

LUCJAN SŁAWETA
Warszawa

Wpływ dodatku glutationu zredukowanego i cysteiny do nasienia mrożonego na jego zdolność zapładniającą

W piśmiennictwie poświęconym białkowym grupom czynnym, dużą uwagę zwraca się obecnie na rolę grup tiolowych, katalizujących procesy enzymatyczne.

Zachęcające wyniki prac laboratoryjnych, które wykazały, że grupy SH zawarte w glutationie zredukowanym nie tracą swojej aktywności po dłuższym przechowywaniu w ciekłym azocie, ukierunkowały dalszy tok postępowania. Zdecydowano się na konserwowanie nasienia buhajów w ciekłym azocie dodając do rozrzedzalnika czynne grupy SH. Początkowo na skalę laboratoryjną, a następnie już w produkcji terenowej w jednym z zakładów unasienniania.

Materiał i metody

Nasienie od 11 buhajów konserwowane w stanie płynnym, oraz przechowywane w ciekłym azocie z dodatkiem do rozrzedzalnika czynnych grup tiolowych, wysyłane od stycznia do grudnia 1970 roku na punkty unasienniania położone na terenie powiatów Rawicz i Leszno, w rejonie działania Państwowego Zakładu Unasienniania Zwierząt w Lesznie, województwo poznańskie.

Do badań użyto nasienie, które na podstawie obowiązujących kryteriów uznano za przydatne do unasienniania.

Każdy ejakulat po ocenie, rozcieńczany był indywidualnie w oparciu o specjalnie ułożone tabele, inne dla nasienia konserwowanego w stanie płynnym, inne w ciekłym azocie. Nasienie konserwowane w stanie płynnym rozcieńczono rozrzedzalnikiem mlekowo-żółtkowym z dodatkiem streptomycyny, w takiej proporcji aby każda dawka nasienia posiadała standard biologiczny na poziomie 40×10^6 plemników o ruchu postępowym. Nasienie od tych samych buhajów konserwowane w ciekłym azocie (metodą japońską) rozcieńczano rozrzedzalnikiem cytrynianowo-fruktozowo-żółtkowym z dodatkiem streptomycyny i glicerolu. Do 100 ml tego rozrzedzalnika dawano 0,02 g glutationu zredukowanego i 0,02 g cysteiny. Rozcieńczenie wykonywano w takiej proporcji, aby w każdej kulce (jednej porcji) po rozmrożeniu znajdowało się około 30×10^6 plemników o ruchu postępowym.

Rozrzedzalnik przygotowywano na mieszadle elektromagnetycznym typ ATP z podgrzewaczem. Glutation zredukowany i cysteinę rozpuszczano w roztworze cytrynianu z fruktozą, przed dodaniem żółtka jaj kurzych. Glicerol dodawano po podgrzaniu go do 55°.

Nasienie konserwowane w ciekłym azocie wysyłano do 12 punktów unasienniania (10 na terenie powiatu Rawicz i 2 na terenie powiatu Leszno), które w badanym okresie wykonały 6415 pierwszych zabiegów unasienniania. Nasienie konserwowane w stanie płynnym wysyłano do 26 punktów unasienniania (10 na terenie powiatu Rawicz i 16 na terenie powiatu Leszno), które w tym samym okresie unasienniały po raz pierwszy 8415 sztuk.

Inseminatorzy, którzy otrzymywali nasienie mrożone z dodatkiem grup SH, rozmrażali kulki w 1 ml płynu fizjologicznego o temperaturze 55°, na punkcie unasienniania. Rozmrożone dawki umieszczały w pudełkach plastikowych, które wkładali do we-

wnętrznej kieszeni marynarki i wyjeżdżali w teren do wykonywania zabiegów unasienniania. Tak przechowywane (w temperaturze około 32°) rozmrożone nasienie zachowywało swoją zdolność zapładniającą przez czas około 8 godzin. Inseminatorom tym zalecono wykonywanie zabiegów unasienniania nie wcześniej niż około 1 godziny po rozmrożeniu. Płyn fizjologiczny do rozmrażania kulek wymieniano na punktach unasienniania jeden raz w tygodniu.

Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawione są w tab. 1.

Tab. 1. Wskaźniki niepowtarzalności po 60 dniach, po unasiennianiu nasieniem mrożonym z dodatkiem grup SH i po nasieniu płynnym.

Nazwa buhaja i nr licencji	Nasienie mrożone			Nasienie płynne		
	liczba zabiegów	liczba krow niepowlarajacych	%	liczba zabiegów	liczba krow niepowlarajacych	%
Blakir 209 G	670	499	74,5	527	393	74,6
Boch 1022 G	596	489	82,0	2160	1737	80,0
Bohater 548 G	277	213	77,0	1812	1423	78,5
Czerdon 191 G	155	125	80,6	1213	972	79,2
Glewant 616 G	602	466	77,4	275	219	79,3
Gordon 188 G	297	215	72,4	1057	715	67,6
Gromadzki 196 G	223	179	80,0	129	100	77,5
Johan 64 G	1302	946	72,6	381	277	72,7
Salon 982 G	1320	1025	77,6	578	433	75,0
Torredor 190 G	949	699	73,5	76	53	70,0
Wersal 596 G	24	20	83,8	206	164	79,6
Razem	6415	4876	76,0	8415	6426	76,4

Z tab. 1 wynika, że wskaźnik niepowtarzalności po unasiennianiu nasieniem płynnym, był wyższy o 0,4% niż po nasieniu mrożonym. Liczba zabiegów wykonanych nasieniem płynnym była o 2000 większa niż nasieniem mrożonym. Wynikało to z terenowego układu punktów unasienniania, oraz ze stopniowego przechodzenia punktów unasienniania z nasienia płynnego na mrożone. Pierwsze punkty pracujące nasieniem mrożonym zostały uruchomione w styczniu, ostatnie w czerwcu 1970 r. Z liczby 11 buhajów od których wysyłano nasienie, 10 było rasy ncb, a 1 (Wersal 596 G) rasy mięsnej charolaise.

Dyskusja

Trudności w szerokim zastosowaniu w Polsce nasienia mrożonego wynikają z dwóch zasadniczych powodów:

1. brak kontenerów produkcji krajowej,
2. trudny do rozwiązania, zwłaszcza na punktach unasienniających krowy w gospodarstwach indywidualnych, transport nasienia mrożonego w teren pracy inseminatora.

Przedstawione zmiany w składzie rozrzedzalnika do rozcieńczania nasienia konserwowanego w ciekłym azocie, to jest dodatek ciał z aktyw-

na grupą SH, rozwiązują w zupełności trudności wynikające z pkt 2. Inseminatorzy, którzy wykonywali zabiegi unasienniania nasieniem mrożonym, dojeżdżali do zgłoszonych krów i jałowic będących w rui, każdym środkiem lokomocji. Samochodami, motocyklami, motorowcami i rowerami. Sam fakt, że kontener z ciekłym azotem pozostawał wyłącznie na punkcie unasienniania, a rozmrożone nasienie przewożone było przez kilka godzin w pudełkach plastikowych w temperaturze około 32°C, jest już bardzo dużym udogodnieniem w pracy inseminatora.

Wskaźnik niepowtarzalności sztuk unasienniania nasieniem mrożonym w stosunku do wskaźnika nasienia płynnego, jest bardzo zachęcający do szerokiego zastosowania rozrzedzalnika z dodatkiem grup tiolowych.

Dodatkowe koszty jakie poniósł Zakład z tego tytułu były znikome. 1 g glutationu zredukowanego produkcji firmy angielskiej BDH Biochemical, oraz 1 g cysteiny produkcji firmy węgierskiej Reanal-Budapest, które zastosowano do rozrzedzalnika, wyniosły łącznie około 500 zł. Wyprodukowano w tym okresie około 20.000 jednoporcjowych kulek nasienia buhajów. Wykorzystanie tego nasienia na punktach unasienniania było bardzo dobre — średnio około 95%.

Należy również dodać, że kilka tysięcy cieląt urodzonych od krów unasiennianych nasieniem mrożonym z dodatkiem grup SH, wykazywało bardzo dobrą żywotność bezpośrednio po urodzeniu, jak również prawidłowy dalszy rozwój. Można więc przypuszczać, że grupy tiolowe wpływając dodatnio na przebieg procesów enzymatycznych w plemnikach, nie naruszają ich struktury DNA.

Należy dodać, że cysteina jako aminokwas z grupy siarkowej, ulega powolnemu samoutlenianiu i przechodzeniu w cystynę, w której mostek dwusiarczkowy S-S hamuje procesy oksy-redukcyjne.

Proponowany rozrzedzalnik, oraz tabele rozcieńczeń, zostały w dniu 8 października 1970 r. zgłoszone do Oddziału SITR w Lesznie, jako pracowniczy wniosek wynalazczy.

Wnioski

1. Dodatek aktywnych grup SH do rozrzedzalnika przy konserwowaniu nasienia buhajów w ciekłym azocie, nie wpływa ujemnie na zdolność zapładniającą plemników.

2. Transport w temperaturze około 32°C rozmrożonego nasienia jest dla inseminatorów bardzo wygodny i gwarantuje wysoką skuteczność zabiegów unasienniania.

3. Cielęta urodzone po unasiennianiu nasieniem mrożonym z dodatkiem grup SH, wykazują dużą żywotność i prawidłowy rozwój.

Adres autora: dr Lucjan Ślaweta, Warszawa 21, ul. Dickensa 19 m 39.

Славѣта Л. — Влияние прибавления к семени редуцированного глутатиона и цистеина на его оплодотворительные свойства.

Семя 11 быков консервировали по японскому методу в жидком азоте, придавляя к цитратфруктозо-желточному разбавителю кроме глицерола и стрептомицина. 0,02 г редуцированного глутатиона и 0,02 г цистеина на 100 мл разбавителя. Этом прием позволил растворенное в инсеминационном пункте семя перевозить в температуре ок. 32° и применять ок. 8 часов.

Приготовленным таким способом семенем провели инсеминацию 6415 коров и телок. Положительный результат через 60 дней установили в 76%. У 8415 контрольных коров и телок инсеминированных жидким семенем от этих же быков и в том же периоде оплодотворение через 60 дней установили в 76,4%.

Ślaweta L. — The influence of the addition of reduced glutathione and cysteine to the frozen semen on its fertilizing properties.

The semen taken from 11 bulls was conserved in liquid nitrogen acc. to Japanese method in yolk egg-fructose-citric acid solution without glycerol and streptomycin, but with the addition of 0,02 g of reduced glutathione and 0,02 g of cysteine per 100 ml. The conserved semen diluted at insemination centers could be transported at 32°C and used for insemination within 8 hrs. There were carried out 6415 inseminations by means of such prepared semen and obtained 76.0% NR after 60 days. For control 8415 cows and heifers were inseminated with the semen of the same bulls and the percentage of NR after 60 days was 76.4%.

HECK F. C., SHELDON W. G., GLEISER C. A.: Patogeneza doświadczalnego zakażenia myszy adenowirusem myszy. (Pathogenesis of experimentally produced mouse adenovirus infection in mice). Am. J. vet. Res., 33, 841—846, 1972 (4).

Dziewięciodniowe myszki zakażono dootrzewnowo 20000LD 50 lub 100 LD 50 adenowirusem myszek, szczep FL. Codziennie przez okres tygodnia poddawano ubojowi po 3 myszki, pobierano krew i oznaczano LD 50 wirusa. Ponadto część krwi posiewano na jednowarstwową hodowlę komórek nerki myszek, określano miano przeciwciał wiążących dopełniacz oraz przeprowadzono badania histopatologiczne mózgu, nerek, serca, płuc, grasicy, wątroby i śledziony. Po zakażeniu myszek zarówno dużą jak i małą dawką wirusa obserwowano nastroszenie sierści, senność, zahamowanie wzrostu. Niezależnie od wielkości dawki zakaźnej występowała 1 dnia po zakażeniu wiremia. Wiremia utrzymywała się przez okres 6 dni. Wirus wykrywano w sercu, nerkach, wątrobie, śledzionie i mózgu zakażonych sztuk 3—5 dnia po zakażeniu. Począwszy od 3 dnia po zakażeniu w jądrach komórek śródbłonka kłębuszków nerkowych, a od 4 dnia w jądrach komórek innych narządów pojawiły się ciała wtretowe typu A. Liczne ciała wtretowe występowały w jądrach komórek śródbłonka naczyń krwionośnych mózgu, w mikrogliach i małych neuronach kory mózgowej. W komórkach Purkiniego mózdzku pojawiły się duże bazofilne wtretę począwszy od 4 dnia po zakażeniu. Dwunastego dnia po zakażeniu wykryto w surowicy zakażonych myszek swoiste przeciwciała wiążące dopełniacz.

Z.