

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

WŁADYSŁAW BIELAŃSKI, KRZYSZTOF BILIK, ZBIGNIEW ZAPLETAL

Sztuczne unasienianie koni II. Wstępne próby konserwacji nasienia ogierów w płynnym azocie (-196°C)

Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt, WSR w Krakowie
Kierownik: prof. dr W. BIELAŃSKI

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Instytutu Zootechniki Balice k/Krakowa
Kierownik: doc. dr S. WIERZBOWSKI

Zarysowujące się możliwości długotrwałej konserwacji nasienia ogierów w niskich temperaturach otwierają przed hodowcami szerokie perspektywy posługiwania się wartościowymi ogierami. Metoda ta może umożliwić równomierną eksploatację ogierów w ciągu roku, niezależnie od sezonowego występowania rui u klaczy.

Próby posługiwania się mrożonym nasieniem ogierów, podejmowane były od początku lat pięćdziesiątych, jednakże pozytywne wyniki zarzębień klaczy były tylko sporadyczne. Intensywniejsze badania, uwieńczone pozytywnymi rezultatami, prowadzone są od 1964 r., tj. od czasu wprowadzenia przez Nagase i Grahama (7) uproszczonej metody zamrażania nasienia buhajów, przez bezpośrednie wkraplanie go na płytę suchego lodu (CO_2) dla uzyskania nasienia w postaci zamrożonych ziarn w kształcie kulek. Technika zamrażania nasienia ogierów w kulkach została zastosowana w Japonii (8), ZSRR (10), w Niemczech (5, 12) i w innych krajach.

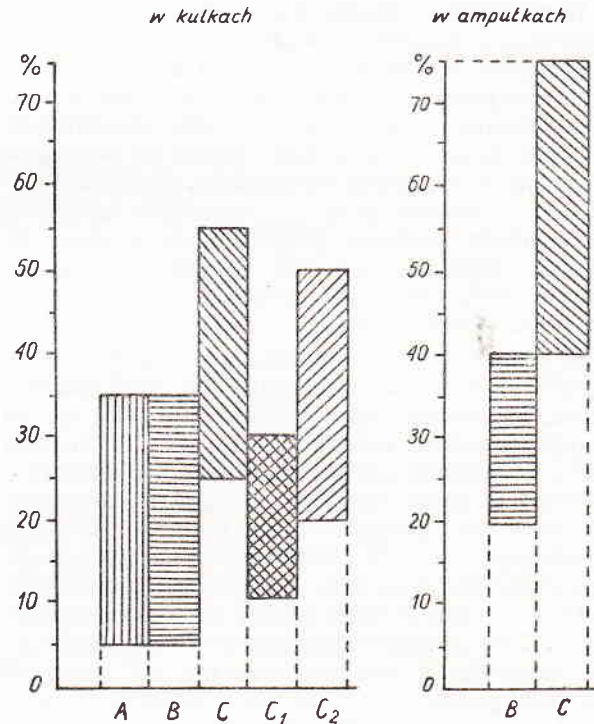
Celem naszej pracy było sprawdzenie opisanych metod, a w szczególności porównanie recepty Rombego i wsp. (10) z receptą Nagase i wsp. (8). W trakcie doświadczenia próbowano również dokonać modyfikacji receptury Nagase i wsp. (8), w kierunku zastąpienia trudno dostępnej na rynku krajowym rafinozy, innym cukrem o zbliżonych właściwościach. Wypróbowano też odmienną metodę zamrażania nasienia w ampulkach (względnie w szklanych probówkach), co prawie równocześnie zostało też podane jako skuteczniejsza metoda przez innych autorów (3).

Materiał i metody

Materiałem do badań było nasienie ogierów doświadczalnych Katedry oraz Stacji Unasieniania Klaczy PZUZ w Zagórzycach. W sumie przeprowadzono próby na nasieniu pięciu ogierów i jednego osła. Nasienie pobierano do sztucznej pochwy bez rozdzielania na frakcje. Przeprowadzono ocenę podstawową ruchliwości plemników i wstępnie nasienie rozrzedzono. Następnie zagęszczano nasienie przez wirowanie, w ciągu 15 min. przy 2000 obr./min. Po wirowaniu i odlaniu około 3/4 osocza, zagęszczone nasienie

rozrzedzono badanym rozcieńczalnikiem z dodatkiem glicerolu. Po przejściu okresu ekwilibracji 2—6 godzin, zależnie od metody, nasienie poddawano zamrażaniu.

W pierwszej części doświadczenia, wkraplając go z pipety kroplami po 0,2 ml na taflę ustalonego CO_2 uzyskiwano zestalone kulki, które zbierano w pudełkach plastikowych i zanurzano w płynnym azocie (13).



Rys. 1. Ruchliwość plemników (%) po rozmrożeniu nasion ogierów.

A — rozcieńczalnik wg Dorotte (1) z glicerolem: 32 ejakulatory, przeciętna ruchliwość przed zamrażaniem 85%, po rozmrożeniu 15%.

B — rozcieńczalnik wg Rombe i wsp. (10) — 36 ejakulatów zamrażanych w kulkach, przeciętna ruchliwość przed zamrażaniem 78%, po rozmrożeniu 25%; 5 ejakulatów zamrażanych w ampulkach, przeciętna ruchliwość przed zamrażaniem 78%, po rozmrożeniu 30%.

C — rozcieńczalnik wg Nagase i wsp. (8), 14 ejakulatów zamrażanych w kulkach, przeciętna ruchliwość przed zamrażaniem 75%, po rozmrożeniu 40% 41 ejakulatów zamrażanych w ampulkach; przeciętna ruchliwość przed zamrażaniem 75%, po rozmrożeniu 55%.

C₁ — rozcieńczalnik wg Nagase i wsp. z pominięciem rafinozy; 49 ejakulatów; przeciętna ruchliwość przed zamrożeniem 80%, po rozmrożeniu 25%.

C₂ — rozcieńczalnik w/g Nagase i wsp. przy zastąpieniu rafinozy, sacharozą; 7 ejakulatów; przeciętna ruchliwość przed zamrażaniem 77%, po rozmrożeniu 35%.

W drugiej części doświadczenia, nasienie było wlewane do szklanych probówek o pojemności 1,8—4,0 ml korkowane i zamrażane nad parami ciekłego azotu w kontenerze (około 15 cm nad powierzchnią płynnego azotu, przez 7—15 min.), po czym zanurzane w płynnym azocie.

Sprawdzanie żywotności plemników po zamrożeniu przeprowadzono rozpuszczając nasienie w kulkach wprost na podgrzanym szkiełku podstawowym (ca 35°C), a nasienie w probówkach rozmrażano w łaźni wodnej o temperaturze 38—40°C. W czasie doświadczenia badano zachowanie się plemników zamrożonych wg pięciu różnych metod.

Metoda „A” kontrolna. Zastosowano poprzednio opisany rozcieńczalnik wg Dorotte (1), z dodatkiem 3,5% glicerolu. Zamrażanie przeprowadzono w kulkach.

Metoda „B” wg recepty (10). Zamrażanie przeprowadzono w kulkach i ampulkach.

Metoda „C” wg recepty (8). Zamrażanie przeprowadzono w kulkach i w ampulkach.

Metoda „C₁” jak metoda „C”, z pominięciem dodatku rafinozy. Zamrażanie przeprowadzono w kulkach.

Metoda „C₂” jak metoda „C”, przy zastąpieniu rafinozy sacharozą. Zamrażanie przeprowadzono w kulkach.

W y n i k i

W pierwszym etapie doświadczenia w czasie zamrażania nasienia w kulkach przebadano 133 ejakulatów, z których uzyskano 371 porcji inseminacyjnych o ruchliwości plemników, po rozmrożeniu, w granicach 5—55%. Ruchliwość ta była przeciętnie o 50% niższa w stosunku do ruchliwości przed mrożeniem. Najlepsze rezultaty uzyskano przy zastosowaniu oryginalnej metody, podanej przez Nagase i wsp. (8). Mroząc nasienie wg tej metody, uzyskano średnio 35% (25—55%) plemników ruchliwych po rozmrożeniu (diagram).

W drugim etapie doświadczenia podczas zamrażania nasienia w ampulkach, nad parami azotu, zamrożono 46 ejakulatów, uzyskując 96 porcji nasienia inseminacyjnych (10 metodą „B” i 86 metodą „C”) o ruchliwości plemników 20—75%. Lepsze rezultaty osiągnięto zamrażając nasienie przygotowane metodą „C” (8), uzyskując 40—75% plemników ruchliwych po rozmrożeniu (diagram). Ruchliwość plemników była średnio o 5—35% niższa niż przed mrożeniem. Czas przeżywania plemników po odtajaniu nasienia w temperaturze ok. 4°C wynosił 40—125 godzin. Koncentracja plemników w 1 mm³ nasienia wynosiła 400—950 tys.

Przy mrożeniu nasienia w ampulkach, przygotowanego metodą „B” (10) uzyskano zaledwie 20—40% plemników ruchliwych czyli o 30—60% poniżej oceny przed mrożeniem.

D y s k u s j a

Wyniki uzyskane przy mrożeniu nasienia w kulkach odbiegają znacznie (metody „A”, „B”, „C”) od wyników, podanych przez innych autorów (5, 6, 12), którzy przeprowadzali podobne próby konserwowania nasienia ogiera w niskich temperaturach. Należy jednak zaznaczyć, że użyte do mrożenia (w metodzie „C”, „C₂)

ejakulatory o dobrej ruchliwości, gęstości, i wysokiej koncentracji plemników, też stosunkowo dobrze znosiły zamrażania i po rozmrożeniu plemniki wykazywały dobrą ruchliwość (jedna z dwu unasienionych klaczy, nasieniem zamrożonym wg metody „C₂”, została żrebna).

Zamrażanie nasienia w ampulkach, nad parami azotu, dało wyniki zbliżone do uzyskiwanych przez autorów sprzed kilku już lat (11) — 60—70%, (2) — 35—40%, (4) — 50—100%. Autorzy ci zamrażali nasienie w rozcieńczalnikach z dodatkiem żółtka i gliceryny, w ampulkach przez wolne schładzanie w łaźni alkoholowej, dodając suchego lodu. Nishikawa i wsp. (9) podają, że zamrażali nasienie w słomkach z winylu o pojemności 1 ml i uzyskiwali po rozmrożeniu 50—80% plemników ruchliwych, przy czym na 113 unasienionych klaczy 50 zostało żrebnym. Merkt i wsp. (6) zamrażali nasienie w kulkach uzyskując po rozmrożeniu średnio 50% plemników ruchliwych i na 20 unasienionych klaczy 10 zostało żrebnym.

W naszym doświadczeniu nie przeprowadzono regularnie zabiegów unasieniania klaczy, chodziło przede wszystkim o dostosowanie jednej z metod do naszych możliwości laboratoryjnych, w praktyce terenowej. Uzyskane tymczasowe wyniki, chociaż liczebność ich nie jest dostatecznie duża dla ostatecznego wypowiedzenia się o metodzie mrożenia nasienia ogierów, zachęcają do podjęcia prób unasieniania klaczy na skalę praktyczną. W czasie przechowywania, przez okres 19 miesięcy, nasienia w kulkach, ogiera (nr 1001) konika, oraz ogiera (nr 1002) osła, ruchliwość plemników obniżyła się o około 5% w stosunku do ruchliwości plemników w dniu zamrażania. W próbkach nasienia, przechowywanego w ampulkach, przez 6 miesięcy, nie stwierdzono obniżenia się ruchliwości plemników.

Stosunkowo liczne doniesienia o pozytywnych wynikach unasieniania klaczy mrożonych nasieniem, przedstawione w czasie VI Międzynarodowego Kongresu Rozrodu Zwierząt w Paryżu (lipiec 1968 r.), zdają się wskazywać, że nasienie ogierów wykazujące dobrą ruchliwość po odmrożeniu posiada pełną wartość biologiczną i szansę na uzyskanie nim zapłodnienia tak, jak świeżym nasieniem o tej samej ruchliwości.

W n i o s k i

1. Nasienie ogierów zamrażane do temperatury płynnego azotu wg metody podanej przez Nagase i wsp. (8), wykazywało po rozmrożeniu wyższą ruchliwość oraz dłuższy czas przeżywania, niż przy innych badanych metodach zarówno przy zamrażaniu w kulkach jak i w ampulkach.

2. Uzyskiwane wyniki oceny mikroskopowej nasienia po zamrożeniu zachęcają do podjęcia

prób posługiwania się konserwowanym nasieniem ogierów w niskich temperaturach, w praktyce inseminacyjnej.

Autorzy wyrażają podziękowanie prof. Tadeuszowi Mannowi za ofiarowanie koniecznej dla doświadczenia rafinozy. Dyrekcji Zjednoczenia Hodowli Zarodowej Zwierząt w Warszawie za udostępnienie ogierów do doświadczeń, a Dyrekcji Wojewódzkiego Państwowego Zakładu Unasieniania Zwierząt w Zabierzowie k/Krakowa i Dyrekcji Zakładu w Zagórzycach za zezwolenie na prowadzenie doświadczeń w Stacji Unasieniania Kłaczy w Zagórzycach.

Piśmiennictwo

1. Bielański W., Kierznowska K., Nowak S.: *Medycyna Wet.* 23, 738, 1967.
2. Buel J. R.: *Vet. Rec.* 75, 900, 1963.
3. Knoop C. E.: *Intern. Congr. Anim. Reprod.*, Paris, 1968.
4. Iljinskaja T.: *Koniewodstwo i Kon. Sport*, 26, (2), 32, 1956.
5. Merkt H., Krause D.: *Deut. Tierärztl. Wochenschr.* 73, 267, 1966.
6. Merkt H.: *Intern. Cong Anim. Reprod.*, Paris, 1968.
7. Nagase H., Graham E.: *Cong. Intern. Anim. Reprod.*, Trento, 4, 387, 1964.
8. Nagase H., Soejima S., Tomizuka T., Oshida H., Mikawa T., Sagara Y., Hoshi S., Niwa T.: *J. Anim. Reprod.* 12 (2), 52, 1966.
9. Nishikawa Y., Waide Y., Shinomiya S.: *Intern. Cong. Anim. Reprod.*, Paris, 1968.
10. Rombe C., Kotjagina M., Piller N.: *Koniewodstwo i Kon. Sport*, 35 (3), 32, 1965.
11. Roy A.: *Vet. Rec.* 67, 330, 1955.
12. Schäfer H., Baum W.: *Fortpfl. Haust.* 1, 105, 1964.
13. Wierzbowski S., Branny, J., Pilch J.: *Biuletyn III Zjazdu PTNW* — Lublin, 379, 1966.

Adres autorów: Kraków, Al. Mickiewicza 24/28 WSR, Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt.

Бебяньски В., Билик К., Заплеталь З. — Искусственное осеменение лошадей. II. Предварительные опыты по консервации семени жеребцов в жидком азоте (-196°C).

Провели сравнительное исследование методов замораживания семени жеребца: метода А — контрольного с применением разбавителя РАВ по Dorotte'у (который оказался оптимальным в предыдущих пробах для консервации жидкого семени); метода В по Rombe и др. 1965, и метода С по Nagase и др. 1966 с том, что продавали применять разбавитель без рафинозы (C_1) или заменить рафинозу сахарозой (C_2).

Применяли 2 способа замораживания: в шариках и в ампулах над парами азота. В графиках представили результаты — процент живчиков после замораживания способность движения. Установили что лучше результаты получались после применения японского метода „С” и замораживания в ампулах над парами азота.

Bielański W., Bilik K., Zapletal Z. — **Artificial insemination in horses. II. Preliminary trials with freezing semen in liquid Nitrogen (-196°C).**

In our experiment different methods of deep freezing of the semen of stallions were compared. As the control (method A) the diluent with P.A.B. was used acc. to Dorotte 1955, that proved to be the most effective for keeping the stallion semen in fluid (1), method B acc. to Rombe and co. 1965, method C acc. to Nagase and co. 1966. As the special trial (C_1) the last diluent was used without raffinose, and substituted by saccharose (C_2). Two techniques of freezing were used: in pellets and in ampules in Nitrogen vapours.

Diagram presents the results of each method, per cent of motility after freezing in pellets and in ampules.

The best results in motility of spermatozoons after freeezing were obtained by the use of the original Japanese method (C) and freezing in ampules in Nitrogen vapours.

JERZY STRZEŻEK

Wskaźniki biochemiczne w zastosowaniu do oceny jakości nasienia zwierząt gospodarskich

I. Białka plazmy nasiennej a jakość nasienia tryka

Katedra Biochemii Wydziału Zootechniki WSR w Olsztynie
Kierownik: doc. dr W. MINAKOWSKI

Białka plazmy nasiennej, w odróżnieniu od białka surowicy krwi, są mniej zróżnicowane oraz występują w innych stosunkach ilościowych. Ich pochodzenie nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśnione. Mietkawski i Bruegemann, cyt. za Szumowskim (21), są zdania, że białka plazmy w swej większości odpowiadają globulinom krwi i biorą swój początek głównie w najądrzach, jądrach i prostatie. Szybki wzrost i wysokie tempo biosyntezy białek w tkankach prostaty, pęcherzyków nasiennych i jąder, po iniekcji testosteronu i hormonów gonadotropowych, są dowodem regulacji hormonalnej syntezy białek w organach płciowych (8, 14, 26). Larson i Salisbury (12, 13) oraz Bennett (1) stwierdzili, że białka plazmy nasiennej zwierząt są heterogennymi. Buruiana i wsp. (3, 4, 5) oraz Bennett (1) zaliczają białka te w większości do kwaśnych glikoproteidów typu sjalomukoidów. Tak więc, jak większość pły-

nów biologicznych, białka plazmy nasiennej mogą ulegać zmianom gatunkowym i ilościowym w zależności od różnych warunków. Szczególnie ważne wydają się być obserwacje dotyczące zmian frakcji białkowych w zależności od czynności gruczołów płciowych. Prace Szumowskiego i wsp. (17, 20, 21, 22, 23), Buruiana (6), Rossa (18, 19), Kleminy (11), Juneja i wsp. (10), prowadzone przede wszystkim nad białkami plazmy nasienia człowieka i buhaja, zwróciły uwagę na powiązanie obrazu frakcji białkowych oraz w mniejszej mierze ilości białka w plazmie z płodnością osobników męskich i zdolnością zapładniająca nasienia. Ważnym osiągnięciem tych badań jest wykazanie zależności między zmianami we frakcjach białkowych, a zaburzeniami czynnościowymi jąder lub najądrzy, stanami zapalnymi dróg wyprowadzających czy też pęcherzyków nasiennych.