

JÓZEF BADURA, STANISŁAW L. RANDZIO, MACIEJ MAŁECKI

Urządzenie do programowanej konserwacji zarodków zwierząt w niskich temperaturach

Z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu
Z Instytutu Chemii Fizycznej PAN w Warszawie

W ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie transplantacją zarodków zwierząt, pozwalającą na szersze wykorzystanie potencjału genetycznego samic. Osiągnięty postęp w zakresie badań kriobiologicznych stwarza realne szanse wykorzystania tej metody w praktyce (5, 10, 12)).

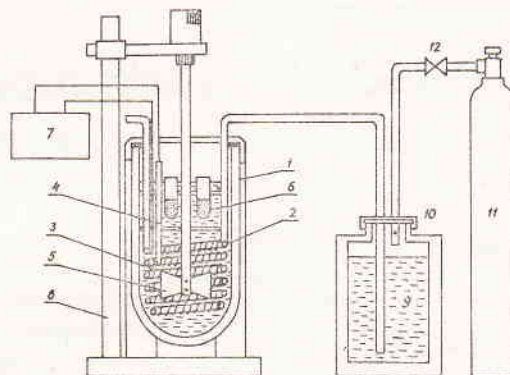
Wprowadzenie transplantacji do praktyki jest związane z podniesieniem efektywności jej podstawowych ogniw: superowulacji (hodowli oocytów i zapłodnienia *in vitro*), pozyskiwania, konserwacji i transplantacji zarodków. Z uwagi na dużą zmienność wyników superowulacji, pozyskiwania zarodków, a w szczególności synchronizacji rui dawcy i biorcy ważną rolę spełnia konserwacja pozyskanych zarodków. Konserwacja w stanie płynnym, pozwalająca na zachowanie zdolności rozwojowych zarodków przez krótki okres, nie rozwiązuje wspomnianych trudności. Problem ten rozwiązuje natomiast zamrażanie zarodków i przetrzymywanie ich w bardzo niskich temperaturach (ciekły azot, wodór), co umożliwi ich przechowywanie przez nieograniczony okres czasu i użycie w sposób dogodny organizacyjnie (10, 12).

Obecnie konserwacja zarodków w niskich temperaturach jest dość skomplikowana i wymaga posiadania odpowiedniego sprzętu kriogenicznego (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 13). Przy zamrażaniu i rozmrażaniu zarodków wymagane są odpowiednie reżimy temperaturowe. Sprostać temu może odpowiednio zautomatyzowany sprzęt. Aparaty takie znajdują się w obrocie — Planer Products Ltd (Anglia), Mini — freezer R 202/200 R i inne. Są one bardzo kosztowne, stąd potrzeba poszukiwania własnych rozwiązań.

Przykładem takiego rozwiązania jest urządzenie, którego schemat ideowy przedstawiony jest na ryc. 1. W termosie (1) o objętości 1 litra umieszczone są następujące elementy: chłodnica (2) wykonana z rurki miedzianej, nawinięty wokół chłodnicy grzejnik (3) w izolacji z „Teflonu”, oporowy czujnik temperatury Pt 100 (4), mieszađło (5) oraz probówki (6), zawierające konserwowane zarodki. Wszystkie te elementy zalane są metanolem lub etanolem do poziomu poniżej górnej krawędzi probówek, które ułożone są w plastikowym stojaku z okrągłymi otworami dla 17 probówek. Probówki zamykane są naturalnymi korkami. Grzejnik (3) i czujnik temperatury (4) podłączone są do regulatora temperatury UNIPAN typ 655 (7). Termos wraz ze wszystkimi elementami konstrukcyjnymi umocowany jest na obudowie mieszađła (8). Źródłem zimna jest ciekły azot zawarty w zbiorniku (9). Nakrętka uszczelniająca (10) na zbiorniku pozwala na wytworzenie pożądanego nadciśnienia w zbiorniku przy pomocy azotu gazowego zawartego w butli (11) i reduktora ciśnienia (12). W nakrętce znajduje się również otwór do połączenia z zawo-

rem bezpieczeństwa, który zabezpiecza przed rozsadzeniem zbiornika w przypadku zbyt dużego nadciśnienia, oraz manometr do pomiaru nadciśnienia.

Działanie opisanego urządzenia jest następujące: przy pomocy regulatora (7) nastawia się wysokość temperatury początkowej, np. 298 K (25°C); natomiast przy pomocy reduktora (12) reguluje się nadciśnienie w zbiorniku (9) na 0,2—0,3 bara, co powoduje przepływ ciekłego azotu przez chłodnicę (2). Po ustaleniu się równowagi w zadanej temperaturze początkowej nastawia się temperaturę do której próbki mają być schłodzone oraz szybkość schładzania. Szybkość schładzania zależy od nastawionej wartości na regulatorze oraz od efektywności chłodzenia. Regulator temperatury UNIPAN typ 655 pozwala na liniowe nastawianie i opadanie temperatury z szybkościami zawartymi w przedziale 0,002—10 K min⁻¹. Po osiągnięciu wyznaczonej temperatury program samoczynnie zatrzymuje się. Można wtedy dokonać potrzebnych operacji na zarodkach oraz wybrać nową szybkość dalszego schładzania do żądanej niższej temperatury.



Rys. 1. Schemat ideowy urządzenia do programowanej konserwacji zarodków w niskich temperaturach

Objaśnienia: 1 — termos, 2 — chłodnica, 3 — grzejnik, 4 — oporowy czujnik temperatury Pt 100, 5 — mieszađło, 6 — probówki z zarodkami w płynie kriochronnym, 7 — programator temperatury UNIPAN typ 655, 8 — obudowa mieszađła, 9 — zbiornik z ciekłym azotem, 10 — nakrętka uszczelniająca, 11 — butla z gazowym azotem, 12 — reduktor ciśnienia.

W skonstruowanym urządzeniu wykonano kilka serii schładzania i ogrzewania. Przy schładzaniu z szybkościami 0,2 K min⁻¹ i 2 K min⁻¹ dokładność liniowego spadku temperatury była rzędu kilku setnych kelwina. Przy tych pomiarach sprawdzających do pomiaru temperatury w funkcji czasu używano termometru kwarcowego z drukarką. W rutynowych pomiarach laboratoryjnych temperatura mierzona jest termoparą umieszczoną w jednej z probówek i podłączonej do rejestratora.

Dokładność działania urządzenia zależy przede wszystkim od poprawnego dobrania nastawienia regulatora oraz od możliwości stacjonarnego przepływu ciekłego azotu przez chłodnicę.

Urządzenie to może być wykorzystane w konserwacji innych materiałów biologicznych, gdzie wymagane jest zamrażanie i rozmrażanie od żądanych temperatur z odpowiednią szybkością. Obecnie prowadzi się w Instytucie zamrażanie zarodków myszy i krów, co będzie tematem następných opracowań.

Piśmiennictwo

1. Forgrave L. F., Rajamahendran P., Baker R. D.: *Can. J. Anim. Sci.* 57, 389, 1977.
2. Leibo S., McGrath J. J., Cravalho E. G.: *Cryobiology* 12, 579, 1975.
3. Masstp A., Jacquolot B., Ectors F.: *Ann. Med. Vet.* 122, 127, 1978.
4. Mazur P.: *Cryobiology* 14, 251, 1977.
5. Shea B. F., Ollto G. W., Jacobson M. E.: *Can. J. Anim. Sci.* 57, 801, 1977.
6. Smorąg Z., Kąńska L., Wierzbowski S.: *Roczn. Nauk zootechn.* 3, 21, 1976.
7. Tsunoda Y., Sugie T.: *J. Reprod. Fert.* 49, 173, 1977.
8. Utsumi K., Yuhara M.: *Jap. J. Fert. Steril.* 20, 102, 1975.
9. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P.: *Science* 178, 411, 1972.
10. Whittingham D. G.: *Genetics* 78, 395, 1974.
11. Wierzbowski S., Smorąg Z., Wierchoś E.: *Medycyna Wet.* 34, 321, 1978.
12. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A.: *J. Reprod. Fert.* 52, 391, 1978.
13. Zeilmaker G. H., Verhamme C. M. P. M.: *Cryobiology* 16, 6, 1979.

Adres autora: dr Józef Badura, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.

Бадурa Ю., Рандзио С. Л., Малецкий М. — Устройство для программированной консервации зародышей животных в низких температурах.

Разработали и выполнили устройство, создающее возможность программированной консервации зародышей и других биологических материалов в низких температурах. Примененный в системе регулятор температуры UNIPAN тип 655 позволяет расти линейно и падать температуре и диапазоне 0,002—10 К мин⁻¹. При охлаждении со скоростями 0,2 К мин⁻¹ и 2 К мин⁻¹ точность линейного спада температуры была порядка нескольких сотных кельвина.

Badura J., Randzio S. L., Malecki M. — Device to conservation of animal embryos at low temperatures.

There was elaborated and made a device which enables programmatic conservation of embryos and other biological materials at low temperature. An applied temperature regulator (Unipan, type 655) allows linear temperature incrising and decrising at the speed contained at the interval of 0.002—10 K min⁻¹. At cooling with a speed of 0.2 K min⁻¹ and 2 K min⁻¹ the exact linear decrease of temperature was some hundredth of Kelvin.

BARBARA STANISŁAWSKA

Rozdziały na żelu skrobiowym białek osocza i esteraz osoczowych u lisic polarnych w czasie ciąży i laktacji

Z Zakładu Fizjologii i Anatomii Zwierząt Instytutu Zootechnicznego ATR w Bydgoszczy

Elektrofereza pozioma i pionowa na żelu skrobiowym okazała się metodą bardzo przydatną do badań genetycznych białek i enzymów u ludzi i zwierząt. W czasie przeprowadzania powyższych badań stwierdzono, że niektóre białka i enzymy ulegają zmianom nie tylko genetycznym, ale również fizjologicznym i chemicznym. U kobiet (12) wykazano pojawienie się dwu dodatkowych frakcji białkowych w czasie ciąży. Zostały one zidentyfikowane jako oksytocynaza CAP₁ i CAP₂. Ryden (14) podaje, że u klaczy, krów, suk, królic i świnek morskich nie obserwowano aktywności oksytocynazowej w czasie ciąży. Badania Dostała (2) wskazują na pewne powinowactwo transferyn do hormonów estrogennych, co wydaje się mieć związek z polimorfizmem u bydła. U kur w okresie poprzedzającym znoszenie jaj, niosek i pierzających się występowały zmiany w niektórych frakcjach białkowych (3, 9), a także w aktywności esteraz (4, 6), pewna zmienność tych enzymów uwarunkowana fizjologicznie występowała również u kurcząt (13). Jastrzębski (6) podaje, że esteraza karboksylowa w okresie poprzedzającym nieśność i u niosek była niewidoczna na żelu, a pojawiała się w okresie pierzenia, zaś u kogutów była obecna cały czas i znikala po podaniu stilbestrolu. Uważa się,

że zmiany aktywności karboksylowej osocza kur są zależne od wpływów hormonów sterydowych tj. estrogenów i progesteronu (6).

Rozdział i identyfikacja esteraz u lisów i piesaków zostały przeprowadzone przez Serowa wsp. (16). Autorzy stwierdzili, że w przerwany systemie buforów na żelu skrobiowym esterazy osocza lisów i piesaków mają identyczne frakcje. Przy użyciu substratów i inhibitorów zostały zidentyfikowane poszczególne strefy aktywności esterazowej osocza tych zwierząt. Frakcją najwolniej wędrującą do anody okazała się esteraza cholinowa. Wykazywała ona tylko jedną strefę aktywności. Nieco szybciej do bieguna dodatniego wędrowała esteraza karboksylowa, która podobnie jak poprzednio opisany enzym miała tylko jedną strefę aktywności. Następne dwie frakcje, leżące przed esterazą karboksylową w kierunku anody, należały do esterazy aryłowej, która miała dwa komponenty AR₂ — wędrujący wolnej i AR₁ — szybciej.

Fizjologiczna zmienność frakcji esterazowych u kur zależna od wpływów hormonalnych oraz fakt, że prawie cały progesteron u ciężarnych lisic jest pochodzenia jajnikowego (10) nasunęły przypuszczenie, że osoczowe frakcje esteraz mogą ulegać zmianom w czasie ciąży i laktacji.