

JAN PILCH, MARIA STRUPCZEWSKA

## Liofilizacja - perspektywiczna metoda konserwacji nasienia zwierząt ?

Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienienia Zwierząt Instytutu Zootechniki w Balicach k. Krakowa

Wprowadzenie do praktyki hodowli zwierząt metody zamrażania nasienia miało ogromne znaczenie dla zwiększenia produkcji w tej dziedzinie gospodarki. Dzięki opanowaniu i wprowadzeniu tej metody do praktyki, możliwym było szerokie użycie buhajów sprawdzonych, co z kolei pozwoliło uzyskać szybki postęp hodowlany.

Jednakże sposób konserwacji nasienia przez mrożenie i przechowywanie w ciekłym azocie posiada też szereg cech ujemnych. Główną niedogodnością jest wysoki koszt metody. Składa się na to przede wszystkim koszt naczyń kriogenicznych (kontenerów) do przechowywania oraz transportu nasienia i ciekłego azotu. Kraje o średnim i niskim poziomie technicznego zaawansowania z reguły nie są w stanie podjąć u siebie produkcji tego sprzętu, a więc muszą opierać się na imporcie. Produkcja ciekłego azotu jest już szerzej rozpowszechniona, niemniej niektóre kraje stale odczuwają jego niedobór, a są i takie, które importują ten środek chłodzący. Użycie ciekłego azotu o temperaturze minus 196°C jako czynnika konserwującego stwarza również szereg trudnych problemów dotyczących BHP personelu zatrudnionego w całym cyklu produkcyjnym: od laboratorium w stacji unasienienia poprzez banki nasienia, transport aż do inseminatorów w terenie.

Dlatego też każde nowe rozwiązanie eliminujące lub chociażby ograniczające użycie sprzętu kriogenicznego i ciekłych gazów z jednej strony, a zapewniające warunki długotrwałego przechowywania i normalnej płodności z drugiej — stanowiłoby w hodowli kolejny krok w kierunku uproszczenia i obniżenia kosztów pracy.

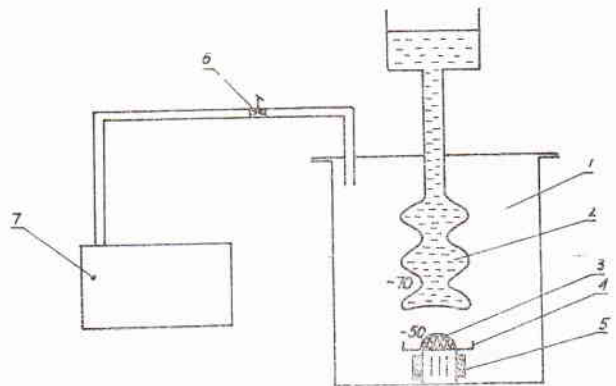
Ostatnie doniesienia dotyczące prac nad zagadnieniem liofilizacji plemników wydają się budzić pewne nadzieje na oczekiwany postęp w dziedzinie konserwacji nasienia.

Liofilizacja jest metodą konserwacji, polegającą na zamrożeniu a następnie odwodnieniu (wysuszeniu) materiału drogą sublimacji lodu. Schematycznie proces ten przebiega w sposób następujący (ryc. 1):

1. materiał jest zamrażany w warunkach normalnych (ciśn. atm.),

2. zamrożony materiał jest poddawany procesowi odwodnienia. W tym celu umieszcza się go w komorze o obniżonej preżności pary wodnej, do której dostarcza się następnie ciepło. Warunki te powodują sublimację lodu w parę wodną, która jest usuwana albo drogą kondensacji na oziębionej powierzchni albo jest chemicznie pochłaniana względnie odpompowywana z komory,

3. po uzyskaniu odpowiedniego stopnia odwodnienia materiał jest umieszczony w hermetycznym opakowaniu i może być przechowywany w zależności od potrzeb albo w temperaturze pokojowej lub w temperaturze obniżonej.



Ryc. 1. Schemat urządzenia do liofilizacji

Objaśnienia: 1 = komora; 2 = kondensator; 3 = liofilizowana próbka; 4 = podstawka; 5 = grzałka; 6 = zawór; 7 = pompa próżniowa.

Rozpowszechniona szeroko w konserwacji żywności, farmaceutyków, preparatów histologicznych itp., liofilizacja charakteryzuje się następującymi walorami:

1. zachowanie cech fizyczno-chemicznych i biologicznych materiału,
2. zachowanie w znacznym stopniu pierwotnej mikrostruktury,
3. duża stabilność liofilizowanego produktu w różnych warunkach otoczenia przy odpowiednim opakowaniu,
4. łatwość transportu i magazynowania,
5. łatwość odtwarzania wartości początkowej materiału przez dodanie wody lub innych rozpuszczalników.

Z dotychczasowych badań wynika, że o ile biologiczny materiał nieżywy konserwuje się łatwo przy zastosowaniu tej metody, o tyle przypadki udanej liofilizacji komórek żywych należą jeszcze do rzadkości. Do liczby tych rodzajów komórek, które udało się już skutecznie zliofilizować należą plemniki zwierząt, zwłaszcza nasienie buhaja.

Pierwsze doniesienie o próbie liofilizacji plemników pojawiło się w 1949 r. Polge, Smith i Parkes (cyt. za 3) liofilizowali plemniki koguta rozcieńczone płynem Ringera z 30% zawartością gliceryny. W przypadku odciągnięcia 85—90% wody w procesie suszenia używali 50% plemników ruchliwych w nasieniu ocenianym bezpośrednio po zakończeniu procesu. Natomiast po 2 go-

dzinach przetrzymywania w temperaturze pokojowej plemniki ginęły.

W 1954 r. Sherman (9) liofilizując plemniki ludzkie w obecności gliceryny nie uzyskał pozytywnego wyniku. Autor stwierdza, że wysoka koncentracja gliceryny unieruchamia, a znaczne odciagnięcie wody niszczy plemniki.

Leidl (6) w 1954 r. obserwował obumieranie plemników w wypadku odciagnięcia 95% wody z liofilizowanego nasienia rozcieńczonego uprzednio rozrzedzalnikiem cytrynianowo-żółtkowym z 10% zawartością gliceryny. W miarę suszenia koncentracja gliceryny w nasieniu wzrastała, co zdaniem autora toksycznie oddziaływało na plemniki. Próba oddzielenia gliceryny przed rozpoczęciem liofilizacji nie powiodła się.

Biały i Smith (2) w 1957 r. zamrażali nasienie buhaja w obecności rozcieńczalnika cytrynianowo-żółtkowego z 7,5% dodatkami gliceryny, a następnie suszyli do różnych zawartości wody. Przy 40% pozostałej w nasieniu wody ruchliwość plemników wynosiła średnio 11,5% to znaczy tyle samo ile w nasieniu nie suszonym. Ruchliwość ta obniżała się w miarę suszenia i przy 75% odciagniętej wody wynosiła 4,1%, a przy 95% tylko nieznaczne plemniki wykazywały ruch. W doświadczeniu tym odtwarzanie odbywało się natychmiast po zakończeniu procesu liofilizacji.

W tym samym roku Sherman (10) przeprowadził liofilizację, tym razem plemników buhaja, zmieszanych z żółtkiem jaja kurzego i 7,0% dodatkami gliceryny. Autor doszedł do wniosku, że powodem obumierania plemników był sposób i szybkość suszenia, wysoka koncentracja gliceryny i soli w suszonej próbce oraz sposób i szybkość wprowadzania wody w procesie odtwarzania komórek.

W tym samym również roku Juszczenko (4) doniósł o skutecznych próbach liofilizacji plemników buhaja, tryka i królika. Autor stosował rozcieńczalniki z różną zawartością gliceryny (7 do 20%), którą następnie usuwał z rozcieńczonego nasienia przed rozpoczęciem procesu liofilizacji. Wysuszone próbki plemników buhaja były przechowywane przez 18 do 20 miesięcy powyżej temperatury zamrażania i po odtworzeniu zawierały komórki żywe. Jest to jak dotąd jedyny zrelacjonowany w literaturze przypadek przechowywania nasienia zliofilizowanego w temperaturze wyższej od punktu zamrażania przez okres dłuższy niż wynosi czas przeżywania nie zamrożonych komórek. Autor nie przeprowadził próby inseminacji krów tym nasieniem. Test płodności przeprowadził natomiast na zliofilizowanym nasieniu królika uzyskując 12 miotów normalnie rozwiniętego potomstwa. Powyższe wyniki nie zostały niestety powtórzone przez autora, a próby sprawdzenia tej techniki podejmowane przez innych badaczy zakończyły się niepowodzeniem.

W 1958 r. Albright i wsp. (1) stosując natychmiastowe odtwarzanie obserwowali 5—10% plemników o ruchu postępowym w nasieniu buhaja rozcieńczonym pełnym mlekiem z 10% dodatkami gliceryny i liofilizowanym przez 45 min.

Meryman (cyt. za 3) doniósł w 1960 r. o pozytywnym wyniku liofilizacji plemników buhaja przeprowadzonej bez udziału gliceryny jako czynnika ochronnego. Zliofilizowane próbki nasienia o zawartości wody szacowanej na 8% wykazywały dobrą ruchliwość po natychmiastowym odtworzeniu. Po 24 godzinnym okresie przetrzymywania obserwowano jedynie ślady ruchliwości i ten stan utrzymywał się do 6 dni. W próbie biologicznej jedna krowa została zapłodniona. Inni badacze chcąc wypróbować podaną technikę nie uzyskali pozytywnych rezultatów. Również Meryman i Kafig (7) w 1963 r. donieśli o nieudanej próbie potwierdzenia tego wcześniejszego, pozytywnego wyniku.

W 1960 r. także Anderson i Merilan (cyt. za 3) liofilizowali plemniki buhaja. Zastosowali oni różne sposoby postępowania używając nasienia nie rozcieńczonego i rozcieńczonego różnymi rozrzedzalnikami oraz stosując różne sposoby odwodnienia zamrożonego materiału. Wypróbowali też technikę podaną przez Juszczenkę w 1957 r. Jednakże żadna kombinacja nie dała pozytyw-

nego wyniku. Autorzy przypisali to wysokiej koncentracji gliceryny pozostającej w wysuszonej próbce.

W następnym roku Nei i Nagase (cyt. za 3) stosując metodę Merymana, na kilka prób w jednym przypadku zanotowali sukces. Stwierdzili oni, że odciagnięcie z próbki 75% wody zabija plemniki.

W tymże roku Saacke i Alquist (8) przeprowadzili próby liofilizacji nasienia buhaja przy użyciu metod Leidla, Juszczenki i Merymana. Żadna z nich nie dała pozytywnego wyniku. Stwierdzili oni, że obecność gliceryny w czasie suszenia daje woskopodobną pozostałość, która potem rozpuszcza się z dużą trudnością w czasie odtwarzania. Metoda Juszczenki usuwania gliceryny nie rozwiązuje tego problemu. Jednocześnie obserwacje czynione przy użyciu mikroskopu elektronowego wskazały, że w czasie liofilizacji uszkodzeniu ulega błona cytoplazmatyczna plemnika.

Po dłuższej przerwie w 1967 r. Singh i Roy (cyt. za 3) studiowali związek pomiędzy rozcieńczalnikami cytrynianowo-żółtkowym i mlekowym z dodatkiem (7%) lub bez dodatku gliceryny a temperaturą jaką posiadała próbka przed liofilizacją: +5°C, +20°C i -40°C. Najlepsze wyniki osiągnęli przy użyciu rozcieńczalnika cytrynianowo-żółtkowego bez dodatku gliceryny i temp. próbki wynoszącej +5°C. Najwyższą ruchliwość po liofilizacji wynosząca średnio 20,1% uzyskana była po osiągnięciu całkowitego wysuszenia próbki (ocenianego wzrokowo). W badaniach tych nie próbowano przetrzymać nasienia i nie przeprowadzano też testu biologicznego.

Z analizy wymienionego wyżej przeglądu prac nad liofilizacją plemników można wyciągnąć przypuszczenie, że główną przyczyną niepowodzeń była obecność gliceryny w środowisku. W trakcie suszenia gliceryna w postaci woskopodobnej pozostałości otacza komórki, nie wysycha, a w czasie postępującego procesu liofilizacji jej koncentracja wzrasta. W rezultacie powstaje środowisko o bardzo niekorzystnym stosunku toksycznej w swoim stężeniu gliceryny do wysuszonych komórek i innych neutralnych substancji rozcieńczalnika.

Biorąc to pod uwagę Graham z zespołem współpracowników z Uniwersytetu Minnesota (USA) zrezygnowali ze stosowania gliceryny jako środka kriochronnego i wprowadzili rozcieńczalnik, którego głównymi składnikami jest substancja o nazwie Tris oraz żółtko jaja kurzego. Kompleksowe badania podjęte przez ten zespół pracowników dały w 1974 r. (3) jedno urodzone cielę po nasieniu liofilizowanym, zawierającym 12% wody, a w 1976 r. dalsze sukcesy przedstawione na Międzynarodowym Kongresie Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt w Krakowie (5). Autorzy tego ostatniego eksperymentu Larson i Graham użyli do badań nasienia buhajów rozcieńczonego rozrzedzalnikiem zawierającym Tris, cytrynian sodu i żółtko jaja kurzego, o pH 7,2. Nasienie zamrażali w kuleczkach o objętości 0,025 ml na suchym lodzie. Partie kuleczek o wadze 400 g poddawali suszeniu w komorze próżniowej o temperaturze -50°C. Po trzech dniach suszenia próbki zawierały 50% wody, a po 6 dniach już tylko 7%. Na tym etapie część próbek przenoszono do ciekłego azotu, a pozostałe podgrzewano do 20°C nie przerywając suszenia. Po dalszych 4 dniach suszenia, kiedy próbki zawierały już śladowe ilości wody przerywano proces odwadniania i pozostawiano je w temperaturze otoczenia (ok. 25°C).

Rozmrażanie przeprowadzano w roztworze cytrynianu sodu w łaźni wodnej o temperaturze 37°C.

Ruchliwość nasienia nie ulegała zmianie w miarę postępującego suszenia aż do poziomu 30% zawartości wody. Dalsze suszenie do poziomu 3% wody powodowało spadek ruchliwości, a poniżej 3% wody nasienie nie wykazywało już żadnego ruchu. Uszkodzenia akrosomów zaczęły się zaznaczać przy 7%, a poziom aminotransferazy aspar. nie zmienił się do 0,5 procentowej zawartości wody w plemnikach.

Do inseminacji stosowano dawki o obj. 2 ml, zawierające 160 mln plemników. Ogółem unasienniono 65 krów nasieniem o różnym stopniu wysuszenia. Wyniki przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Wyniki badań Larsona i Grahama (5)

| Zawartość wody w nasieniu (%) | 100  | 50   | 25   | 12   | 7    | ok 0 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Liczba krów zapłodnionych     | 6/12 | 4/12 | 4/12 | 0/12 | 2/14 | 1/3  |
| Liczba krów inseminowanych    |      |      |      |      |      |      |

Ciąże uzyskane po inseminacji nasieniem zawierającym 50,25 i 7% wody dowodzą, że zdolność do zapłodnienia plemników poddanych znacznemu odwodnieniu jest zjawiskiem realnym i powtarzalnym. Natomiast jedna ciąża uzyskana po unasiennieniu 3 krów nasieniem prawie całkowicie wysuszonym i w dodatku prze-

chowowanym przez 1 miesiąc w temperaturze 25°C była dla samych autorów dużym zaskoczeniem. Ich zdaniem, ze względu na małe liczebności, próby te muszą być powtórzone i zweryfikowane.

Jak widać z powyższego przeglądu w 28 letniej historii badań nad liofilizacją plemników do 1974 r. nie uzyskano obserwowanego postępu. Dopiero badania amerykańskie prowadzone na przestrzeni ostatnich 3 lat przyniosły obiecujące rezultaty. Powtarzalne przypadki zacień krów po nasieniu liofilizowanym rokuja nadzieję opanowania tej techniki na skalę praktyczną przez ośrodki badawcze najbardziej obecnie zaawansowane. Z drugiej strony wyniki te wpływają niewątpliwie na ożywienie prac badawczych w tym kierunku podejmowanych przez laboratoria innych krajów. W tej atmosferze rozwój liofilizacji jako nowej, perspektywicznej metody konserwacji nasienia może się stać sprawą realną.

#### Piśmiennictwo

1. Albright J. L., Erb R. E., Ehlers M. H.: J. Dairy Sci. 41, 206, 1958.
2. Biely G., Smith V. R.: J. Dairy Sci. 40, 739, 1957.
3. Graham E. F., Larson E. V., Crabo B. G.: Proc. 5th Techn. Conf. AI and Reprod., NAAB, 1974.
4. Juščenko N. P.: Dokl. Akad. Selskochoh. Nauk. Leningrad, 22 (6), 37, 1957.
5. Larson E. V., Graham E. F.: Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. AI Kraków, Vol. IV, 622, 1976.
6. Leidl E.: Proc. 3th Congr. Anim. Reprod., Cambridge, 3, 39, 1956.
7. Meryman H. T., Kafig E.: J. Reprod. Fertil. 5, 87, 1963.
8. Saacke R. G., Almquist J. O.: Nature 192, 995, 1961.
9. Sherman J. K.: Am. J. Physiol. 190, 281, 1957.
10. Sherman J. K.: Fert. Steril. 5, 357, 1954.

Adres autora: mgr inż. Jan Pilch, Instytut Zootechniki, 32-063 Bałice K. Krakowa.

**HABRDA J., MALIKOVA M.:** Trwałość pozostałości penicyliny w tkankach cieląt po pozajelitowym, leczniczym podaniu preparatu Prokain-penicillin G inj. ad usum vet. (Pretravavani rezidui penicilinu v organizmu telat po parenteralni lecebne aplikaci pripravku Prokain-Penicillin G inj. ad usum vet.). Vet. Med. (Praha) 21, 161—166, 1976 (3).

Dwoma dyfuzyjnymi metodami określono zawartość penicyliny w tkankach 15 szt. cieląt po jednorazowym, domięśniowym podaniu Prokain-Penicillin G (Spofa) inj. ad us. vet. w dawce 25 000 j. m. na 1 kg wagi ciała. Do badań jako drobnoustrojów testowych użyto 3 muzealne szczepy: *Bac. subtilis* (ATCC 6633), *Sarcina lutea* (ATCC 9341) i *Micrococcus flavus* (ATCC 19240). Ilościowe określenie penicyliny w próbkach odczytywano z krzywej standardowej. Obie zastosowane metody były mniej więcej jednakowo czułe, a z drobnoustrojów testowych najbardziej przydatny okazał się *Micrococcus flavus*.

Po 2, 3, 5 i 20 dniach od podania antybiotyku u wszystkich doświadczalnych cieląt (po dwa w każdej grupie) wyniki były dodatnie, po 10 dniach antybiotyku stwierdzono u 3 cieląt na 4 badanych, a po 15 dniach u 2 szt. cieląt na trzy badane. Najczęściej penicylinę stwierdzano w wątrobie, nerkach i w tkance mięśniowej w miejscach iniekcji. Najwyższe stężenie antybiotyku było w miejscu iniekcji, a najniższe w rdzeniu kręgowym. W tkance mięśniowej (oprócz miejsc iniekcji) stwierdzono niewielkie ilości antybiotyku nawet jeszcze po upływie 20 dni od podania. Obróbka kulinarna (gotowanie i pieczenie) i technologiczna (solenie

i mrożenie) nie w każdym przypadku inaktywowały penicylinę. Autorzy polecają okres karencji dla badanego antybiotyku 30 dni.

d. i.

**GREEN D., MOOR R. M.:** Wpływ narkozy na poziom progesteronu i kortyzolu w płazmie krwi obwodowej owiec. (The influence of anaesthesia on the concentrations of progesterone and cortisol in peripheral blood plasma of sheep). Res. vet. Sci. 22, 122—129, 1977 (1).

Znieczulanie ogólne wywiera wpływ na poziom hormonów sterydowych i gonadotropin u wielu gatunków zwierząt. Wpływ halotanu i pentobarbitonu sodowego, stosowanych łącznie lub oddzielnie na zawartość progesteronu i kortyzolu w płazmie przebadano na 10 owcach poddanych hysterektomii w lutealnej fazie cyklu płciowego. Grupę kontrolną stanowiło 5 owiec. Zwierzęta z grupy A otrzymały pentobarbiton sodowy dożylnie w dawce 25 mg/kg, a następnie zastosowano narkozę wziewną przy użyciu halotanu (1,8% halotanu w powietrzu wdychanym). W grupie B narkozę wywołano i podtrzymywano halotanem, zaś w grupie C stosowano w tym celu pentobarbiton sodowy. Krew do badań pobierano na 30 minut przed narkozą oraz po 0, 5, 30, 60 min. i 4, 24, i 30 godz. po narkozie. U wszystkich owiec poddanych narkozie występował wzrost poziomu progesteronu i kortyzolu w płazmie po około godzinie od chwili wystąpienia narkozy. W grupie A ten wzrost był statystycznie znamienny, w grupie B znamiennemu zwiększeniu ulegał poziom kortyzolu w płazmie. Po 4 godzinach poziom progesteronu w płazmie powracał do wartości wyjściowych.

G.