

ZDZISŁAW SMORAĞ

Próba uchwycenia zmian morfologicznych występujących w mrożonym nasieniu buhaja i tryka

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytut Zootechniki, Balice k. Krakowa
Kierownik: doc. dr habil. S. WIERZBOWSKI

Podstawową metodą oceny nasienia mrożonego jest jego ruchliwość po rozmrożeniu. Takie kryterium oceny daje dostateczną informację o wartości zapładniającej nasienia buhajów, natomiast nie daje zadowalających rezultatów zastosowane do oceny mrożonego nasienia tryków, gdyż mimo dobrej ruchliwości jego płodność jest na ogół niższa niż przy kryciu naturalnym lub inseminacji nasieniem płynnym. Powodem tych rozbieżności jest prawdopodobnie uszkodzenie akrosomu, do którego dochodzi w procesie mrożenia, podczas gdy aparat ruchu pozostaje nienaruszony (2, 5, 9, 10). Zmiany te są jednak uchwytne tylko przy pomocy mikroskopu elektronowego co wyklucza możliwość kontroli nasienia mrożonego na tej drodze dla celów praktycznych. Stąd wyrosła potrzeba opracowania metody prostszej, opartej na możliwości posługiwania się mikroskopem świetlnym.

Przyjmując uszkodzenie akrosomu za przyczynę obniżonej płodności nasienia mrożonego podjęto próbę wykrywania zmian morfologicznych w przedniej części główki plemników przy pomocy mikroskopu świetlnego. Wychodząc z założenia, że proces zamrażania nasienia buhaja nie pociąga za sobą tak licznych uszkodzeń struktury plemnika jak to ma miejsce w nasieniu tryków, przeprowadzono porównanie nasienia mrożonego tych dwu gatunków.

Materiał i metody

W doświadczeniu użyto metody zastosowanej przez Buttle i wsp (1) polegającej na wykrywaniu zmian morfologicznych przedniej części główki plemnika w nasieniu inkubowanym w roztworze nigrozyny. Na szkiełku podstawowym o temp. 38-40°C umieszczano obok siebie kroplę 10% roztworu nigrozyny angielskiej i kroplę nasienia. Po zmieszaniu z nigrozyną nasienie pozostawało na szkiełku przez okres co najmniej 1 minuty. Po tym czasie wykonywano rozmaz i utrwalano go nad płomieniem.

Materiał doświadczalny stanowiły 34 ejakulatory od pięciu tryków. Nasienie buhajów zamrażano w kulkach wg metody podanej przez Wierzbowskiego i Pilcha (12), a nasienie tryków w szklanych ampulkach wg metody podanej przez Karetę i wsp. (4). Z każdego ejakulatu wykonywano rozmaz po pobraniu, a następnie po ekwilibracji i po mrożeniu. Bezpośrednio przed wykonaniem rozmazu, przeprowadzano ocenę szacunkową ilości plemników ruchliwych.

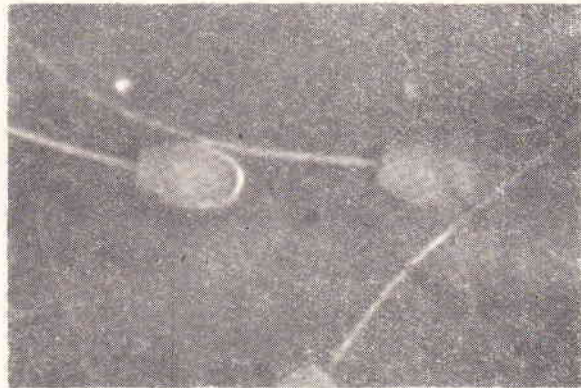
Dla uzupełnienia przeprowadzono również mrożenie nasienia buhajów i tryków bez osłaniającego rozcieńczalnika. Świeże nasienie rozlewano do szklanych probówek i zamrażano, a następnie rozmrażano w temp. +40°C i wykonywano rozmaz.

Obserwacje przeprowadzano pod mikroskopem Zeiss Nu stosując powiększenie 2000-2500×. Z każdego preparatu licząco 300 plemników.

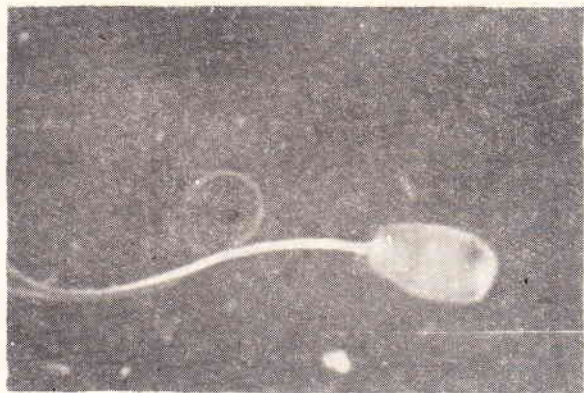
Istotność różnic między ilością plemników nieuszkodzonych w poszczególnych grupach nasienia obliczano przy pomocy testu Duncana.

Wyniki

W rozmazach wykonywanych zarówno z nasienia świeżego jak i po ekwilibracji i po mrożeniu stwierdzano obecność dwu grup różniących się pod względem plemników. Do nieuszkodzonych zaliczano plemniki odznaczające się jasnym brzegiem przedniej części główki. Pojaśnienie w formie obwódki występujące w plemnikach nieuszkodzonych rozszerzało się nieco ku wierzchołkowi główki i wyraźnie kontrastowało z szarym tłem preparatu i główką plemnika.



Ryc. 1. Rozmaz z nasienia tryka po rozmrożeniu. Z lewej plemnik nieuszkodzony z jasną obwódką otaczającą przednią część główki (× 2500).



Ryc. 2. Rozmaz z nasienia tryka po rozmrożeniu. Główna plemnika posiada jasną plamę oraz lekko spłaszczony wierzchołek. Forma zaliczana do opisanych uszkodzeń (× 2500).

Do grupy uszkodzonych zaliczano plemniki wskazujące „rozmyty” brzeg przedniej części główki, co wyrażało się w zatarciu konturu plemnika i brakiem jasnej obwódki. Do tej grupy zaliczano również plemniki posiadające

na szczycie główki różnej wielkości i kształtu jasne miejsca. Brzegi główek w pobliżu tych miejsc były o wiele słabiej zaznaczone niż w plemnikach nieuszkodzonych, a wierzchołki były spłaszczone (ryc. 2). Opisane formy plemników występowały w określonych ilościach w nasieniu świeżym, po ekwilibracji i po mrożeniu, natomiast w nasieniu nie rozcieńczonym, zamrożonym przez włożenie wprost do ciekłego azotu, wszystkie plemniki wykazywały zmiany w postaci „rozmytego” brzegu przedniej części główki (tab. 1).

odwrotną proporcję, bowiem nieuszkodzonych plemników było średnio 25,4% w stosunku do 41,4% plemników wykazujących ruch.

Zarówno u buhajów jak i tryków nie stwierdzono istotnej różnicy między ilością plemników nieuszkodzonych w nasieniu świeżym i poddanym ekwilibracji. Natomiast różnica ta była wysoko istotna między ilością plemników nieuszkodzonych w nasieniu świeżym i poddanym ekwilibracji, a nasieniem mrożonym.

Zestawienie badanych ejakulatów w grupach o tej samej ocenie ruchliwości po rozmrożeniu

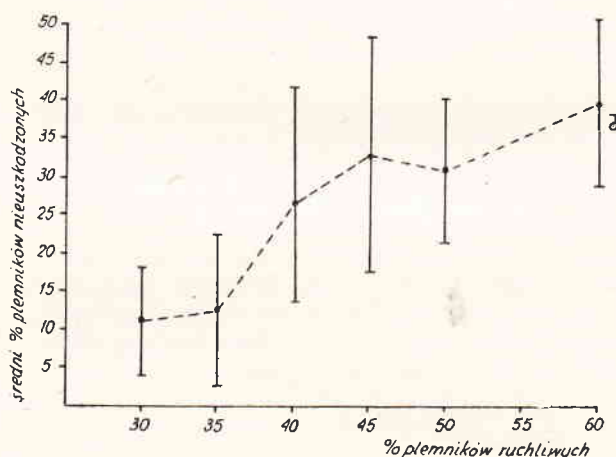
Tab. 1. Procentowy udział plemników ruchliwych i plemników z nieuszkodzonymi akrosomami w nasieniu buhajów i tryków

Ocena	Buhaje			Tryki		
	Nasienie świeże	Nasienie po ekwilibracji	Nasienie mrożone	Nasienie świeże	Nasienie po ekwilibracji	Nasienie mrożone
% plemników ruchliwych	73,8 ± 6,0	72,9 ± 5,8	39,5 ± 8,0	81,3 ± 4,7	78,3 ± 7,3	41,4 ± 11,9
% plemników nieuszkodzonych	78,7 ± 9,3	78,1 ± 8,4	41,6 ± 12,9*	88,6 ± 6,1	86,6 ± 6,1	25,4 ± 14,0*

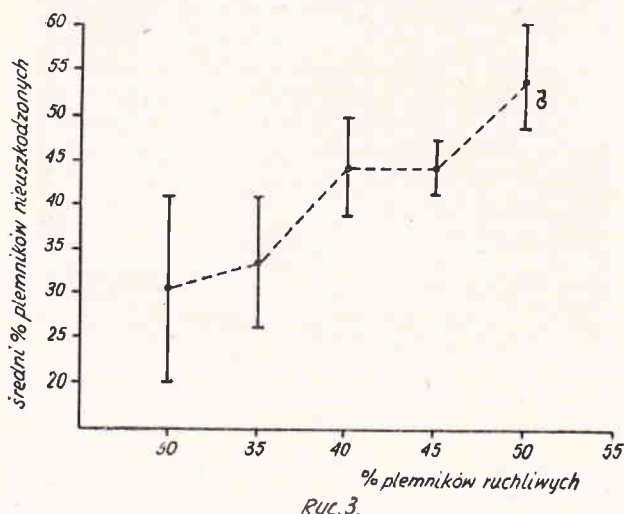
* różnica wysoko istotna w stosunku do nasienia świeżego i po ekwilibracji.

W świeżym nasieniu buhajów o średniej ruchliwości wynoszącej 73,8% stwierdzono średnio 78,7% plemników nie wykazujących zmian. Po ekwilibracji, w nasieniu o średniej ruchliwości 72,9% znajdowało się w 78,1% plemników nieuszkodzonych. W nasieniu mrożonym % plemników nie wykazujących zmian był także wyższy od % plemników ruchliwych i wynosił 41,6% w stosunku do 39,5% plemników ruchliwych.

W świeżym nasieniu tryków o ruchliwości wynoszącej średnio 81,3% stwierdzono 88,6% plemników nie wykazujących zmian. W nasieniu poddanym ekwilibracji po zakończeniu której średnia ocena ruchliwości wyniosła 78,3% stwierdzono 86,6% plemników nieuszkodzonych, natomiast w nasieniu mrożonym stwierdzono



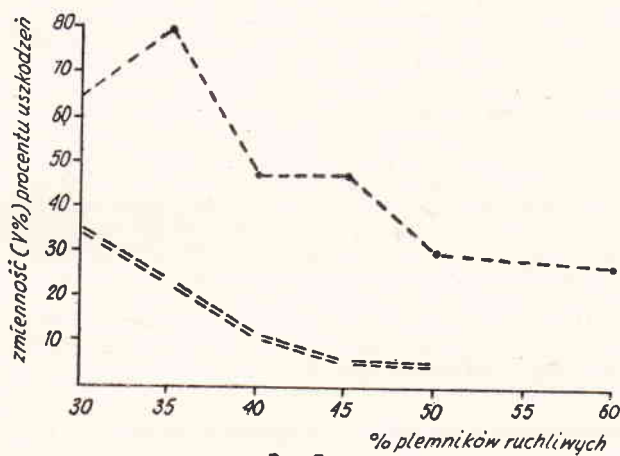
Ryc. 4. Średni % plemników z nieuszkodzonymi akrosomami w ejakulatach tryków o takim samym % plemników po rozmrożeniu.



Ryc. 3. Średni % plemników z nieuszkodzonymi akrosomami w ejakulatach buhajów o takim samym % plemników ruchliwych po rozmrożeniu.

(ryc. 3 i 4) i porównanie z oceną morfologiczną, pozwoliło na uchwycenie dalszych różnic występujących w nasieniu buhajów i tryków pod wpływem mrożenia. I tak w nasieniu buhajów liczba plemników niezmiennych morfologicznie była prawie we wszystkich klasach wyższa od liczby plemników wykazujących ruch. Większą zmienność w ilości plemników nieuszkodzonych stwierdzono jedynie w klasach ruchliwości 30 — 35% a więc przy słabszych wynikach zamrażania. Natomiast w nasieniu tryków liczba plemników wykazujących ruch była we wszystkich klasach ocen wyższa od średniej ilości plemników niezmiennych morfologicznie, przy czym najniższy % plemników nieuszkodzonych w stosunku do ilości plemników ruchliwych stwierdzono w klasach ruchliwości 30 — 35%, a więc przy słabszych wynikach zamrażania.

Równocześnie też we wszystkich klasach ocen stwierdzono dużą zmienność w ilościach plemników nieuszkodzonych (ryc. 5).



Ryc. 5.

Ryc. 5. Zmienność procentu plemników nieuszkodzonych w ejakulatach o tej samej ruchliwości po rozmrożeniu.

Dyskusja

Zastosowana metoda wydaje się pozwalać na uchwycenie zmian morfologicznych w przedniej części główki plemnika. W rozmiarze morfologicznym łatwo bowiem można wyróżnić plemniki posiadające jasny brzeg przedniej części główki oraz plemniki, które go nie posiadają. Zjawisko to należy tłumaczyć gromadzeniem się cząsteczek nigrozyny na nieuszkodzonej, gładkiej powierzchni główki. Promienie świetlne przechodząc przez brzeg otoczonego cząsteczkami nigrozyny akrosomu powodują tworzenie się jasnej obwódki wokół przedniej części główki. W wypadku uszkodzenia tej powierzchni, cząsteczki nigrozyny przenikają do plemnika i wówczas zjawisko to nie występuje.

Zachodzi jednak pytanie, czy otoczenie powierzchni główki cząsteczkami nigrozyny występuje jedynie w plemnikach zupełnie nieuszkodzonych, czy też może występować w przypadkach mniejszych zmian jak np. nabrzmienie akrosomu. Już w nasieniu świeżym występuje pewien procent plemników nie posiadających obwódki a więc zaliczanych do uszkodzonych. Są to prawdopodobnie plemniki ze zmianami starczymi akrosomu polegającymi na jego rozkładzie. Mrożenie powoduje dalsze zwiększenie ilości plemników z podobnymi zmianami w akrosomie. Zasadniczym problemem jest ustalenie ewentualnej zależności między wspomnianymi zmianami a płodnością nasienia.

Z uzyskanych rezultatów wynika, że proces zamrażania prowadzi do uszkodzenia pewnego odsetka plemników zarówno w nasieniu buhajów jak i tryków. Jednak u buhajów mimo znacznego wzrostu po mrożeniu procentu plemników z uszkodzonymi akrosomami, ilość plemników nieuszkodzonych wynosząca 41,6% była wyższa od ilości plemników ruchliwych. Wyniki te są zbliżone do rezultatów Warnawskiego i Turbina (8),

którzy stwierdzili 36% plemników nieuszkodzonych w nasieniu mrożonym buhaja. Natomiast Buttler i wsp. (1) stwierdzili przy użyciu tej samej metody 56,1% plemników nieuszkodzonych, a Tischner (12) posługując się metodą fluorescencji wykazał w mrożonym nasieniu buhaja 82% plemników nieuszkodzonych. Również Kann (3) wykazała zmiany w akrosomach plemników mrożonego nasienia buhajów, nie podając jednak jakiego % plemników one dotyczyły. Z drugiej strony Ropatz i wsp. (7) i Healey (2) posługując się mikroskopem elektronowym nie wykazali ujemnego wpływu mrożenia na ultrastrukturę plemników buhaja.

Porównanie nasienia mrożonego buhajów i tryków wykazało, że procent plemników nieuszkodzonych w nasieniu tryków był dużo niższy niż w ejakulatach buhajów o podobnej ruchliwości i wynosił średnio 25,4%. Zbliżoną ilość plemników nieuszkodzonych wykazał Tischner 30% (12), a niższą Warnawskiej — 16% (9). Również Quinn i wsp. (6) stwierdzili uszkodzenie akrosomów u większości plemników mrożonego nasienia tryków, natomiast Healey (2) wykazał uszkodzenie akrosomu wszystkich plemników.

Wykazana ilość plemników nieuszkodzonych była niższa od średniej ilości plemników ruchliwych. Podobne zjawisko stwierdził także Warnawskiej (9, 10) opierając się na obserwacjach przeprowadzonych przy użyciu mikroskopu elektronowego.

W przeprowadzonym doświadczeniu stwierdzono również, że stosunek ilości plemników nieuszkodzonych do ruchliwych w mrożonym nasieniu tryków nie jest wielkością stałą lecz cechuje go duża zmienność we wszystkich klasach ruchliwości. Mimo tego procent plemników nieuszkodzonych wzrasta w miarę poprawy ruchliwości nasienia. Najniższy procent plemników nieuszkodzonych w stosunku do ruchliwych wystąpił w ejakulatach o niższej ruchliwości (30 — 35%), gdzie stanowił zaledwie 1/3 plemników ruchliwych. W ejakulatach o ruchliwości powyżej 40% następował wyraźny wzrost liczby plemników nieuszkodzonych do około 2/3 plemników ruchliwych. Dlatego też w odniesieniu do nasienia zawierającego 30 — 35% plemników ruchliwych można przyjąć, że przyczyna niskich wyników inseminacji tym nasieniem leży w zbyt małej ilości plemników nieuszkodzonych w dawce inseminacyjnej. Natomiast w klasach nasienia o dobrej ruchliwości, rozbieżność między ilością plemników nieuszkodzonych i ruchliwych nie jest duża, stąd też, na ogół niskie i nierówne wyniki unasienniania owiec nasieniem mrożonym (4) można tłumaczyć niewielkimi zmianami w plemnikach, mogącymi mieć już ujemny wpływ na zdolność zapłodnienia nasienia, a nie wykrywalnych z powodu zbyt małej precyzji tej metody. Mimo tych rozbieżności przedstawiona metoda wydaje się być przydatna do oceny mrożonego nasienia

tryków. Występująca bowiem zmienność w ilości plemników nieuszkodzonych w ejakulatach o podobnej ruchliwości stwarza możliwość wyboru do inseminacji ejakulatów o najwyższym procencie plemników nieuszkodzonych.

Wnioski

1. Mrożenie nasienia powoduje wzrost ilości plemników z uszkodzonymi akrosomami, przy czym zaznacza się on o wiele wyraźniej w nasieniu tryków niż w nasieniu buhajów.

2. Podana metoda może być przydatna dla oceny nasienia mrożonego tryków.

Piśmiennictwo

- Buttle H. M., Hancock J. L., Purser A. F.: *Animal Prod.* 7, (1), 59, 1965.
- Healey P.: *J. Reprod. Fert.* 19 (1), 21, 1969.
- Kann M. L.: *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 269, 2026, 1969.
- Kareta W., Piłch J., Wierzbowski S.: Zamrażanie nasienia tryków w niskich temperaturach. III. Płodność owiec po nasieniu mrożonym (w maszynopisie, przyg. do druku).
- Milowanow W. K., Warnawski A. N., Nauk W. A.: *West. sel.-choz. nauki Moskwa* 15, (10), 86, 1970.
- Quinn P. J., White J. G., Clelland K. W.: *J. Reprod. Fert.* 18, 209, 1969.
- Rapatz T. G., Menz K. J., Luyte B. J.: *Anatomy of the Freezing process in biological materials w: Cryobiology*, 139, Academic Press, London and New York, 1966.
- Warnawski A. N., Turbin W.: *Ziwnowodstwo*, 10, 71, 1968.
- Warnawski A. N.: *Owcewodstwo*, 2, 28, 1970.
- Warnawski A. N.: *Owcewodstwo*, 16, 8, 22, 1970.
- Wierzbowski S., Piłch J.: *Nasienie mrożone w inseminacji bydła*. PWRiL, 1970.
- Tischner M.: *IV Zjazd PTNW*, W-wa, 1970.

Adres autora: dr Zdzisław Smorąg, Balice k/Krakowa, Instytut Zootechniki.

Сморонг З. — Исследования по морфологическим изменениям появляющимся в замороженном семени быка и барана.

Исследованиям подвергли 34 эякулята от 3 быков и 39 эякулятов от 5 баранов. Мазки приготовленные из семени после инкубации в 10% растворе нигрозина (по Buttle 1965) рассматривали под иммерсией светового микроскопа применяя увеличение 2000—2500 раз. Исследовали свежее семя (с), тоже самое семя подвергнутое эквilibрации (э), мороженное (м), а также замораживаемое без защитного разбавителя (м.б.р.). Живчики окаймленные светлым обводом вокруг передней части головки считали неповрежденными в отличие от живчиков без обвода (повреждение акросома). Установили, что в семени быков и баранов м. количество поврежденных живчиков было больше чем в семени с. и э. В семени м.б.р. все живчики чем повреждены. В семени баранов м. количество не поврежденных живчиков было меньше числа подвижных (не поврежденных 25,4%, подвижных 41,4%). Наблюдали тоже раннее количество поврежденных живчиков в эякулятах не отличающихся в подвижности. В семени быков количество морфологических изменений живчиков было меньше количества подвижных (в среднем 39,5% подвижных и 41,6% не поврежденных).

Smorąg Z. — An attempt of assessing of morphological changes occurring in the frozen semen of a bull and ram.

The investigations were performed to reveal the changes occurring within the sperm heads under the influence of freezing. Thirty four ejaculates from 3 bulls and thirty nine ejaculates from 5 rams were examined. Smears of semen incubated in 10% nigrosine solution, as recommended by Buttle (1965), were evaluated under the oil immersion objective of a light microscope (2000—2500×). Samples of freshly collected semen were determined and after equilibration these

same samples were frozen with and without the addition of a diluent and then reevaluated. The examinations revealed spermatozoa with a bright aureole around the anterior part of the sperm head (classified as intact), and spermatozoa with aureole missing (as impaired one). In frozen semen of the bull and ram the number of impaired spermatozoa was remarkably increased in comparison to freshly collected and equilibrated semen. On the other hand, spermatozoa in frozen semen without the addition of the diluent were all impaired. The exploratory studies indicated that in frozen semens of rams the number of impaired spermatozoa was higher than that of the motile ones (41.4% of motile and 25.4% of intact spermatozoa on the average). A great variability in the number of impaired spermatozoa was found out in ejaculates of equal motility. The incidence of morphologically changed spermatozoa in bovine semen, however, was lower than the number of motile sperm cells (39.5% of motile and 41.6% of intact spermatozoa on the average).

PUGH G. W., HUGHES D. E.: Zakaźne zapalenie rogówek i spojówek bydła uzyskane różnymi metodami eksperymentalnymi. (Infectious bovine keratoconjunctivitis induced by different experimental methods). *Cornell Vet.*, 56, 23—45, 1971 (1).

Autorzy przedstawili wyniki badań nad etiopatogenezą zakaźnego zapalenia rogówek i spojówek u bydła. Część badanych krów zakażono do worka spojówkowego *Moraxella bovis* (szczyepy gładkie hemolityczne, szorstkie hemolityczne, niehemolityczne), pozostałe sztuki zakażono dospojówkowo wydzieliną z worka spojówkowego krów chorych względnie dwoinkami hemolitycznymi. U części krów wprowadzono do worka spojówkowego jednocześnie *M. bovis* i wirus IBR. U krów zakażonych szczepami hemolitycznymi *M. bovis* oraz u sztuk zakażonych *M. bovis* i wirusem IBR wystąpiły objawy zapalenia. W drugiej serii doświadczzeń w których wkraplano do worka spojówkowego zawiesinę *M. bovis* z chlorkiem magnezu lub wyciek z worka spojówkowego od krów chorych, objawy chorobowe wystąpiły jedynie po podaniu *M. bovis* w zawieszynie z chlorkiem magnezu. Autorzy uważają, że *M. bovis* odgrywa zasadniczą rolę w etiologii zakaźnego zapalenia rogówek i spojówek. Rodzaj inokulum użytego do zakażenia wywiera istotny wpływ zarówno na okres inkubacji jak i na charakter zmian chorobowych.

Z.

CHODURII K. V. R., DERBYSHIRE J. B.: Badania porównawcze ciepłostalą rozpuszczalną w wodzie frakcji i materiału strącalnego kwasem otrzymanego z hodowli *Vibrio fetus*. (A comparative study of the heat stable, water-soluble fraction and the acid precipitable material of *Vibrio fetus* cultures). *Cornell Vet.*, 61, 1—12, 1971 (1).

Z pięciu szczepów *Vibrio fetus* uzyskano frakcję strącalną kwasem (APM), frakcję ciepłostalą (HS) frakcję rozpuszczalną w wodzie i frakcję nukleoproteinową (NP). Wszystkie frakcje zawierały w swoim składzie białka, węglowodany i DNA. Frakcje rozpuszczalne pochodzące z różnych szczepów różniły się zawartością węglowodanów. Nie stwierdzono istnienia zależności pomiędzy zawartością węglowodanów w różnych frakcjach tego samego szczepu. W odczynie wiązania dopełniacza i w odczynie immunoelektroforezy z użyciem surowic niewyadsorbowanych uzyskano reakcje krzyżowe ze wszystkim frakcjami. Obecność wspólnego antygenu w badanych frakcjach antygenowych potwierdzono odczynem Castellaniego. Wyniki badań chemicznych i serologicznych wskazują, że frakcja strącalna kwasem i frakcja ciepłostalą są złożoną mieszaniną nieoczyszczonych antygenów *Vibrio fetus*.

Z.