

18. Ludwig H.: Bovine herpesviruses, w: The Herpesviruses, red. B. Roizmann, Plenum Press, New York 1983.
19. Ludwig H., Gregersen J. P.: Rev. sci. tech. off int. Epiz. 5, 869, 1986.
20. Mackay J. M. K.: J. Comp. Pathol. 79, 147, 1969.
21. Malmquist W. A., Krauss H. H., Moulton J. E., Wandera J. G.: Lab. Invest. 26, 528, 1972.
22. Mohanty S. B., Hammond R. C., Lillis M. G.: J. Am. Vet. Med. Ass. 158, 1978, 1971.
23. O'Connor M.: Irish Vet. J. 41, 345, 1987.
24. Offay J. M., Mock R., Fulton R. W.: Am. J. Vet. Res. 54, 4, 1993.
25. Opendbosch Van E., Wellemans G., Ooms L. A., Degrese A. D.: Vet. Res. Communications 12, 111, 1988.
26. Osorio F. A., Rock D. L., Reed D. E.: J. gen. Virol. 66, 1941, 1985.
27. Papanastasiopoulou M., Koptopoulos O., Ludwig H.: Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis. 14, 47, 1991.
28. Pierson R. E., Hambdy F. M., Dardiri A. H., Ferris D. H., Schloer G. M.: Am. J. Vet. Res. 40, 1091, 1979.
29. Plowright W., Ferris R. D., Scott G. R.: Nature 4757, 1167, 1960.
30. Rock D. L., Haymoser W. A., Osorio F. A., Reed D. E.: J. gen. Virol. 67, 2515, 1986.
31. Rock D. L., Nesburn A. B., Ghiasi H., Ong J., Lewis T. L., Lokensgard J. R., Wechsler S. L.: J. Virol. 61, 3820, 1987.
32. Roizmann B., Baines J.: Comp. Immunol. Microbiol. infect. Dis. 14, 47, 1991.
33. Roizmann B.: Arch. Virol. 123, 425, 1992.
34. Saito J. K., Gribble D. H., Berrios P. E., Knight H. D., McKercher D. G.: Am. J. Vet. Res. 35, 847, 1974.
35. Scott F. M., Martin W. B.: Vet. Rec. 102, 464, 1978.
36. Scott F. M.: Bovine herpesvirus 2 infections, w: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, red. G. Wittmann, Kluwer Academic Publishers, Boston 1989.
37. Stanberry L. R.: Prog. med. Virol. 33, 61, 1986.
38. Studdert M. J., Brake F., Browning G. F.: Austr. Vet. J. 66, 402, 1989.
39. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret P. P.: Bovine herpesvirus 4 (BHV-4) infectious of cattle, w: The Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, red. G. Wittmann, Kluwer Academic Publishers, Boston 1989.
40. Verwoerd D. W., Meyer-Scharrer E., Broekman J., De Villers E. M.: Onderstepoort J. Vet. Res. 46, 61, 1979.
41. Villers de E. M.: J. Virol. 22, 705, 1979.
42. Wentink G. H., van Oirschot J. T., Verhoeff J.: Vet. Quart. 15, 30, 1993.
43. Zmudzinski J. F.: Charakterystyka i podstawy zwalczania zakażeń wirusem otru u buhajów. Praca hab., Puławy 1987.

Adres autora: dr Andrzej Salwa, ul. Chałubińskiego 6/32, 80-807 Gdańsk

WIESŁAW BIELAS, ANDRZEJ DUBIEL

artykuł przeglądowy

Konserwacja nasienia knura w niskich temperaturach

Katedra Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Pomimo wysiłków badawczych na całym świecie nie została jeszcze opracowana w pełni zadowalająca metoda konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach (2, 3). Stan ten spowodowany jest brakiem niezawodnych metod, które mogą prognozować *in vitro* o zdolności do zapłodnienia mrożonego nasienia knura oraz ekstremalną gatunkową wrażliwością jego nasienia na procesy kriokonserwacji spowodowaną charakterystyczną budową błon komórkowych plemników (3, 6, 13).

Do 1970 r. niekorzystnymi wynikami kończyły się próby zamrażania nasienia knura w oparciu o metody konserwacji nasienia buhaja (3). Dopiero w 1970 r. Polge i wsp. (16) opisali pierwsze skuteczne zapłodnienia uzyskane po zastosowaniu nasienia mrożonego knura, które nastąpiły po inseminacji chirurgicznej bezpośrednio do jajowodu loszki. Rok później opisano trzy metody głębokiego zamrażania nasienia knura, wynikiem których było uzyskanie cięż po inseminacji doszyjkowej (5, 8, 18). Jednak żadna z tych wczesnych metod nie została zastosowana na szeroką skalę w inseminacji trzody chlewnej ze względu na niski wskaźnik oproszeń w porównaniu z nasieniem świeżym (3).

Niniejsza praca ma na celu wyeksponowanie osiągnięć badawczych w dziedzinie konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach.

Metody konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach

Istnieją cztery podstawowe metody zamrażania nasienia knura w niskich temperaturach, które testowane były w warunkach polowych przez Pursela w 1975 r. (19), Westendorfa w 1975 r. (28), Paquignona w 1976 r. (14) i Larsona w 1977 r.

(11). Według danych piśmiennictwa (9, 10) aktualnie stosowane metody konserwacji opierają się głównie na pracach wymienionych badaczy. Wszystkie badania, oprócz metody Westendorfa, wymagają zamrażania nasienia w kulkach według Nagase i Niva oraz posiadają następujące wspólne cechy: inkubację nasienia przed wirowaniem oraz zamrażanie plemników w formie skoncentrowanej przy niskim stężeniu glicerolu (19). Z powyższych danych, które prezentują wymienieni autorzy wyszczególnić można cztery następujące zasady:

- ekwilibracja przez około 4,5 godziny,
- koncentrację nasienia przez wirowanie oraz usunięcie plazmy nasienia przed schładzaniem plemników do 15°C. Wirowanie odbywa się albo tuż po pobraniu, albo po inkubacji,
- zamrażanie skoncentrowanej zawiesiny plemników w formie kulek lub konfekcjonowanie nasienia w mikro- i makrotubach (3, 26), torebkach plastikowych (4) oraz w tubach aluminiowych (25). Powszechnie stosowana jest koncentracja od 450 milionów do 1 miliarda plemników w 1 ml (7, 14, 28),
- dodawanie tuż przed zamrożeniem do zawiesiny plemników niewielkiej ilości glicerolu (1).

Problematyka zamrażania i konfekcjonowania nasienia knura

Nasienie knura wymaga szybszego tempa mrożenia niż nasienie innych gatunków zwierząt (17). Warunek ten spełnia zamrażanie nasienia knura w formie kulek na suchym lodzie, co zostało uwzględnione przez wymienionych autorów (10, 11, 14, 19).

Brakuje wyczerpujących danych na temat schładzania nasienia w makrotubach metody Westendorfa (28). Uczony ten

wykazał również wady zamrażania nasienia w formie kulek, takie jak: większą pracochłonność, skomplikowany proces rozmrażania oraz dużą ilość granulek nasienia potrzebną do jednego zabiegu inseminacyjnego.

Stwierdzono także (25), że nasienie konfekcjonowane w cienkościennych tubach aluminiowych, wykazuje wyższą ruchliwość po rozmrożeniu, gdy jest schładzane w parach azotu w czasie 3 minut od temperatury +5 do -100°C.

Z przyczyn praktycznych bardziej pożądane wydaje się zamrażanie nasienia knura w opakowaniach o większych objętościach. Obecnie mrożone nasienie knura konfekcjonuje się w dużych tubach plastikowych o objętości 5-6 ml (2, 9), minitubach o objętości od 0,25 do 0,5 ml, torebkach plastikowych o objętości 6 ml oraz w tubach płaskich o objętości 1,7 ml (4, 12, 26).

Przechłodzenie (supercooling) występujące w trakcie zamrażania nasienia dopóty nie jest szkodliwe dla zamrażanych plemników, dopóki nie wystąpi krystalizacja lodu. Wraz z rozpoczęciem formowania się kryształów lodu wytwarza się utajone ciepło topnienia, które przez wzrost temperatury w zamrażanym nasieniu, prowadzi do przedłużenia okresu po zapoczątkowaniu zamrażania (freezing point plateau). Procesy te powodują uwalnianie wody z zamrażanej próbki nasienia, wskutek czego plemniki narażone są na letalne dla nich zmiany ciśnienia osmotycznego (7, 13, 21).

Na te szkodliwe następstwa w mniejszym stopniu podatne są plemniki zamrażane w formie kulek na suchym lodzie oraz w minitubach o przekroju okrągłym i płaskim o małej objętości od 0,25 do 1,7 ml, jak również w torebkach o objętości 5 ml i wymiarach 5 na 10 cm. W tych przypadkach obserwuje się bowiem stosunkowo lepszą jakość nasienia po rozmrożeniu, dzięki dużej powierzchni kulki lub opakowania w stosunku do małej objętości i związanemu z tym szybkim uwalnianiu ciepła (4, 21).

Nasienie knura konfekcjonowane natomiast w metodzie makrotub w słómkach o objętości 5-6 ml, jest bardziej narażone na szok osmotyczny z powodu dużej objętości w stosunku do małej powierzchni opakowania. Stan ten związany jest z wolniejszym oddawaniem ciepła oraz z suboptymalnym tempem zamrażania-rozmrażania centralnie znajdujących się plemników (12, 21).

Szybkość zamrażania centrum makrotub pozostaje suboptymalna pomimo regulowania odległości od powierzchni ciekłego azotu a nawet podczas zamrażania w elektronicznie sterowanych urządzeniach (4).

Alternatywnym postępowaniem było spłaszczenie dostępnych słómek w celu zmniejszenia pola przekroju i uzyskania korzystnego stosunku powierzchni do objętości (12, 26). Jednak główną wadą słómek płaskich o objętości 1,7 ml, jest konieczność użycia kilku sztuk do jednej inseminacji. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wskaźnikami płodności po zastosowaniu tych słómek oraz makrotub o objętości 5 ml, pomimo lepszej jakości nasienia po rozmrożeniu opakowań płaskich (24).

Wyższy o 12% wskaźnik zapłodnionych komórek jajowych w porównaniu do metody makrotub, otrzymano po elektronicznym zamrażaniu w parach azotu, nasienia konfekcjonowanego w torebkach plastikowych o objętości 5 ml, powierzchni 50 cm² i przekroju 1 mm (4).

Wydaje się, iż optymalnym tempem zamrażania dla plemników knura jest szybkość 3°C na minutę od 5 do -6°C, 1 minuta w temperaturze -6°C oraz 20°C na minutę dalej od

-6°C do -100°C (4). Szybkość ta jest możliwa do osiągnięcia jedynie w programowanych elektronicznie urządzeniach służących do mrożenia komórek i tkanek (2, 21). Urządzenia te umożliwiają błyskawiczne przechodzenie przez najbardziej krytyczną strefę temperatur w przedziale od 0°C do -20°C, w której dochodzi do uszkodzenia aż 75% plemników (21).

Rozrzedzalniki

Rozrzedzalniki służące do zamrażania nasienia knura podzielić można na 2 różne grupy. Pierwszą stanowią pożywki pozbawione buforów, zawierające żółtko jaja, glukozę (16) oraz żółtko, laktozę i Orvus Es Pastę, detergent dyspergujący frakcję lipoproteinową żółtka jaja kurzego (28). Do drugiej grupy zaliczamy rozrzedzalniki zawierające bufor w postaci TRIS (2-amino-2 hydroksymetylopropano-1,3 diol) lub TES (kwas N-tris-(hydroksymetylo) metylo-2-aminosulfonowy) (11, 19). Uszkodzenia komórek powstające w trakcie mrożenia nasienia knura uzależnione są również od stężenia jonowego rozrzedzalników. Najlepsze efekty osiągano przy użyciu rozrzedzalników o niskiej koncentracji elektrolitów (22). Głównymi składnikami rozrzedzalników są cukry, białka, lipoproteiny, bufory oraz krioprotektory głównie glicerol.

Cukry

Glukoza i laktoza są najczęściej stosowanymi składnikami rozrzedzalników w aktualnie stosowanych metodach zamrażania nasienia knura, powodujących optymalny wzrost odsetka plemników o ruchu prawidłowym, posiadających nieuszkodzony akrosom (14, 19). Działanie krioprotekcyjne cukrów polega na stabilizacji ciśnienia osmotycznego poprzez obniżenie koncentracji elektrolitów i zewnątrzkomórkowy wzrost procentu wody niezwiązanej (13).

Białka i lipoproteiny

Dostarczane są do pożywek w formie żółtka jaja, mleka lub kazeiny. Frakcja lipoproteinowa żółtka chroni akrosomy plemników knura przed szokiem chłodowym (6). Żółtko można jedynie wykorzystywać do rozrzedzania osadu plemników po wirowaniu ponieważ wywiera negatywny wpływ na żywotność plemników w czasie ekwilibracji (19). Mechanizm działania tych składników nie jest jasny (14), wydaje się, iż wywierają one swój korzystny wpływ przez zmniejszenie intensywności hydrolizy lipidów wchodzących w skład błon, stabilizując błony plemników (23).

Glicerol

Kluczem do oddziaływania glicerolu polegającego na ochronie plemników knura przed niekorzystnym wpływem niskiej temperatury, stało się obniżenie stężenia oraz dodawanie tego związku w rozrzedzeniu ostatecznym tuż przed procesem mrożenia (1, 16). Glicerol wraz z DMSO (2-metylosulfotlenek), w przeciwieństwie do cukrów, należy do czynników krioprotekcyjnych penetrujących błony plemników (1, 6). Nowsze doniesienia naukowe sugerują stężenie 3% glicerolu jako optymalne dla zachowania dużej liczby plemników ruchliwych z nieuszkodzonym akrosomem (1, 2, 7).

Orvus Es Paste, (OEP)

Syntetyczny detergent obniżający napięcie powierzchniowe, wprowadzony przez Grahama (8). Skutecznie ochrania inte-

gralność akrosomów oraz polepsza ruchliwość plemników po rozmrożeniu, istotnie podnosząc wskaźnik oproszeń (20, 28). Stwierdzono, iż najlepsze efekty uzyskuje się po łącznym zastosowaniu z glicerolem (20). Mechanizm jego działania nie jest dokładnie wyjaśniony, ale wydaje się, że działa on raczej przez przemiany składników żółtka, aniżeli przez stabilizację błon plemników (23).

Plazma nasienia

W piśmiennictwie istnieją sprzeczne dane na temat krioprotekcyjnego wpływu plazmy nasienia w pożywkach (20, 24). Badania Pursela wykazały, iż obecność plazmy w trakcie ekwilibracji, podnosi odporność plemnika na procesy schładzania, a wykluczenia jej przed mrożeniem przez wirowanie, podwyższa odsetek plemników z normalnym akrosomem (18). Związane to jest z obecnością w plazmie zasadowych białek posiadających właściwości hemaglutynacyjne w stosunku do błon plemników (6). Zdecydowanie przeciwny charakter wykazuje zawarty w plazmie kwas sialowy, który zwiększa ruchliwość i jakość plemników po rozmrożeniu, jeśli jego zawartość zbliżona jest do 0,042 mg/ml (27).

Proces rozmrażania

Ze względu na dużą objętość nasienia potrzebnego do jednej dawki inseminacyjnej, postępowanie w trakcie rozmrażania nasienia knura zasadniczo odbiega od sposobów rozmrażania nasienia samców innych gatunków. Rozmrażanie kulek polega na rozmrażaniu ich w specjalnych roztworach, wstępnie podgrzanych do +40, +50°C (10, 19). Szybkie ocieplenie chroni plemniki przed rekrytalizacją małych kryształków lodu wewnątrzkomórkowego na większe (13). Waide (25) uzyskiwał optymalne parametry plemników rozmrażając nasienie knura konserwowane w tubach aluminiowych w temperaturze +40, +50°C. Perezcanto-Fernandez (15) ustalił, iż rozmrażanie makrotub w łaźni wodnej o temperaturze +50°C przez 40 sekund daje najlepsze efekty. Badania prowadzone przez Weitze i wsp. (26), wykazały, iż najskuteczniejszy proces rozmrażania uzyskuje się rozmrażając tuby płaskie o objętości 1,7 ml przez 13 sekund w temperaturze 50°C, minituby o objętości 1 ml w temperaturze 39°C przez 10 sekund. Nieco lepsze wyniki ruchliwości porozmrożeniowej obserwuje się w pojemnikach płaskich, w których grubość zamrożonego nasienia wynosi 1 mm, co zapobiega powstawaniu płynnych stref izolacyjnych, a krótki czas rozmrażania zapobiega przegrzaniu plemników leżących peryferyjnie (4, 12, 26).

W porównaniu z roztworami służącymi do zamrażania, roztwory rozmrażalnicze zawierają liczne elektrolity (22). Wysoka koncentracja elektrolitów ma bowiem zapobiegać nadmieremu przenikaniu wody do komórek (13, 22).

Obecnie najczęściej stosuje się mineralne roztwory takie jak BTS-Beltsville thawing solution (19), Hulsenberg (28), OLEP (11) oraz INRA-ITP (14). Głównym komponentem węglowodanowym tych rozrzedzalników jest glukoza, laktoza dodatkowo włączona jest w skład rozrzedzalnika Hulsenberg, a fruktoza zastępuje glukozę w OLEP. EDTA – kwas etyleno 2-amino tetra octowy wchodzi w skład Hulsenberg, BTS oraz INRA-ITP. Drugą grupę roztworów rozmrażalniczych stano-

wią roztwory zawierające białko w formie plazmy nasienia (5) oraz mleka odtłuszczonego (8).

Podsumowanie

Aktualnie mrożenie nasienia knura prowadzone jest na ograniczoną skalę, głównie z powodu niższej płodności w porównaniu z nasieniem konserwowanym w stanie płynnym, różnej osobniczej odporności nasienia na proces kriokonserwacji oraz wysokich kosztów i pracochłonności. Jednak pomimo tych ujemnych stron, zastosowanie mrożonego nasienia knura daje określone korzyści. Pozwala na tworzenie rezerw genetycznych najlepszego materiału zarodowego, otwiera możliwości eksportu nasienia na duże odległości. Głównym problemem do przezwyciężenia nadal pozostaje indywidualne zróżnicowanie przydatności nasienia od poszczególnych knurów do konserwacji w niskich temperaturach, określenie optymalnego czasu inseminacji loch nasieniem mrożonym oraz konieczność stosowania dużej liczby plemników do jednego zabiegu unasienniania. Wyzwaniem nadal pozostaje usprawnienie procesów zamrażania oraz rozmrażania w celu osiągnięcia optymalnej płodności oraz ogólnej dostępności mrożonego nasienia knura w terenie.

Piśmiennictwo

1. Almlid T., Johnson L. A.: Zuchthyg. 24, 8, 1989.
2. Berger B. i wsp.: Reprod. Domest. Anim. 27, 266, 1992.
3. Bwanga C. O.: Acta Vet. Scand. 32, 431, 1991.
4. Bwanga C. O. i wsp.: Reprod. Domest. Anim. 26, 117, 1991.
5. Crabo B. G., Einarsson S.: Acta Vet. Scand. 12, 125, 1971.
6. De Leeuw F. E. i wsp.: Proc. 2nd Int. Conf. Boar Semen Presery., Beltsville A7:27, 1990.
7. Fisher P. S. i wsp.: Mol. Reprod. Dev. 34, 190, 1993.
8. Graham E. F. i wsp.: A. I. Digest. 19, 16, 1971.
9. Hammitt D. G., Martin P. A.: Theriogenology 32, 359, 1989.
10. Hashizume T. i wsp.: Jap. J. Anim. Repr. 36, 195, 1990.
11. Larson K., Einarsson S.: Acta vet. scand. 17, 43, 1976.
12. Leps H.: Tiefgefrierung von Ebersammen in Kunststoffrohren. Praca dokt., Hannover 1988.
13. Mazur P.: 1st Internat. Conference on Deep Freezing of Boar semen. Uppsala 1985, s. 91.
14. Paquignon M., Cour M.: Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Kraków 4, 1041, 1976.
15. Perezcanto Fernandez J.: Tiefgefrierung von Ebersammen in Kunststoffrohren. Praca dokt., Hannover 1978.
16. Polge C., Salamon S., Wilmut I.: Vet. Rec. 87, 424, 1970.
17. Polge C.: Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Kraków 4, 1061, 1976.
18. Pursel V. G., Johnson L. A.: U. S. Dept. Agric. 44, 227, 1971.
19. Pursel V. G., Johnson L. A.: J. Anim. Sci. 40, 99, 1975.
20. Pursel V. G. i wsp.: J. Anim. Sci. 47, 198, 1978.
21. Pursel V. G., Park C. S.: 1st Internat. Conference on Deep Freezing of Boar Semen. Uppsala 1985, s. 147.
22. Senegacnik J., Vengust M., Bajt G.: Proc. 9th Congr. Anim. Reprod. A. I., Madryt 1980.
23. Strzeżek J., Głogowski J. i wsp.: Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Urbana 1984, s. 224.
24. Stampa E.: Tiefgefrierung von Ebersammen in Kunststoffrohren. Praca dokt., Hannover 1989.
25. Waide Y.: Japan. Agric. Res. Quart. 9, 115, 1975.
26. Weitze K. F., Rath D., Leps H.: Proc. 11th Congr. Anim. Reprod. A. I., Dublin 3, 312, 1988.
27. Wemheuer W.: Tiefgefrierung von Ebersammen. Praca dokt., Giessen 1988.
28. Westendorf P. i wsp.: Dt. Tierärztl. Wschr. 82, 261, 1975.

Adres autora: lek. wet. Wiesław Bielas, ul. Długa 44/2, 53-658 Wrocław