

ANDRZEJ DUBIEL, JERZY MONKIEWICZ, STANISŁAW GRACZYK

Wstępne badania nad wpływem witaminy A na niektóre parametry nasienia królików

Z Kliniki Położniczej Instytutu Patologii i Terapii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

Z Instytutu Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej Wydziału Zootechnicznego AR we Wrocławiu

Związek między witaminą A a płodnością odkryto prawie równoległe z odkryciem witaminy „płodności” E. Nelson i wsp. (15) stwierdzili, że lochy trzymane na paszy pozbawionej witaminy A ronia lub rodzą prosięta mało żywotne lub martwe. W kilka lat później Hughes i wsp. (cyt. za 10) opisali nowe spostrzeżenia, dotyczące objawów ze strony układu płciowego na tle awitaminozy A. Obserwując loszki trzymane od odsadzenia do dojrzałości płciowej na diecie ubogiej w karoteny zauważyli, że po dojściu do wieku reprodukcyjnego wykazują one zaburzenia w rui, przeważnie silniejsze i dłużej trwające niż u zwierząt kontrolnych. Na 8 loszek krytych w czasie owych nienormalnych rui zapłodnieniu uległy tylko 3, przy czym wszystkie poroniły. U pozostałych wykazano niedorozwinięte macice.

Podobne objawy u krów, a mianowicie niezdolność do utrzymania ciąży lub rodzenie martwych oraz mało żywotnych cieląt opisali Hart i Guilbert (8), a u owiec Pierce (16). Także szeroko zakrojone badania Masona (12) na zwierzętach laboratoryjnych wykazały, że w przebiegu awitaminozy A rozwijają się u szczurzy zmiany nekrotyczne w łożyskach, w następstwie czego dochodzi do niedożywienia płodów z następnym ronieniem lub wydawaniem na świat słabego potomstwa.

U samców na tle awitaminozy A dochodzi do zaburzeń w spermatogenezie. U szczurów trzymanych na diecie bezwitaminowej następuje zanik jąder, jako następstwo degeneracji tkanki plemnikotwórczej (7, 12). Buhaje trzymane na diecie ubogiej w karoteny dają nasienie gorszej jakości (5), a u buhajów, u których rozwinęły się ogólne objawy awitaminozy dochodzi do zaniku i zmian degeneracyjnych w jądrach, które nie ustępują nawet po iniekcjach gonadotropiny (14). Uderzająca jest odmienna reakcja poszczególnych gatunków zwierząt na niedobór witaminy A. Bardzo rzadko występują jednakowe objawy chorobowe i związane z nimi zmiany anatomopatologiczne (6, 9, 11, 13, 17).

Wśród licznych prac nad witaminą A, prowadzonych na różnych gatunkach zwierząt, brak jest w dostępnym piśmiennictwie światowym doniesień na temat wpływu wymienionej witaminy na nasienie królików, co skłoniło autorów niniejszej pracy do przeprowadzenia własnych obserwacji nad tym zagadnieniem.

Materiał i metody

Obserwacje przeprowadzono na 9 królikach, w wieku 12—18 miesięcy, waga 4,5—5 kg. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: w pierwszej (3 szt.), każdemu z nich podano w formie jednorazowej domięśniowej iniekcji roztwór oleistej witaminy A — Polfa, w ilości 100 i 200 tys. j.m. (2 szt. podano 100 tys. j.m., 1 szt. podano 200 tys. j.m.), w drugiej grupie (3 szt.) także podano witaminę A w podobny sposób jak wyżej, każdemu królikowi odpowiednio: 300, 400 i 450 tys. j.m., trzecia grupa (3 szt.) to samce kontrolne.

Przed i po podaniu witaminy A od każdego samca pobrano i przebadano 5—6 ejakulatów pobranych do sztucznej pochwy w odstępach 7—13 dni. Równocześnie pobierano i badano nasienie 3 królików grupy kontrolnej. Tuż po pobraniu ejakulatu przeprowadzono ocenę wstępną nasienia. Następnie określano koncentrację plemników w jednym mm³ ejakulatu i odsetek plemników anormalnych. Przeprowadzono także próbę przeżywalności nasienia w temp. 46,5°C. Próbę wykonywano z nasieniem nierozrzedzonym i rozrzedzonym w odpowiednim rozrzedzalniku w stosunku 1:5. Używano następujących rozrzedzalników: rozrzedzalnik I (50 ml H₂O, 0,9 glukozy, 0,2 laktozy, 1,6 sacharozy, 5 ml żółtka, 2,74 ml glicerolu), rozrzedzalnik II (2,9% cytrynian sodu 2H₂O—50 ml i 5 ml żółtka), rozrzedzalnik III (50 ml H₂O, glukoza 3,0, cytrynian sodu (2H₂O—35,7%) 0,5 ml, NaOH 4%—0,4 ml), rozrzedzalnik IV (50 ml H₂O, glukoza 2,5, cytrynian sodu 5H₂O—0,15 ml, żółtko 5 ml).

Równocześnie 1 tydzień przed podaniem witaminy A i odpowiednio 2 tyg., 3 tyg., 5 tyg. i 6 tyg. po podaniu witaminy, określano u każdego samca jej poziom w surowicy krwi, pobranej z żyły usznej (równocześnie określano poziom witaminy A w surowicy krwi królików grupy kontrolnej). Po pobraniu krwi umieszczano w lodówce na okres 30 min., a następnie wirowano przez 10 min. przy 3 tys. obrotów na minutę. Następnie odpipetowywano do oznaczenia witaminy 5 ml surowicy. Dalsze postępowanie było zgodne z metodą podaną przez Dvoraka (4). Do wywołania barwnej reakcji Carr-Price'a (1) używano 1 ml chloroformowego roztworu i 5 ml 25% chloroformowego roztworu trójchlorku antymonu. Intensywność powstałej barwy mierzono w 6 sekund po zmniejszeniu reagujących roztworów na fotokolorymetrze typu „Spectol”. Po odczytaniu z krzywej standardowej i przeliczeniu poziom witaminy A podano w µg%.

Wyniki i dyskusja

Uzyskane parametry oceny wstępnej i przedstawionych badań uzupełniających nasienia królików (6 szt.) przed podaniem witaminy A i samców grupy kontrolnej (3 szt.) nie odbiegają od średnich otrzymanych we wcześniej przedstawionych pracach (2, 3) i w tym kon-

tekście przedstawione rezultaty należy uznać za poprawne. Obserwacje własne wykazały, że objętość nasienia królików po podaniu witaminy A wyraźnie zwiększa się w grupie pierwszej aż do 45 dnia, aby po 55 dniach spaść poniżej średniej objętości ejakulatu przed podaniem wymienionego preparatu (tab. 1). Tym-

Tab. 1. Średnia objętość ejakulatów królików przed i po podaniu wit. A w ml

Przed podaniem wit. A	Po podaniu wit. A w dniach:					
	7	14	21	34	45	55
100—200 tys. j.m. 1,08	1,66	2,00	1,76	1,30	1,66	1,03
300—450 tys. j.m. 1,00	1,46	1,30	1,30	1,30	1,03	1,06

czasem w drugiej grupie zwierząt, gdzie stosowano większe dawki witaminy, objętość ejakulatu także zwiększa się, ale jej wzrost jest mniejszy w porównaniu z grupą pierwszą (tab. 1).

tyczące spadku procentu plemników o ruchu prawidłowym już 21 dnia po podaniu witaminy A. Zmiany te wyraźnie nasilały się z upływem czasu, aby po upływie 55 dni doprowadzić do nekrospermii (tab. 2). W obu grupach zwierząt nie stwierdzono wyraźnych zmian w zakresie koncentracji plemników w jednostce objętości ejakulatów oraz procentu plemników anormalnych przed i po podaniu witaminy, z wyjątkiem wyraźnego wzrostu plemników uszkodzonych (głównie oddzielne główki) w ejakulatach z nekrospermią.

Jedną z ważniejszych prób przy ocenie nasienia jest próba przeżywalności plemników w nasieniu rozrzedzonym w temp. 46,5°C. Mając na uwadze ważność opisanego testu również w warunkach doświadczalnych przy zastosowaniu witaminy A, określano średni czas przeżywalności plemników w nasieniu nierozrzedzonym i rozrzedzonym w różnych rozrzedzalnikach (tab. 3, 4). Obserwacje własne wykazały, że po podaniu mniejszych dawek witaminy A (100—200 tys. j.m.) czas przeżywalności nasienia nierozrzedzonego i rozrzedzonego rośnie w zależności od stosowanego rozrzedzalnika (tab. 3) i wraca do pozycji wyjściowej (przed podaniem witaminy) od 14—55 dni. Najdłuższy czas

Tab. 2. Procent plemników o ruchu prawidłowym przed i po podaniu wit. A

Przed podaniem wit. A	Po podaniu wit. A w dniach:					
	7	14	21	34	45	55
100—200 tys. j.m. 60—80	60—80	60—80	70—80	60—90	70—80	60—80
300—450 tys. j.m. 60—70	70—80	70—80	50—70	30—50	20—30	0—20

Barwa, woń i konsystencja ejakulatów w obu grupach nie wykazują żadnych zmian po podaniu witaminy A. Bardzo ciekawe spostrzeżenia zaobserwowano przy następnym niezwykle istotnym parametrze oceny wstępnej nasienia, jakim jest określanie procentu plemników o ruchu prawidłowym. Przy stosowaniu mniejszych dawek witaminy A nie obserwowano żadnych, uchwytnych dla oka zmian w tym zakresie, a procent plemników o ruchu prawidłowym przed podaniem preparatu wahał się od 60—80 i po podaniu 60—90. Natomiast w drugiej grupie zwierząt zanotowano wyraźne zmiany, do-

przeżywalności nasienia wykazano w rozrzedzalniku II (131,2 min.), a najkrótszy w rozrzedzalniku I (15 min.). Także w grupie drugiej wymieniony parametr zachowuje się podobnie jak w grupie pierwszej, aby po 14—21 dniach spaść poniżej poziomu wyjściowego (przed podaniem witaminy A). Około 55 dnia po podaniu dużych ilości witaminy A (300—450 tys. j.m.) obserwowano nekrospermię (tab. 4).

Równoczesne oznaczanie witaminy A (tab. 5) wykazało ścisłą współzależność jej poziomu w surowicy krwi z wyżej przedstawionymi zmianami w zakresie niektórych parametrów nasienia królików. Nagły

Tab. 3. Średni czas przeżywalności plemników w różnych rozrzedzalnikach przed i po podaniu wit. A (100—200 tys. j.m.) w minutach

Rozrzedzalnik	Przed podaniem witaminy A	Po podaniu wit. A w dniach:					
		7	14	21	34	45	55
I	32	60	15	15	41,2	—	30
II	98,4	131,2	120	105	93,7	101,2	90
III	59	111,2	90	105	75	82	60
IV	30	90	45	75	48,7	55	45
Nasienie nierozrzedzone	64,7	73,7	60	60	48,7	45	45

Tab. 4. Średni czas przeżywalności plemników w różnych rozrzedzalnikach przed i po podaniu wit. A (300—450 tys. j.m.)

Rozrzedzalnik	Przed podaniem wit. A	Po podaniu wit. A w dniach:					
		7	14	21	34	45	55
I	43,5	30	45	45	41,2	22,5	nekrospermia
II	80	150	120	120	52,5	60	nekrospermia
III	53,5	120	105	105	41,2	42	nekrospermia
IV	36	78,7	60	45	45	37,5	nekrospermia
Nasienie nierozrzedzone	53,5	71	45	60	15	15	nekrospermia

wzrost ilości witaminy A w surowicy krwi samców, mógł wpłynąć niekorzystnie na procent plemników o ruchu prawidłowym, łącznie z wystąpieniem nekrospermii. Tymczasem małe dawki witaminy A, z czym wiąże się niższy poziom wymienionej substancji we krwi, mogły wpłynąć korzystnie na przedstawione parametry nasienia, a szczególnie na czas przeżywalności plemników w różnych rozrzedzalnikach. Poziom witaminy A w surowicy krwi wracał do normy po 6 tygodniach po iniekcji witaminy (tab. 5), co mogło także spowodować, że poszczególne wartości oceny nasienia wracały do pozycji wyjściowej (przed podaniem witaminy A).

Tab. 5. Poziom wit. A w $\mu\text{g}\%$ w surowicy krwi królików przed i po jej podaniu

Ilość wit. w tys. j.m.	Przed iniekcją witaminy	Po iniekcji witaminy w tygodniach			
		2	3	5	6
100	46,0	55,7	55,7	52,2	42,6
100	48,3	57,0	56	—	49,5
200	42,6	49,5	52,2	49,5	39,9
300	32,4	46,0	49,5	52,2	35,7
400	69,6	130	125	—	67,4
450	39,9	74,3	61,2	57,7	39,9

W drugiej grupie zwierząt, w której stosowano duże ilości witaminy A, procent plemników o ruchu prawidłowym wracał do normy dopiero po upływie 60 dni od podania witaminy. W grupie zwierząt kontrolnych, w czasie przebiegu doświadczania nie zaobserwowano żadnych uchwytanych zmian w zakresie badanych parametrów nasienia oraz poziomu witaminy A w surowicy krwi. Wstępne badania własne nad wpływem witaminy A na nasienie królików zostały przeprowadzone na stosunkowo małym materiale doświadczalnym, co nie upoważnia do wysuwania wiążących wniosków. Witamina A może wpływać bezpośrednio na spermatogenezę, czy też dodatkowe gruczoły płciowe, ale aby to udowodnić, należy przeprowadzić szereg szczegółowych badań dodatkowych, na dużym materiale zwierząt, dla wyjaśnienia przebiegu, istoty i przyczyn zaobserwowanego zjawiska.

Wnioski

1. Badania własne wykazały, że witamina A może mieć nieobojętny wpływ na niektóre parametry nasienia królików.

2. Małe dawki witaminy A (100—200 tys. j.m. na królika) podane jednorazowo, mogą wpływać korzystnie na objętość ejakulatu i przeżywalność plemników w różnych rozrzedzalnikach.

3. Duże dawki witaminy A (300—450 tys. j.m. na królika) podane jednorazowo, mogą wywierać niekorzystny wpływ na procent plemników o ruchu prawidłowym łącznie z wystąpieniem nekrospermii i czas przeżywalności plemników w różnych rozrzedzalnikach.

Piśmiennictwo

1. Carr F. H., Price E. A.: J. Biochem. 20, 497, 1926.
2. Dubiel A.: Medycyna Wet. 29, 624, 1973.
3. Dubiel A.: Pol. Arch. wet. — w druku.
4. Dvorak M.: Sbornik Vysoke Skoly Zemedelske a Lesnicko. Brno, 28, 399, 1959.
5. Guilbert H. R., Hart G. H.: J. Nutrit. 10, 409, 1935.
6. Grungaud R., Conguy T., Nicol M.: Rend. Soc. Biol. 154, 973, 1960.
7. Gross L.: J. Path. Bact. 27, 27, 1924.
8. Hart G. H., Guilbert H. R.: Calif Agr. Exp. Sta. Bull. 560, 1, 1933.
9. Jaśkowski L., Wałkowski L., Dobrowolska D., Domańska E.: R. Nauk Rol. 67, 327, 1956.
10. Jaśkowski L.: Medycyna Wet. 23, 385, 1969.
11. Johnson B. C., Wolf G.: Vitamins Horm. 18, 457, 1960.
12. Mason K. E.: Anat. Rec. 43, 232, 1930.
13. Mason K. E.: Am. J. Path. 52, 153, 1933.
14. Madsen L. L., Eaton O. N., Heemstra L., Davis R. E., Babbell C. A., Knapp B.: J. Anim. Sci. 7, 60, 1948.
15. Nelson E. V., Heller V. G., Lamb A. A.: A. J. Physiol. 59, 335, 1922.
16. Pierce A. W.: Austr. J. Agric. Res. 5, 470, 1954.
17. Tangl H.: Witaminy, hormony i antybiotyki w hodowli zwierząt. PWRiL, 1961.

Adres autora: dr Andrzej Dubiel, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław.

Дубель А., Монкевич Е., Грачик С. — Предварительные исследования над влиянием витамина А-Polfa на некоторые параметры семени кроликов.

Исследования провели на 9 кроликах самцах возрастом в 12—18 месяцев и весом в 4,5—5,0 кг. Животных разделили на 3 группы по 3 кролика: в I каждому кролику впрыснули внутримышечно однократно 100—200 тысяч м.е. маслянистого витамина А, во II группе — этимже методом — 300, 400 или 450 тысяч м.е.; III группа была контрольной. До введения и после введения витамина А брали каждые 7—13 суток образцы эякулятов. Кроме того у всех животных исследовали уровень витамина А в сыворотке крови.

Установили, что малые дозы витамина (100—200 тысяч м.е. на кролика) при однократном введении могут благоприятно повлиять на объем эякулята и переживаемость живчиков в разбавителях спермы. Большие дозы витамина А (300—450 тысяч м.е. на кролика) при однократном введении могут повлиять неблагоприятно на процент живчиков с

Dubiel A., Monkiewicz J., Graczyk S. — Preliminary examinations on the influence of vitamin A on some semen parameters in rabbits.

The observations were carried out on 9 rabbits, 12—18 months old, weighing 4.5—5 kg. The animals were divided into three groups. The first group was given once vitamin A intramuscularly at the dose of 100000 and 200000 I. U., the second group received 300000, 400000 and 450000 I. U., the third group (males) served as a control. Before and after application

of vitamin A there were taken and examined 5—6 ejaculates at intervals of 7—13 days. Simultaneously there were examined the level of the vitamin in the serum of all the animals under study. It was found that small doses of the vitamin (100000—200000 I.U. per animal/can influence positively the volume of

ejaculates and the survival of spermatozoons in different suspensions. Large doses of vit. A (300000—450000 I.U.) can influence negatively on the percentage of spermatozoons with normal movement and lead to necrospemia, and the time of survival in suspensions is shortened.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

MICHAŁ BARTOSZCZE
Puławy

Zestaw do ciągłej trypsynizacji tkanek

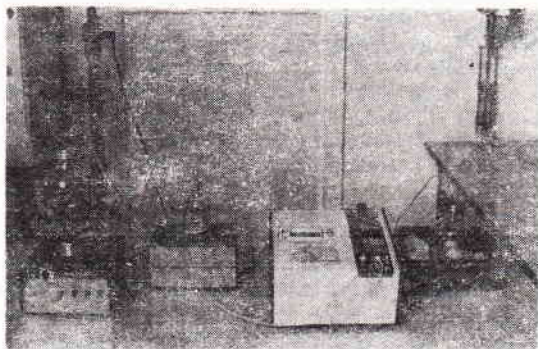
Pierwsze hodowle komórek uzyskiwane drogą trypsynizacji zarodków lub noworodków oraz ich narządów wewnętrznych z uwagi na szereg zalet (1) znalazły wszechstronne zastosowanie w wirusologii, zarówno dla celów naukowo-badawczych jak i diagnostycznych.

Stosowane dotychczas powszechnie metody trypsynizacji są jednak mało wydajne, pracochłonne i stwarzają możliwość (z uwagi na konieczność częstego otwierania naczyń) łatwego zakażenia komórek czynnikami zanieczyszczającymi (bakterie, pleśnie).

Biorąc pod uwagę powyższe niedogodności czynione są próby zmechanizowania procesu trypsynizacji, czego przykładem jest aparat węgierski „Tripszimat” (2).

Wobec braku na rynku krajowym tego typu aparatury podjęto próbę opracowania zestawu, działającego na zasadzie ciągłego odbioru komórek i uzupełnianiu ubytku trypsyny. W skład zestawu wchodzi następujące elementy:

- mieszadło magnetyczne (ATM) z regulacją temperatury;
 - pompa dozująca UNIPAN typ 304;
 - przewody doprowadzające z polichlorku winylu i rurki tłoczące o średnicy 2 mm;
 - kalibrowana butelka do trypsynizacji (500 ml);
 - filtr do odbioru komórek;
 - butelka do odbioru zawiesiny komórek (500 ml);
- Ogólny widok zestawu przedstawia ryc. 1. Głów-



Ryc. 1. Ogólny widok zestawu do trypsynizacji z ciągłym odbiorem komórek

nym elementem zestawu jest pompa dozująca, pozwalająca na ciągle przetłaczanie i odbiór (przewodami) określonej ilości cieczy, przy zachowaniu warunków całkowitej sterylności. Wydajność pompy wynosi od 0,08—96 ml/min.

W celu odbioru uwolnienia z tkanki komórek i umożliwienia dostania się do przewodów kawałeczków

tkanki, w naczyniu do trypsynizacji umieszczono rurkę szklaną odpowiednio zagiętą do kształtu butelki. Na dolną część rurki nałożono filtr metalowy o wielkości oczek około 1 mm. Na filtr nakładano dodatkowo (luźno) warstwę gazy. Dolny odcinek filtru umieszczono w odległości 0,5—1 cm od dna butelki i 0,5 cm od jej ścianki. Rurkę z filtrem umocowano w korku gumowym butelki i połączono z przewodem do odbioru zawiesiny.

Przygotowanie zestawu do pracy polegało na wyjałowieniu (w autoklawie) naczyń wraz z filtrem oraz przewodów (w 75% alkoholu) i połączeniu poszczególnych elementów z przewodami za pomocą stożkowych końcówek wykładanych do igieł Record.

W badaniach nad oceną przydatności zestawu do trypsynizacji użyto tkankę zarodka kurzego. Wstępne czynności, polegające na opłukaniu i rozdrobnieniu zarodków, przeprowadzano w sposób powszechnie stosowany. Rozdrobnioną tkankę przenoszono do butelki trypsynizacyjnej i zalewano określoną ilością trypsyny. Naczynie z tkanką umieszczano w łaźni wodnej (37°C) na mieszadle magnetycznym, a następnie włączano mieszadło i pompę dozującą. U uruchomienie pompy powodowało zassanie przez filtr określonej ilości zawiesiny (uwolnionych) komórek i przetłoczenie jej przewodem do butelki zbiorczej, którą umieszczono w plastikowym pudełku z lodem (przerwanie procesu trawienia). Równocześnie drugim przewodem, łączącym naczynie do trypsynizacji z butelką, zawierającą trypsynę, ubytek trypsyny został uzupełniony świeżą porcją roztworu.

Stwierdzono, że optymalny czas trypsynizacji zarodków kurzych (7—10 zarodków) wynosił od 70—90 minut, przy wydatku 1,5 ml zawiesiny na minutę. Z 1 g tkanki uzyskiwano przeciętnie około 2×10^6 komórek przy stosunku komórek żywych do martwych jak 5:1. Komórki po odwirowaniu zawieszano w płynie odżywczym wzrostowym i rozlewano do probówek.

Na zakończenie przewody plastikowe przepłukiwano płynem fizjologicznym, przedmuchiwano powietrzem i odkażano 75% alkoholem.

W porównaniu do metod tradycyjnych trypsynizacja z ciągłym odbiorem komórek jest bardziej wydajna, zmniejsza możliwość zakażenia komórek oraz zmniejsza liczbę komórek uszkodzonych.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki celowe będzie przeprowadzenie dalszych doświadczeń dla określenia przydatności opisanego zestawu do trypsynizacji innych tkanek.

Piśmiennictwo

1. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna. PWRiL 1965.
2. Marton A.: Acta mikrobiol. hung. 20, 481. 1973.

Adres autora: dr Michał Bartoszcze, ul. Krańcowa 1/19. 24-100 Puławy.