

należy uwzględniając florę bakteryjną i podawane antybiotyki. Dalsze doświadczenia z do-wymieniowym zakażeniem drożdżakami, przy równoczesnym uwzględnieniu różnych drobno-ustrojów, mogą rzucić nowe światło na etio-logię schorzenia.

Pozostaje również zupełnie otwarta sprawa leczenia grzybic wymienia, a także ewentual-nych zarządzeń sanitarnych. Nie mogą one być zbagatelizowane o tyle, że coraz częstsze doniesienia o występowaniu grzybic jamy ust-nej i dalszych odcinków przewodu pokarmo-wego u ludzi mogą być powiązane ze spoży-aniem zakażonego mleka. Wymaga to rów-nież odpowiedniego przystosowania do tych badań Wojewódzkich Zakładów Higieny Wete-rynaryjnej, których współpraca z terenowymi lekarzami przyniesie niewątpliwe korzyści.

Piśmiennictwo

1. Beck C. C.: M. S. U. Vet. 17, 32 (1957). Mycotic mastitis.
2. Bernhardt H.: Die Pilzarten des Sputums. Zentralblatt f. Hyg. u. Bact. Origin 178, 515, 1960.
3. Clark R. J.: Candida Species in bovine mastitis. N. Z. Vet. 4, 76, 1962.
4. Conant N. T., Smith D. T., Baker J. L., Mar-tin D. S.: Manual of Clinical Mycology 1954. Phila-dephia.
5. Emmons C. W.: Isolation of Coccidioles from soil and rodents. Public Healths Rep. 57, 109, 1942.
6. Fischer W.: Experientia IX, 1, 20, 1953 cyt. według Poleman G. Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten 1961 Stuttgart.
7. Galli G.: Observation and research on bovine my-cotic mastitis. Vet. Italiana. 5, 587, 1954.
8. Keith J., Loken D. V., Thomson E. S., Har-vey H., Hoyt D. M., Ball R. A.: Infection of the bovine udder with *Candida tropicalis*. J. of Am. Vet. Med. ASS. 138, 401, 1959.
9. Keller H.: Einige Probleme bei der Verwendung von Antibiotik mit besonderer Berücksichtigung der bakte-riellen Resistenz. Schweiz. Arch. f. Tier. 651, 1957.
10. Klose F., Schürmann R.: Experimentelle Unter-suchungen über Soormycosen. Zentralblatt f. Hyg. 63, 1952.
11. Lerche M.: Eine durch Algen (Protoetia) hervor-gerufene Mastitis bei einer Kuh. B. M. T. W. 64, 1952.
12. Paine T. F.: In vitro Experiments with *Monilia* and *Bac coli* to explain *Moniliasis* in Patients Receiving Antibiotics. Zentralblatt f. Hyg u. Bact (Referate) 102, 176, 1959.
13. Seele — Laver: Sprosspilzen als Krankheitsreger in-sondern im Entergewebe bei Kühen. Monatshefte für Tierheilkunde 7, 94, 1955.
14. Stelle — Bodger A.: Bovine Mastitis due to Yeas. Vet. Res. 65, 304, 1953.
15. Seligman E.: Virulence enhancement of *Candida albicans* by antibiotics and cortisone. Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 83, 778, 1958.
16. Vinkennel A.: cyt. według G. Poleman: Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten. 1961. Stuttgart.

Adres autora: prof. dr Alfred Senze, Wrocław, Norwida 25.

HENRYK MAIK

Fotoabsorpcyjometryczne oznaczanie gęstości nasienia buhaja

(Skalowanie aparatu KF 3)

Zakład Inseminacji i Zwalczenia Niepłodności. Instytut Wet. Zakład w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr LECH JAŚKOWSKI

Racjonalne wykorzystanie możliwości reprodukcyj-nych buhaja w zakładzie unasienniania zwierząt wy-maga określenia koncentracji plemników każdego uzyskanego ejakulatu.

W praktyce produkcyjnej zakładu najczęściej kon-centrację plemników w ejakulacie określamy szca-cunkowo w komorze Bloma. Bardziej dokładne me-tody określania gęstości nasienia, jak przedstawiona niedawno przez Jarosza (1961) metoda określenia gę-stości na podstawie porównania ze standardami, jak-kolwiek bardziej dokładna i stosunkowo łatwa, nie przyjęła się w praktyce ze względu na błąd dochodzący do 20% pomiaru. Podobnym błędem obarczo-na jest metoda Karrasa (1952) oparta o pomiar zmętnienia przy pomocy klina optycznego. Najdokład-niejsza z metod oznaczania gęstości — cytometrycz-na — jest czasochłonna i z tej przyczyny w zakładach nieprzydatna. W większości zakładów unasienniania za granicą szerokie zastosowanie znalazła metoda fotokolorymetrycznego określenia gęstości nasienia. Odnacza się ona stosunkowo dużą dokładnością i w wykonaniu jest szybka. Była przedmiotem sze-regu badań, przy czym większość autorów oceniła bardzo pozytywne jej zalety.

Jako pierwsi Comstock i Green (1939) zastosowali metodę fotokolorymetryczną do oznaczenia gęstości nasienia tryków, wykazując wysoką zgodność ozna-czeń fotokolorymetrycznych z metodą cytometrycz-ną. Thorausch (1951) na podstawie swych badań do-szedł do wniosku, że błędy popełniane przy liczeniu plemników w cytometrze są większe, niż przy ozna-czaniu gęstości metodą fotokolorymetryczną. Willms (1953) pracując przy pomocy kolorymetru „medico” uzyskał prostą zależność między wartością absorpcji światła a gęstością nasienia. Podobne wyniki uzy-skali Cox i Melrose (1954), Perez i Roux (1957), Ku-ćirek (1958), Stach (1959) i ostatnio Ehrlein (1961).

Wszyscy wymienieni autorzy pracowali przy po-

mocy różnych fotokolorymetrów o różnej czułości elementów światłoczułych, o różnych parametrach źródła światła i różnym wyskalowaniu tarczy galwa-nometru. Dlatego też wyniki liczbowe znalezionych przez nich zależności między gęstością nasienia a odczytem na skali użytych aparatów nie mogą być wykorzystane. Nadto, nawet aparaty tego samego typu, wytwarzane przez tę samą wytwórnę, wyka-zują dość znaczne różnice wychylenia skali galwa-nometru, przy pomiarze zmętnienia lub intensywno-ści zabarwienia identycznych zawiesin lub roztwo-rów. Wiąże się to z różną czułością fotoclementów zastosowanych w różnych aparatach.

Cel badań

Każdy indywidualny przyrząd do określania gęstości nasienia musi przed zastosowaniem podlegać wyskalowaniu i dopiero potem może być zastosowany do pomiarów. Zadaniem ni-niejszej pracy było wyskalowanie fotokolory-metru KF 3 produkcji Warszawskich Zakładów Aparatury Laboratoryjnej i Pomiarowej i określenia jego przydatności do oznaczania gęstości nasienia buhaja. Równocześnie posta-nowiono w przebiegu badań prześledzić przy-czynę i wielkość błędów popełnianych przy fotokolorymetrycznym pomiarze gęstości nasie-nia, oraz zbadać możliwości uproszczonego ska-łowania fotokolorymetru.

Materiał i metoda

Opis aparatu. Źródłem światła w aparacie KF 3 jest żarówka z włóknem żarowym punktowym 6V 30W zasilana ze stabilizatora napięcia. Część stru-

mienia świetlnego z żarówki przechodzi przez kondensator, dalej przez płyn zawarty w kuwecie, filtr barwny, a następnie oświetla pierwsze ogniwo fotoelektryczne.

Druga część strumienia świetlnego regulowana diafragmą irysową pada na drugie fotoogniwo.

Oba fotoelementy połączone są kompensacyjnie galwanometrem. Elementem pomiarowym jest potencjometr z wbudowanym bębniem, na którym nasiesiono podziałkę transmisji i ekstynkcji.

Badania przeprowadzono przy filtrze żółto-zielonym (wg oznaczenia firmy Schott, Jena — VG7), wydzielałym światło z wiązki świetlnej (prawie monochromatyczne $0\lambda = 509 \mu\text{m} - 575 \mu\text{m}$). Aparat włączano do sieci co najmniej 15 min. przed dokonaniem pomiarów, miało to na celu ustabilizowanie się fotoprądów płynących w obwodzie. Po sprawdzeniu prawidłowego działania aparatu, napełniano dwie kuwety o tej samej długości warstwy absorpcyjnej, pierwszą roztworem użytym do rozcieńczenia nasienia, drugą rozcieńczonym nasieniem przygotowanym do oznaczenia. Po włożeniu obu napełnionych kuwet do aparatu w bieg wiązki świetlnej stawiano kuwetę z płynem rozrzedzającym.

W tym położeniu kuwet, potencjometr pomiarowy ustawiano w położeniu zerowym. Galwanometr do tego momentu był wyłączony. Po włączeniu w obwód galwanometru, strzałkę jego ustawiono w położenie zerowe, regulując jej położenie wielkością otworu diafragmy irysowej. Następnie kręcąc gałką regulującą położenie obu kuwet, wstawiono w bieg światła kuwetę napełnioną rozcieńczonym badanym nasieniem. Wychylenie strzałki galwanometru sprawdzano ponownie do położenia zerowego regulując pokrętkiem potencjometru.

Z naniesionej podziałki na bębnie odczytywano wartość ekstynkcji.

Odczyt dla każdej próbki powtarzano dwa razy. W wypadku gdy uzyskano dwie różne wartości pomiar powtarzano i obliczano średnią arytmetyczną z trzech odczytów. Wynik końcowy zapisywano do tabeli.

W zasadzie używano do pomiarów kuwet o długości warstwy absorpcyjnej równej 1 cm. Jednak, jeśli wartość E badanej próby nasienia była mniejsza od 0,2, lub większa od 0,65 zmieniano kuwetę. Przy ekstynkcji mniejszej od 0,2 na kuwety o warstwie absorpcyjnej równej 2 cm, przy E większym od 0,65 na kuwety o warstwie absorpcyjnej równej 0,5 cm. W tym przypadku otrzymane wartości E mnożono przez odpowiednie współczynniki, w pierwszym przypadku przez 0,5, drugim przez 2.

Przy posługiwaniu się kuwetami o długości warstwy absorpcyjnej równej 0,5 i 1 cm oraz zastosowaniu filtrów VG7 najodpowiedniejsze jest użycie nasienia rozcieńczonego 1:50, gdyż przy tych parametrach odczyt próby nasienia o koncentracji od $0,5 - 1,0 \times 10^9$ mieści się w podziałce o dużej czułości potencjometru.

Do skalowania użyto 47 ejakulatów, uzyskanych od 22 buhajów czarno-białych nizinnych, o koncentracji plemników od $0,04 \times 10^9/\text{ml}$ do $2,01 \times 10^9/\text{l}$ ml.

Bezpośrednio po uzyskaniu nasienia od buhaja pobierano ze sztucznej pochwy czystą i suchą mikro-pipetą, o pojemności 0,2 ml, taką samą ilość nasienia. Ponieważ kalibracja pipet, oraz średnica otworu wlotowego pipety okazała się niejednakowa, używano do wszystkich pobrań pipet dodatkowo sprawdzonych. Średnica otworu wlotowego pipet wynosiła około 0,05 cm. Przenosząc nasienie w pipecie do uprzednio przygotowanego w zlewce rozcieńczalnika, którym było 9,8 ml 2,8% roztworu wodnego cytrynianu sodowego o temp. 35°. czystą płócienną szmatką wycierano zewnętrzną ścianę pipety, w celu zapobieżenia ewentualnemu przeniesieniu dodatkowej ilości nasienia.

Następnie delikatnie wydmuchiowano nasienie z pipety do rozcieńczalnika. Aby umożliwić reszcie nasienia zwisającej na końcu pipety spłynięcie, dotykano końcem pipety lustra rozrzedzalnika, cały czas delikatnie wydmuchując z pipety resztki nasienia. Nasienie z rozcieńczalnikiem mieszano przez okres 30 sek.

W ten sposób przygotowane nasienie oznaczono absorpcjometrycznie.

Bezpośrednio po zmierzeniu ekstynkcji pobierano z kuwety czystą i suchą pipetą o pojemności 1 ml, 1 ml badanego rozcieńczonego nasienia. Nasienie to delikatnie wydmuchiowano do próbówki, gdzie uprzednio odmierzone pipetą 3 ml 3% roztworu NaCl. Oba płyny mieszano około 30 sek. Następnie za pomocą pipety pasterskiej mieszaliną tą napełniano komorę cytometryczną Thoma.

Aby otrzymać prawidłową wysokość komory zwrócono uwagę na powstanie i umiejscowienie się barwnych pasów Newtona.

Do liczenia przystąpiono po upływie 5 minut od momentu napełnienia komory, w tym czasie nastąpiła sedymentacja plemników (Ehrlein 1961). Plemniki liczono pod mikroskopem Zeissa w kontracie fazowym przy powiększeniu 400X, według ogólnych zasad liczenia plemników w cytometrze. Każdą próbę oznaczoną liczoną 4X w 10 kwadratach średnich (o powierzchni $1/25 \text{ mm}^2$). Po obliczeniu koncentracji plemników w jednym ml nasienia wynik zapisywano do tabeli.

W praktyce fotokolorymetrycznych pomiarów gęstości nasienia stosuje się rozcieńczalniki zabijające plemniki (4% roztwór chloraminu, Kučirek 1953, Willms 1959, Stach 1959, Ehrlein 1961), 1% roztwór formaliny (Cox Melrose 1953, Shalash 1956), lub też 3% roztwór NaCl. Według ww autorów zabijanie plemników stwarza bardziej jednolite warunki pomiaru. Ponieważ badania niniejsze planowano jako wstęp do prób nad obiektywną oceną ruchliwości nasienia, zdecydowano się na zastosowanie płynu nie zabijającego plemników. Wymagało to dodatkowych badań nad właściwościami absorpcjometrycznymi nasienia nie zabitego.

Wyniki badań

Badania wstępne

1) Źródłem zakłóceń kolorymetrycznych pomiarów może być osocze, które poza różnym zabarwieniem i intensywnością zabarwienia, wykazuje niejednakowe zmętnienia. W związku z tym ze zbitych 43 ejakulatów wybrano 18 reprezentujących charakterystyczne cechy osocza o 3 odcieniach zabarwienia i 2 stopniach zmętnienia. Po odwirowaniu plemników i rozcieńczeniu osocza 1:50 przeprowadzono pomiar ekstynkcji, wywołanej przez osocze. Pomiar ekstynkcji podaje tabela 1.

Tab. 1. Wpływ barwy i zmętnienia osocza nasienia na wartość ekstynkcji

Barwa osocza	Ilość prób	Zmętnienie	
		opalizujące	mętne
Białe	2 × 3	0,005	0,01
Żółtawe	2 × 3	0,007 (0,005—0,01)	0,02
Żółte	2 × 3	0,005	0,02
Przeciętna wartość		0,006	0,017

Jak wynika z tabeli, barwa ejakulatu wpływa jedynie w tych przypadkach na wartość ekstynkcji, w których osocze jest wyraźnie zmętniałe, przy czym wartość ta w przypadku krańcowym utrzymywała się w granicach 0,02 E, co odpowiada ilości $3,8 \times 10^4$

plemników w 1 mm³. Nawet w przypadku wyraźnego zanieczyszczenia nasienia dostrzegalnego gołym okiem wartość ekstynkcji osocza nie przekraczała 0,05.

2) W celu zbadania, czy pod wpływem przetrzymywania nasienia następuje zmiana wartości ekstynkcji, przeprowadzono następujące badanie; 10 ejakulatów podzielono na dwie części, z których 1 poddano zabiciu przez nagłe zanurzenie próbek nasienia w solance o temp. -10°. Następnie przeprowadzono pomiary w obu próbach każdego ejakulatu w odstępach 24 godz. Wyniki podaje tabela 2.

Tab. 2. Wpływ czasu przetrzymywania ejakulatu na wartość ekstynkcji, osobno dla nasienia ruchliwego i nieruchliwego

nr ejak.	Czas dokonania pomiaru Oh		24 h		48 h		72 h	
	A	B	A	B	A	B	A	B
	ruchl.	nieruchl.						
1	0,90	0,57	0,80	0,58	0,80	0,57	0,68	0,57
2	0,29	0,21	0,29	0,29	0,27	0,27	0,27	0,29
3	0,82	0,58	0,71	0,58	0,60	0,54	0,60	0,58
4	0,64	0,54	0,61	0,63	0,61	0,60	0,54	0,55
5	0,68	0,55	0,69	0,58	0,68	0,55	0,68	0,53
6	0,41	0,35	0,40	0,39	0,40	0,39	0,35	0,33
7	0,50	0,41	0,50	0,42	0,46	0,43	0,50	0,47
8	0,31	0,26	0,31	0,32	0,31	0,33	0,29	0,27
9	0,17	0,14	0,17	0,15	0,18	0,17	0,20	0,19
10	0,68	0,59	0,68	0,59	0,66	0,59	0,69	0,62
Przeciętne wartości	0,54	0,42	0,51	0,45	0,49	0,44	0,48	0,44

Z tabeli wynika, że w nasieniu ruchliwym wartość ekstynkcji stopniowo zmniejsza się, z tym że w dniu zerowym jest ona wyraźnie wyższa od wartości ekstynkcji nasienia zabitego. W nasieniu zabitym przeciętna wartość ekstynkcji utrzymuje się mniej więcej na tym samym poziomie, z tym, że pierwszy pomiar wykazał najniższą wartość. Dane przeciętne nie odzwierciedlają w pełni indywidualnych wahań w odczycie obserwowanym w poszczególnych ejakulatach.

3) W celu zbadania jednolitości odczytów, w zależności od czasu, jaki upłynął od chwili wymieszania nasienia z rozcieńczalnikiem do chwili przeprowadzenia odczytu, przeprowadzono z pięciu ejakulatami nasienia żywego oraz z pięciu ejakulatami nasienia martwego, odczyt ekstynkcji w odstępach minutowych do pięciu minut po 10 i 30 minutach. Wynik podaje tabela 3.

Jak wynika z tabeli nasienie ruchliwe utrzymuje wyjściową wartość ekstynkcji przez okres 10 minut prawie niezmiennie, natomiast nasienie zabite wykazuje w tym okresie dość znaczną zmienność, dochodzącą w krańcowych przypadkach do 0,1 E, co odpowiada około 1,8×10⁵ plemników w nasieniu o koncentracji około 1,0×10⁶ w 1 mm³.

4) Przy pomocy 5 ejakulatów, w których powtórano dziesięciokrotnie i niezależnie każdy pomiar, oznaczono średni błąd pojedynczego oznaczenia, wyniósł on w krańcowym przypadku 0,026×10⁶, przeciętnie 0,007×10⁶ zawartości plemników w jednym mm³. Jak z tego wynika błąd powstający na skutek niedokładności przygotowania nasienia do pomiaru oraz niedokładności aparatu był w niniejszych badaniach bardzo nieznaczny.

Tab. 3. Jednolitość odczytu próby w zależności od czasu dokonania pomiaru

Nr próby	A (ruchliwe)							
	Czas odczytu próby w minutach							
	0	1	2	3	4	5	10	30
1	0,435	0,440	0,440	0,440	0,440	0,440	0,440	0,380
2	0,330	0,330	0,330	0,330	0,330	0,330	0,330	0,320
3	0,680	0,680	0,680	0,680	0,680	0,680	0,680	0,640
4	0,230	0,230	0,230	0,225	0,225	0,225	0,225	0,225
5	0,390	0,390	0,390	0,390	0,390	0,390	0,385	0,375

Nr próby	B (nieruchliwe)							
	Czas odczytu próby w minutach							
	0	1	2	3	4	5	10	30
1	0,440	0,420	0,435	0,450	0,460	0,470	0,465	0,420
2	0,390	0,350	0,330	0,330	0,330	0,330	0,320	0,320
3	0,520	0,560	0,590	0,610	0,620	0,610	0,600	0,570
4	0,390	0,415	0,450	0,450	0,460	0,460	0,460	0,410
5	0,240	0,230	0,215	0,200	0,200	0,205	0,215	0,210

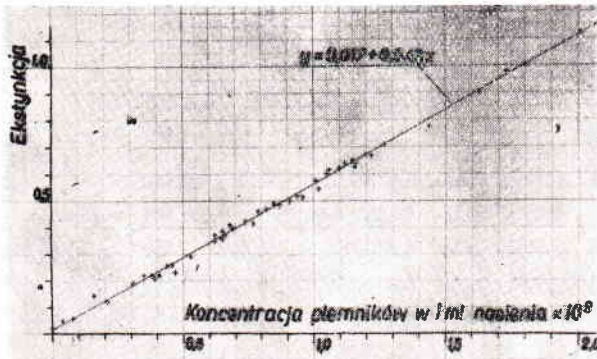
Tab. 4. Zestawienie uzyskanych wartości ekstynkcji i gęstości odpowiednich ejakulatów

Nr ejak.	Eks-tynk-cja	Koncentr. plemn. określona w komorze Thoma	Nr ejak.	Eks-tynk-cja	Koncentr. plemn. określona w komorze Thoma
1	0,020	0	24	0,460	0,790
2	0,045	0,040	25	0,470	0,820
3	0,057	0,080	26	0,490	0,850
4	0,145	0,160	27	0,485	0,870
5	0,120	0,210	28	0,500	0,910
6	0,190	0,310	29	0,520	0,940
7	0,220	0,350	30	0,515	0,960
8	0,220	0,380	31	0,575	1,010
9	0,210	0,390	32	0,545	1,020
10	0,220	0,410	33	0,600	1,050
11	0,255	0,440	34	0,615	1,060
12	0,230	0,460	35	0,620	1,100
13	0,260	0,470	36	0,640	1,120
14	0,290	0,530	37	0,650	1,150
15	0,350	0,620	38	0,625	1,160
16	0,370	0,620	39	0,640	1,160
17	0,355	0,650	40	0,675	1,200
18	0,385	0,650	41	0,670	1,220
19	0,370	0,660	42	0,710	1,270
20	0,410	0,680	43	0,777	1,440
21	0,395	0,690	44	0,900	1,630
22	0,420	0,740	45	0,970	1,730
23	0,415	0,770	46	1,000	1,800
			47	1,120	2,010

Wyniki skalowania kolorymetru

Szczegółowe wyniki wartości ekstynkcji oraz określenie gęstości odpowiednich ejakulatów zestawiono w tabeli 4 oraz przedstawiono graficznie na rys. 1.

Uzyskane z wyżej podanych liczb średnie wyniosły dla ekstynkcji 0,462, a dla gęstości 0,820×10⁶. Współczynnik korelacji dla współzależności między ekstynkcją i gęstością nasienia wyniósł R = 0,998, a współczynnik regresji b = 0,543. Uzyskane przy pomocy współczynnika regresji równanie regresji dla wartości średnich wyniosły y = 0,017+0,543x. Na podstawie powyższych danych obliczono oczekiwane



Rys. nr 1. Współzależność ekstynkcji i gęstości nasienia.

gęstości nasienia dla wzrastających wartości ekstynkcji od 0,1 do 1,2.

Wartość ekstynkcji	Oczekiwana gęstość nasienia
0,1 koncentracja plemników w 1 ml wynosi	$0,150 \times 10^9$
0,2	0,340 „
0,3	0,520 „
0,4	0,710 „
0,5	0,890 „
0,6	1,080 „
0,7	1,260 „
0,8	1,440 „
0,9	1,620 „
1,0	1,810 „
1,1	1,990 „
1,2	2,160 „

Z tabeli wynika, że wzrost wartości ekstynkcji o 0,01 daje wzrost gęstości nasienia o $0,018 \times 10^9$.

Średni całkowity błąd obliczony na podstawie odchyłeń wartości odczytywanych od wartości oczekiwanych wyniósł $0,023 \times 10^9$ plemników, przy wahaaniach maksymalnych plus minus $0,070 \times 10^9$.

Nadmienić jednak należy, że błąd przekraczający $0,050 \times 10^9$ od wartości oczekiwanej występował sporadycznie. Wydaje się, że główną przyczyną odchyłeń wartości empirycznych od wartości oczekiwanych był błąd, powstały z liczenia plemników w cytometrze. W przypadku, gdy liczenie powtarzano czterokrotnie i za gęstość empiryczną przyjmowano średnią z czterech pomiarów, błąd ten kształtował się w sposób podany powyżej, jeżeli natomiast obliczono gęstość dziesięciokrotnie, wówczas średnia gęstość empiryczna pokrywała się prawie całkowicie z gęstością oczekiwaną, w oparciu o pomiar fotokolorymetryczny. Na podstawie powyższego należy wnioskować, że przy skrajnym unikaniu błędów technicznych w przebiegu oznaczania fotokolorymetrycznego gęstości nasienia, wiarygodność tego odczytu jest wyższą, aniżeli wiarygodność z jednego, dwóch lub czterech określeń gęstości przy pomocy cytometru.

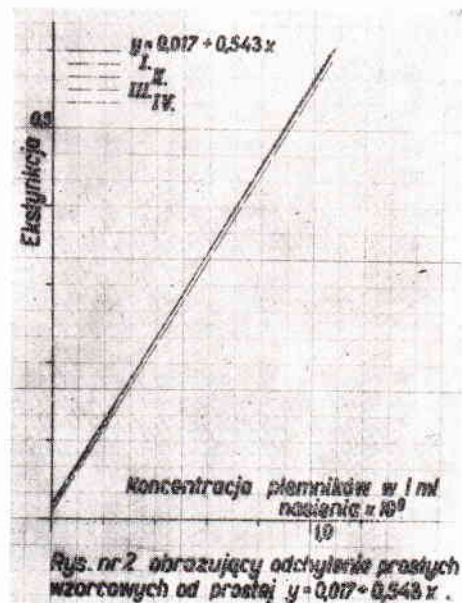
Próby uproszczonego skalowania aparatu

W praktyce skalowanie fotokolorymetru przy pomocy empirycznego ustalania gęstości wielu ejakulatów jest czasochłonne i trudne do przeprowadzenia. Ponieważ z badań niniejszych wynika, że gęstość empiryczna nasienia określona przy pomocy 10-krotnego liczenia w cytometrze, pokrywa się prawie idealnie z gęstością oczekiwaną na podstawie pomiaru absorpcji oraz przyjmując, że do wykreślenia prostej regresji potrzebne są w zasadzie dwa punkty pozwalające wytyczyć jej przebieg, przeprowadzono kilka prób oznaczenia prostej regresji przy pomocy pomiarów 2 ejakulatów. Do prób używano ejakulatów, które makroskopowo zaliczono do „sper-

ma densum”. Każdy ejakulat dzielono na 2 części, jedną z nich oziębiano i po osadzeniu się plemników na dnie próbki określano wartość ekstynkcji dla osocza. W drugiej określano wartość ekstynkcji, a następnie przeprowadzono 10 niezależnych pomiarów gęstości nasienia przy pomocy cytometru, obliczając w każdym pomiarze ilość plemników w 10 średnich kwadratach. Średnią z tych pomiarów przyjmowano jako empiryczną gęstość nasienia. W wymienionych czterech próbach gęstość ejakulatów A i B i odpowiednie ekstynkcje wyniosły:

I	$0,980 \times 10^9$	i	$1,580 \times 10^9$	0,58 E	0,88 E
II	1,320 „	i	1,190 „	0,72 E	0,68 E
III	1,250 „	i	1,440 „	0,71 E	0,78 E
IV	1,505 „	i	1,590 „	0,83 E	0,89 E

Równocześnie średnia ekstynkcja dla osocza w obu ejakulatach dla prób od 1—4 wyniosła 0,01; 0,012; 0,007 i 0,015. Współczynniki regresji dla wymienionych prób wyniosły 0,555; 0,552; 0,544 i 0,549, różniąc się więc nieznacznie od współczynnika regresji uzyskanego w badaniu podstawowym. Wykreślone metodą interpolacji proste regresji miały zbliżony przebieg. Błąd maksymalny w porównaniu z zasadniczą prostą regresji wyniósł 3×10^4 plemników przy gęstości nasienia 1×10^9 w 1 ml (rys. nr 2).



Rys. nr 2. obrazujący odchylenie prostych wzorcowych od prostej $y = 0,017 + 0,543x$.

Omówienie wyników

Z badań wstępnych wynika, że wartość absorpcji uwarunkowana jest prawie całkowicie ilością plemników zawartych w nasieniu, osocze zaś, mimo że zawiera przeważającą ilość barwników, wpływa w sposób nieznaczny na ogólną wartość absorpcji. Indywidualne różnice barwy ejakulatów wpływają w nikłym, praktycznie żadnym stopniu, na wartość oznaczenia. Badania wstępne wykazały, że nasienie żywe należy badać natychmiast po pobraniu, gdyż przetrzymywanie go w temperaturze $+3^\circ$ zmienia jego zdolność absorbowania światła. Wielkość absorpcji zależy także od ruchliwości plemników, przy czym nasienie ruchliwe utrzymuje wyjściową wartość E, w odróżnieniu od nasienia martwego.

Z badań niniejszych zdaje się wynikać, że metoda fotokolorymetrycznego określania gę-

stości nasienia jest metodą obiektywną i ścisłą. Pod tym względem wyniki niniejsze pokrywają się całkowicie z wynikami badań innych autorów, którzy wykorzystywali zjawisko absorbowania światła przez nasienie do określania jego gęstości.

W naszym przypadku współczynnik korelacji między ekstynkcją a gęstością nasienia wyniósł $r = 0,998$, natomiast Kučirek (1958) uzyskał $0,993$, Stach (1959) — $0,996$, Ehrlein (1961) — $0,989$.

Wydaje się również, że jakkolwiek dokładne wyskalowanie fotokolorymetru jest stosunkowo pracochłonne, można przy pomocy metody uproszczonej wyskalować fotokolorometr dostatecznie ściśle dla celów praktycznych. Błąd powstały z uproszczonego skalowania nie przekracza 3% wartości uzyskanych przy pomocy skalowania bardziej ścisłego. Warunkiem uzyskania wyników wiarogodnych jest, jak stwierdzono w badaniach niniejszych, potwierdzonych między innymi badaniami Ehrleina, Kučirka, Stacha absolutna dokładność przeprowadzonych pomiarów rozcieńczeń i przyrządów pomiarowych.

Różnice między poszczególnymi pomiarami gęstości nasienia przeprowadzonymi przy pomocy fotokolorymetru są znacznie mniejsze aniżeli między niezależnymi pomiarami gęstości nasienia przeprowadzonymi metodą cytometryczną.

Uwagi praktyczne

W początkowej fazie niniejszych badań używano starego fotokolorymetru tej samej wytwórni (KF 2). Fotokolorometr ten dawał wyniki bardzo rozbieżne, w związku z tym, przy rozpoczęciu każdorazowym pomiarów, istniały wątpliwości, czy uzyskane współzależności odpowiadają stanowi faktycznemu.

Próbowano sprawdzać prawidłowe działanie fotokolorymetru przy pomocy standardowych roztworów barwnych. Metoda ta okazała się o tyle niepraktyczna, że trudno było oczyścić kuwety, w których umieszczono roztwory standardowe. W związku z tym, zamiast kuwety użyto barwnego szkła, odpowiednio przyciętego do badania sprawności aparatu. Przed każdym pomiarem sprawdzono, czy wartość ekstynkcji, spowodowana przez wymienioną płytkę szklaną, była jednakowa. Przy pomocy tej płytki można było wykryć wadliwość działania fotokolorymetru KF 2, a następnie regularnie kontrolować prawidłowość działania aparatu KF 3. Ta regularna kontrola jest nieodzowna ze względu na to, że z biegiem czasu fotoelementy aparatu ulegając „starzeniu” powodują, że wykreślona prosta charakteryzująca współzależności niedokładnie odtwarza. Ponadto sprawdzanie aparatu jest nieodzowne we wszystkich przypadkach wymiany żarówek lub jakichkolwiek napraw układu optycznego.

W przypadkach stwierdzenia, że wartość ekstynkcji w czasie sprawdzania jest inna niż ta, którą ustalono jako wartość wzorcową, należy przeprowadzić przeskalowanie fotokolorymetru.

Wnioski

Fotokolorometr KF 3 pozwala obiektywnie określić gęstość nasienia przy średnim całkowitym błędzie pomiarów plus minus $0,028 \times 10^9$ plemników zawart. w 1 ml. Stwierdzono wy-

soką współzależność między wartością ekstynkcji a gęstością nasienia obliczoną w cytometrze. Metoda ta nadaje się do zastosowania w praktyce ze względu na szybkość, z jaką można przeprowadzić dokładny i obiektywny pomiar. Każdy fotokolorometr, ze względu na odmienną czułość fotoelementów, powinien być przed wprowadzeniem do użytkowania wyskalowany i następnie regularnie kontrolowany.

Piśmiennictwo

1. Bosselaar G. A., Spronki N.: An Apparatus for Measuring the Motility of Sperm Cells. J. Agr. sc. 1953 Nov.
2. Cox C. P., Melrose D. R.: The Calibration of A Photo — Electric Absorptiometer for the Rapid Estimation of Counts of Spermatozoa in Bull. J. Agr. Sc. 1953 July.
3. Ehrlein H. J.: Untersuchungen über die Genauigkeit der Dichtebestimmung von Bullensperma mittels einer Zählkammer und des „Hellige Haemoskopes”. Diss. Hannover 1961.
4. Jarosz S.: Ocena gęstości nasienia na podstawie porównania ze standardowymi rozrzedzeniami nasienia buhaja. Zeszyty Probl. Post. Nauk Roln. Zesz. 31, 1961.
5. Kučirek O.: Versuche zur Dichtebestimmung von Bullenejakulaten mit dem Hellige — Haemoskop. D. ss. Hannover 1958.
6. Mann T.: Biochemia Nasienia. PWRiL, 1958.
7. Neumann J.: Použití fotokolorimetru jako spermiodensimetru. Vet. XII, 1962.
8. Stach Dagmar: Versuche zur Dichtebestimmung von Bullensperma mit dem Photometer „Eppendorf”. Diss. Hannover 1939.
9. Shalash M. R.: A Rapid Method of Standardisation of the Density of Buffalo Semen. The Vet. Record 1956, Vol. 68.
10. Thorausch: Untersuchungen über ein Messinstrument zur Feststellung der Spermadichte für Bullensperma. Tierärz. Um. 1951, 6, 7/8.
11. Ullner H. R.: Die Dichtebestimmung von Bullensperma mit dem Kompensationsphotometer. Fortph. Zuchthyg. 1955, 5/7.
12. Willms H.: Versuche zur Dichtebestimmung von Bullenejakulaten mit Hilfe eines Kolorimeters. Diss. Hannover 1954.

Adres autora Henryk Maik, Bydgoszcz, ul. Swierczewskiego 35.

Maik Г. ФОТОАБСОРБЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГУСТОТЫ СЕМЕНИ БЫКА — ПРОИЗВОДИТЕЛЯ. (Калибровка аппарата КФ 3)

С целью установления пригодности фотоколориметра КФ3 для определения густоты семени быка — производителя, исследовано 47 эякулятов, происшедших от 22 быков. Определяли живое семя, разбавленное в изотоническом растворе лимоннокислого натрия. Констатировано высокую положительную корреляцию $x = +0,998$ между экстинкцией а измерением густоты цитометрическим методом.

Разработано и проверено упрощенным методом калибровку аппарата, проведенную на основании вычерчения прямой через два определенных пункта.

На основании указанных исследований автор заключает, что аппарат КФ3 является пригодным для объективного определения густоты семени в практических условиях искусственного осеменения.

Maik H. — Photoabsorbtiometric measurement of sperm concentration 1. Calibration of the photocolorimeter KF-3.

In order to examine the fitness of the photocolorimeter KF-3 for estimating the concentration of bull semen, 47 ejaculates from 22 bulls were used. The estimations were performed with fresh and „live” semen. A very high correlation was found between the photocolorimetric readings (extinction values) and sperm count, of $r = +0,998$. A simplified method of calibration of the apparatus was elaborated and tested.

On the basis of the above-mentioned experiments it was found that the photocolorimeter KF-3 may be used for routine estimation of sperm concentration.

Maik H. — La définition photoabsorptiométrique de la densité du sperme du taureau (La graduation de l'appareil KF 3).

Pour définir l'utilité du photocolorimètre KF 3 pour la détermination de la densité du sperme du taureau on détermina 47 éjaculations, provenant de 22 taureaux. On détermina le sperme vivant, dilué dans une solution izotonique de citrate de soude. On constata une grande dépendance positive $r = +0,998$ entre l'extinction et la mesure de la densité calculée à l'aide de la méthode cytométrique. On calcula l'équation de la regression directe et on donna la méthode simplifiée de graduer l'appareil, effectuée en traçant une ligne droite par deux points déterminés. On calcula l'erreur de la définition de l'éjaculation ainsi que l'erreur survenue de la graduation simplifiée. La manière de contrôler l'action régulière de l'appareil et présentée.

Les recherches citées démontrent, que l'appareil KF 3 convient à la définition objective de la densité du sperme dans les conditions de la pratique d'insemination.

Maik H. — Photoabsorptionmetrische Bestimmung der Dichtigkeit Bullenspermas (Skalabezeichnung des Apparates KF3).

Zwecks Brauchbarkeitsbezeichnung des Photokolormeters KF3 zur Bestimmung der Dichtigkeit Bullenspermas, wurden 47 von 22 Bullen stammende Ejakulate benützt. Es ist lebendes in isotonischer Natriumcitratlösung verdünntes Sperma bestimmt worden. Eine hohe gegenseitige positive Abhängigkeit $r = +0,998$ zwischen der Extinktion und der mit cytometrischen Methode vermessenen Dichtigkeit wurde festgestellt. Man berechnete die Gleichung der Regressionsgerade und eine vereinfachte Skalamethode des Apparates auf Basis der Geradedarstellung durch zwei fixierte Punkte, weiters den Fehler der einfachen Bestimmung des Ejakulats sowie den aus der vereinfachten Skalierung sich ergebenden Fehler. Die Art der Kontrolle des Apparates wird angegeben. Auf Grund der Untersuchungen kommt der Verfasser zur Überzeugung, dass die Vorrichtung KF3 zur objektiven Bestimmung der Dichtigkeit Bullenspermas in der Besamungspraxis geeignet ist.

PATOLOGIA I TERAPIA

JAROGNIEW KOZŁOWSKI

Zagórow

Farmakodynamiczne podstawy stosowania trankwiliny (chloropromazyny) u zwierząt. I. Działanie ośrodkowe

Coraz częstsze stosowanie w ciągu ostatnich lat pochodnych fenotiazyny w leczeniu weterynaryjnym powoduje konieczność dokładnego zajęcia się tą grupą leków. Duże zalety chloropromazyny, wielokierunkowość działania, przewidywana powszechność użycia, a jednocześnie nowość i często sprzeczne doniesienia autorów, co do wyników działania w takich samych jednostkach chorobowych, zmuszają niejednokrotnie lekarza do podjęcia samodzielnej decyzji co do celowości użycia tego leku i określenia wysokości dawki w konkretnym przypadku. Oczywiście decyzja taka wydana być może jedynie w oparciu o znajomość działania terapeutycznego i ubocznego stosowanego leku, jego dalszych losów w organizmie i umiejętność przewidywania możliwych komplikacji. Bez trudu poznania mechanizmu działania leku nie może być mowy o rzetelnej farmakoterapii.

Wprawdzie dalecy jesteśmy jeszcze od pełnego poznania właściwości farmakologicznych chloropromazyny, to jednak wielokierunkowe badania doświadczalne i kliniczne rzuciły już pewne światło na ten problem. Zadaniem niniejszej publikacji jest przedstawienie wyniku tych badań, oraz dokonanie przeglądu głównych koncepcji tłumaczących mechanizm działania omówionego leku.

Chloropromazyna należy do grupy środków kojących, którą obejmuje się szeregiem nazw jak tranquillisantia, ataractita, neuroleptica, neuroplegica itp.

Zasadniczą cechą chloropromazyny jest jej uspokajające działanie psychotropowe, jednak z natury różne od tradycyjnych środków (sedativa), dla których

uspokojenie bywało tylko etapem poprzedzającym efekt nasenny i narkotyczny.

Działanie chloropromazyny na organizm jest wielokierunkowe. Ścisłe rozgraniczenie objawów zależnych od bezpośredniego wpływu chloropromazyny na ośrodkowy układ nerwowy, od zmian wywołanych działaniem obwodowym sprawia w praktyce pewne trudności.

Wśród objawów ogólnych u zwierząt po aplikacji chloropromazyny na plan pierwszy wysuwa się obniżenie spontanicznej aktywności. Charakterystyczny jest przy tym stan daleko idącej obojętności wobec otaczającego świata, mimo w pełni zachowanych zdolności pojmowania go. Reakcje w zasadzie są świadome i celowe, chociaż rozwijają się z pewnym opóźnieniem (27). Z reguły notuje się obniżenie lub zupełny zanik agresji. Zwierzęta objawiające przed podaniem chloropromazyny stan wzmożonego napięcia psychicznego i gwałtowne odruchy obronne, po zadaniu tego leku pozwalają na zbliżenie się człowieka, przeprowadzenie badań i wykonanie zabiegów (12). Opis objawów klinicznych u różnych gatunków zwierząt po zadaniu trankwiliny znaleźć można w pracach wielu autorów (7, 12, 13, 21, 23, 25) i nie ma potrzeby ich tu przytaczać.

Stopień nasilenia tych objawów zależy od dawki leku. Ścisłe określenie dawki wywołującej dany zespół zmian nie jest jednak możliwe, ponieważ istnieje nie tylko gatunkowa i indywidualna wrażliwość na ten lek, ale nawet u jednego i tego samego zwierzęcia ta sama dawka może wywołać zmiany o różnym nasileniu, zależne np. od stanu pobudzenia emocjonalnego zwierzęcia. Badania Wojtczak-Jaroszewej (23) wykazały, że w czasie podwyższonego pobudzenia obronnego, dawka, która wywoływała uprzednio wyraźne osłabienie warunkowych reakcji obronnych, nie wykazywała działania. Autor (12) w swej praktyce obserwował przypadek, gdzie u podrażnionego uprzednio buhaja bardzo duża dawka trankwiliny (6 ml/100 kg) zdołała spowodować jedynie nieznaczne uspokojenie.