

(7) metoda kapacytacji i zapłodnienia pozwoliła autorom uzyskać wysoki odsetek zapłodnienia potwierdzonego, w 40 godzin po inseminacji, rozwojem 62,6% zygot do stadium od 2 do 6 blastomerowego. Tak korzystny wynik uzyskany przez Crozet i wsp. (7) i Chenga i wsp. (5) związany był głównie z zastosowaniem do kapacytacji plemników pożywki wzbogaconej 20% inaktywowanej surowicy owiec. Surowica powodowała dużą aglutynację plemników, co według Thompsona i Cumminsa (17) może wpływać korzystnie na ich przeżywalność. W badaniach własnych użyto podobnej pożywki do kapacytacji plemników, mimo to uzyskany wynik zapłodnienia był zdecydowanie niższy niż w doświadczeniach Crozet i wsp. (7). Ten gorszy wynik badań własnych może być związany z przeprowadzeniem hodowli oocytów w systemie statycznym. Niestateczny system hodowli jest według Staigmillera i Moor (15) niezbędny dla zachowania właściwej równowagi sterydów, szczególnie w krytycznej, wczesnej fazie dojrzewania oocytów.

Uzyskane efekty rozwoju zygot w przejściowej biorczynie wskazują, że odsetek rozwijających się zarodków (54,3%) był porównywalny do stwierdzonego procentu zapłodnienia ocenianego w 16–18 godzin po inseminacji (48,4%). Zbliżony rezultat (62,6%) otrzymali Crozet i wsp. (7) hodując 2–6 blastomerowe zarodki owiec przez trzy dni w jajowodzie królika. Fukui i wsp. (8) po 13 dniach hodowli w jajowodzie przejściowej biorczynie zapłodnionych *in vitro* oocytów, uzyskali 23,5% blastocyst. Natomiast Staigmiller i Moor (15) po 12 dniach hodowli w jajowodzie przejściowej biorczynie hodowanych *in vitro*, ale zapłodnionych *in vivo* oocytów otrzymali 55,3% blastocyst. W porównaniu do tych rezultatów stwierdzony w badaniach własnych udział blastocyst był zdecydowanie niższy (18,5%). Porównywanie wyników musi być jednak bardzo ostrożne ze względu na zróżnicowanie podejście metodyczne autorów. Stąd też można stwierdzić, że efektywność tej techniki w dużej mierze zależy od zastosowanej pożywki i jej składu (5, 8, 13, 15) oraz warunków hodowli. Niemniej jednak uzyskane wyniki nie odbiegają zbytnio

od rezultatów otrzymanych przez innych autorów. Potwierdzają także fakt, że hodowane i zapłodnione *in vitro* oocyty owiec po przeniesieniu do biorczyń pośrednich bezpośrednio po inkubacji z plemnikami, mogą rozwijać się pomyślnie do stadium moruli i blastocysty. Urodzonych 8 jagniąt (przeżywalność 53,3%) świadczy o pełnej zdolności rozwojowej morul i blastocyst uzyskanej w wyniku zastosowania techniki *in vitro*. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu dowodzą skuteczności użytych metod *in vitro*. Mimo, że efektywność produkcji zarodków lub potomstwa tą techniką jest jeszcze zdecydowanie niższa, niż uzyskiwana w wyniku naturalnego procesu rozrodu, to jednak wobec ciągłego postępu badań technika ta niewątpliwie znajdzie zastosowanie w wielu dziedzinach nauki i praktyki.

Piśmiennictwo

1. Bondioli K. R., Wright R. W.: J. Anim. Sci. 57, 1006, 1983.
2. Brackett B. G., Oliphant G.: Biol. Reprod. 12, 260, 1975.
3. Brackett B. G., Bosquet D., Boice M. L., Donawick W. J., Evans J. F., Dressel M. A.: Biol. Reprod. 27, 147, 1982.
4. Brackett B. G., Keefer C. L., Troop C. G., Donawick W. J., Bennett K. A.: Theriogenology 21, 224, 1984.
5. Cheng W. T. K., Moor R. M., Polge C.: Theriogenology 25, 146, 1986.
6. Critser E. S., Leibfried-Rutledge M. L., Eyestone W. H., Northey D., First N. L.: Theriogenology 25, 150, 1986.
7. Crozet N., Huneau D., Desmedt V., Theron M. C., Szöllösi D., Torres S., Sevellec C.: Gamete Res. 16, 159, 1987.
8. Fukui Y., Glew A. M., Gondolfi F., Moor R. M.: Theriogenology 29, 883, 1988.
9. Goto K., Kajihara S., Kosaka S., Koba M., Nakanishi Y., Ogasawa K.: Theriogenology 29, 251, 1988.
10. Greve T., Xu K. P., Calleson H., Hyttel P.: J. In vitro Fert. and Embryo Transfer 4, 281, 1987.
11. Lambert R. D., Sirard M. A., Bernard C., Béland R., Riour J. E., Leclerc P., Menard D. P., Bedoya M.: Theriogenology 25, 117, 1986.
12. Lu K. H., Boland M. P., Crosby T. F., Gordon I.: Theriogenology 27, 251, 1987.
13. Madison V. J.: Factors influencing *in vitro* maturation and fertilization of ovine oocytes. Praca dokt., Swiss Federal Institute of Technology, Zurich 1988.
14. Sirard M. A., Lambert R. D., Menard D. P., Bedoya M.: Reprod. Fert. 75, 551, 1985.
15. Staigmiller R. B., Moor R. M.: Gamete Rec. 9, 221, 1984.
16. Thompson J. G. E., Cummins J. M.: Anim. Reprod. Sci. 9, 75, 1985.
17. Utsumi K., Katoh H., Iritani A.: Theriogenology 29, 320, 1988.
18. Xu K. P., Greve H., Calleson H., Hyttel P.: J. Reprod. Fert. 81, 501, 1987.
19. Yoshida M.: Jpn. J. Vet. Sci. 49, 711, 1987.

Adres autora: mgr Urszula Eysymont, ul. Meander 1a m. 32, 00-791 Warszawa

WOJCIECH LIETZ

Wykorzystanie badań cytologicznych do rozpoznawania schorzeń układu rodowego klaczy

Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Badania cytologiczne komórek nabłonkowych pochodzących z dróg rodnych zapoczątkowane zostały w naukach medycznych w XIX wieku przez Pouchet'a, Morena, Lataste (cyt. za 7). Największe jednak zasługi dla rozwoju cytologii położył Papanicolaou (13). Wykazał on, że zmiany zapalne w układzie rozrodczym znajdują swoje odbicie w zmianach morfologicznych złuszczonego nabłonków pochwy, szyjki i macicy. Opisy tych komórek można znaleźć w dostępnych opracowaniach z zakresu diagnostyki laboratoryjnej i klinicznej (2, 10).

U zwierząt cytologią narządu rodowego zajmowało się wielu autorów (7, 13, 20), zaś pionierami tych badań u koni byli m.in. Hammond i Wodzicki (1942) oraz Knudsen (1961). W chwili obecnej, pomimo opracowania innych metod diagnostyki schorzeń układu rozrodczego, badania cytologiczne znajdują nadal coraz więk-

sze rzesze zwolenników ze względu na łatwość ich wykonania oraz możliwość szybkiego rozpoznania i charakterystykę stanu zapalnego narządu.

Rozmazy nabłonków i śluzu mogą być wykonywane w każdej fazie cyklu rujowego (2, 11, 18). Najbardziej wiarygodne informacje cytologiczne uzyskuje się wówczas, gdy wymazy pobierane są w okresie pełnej rui (1, 3, 6, 12, 14, 17). Niemniej jednak niektórzy autorzy sugerują, że próbki z wczesnej fazy rui mogą dawać wyniki fałszywie ujemne (2, 4). Uważa się również, że wszelkie manipulacje w drogach rodnych w fazie ciała żółtego mogą prowadzić do zaburzeń w cyklu rujowym (9).

Wymazy z dróg rodnych pobierane są najczęściej jałowym wacikiem (2, 6, 11, 20). Diagnostyka schorzenia na podstawie materiału uzyskanego przy użyciu wacika

może być utrudniona (10). Innymi zalecanymi metodami są: aspiracja śluzu przy użyciu pipet (7, 10, 19) lub płukanie jamy macicy niewielką ilością sterylnego płynu fizjologicznego i odwirowanie odzyskanych popłuczyn (17).

Pobrany materiał rozprowadza się na odtłuszczone szkiełko podstawowe, a następnie może być:

- suszony na powietrzu i barwiony (11, 18),
- suszony na powietrzu, utrwalany w utrwalaczu cytologicznym (mieszanina alkoholowo-eterowa 1:1) i barwiony (2),
- utrwalany w utrwalaczu cytologicznym, a następnie barwiony (10, 19).

Według opinii niektórych autorów suszenie wykonanych preparatów na powietrzu powodować może powstanie w komórkach artefaktów, które utrudniają prawidłowy odczyt cytogramu (6, 10, 19).

W zależności od miejsca pobrania i fazy cyklu rujowego w rozmazie cytologicznym mogą występować komórki superficjalne, intermedialne, endocervikalne, endometrialne oraz śluz o różnej gęstości (2, 6, 10, 19). Obecność jednak komórek parabazalnych i bazalnych w prawidłowym obrazie cytologicznym jest dyskusyjna. Niektórzy badacze sugerują, że pojedyncze komórki tych warstw mogą pojawić się w rozmazie w stanach fizjologicznych. Większość autorów jest zdania, że komórki parabazalne i bazalne są widoczne w preparacie tylko w przypadkach występowania stanów zapalnych, owrzodzeń i nadżerek warstwy powierzchniowej błony śluzowej dróg rodnych (6, 10, 19).

W preparatach cytologicznych mogą także występować elementy morfotyczne krwi tj.: neutrofile, limfocyty, eozynofile i makrofagi (1, 6, 12, 14, 20).

Według większości autorów komórki odczynu zapalnego (neutrofile, limfocyty i makrofagi) nie powinny pojawiać się w rozmazach pochodzących od zdrowych klaczy (2, 3, 4, 12, 14, 15, 21). Inni przyjmują, że komórki te mogą występować, ale w niewielkich ilościach (1, 6). Pomimo istnienia tych rozbieżności, opisano obecność neutrofilów u klaczy w czasie pierwszej rui po zimowym *anestrus* (14) i u klaczy będących w *metaestrus* (11). Zgodne są opinie, że neutrofile pojawiają się w wymazach pobranych z dróg rodnych w czasie trwania procesu zapalnego oraz od klaczy: w okresie 7–10, a nawet do 30 dni po porodzie (6, 14), po kuracji antybiotykowej (4), często krytych ogierem w czasie jednej rui np. dawczyń zarodków (14), powtarzających ruje i starszych (14) oraz w przypadku pobierania materiału do badań w 24–72 godzin, a nawet do 7 dni po kryciu (2, 6, 14).

Sugeruje się również, że u klaczy eliminacja neutrofilów jest opóźniona w przypadkach odmy pochwy, uszkodzenia szyjki macicznej, opóźnionej inwolucji macicy, a także przy zaburzeniach funkcjonowania mechanizmów obronnych błon śluzowych dróg rodnych (16).

Obecność tylko dojrzałych neutrofilów świadczy może o nieinfekcyjnym zapaleniu dróg rodnych, powstałym w wyniku uszkodzeń mechanicznych. Widoczne neutrofile o różnym stopniu dojrzałości występować mogą przy zapaleniu infekcyjnym, któremu towarzyszy najczęściej rozpad komórek oraz występowanie licznych wolnych jąder komórkowych i rozpadłych neutrofilów (3, 6, 8, 11, 12, 14).

Informacje na temat występowania neutrofilów w przypadku zapalenia spowodowanego przez grzyby są sprzeczne. Jedni autorzy opisali mobilizację tych komórek na błonach śluzowych (2, 3, 5), inni zaś podają,

że infekcji wywołanej przez drożdżaki nie towarzyszy nagromadzenie neutrofilów (11).

W przypadku toczącego się ostrego stanu zapalnego, liczba limfocytów jest niewielka, rośnie natomiast przy stanach przewlekłych (2, 6, 14). U klaczy, u których stwierdzono znaczną zawartość limfocytów, zauważono niską płodność oraz niebezpieczeństwo wczesnego poronienia (11). Większość autorów uważa, że w rozmazach pochodzących od zdrowych klaczy nie powinny występować limfocyty i makrofagi. Znaleziono je jednak w rozmazach pochodzących od klaczy, u których flora bakteryjna w drogach rodnych jest stosunkowo skąpa (1), u klaczy bezpośrednio po porodzie (2) oraz u klaczy przejawiających regularne cykle (6).

Jakkolwiek rola komórek eozynofilnych w patologii układu rozrodczego nie jest znana, to jednak stwierdza się ich obecność w rozmazach cytologicznych około 5–8 godz. po zadziałaniu szkodliwego czynnika, tj. w ostrej fazie narastania zapalenia (6). Niektórzy autorzy stwierdzili obecność eozynofilów w kilka dni po porodzie, w okresie do 10 dni po stanówce oraz w przypadku infekcji grzybiczych (2). Sugeruje się, że eozynofile mogą także występować przy przewlekłych stanach zapalnych (8), a także w przypadku odmy pochwy, po wlewach leczniczych do macicy oraz po drażnieniu mechanicznym śluzówki dróg rodnych np. po wprowadzeniu kateteru, cewnika lub pipety inseminacyjnej (1, 17).

W rozmazach cytologicznych fizjologicznie mogą pojawić się też krwinki czerwone, jednak w niewielkiej ilości — najczęściej w okresie rui, a także w czasie 7–10 dni po porodzie (2, 6). Większość autorów jest też zgodna co do faktu wystąpienia krwinek czerwonych w rozmazach cytologicznych w przypadku nadżerek śluzówki przez toczący się proces zapalny (2, 6, 20) lub jej mechanicznego uszkodzenia w czasie pobierania materiału (10).

Jak wynika z przytoczonego przeglądu literatury możliwości wykorzystania badań cytologicznych do bardzo wczesnej diagnostyki stanów zapalnych układu rozrodczego wydają się więc bardzo duże. Dzięki nieinwazyjności metody oraz dużego prawdopodobieństwa ustalenia przyczyny schorzenia, badania te powinny znaleźć o wiele szersze zastosowanie w praktyce, niż jest to obecnie stosowane.

Piśmiennictwo

1. Bowman T.: maszynopis, praca skierowana do druku w Mod. Horse Breed. 1984.
2. Brook D.: J. Eq. Vet. Sci., 5, 16, 1985.
3. Brook D.: J. South Afr. Vet. Ass. 53, 261, 1982.
4. Brook D.: J. Compend. C. Ed., 6, 300, 1984.
5. Brook D.: Modern Vet. Pract. A-3, May, 1984.
6. Cuto M., Hughes J. P.: J. Eq. Vet. Sci. 4, 265, 1986.
7. Głód W.: Zootechnika, Kraków-11, 65, 1961.
8. Hillman R. B.: Evaluation and Therapy w: Equine Reproduction, red. Dean P. Neely, Irvin K. M. Liv. La Roche Inc. Nutley, New Jersey, 1983.
9. Hurtgen J. P., Ganjem V. K.: J. Reprod. Fert., suppl. 27, 191, 1979.
10. Klimek R.: Ginekologia, PZWL, Warszawa, 1981, s. 625.
11. Knudsen O.: Cornell Vet. 54, 415, 1964.
12. Knudsen O.: Proc. 28th Ann. Conv. Am. Ass. Eq. Pract. 1982, s. 431.
13. Marcinkowski K.: Badanie nad wartością gļopsji macicy i rozmazów pochwoy w określeniu czynności jajników u klaczy. Praca dokt. AR Wrocław, 1962.
14. Mattos R. C., Mattos L. G., Gunzel A. R., Klug E.: Prakt. Tierarzt. Sonderdruck 65, 1984.
15. Peterson F. B.: Proc. Am. Ass. Eq. Pract. 1969, s. 279.
16. Picketts S. W.: Vet. Rec. 108, 46, 1981.
17. Slusher S. H., Freeman K. P., Roszel J. F.: J. Am. Vet. Med. Ass. 184, 665, 1984.
18. Solomon W. J., Schultz R. H., Fahning M. L.: Proc. 18th Ann. Conv. Am. Ass. Eq. Pract. 1972, s. 55.
19. Teter J.: Cytodiagnostyka hormonalna, PZWL, Warszawa, 1968.
20. Wingfield-Digby W. J.: Eq. Vet. J. 10, 167, 1978.
21. Wingfield-Digby W. J.: Reprod. Fert., suppl. 32, 181, 1982.

Adres autora: lek. wet. Wojciech Lietz, ul. Jałowcowa 12, 44-100 Gliwice