

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

CZESŁAWA JABŁONOWSKA, JERZY STRZEŻEK

Badania porównawcze nad dwiema technikami selekcji ruchliwych plemników rozmrożonego nasienia buhaja*)

Katedra Biochemii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR-T, 10-718 Olsztyn-Kortowo, bl. 37

Podczas konserwacji nasienia zarówno w stanie płynnym, jak i na etapach technologii zamrażania, mogą następować zmiany przepuszczalności błon plazmatycznych plemnika przejawiające się obniżeniem ruchliwości komórek oraz uwalnianiem do środowiska zewnątrzkomórkowego enzymów akrosomu i wstawki (9, 11, 18, 19, 30, 21, 35). Stopień „wycieku” enzymów informować może nie tylko o nasileniu zmian starzeniowych struktur plemników w czasie przechowywania nasienia, ale również pośrednio sugerować o jego zdolności zapładniającej (22, 23, 24). Tym niemniej jednak przydatność praktyczna omawianych metod biochemicznych oceny jakości nasienia jest ograniczona ze względu na niedoskonałość wyposażenia aparaturowego laboratoriów zakładów unasienniania. Wynikają stąd potrzeby poszukiwania szybkich metod selekcji niesprawnych komórek, zwłaszcza występujących po zamrożeniu-rozmrożeniu nasienia.

W ostatnim okresie opracowano szereg technik selekcji frakcji ruchliwych plemników przy zastosowaniu gradientu stężenia albumin (10, 26, 28), gradientu Percollu (1, 3), techniki podpiywowej (tzw. swim-up) — (3, 4) oraz filtracji przez perelki i włókna szklane (2, 15). Zainteresowanie wymienionymi technikami wzrasta z uwagi na możliwość wykorzystania w praktyce ejakulatów pochodzących od osobników oligospermicznych (3).

Z drugiej strony szybki postęp dokonujący się w zakresie rozwoju metod zapłodnienia *in vitro* oocytów zwierząt gospodarskich (3, 14) wymaga zastosowania męskich komórek płciowych o wysokiej wartości biologicznej. Stwierdzono bowiem, że obniżenie odsetka implantowanych zarodków, uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* może być spowodowana przez plemniki z defektami morfologicznymi i zaburzeniami funkcjonalnymi (3).

Podjęto również próby wykorzystania selekcji ruchliwych plemników do różnicowania kariotypów wymienionych komórek, zwłaszcza w zakresie stosunków ilościowych komórek z X i Y chromosomami (4, 5, 10).

Wszystkie prezentowane dotychczas w piśmiennictwie światowym techniki selekcyjne obciążone są pewnymi niedoskonałościami dotyczącymi między innymi słabego odzysku komórek ruchliwych z ogólnej populacji nanieśionych na kolumnę oraz ograniczonego stosowania ilościowego pojedynczej kolumny wypełnionej specyficznym nośnikiem.

Celem pracy było określenie właściwości selekcyjnych polskiego preparatu chitynowego, przygotowanego do rozdzielania według wcześniej opracowanej przez nas metodyki (13). Testem porównawczym była technika selekcji plemników z zastosowaniem Sephadexu G-15, opracowana znacznie wcześniej przez Graham i wsp. (12).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na mrożonym nasieniu buhajów rasy cb użytkowanych w SHiUZ w Olsztynie. Użyte do badań nasienie cechowało się ruchliwością plemników po rozmrożeniu od 10 do 60%. Jako kolumny rozdzielcze zastosowano plastikowe strzykawki o pojemności 5 cm³ i średnicy 1,4 cm, których dno uszczelniono watą szklaną, a wylot zakończono wężykiem z zaciskaczem. Naważkę odpowiednio spreparowanej chityny (prod. MIR w Gdyni) — (6, 7) umieszczano w kolumienke, zalewano ok. 10 cm³ 5% NaOH na okres ok. 3 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie płukano wodą dejonizowaną do odczynu obojętnego, zalewano ok. 10 ml 3% kw. cytrynowym (ok. 3 godz.), ponownie płukano wodą dejonizowaną do odczynu obojętnego. Po sączeniu kolumnę z chityną przemywano kilkakrotnie objętością wody dejonizowanej, a następnie poddawano procesowi regeneracji z zastosowaniem 5% NaOH i 3% kwasu cytrynowego.

Zregenerowane kolumny służyły do przeprowadzenia sąceń próbek nasienia. W przypadku nośnika Sephadex G-15 zastosowano metodykę opracowaną przez Graham i wsp. (12) oraz Fayemi i wsp. (8). Kolumienki wypełniano 20% żelem Sephadex G-15 (40—120 μ firmy Pharmacia). Bezpośrednio przed sączeniem kolumienki wypełnione nośnikami przemywano płynem Ringera (16) o temperaturze 37°C. Próby nasienia o objętości 500 μl (koncentracja plemników około 0,15 × 10⁹) nanoszono pipetą automatyczną. Plemniki wymywano z kolumienek 1 cm³ porcją płynu Ringera.

Frakcje plemników ruchliwych (żywe) i nieruchliwych (martwe) zbierano do kalibrowanych probówek. Wymywanie kończono, gdy w wycieku z kolumny nie stwierdzono obecności plemników. Zarówno przed sączeniem, jak i bezpośrednio po sączeniu dokonywano oceny jakości nasienia.

*) Praca wykonana w ramach CPBP 05.06. pt.: „Fizjologia i patologia rozrodu zwierząt gospodarskich”.

- Analizy mikroskopowe obejmowały ocenę:
- odsetka plemników ruchliwych metodą wizualną przy użyciu mikroskopu z wmontowanym podgrzewaczem (temperatura 37°C),
 - koncentracji plemników metodą cytometryczną,
 - stanu akrosomów po uprzednim ich wybarwieniu według metody Watsona (27). Uzyskane dane liczbowe poddano analizie statystycznej (17).

Wyniki i omówienie

Sączeniu na kolumnach wypełnionych nośnikiem chitynowym i sephadexowym poddano dwie jakościowo różne próby rozmrożonego nasienia buhaja tj. charakteryzujące się znacznym odsetkiem plemników ruchliwych po rozmrożeniu (powyżej 30%) oraz nasienie zdyskwalifikowane po ocenie mikroskopowej ze względu na odbiegający od normy odsetek komórek wykazujących ruch postępowy. W obu wariantach zastosowanych nośników uzyskano istotny wzrost plemników ruchliwych po sączeniu nasienia. Tym niemniej jednak rezultaty sączenia

Tab. 1. Rezultaty sączenia nasienia buhaja o niskiej ruchliwości wyjściowej plemników po rozmrożeniu (n=14)

Miary statystyczne	Odszetek plemników ruchliwych		
	porozmrożeniu	po przesączeniu nasienia przez kolumnę	
		chitynową	sephadexową
\bar{x}	16,79	61,43 **	45,71
s	3,72	7,70	11,58
V	22,16	12,53	25,33

Objaśnienie: ** — istotność różnic między średnimi $I > II$ ($p \leq 0,01$).

Tab. 2. Wpływ rodzaju nośnika na odsetek plemników ruchliwych uzyskanych po przesączeniu nasienia zakwalifikowanego do inseminacji (ruchliwość plemników powyżej 30%) (n=14)

Miary statystyczne	Odszetek plemników ruchliwych		
	porozmrożeniu	po przesączeniu nasienia przez kolumnę	
		chitynową	sephadexową
\bar{x}	35,83	71,67 **	62,5
s	7,36	2,58	6,12
V	20,54	3,53	3,79

Objaśnienie: jak w tab. 1.

Tab. 3. Wpływ rodzaju nośnika na zmiany odsetka plemników z normalnym akrosomem (NAR) podczas inkubacji w temperaturze 37°C (n=14)

Miary statystyczne	Plemniki z NAR (%)											
	Nasienie po rozmrożeniu			chityna						sephadex G-15		
				ruchliwe			nieruchliwe			ruchliwe		nieruchliwe
	0h	0,5h	1,0h	0h	0,5h	1,0h	0h	0,5h	1,0h	0h		
\bar{x}	91,14	88,65	88,36	93,72	92,43	90,40	81,93	92,93	90,57	89,75	80,43	
s	4,20	4,70	4,22	2,84	3,43	6,23	6,30	3,05	3,50	4,57	5,92	
V	4,60	5,30	4,77	3,05	3,71	6,89	7,69	3,28	3,86	5,09	7,36	

na kolumnach chitynowych były statystycznie wysoko istotne w porównaniu do nośnika sephadexowego (tab. 1, tab. 2). Zwłaszcza w przypadku prób nasienia zdyskwalifikowanego po rozmrożeniu stwierdzono prawie 3,7-krotny wzrost odsetka plemników ruchliwych. W odniesieniu do kolumny sephadexowej wyznacznik ten był zdecydowanie niższy (tab. 1). Podobne różnice, chociaż mniej dobitnie zaznaczone, uzyskano w przypadku prób nasienia o wysokiej jakości po rozmrożeniu (tab. 2).

Jak wynika z danych tabeli 3 sączenie w porównaniu do prób nasienia uzyskanych bezpośrednio po rozmrożeniu na obu nośnikach zwiększa odsetek plemników z normalnym akrosomem. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie omawianych wartości pomiędzy nośnikiem chitynowym i sephadexowym. Zwraca natomiast uwagę większa stabilność struktur akrosomowych plemników sączonych na kolumnach chitynowych, które poddane były inkubacji w temperaturze 37°C.

Uzyskane rezultaty pozwalają wnioskować o lepszej efektywności podziału frakcji plemnikowych w przypadku prób nasienia sączonych na nośniku chitynowym aniżeli sephadexowym. Zjawisko to jest trudne do interpretacji. Związane jest ono zapewne z obecnością większej liczby wolnych grup glukozaminoacylowych w preparacie chitynowym i wynikających stąd lepszych możliwości selekcyjnego różnicowania stanu plazmolemy plemników naniesionych na kolumnę. W przebiegu sączenia na obu nośnikach frakcje plemników ruchliwych uzyskiwane są jako pierwsze po wprowadzeniu płynu wymywającego. Natomiast frakcja plemników nieruchliwych (martwa) wiązana jest silniej z nośnikiem i wymywana jest z kolumny dopiero po kilkakrotnym jej przemywaniu. Jednak, o ile w przypadku wariantu nośnika chitynowego możliwe jest wypłukanie frakcji omawianych komórek, to w odniesieniu do nośnika sephadexowego wydają się być bardziej trwale związane. Zjawisko powyższe pozwala na kilkakrotne użycie kolumny chitynowej do sączenia prób nasienia o różnej jakości po rozmrożeniu.

Na ryc. 1 przedstawiono zmiany ruchliwości frakcji plemników „żywych” zawieszonych w



Ryc. 1. Zmiany ruchliwości plemników uzyskanych po sączeniu nasienia zakwalifikowanego do inseminacji (temperatura inkubacji 37°C)

płynie Ringera i inkubowanych w temperaturze 37°C. Charakterystycznym jest wyraźne skrócenie okresu przeżywalności komórek sączonych na obu nośnikach, w porównaniu do prób nasienia po rozmrożeniu. Wynika to zapewne ze zmian funkcjonalnych plazmolemy zwłaszcza w segmencie wstawkowo-witkowym. Jednakże, zwłaszcza w przypadku prób nasienia zdyskwalifikowanego po rozmrożeniu (ruchliwość plemników $\leq 20\%$) obserwowano wyraźne utrzymanie ruchu postępowego przez wysoki odsetek komórek, zwłaszcza w pierwszych 30 minutach inkubacji. Stwarza to możliwość wykorzystania frakcji plemników ruchliwych nasienia wstępnie zdyskwalifikowanego do zabiegów inseminacyjnych.

Przeprowadzone pierwsze próby biologiczne z zastosowaniem w dawce inseminacyjnej frakcji „żywych” plemników potwierdzają możliwość praktycznego wykorzystania metody sączenia nasienia na nośniku chitynowym. Badania są kontynuowane.

Piśmiennictwo

1. Arcidiacono A., Walt H., Campana A., Balerna M.: *Int. J. Andrology* 6, 433, 1983.
2. Bangham A. D., Hancock J. L.: *Nature* 176, 656, 1955.
3. Berger T., Marrs R. P., Moyer D. L.: *Fert. Steril.* 43, 268, 1985.
4. Brandriff B. F., Gordon L. A., Haendel S., Ashworth L. K., Carrano A. V.: *Fert. Steril.* 46, 686, 1986.
5. Brandriff B. F., Gordon L. A., Haendel S., Singer S., Moore D. H., Gledhill B. L.: *Fert. Steril.* 46, 678, 1986.
6. Brzeski M.: *Techn. i Gosp. Morska* 1, 26, 1980.
7. Brzeski M., Mleczkowska M., Sowa K., Stolz H., Wojtasz-Pająk A.: *Studia i mat. MIR, Gdynia, seria S*, 2, 13, 1985.
8. Fayemi E. O., Crabo B. G., Graham E. F.: *Theriogenology* 12, 13, 1979.
9. Foote R. H.: *Theriogenology* 3, 219, 1975.
10. Goodall H., Roberts A. M.: *J. Reprod. Fert.* 48, 433, 1976.
11. Graham E. F., Pace M. M.: *Cryobiology* 3, 361, 1967.
12. Graham E. F., Vazquez I. A., Schmehl M. K. L., Evensen B. K.: VIII-th Intern. Congress Anim. Reprod. Art. Insemin. 4, 896, 1976, Kraków.
13. Jabłonowska Cz., Strzeżek J., Brzeski M.: *Zgłoszenie patentowe Nr P-255-519*, 1985.
14. Kątska L.: *Roczn. Nauk Zoot.* 23, 83, 1985.
15. Maki-Laurila M., Graham E. F.: *J. Dairy Sci* 51, 965, 1968.
16. Mann T., Lutwak-Mann C.: *Male reproductive function and semen*, Springer — Verlag, Berlin, 1981.
17. Ruszczyk Z.: *Metodyka doświadczeń zootechnicznych*. PWRiL, Warszawa, 1981.
18. Schill W. B.: *Fert. Steril.* 26, 711, 1975.

19. Smigleńska J., Strzeżek J.: *Zesz. probl. post. Nauk Roln.* 263, 185, 1986.
20. Smigleńska J., Strzeżek J.: *Medycyna Wet.* 35, 500, 1979.
21. Strzeżek J., Smigleńska J., Taha Jassim Al-Taha.: *Medycyna Wet.* 35, 353, 1979.
22. Strzeżek J., Torska J., Taha Jassim Al-Taha, Glogowski J.: *Pract. Biotechnology* 8, 14, 1981.
23. Strzeżek J., Świdowiec K.: *Zuchthyg.* 21, 64, 1986.
24. Strzeżek J., Torska J., Czebot H., Akstuto W., Wacławik A.: *Medycyna Wet.* 38, 70, 1982.
25. Strzeżek J., Ciereszko A.: *Comp. Biochem. Physiol.* 86B, 373, 1987.
26. Tang L. C. H., Chan S. Y. W.: *Singp. J. Obstetrics Gyn.* 14, 138, 1983.
27. Watson P. F.: *Vet. Rec.* 97, 12, 1979.
28. White L. M., Beal W. E., Bame J. H., Saacke R. G., Marshall C. E.: *J. Anim. Sci.* 59, 454, 1984.

Adres autora: dr Czesława Jabłonowska, ul. Astronomów 8, 10-706 Olsztyn

Яблоновская Ч., Стшежек Е. — Сравнительные исследования 2 техник селекции подвижных живчиков размороженного бычьего семени

Соответствующе приготовленный препарат хитина, изолированный из покровов антарктического криля, использовали для селекции подвижных живчиков размороженного бычьего семени.

На колонки, заполненные хитиновым носителем, наносили пробы размороженного семени соответствующего объема и концентрации живчиков (500 μ л 0,15 $\times 10^9$ живчиков).

Фракции подвижных и неподвижных живчиков вымывали из колонок дозами движения Рингера. Фильтрацию проводили в темп. 37°C. В полученных фракциях микроскопическими методами оценивали концентрации и процент живчиков с нормальной акросомой (НАР).

Показали, что особенно в случае фильтрования семени с низкой подвижностью живчиков после разморозения получили почти 4-кратный рост числа клеток с поступательным движением и НАР. Выживаемость живчиков, полученных после фильтрования, была ниже по сравнению с исходными пробами. Отметили лучшую распределительную эффективность хитиновых препаратов чем повсеместно применяемых септадексовых гелей. В испытательных инсеминационных предприятиях подтвердили высокую биологическую ценность полученных после селекции фракций подвижных живчиков.

Jablonowska C., Strzeżek J. — Comparative examinations on two methods of spermatozoons selection

A chitin preparation, isolated from the shell of the antarctic krill, was employed to select the spermatozoons of the semen of a bull. On the columns filled with the chitin the samples of the thawed semen in the amount of 500 μ l and the concentration of 0.15 $\times 10^9$ were deposited. The fractions of mobile and not mobile spermatozoons were washed with Ringer's solution. The process of filtration was performed at 37°C. The concentration and percentage of spermatozoons with a normal acrosome (NAR) were determined in the fractions by means of microscopy.

It was found that in case of the filtration of spermatozoons of low mobility almost a four fold increase of the number of moving cells with NAR was stated. However, the survival rate of spermatozoons following filtration was lower. A better separation efficacy of chitin preparations was observed compared with sephadex gels commonly used. Preliminary results of insemination confirmed the high biological value of spermatozoons selected by the technique employed.