

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

DANUTA PLEWIŃSKA-WIERZBOWSKA, WŁADYSŁAW BIELAŃSKI

Metoda oceny szybkości i rodzaju ruchu plemników

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

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt
Instytut Zootechniki, Balice k. Krakowa

W ocenie nasienia, podstawowe znaczenie posiada określenie ruchu plemników. Ocena szacunkowa pozwala wprawdzie na szybką orientację w ilości ruchliwych plemników, nie jest jednak metodą dokładną. Poszukiwanie obiektywnej metody oceny ruchu plemników było tematem prac wielu autorów. Między innymi próbowano wykorzystać fotografię mikroskopową, którą pierwszy do badania ruchu nasienia wprowadził Rothschild (4). Metoda ta, podobnie jak i metoda Rikmenspoela (2) oparta na rejestracji poruszających się plemników przez fotokomórkę, wymaga specjalnego sprzętu oraz wielu skomplikowanych obliczeń i nie znalazła zastosowania w praktyce.

Tchakarov i wsp. (5) wprowadził dla oceny ruchu plemników człowieka, metodę nazwaną spermatokinezografią. Metoda ta polega na fotograficznej rejestracji poruszających się plemników.

Rozrzedzone nasienie umieszczone w komorze Bürkera fotografuje się w ciemnym polu widzenia w określonym czasie ekspozycji. Główki poruszających się plemników odbijają światło pozostawiając na błonie fotograficznej jasny ślad.

Szereg tych śladów w postaci przerywanej linii oznacza przebytą drogę. Z kształtu pozostawionych przez plemniki śladów odczytuje się rodzaj ich ruchu. Natomiast na podstawie długości przebytej drogi, można obliczyć szybkość. Przy pomocy spermatokinezografii można więc równocześnie oznaczyć rodzaj ruchu plemników obliczyć ich szybkość, a także stosunek żywych do martwych, gdyż plemniki martwe pozostawiają na błonie fotograficznej swój własny nieruchomy kontur. Zastosowanie metody Tchakarowa do oceny ruchu plemników zwierząt gospodarskich wymagało wprowadzenie szeregu modyfikacji dotyczących składu rozrzedzalników, stopnia rozrzedzenia nasienia, grubości warstwy fotografowanej, a także czasu naświetlania. Ponadto wprowadzono przysłonę centralną oraz odczyt z negatywów, co znacznie upraszcza i przyspiesza ocenę wyników (6).

Rozrzedzanie nasienia

a) Nasienie buhaja rozrzedza się płynem Ringera o składzie:

NaCl	8,50 g
KCl	0,25 g

CaCl ₂	0,20 g
NaHCO ₃	0,30 g
Aqua dest. ad . . .	1000,00 ml

Przy takiej koncentracji nasienia wynoszącej 1 000 000 plemników w 1 mm³ stopień rozrzedzenia winien wynosić około 800 ×.

b) Nasienie tryka rozrzedza się rozrzedzalnikiem Aslaniana o składzie:

Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	41,6 g
KH ₂ PO ₄	1,6 g
Aqua dest ad	1000,0 ml

Przy średniej koncentracji nasienia wynoszącej 2 000 000 plemników w 1 mm³, stopień rozrzedzenia winien wynosić około 1500 ×.

c) nasienie ogiera rozrzedza się 7,0% roztworem glukozy. Przy średniej koncentracji nasienia wynoszącej 300 000 plemników w 1 mm³ stopień rozrzedzenia winien wynosić około 250 ×.

d) Nasienie knura rozrzedza się odwirowanym osoczem tegoż nasienia. Przy średniej koncentracji nasienia wynoszącej 200 000 plemników w 1 mm³, stopień rozrzedzenia winien wynosić około 150 ×.

Sprzęt

1. Mikroskop z urządzeniem do ciemnego pola (przysłona centralna),
7. Nasadka fotograficzna z aparatem małoobrazkowym,
3. Lampa mikroskopowa,
4. Stabilizator prądu,
5. Stolik podgrzewający,
6. Komora Bürkera,
7. Szkiełka podstawowe i nakrywkowe.

W naszym Zakładzie używano mikroskopu typu Lg Og firmy Zeiss Jena, nasadki fotograficznej typu Milflex firmy Zeiss Jena oraz aparatu fotograficznego marki Exakta. Ciemne pole uzyskiwano przez zastosowanie przysłony centralnej umieszczonej w miejscu przeznaczonym na filtr. Jest to metalowy względnie kartonowy krążek czarnego koloru, którego średnica musi być dostosowana do optyki danego mikroskopu. Przysłona działa na zasadzie kondensora ciemnego pola. Podgrzewacz stolika mikroskopu pozwala na utrzymanie stałej temperatury i jej kontrolę. Można stosować urządzenia różnego typu pod warunkiem, że ich grubość nie będzie utrudniała operowania kondensorem przy nastawianiu ciemnego pola. Temperatura szkiełka winna wynosić 37°C jest to bowiem optymalna temperatura dla oceny ruchu plemników.

Ustawienie aparatury

1. Z mikroskopu wyjmuje się górną część kondensora (Aparat Abb'ego),
2. Źródło światła ustawia się centralnie, tak aby lustro oświetlone było równomiernie,
3. Nastawia się ostrość na siatce Bürkera umieszczonej na stoliku podgrzewającym,

4. Zakłada się przysłonę centralną w miejscu przeznaczonym na filtr,
5. Podnosi się kondensator aż do uzyskania maksymalnego świecenia siatki stolika Bürkera, przy czarnych kwadratach,
6. Wyjmuje się stolik Bürkera i zakłada szkiełko podstawowe.
7. Kroplę rozrzedzonego nasienia umieszcza się na szkiełku podstawowym i przykrywa nakrywkowym,
8. Wykonuje się zdjęcie używając filmu o czułości 15 lub 18 Din, przy obiektywie mikroskopu 8 względnie 10 ×.

Odczytywanie wyników

Dla odczytania obrazu ruchu plemników film negatywowy umieszcza się w ciemni w powiększalniku, a uzyskany obraz rzuca się na biały papier. Ostrość oraz pożądaną wielkość obrazu ustawia się na klatce ze sfotografowaną siatką Bürkera.

Ocena fotogramów

Przy pomocy spermatokinezografii można obliczyć:

- a) procentowy stosunek plemników poruszających się do nieruchomych (żywe — martwe),
- b) uzyskać ocenę rodzaju ruchu,
 - a) określić szybkość poruszających się plemników,
 - a) Plemniki martwe w odróżnieniu od poruszających się, pozostawiają na kliszy swój niezmienny kontur. Przez zliczenie śladów pozostawionych przez plemniki poruszające się, a następnie przez plemniki nieruchome można obliczyć stosunek żywych do martwych,
 - b) Rodzaj ruchu plemników określa się na podstawie śladów pozostawionych przez poruszające się plemniki. Linia prosta ciągła, wskazuje na szybki ruch postępowy. Prosta przerywana — określa wolniejszy ruch postępowy. Ślad w kształcie koła względnie spirali — ruch kolisty. Oscylujące plemniki pozostawiają podwójne ślady.
 - c) Szybkość ruchu plemników. Ślady poruszających się plemników występujące na negatywie w postaci ciągłych linii przerysowuje się pod rzutnikiem na biały papier, a następnie mierzy linijką względnie krzywomierzem.

Szybkość ruchu plemników oblicza się wg wzoru:

$$v = \frac{S}{t}$$

gdzie: v — szybkość w μ /sek
 S — droga poruszających się plemników
 t — czas naświetlania

Skalą porównawczą jest tu klatka ze sfotografowanym stolikiem Bürkera o znanej długości boku.

Opisana metoda spermatokinezografii pozwala na obiektywną ocenę nasienia oraz udokumentowanie sposobu poruszania się plemników badanego samca. Dużym ułatwieniem w porównaniu do metody Tchakarowa (5) jest zastosowanie przysłony centralnej w miejsce kontrastu fazowego, co pozwala posługiwać się najprostszymi mikroskopami bez własnego źródła światła. Pomiar szybkości ruchu nasienia wykonany na negatywie przy pomocy powiększalnika do zdjęć z pominięciem robienia odbitek także upraszcza pracę. Tak więc spermatokinezografia nie wymagając specjalnej aparatury może być stosowana przy badaniach nasienia rozplodników np. przed użyciem ich do sztucznego unasielenia lub też przy kupnie. Nasienie mrożone również można oceniać przy pomocy tej metody, nieznaczna ilość żółtka w rozrzedzalniku nie wpływa bowiem na jakość obrazu.

Piśmiennictwo

1. Astanian M.: Nowe poglądy i osiągnięcia w biologii rozmnażania zwierząt gospodarskich PWRiL, 1952.
2. Rikmenspoel R.: Dysertacja Uniw. Utrecht, 1957.
3. Rothschild Lord: J. Exp. Biol. 30, 178, 1953.
4. Rothschild Lord: Nature 171, 512, 1953.
5. Tchakarow E., Natchev Tch., Andrejev T.: C. R. Acad. Sci. Bulg. 11, 331, 1958.
6. Wierzbowska D.: Acta Agr. et Silv. 1, 3, 1969.

Adres autora: dr Danuta Plewińska-Wierzbowska, Balice k/Krakowa, Instytut Zootechniki.

Плевиньска-Вежбовска Д., Белянски В. — Метод оценки скорости и способа движения живчиков.

Описали модифицированный и приспособленный к оценке движения живчиков сельскохозяйственных животных фотографический метод называемый сперматокинезографией. Сущность метода состоит в том что разведенную сперму (быка — жидкостью Рингера, барана — разбавителем спермы Асланьяка, жеребца — раствором глюкозы, хряка — плазмой семени) подвергают фотоснимке в темном поле. Движущиеся живчики оставляют на фильме следы своей формы. Метод сперматокинезографии позволяет определять скорость и способ движения живчиков а также процент мертвых живчиков.

Plewińska-Wierzbowska D., Bielański W. — The methods for evaluation of the speed and the sort of movement of spermatozoons.

A modified photographic method was applied to the evaluation of the speed of spermatozoons of domestic animals. The method was called spermatokinezography. Dilute semen (with Ringer's solution in the case of bull, Aslanian's solution in the case of ram, glucose solution and plasma semen in the case of stallion and boar, respectively) is photographed in dark field illumination. The moving spermatozoons reflecting the light leave the traces of their own forms on the film. By the use of this technique is possible to determine the speed, kind of movement and proportion of dead to alive spermatozoons.

JOSTEN F. W.: Badania elektrometryczne nad przebiegiem wartości pH w mięsie świń rzeźnych i jego znaczenie dla badania mięsa. (Elektrometrische Untersuchungen über den pH-Wert-Verlauf im Fleisch von Schlachtschweinen und dessen Bedeutung für die Fleischuntersuchung). Inaug. Diss. Giessen 1967.

Autor określał przebieg pH w mięśniach (mm. adductores) 120 tusz świń rzeźnych schładzanych szybko i 40 tusz świń rzeźnych schładzanych stopniowo. Pomiar dokonywane były po 15 min. oraz po 2, 4, 6, 8 i 24 godz. po uboju przy pomocy pH-metru f-my „Hauptner”. Wyniki badań wykazały, że bez względu na rodzaj schładzania tusz, występują w mięśniach świń, 4 typy przebiegu wartości pH:

- 1) końcowa wartość pH w 2 godz., pH poniżej 6,0 (świnie o mięśniach zdegenerowanych),
- 2) końcowa wartość pH w 8 godz., pH — 6,2 i niższe (świnie normalne),
- 3) końcowa wartość pH w 24 godz., pH — 6,2 i niższe (świnie normalne),
- 4) końcowa wartość pH 6,3 i wyższa (świnie o wadliwym zakwaszeniu mięśni).

Autor stwierdził, że przy szybkim schładzaniu tusz, obniżenie się wartości pH przebiega wolniej, niż przy schładzaniu powolnym, jednak pH osiąga wtedy wartość końcową o 0,1 niższą. Nie stwierdzono wpływu płci i wagi tusz na kształtowanie się wartości pH. Autor jest zdania, że pomiary pH mięśni po 2, 8 i 24 godz. po uboju oraz równocześnie przeprowadzane badania organoleptyczne, umożliwiają zaszeregowanie danej świni rzeźnej do jednego z wymienionych typów przebiegu pH.

L. Nowicki