

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

ERIK BLOM

Ocena morfologiczna wad plemników buhaja. II. Propozycja nowej klasyfikacji wad plemników

Z Państwowego Instytutu Weterynarii w Kopenhadze (Statens Veterinaere Serumlaboratorium,
Bülowsvej 27, DK — 1870, Kopenhagen V, Dania)

Poprawna klasyfikacja różnych wad plemników występujących w spermogramie buhaja była przedmiotem dyskusji już od wielu lat. Lagerlöf (26) zalecał zliczanie razem wszystkich obserwowanych wad plemników z pominięciem tylko bardzo pospolitych dwóch ich typów: wolnych, luźnych, normalnych główek oraz pojedynczych pętli witek. Z początkiem lat czterdziestych Herman i Swanson (24) oraz inni autorzy w USA w swoich klasyfikacjach łączyli razem wszystkie nieprawidłowe formy plemników, co często było związane z błędną oceną płodnych buhajów. Stąd doszli do wniosku, że morfologia plemników przy badaniu płodności wydaje się mieć w większości przypadków tylko drugorzędne znaczenie. W początkach lat czterdziestych znaczenie badań morfologicznych plemników znacznie się obniżyło. Z inspiracji wysuwanych przez Milovanova (27) zaproponowałem pewne usprawnienie systemu klasyfikacji przez podział wad plemników na dwie grupy:

1. Zmiany pierwotne — to jest te, które powstają w czasie spermiogenezy, a związane są z procesami patologicznymi, przebiegającymi w nabłonku nasieniotwórczym.

2. Zmiany wtórne — to jest te, które prawdopodobnie w większości przypadków powstają już po sformowaniu się plemnika i opuszczeniu przez niego jądra, a do których zaliczyłem: a) wolne, luźne, normalne główki, b) plemniki z kropłą protoplazmy w położeniu bliższym oraz c) dalszym, d) plemniki z pojedynczą pętlą witek, e) plemniki z odłączoną czapeczką akrosomalną.

Dla poprawnej klasyfikacji proponowałem wszystkie pierwotne nieprawidłowości łączyć w jedną grupę, podczas gdy wtórne zmiany traktować oddzielnie, nie łącząc ich, ale oceniając niezależnie ich ilości (2, 3).

Od czasu przedstawienia tego schematu klasyfikacji na I Międzynarodowym Kongresie Rozrodu Zwierząt w Mediolanie w 1948 r. (2) jest on szeroko stosowany i prawie ogólnie przyjęty. Jednakże obecnie doświadczenia uzyskane z rutynowych prac diagnostycznych i nowoczesne badania mikroskopem elektronowym wydają się nie potwierdzać potrzeby dalszej klasyfikacji z podziałem na zmiany pier-

wotne i wtórne. Dla przykładu podaję, że zaburzenia powodujące pozostawanie kropeł protoplazmy w położeniu bliższym, w ejakulowanych plemnikach mogą jednak pochodzić z nabłonka nasieniotwórczego, a nie jak przypuszczano z przewodu najądrza. Także i w przypadkach poważnych wad witek jak wada „DAG” (typowa zmiana pierwotna) — wiemy teraz, że wady tego typu powstają w czasie przesuwania się plemników przez głowę najądrza, ponieważ plemniki uzyskane z jąder mają wygląd normalny. Co więcej, szczegółowe badania przeprowadzone przez Rao (29) wskazują wyraźnie, że dobrze znane odchylenia w formach główek jak: wąskie, małe normalne, olbrzymie i skrócone szerokie — trzeba uznać za morfologiczne warianty nie związane ze zmianami patologicznymi w jądrach.

W konsekwencji tych spostrzeżeń zaproponowałem (8) nowe zasady klasyfikacji plemników z podziałem na wady główne (major defects) oraz pomniejsze (minor defects), tab. 1. Definicja tych określeń może być następująca:

- główne wady plemników stanowią wszystkie nieprawidłowe typy plemników, które zostały wykazane jako skorelowane z obniżoną płodnością,
- pomniejsze wady plemników — to inne odchylenia w formach plemników, które wydają się mieć mniejsze znaczenie dla płodności buhaja.

Przy praktycznej ocenie spermogramów, główne wady plemników (tab. 1) są zliczane razem i musi być podana ich ogólna liczba. Równocześnie jakaś dominująca nieprawidłowość w spermogramie powinna być podkreślona, zanotowana i podana w końcowym rezultacie. Jeżeli jednak plemnik wykazuje więcej niż jedną wadę, to powinna być rejestrowana tylko ta, która ma mniejszą liczebność. W przypadku wady „bezglowego plemnika” wystąpienie dużej liczby wolnych normalnych główek musi być łączone z występowaniem oddzielonych witek z charakterystyczną bliższą pętlą. Liczne ruchliwe, luźne witek plemników należą także do charakterystycznego obrazu klinicznego. Dotychczas wada ta była potwierdzona dość powszechnie u rasy Guernsey, ale

Tab. 1.

Wady główne			Wady podrzędne		
Lp	Plemniki (1-15)		Lp	Plemniki (16-24) i inne komórki (I-VI)	
0	Normalne kontrola		0	Normalne kontrola	
1	Niedorozwinięte		16	Ze zwężonymi główkami	
2	Podwójne		17	Z małymi główkami	
			18	Z główkami olbrzymimi i krótkie, a szerokie	
3	„Guzowate” wady akrosomu		19	Luźne normalne główki	
4	„Bezglowe” (typu Guernsey)		20	Oddzielone błony akrosomu widoczne w rozmazach z tuszem	
5	Z „diademem”		21	Z odosionym przystawieniem wstki	
6	Gruszkowate		22	Z kroplą protoplazmy w położeniu dalszym	
7	Ze zwężoną główką u podstawy		23	Z pojedynczą pętlą wstki	
8	Z zatartym konturem główki			24	Z pętlą lub zagięciem bliżej końca wstki
9	Z matą nieprawidłową główką		I		Komórki olbrzymie (wielojądrowe)
10	Luźne nieprawidłowe główki		II	Twory meduzowate	
11	Z „korkociągim” wstanki		III	Komórki olbrzymie	
12	Z innymi wadami wstanki (łącznie z formą „pieńka”)		IV	Nabłonki	
13	Z kroplą protoplazmy w położeniu bliższym		V	Leukocyty	
14	Z „niby kroplą”		VI	Erytrocyty	
15	Zwinęte wstki w pętle lub ślimakowate (wada DAGA)				

prawdopodobnie występuje także u rasy Hereford. Znaczenie wady odosiowego przystawienia witki (forma abaxialna) jako czynnika obniżającego płodność, nie zostało dotychczas ostatecznie ustalone. W 1952 r. na podstawie badań przeprowadzonych na dużej liczbie buhajów fryzyjskich, Sjollema (33) oceniał tę wadę jako normalną zmienność. Roslanowski (31) nieco później zaobserwował występowanie odosiowego umieszczenia witki w nasieniu polskich buhajów n.c.b. i stwierdził, że pewien procent tej wady występował zwykle u określonych rodzin buhajów.

Na podstawie własnych badań buhajów w Danii, podejrzewałem związek między występowaniem odosiowego ustawienia witki a obniżoną płodnością, jednak nie mogłem tego potwierdzić. Wobec tego w proponowanym schemacie umieściłem tę wadę jako pomniejszoną (minor defects). Pomniejsze wady plemników (tab. 1) nie powinny być nigdy razem zliczane. Według mego zdania jedynie pomniejsze wady przekraczające 10—15% zasługują na uwzględnienie w końcowym wyniku badania morfologicznego nasienia. Muszę tutaj nadmienić, że żaden system klasyfikacji spermogramu nie jest jeszcze w pełni wypróbowany i że nowe obserwacje i usprawnienia techniczne pozwolą na lepsze zrozumienie i konieczną rewizję tych systemów w przyszłości.

W związku z proponowanym systemem klasyfikacji nasuwa się pytanie jak wysoki procent plemników z wadami głównymi może być tolerowany w próbkach nasienia pochodzącego od „normalnego” buhaja? Odpowiedź nie jest łatwa. Nawet niska zawartość 5—10% utrzymujących się kropli proksymalnych, albo plemników z korkociągiem może być związana z niską ruchliwością i obniżoną płodnością. Z praktycznych względów jednak polecałbym utrzymanie tradycyjnego górnego limitu 15% form z wadami głównymi dla normalnego nasienia. Przekroczenie tej ilości jest pewną wskazówką, że w jądrach albo w najądrach istnieją jakieś nieprawidłowe stany. Pełne badanie morfologiczne nasienia powinno obejmować ocenę i liczenie co najmniej 200 plemników w barwionym rozmazie (możliwie kombinowane z badaniem w mikroskopie fazowo-kontrastowym). Niektóre charakterystyczne wady plemników wydają się mieć, jak wspominałem, charakter dziedziczny, dlatego usilnie zaleca się, aby wszystkie hodowlane buhaje przed włączeniem do rozrodu były poddane morfologicznemu badaniu nasienia przez dobrze przygotowanego specjalistę.

U w a g i m e t o d y c z n e

Barwienie plemników. Zarówno w rutynowej pracy nad oceną morfologii plemników, jak i dla różnicowania ich liczenia, osobiście preferuję niżej opisane tzw. „negatywne” metody

barwienia, które nawzajem uzupełniają się bardzo dobrze:

— rozmazy barwione tuszem indyjskim (chińskim),

— rozmazy barwione eozyną z nigrozyną.

Poważną korzyścią stosowania tych „negatywnych” barwień jest to, że wszystkie elementy morfologiczne obecne w ejakulacie można znaleźć w rozmazie, ponieważ nie zostają przy tym wymyte. Przy morfologicznym badaniu nasienia należy używać zawsze co najmniej dwóch metod barwienia, aby można było sprawdzić, czy obserwowane zmiany np. luźne normalne główki nie są tworami sztucznymi, artefaktami. Rozmaz z tuszem indyjskim jest specjalnie przydatny we wstępnych i szybkich orientacyjnych badaniach, ponieważ daje silny kontrast. Wszystkie szczegóły i zmiany, które mają jakiś związek z akrosomem są dobrze widoczne na tych rozmazach, np. takie jak guzowate plemniki i oderwana czapeczka akrosomalna (zsuniecie się *galea capitis*). Do barwienia należy używać dobrej jakości homogenizowanego tuszu indyjskiego. Polecam tusz, w którym po dłuższym czasie stania uległy osadzeniu się większe jego cząstki, np. tusz typu „Pelikan Tusch” 1431 firmy Gunter Wagner Hannover.

Prosta i pewna metoda barwienia żywych i martwych plemników eozyną-nigrozyną została w powodzeniu zastosowana do oceny liczenia plemników (11, 16 i inne). Zaletą jej jest możliwość sprawdzenia, czy wada plemników występuje w żywych, czy w martwych formach — ma to miejsce w przypadku wady „korkociągu”. Słabą stroną tej metody stanowi natomiast niemożność dostatecznej oceny zmian związanych z akrosomem. Dlatego powinna być ona zawsze łączona z barwieniem rozmazów tuszem. Od wielu lat stosuję następującą modyfikację oryginalnego przepisu sporządzania eozyny z nigrozyną: 5% eozyny (niebieska) w roztworze wodnym (1 część), 10% nigrozyna (rozpuszczalna w wodzie) (4 części). Barwniki produkowane przez firmę Georg T. Gurr, London S. W. 6 Anglia, okazały się najlepsze spośród innych próbowanych. Ta mieszanina ma pH wahające się między 9,4—9,9 a zawiera 1% eozyny i 8% nigrozyny. Mieszanina może być przechowywana w temperaturze pokojowej w ciemnych butelkach z zakraplaczem i używana w ciągu 2—3 lat od momentu przygotowania, bez obawy jakichkolwiek zmian czy tworzenia się osadu.

Oba typy rozmazów „negatywnych” wykonane są przez umieszczenie średniej wielkości kropli barwnika na odtłuszczonym, ogrzanym szkiełku podstawowym. Następnie przy użyciu pipety pasteurowskiej kładzie się małą kroplę dobrze wymieszanego nasienia. Te dwie krople dokładnie miesza się ze sobą i zawiesinę rozprowadza po szkiełku w warstwie o różnych grubościach przy pomocy przyłożonej grubszej części pipety. Rozmaz po wysuszeniu

pokrywa się balsamem kanadyjskim, albo podobnym środkiem i nakrywa szkiełkiem nakrywkowym. W ten sposób preparat może być przechowywany bez obawy o wyblaknięcie.

Ultrastruktura. Technika ultra cienkich skrawków badanych w mikroskopie elektronowym stała się dzisiaj cenną pomocą w poznaniu związków między morfologią plemników a nieplodnością samca. Wraz z dalszym postępem technicznym, zwłaszcza metod utrwalania materiału, wzrastają szanse na uzyskanie coraz lepszych rezultatów badań może już w najbliższej przyszłości. Chciałbym podkreślić znaczenie dwóch momentów, które należy uwzględnić przed przystąpieniem do poważniejszych badań nad ultrastruktura plemników:

- jeżeli charakterystyczna wada plemników nie będzie obejmować co najmniej 10—15% populacji plemników, nie ma szans na znalezienie koniecznego materiału o właściwym przekroju, a tym samym prawie niewykonalne będzie rozpoznanie zmian strukturalnych,
- dla porównania i sprawdzenia możliwości występowania artefaktów, konieczne jest prowadzenie równoległe z badaniem materiału patologicznego, badania materiału normalnej próbki nasienia (względnie badania zdrowej tkanki), jąder albo nadjądrzy.

Piśmiennictwo

1. Bane A., Nicander L.: Nord. Vet.-Med. 17, 628, 1965.
2. Blom E.: I Congr. Anim. Reprod., Milano 1944 (nie publikowane) Danish ed. Medlesbl. danske Dyrl. gefor. 31, 446, 1948.
3. Blom E.: On the evaluation of bull semen. Praca dokt., Copenhagen, 1950.

4. Blom E.: Nature (London) 193, 1280, 1959.
5. Blom E.: Nature (London) 209, 739, 1966.
6. Blom E.: Nord. Vet.-Med. 20, 279, 1963.
7. Blom E.: Proc. Int. Symp. imm. of Spermatozoa, Varna 401, 1967.
8. Blom E.: Nord. Vet.-Med. 25, 383, 1973.
9. Blom E.: Materiały nie publikowane.
10. Blom E.: Nord. Vet.-Med. 28, 295, 1976.
11. Blom E.: Sperm morphology with reference to bull infertility. 1-st All-India Symposium (Punjab) 61, 1977.
12. Blom E.: Materiały nie publikowane.
13. Blom E., Birch-Andersen A.: Proc. Danish. Ass. Artif. Insem. Vet., Nyborg 4, 31, 1959.
14. Blom E., Birch-Andersen A.: Nature (London) 194, 989, 1962.
15. Blom E., Birch-Andersen A.: Zesz. problem. post. nauk rol. 67, 285, 1966.
16. Blom E., Birch-Andersen A.: Proc. 5 Wild Congr. Fert. ster., Stockholm 1966, s. 602, (Excerpta Med. no 133).
17. Blom E., Birch-Andersen A.: Proc. 6 Congr. Int. Reprod. anim., Paris 1, 117, 1968.
18. Blom E., Birch-Andersen A.: J. Reprod. Fert. 23, 67, 1970.
19. Blom E., Jensen P.: Nord. Vet.-Med. 29, 194, 1977.
20. Blom E., Wolstrup C.: VIII Int. Congr. Animal Reprod. Artif. Insem., Kraków 4, 690, 1976.
21. Blom E., Aarkrog A.: Acta vet. scand. 13, 438, 1972.
22. Bretschneider L. H.: Proc. Koninkl. Nederl. Akad., Wetensch. 52, 301, 1949.
23. Coubrough R. J., Barker C. A. V.: Proc. 5 Int. Congr. Animal Reprod., Trento 5, 219, 1964.
24. Herman H. A., Swanson E. W.: Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Sta. no 326, 1941.
25. Hancock J. L., Rollinson D. H. L.: Vet. Rec. 61, 742, 1949.
26. Lagerlöf N.: Morphologische Untersuchungen über Veränderungen in Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit vermindeter oder aufgehobener Fertilität. Acta path. microbiol. scand. Suppl. 19, Uppsala, 1934.
27. Milovanov V. K.: Iskusstvennoje osemenenje selskochozajstvennych zivotnych. Wyd. Moskwa, 1940.
28. Olds P. J.: J. Anat. 109, 31, 1971.
29. Rao A. R.: Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Praca dokt., Stockholm, 1971.
30. Retzius Gustav.: Biologische Untersuchungen. Neue Folge, Stockholm 14, 174, 1909.
31. Roslanowski K.: Gen. pol. 10, 152, 1969.
32. Settergren I., Nicander L.: Proc. 6 Congr. int. Reprod. anim., Paris 1, 191, 1968.
33. Sjollem P.: Tijdschr. Diergeneesk. 77, 909, 1952.
34. Teunissen G. H. B.: Tijdschr. Diergeneesk. 71, 292, 1946.
35. Williams W. W., Savage A.: Cornell Vet. 15, 353, 1925.
36. Aamdal J.: Nord. Vet.-Med. 3, 102, 1951.

Tłumaczył i uzupełnił tabelą prof. dr Władysław Bielański, ul. Lobzowska 24/33, 31-140 Kraków.

COX H. U., LUTHER D. G.: Oznaczanie wrażliwości *Pseudomonas aeruginosa* na leki przeciwbakteryjne metodą krążkową i metodą mikrorozcieńczeń. (Determination of antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by disk diffusion and microdilution methods). Am. J. vet. Res. 41, 906-909, 1980 (6).

Porównano wrażliwość 180 szczepów *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od ptaków (20), bydła (12), psów (102), koni (25), kotów (11), owcy (1), świni (1), świnki morskiej (1), węża (1) i dzikiego psa (1) na 12 lekach przeciwbakteryjnych określoną metodą krążkową i metodą rozcieńczeń. W metodzie krążkowej wszystkie szczepy były wrażliwe na kolistynę, odporne na ampicylinę, cefalotynę i nitrofurantoinę. Ponadto 98,3% szczepów była wrażliwa na amikacynę, 96,1% na gentamycynę, 98,3% na tobramycynę. Na karbenicylinę było odporne 58,9%, chloramfenikol 92,8%, kanamycynę 92,2% tetracyklinę 97,2% i TMP + sulfonamid 98,3% szczepów. Całkowitą zgodność między metodą krążkową i metodą rozcieńczeń uzyskano dla ampicyliny, cefalotyny, kolistyny, gentamycyny i nitrofurantoiny. Nieznacznie stopnia różnice występowały w przypadku amikacyny, karbenicyliny, kanamycyny, tetracykliny i tobramycyny. Duże różnice we wrażliwości wystąpiły w przypadku chloramfenikolu i TMP+sulfonamid.

G.

LIU C. T., SANDERS R. P., DOMINIK J. W., FORMAL S. B.: Wyniki dożylnego i aerozolowego stosowania nieoczyszczonej toksyny *Shigella* u małp *Macaca mulatta*. Badania wstępne. (Effects of intravenous and aerosol administration of crude *Shigella* toxin to rhesus macaques. Preliminary study). Am. J. vet. Res. 41, 836-839, 1980 (5).

Celem badań było określenie wielkości dawki, czasu przeżycia i zmian w wybranych wskaźnikach biochemicznych oraz reakcji ze strony układu krążenia i wątroby po dożylnym iniekcji nieoczyszczonej toksyny *Shigella dysenteriae* R 60 u *Macaca mulatta*. Ponadto określono czas przeżycia po aerozolowym podaniu supraletalnej dawki tej toksyny oraz zmiany sekcyjne które rozwinęły się na skutek toksemii. Po iniekcji dożylnej toksyny wystąpił szok, zaburzenia czynnościowe wątroby, zaburzenia w oddychaniu, konwulsje i padnięcia. Czas przeżycia był odwrotnie proporcjonalny do wielkości dawki toksyny. Dawka śmiertelna wahała się w granicach 20-200 mg na kg wagi ciała. Natężenie zmian w sercu i w przewodzie pokarmowym było proporcjonalne do wielkości dawki dożylnej. Przy podaniu toksyny do aerozolu objawy zatrucia nie występowały w okresie 7 dni.

G.