysyczone podaną mieszaniną gazów okazało się dla zarodków korzystniejsze. Uzyskano rozwój zarodków od zapłodnienia do stadium moruli, a także rozwój od stadium 8 blastomerów do późnej moruli lub blastocysty. W wyniku przeniesienia 4 zarodków, hodowanych *in vitro* w środowisku z mieszaniną gazów, uzyskano 4 prawidłowe ciążę (21).

W kolejnych latach ulepszono metody hodowli zarodków *in vitro*. Renard i wsp. (13, 14, 15) pobierali zarodki w 6 lub 7 dniu rozwoju, hodowli *in vitro* 2 do 4 dni w płynie Brinстера lub Menezo i uzyskali po ich przeniesieniu rozwój ciąży. Dobrym środowiskiem dla hodowli zarodków *in vitro* okazał się płyn Dulbecco, uzupełniony 20% dodatkiem surowicy płodów ciążących. Trounson ze współpracownikami (22) hodując w tym płynie zarodki bydłące, uzupełnionym przez dodanie surowicy płodów ciążących, z zarodków 6-dniowych hodowanych przez dwa dni uzyskał 78% normalnie rozwiniętych późnych morul, które po przeniesieniu dały w 50% rozwój ciąży.

### Hodowla zarodków w jajowodach

Prócz hodowli *in vitro* stosuje się hodowlę zarodków bydłących w podwiązanych jajowodach królika. Ta hodowla stwarza warunki bardziej zbliżone do naturalnych. Metodę tę, opracowaną przez Lawsons i wsp. (8), szczególnie potwierdziły badania Bolanda ze wsp. (2) oraz Crosbygo i wsp. (4). Crosby i wsp. hodowali zarodki bydłące w jajowodach królika od stadium jednokomórkowego przez 3 dni lub 4, następnie przenosili zarodki do hodowli *in vitro*. Takie zabiegi nie hamowały rozwoju, a zarodki przeniesione z hodowli *in vitro* do narażków rodnych krów implantowały się i rozwijały normalnie (5, 8). Tak więc ta ostatnia metoda może służyć zarówno do oceny, jak i do krótkotrwałego przechowywania zarodków.

### Testy fluorescencyjne

Oceny morfologiczne można uzupełniać działając na zarodki związkami chemicznymi wywołującymi fluorescencję. Stosuje się głównie 3,6-dwuacetofluoresceinę (FDA) lub 4,6-dwuamido-2-fenyloidal (DAPI). FDA nabywa właściwości fluorescencyjnych w wyniku hydrolizy zachodzącej w komórce, przy udziale esteraz, a więc fluorescencja tego związku jest specyficzna tylko dla żywych komórek. Z pomocą tego związku odróżnia się komórki jajowe żywe od martwych lub degenerujących u myszy (12), królików (17) i bydła (3, 15, 16, 18). Wykazano dużą zgodność pomiędzy pozytywną reakcją wywołującą fluorescencję u zarodków i ich zdolnością do rozwoju *in vitro* (18).

DAPI jest związkiem wykazującym powinowactwo do kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). Wiąże się ze strukturami komórkowymi, które zawierają DNA, a więc z chromatyną jądra komórkowego i matriks mitochondriów. Związek ten umożliwia selektywne odróżnienie komórek martwych od żywych, gdyż właściwości fluorescencyjnych nabywa w połączeniu z martwymi strukturami komórkowymi zawierającymi DNA. DAPI był już stosowany do oceny zarodków bydłących (17, 18).

Oba omówione związki nie mają szkodliwego wpływu na zarodki, co potwierdzają hodowle *in vitro* prowadzone po dokonaniu oceny.

Jak widzimy, metody oceny zarodków ssaków mogą być stosowane jako proste lub złożone. Badania idą w kierunku opracowania metody możliwie najprostszej, która maksymalnie ograniczałaby manipulacje z zarodkami, gdyż tylko najkrótsze przebywanie poza środowiskiem naturalnym zwiększa procent prawidłowo rozwijających się zarodków po przeniesieniu od dawcy do biorcy.

### Piśmiennictwo

1. Betteridge K. J.: Embryo transfer in farm animals. Agriculture, Canada, Monograph 19, 1977.
2. Boland M. P., Crosby T. F., Skehan B.: One-egg transfer to breed recipients after storage of the egg in the rabbit oviduct. Univ. College Dublin, Fac. Gen. Agric. 17, 1978.
3. Church R. B., Raines K.: Theriogenology 13, 1, 1980.
4. Crosby T. F., Boland M. P., Gordon M. A.: Further studies in the culture of fertilized cattle eggs in the rabbit oviduct. Univ. College Dublin, Fac. Gen. Agric. 18, 1978.
5. Crosby T. F., Boland M. P., Skehan B.: Storage cattle eggs in the rabbit oviduct. Univ. College Dublin, Fac. Gen. Agric. 19, 1978.
6. Gilbert S. F.: Developmental Biology. Sinauer Ass. Inc., 1985, s. 93.
7. Kauffold P., Thamm I.: Die Zustandsbeurteilung von Rinderembryonen-Arbeitsanleitung für den Embryotransfer. Forschungszentrum für Tierproduktion Dummerstorf-Rostock der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der DDR 1985, s. 14.
8. Lawson A. A. S., Rowson L. F. A., Adams C. E.: J. Reprod. Fert. 28, 331, 1972.
9. Linares T.: Studies on the early embryonic development in repeat breeder and virgin heifers. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala 1981, 1.
10. Linares T., King W. A.: Theriogenology 14, 123, 1980.
11. Linares T., King W. A.: Plöen L.: Nord. Vet.-Med. 32, 433, 1980.
12. Mohr R. L., Trounson A. O.: J. Reprod. Fert. 58, 189, 1980.
13. Osuchowska Z.: Embriologia. PWRiL 1977, s. 210.
14. Renard J. P., du Mensil du Buisson F.: Proc. VII Inter. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. 3, 309, 1976.
15. Renard J. P., Menezo J., Heyman J.: Theriogenology 17, 106, 1982.
16. Schilling E., Döpke H. H.: Naturwiss. 65, 658, 1978.
17. Schilling E., Niewmann H., Cheng S. P., Döpke H. H.: Zuchthygiene 14, 170, 1979.
18. Schilling E., Smidt D., Sacher B., Potac D., El Kaschob S.: Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19, 1625, 1979.
19. Shea B. F.: Theriogenology 15, 31, 1981.
20. Smorąg Z.: Srodki osłaniające oraz regulacja temperatury w dwustopniowej metodzie zamrażania zarodków ssaków. Praca hab. IZ Kraków, 1981.
21. Terwit H. R., Whittingham D. G., Rowson L. E. A.: J. Fert. 30, 492, 1972.
22. Trounson A. O., Willadsen S. M., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 47, 367, 1976.
23. Wierzbowski S., Smorąg Z., Wierchoś E.: Przenoszenie zarodków u bydła. Balice-Przysiek 1985, s. 32.
24. Wright R. W., Anderson G. B., Cupps P. T.: Proc. VIII Inter. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem., Kraków 3, 15, 1976.

Adres autora: mgr inż. Jacek Jura, ul. N. Krupskiej 12 m. 4, 31-559 Kraków

**TAOUDI A., KIRCHHOFF H.: Izolacja *Mycoplasma capricolum* od krów z zapaleniem gruczołu mlekowego. (Isolation of *Mycoplasma capricolum* from cows with mastitis). Vet. Rec. 119, 247, 1986 (10).**

Z wydzielin gruczołu mlekowego dwóch krów z klinicznymi objawami zapalenia wyosobniono dwa szczepy *Mycoplasma*. Wyizolowane szczepy były wrażliwe na digitoninę, na siarczan poliantelu, fermentowały glukozę w ciągu 24 godzin, hydrolizowały argininę po 9 dobach inkubacji i redukowały intensywnie chlorek tetrazolu. W oparciu o powyższe właściwości oraz brak zdolności do wytwarzania fosfatazy i „spost” wyosobnione szczepy zidentyfikowano jako *Mycoplasma capricolum*.

G.