

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

SABAH B. A. ALI*, MARIAN TISCHNER

Mrożenie nasienia tryków w tubach aluminiowych i próby głębokiej doszyjkowej inseminacji owiec

Katedra Rozrodu Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
* Uniwersytet Salahaddin, Erbil, Irak

Istnieje wiele czynników, które wywierają wpływ na płodność owiec unasienianych nasieniem mrożonym. Salamon i Liglfoot (29), a także wcześniej Łopyrin i Łoginowa (19) wykazali, że żywotność nasienia rozmrożonego w drogach rodnym maciurek, a także ich transport zwłaszcza przez kanał szyjki są znacznie ograniczone. Potwierdzeniem tych badań były doświadczenia Mattnera i wsp. (21), którzy wprowadzając nasienie rozmrożone wprost do macicy sposobem chirurgicznym przez laparotomię uzyskali normalną płodność owiec nawet wówczas, gdy dawka inseminacyjna nasienia mrożonego zawierała tylko 30×10^6 plemników ruchliwych.

Edquist i wsp. (8) celem wywołania kurczliwości szyjki macicznej i poprawienia tym sposobem transportu rozmrożonego nasienia podawali do nasienia oksytocynę, lecz nie otrzymali poprawy wyników zapłodnień. Dimov i Georgiev (7) uważają, że podczas mrożenia nasienia następuje obniżenie aktywności prostaglandyn, których poziom w świeżym nasieniu tryka jest wysoki.

Andersen i wsp. (3), Fuki i Roberts (11), Miłowanow i Sokołowska (23) opracowali w oparciu o budowę anatomiczną kanału szyjki macicznej owiec nowe wzory pipet inseminacyjnych, o spiralnym zakończeniu w ich odcinku końcowym. Przy pomocy tych pipet w większości owiec można było deponować nasienie wprost do trzonu macicy. Jednak pomimo uzyskiwania ponad 60% zapłodnień (23) metoda ta nie została w pełni zaakceptowana. Ogólnie uważa się, że technika głębokiej doszyjkowej inseminacji ma ograniczone zastosowanie, gdyż nie u wszystkich owiec udaje się wprowadzić nasienie wprost do macicy, a także stwarza możliwość uszkodzeń błony śluzowej szyjki podczas manipulowania pipetą wewnątrz jej kanału. Zestępcze rozwiązanie zaproponowali Killeen i Caffery (17) oraz Armstrong i Evans (4) stosując laparoskopową metodę inseminacji owiec. Metoda ta polega na punkcji jamy brzusznej i wprowadzaniu nasienia specjalną igłą wprost do macicy. Zabieg inseminacji wykonuje się w pozycji leżącej owcy po miejscowym znieczuleniu lub rzadziej pod ogólną narkozą. Stosując

tę technikę inseminacji nasieniem mrożonym osiągnęto 61% zapłodnień, tj. o 11% więcej w porównaniu do doszyjkowej inseminacji. Metoda ta w niektórych krajach stosowana jest już na skalę praktyczną. Maxwell (22) podaje, że podczas jednego sezonu 1985/86 unasieniono w Australii techniką laparoskopową około 50—60 tysięcy owiec. Pomimo to wydaje się, że laparoskopowa metoda inseminacji ma również ograniczone możliwości wykorzystania praktycznego. Jest zbyt czasochłonna, niesie ryzyko infekcji i wymaga dosyć kosztownego sprzętu.

Nieco inny problem stanowi sposób mrożenia nasienia. Stosowana początkowo metoda mrożenia nasienia w kulkach jest krytykowana jako mało praktyczna, a także ze względu na trudność oznakowania kulek i łatwość ich zakażeń (6). Wielu autorów (13, 14, 18) mroziło nasienie w ampulkach szklanych o objętości około 1,5 ml. Ostatnio stosuje się do mrożenia słomki o objętości 0,2 ml (1).

Technika przygotowania nasienia do mrożenia oparta na zagęszczeniu nasienia przez wirowanie (1) również nie może być w pełni akceptowana. Wirowanie nasienia może mieć ujemny wpływ nie tylko na jego właściwości po rozmrożeniu, ale także tą drogą eliminuje się wiele wartościowych plemników. Jeżeli np. stosuje się zbyt szybkie obroty dochodzi do mechanicznego uszkodzenia dużego procentu plemników. Natomiast zbyt wolne obroty powodują, że wiele żywotnych plemników nie osiada na dnie próbówki i jest tą drogą eliminowane z użycia do inseminacji. Głównym celem naszych badań były zatem próby usprawnienia techniki mrożenia nasienia tryków, jak również głębokiego doszyjkowego unasieniania owiec.

Materiał i metody

Wstępne badania przeprowadzono na 74 ejakulatach pobranych od 4 tryków rasy polska owca górską. Badania te zostały następnie uzupełnione na 24 ejakulatach pobranych od 24 tryków, z których 14 było rasy polska górską oraz 10 czarnogłówek. Wiek tryków wahał się 2—4 lat. Nasienie od pierwszej grupy 4 tryków pobierano w m-cu maju 3 razy w tygodniu, a od pozostałych na przełomie października i listopada 1987.

Bezpośrednio po pobraniu i ocenie szacunkowej nasienia przeprowadzano rozrzedzanie nasienia roz-

rzeczalnikiem opracowanym dla nasienia buhajów (20) stosując glicerol w ilości 6%. Skład rozrzedzalnika:

roztwór 2,9% dwuwodnego cytrynianu sodu = 74 ml, fruktoza = 1,25 g, żółtko jaja kurzego = 20 ml, glicerol = 6 ml.

Rozrzedzenie nasienia przeprowadzano w temp. około 30°C w stosunku 1:4 do 1:8 tak, aby w jednej dawce inseminacyjnej znajdowało się co najmniej 180×10^6 plemników. Po rozrzedzeniu nasienie przetrzymywano w temp. pokojowej przez około 20 min., po czym przelewano go do odpowiednio przygotowanych sterylnych tub aluminiowych i kontrolnie do ampulek szklanych o poj. 1,2 ml. Początkowo używano małych tub aluminiowych o wymiarach: 2 mm średnica, 20 mm szerokość i 40 mm długość, które napełniano nasieniem rozrzedzonym o objętości 1,5–2 ml. Następnie w Stacji Unasieniania Owiec w Jaworkach okazało się, że dla celów praktycznych bardziej odpowiednie są duże tuby aluminiowe o poj. 8–10 ml o wymiarach: 4 mm średnica, 35 mm szerokość i około 100 mm długość. Po napełnieniu tub nasieniem zamykano je szczególnie przez zawinięcie i zaciśnięcie brzegów tuby zwracając uwagę, aby wewnątrz tuby nie pozostało powietrze. Tak przygotowane nasienie przenoszono do lodówki o temp. 2–5°C na 3–4 godziny. Po tym czasie nasienie zamrażano w parach ciekłego azotu. W tym celu umieszczano tuby i ampulki z nasieniem w drucianym koszyczku, wkładano je do kontenera (o poj. 30 l) wypełnionego do połowy ciekłym azotem i zawieszano 5 cm ponad powierzchnią ciekłego azotu na okres 7 min. Po tym czasie nasienie zanurzano bezpośrednio w ciekłym azocie. Natomiast nasienie pobrane od 24 tryków w Stacji Unasieniania Owiec w Jaworkach zamrażano w stelażu opracowanym przez Müllera (24) dla mrożenia nasienia ogierów. Ściany stelaża o wymiarach 7 cm wysokości, 17 cm szerokości i 32 cm długości wykonano z blachy miedzianej, w jego wnętrzu umieszczono co 5–6 mm żeberka aluminiowe. Przed mrożeniem nasienia stelaż zanurzano do 2/3 wysokości w ciekłym azocie i po ustaleniu się temperatury zamrażano nasienie wkładając tuby do stelaża pomiędzy żeberka. Po 7–9 min. przenoszono tuby do ciekłego azotu. Rozmrażanie nasienia dokonywano przez szybkie przeniesienie nasienia z ciekłego azotu do łaźni wodnej o temp. od 38–40° na 30 sek. Po rozmrożeniu badano ruchliwość plemników, a także przeprowadzano test przeżywania nasienia w temp. 2–5°C (5). Celem określenia zmian morfologicznych pobierano próbki świeżego nasienia, a następnie rozrzedzonego po ekwilibracji i rozmrożeniu. Wykonywano rozmazy na szkiełku podstawowym, które barwiono eozyną-nigrozyną i przeprowadzono ich ocenę morfologiczną (5).

W oparciu o wcześniejsze badania morfologiczne szyjki macicznej (2) zmodyfikowano pipetę inseminacyjną dostosowując jej końcowy kształt do charakterystycznego układu kanału (ryc. 1). Najpierw na 29 owcach wybranych losowo i przeznaczonych do uboju przeprowadzono porównawcze „unasienianie” stosując tusz zamiast nasienia. „Unasieniono” zmodyfikowaną pipetą 15 sztuk i kontrolnie 14 sztuk tradycyjną pipetą szklaną. Około 1 godz. po „inseminacji” wszystkie owce poddano ubojowi w rzeźni. Zaraz po uboju wypreparowano cały układ rodny, a

następnie w laboratorium na podstawie stanu jajników określano fazę cyklu i ustalano miejsce zdeponowania tuszu.

Inseminację nasieniem mrożonym przeprowadzono na 23 maciorkach mieszańców typu merynos, w wieku 2–4 lat, utrzymywanych w Stacji Doświadczalnej AR w Przegorzalach. Zabiegi wykonano pod koniec m-ca listopada 1986 r. Wszystkie maciorki otrzymały wcześniej domięśniowo prostaglandynę (Estrumate) w ilości 125 µm. Unasienianie przeprowadzano w drugiej kolejnej rui występującej po rui sprowokowanej prostaglandyną. Pierwszy zabieg inseminacyjny wykonano 20–24 godz. od momentu wystąpienia objawów rui, a drugi po dalszych 12 godzinach. Początek rui i czas jej trwania kontrolowano trykonią-probierem 2 razy dziennie (rano i wieczorem). Używano nasienia zamrożonego w małych tubach, które po rozmrożeniu wykazywało co najmniej 30% plemników o ruchu postępowym. Stosowano wzniętkową metodę inseminacji. Po wprowadzeniu pipety do zewnętrznego ujścia szyjki wykonywano równocześnie delikatne ruchy prawo- i lewoskrętne wprowadzając pipetę w głąb kanału szyjki.

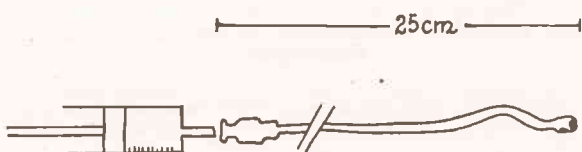
Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z zastosowaniem analizy wariancji, a także wyliczono wskaźniki procentowe dla oceny morfologicznej nasienia i wyników unasieniania.

Wyniki i omówienie

Wszystkie wybrane losowo tryki wykazywały normalny popęd płciowy i oddawały nasienie, którego ruchliwość zaraz po pobraniu wynosiła średnio 80%, koncentracja $3,5 \times 10^9$ w 1 ml i objętość 1,25 ml. Natomiast szczegółową charakterystykę nasienia mrożonego podano w tab. 1 i 2. Na podstawie przeprowadzonych badań okazało się, że 92% ejakulatów zamrożonych w dużych oraz 86% w małych tubach aluminiowych i tylko 44% zamrożonych kontrolnie w ampulkach szklanych wykazywało do rozmrożeniu ruchliwość powyżej 30%. Podobnie przedstawiał się czas przeżywania nasienia w temp. 2–5°C, który wynosił średnio dla nasienia zamrożonego w dużych tubach 481 godz., w małych tubach 341 godz. i w ampulkach szklanych 237 godz. Przyjmując, że 30% plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu stanowi wartość graniczną przydatności nasienia do inseminacji owiec (15) okazało się, że około 90% nasienia

Tab. 1. Porównanie wyników oceny nasienia zamrożonego w małych i dużych tubach aluminiowych oraz ampulkach szklanych

Liczba tryków	Sposób opakowania nasienia	Ruchliwość nasienia po rozmr.	Ejakulacja	Ruchliwość nasienia po rozmr.	Czas przeżywania nasienia w temp. 2-5°C (godziny)	Współczynnik	
74	małe tuby	≥ 30	64	86	42	341 (292-518)	55
		< 30	10	14	14	114 (12-228)	9
52	ampułki szklane	≥ 30	23	44	31	237 (196-300)	31
		< 30	29	56	19	148 (100-163)	13
24	duże tuby	≥ 30	22	92	46	481 (156-708)	72
		< 30	2	8	17	228 (180-276)	25



Ryc. 1. Zmodyfikowana pipeta do inseminacji owiec. Długość 25 cm, średnica 0,2 cm

Tab. 2. Wyniki oceny morfologicznej nasienia tryków zamrożonego w ampulkach szklanych i małych tubach aluminiowych

Nr tryka	Liczba ejakulatów	Nasienie świeże				Po ekwilibracji				Typ opakowania	Liczba ejakulatów	Po rozmrożeniu			
		zwinięta wówka	luźna główka	zmiany akrosomu	razem	zwinięta wówka	luźna główka	zmiany akrosomu	razem			zwinięta wówka	luźna główka	zmiany akrosomu	razem
1	26	1,0	0,8	0,05	1,8	1,5	1,4	0,04	2,9	tuby	26	5,7	1,0	1,5	8,2
										ampułki	16	6,1	3,9	3,9	13,9
2	22	0,6	0,6	0,05	1,2	0,8	0,6	0,1	1,5	tuby	20	4,5	2,0	2,5	9,0
										ampułki	15	5,4	3,1	4,0	12,5
3	16	1,8	2,2	0,0	4,0	1,2	1,9	0,1	3,2	tuby	16	5,6	2,8	1,1	9,5
										ampułki	12	5,9	4,5	3,3	13,7
4	10	1,3	0,4	0,0	1,7	0,6	0,6	0,0	1,2	tuby	10	3,0	2,1	2,3	7,4
										ampułki	8	3,5	2,6	4,8	10,9
razem 74		1,2	1,0	0,05	2,2	1,0	1,1	0,1	2,2	tuby	72	4,7	2,0	średnio 1,9	8,5
średnia										ampułki	51	5,2	3,5	4,0	12,8*

Objaśnienie: * $p < 0,01$.

zamrożonego w tubach aluminiowych spełniło te wymogi. Kareta (13) zamrażając nasienie w ampulkach uzyskiwał efektywność mrożenia, średnio 58% z wahaniami dla poszczególnych tryków od 26 do 86%. Łoginowa i Zełtobriuch (18) po nasieniu mrożonym w ampulkach uzyskiwali zaledwie 32,5% wykotów owiec. W dostępnej literaturze nie napotkano na dane dotyczące mrożenia nasienia tryków w tubach aluminiowych. Natomiast tuby takie są często używane do mrożenia nasienia ogierów (24, 25, 30), które — jak wiadomo — jest bardzo wrażliwe na proces konserwacji w ciekłym azocie.

Szczegółowe opracowanie dotyczące wpływu rozrzedzalników na konserwację nasienia tryków podał Ott i Memon (26). W naszych badaniach zastosowano rozrzedzalnik wg Martina i Emmensa (20) przeznaczony dla mrożenia nasienia buhajów. Rozrzedzalnik ten z dodatkiem 8% glicerolu stosowany był również do zamrażania nasienia tryków (13, 14). Na podstawie ostatnich danych piśmiennictwa (4, 9, 10) okazało się, że 6% glicerolu w rozrzedzalniku dla nasienia tryków stanowi jego optymalną koncentrację. Pozostałe składniki rozrzedzalnika Martina i Emmensa (20) są obecnie nadal powszechnie stosowane zarówno do mrożenia nasienia tryków, jak i buhajów.

Ocena morfologiczna mrożonego nasienia wykazała, że ekwilibracja nie wywarła istotnego wpływu na właściwości morfologiczne plemników. Natomiast proces mrożenia spowodował uszkodzenie akrosomów u około 1,9% plemników nasienia zamrażanego w tubach i 4% nasienia w ampulkach. Ogółem podczas zamrażania — rozmrażania doszło do uszkodzenia struktury morfologicznej u około 6% plemni-

ków zamrażanych w tubach i 10% zamrażanych w ampulkach ($p < 0,01$), (tab. 2).

Nadal pozostaje problem właściwej oceny rozmrożonego nasienia. Większość autorów ocenę tę opiera jedynie na szacunkowym badaniu ruchliwości plemników po rozmrożeniu. Jak wiadomo plemniki tryka mogą wykazywać po rozmrożeniu dosyć dobrą ruchliwość przy obniżonej ich zdolności do zapłodnienia. Zastosowany przez nas test przeżywania nasienia w temp. 2—5°C wykazał długi czas życia plemników. Test ten po raz pierwszy zastosowany był przez Parszutina i Skatkina (27) dla oceny świeżego nasienia ogierów. Obecnie jest rów-

Tab. 3. Miejsce zdeponowania tuszu po „unasiennianiu” owiec tradycyjną i zmodyfikowaną pipetą

Typ pipety	Faza cyklu rujowego	Liczba unasiennionych owiec	Miejsce zdeponowania tuszu				Liczba (%)
			Podwła	Kanałszyjki	Trzon rog. maćicy	Trzon maćicy	
szklana tradycyjna	pęcherzykowa	7	6 (86)	1 (11)	-	-	-
		7	7 (100)	-	-	-	-
zmodyfikowana	pęcherzykowa	9	1 (11)	1 (11)	-	1 (11)	6 (67)
		6	2 (33)	3 (50)	-	1 (17)	-

Tab. 4. Wyniki głębokiej doszyjkowej inseminacji macioerek nasieniem zamrożonym w małych tubach aluminiowych

Cykle rujowe	Liczba inseminacji	Liczba macioerek	Liczba macioerek zapłodn.	Plodność %	Liczba stwierdzonych przedwiurodzonych jagaiąt
1	2	23	16	70	20
2	2	5	3	60	3

niez stosowany do oceny mrożonego nasienia ogierów (24, 25, 30). Badania Romankovej i Namienkova (28) potwierdziły dosyć ściśle zależność pomiędzy wskaźnikiem zażrebień a czasem przeżywania rozmrożonego nasienia w temp. 0°C. Podobne badania na nasieniu tryków nie były dotychczas przeprowadzone.

Badania morfologiczne kanału szyjki na odlewach szybko twardniejących polimerów (23) oraz odlewach lateksowych (2) wykazały, że kanał szyjki macicznej ma u większości owiec spiralną konfigurację z poprzecznie ułożonymi zwężeniami i uchylkami. Podczas rui następuje lekkie rozwarście kanału i powiększenie jego średnicy. Dostosowując kształt pipety inseminacyjnej do morfologicznej budowy kanału szyjki wypróbowano początkowo kilka wzorów pipet. Najbardziej praktyczną okazała się pipeta z lekko spiralnie wygiętą końcówką od lewej do prawej strony, zakończona niewielką kulką z dwoma otworami (ryc. 1). Podobny wzór pipety wykonali wcześniej Miłowanow i Sokołowska (23), którzy wprowadzając nasienie na głębokości 2,5 cm i głębiej uzyskali 68% zapłodnień po inseminacji 247 owiec. Przeprowadzone „unasieniania” tuszem owiec będących w różnej fazie cyklu potwierdziły możliwość głębokiego wprowadzania nasienia. Stosując zmodyfikowaną pipetę inseminacyjną u większości owiec, u których na jajnikach stwierdzono pęcherzyk Graafa zdeponowano tusz w trzonie i rogach, a także w szyjce macicznej. Natomiast stosując tradycyjną pipetę inseminacyjną tylko u jednej owcy będącej w fazie pęcherzyka Graafa zdeponowano tusz na głębokość 1/3 kanału szyjki. Natomiast szyjka maciczna owiec w fazie ciała żółtego okazała się trudna do wprowadzenia tuszu zarówno zmodyfikowaną pipetą, jak i tradycyjną (tab. 3).

Spośród 23 macioerek unasienianych nasieniem mrożonym zmodyfikowaną pipetą zostało zapłodnionych w jednym cyklu 16, tj. 70%. Pięć macioerek z siedmiu, które nie zostały zapłodnione po pierwszej inseminacji powtórzyło ruję i ponownie unasieniono nasieniem mrożonym. Z tej liczby w kolejnym cyklu dalsze trzy macioarki zostały zapłodnione (tab. 4). Następnie około 2—3 m-cy po inseminacji przeprowadzono kontrolne badanie macioerek w kierunku ciąży przy pomocy aparatu ultradźwiękowego (Renco PREG-ALERT prod. USA). Siedem macioerek, u których rozpoznanie ciąży było wątpliwe poddano kontrolnemu ubojowi w rzeźni. U 5 z nich stwierdzono normalny rozwój płodu, w tym 2 ciąży bliźniacze. U 2 macioerek nieciężarnych nie stwierdzono w macicy żadnych odchyłań od normy. Pozostałe 14 macioerek po normalnym okresie ciąży urodziło 16 jagniąt.

Inseminację owiec nasieniem mrożonym przeprowadzono na stosunkowo małej liczbie owiec w warunkach doświadczalnych. Uzyskanie oko-

ło 70% zapłodnień w jednym cyklu stanowi pewien postęp. Zastosowana prosta metoda zamrażania nasienia i doszyjkowa głęboka inseminacja może być łatwo adaptowana do warunków terenowych. Istnieją zatem możliwości sprawdzenia opisaną technikę w praktyce na większej liczbie owiec.

Piśmiennictwo

1. Aamdal J., Johansen K. E., Graffer T.: Proc. XIV Nord Vet. Congr., Copenhagen, 1982, 349.
2. Ali S. B. A.: Acta Agr. Silv. ser. Zoot. 26, 29, 1987.
3. Andersen K., Aamdal J., Fouger J. A.: Zuchthyg. 8, 113, 1973.
4. Armstrong D. T., Evans G.: J. Reprod. Fert. 71, 89, 1984.
5. Bielański W.: Rozród zwierząt. PWRiL, Warszawa, 1977.
6. Colas G.: 9th Inter. Congr. on Anim. Reprod. and A.I. 2, 287, 1980.
7. Dimov V., Georgiev G.: J. Anim. Sci. 44, 1050, 1977.
8. Edquist S., Einarsson S., Gustafsson B., Linde C., Lindell J. O.: Int. J. Fert. 20, 234, 1975.
9. Fiser P. S., Ainsworth L., Langford G. A.: Cryobiology 18, 399, 1981.
10. Fiser P. S., Fairfull R. W.: Cryobiology 21, 542, 1984.
11. Fukui Y., Roberts E. M.: J. Reprod. Fert. 51, 141, 1977.
12. Grigorjan S. B., Nasarjan V. K., Kadilov V. E.: Zivotn. 4, 37, 1987.
13. Kareta W.: Roczn. nauk. Zoot. Monografie i rozprawy 7, 3, 1977.
14. Kareta W., Pilch J., Wierzbowski S.: Medycyna Wet. 27, 734, 1971.
15. Kareta W., Wierzbowski S.: Roczn. nauk Zoot. 3, 9, 1976.
16. Kareta W., Wierchoć E., Pilch J.: Opracowanie problemowe, Centr. Bibl. Roln. 1, 1969.
17. Killen I. D., Cafferly G. J.: Aust. Vet. J. 59, 95, 1982.
18. Loginova N. V., Zeltobryuch N. A.: Ovcevod. 9, 22, 1968.
19. Lopyrin A. I., Loginova N. W.: Ovcevod. 4, 31, 1958.
20. Martin I., Emmens C. W.: J. Endocrinology 17, 449, 1958.
21. Mattner P. E., Entwistle K. W., Martin I. C. A.: Aust. J. Biol. Sci. 22, 181, 1969.
22. Maxwell W. M. C.: 2nd World Merino Conf., Madrid, 5, 126, 1986.
23. Miłowanov V. K., Sokołowska J. J.: Vestn. Sel. Nauki, 12, 291, 1980.
24. Muller Z.: J. Reprod. Fert. Suppl. 32, 47, 1982.
25. Naumenkov A., Romankova N.: Konev. konn. sport 5, 33, 1970.
26. Ott R. S., Memon M. A.: Soc. Theriog. 10, 1, 1980.
27. Parsutin G. V., Skatkin P. N.: Vestn. Sel. Nauki Zivotn. (2), 154, 1940.
28. Romankova N., Naumenkov A.: Puti Uskor. Nauc-Tek. Progr. Konev. Moskva, 1986, s. 91.
29. Salomon S., Lightfoot R. J.: Nature. Lond., 216, 194, 1967.
30. Tischner M.: J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 53, 1979.

Adres autora: mgr Sabah B. A. Ali, ul. Radzikowskiego 72/6, 31-315 Kraków

Autorzy składają serdeczne podziękowanie Dyrektorowi inż. M. Zielińskiemu i pracownikom Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt w Nowym Saczu za umożliwienie i pomoc w przeprowadzeniu części badań oraz dr W. Karecie za cenne uwagi i sugestie dotyczące części metodycznej pracy.

Али С. Б. А., Тишнер М. — Замораживание семени баранов в алюминиевых тубиках и попытки глубокой внутриматочной инсеминации овец

На 98 эякулятах, взятых от 28 баранов, провели сравнительные исследования семени, замораживаемого в алюминиевых тубиках и контрольно в стеклянных ампулах. Получили улучшение ($p < 0,01$) показателя подвижности, времени выживания и результатов морфологической оценки семени, замораживаемого в тубиках. Приспосабливая форму инсеминационной пипетки к морфологическому строению канала шейки модифицировали инсеминационную пипетку. В конечном результате изготовили пипетку со слегка выгнутой спирально наконечником слева направо, оконченным шариком с 2 отверстиями. Затем провели контрольные „инсеминации” тушью на овцах, предназначенных на забой. Из 29 овец, инсеминированных модифицированной пипеткой, у 67%, находившихся в фазе графовых пузырьков, туш депонировали в теле и уг-

лах матки. Применяя традиционную пипетку, только у 1 овцы в фазе граафового пузырька депонировали тушь на глубине 1/3 канала шейки. У овец в фазе желтого тела не удалось ввести тушь в канал шейки как традиционной, так и модифицированной пипеткой. Затем 23 овец иасеминировали семенем, замороженным в тюбиках при помощи модифицированной пипетки, вводя глубоко внутривагинально семя. В одном цикле было оплодотворенных 16 (70%), а во втором очередные 3 овцы среди 5, повторивших охоту.

Ali S. B. A., Tischner M. — **Freezing of ram semen in aluminium packets and deep cervical insemination of ewes with a modified pipette**

Comparative studies were conducted on 98 ejaculates collected from 28 rams. The semen was frozen in aluminium packets and control glass ampules. A significant improvement ($p < 0.01$) was found in the mo-

tility and survival rates, as well as in the morphology of spermatozoa frozen in aluminium packets. Basing on results obtained from a morphological examination of the cervical canal, a modified insemination pipette (ball-tipped, slightly bent to the left at its initial part) was designed. A group of 29 control ewes was „inseminated” with India ink. Post-slaughter examination revealed that in 67% of ewes being in the Graafian follicle phase the ink deposited with the use of the modified pipette reached the body and horns of the uterus. While only in one ewe out of those „inseminated” with a traditional pipette the India ink reached the depth of 1/3 of the cervical canal. In ewes, which were in the corpus luteum phase, it was not possible to deposit the ink in the cervical canal using either the traditional or the modified pipette. Other 23 non-selected ewes were deep cervically inseminated with semen frozen in aluminium packets using the modified pipette. Sixteen (70%) ewes conceived within one cycle, and 3 out of the 5 ewes which returned to oestrus became pregnant in the second cycle.

ZOFIA LUBERDA, JERZY STRZEŻEK, ARTUR BIELSKI

Wpływ zawartości cynku w plazmie nasienia knura na aktywność DNaz i fosfataz oraz właściwości precipitujące tego płynu wobec żółtka jaja kurzego*)

Katedra Biochemii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR-T, 10-718 Olsztyn-Kortowo

Rola jonów cynkowych w procesach rozrodu nie jest jeszcze dokładnie określona. Tym niemniej w ostatnich latach poznano mechanizm ich działania na poziomie molekularnym. Jony Zn^{2+} okazały się aktywatorami niektórych enzymów nasienia (5), stabilizatorami chromatyny i błon plazmatycznych plemników (7), modulatorami procesów energetycznych omawianych komórek (6).

W przypadku knura jony Zn^{2+} wpływają na szereg właściwości biologicznych układu rozrodczego. Wiązane i transportowane przez specyficzne białko plazmy nasienia określają właściwości fizykochemiczne i biologiczne wymienionego płynu (2, 13, 14, 15). Białko zależne od jonów cynkowych kontroluje transport błonowy w segmencie wstawkowym plazmolemy, wykazuje właściwości antybakteryjne oraz precipitujące wobec żółtka jaja kurzego. Wymienione właściwości białka plazmowego wydają się być uwarunkowane koncentracją jonów cynkowych (13).

Kontynuując nasze badania podjęliśmy próbę określenia wpływu różnych koncentracji jonów Zn^{2+} na aktywność wybranych enzymów hydrolitycznych oraz działanie precipitujące plazmy nasienia knura.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w plazmie nasienia knurów rasy wbp. Poziom jonów cynkowych oznaczano metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej. Oznaczeń dokonywano w płomieniu powietrzno-acetylenowym przy zastosowaniu spektrofotometru firmy Pye Unicam model SP 2900. Plazmę rozcieńczano 0,01M kwasem cytrynowym w stosunku 1:50. Jako standard używano $Zn(NO_3)_2$ w 0,01M kwasie cytrynowym. Zawartość cynku określano w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ plazmy.

Aktywność precipitującą plazmy nasienia wobec żółtka jaja kurzego oznaczano metodą podwójnej dyfuzji w żelu agarozowym (10). Dyfuzję przeprowadzono na 1% agarozie w 0,15 NaCl na płytkach Petriego o średnicy 5,5 cm. Grubość warstwy agarozy wynosiła 0,2–0,4 cm. Odległość między zbiorniczkiem centralnym a zbiorniczkami obwodowymi wynosiła 1 cm. W zbiorniczku centralnym umieszczano 15% roztwór żółtka jaja kurzego, w obwodowych plazmę nasienia. Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej od 48 do 72 godzin.

Aktywność DNaz oznaczano metodą Kurnicka (8). Próbkę plazmy inkubowano cztery godziny w temperaturze 37°C z odpowiednimi substratami w stosunku 1:15 dla DNazy I-zasadowej i 1:12 dla DNazy II-kwasnej. Substrat dla DNazy I zawierał: 0,0088% DNA 4,3mM $MgCl_2$, 14,3mM Tris-HCl (pH 7,6) oraz 0,0017% zieleni metylowej. Substrat dla DNazy II zawierał: 0,013% DNA, 42,7mM $MgCl_2$, 6,6mM buforu octanowego (pH 4,6) oraz 0,01% zieleni metylowej. Reakcję hamowano mieszaniną 0,33M cytrynianu sodu i 0,05M Tris-HCl (pH 7,5) w stosunku 1:3. Stopień redukcji barwy uwolnionej zieleni metylowej określano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 640 nm. Za jednostkę enzymatyczną (U) przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje redukcję absorbancji o 1 jednostkę w ciągu 1 minuty.

* Praca wykonana w ramach CPBP 05.06 pt.: „Fizjologia i patologia rozrodu zwierząt gospodarskich”.