

by means of gas chromatography. One hour after placenta expulsion a high content of protein — 11.29% and exogenic fatty acids ($C_{18:2} + C_{18:3} + C_{20:1}$) — 21.30%, mostly of linoleic acid $C_{18:2}$ — 19.36%, were found. At two consecutive lactations there was found a decrea-

se of the level of protein and exogenic fatty acids reaching a value of 5.17% and 11.95% respectively (at the 21 day of lactation). The content of fat and ash in sow's milk increased since parturition to the 21-st day of lactation.

ZDZISŁAW SMORAĞ, VIVIANE GARNIER*, JEAN-PAUL RENARD**, BOZENNA WIECZOREK

Wpływ sacharozy na przeżywanie 2-blastomerowych zarodków króliczych zamrażanych szybko w 1,2-propanediolu

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Instytutu Zootechniki,
32-083 Balice k/Krakowa
* INRA, Jouy-en-Josas
** Instytut Pastera, Paryż

Redukcja zawartości wody w zamrażanej komórce jest jednym z głównych warunków zachowania żywotności po rozmrożeniu. Zmniejszanie zawartości wody w trakcie zamrażania odbywa się w wyniku powstawania zewnątrzkomórkowego lodu, a stopień dehydratacji jest regulowany głównie szybkością zamrażania. Wiadomo jednak, że komórki ssaków zdolne są do utraty znacznej ilości wody również w temperaturach plusowych, ale w środowisku hipertonicznym. Zmniejszanie zawartości wody w komórkach przed mrożeniem, a więc w temperaturach plusowych okazywało się korzystne w przypadku komórek skóry podsuszanych na powietrzu (12), czy erytrocytów poddanych działaniu hyperosmotycznego roztworu sacharozy (6). Podobnie zamrażanie wcześniej dehydratowanych fibroblastów (1) zwiększało przeżywanie po rozmrożeniu. Analogiczne postępowanie było również korzystne przy zamrażaniu zarodków mysich (19). Częściowa dehydratacja zarodków króliczych przed mrożeniem przy użyciu 0,5 M sacharozy pozwoliła ponadto na zastosowanie znacznie szybszego tempa zamrażania, co umożliwiło opracowanie przez Renarda i wsp. (9) prostej i dość efektywnej metody dwustopniowego zamrażania 2-blastomerowych zarodków. Próba zwiększenia dehydratacji zarodków przed mrożeniem zastosowana przez ww. autorów nie przyniosła pozytywnych wyników.

Nie wiadomo natomiast, jaki jest wpływ niewielkich stężeń sacharozy na efektywność zamrażania zarodków. Można jednak zakładać, że dzięki stabilizującemu oddziaływaniu cukrów na błony komórkowe (2, 3, 4) nawet niska koncentracja sacharozy wpłynie korzystnie na wyniki zamrażania.

W przeprowadzonych doświadczeniach badano wpływ niskich koncentracji sacharozy oraz zróżnicowanego stężenia propanediolu na zamrażalność 2-blastomerowych zarodków króliczych przy zastosowaniu szybkiej, dwustopniowej metody zamrażania. Ponadto podjęto próbę określenia osłaniającego działania sacharozy i

propanediolu przy przyjętej procedurze zamrażania.

Materiał i metody

Do badań użyto 2-blastomerowych zarodków króliczych pochodzących od 6-miesięcznych samic rasy nowozelandzkiej. U królic wywoływano superowulację przy użyciu FSH i LH wg metody Kennelly'ego i Foota (5). Po upływie 26—28 godzin od pokrycia zwierzęta ubijano, a zarodki pozyskiwano przez przepłukanie jajowodów przy użyciu PBS uzupełnionego 20% surowicy płodów cielęcych (FCS). Po uzyskaniu i ocenie, zarodki umieszczano na 30 minut w temperaturze pokojowej w roztworze PBS+20% FCS zawierającym 1,0 M — 1,2 propanediolu. Z kolei zarodki umieszczano na 5 minut w jednym z następujących roztworów:

- A. Doświadczenie I — 0,5 do 3,0 M propanediolu + 0,01, 0,1 lub 0,5 M sacharozy w PBS + 20% FCS.
B. Doświadczenie II — 1 M propanediolu + 0,01 M sacharozy, 1,0 M propanediolu, 0,01 M lub 0,8 M sacharozy.

Postępowanie przy zamrażaniu i rozmrażaniu było zbliżone do podanego przez Renarda i wsp. (9). Zarodki zamrażano w słówkach o pojemności 500 μ l, które wcześniej wypełnione zostały następującymi frakcjami: frakcja A — 150 μ l 0,05 M sacharozy w PBS + 20% FCS; frakcja B — 40 μ l powietrza; frakcja C — 150 μ l 0,5 M sacharozy w PBS + 20% FCS; frakcja D — 20 μ l powietrza; frakcja E zawierała 40 μ l jednego z roztworów użytych w doświadczeniu I i II (ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat słowki do szybkiego zamrażania zarodków króliczych

Objaśnienia: A — 0,05 M sacharoza, B — powietrze, C — 0,5 M sacharoza, D — powietrze, E — 0,1 M sacharoza + 1,0 M₂ — propanediol.

Przygotowane wg powyższego sposobu słowniki były przetrzymywane w temp. -25°C przez okres od kilku dni do kilku tygodni. Bezpośrednio przed zamrażaniem zarodków, słówkę wyjmowano z zamrażalnika, obejmując palcami część końcową zawierającą frakcję E. Wówczas następowało podgrzewanie tej frakcji w tempie szybszym niż pozostałych frakcji. Po częściowym rozmrożeniu frakcji E (po 6—8 sekundach trzymania między palcami) umieszczano w niej 5—10 zarodków wraz z niewielką ilością roztworu o temperaturze pokojowej. Następnie słówkę z zarodkami ponownie umieszczano w temp. -25°

C i przetrzymywano przez 150 minut. Po tym czasie przekładano do ciekłego azotu. Do rozmrażania słomkę wyjmowano z ciekłego azotu i umieszczano w pozycji pionowej w łaźni wodnej o temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$. Kiedy stwierdzano, że poszczególne frakcje słomki zostały już rozmrożone, co następowało po ok. 8 sekundach, mieszano frakcją E z frakcją C poprzez kilkakrotne delikatne ostukanie słomki. Następowo wówczas zmieszanie dwu roztworów zawierających różne koncentracje sacharozy oraz miało miejsce rozcieńczenie związku osłaniającego. Następnie pozostawiano słomkę przez 5 minut w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$, po czym wyjmowano z łaźni, a całą zawartość wypychano na szkiełko zegarkowe. Dochodziło wówczas do zmieszania wszystkich płynnych frakcji słomki, w rezultacie czego następowało dalsze rozcieńczenie związku osłaniającego w hipertonicznym roztworze sacharozy. Zarodki przemywano następnie dwukrotnie przy użyciu PBS, po czym przenoszono do płynu B₂ (8).

Przeżywanie zarodków oceniano na podstawie rozwoju *in vitro* do stadium moruli lub blastocysty po 48–72 godz. hodowli w temp. $+37^{\circ}\text{C}$ w płynie B₂ lub po przeniesieniu zarodków do jajowodów pseudocieżarnych samic. Przenoszenie zarodków przeprowadzano na drodze chirurgicznej wg metody podanej przez Stapięsa (11). Każda biorczyni otrzymywała 8–12 godzin po pokryciu przez samca uprzednio poddanego wasektomii. W 28 dniu ciąży wszystkie biorczynie poddawano ubojowi, w celu określenia liczby żywego potomstwa.

W obliczeniach statystycznych posługiwano się testem χ^2 .

Wyniki i omówienie

W badaniach wstępnych, kiedy zarodki zamrażano do -20° lub -30°C , uzyskano stosunkowo niskie przeżywanie: 3 z 15 (20%) zarodków rozwijało się po zamrożeniu do -20°C , a 8 z 15 (53,3%) po zamrożeniu do -30°C . W tej sytuacji zdecydowano zamrażać zarodki do -25°C przed przemieszczeniem do ciekłego azotu.

Zamrażając 2-blastomerowe zarodki królicze do -25°C , najwyższą przeżywalność uzyskano wówczas, kiedy roztwór do zamrażania zawierał 1,0 M, 1,2-propanediolu oraz 0,1 M sacharozy. Przeżywało wówczas 95,8% zarodków (tab. 1). Stosując powyższą koncentrację sacharozy (0,1 M) stwierdzono rozwój zarodków przy każdej z użytych koncentracji 1,2-propanediolu, chociaż w przypadku użycia skrajnych stężeń tego związku odsetek przeżywających zarodków wynosił jedynie kilkanaście %. Najbardziej wyrównane wyniki przeżywania uzyskano, gdy koncentracja sacharozy w płynie do zamrażania wynosiła 0,01 M.

W poszczególnych grupach stwierdzono wówczas 41,2; 44,4 oraz 59,1% rozwijających się zarodków (przy koncentracji propanediolu wynoszącej odpowiednio 1,2 lub 3 M. Użycie do zamrażania płynu zawierającego 2,0 M 1,2-propanediolu spowodowało zniesienie dodatniego oddziaływania sacharozy. Uzyskano bowiem podobny odsetek przeżywających zarodków zarówno przy braku dodatku cukru, jak i wtedy, gdy koncentracja sacharozy wynosiła 0,01 M lub 0,1 M oraz niższe przeżywanie, gdy koncentracja sacharozy wynosiła 0,5 M (odpowiednio 44,4, 44,4, 44,0 oraz 31,3%).

Tab. 1. Rozwój *in vitro* (%) 2-blastomerowych zarodków króliczych zamrażanych w roztworach o różnej koncentracji sacharozy i 1,2-propanediolu

1,2-propanediol (M)	sacharoza (M)			
	0,0	0,01	0,1	0,5
0,5	—	—	41,1 (2,48)	—
1,0	0 (2,12) ^a	41,2 (3,17)	95,8 (3,24) ^x	0 (2,13)
1,5	—	—	75 (2,44)	—
2,0	44,4 (3,13)	44,4 (2,9)	44 (3,25) ^x	31,3 (3,16)
3,0	4,8 (3,24)	59,1 (2,22)	43,3 (2,15)	8,3 (2,12)

Objasnienia: a) wartości w nawiasach oznaczają liczbę potworzeń oraz liczbę zarodków odzyskanych po rozmrożeniu. x — p 0,05.

Nie zanotowano przeżywania 2 b zarodków króliczych zamrażanych w 1,0 M 1,2-propanediolu oraz w roztworze o równoważnym stężeniu osmotycznym, zawierającym zamiast związku osłaniającego, tylko 0,01 M sacharozę (tab. 2). Z kolei po mrożeniu w roztworze 1 M 1,2-propanediolu i 0,01 M sacharozy stwierdzono rozwój 32% zarodków, podczas gdy w roztworze samej sacharozy o równoważnym stężeniu osmotycznym (0,8 molarnym) przeżywało 12% zamrażanych zarodków.

Po przeniesieniu zarodków zamrożonych w roztworze zawierającym 1,0 M propanediolu i 0,1 M sacharozy, uzyskano pełny rozwój 39,7% zarodków w porównaniu z 32,2% rozwijających się zarodków świeżych (tab. 3).

Uzyskana w tym doświadczeniu przeżywalność (ponad 90%) osiągnięta przy zastosowaniu optymalnego wariantu zamrażania jest porównywalna z wynikami osiągniętymi przez Renarda i wsp. (9) przy użyciu 0,5 M sacharozy i zamrożeniu do -30°C . Powstaje pytanie o rolę użytej sacharozy w procesie szybkiego zamrażania zarodków króliczych. Stosowanie 0,5 M roztworu sacharozy prowadziło już przed zamrożeniem do redukcji objętości zarodków o ok. 50%. Fakt ten skłaniał do przypuszczeń, że znaczna utrata wody w zarodkach przed mrożeniem umożliwiała zastosowanie szybkiego tempa zamrażania. Ta interpretacja budziła jednak wątpliwości, gdyż pomimo osiągnięcia znacznego odwodnienia zarodków przed mrożeniem konieczne było jednak stosowanie co najmniej kilkudziesięciominutowego czasu ekwilibracji w temp. -30°C przed przełożeniem zarodków do ciekłego azotu. Podwyższenie koncentracji sacharozy w płynie do mrożenia nie eliminowało potrzeby ekwilibracji. Oznaczało to, że w zastosowanej procedurze zamrażania, dehydratacja nie była jedynym czynnikiem osłaniającym komórki.

W naszym doświadczeniu zarodki umieszczane w roztworze 0,1 M sacharozy ulegały tylko nieznacznemu obkurczeniu, a okazało się to wystarczające dla uzyskania wysokiej przeżywalności zarodków. Można zatem sądzić, że dehydratacja zarodków nie spełniała w tym przypadku znaczącej roli. Znaczenie użytej sacharozy można by tutaj wyjaśnić raczej jej pozytywnym oddziaływaniem na błonę plaz-

to liquid nitrogen. One-step system of quick thawing was used to remove a protective substance. The highest survival rate was observed after freezing in a solution of 1.0 M propanediol and 0.1 M saccharose: 95.8% of developing germs in vitro and 39.7% in vivo were observed. Apart from a satisfactory effect the advantage of the method was its simplicity without

the necessity to use a special apparatus for freezing. No development of the germs frozen in 0.1 M solution of propanediol or 0.01 M sol. of saccharose was found. In contrast, 32 per cent of developing germs was observed if they were frozen in a solution of propanediol (1.0 M) and saccharose (0.01 M), and 12 per cent when frozen in 0.8 M sol. of saccharose.

ROMAN SŁAWETA, WACŁAW AKSIUTO*, JERZY KOBLAŃSKI, GRAZYNA SOSIŃSKA**

Badania nad wpływem dodatku glutationu (GSH) na jakość konserwowanego nasienia buhaja¹⁾

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna

* Stacja Hodowli i Unasienniania Zwierząt, ul. Bydgoska 1/3, 10-243 Olsztyn

** Stacja Hodowli i Unasienniania Zwierząt w Kocierzowach, 97-345 Gunned

Plemniki buhaja w warunkach tlenowych ulegają szybkiemu procesowi starzenia się, przejawiającego się obniżeniem funkcji metabolicznych takich jak fruktoliza i oddychanie (14). W obecności tlenu oddychanie nie opiera się wyłącznie na substratach pozakomórkowych, lecz także występuje zjawisko polegające na utlenianiu składników komórki, głównie lipidów (15).

W wyniku peroksydacji lipidów błon komórkowych dochodzi do nagromadzenia się plemnikobójczych nadtlenków (10, 11), które powodują zaburzenia biochemiczne dotyczące aktywności oddechowej plemników, fruktolizy i syntezy ATP (2, 16).

Ponadto w procesie konserwacji plemników buhaja, średnio około 30% komórek ulega uszkodzeniu, w wyniku czego dochodzi do uwalniających z plemników oksydazy L-aminokwasów (17). Enzym ten katalizuje reakcję utleniania L-tyrozyny, L-fenylalaniny oraz L-tryptofanu, zawartych w nasieniu buhaja oraz żółtka jaja kurzego, stanowiącego komponent rozrzedzalnika do konserwacji plemników (19). Jednym z końcowych produktów tej przemiany jest H_2O_2 (12). Przeprowadzona analiza poziomu nadtlenków lipidów w nasieniu buhaja poddanemu konserwacji i przechowywanemu w ciekłym azocie, wykazała około 8-krotny ich wzrost w stosunku do nasienia świeżego (12). Związkiem obniżającym szybkość procesów peroksydacji jest glutation (GSH) będący substratem w systemie enzymatycznym peroksydaza-reduktaza (4).

Stąd przeprowadzone badania, których celem była ocena ruchu postępowego plemników oraz wartości biologicznej nasienia konserwowanego z dodatkiem glutationu zredukowanego w rozrzedzalniku mlekowo-żółtkowo-glicerolowym.

Materiał i metody

Oceny wartości biologicznej nasienia konserwowanego w rozrzedzalniku mlekowo-żółtkowo-glicerolowym dokonano na 30 ejakulatach od 6 buhajów rasy

czarno-białej w wieku 18 miesięcy, użytkowanych w SHiUZ Olsztyn. Ejakulatory, w których odsetek plemników o ruchu postępowym był wyższy niż 60%, dzielono na dwie równe porcje i rozcieńczano rozrzedzalnikiem złożonym z: 78% odtłuszczonego mleka, 15% żółtka jaja kurzego, 7% glicerolu, 2g fruktozy/100 ml, penicyliny i streptomycyny (500 i.u./ml). Rozrzedzalnik ten opracowano w IGIHZ PAN w Jastrzębcu (22).

Wstępnie ejakulatory rozcieńczono do połowy objętości końcowej (nasienie plus rozrzedzalnik) rozrzedzalnikiem bez glicerolu i w okresie 1 godziny schładzano w lodówce do 4°C. Następnie uzupełniono do objętości końcowej rozrzedzalnikiem o 4°C z glicerolem, zaś próby doświadczalne zawierały dodatkowo GSH. Końcowe stężenie glicerolu w próbach nasienia było stałe i wynosiło 3,5% (24), zaś GSH 5mM (20). Po 2,5 godzinnej ekwilibracji nasienia (13) próby zamrażano na suchym lodzie. W dawce o objętości 0,1 ml było około 30×10^6 plemników.

W okresie od maja do grudnia 1984 r. unasienniono po raz pierwszy 1118 krów, z czego 470 nasieniem z dodatkiem GSH, zaś 648 stanowiło grupę kontrolną. Skuteczność zabiegów ustalano wstępnie do 60 dnia od daty pierwszego zabiegu unasienniania, na podstawie niepowtarzalności rui (NR/60). Następnie powyżej 90 dnia lekarze weterynarii przeprowadzali ponowne badania w celu stwierdzenia ciąży. Ponadto 144 ejakulatory pozyskane w okresie roku od 20 buhajów użytkowanych w SHiUZ Kocierzowy, konserwowano według wyżej opisanej metody i oceniano ruch postępowy plemników w nasieniu bezpośrednio po rozmrożeniu oraz 3 i 5-godzinnej inkubacji w 37°C. Próby nasienia rozmrażano w 1 ml 0,9% NaCl.

W statystycznej analizie wyników wartości biologicznej nasienia zastosowano test różnicy między dwoma frakcjami. Dla oceny wpływu egzogenego GSH na ruch plemników przeprowadzono analizę wariacji jednoczynnikowej w układzie ortogonalnym. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami określano testem t Studenta.

Wyniki i omówienie

W nasieniu, bezpośrednio po rozmrożeniu, średni odsetek plemników o ruchu postępowym w próbach nasienia zawierających GSH był wyższy o 2,8% (różnica przy $p \leq 0,01$) w porównaniu do prób kontrolnych. W teście oporności w temperaturze 37°C po 3- i 5-godzinnej inkubacji, w nasieniu poddanym konserwacji bez dodatku GSH, liczba plemników o zachowanym ruchu była niższa odpowiednio o 6,4% i 8,4% (różnica przy $p \leq 0,01$) w stosunku do wartości uzyskanych dla prób z GSH (tab. 1).

¹⁾ Praca wykonana w ramach podproblemu MR II.10.1. Fizjologia Rozrodu.