

ROMAN SŁAWETA, JOLANTA SIKORSKA, JERZY STRZEZEK

Wpływ czasu przechowywania nasienia knura w temperaturze 15°C – 18°C na zmiany akrosomów plemników i ich wartość biologiczną

Centralna Stacja Hodowli Zwierząt, Oddział w Parzniewie, 05-800 Pruszków
Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego ART,
10-718 Olsztyn-Kortowo

Określenie odsetka plemników ruchliwych w nasieniu świeżym oraz konserwowanym jest najczęściej stosowanym w praktyce inseminacyjnej testem oceny jakości nasienia knura. Badania Einarssona i Viringa (7) wskazują jednak, że podział na plemniki „ruchliwe” i „nieruchliwe”, w przypadku nasienia knura nie może stanowić obiektywnego wskaźnika w przewidywaniu jego zdolności zapładniającej. Wymienieni autorzy zalecają rozszerzenie powyższej oceny o badania stanu morfologicznego akrosomu plemników, a zwłaszcza zmian jego konturu.

Znaczenie biologiczne akrosomu w procesie zapłodnienia polega na udziale systemu enzymatycznego tej struktury w procesie przenikania plemników przez osłonki komórki jajowej (3, 13). Stąd zmiany morfologiczne akrosomu plemników wiążą się z obniżoną zdolnością zapładniającą oraz płodnością samca (1, 2, 5, 9, 10, 16). Dalszy postęp w zakresie konserwacji nasienia knura uwarunkowany jest opracowaniem w miarę obiektywnej i szybkiej metody oceny przydatności nasienia do sztucznej inseminacji. Strzeżek i wsp. (14) stosując metody biochemiczne przeprowadzili charakterystykę zmian w metabolizmie nasienia, konserwowanym w trzech różnych rozcieńczalnikach. Autorzy ci stwierdzili, że rozcieńczalnik Kiev I w miarę dobrze stabilizuje struktury plemnikowe podczas 48 godz. przechowywania nasienia knura.

Biorąc pod uwagę potrzeby praktyki inseminacyjnej podjęto badania dotyczące oceny zmian morfologicznych akrosomu i stopnia ruchliwości plemników w nasieniu knura, konserwowanym w rozcieńczalniku Kiev I, oraz wpływu powyższych zmian na jego zdolność zapładniającą.

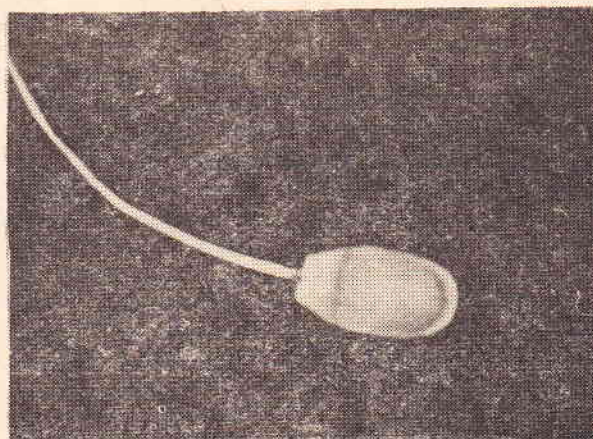
Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 112 ejakulatach, pobranych techniką manualną od 46 knurów użytkowanych w Stacji Unasieniania Loch. Pozyskiwano frakcję bogatą w plemniki, którą po ocenie objętości, ruchliwości i koncentracji plemników rozcieńczano tak, by w objętości 100 ml znajdowało się około 4 mld plemników żywych. Do rozcieńczania nasienia stosowano rozrzedzalnik Kiev I o składzie: glukoza 60,00 g, cytrynian sodu $\times 2H_2O$ 3,75 g, EDTA 3,00 g, węgiel sodu kwaśny 1,25 g, streptomycyna 0,50 g, penicylina 500,000 j. m., woda (red.) ad 1000 ml.

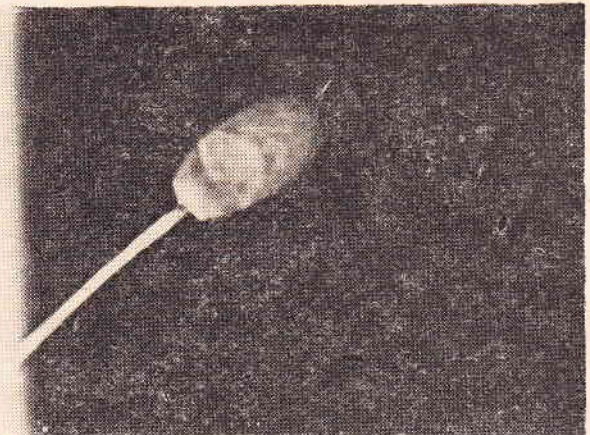
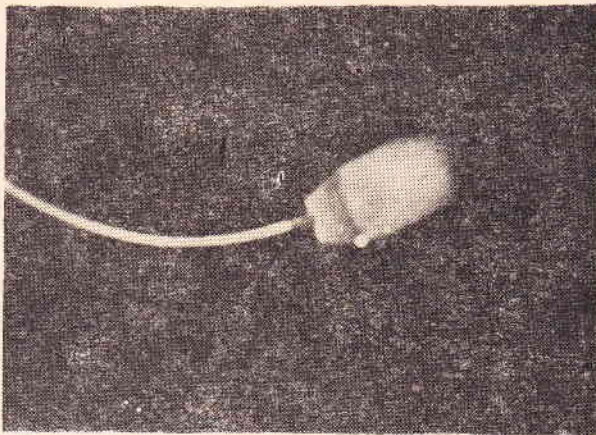
Rozcieńczone nasienie po schłodzeniu w ciągu 2–3 godzin do temperatury 15–18°C transportowano w teren w kalibrowanych butelkach o pojemności 250 ml i 500 ml, umieszczonych w termosach dla utrzymania stałej temperatury. Ogółem inseminowano 226 loch, z czego 77 — nasieniem przechowywanym 0–12 godz., 83 — nasieniem przechowywanym 24–36 godz., oraz 66 — nasieniem przechowywanym 48–60 godz. Odsetek samic nie powtarzających rui po pierwszym unasiennianiu wyliczono po 60 dniach od zabiegu inseminacyjnego. Wyliczono również płodność loch na podstawie liczby żywych prosiąt urodzonych w miocie.

W celu określenia stanu akrosomów i ruchliwości plemników, przed wysłaniem prób, pobierano po 10 ml rozcieńczonego nasienia i przechowywano je w probówkach w termoboksie (prod. NRD), utrzymującym temperaturę w granicach od 15°C do 18°C. W uprzednio wymienionych przedziałach czasowych sporządzono rozmaz nasienia dla określenia stopnia uszkodzenia akrosomów. Rozmazy barwiono metodą Buttle i wsp. (6) stosowaną do rozmrożonego nasienia buhajów i adaptowaną przez nas do nasienia knurów konserwowanego w stanie płynnym. W każdym preparacie oceniano morfologię akrosomów 200 plemników, przy powiększaniu 1000-krotnym z zastosowaniem imersji olejowej (4). Ocenę stanu akrosomów przyjęto według klasyfikacji podanej przez Graham i wsp. (8).

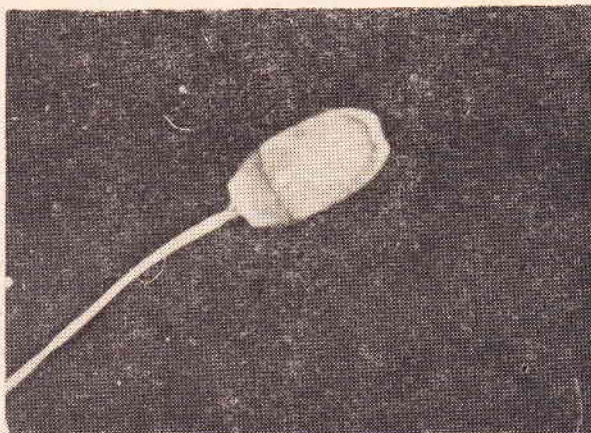
Ryciny 1, 2 i 3 przedstawiają grupy morfologiczne plemników z różnym stanem akrosomów, klasyfikowanych jako normalne (grupa I), o średnio zmienionych (grupa II) oraz silnie zmienionych akrosomach (grupa III). Równolegle z wykonywaniem rozmazów przeprowadzono ocenę ruchliwości plemników po 30 min. inkubacji nasienia w temperaturze 37°C. Odsetek plemników ruchliwych określano stosując mikroskop fazowo-kontrastowy firmy Zeiss Jena (NRD), ze stolikiem krzyżowym, podgrze-



Ryc. 1. Plemniki o normalnym akrosomie (gr I). Barwienie negatywne, 10% nigrozyna (pow. 3500×)



Ryc. 2. Plemniki o średnio zmienionych akrosomach (gr II). Krawędź czapeczki akrosomowej nierówna, pęczniejąca lub brak jej zupełnie. Czapeczka trwale przylepiona do główki plemnika (pow. 3500×)



Ryc. 3. Plemniki o silnie zmienionych akrosomach (gr III). Brak czapeczki akrosomowej, która uległa pęcherzykowaniu z następową utratą substancji akrosomowej (pow. 3500×)

wanym do temperatury około 40°C z kolumny ogrzewczej.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej, po uprzednim transformowaniu uzyskanych danych według wzoru $y = \arcsin Vp$, (11).

Wyniki i omówienie

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 1 w miarę wydłużania czasu konserwacji nasienia knura w rozrzedzalniku Kiev I, następuje wyraźne obniżenie jego jakości oraz zdolności zapładniającej. Średni odsetek plemników o niezmienionych akrosomach, w stosunku do pierwszej doby konserwacji prób obniżył się w drugim dniu o 7,3%, zaś w trzecim o 16,4%. Zmiany akrosomu plemników korelowały z zaburzeniami we wstawkowym aparacie ruchu, bowiem już w drugim dniu konserwacji nasienia obserwowano spadek ruchliwości plemników o około 20%, zaś w trzecim o około 50%. Rezultaty powyższe wskazują, że między 24 a 36 godziną konserwacji nasienia knura dochodzi do intensywnego ob-

umierania komórek, nasilającego się po 48 godz. przechowywania prób. Powyższe obserwacje potwierdzają statystycznie istotne wartości współczynnika korelacji pomiędzy stanem akrosomów plemników a ich ruchliwością w poszczególnych okresach konserwacji (tab. 2). Również Strzeżek i wsp. (14) oraz Strzeżek i Śmigielka (15) stwierdzili, że po 48 godz. przechowywania nasienia knura w rozrzedzalniku Kiev I dochodzi do zmian przepuszczalności błon cytoplazmatycznych plemników, przejawiających się intensywnym uwalnianiem akrosyny oraz aminotransferazy asparaginianowej. Wymienieni autorzy ponadto wykazali zmiany antygenowe w nukleoproteidach główki przechowywanych plemników.

Tab. 1. Charakterystyka jakości nasienia knurów oraz jego wartości biologicznej podczas długotrwałego przechowywania w temperaturze 15°C—18°C

Godz. przechowywania nasienia	Miary statystyczne	Plemniki z normalnymi akrosomami (%)	Ruchliwość plemników	Wskaźniki NR/60 (%)	Płodność loch
0—12	n	112	112	77	70
	\bar{x}	86,64	64,28	86,74	9,51
	s	8,33	8,99	27,72	2,76
	v	9,00	13,00	31,00	29,00
24—36	n	112	112	83	66
	\bar{x}	79,32**	41,43**	79,39	10,05
	s	10,28	12,57	34,40	2,50
	v	12,00	30,00	43,00	24,00
	n	112	112	66	47
	\bar{x}	70,21**	17,68**	67,40**	10,37
	s	14,66	12,33	42,07	2,02
	v	20,00	69,00	62,00	19,00

Objaśnienie: ** — różnice istotne przy $P < 0,01$ w stosunku do prób nasienia w 0—12 godz. konserwacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań mikroskopowych można przypuszczać, że wzrastająca ilość „martwych” plemników, obserwowana w miarę upływu czasu konserwacji nasienia knura stanowi główną przyczynę zmian powstających w procesie starzenia się tych komórek. Starzenie się plemników wpływa na zdolność zapładniającą nasienia (tab. 1). Wskaźnik niepowtarzalności loch i loszek po I zabiegu inseminacyjnym wyraźnie się obniża, osiągając dla nasienia po 2 dobowym okresie konserwacji wartość o prawie 20% niższą ($p \leq 0,01$) niż w nasieniu konserwowanym 0—12 godz. Należy podkreślić, że powyższe dane wykazują statystycznie istotną korelację ze stanem akrosomów plemników (tab. 2). Stanowi to ważną wskazówkę praktyczną dla służby inseminacyjnej o potrzebie zwiększania liczby żywych plemników w dawkach stosowanych po 48 godz. konserwacji nasienia w rozrzedzalniku Kiev I.

Tab. 2. Współczynniki korelacji pomiędzy liczbą plemników z normalnymi akrosomami a ich ruchliwością i wartością biologiczną w poszczególnych przedziałach czasowych konserwacji nasienia knura

Plemniki z normalnymi akrosomami				
	czas w godz.	0—12	24—36	48—60
Ruchliwość plemników	0—12	0,14	—	—
	24—36	—	0,23*	—
	48—60	—	—	0,33**
Wskaźnik NR/60	0—12	0,01	—	—
	24—36	—	0,03	—
	48—60	—	—	0,26*
Płodność	0—12	0,03	—	—
	24—36	—	0,17	—
	48—60	—	—	0,21

Objaśnienia: * — istotność przy $P < 0,05$, ** — istotność przy $P < 0,01$.

Zaskakującymi wydają się być wyniki dotyczące płodności loch inseminowanych nasieniem z różnych okresów konserwacji (tab. 1). Statystycznie nieistotna, ale jednak wyższa liczba prosiąt żywo urodzonych w miocie loch inseminowanych nasieniem przechowywanym od 24 do 60 godz. wskazywać jedynie może, że w pierwszych godzinach po rozcienczeniu nasienia knura następuje specyficzny okres dojrzewania plemników do procesu zapłodnienia (1).

Rezultaty badań Einarssona i Viringa (7) wskazały na ochraniającą funkcję białek plazmy nasienia knura w czasie transportu plemników w żeńskich drogach płciowych oraz na ich udział w zachowaniu zdolności zapładniającej tych komórek. Pavelko i Crabo (11) obserwowali nawet osobnicze różnice w zakresie wiązania się na powierzchni plemników zna-

kowanych J^{125} białek plazmowych. Zjawisko powyższe korelowało z płodnością knurów.

Rozcienczenie nasienia knura roztworami o niskiej sile jonowej lub zawierającymi sole wersenianu wywołuje zmiany na powierzchni błony plemnikowej, utrudniając tym samym wiązanie się tzw. plazmowych białek oplaszczających. Efekt powyższy można łagodzić inkubacją nasienia, przed jego rozcienczeniem, w temperaturze pokojowej. Często stosowane w zakładzie unasieniania zwierząt skracanie okresu tzw. hartowania plemników (zwykle 1—2 godz.), polegającego na oplaszczaniu się tych komórek białkami plazmy nasienia powoduje, że stają się one mniej sprawne w trakcie wędrówki w żeńskich drogach płciowych. Komórki te aktywują zapewne swoje akrosomowe systemy enzymatyczne przed zakończeniem okresu 4—6 godz. kapacytacji w drogach płciowych lochy, a zatem nie mogą uczestniczyć w procesie zapłodnienia komórki jajowej mimo bezpośredniego z nią kontaktu. Zjawisko to przyczyniać się może do obniżenia liczby zarodków lub do ich obumierania. Powyższa sugestia wymaga jednak potwierdzenia na większym materiale doświadczalnym.

Reasumując należy stwierdzić, że lochy inseminowane nasieniem konserwowanym do 12 godz. w efekcie końcowym rodzą więcej prosiąt niż lochy rodzące większe mioty po inseminacji nasieniem konserwowanym 24—60 godzin, dzięki znacznie wyższej skuteczności unasieniania.

Piśmiennictwo

1. Bane A., Nicander L.: J. Reprod. Fert. 11, 133, 1966.
2. Blom E.: Medlemsbl. danske Dyrlaegeforen 31, 446, 1948.
3. Bedford J. M.: Biology Reprod. Suppl. 2, 128, 1970.
4. Bieleński W.: Rozród zwierząt. PWRiL, 1977.
5. Buttle H. M., Hancock J. L., Pursel A. F.: Anim. Prod. 7, 59, 1965.
6. Buttle H. M., Hancock J. L.: J. agric. Sci. Camb. 65, 255, 1965.
7. Einarsson S., Viring S.: J. Reprod. Fert. 32, 117, 1973.
8. Graham E. F., Rajamannam A. K. L., Schinckl M. K. L., Makit — Laurila M., Bower R.: A. I. Digest. 19, 12, 1971.
9. Hancock J. L.: Vet. Rec. 61, 308, 1949.
10. Hancock J. L., Roy J.: Mic. Sci. 76, 84, 1956.
11. Pavelko M. K., Crabo B. G.: Proc. VIII-th Int. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Krakow, 1045, 1976.
12. Ruszczyc Z.: Metodyka doświadcz. zootechnicznych. PWRiL, 1973.
13. Stambaugh J. S., Brackett M. N.: Biol. Reprod. 1, 223, 1969.
14. Strzeżek., Smigielska J., Liminowicz J., Czeżot H., Glogowski J.: Mat. XVI Sesji nauk. Sekcji Fizjol. i Patol. Rozrodu PTNW 2, 153, 1979.
15. Strzeżek J., Smigielska J.: Medycyna Wet. 34, 617, 1978.
16. Tennissen G. U. B.: Tijdschr. Diergeneesk. 71, 293, 1964.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Strzeżek, 10-718 Olsztyn-Kortowo, bl. 37.

Славета Р., Сикорская И., Стшежек Е. — Влияние времени хранения семени хряка в темп. 15—18°C на изменения акросом живчиков и их биологическую ценность.

Исследования провели на 112 эякулятах, взятых мануальной техникой от 46 хряков. Семя разбавляли разбавителем Киев I, а затем транспортировали в различные местности в калиброванных бутылках, помещенных в термосах для сохранения темп. 15—18°C.

В общем инсемировали 226 свиноматок, из чего 77 семенем, хранимым 0—12 ч.ч., 83 — семенем, хранимым 24—36 ч.ч. и 66 — семенем, хранимым 48—60 ч.ч. Констатировали, что через 24 часа хранения

семени хряка в разбавителе Киев I понижается процент живчиков с неизменными акросомами и подвижных живчиков. Вышеупомянутые изменения коррелируют с понижением показателя неповторяемости. Не обнаружили, однако, существенных изменений плодовитости свиноматок.

Slaweta R., Sikorska J., Strzeżek J. — **The influence of time of storage of boars semen at 15°—18°C on the changes of spermatozoons acrosomes and their biological value.**

The examinations were performed with 112 ejaculates obtained from 46 boars manually. The semen

diluted in Kiev I diluent was transported for the use in calibrated bottles in vacuum flasks in order to obtain 15°—18°C. Totally 226 sows were inseminated of which 77 with semen preserved for 0—12 h, 83 with semen preserved for 24—36 h, and 66 with semen preserved for 48—60 h. It was found that 24 h preservation of semen in a Kiev I diluent diminishes a percentage of spermatozoons of unchanged acrosomes and active spermatozoons. The above changes are correlated with diminution of an unrepeating index. However, statistically significant changes in sows fertility were not observed.

LECH CHRAMĘGA, JANUSZ ZARZYCKI
Gdynia

Przypadek ropnia jajnika u suki

Ropień jako ograniczony proces zapalny, polegający na ogniskowym nagromadzeniu się ropy w przestrzeni (jamie), powstaje w następstwie ubytku tkanki, która uległa martwicy rozplywnej. Jeżeli nie dochodzi do resorpcji ogniska zapalnego przekształca się ono, ulegając otorbieniu w tzw. ropień otorbieniony w następstwie granicznego (demarkacyjnego) zapalenia, lub też zostaje przerośnięte bliźnowaciejącą tkanką ziarninową. Istnieje też możliwość przebiccia się ropnia na zewnątrz lub do jam ciała, powstaje wtedy przetoka. Przetoki mogą powstać również jako połączenia ropni w sąsiadujących ze sobą narządach (15).

U małych zwierząt, zwłaszcza u psów i kotów, istnieje większa tendencja do powstania ropowicy niż ropni. Wyjątkowo też dochodzi do powstania ropni narządów wewnętrznych, raczej występują one pod postacią ropomacicza, ropnia gruczołu krokowego, lub ropnia mięśni wywołanego infekcją, raną itp. (14). Opisy ropni jajnika lub jajowodów nie są zbyt liczne (3). Ropnie takie opróżniają się zwykle do jamy otrzewnowej, lub też przebijają się przez sklepienie pochwy, przy czym możliwość pęknięcia ropnia jest większa niż się przypuszcza (9, 11). Częściej też następuje pęknięcie ropnia jajnika niż jajowodu, co jest sprzeczne z dawnym poglądem na ten temat (11). Ropnie u zwierząt mogą osiągać bardzo duże rozmiary, nawet do 1/4 ciężaru ciała (13).

Wiele jest przyczyn powstania ropni jajnika i różna jest ich etiologia. Duży wpływ odgrywają w tym przypadku czynniki dodatkowe jak transport, warunki dużego obciążenia organizmu (np. choroby) (13). Ropień jajnika powstaje najczęściej na tle bakteryjnym. U małych zwierząt przyczyną są zwłaszcza: gronkowiec złocisty, rzadziej paciorkowiec, pałeczka ropy błękitnej i pałeczka okrężnicy (4, 13, 14). Brown (4) jako przyczynę pierwotną ropni podaje T-mikoplazmy, które bywają także odpowiedzialne za ronieńnia, a czasami mogą wywołać septicemie. Trudno jest natomiast określić rolę T-mikoplazm w zakażeniach mieszanych z anaerobami, gonokokami lub innymi bakteriami. Stwierdzono także zakażenia wywołane przez *Actinomyces* (5).

Diagnoza ropni jest dosyć trudna. Bardzo często badania rtg dają wynik ujemny (5). Kliniczne objawy są mało charakterystyczne — wzrost temperatury ciała, brak łaknienia, ogólne osłabienie. W obrazie krwi stwierdza się leukocytozę. Natomiast ropnie są często wyczuwalne w badaniach palpacyjnych jamy brzusznej (3, 5). Z badań immunologicznych jako pozytywną oceniono próbę Lateksową zahamowania aglutynacji (Grawindex) (2).

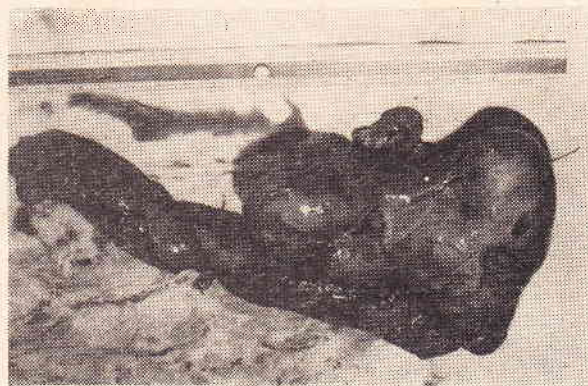
W metodach leczenia ropni jajników najlepsze efekty osiągnęto po zastosowaniu zabiegu operacyjnego usunięcia jajnika z ropniem, macicy lub całego narządu rodnego Często równolegle stosowano sącz-

kowanie. Natomiast samo sączkowanie w przypadkach pęknięcia ropni jajników, lub też tylko leczenie farmakologiczne okazały się bardzo mało skuteczne, a znacznie wzrastała śmiertelność (1, 6, 7, 8, 10, 12).

Opis przypadku

Do lecznicy zgłoszono sześćioletnią sukę rasy owczarek alzacki. Z przeprowadzonego wywiadu wynikało, że trzy lata temu na skutek ropomacicza pies został poddany zabiegowi usunięcia macicy. Po zabiegu nie wystąpiły żadne komplikacje i przez okres ostatnich trzech lat pies nie chorował. W ostatnim okresie pojawiło się podwyższenie temperatury ciała (40,1 C) i powiększenie jamy brzusznej. Wynik badania rtg. był wątpliwy. Natomiast w badaniu palpacyjnym wyczuwalny był duży bolesny twór w jamie brzusznej. Zdecydowano się na wykonanie zabiegu laparotomii. Po otwarciu jamy brzusznej ukazał się kulisty twór wypełniający większą jej część 41 cm długości i 17 cm szerokości. W zagłębieniu ropnia znajdował się powiększony jajnik. Drugi jajnik nie wykazywał żadnych zmian. Próba usunięcia ropnia nie powiodła się ze względu na zrosty z pęcherzem moczowym, otrzewną ścienną, a także aortą brzuszną na odcinku 15 cm. Psa uszpio: wyniki badania histopatologicznego — ropień jajnika.

Ropnie jajnika stwierdzono jeszcze u dwóch innych suk podczas sekcji. Nie były one jednak bezpośrednią przyczyną śmierci tych zwierząt. Wspólną cechą omawianych przypadków był fakt, że zwierzęta zostały poprzednio poddane zabiegowi histerekтомii. Wydaje się więc, że powstanie ropni jajnika w tych przypadkach miało związek z uprzednio wykonanym zabiegiem, tym bardziej, że coraz częściej uznaje się krwiak jako przyczynę ropnia. Nie można także wy-



Ryc. 1.