

ANDRZEJ ŁYCZYŃSKI

Zamrażanie nasienia knurów w rozcieńczalnikach gliko-żółtkowo-glicerolowych

Instytut Hodowli i Technologii Produkcji Zwierzęcej WSR w Poznaniu
Dyrektor: prof. dr J. ZWOLIŃSKI

Badania nad zamrażaniem nasienia knurów prowadzone są od 1955 roku (7). Dotychczasowe wyniki nie są uwieńczone pełnym sukcesem (2). Wydaje się, że jedną z przyczyn jest zbyt mała ilość prac badawczych poświęcona temu zagadnieniu. Ostatnie prace Polge'a i wsp. (6) rzucają nowe światło na problem długotrwałej konserwacji nasienia knurów. Przy stosowaniu nasienia mrożonego w inseminacji chirurgicznej do jajowodów, 83,5% wszystkich badanych komórek jajowych było zapłodnionych. Z 9 loszek ubitych w 3—4 tygodnie po chirurgicznej inseminacji do jajowodów, 66,7% było zapłodnionych, ze średnią ilością 7,5 embrionów na loszkę. Podobny poziom zapłodnień i wielkość miotu był obserwowany u loszek inseminowanych świeżym nasieniem. W następnym doświadczeniu Polge i wsp. (6) unasiemili w ten sam sposób 11 loszek, z czego tylko jedna powtórzyła ruję po 3 tygodniach, a inne były zapłodnione, czyli procent zapłodnień był nawet wyższy niż w poprzednim doświadczeniu. Wyniki tej pracy mogą być zachętą do podejmowania dalszych badań nad mrożeniem nasienia knurów, mając na uwadze aspekt praktycznego zastosowania tej metody. Z dostępnej literatury wnioskować można o sprzecznościach w poglądach na temat pobierania, mrożenia i rozmrażania nasienia knurów (2).

Postanowiono więc przeprowadzić doświadczenia, których celem było porównanie wpływu 25 kombinacji rozcieńczalników na ruchliwość plemników po rozmrożeniu przy równoczesnym ustaleniu optymalnego czasu i temperatury ekwilibracji, czasu i temperatury rozmrażania.

Materiał i metody

Do doświadczenia użyto 31 ejakulatów 8 knurów rasy wba w okresie od sierpnia 1970 do kwietnia 1971 roku. Nasienie pobierano „na rękę” metodą McKenziego (3), zmodyfikowaną przez Nishikawa (cyt. za 9) (ryc. 1).

Do badań użyto tylko bogatej w plemniki frakcji nasienia. Ustalono 25 kombinacji rozcieńczalników, w skład których wchodziła glikoza od 1% do 5% w skokach co 1% i glicerol od 2% do 10% w skokach co 2%. Jako substancję chroniącą plemniki przed udarem chłodowym we wszystkich kombinacjach stosowano żółtko jaja kurzego w ilości 30 ml na 100 ml rozcieńczalnika. Do nasienia jako czynnik bakteriostatyczny dodawano tetracyklinę w ilości 5 000 j.m na 100 ml rozcieńczalnika. Po ocenie makro- i mikroskopowej nasienie rozrzedzano wstępnie w stosunku 1:1 (w temperaturze około 30°C) bez glicerolu. Następnie schładzano je do temperatury około 12°C przez okres 2—2,5 godzin. Rozrzedzania ostatecznego dokonywano w lodówce (ostateczne w stosunku 1:6 do 1:7) stosując rozrzedzalniki zawierające podane wy-



Ryc. 1. Pobieranie nasienia od knura metodą „na rękę”.
fot. A. Rut

żej ilości glicerolu. Nasienie z glicerolem ekwilibrowano przez okres 0,5—1 godziny w temperaturze 5°C. Zamrażania dokonywano na płytach zestalonego CO₂ nakraplając wyjąłowionymi pipetami po 0,13 ml rozrzedzonego nasienia, zgodnie z metodą Nagase i Niwa (4). Po upływie około 5 minut nasienie rozmrażano w izotonicznym roztworze NaCl w stosunku wagowym granul zamrożonego nasienia i rozcieńczalnika 1:3 w temperaturze 40°—50°C przez okres 15—30 sekund. Rozmrożone nasienie oceniano pod mikroskopem (przy około 35°C), określając odsetek plemników o ruchu postępowym. W celu zwiększenia efektywności obserwacji i polepszenia przeżywalności plemników wprowadzono wirowanie rozcieńczalników przy 2,5—3 tys. obrotów na minutę przez 15 minut. Do rozrzedzania wstępnego stosowano supernatant bez dodatku glicerolu.

Wyniki

Średnie procenty ruchliwości nasienia knurów po rozmrożeniu przedstawione są w 6 powtórzeniach każdego z rozcieńczalników (tab. 1). Początkowo stosowano 4—6 godzinny okres ekwilibracji w temperaturze 5°C. W dalszych badaniach okazało się, że krótszy okres ekwilibracji z dwustopniowym rozrzedzaniem pozwolił na uzyskanie lepszych wyników co do ruchliwości nasienia po rozmrożeniu. Również wyższa temperatura rozmrażania okazała się lepsza. Jako rozcieńczalnika przy rozmrażaniu

nasienia używano izotonicznych roztworów soli kuchennej, glikozy i laktozy, oraz supernatantu z odwirowanego nasienia knura. Przy wszystkich używanych do rozmrażania roztworach ruchliwość plemników była zbliżona, dlatego w dalszych badaniach stosowano izotoniczny roztwór soli kuchennej.

Tab. 1. Ruchliwość nasienia knurów po rozmrożeniu w 25 kombinacjach rozcieńczalników

		Poziom glicerolu w rozcieńczalnikach				
		2%	4%	6%	8%	10%
Poziom glikozy w rozcieńczalnikach	1%	0*	0	0	0	0
		0**	0	0	0	0
		0***	0	0	0	0
	2%	16,27	2,17	1,50	0,67	0,17
		23,71	6,41	4,86	2,71	0,95
		10—30	0—8	0—5	0—2	0—1
	3%	30,83	11,67	6,17	0,50	1,50
		33,59	17,27	12,73	2,31	4,86
		20—40	1—30	0—10	0—1	0—5
	4%	31,67	13,67	7,33	2,50	0,34
		33,90	20,40	13,29	7,82	1,37
		15—40	2—25	0—15	0—5	0—2
	5%	19,17	20,83	8,50	7,83	8,33
		24,68	26,30	13,90	14,80	15,17
		5—35	5—30	0—30	0—15	0—15

* Średnie doświadczalne przedstawiające ruch plemników po rozmrożeniu (w %).

** Średnie przekształcone przedstawiające ruch plemników (w stopniach).

*** Obserwowano ruchliwość w granicach (w %).

Omówienie wyników

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wnioskować można, że optymalna koncentracja glicerolu przy zamrażaniu nasienia knurów w kulkach winna wynosić od 2—3%, przy zawartości glikozy 2—4% i stałym poziomie żółtka jaja kurzego 30 ml na 100 ml rozcieńczalnika. Tym samym badania własne autora potwierdziły dotychczasowe wyniki prac Polge'a (5), Serdjuka (8) i innych, glicerol jest bardziej toksyczny dla nasienia knura aniżeli buhaja i tryka. Podkreślić należy, że dotychczas jedynie tylko Serdjuk (8) z wielu badaczy podaje jako optymalną koncentrację glicerolu przy zamrażaniu nasienia knura 2—3%. Polge i wsp. (6) stosowali 4,5 ml glicerolu przy równoczesnej zawartości 5,6 g glikozy i 22,5 ml żółtka jaja kurzego. Inni autorzy, jak Polge, Settergren, Hess i wsp., Hoffman, Baier, King (cyt. za 2, 8, 10) stosowali 6—10% glicerolu, a Roy (7) nawet 20%. Długość okresu schładzania nasienia i ekwilibracji łącznie powinna wynosić 2,5—3,5 godzin. Polge i wsp. (6) stosowali jednostopniowe rozrzedzanie nasienia przeprowadzając ekwilibrację w 5°C przez okres 2,5 godzin i otrzymywali 30—40% plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu. Iida i Adachi (1) przeprowadzając badania nad wpływem długości okresu ekwilibracji na ruchli-

wość plemników po rozmrożeniu stwierdzili, że przedłużanie okresu ekwilibracji obniżało procent ruchliwych plemników utrzymywanych przy 5°C, jak również po zamrożeniu przy -79°C. W badaniach własnych nasienie rozmrażano w temperaturze 40°—50°C, uzyskując dobre wyniki co do ruchliwości plemników. Inni autorzy podają niższe temperatury, Polge i wsp. (6) 37°C, natomiast Serdjuk (8) stosował 60°—65°C, nie dopuszczając do przegrzania nasienia.

Wnioski

1. Nasienie zamrażane w rozcieńczalniku glikozo-żółtkowo-glicerolowym wykazywało po rozmrożeniu ruchliwość 20—40% plemników.

2. Optymalna koncentracja glicerolu w rozcieńczalnikach była 2—3%, przy zawartości glikozy 2—4% i żółtka jaja kurzego 30 ml.

3. Czas schładzania i ekwilibracji nasienia od 2,5 do 3,5 godzin (w temperaturze do 5°C) jest właściwy i wystarczający dla osiągnięcia wysokiej ruchliwości plemników po rozmrożeniu.

4. Rozmrażanie nasienia w roztworze izotonicznym NaCl o temperaturze 40°—50°C przez 15—30 sekund pozwoliło na powrót ruchliwości plemników.

Piśmiennictwo

- Iida I., Adachi T.: Jap. J. zootech. Sci. 37, 411, 1966.
- Łyczynski A.: Prz. hod., 3, 15, 1971.
- McKenzie F. F.: J. Am. vet. med. Ass. 31, 244, 1931.
- Nagase H., Niwa T.: Vth Inter. Congr. Anim. Reprod. A. I. Trento, 4, 410, 1964.
- Polge C.: Annls. Zootech. 8, 113, 1959.
- Polge C., Salamon S., Wilmut I.: Vet. Rec. 87, 424, 1970.
- Roy A.: Vet. Rec. 67, 330, 1955.
- Serdjuk S. I.: Iskusstvennoe Osemenenie Śvinej. Izdatel'stvo Kolos, 1970.
- Wierzchoś E.: Medycyna Wet. 24, 109, 1968.
- Wierzchoś E., Kareta W., Pilch J.: Opracowanie Problemove. CBR. Warszawa, 1969.

Adres autora: Andrzej Łyczynski, Poznań, ul. Palacza 18, Hotel Asystencki.

Лычинский А. — Замораживание семени хряков в глицеро-желточно-глицероловым разбавителе спермы.

Исследования провели на 31 эякулятах 8 хряков великой белой английской породы. Семя брали „на руку” а до исследований отбирали только содержащую много живчиков. Сравнивали влияние на живучесть сперматозоидов 25 комбинаций разбавителей. Разбавители содержали 1—2—3—4 и 5% глицерозы, 2—4—6—8—10% глицерола и по 30 мл яичного желтка. Разбавители центрофугировали 2,5—3,0 тыс. об./мин. — 15 мин. Применяли разбавление: I — 1:1 и II — 1:6—7. Семя сначала охлаждали до 12° без глицерола в течение 2,0—2,5 часов. Эквilibрацию проводили в 5° в течение 0,5—1,0 часа. Семя замораживали в форме шариков. Самую высокую подвижность живчиков (20—40%) получали применяя разбавитель содержащий 2—3% глицерола 2—4% глицероза и 30 мл яичного желтка, на 100 мл жидкости.

Lyczyński A. — The freezing of boar semen in egg-yolk glucose glycerol diluents.

The investigations have been performed with 31 ejaculates derived from 8 boars, big-white English breed. Semen was taken „on the hand” and the examinations were done only with the semen fractions rich in spermatozoa. There was compared the influence of 25 combinations of the diluents on the motility of spermatozoa after thawing. The diluents contained glucose from 1 to 5% (a concentration increased

every 1%), glycerol from 2—10% (a concentration increased every 2%) and 30 ml of yolk egg. The diluents were centrifugated at 2500—3000 rpm for 15 min. The semen was diluted 1:1 (I) or 1:6—1:7 (II) and then frozen up to 12°C for 2—2.5 hrs without glycerol. Equilibration was done at 5°C within 30—60 min. The semen was frozen in the form of balls. The highest motility (20—40%) of semen was noted in the diluent containing glycerol 2—3%, glucose 2—4% and 30 ml of yolk egg per 100 ml of the diluent.

FIZJOLOGIA I FIZJOPATOLOGIA

MARIAN GRUNDBOECK, KRYSZYNA WILCZYŃSKA-CIEMIĘGA, TERESA WOJTOŃ

Prawidłowe wartości białych krwinek i limfocytów u krów rasy ncb z uwzględnieniem wieku zwierząt, różnych regionów kraju oraz pór roku

Pracownia Patologii Komórkowej, Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: doc. dr M. GRUNDBOECK

Wczesne rozpoznawanie białaczki bydła opiera się głównie na badaniu hematologicznym. Zwłaszcza liczba białych krwinek i liczba limfocytów w 1 mm³ krwi oraz procent limfocytów mają tutaj największe znaczenie. Poziom wymienionych krwinek wykazuje pewien zakres fizjologicznych wahań, o czym należy pamiętać przy stwierdzaniu patologicznej leukocytozy względnie limfocytozy bezwzględnej lub względnej. Dlatego tak ważną rzeczą jest opracowanie norm hematologicznych. Rezolucja podjęta na XXXV Konferencji Komitetu OIE w 1967 r. zaleca wszystkim państwom opracowanie takich norm dla poszczególnych ras bydła z uwzględnieniem wieku zwierząt i różnych regionów geograficznych.

Literatura światowa dotycząca parametrów hematologicznych u bydła jest obfita. Również w Polsce podejmowane były badania w tym kierunku między innymi przez Krzymowskiego (4, 5) i Stankiewicza i wsp. (12), jednakże w badaniach tych nie uwzględniono zmian w leukogramie zachodzących z wiekiem u dorosłego bydła. Szereg innych polskich naukow-

ców przy opracowywaniu szczegółowych zagadnień fizjologicznych względnie patologicznych oznaczało również prawidłowe wartości białych krwinek u bydła; jednakże dane te mają najczęściej charakter fragmentaryczny i wykazują ograniczoną przydatność do ogólniejszych stwierdzeń.

Jak wynika z piśmiennictwa na poziom białych krwinek i ich skład procentowy wpływa rasa bydła, warunki środowiskowe i wiek zwierząt. (tab. 1—3). Nadto tab. 4 wskazuje, że nie bez znaczenia jest również pora roku. Dlatego podejmując badania własne postawiono sobie za cel oznaczenie prawidłowych wartości białych krwinek oraz limfocytów u bydła w różnych regionach kraju, z uwzględnieniem wieku zwierząt oraz pory roku.

W pierwszym etapie prac objętym niniejszym doniesieniem ograniczono się do najbardziej rozpowszechnionego w Polsce bydła nizinnego czarno-białego. W przeprowadzonych pracach nie ograniczono się do ilościowego badania białych krwinek i układu limfocytów lecz oznaczono również wartości dla granulocytów,

Tab.1. Liczba białych krwinek w 1 mm³ u bydła w różnych klasach wieku, wg piśmiennictwa

Bydło (rasa)	Państwo	Wiek zwierząt (w latach)														Poz. piśm.
		0-1		1-2		2-3		3-4		4-5		5-6		6-7		
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	
Fryzyskie	NRF	10220	2380	9360	2800	8630	1950	7690	1790	7220	1410	7290	1590	6440	1680	13
Fryzyskie	ZSRR	—	—	8030	—	7200	—	6540	—	6600	—	7170	—	7650	—	5
Rasy mleczne	Dania	9200	2050	9100	2150	8600	2050	8200	1900	—	—	7500	1350	—	—	1
Jersey	wyspa Jersey	9560	2240	8840	2110	8090	2350	7330	2370	6660	2280	6180	1890	—	—	12
Czerwono-białe	CSSR	8250	2120	8580	2150	7340	1590	7070	1520	6460	1480	6810	1840	—	—	8
Holsztyńskie	USA	—	—	11000	3200	11400	2100	9350	2000	8150	2000	—	—	7900	1700	10
Holsztyńskie	Francja	9200	—	8420	—	7400	—	6830	—	5770	—	5330	—	5450	—	2
Charolais	Francja	12600	—	12250	—	9920	—	9600	—	9500	—	9200	—	8700	—	2