

miny, stosując jako metodę obliczeń tzw. układ kwadratu łacińskiego.

Wartości liczbowe mieściły się w granicach od 62,3% do 85,7% w porównaniu z efektem histaminowym.

Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, że wykazywały one wahania w zależności od dawki substancji badanej i tak: Metasystox w dawkach od 0,1  $\gamma$ /kg do 1 mg/kg powoduje krótkotrwałe, nagłe spadki ciśnienia tętniczego w granicach od 5—55% w odniesieniu do ciśnienia wyjściowego, natomiast w dawkach powyżej 1 mg/kg powoduje nagły, krótkotrwały wzrost ciśnienia w granicach od 20—60%. Ekatin w dawkach od 0,1  $\gamma$ /kg — 14 mg/kg powoduje nagłe, krótko trwałe obniżenie ciśnienia tętniczego w granicach od 7—45% w odniesieniu do ciśnienia wyjściowego. Substancją po-

równawczą dla określenia efektu depresyjnego był chlorowodorek histaminy.

Przeprowadzona seria doświadczeń pozwoliła ustalić, średnie dawki śmiertelne dla kota przy podawaniu dożylnym, które wynoszą odpowiednio: dla Metasystoxu — 28,05 mg/kg, dla Ekatinu — 21,5 mg/kg. Wykonane badania potwierdzają prace innych autorów odnośnie wpływu niekorzystnego na układ krążenia wyżej wymienionych insektycydów.

#### Piśmiennictwo

1. Hughes Albright J. P.: London Trans. Ass. Industr. Med. offers, 18, 57, 1965.
2. Organicka fosforova insekticida, Zdr. Nakl. Praha, 1959.
3. Rosival E., Vrbovsky L.: Toxik. i farm. organofosf. zluc. Slov. Akad. Bratislava, 1959.
4. Rump S., Faff J.: Med. pracy 15, 101, 1964.
5. Stankiewicz J., Pawlowski L.: Med. pracy 16, 201, 1965.

Adres autora: mgr Ewa Ranc-Bukowska, Warszawa 33, ul. Brazylijska 15 m. 31.

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JAN PILCH

### Zamrażanie nasienia w żelatynowych kapsułkach

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

Podana w 1964 r. przez Nagase i Niwa (7) metoda mrożenia nasienia w kulkach, dzięki swej prostocie i skuteczności została szeroko wprowadzona do praktyki sztucznego unasieniania. Niemniej pod jej adresem wysuwane są dość przekonujące zastrzeżenia jak: trudne znakowanie kulek, brak zabezpieczenia przed ewentualnym zanieczyszczeniem czy infekcją a także konieczność posługiwania się zestalonym  $\text{CO}_2$  w procesie zamrażania nasienia. Stąd też już w 1966 r. Stoye i wsp. (11) zastosowali kapsułki żelatynowe jako opakowanie nasienia zamrożonego metodą podaną przez Nagase i Niwa. Zamrożoną kapsułkę z nasieniem wprowadzali bezpośrednio do dróg rodnych krowy, gdzie następowało rozmrożenie (tzw. „zimne unasienianie”). Kolejne prace dotyczyły znakowania i zamykania kapsułek (3, 5, 6) oraz zastępowania suchego lodu atmosferą par ciekłych gazów przy zamrażaniu nasienia zarówno w kulkach (1, 2, 9, 10) jak i w żelatynowych kapsułkach (6).

Celem przeprowadzonego doświadczenia było ustalenie warunków zamrażania nasienia w kapsułkach żelatynowych.

#### Materiał i metody

W doświadczeniu wykorzystano 51 ejakulatów od 21 buhajów rasy ncb i pc w wieku 3—5 lat. Po pobraniu nasienie rozcieńczano, a następnie schładzano i poddawano ekwilibracji zgodnie z podanym przez Wierzbowskiego i wsp. (12) postępowaniem z nasieniem przeznaczonym do zamrożenia w kulkach.

Po ekwilibracji jedną część nasienia zamrażano w formie kulek, a drugą część mrożono w kapsułkach żelatynowych w atmosferze par ciekłego azotu. W tym celu w izolowanej styropianem waniencie umieszczano tacę metalową z ustawionymi w rzędach kapsułkami żelatynowymi\*. Dla zapobieżenia przesuwania się lub przewracania, kapsułki przyklejano dnem do pasków poloplastu przymocowanych na tacy. Do waniarki wlewano ciekły azot do poziomu około 2 cm od dna, a tackę z kapsułkami ustawiano na wysokości ok. 4 cm nad jego poziomem, gdzie panowała temperatura rzędu —115 do —120°C. W celu skrócenia czasu schładzania kapsułek do tej temperatury, wkładano tacę na ok. 2 sek. do ciekłego azotu a następnie zawieszano ją na żądanej wysokości nad powierzchnią cieczy. Z kolei napełniano kapsułki nasieniem. Do każdej kapsułki wkrapiano ok. 0,1 ml nasienia. Nasienie uzyskiwało temperaturę ok. —120°C w przeciągu 5 minut. Na tacy o wymiarze 150×250 mm można było jednorazowo zamrozić 100 porcji. Ustawienie 100 kapsułek na tacy trwało około 4 min. Po zamrożeniu, nasienie przenoszono do ciekłego azotu w ten sam sposób jak przenosi się kulki a lekko przymarzniałe do poloplastu kapsułki zgarniano listewką. Zarówno kapsułki jak i kulki (również o obj. 1 ml) przechowywano w ciekłym azocie w tych samych pudełkach.

Po 24 godzinach przechowywania nasienie rozmrażano i oceniano jego ruchliwość.

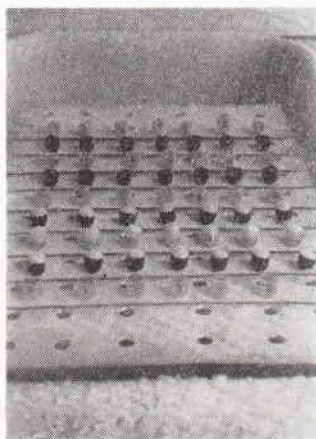
Zarówno kapsułki jak i kulki rozmrażano w roztworze fizjologicznym NaCl (1 kapsułka lub 1 kulka na 1 ml roztworu) o temp. 40°C (łaźnia wodna).

Dla statystycznego obliczenia uzyskiwanych wyników posłużono się testem „t” Studenta (8).

\*) Posłużono się kapsułkami prod. Parke-Davis Co., USA, Nr 0, o poj. 0,7 ml używanymi w krajowym przemyśle farmaceutycznym. Przed użyciem zmniejszono ich pojemność do ok. 0,1 ml przez obcięcie. Nadruk wykonywano przy pomocy ręcznej drukarki offsetowej prod. „Telpod” Kraków. Napisy utrwalano przez przetrzymywanie kapsułek w temp. 60°C przez 2 godziny.

## Wyniki

Nasienie zamrożone w kapsułkach wykazywało średnio po rozmrożeniu 32,7% plemników ruchliwych w porównaniu z 32,9% dla nasienia zamrożonego w kulkach. Różnice były statystycznie nieistotne.



Ryc. 1. Rozmieszczenie kapsułek na tacy w czasie zamrażania nasienia

Szybkość spadku temperatury mierzona przy pomocy termopary (Honeywell Brown Elektronik, USA) była prawie identyczna dla obydwu metod mrożenia. Natomiast sam przebieg krzywej spadku temperatury był nieco odmienny: krzywa kapsułek rysowała nieznaczne „plateau” na poziomie 0 do  $-10^{\circ}\text{C}$ , czego nie zauważono w wypadku kulek.

Czas rozmrażania wynosił ok. 40 sek. dla kapsułek i około 20 sekund dla kulek.

## Dyskusja

Metoda zamrażania nasienia w kapsułkach żelatynowych w parach azotu wprowadza zasadnicze uproszczenie w stosunku do metody kulek: eliminuje konieczność posługiwania się suchym lodem jako pośrednim środkiem chłodzącym. Stanowi to istotny moment metody zamrażania, bowiem stosowanie suchego lodu nastęrcza wiele kłopotów zarówno natury technicznej jak i sanitarno-higienicznej.

Sygnalizowane też były inne rozwiązania mające na celu eliminowanie suchego lodu z procesu zamrażania nasienia. Goossens i Kamps (1) wkraplali nasienie na silikonizowaną folię aluminiową zawieszoną w parach azotu, Rutgers (10) zalecał stosowanie płyty z polerowanej, nierdzewnej blachy stalowej umieszczonej w atmosferze par azotu. Podobne rozwiązanie zastosowali Seifert i Beller (11), przy czym jako środka chłodzącego używali par skroplonego powietrza doprowadzonych pod płytę przy użyciu specjalnego aparatu.

Juszczenko i wsp. (2) donieśli o przeprowadzanych w ZSRR próbach mrożenia nasienia na płytach sporządzonych z tworzyw sztucznych o specyficznych właściwościach zapobiegają-

cych przymarzaniu kulek w trakcie mrożenia w parach azotu.

Jednakże, zastosowanie wyżej wymienionych rozwiązań jest technicznie dość trudne a jednocześnie nie zabezpiecza praktycznej możliwości znakowania kulek.

Mankament ten zostaje wyeliminowany przez zastosowanie kapsułek. Wprawdzie powierzchnia kapsułki, na której można umieścić napis jest niewielka, niemniej z łatwością można tam nadrukować nazwę buhaja lub jej skrót. Funkcję pomocniczą przy oznaczaniu porcji nasienia może spełniać wprowadzenie kapsułek różnobarwnych. Zostało dowiedzione, że barwnik kapsułek stosowanych w przemyśle farmaceutycznym nie wywiera ujemnego wpływu na plemniki buhaja (3).

Merkt i wsp. (6) zaobserwowali, że w warunkach silnych wstrząsów może następować odrywanie się plemników od kulek. Aby temu zapobiec, zaproponowali zamykanie kapsułek przez wkraplanie na zamrożone nasienie niewielkiej ilości rozcieńczalnika, który po zamrożeniu tworzy „korek”. W świetle obserwacji Lormanna (4) fakt odrywania się plemników nie wydaje się nieść poważniejszych następstw dla inseminacji. Autor ten wykazał, że oderwane plemniki są komórkami martwymi.

Do innych zalet przedstawionej techniki należy możliwość zamrażania większej ilości porcji przy użyciu prostych i tanich urządzeń jak: wanienki, termosy z szerokim wlotem itp.

Proces przygotowania i zamrażania nasienia trwa krótko, podobnie jak w metodzie kulek.

Sporządzenie dawki inseminacyjnej jest równie proste jak przy użyciu kulek. Obecność kapsułki w próbówce nie stanowi przeszkody przy wciąganiu rozmrożonego nasienia do pipety.

## Wnioski

1. Zastosowanie kapsułek wprowadza do metody zamrażania nasienia następujące udogodnienia:

- umożliwia oznaczanie poszczególnych porcji nasienia,
- eliminuje konieczność stosowania suchego lodu w procesie mrożenia,
- zapewnia izolację od środowiska.

## Piśmiennictwo

- Goossens J. M. M., Kamps W. J. G.: ABA, 34, 2984, 1966.
- Juszczenko N. P., Siemakow W. G., Lewin K. Ł.: Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., 2, 1183, 1968.
- Krause D., Weitze K. F.: Dte tierärztl. Wschr., 73, 458, 1966.
- Lormann W.: Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., 2, 1081, 1968.
- Merkt H., Weitze K. F., Brunkhorst F.: Dte tierärztl. Wschr., 73, 603, 1966.
- Merkt H., Weitze K. F., Lormann W.: Dte tierärztl. Wschr., 74, 505, 1967.
- Nagase H., Niwa T.: Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., 4, 410, 1964.
- Ruszczyc Z.: Metodyka doświadczeń zootechnicznych, PWRiL, 1955.
- Rutgers A.: K. I. Jaarverslag 1966, Federatie K, I. Netherland, 85, 1967.
- Seifert H. S. H., Beller K. A.: Zuchtygiene, 3, 200, 1968.

11. Stoye H., Mahler R., Dieckmann W.: Zuchthygiene, 1, 2, 1966.  
 12. Wierzbowski S., Branny J., Pilch J.: Ramowa instrukcja zastosowania nasienia mrożonego w praktyce sztucznego unasielenia bydła. Wyd. własne IZ, 34, 1967.

Adres autora: Jan Pilch, Instytut Zootechniki, Balice k. Krakowa, Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasielenia Zwierząt.

#### Пилх Я. — Замораживание семени в желатиновых капсулках.

На 51 эякуляте от 21 быка низменной черно-пестрой и польской красной пород был проведен опыт, целью которого было определение условий замораживания семени в желатиновых капсулках. Метод замораживания в шариках являлся контрольным. Семя разбавляли лимонножелточно-глицериновым разбавителем и после эквilibрации разливали в количестве 0,1 мл в желатиновые капсулки установленные на металлическом подносе подвешенном в парах жидкого азота (около  $-120^{\circ}\text{C}$ ). Через 5 минут капсулочки переносили в жидкий азот. Семя размораживали в физиологическом растворе поваренной соли в температуре  $40^{\circ}\text{C}$ . Процент подвижных живчиков оценивали после размораживания. Статистически достоверных разниц (тест „t” Студента) между результатами полученными для

шариков и капсул не установили. Автор подчеркивает, что применение капсул дает возможность обозначения отдельных порций семени, исключает необходимость применения сухого льда в процессе замораживания, а также предохраняет семя от загрязнения.

#### Pilch J. — Semen freezing in gelatine capsules.

Fifty one ejaculates from 21 Lowlands black-white and Polish red bulls have been examined to determine the nitrogen vapour freezing of bull semen in gelatine capsules. The method of freezing in pellets was used as a control. The semen was diluted with citrate — egg yolk — glycerol. After equilibration the semen was dropped into capsules which were placed on a metal rack embedded in liquid nitrogen vapour (about  $-120^{\circ}\text{C}$ ). After 5 minutes the capsules were immersed in liquid nitrogen. Thawing was carried out in saline at  $40^{\circ}\text{C}$ . The percentage of motility after thawing was determined. There were no significant differences between the pellet and capsule method. The use of the gelatine capsules for nitrogen vapour freezing of semen enables to label each dose, eliminates the necessity of the use of dry ice in the process of freezing and protects semen against contamination.

WACŁAW PATYRA, TADEUSZ DĄBROWSKI, BOGDAN KUCHARSKI

## Flora bakteryjna szyjki macicznej u jałowięjących krów

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie  
 Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

Intensywna hodowla bydła powoduje stopniowe nasilenie występowania szeregu różnorodnych schorzeń, na czoło których wysuwa się obecnie okresowa lub trwała niepłodność.

Jak wykazały badania (1, 3, 4, 8, 9, 12) zakażenia bakteryjne układu rozrodczego odgrywają niebagatelną rolę w tym zagadnieniu. Baier (1) udowodnił, że na tle zakaźnym jałowięje 6—25% krów. Obok brucelozy, rzęśistnicy i wibriony, stwierdza się w ostatnich latach wzrost zakażeń listeriozą, leptospirami, grzybami, gronkowcami i paciorkowcami (3, 4). Knoblauch (3) zbadał 165 krów i u 65% zarówno cielnych jak i niecielnych stwierdził stany zapalne układu rozrodczego, spowodowane obecnością *Str. viridans*. Winkenwerder (12) wyizolował 24 gatunki drobnoustrojów głównie z grupy paciorkowców i uważa, że należy je traktować jako komensale, które jednak zmniejszają odporność narządu. Prasad (7) po przebadaniu 1 109 próbek śluzu, otrzymał tylko 14% prób jałowych. Toureček (9) poddawał badaniu śluz rujowy i doszedł do wniosku, że najłatwiej zacielają się te krowy, których śluz nie posiadał drobnoustrojów. Z badań Utszajewa (10) wynika, że zakażenia macicy przenoszą się na noworodki a szczególnie wysoka śmiertelność cieląt występuje u krów zakażonych diplokokami. Według oceny Gibbsona (2) obecność drobnoustrojów w układzie rozrodczym nie ma większego wpływu na płodność, gdyż stwierdzał je zarówno u krów z prawidłowo przebiegającymi cyklami, jak i u krów jałowięjących. Dopiero pojawienie się stanu zapalnego i ujaw-

nienie zarazków daje podstawy do twierdzenia o ich szkodliwości.

#### Badania własne

Założeniem pracy było określenie flory bakteryjnej w śluzie szyjki macicznej u krów jałowięjących. Jako jałowe uznawano te krowy, które po upływie 3 miesięcy od ostatniego porodu nie wykazywały objawów rui, lub pomimo krycia okazały się niecielne. Przed pobraniem materiału wykonywano badania na ciążę. Materiał pobierano wyjałowionym tamponikiem z waty na drucie odpowiedniej długości, przy użyciu rozwieracza i wzicznika pochwowego. Tamponik wprowadzano do ujścia szyjki macicznej unikając dotyknięcia ścian pochwy i rozwieracza. Tak pobrany materiał natychmiast wysiewano na agar z krwią oraz agar czekoladowy i inkubowano w warunkach tlenowych w  $37^{\circ}\text{C}$ . Równocześnie pobierano śluz do badań w kierunku na rzęśistnicę. Ponadto zwracano uwagę na wygląd błony śluzowej oraz na ilość i jakość śluzu. Ogółem przebadano 144 krów w 9 gospodarstwach wielkostadnych. Wyniki badań przedstawia tab. 1.

#### O m ó w i e n i e

Spółród zbadanych krów nie udało się wykazać drobnoustrojów u 61 (42,3%) zwierząt, zaś u 83 (57,7%) wynik badania bakteriologicznego był dodatni. Rzęśistnicy nie stwierdzono w żadnym przypadku. Flora bakteryjna reprezentowana była najliczniej przez paciorkowce