

PRZYDATNOŚĆ METODY FLUORESCENCYJNEJ DO OCENY NASIENIA MROŻONEGO ZWIERZĄT GOSPODARSKICH

Marian Tischner

Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt WSR w Krakowie
Kierownik: prof. dr Władysław Bielański

Nagromadzone wiadomości o właściwościach nasienia sprawiają, że stosowane powszechnie dotychczasowe metody badania nasienia stają się niewystarczające. Szybka i obiektywna metoda badania nasienia jest szczególnie potrzebna dla oceny biologicznych właściwości plemników, które przechodzą proces konserwacji w niskich temperaturach.

Zastosowana po raz pierwszy przez Struggera i Rosenbergera [9] metoda obserwacji plemników przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego znajduje obecnie coraz większe zastosowanie. Dotychczas metodę tę stosowano między innymi dla różnicowania żywych i martwych plemników [2, 6, 11], w badaniach morfologicznych akrosomów plemników ssaków [1], w obserwacjach nad procesem kapacytacji plemników [3] oraz w badaniach plemników w płynach nieprzezroczystych [8].

Metoda ta opiera się na wzajemnym powinowactwie fluorochromów do plemników, które poddane działaniu promieni ultrafioletowych wykazują własną polichromatyczną fluorescencję. Obecnie wyodrębniono ok. 15 rodzajów fluorochromów wykazujących w różnym stopniu powinowactwo do plemników. Najczęściej z nich stosowane są: primulina, oranż akrydyny i tetracyklina. Ponieważ tetracyklina daje zadowalającą fluorescencję plemników [4] oraz stanowi łatwo dostępny środek, została również zastosowana w naszych badaniach.

MATERIAŁ I METODYKA

Badania przeprowadzono na nasieniu pochodzącym od 3 buhajów, 9 tryków i 1 knura, od których pobrano po 4 ejakulatory. Każdy pobrany ejakulat dzielono na 3 części, z których każdą przed wykonaniem preparatów mikroskopowych poddawano innym zabiegom. Pierwszą część ejakulatu zaraz po pobraniu schładzano stopniowo do temperatury $+4^{\circ}\text{C}$ i przewożono do laboratorium w termosie z lodem, gdzie po okresie 2-4

godz. od chwili pobrania przeprowadzano badania przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Drugą część ejakulatu zaraz po pobraniu zanurzano w termosie z ciekłym azotem. Część trzecią ejakulatu rozrzedzano w rozrzedzalnikach z dodatkiem glicerolu i zamrażano w ciekłym azocie według metod ogólnie przyjętych dla nasienia danego gatunku. Nasienie w szklanych probówkach przechowywano w ciekłym azocie przez okres od kilku godzin do kilku tygodni. Rozmrażanie nasienia przeprowadzano przez zanurzenie ampulek z nasieniem w łaźni wodnej o temperaturze $+40^{\circ}\text{C}$.

Jako fluorochromu używano tetracyklinę produkowaną przez Polskie Zakłady Przemysłu Farmaceutycznego, którą w ilości 50 mg rozpuszczano w 16 ml płynu Tyroda o pH 6,8. Preparaty mikroskopowe przygotowywano według metody podanej przez Ericssona i Bakera [4] oraz w końcowym etapie badań w sposób uproszczony. W tym celu na podgrzane szkiełko podstawowe umieszczono 2-3 krople fluorochromu oraz niewielką ilość nasienia. Przy pomocy szklanej bagietki w ciągu kilkadziesiąt sekund nasienie dokładnie mieszano z fluorochromem, a następnie wykonywano rozmaz wysuszając go ostrożnie nad płomieniem palnika. Gotowe preparaty oglądano pod mikroskopem typ MŁ 2 przy użyciu filtru oznaczonego CC 15 (2 mm).

Z każdej części ejakulatu wykonywano po dwa rozmazy nasienia, na których przeprowadzano ocenę nie mniej niż po 100 plemników. W ocenie mikroskopowej uwzględniano intensywność i typy fluorescencji poszczególnych elementów plemnika oraz zmiany akrosomów plemników.

WYNIKI

Plemniki w mikroskopie fluorescencyjnym świeciły jasno, żółtym kolorem, wyraźnie kontrastując z niebieskim tłem. Intensywność fluorescencji poszczególnych elementów morfologicznych plemników wykazywała dużą różnorodność. Ze względu na typ fluorescencji niektórych elementów plemnika podzielono je na 4 grupy. Do grupy pierwszej zaliczono plemniki, które słabo fluoryzowały. Drugi typ fluorescencji obejmował wstawkę i część basalną główki plemnika. Do grupy trzeciej zaliczano plemniki, u których wyraźna fluorescencja obejmowała witkę oraz akrosom. Grupę czwartą stanowiły plemniki, u których intensywna fluorescencja obejmowała cały plemnik.

W obrazie fluorescencyjnym plemników szczególnie wyraźnie odznaczały się akrosomy, zwłaszcza w tych wypadkach, gdy ta część plemnika została uszkodzona. Ze względu na rodzaj uszkodzenia akrosomów można było podzielić plemniki na dwie grupy. Pierwszą stanowiły plemniki wykazujące obrzmienie szczytowej części, które często można było obserwować jako przejrzysty „welon”, układający się powyżej przed-

niej krawędzi główki plemnika. Drugą grupę stanowiły plemniki wykazujące różny stopień deformacji akrosomu łącznie z jego całkowitą lub częściową utratą.

Tabela

Rodzaje fluorescencji nasienia badanych zwierząt

Rodzaj fluorescencji plemników	Nasienie świeże			Nasienie zamrażane					
	(kontrola)			bez dodatku glicerolu			z dodatkiem glicerolu		
	buhaj	tryk	knur	buhaj	tryk	knur	buhaj	tryk	knur
Brak fluorescencji plemników	39	42	33	4	5	2	38	16	1
Fluorescencja wstawki i podstawy główki	6	40	27	—	—	—	—	16	—
Fluorescencja witki i akrosomu	—	2	4	30	—	—	4	40	—
Fluorescencja całego plemnika	55	16	36	66	95	98	58	28	99
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
W tym deformacje akrosomu	3%	5%	11%	42%	48%	95%	18%	70%	97%

Procentowy udział badanych plemników zaliczanych do poszczególnych typów fluorescencyjnych, w tym ilość plemników wykazujących deformację akrosomów, zestawiono w tabeli. Obserwowane różnice we fluorescencji plemników najwyraźniej zaznaczyły się pomiędzy nasieniem nie zamrażanym a nasieniem zanurzonym w ciekłym azocie bez dodatku glicerolu. W nasieniu nie zamrażanym ok. 40% plemników wykazywało słabą fluorescencję, a ilość plemników ze zmianami akrosomalnej części główki nie przekraczała 11%. Fluorescencja nasienia zamrażanego z dodatkiem glicerolu również różniła się od fluorescencji nasienia kontrolnego. Najwyraźniej różnice te zaznaczały się w nasieniu knura i tryka, a zmiany akrosomów plemników nasienia knura sięgały niekiedy do 100%.

Świeże nasienie tryka i nasienie zamrażane z dodatkiem glicerolu charakteryzowało się największą zmiennością poszczególnych typów fluorescencji. W niektórych przypadkach obserwowano plemniki charakteryzujące się tylko fluorescencją wstawki, lub główki i wstawki.

Zamrażane nasienie knura, niezależnie od dodatku glicerolu, charakteryzowało się zawsze dużą ilością plemników wykazujących zmiany akrosomu. W tych przypadkach, gdy główki plemników były pozbawione akrosomów, wykazywały żółtawą fluorescencję o odcieniu różowym. Oderwane częściowo lub całkowicie akrosomy często znajdowały się w niewielkiej odległości od uszkodzonych plemników i również fluoryzowały przejrzystym żółtawym kolorem.

Nasienie buhajów również charakteryzowało się wyraźną fluorescencją, lecz zmienność w poszczególnych typach fluorescencji morfotycznych elementów plemników i deformacje akrosomów były procentowo najniższe spośród nasienia badanych zwierząt.

DYSKUSJA

Věžnik [11] w celu zróżnicowania żywych i martwych plemników buhaja przeprowadził przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego obserwację nasienia, które barwił primuliną. Wyróżnia on również 4 typy fluorescencji plemników. To zróżnicowanie we fluorescencji przypisuje zmianom w przepuszczalności błon komórkowych plemników, które w miarę utraty zdolności życiowych i postępującego procesu zamierania plemników, stają się bardziej przepuszczalne dla drobin barwnika. Plemniki żywe barwione primuliną nie wykazywały fluorescencji lub fluoryzowały mało intensywnym kolorem niebieskim. W miarę zamierania plemników żółta fluorescencja rozpoczynała się zawsze od wstawki i okolicy centrioli, przechodząc stopniowo w obydwu kierunkach plemnika. Martwe plemniki charakteryzowały się żółtą fluorescencją obejmującą cały plemnik.

Obserwacje te, pokrywające się z wynikami naszych badań, wskazują, że mechanizm łączenia się tetracykliny z plemnikami jest podobny do mechanizmu interakcji pomiędzy plemnikami a primuliną. Istnieje jednak bliżej niewyjaśniony mechanizm utraty zdolności życiowych poszczególnych elementów komórkowych plemników, przebiegający z pewną prawidłową kolejnością. Plemniki wykazujące fluorescencję części akrosomalnej główki, lub podstawy główki, wykazywały zawsze wyraźną fluorescencję wstawki i okolicy centrioli. Natomiast nigdy nie obserwowano zjawiska odwrotnego.

Ericsson i Baker [4] w badaniach nad wiązaniem tetracykliny z plemnikami ssaków również podają, że plemniki, które utraciły zdolności życiowe, fluoryzują intensywniej w porównaniu z plemnikami żywymi.

Obserwacje nasze wskazują, że niezależnie od stopnia połączenia tetracykliny z plemnikami, z wyjątkiem główek plemników knura pozbawionych akrosomów, nie obserwowano nigdy zmian barwy plemników, jak miało to miejsce w badaniach Věžnika [11, 12].

Metoda badania plemników przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego pozwala również na przeprowadzenie dokładnej oceny morfologicznej plemników, a zwłaszcza zmian w budowie akrosomów, co ma szczególne znaczenie przy ocenie nasienia, które może ulec szokowi temperaturowemu. Onuma [7] przy użyciu mikroskopu świetlnego i specjalnej techniki barwienia plemników przeprowadził obserwację systemu akrosomowego plemników buhaja i knura poddawanego szokowi tem-

peraturowemu. Autor ten wskazuje, że odporność akrosomu na szok temperaturowy i czas konserwacji jest uzależniona od gatunku zwierząt. Plemniki knura okazały się bardziej wrażliwe na wahania temperatury i czas przechowywania w temperaturze $+5^{\circ}\text{C}$ aniżeli plemniki buhaja.

Ostatnio przeprowadzone badania Healeya [5] oraz Qinna, Whita i Clelanda [8] nad ultrastrukturą plemników poddawanych konserwacji w niskich temperaturach przy użyciu mikroskopu elektronowego, wskazują, że najmniej odporne na działanie niskich temperatur jest nasienie knura i tryka. Deformacji ulegają przede wszystkim błony komórkowe i akrosomy plemników.

Metoda oceny nasienia przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego okazała się metodą szybką i prostą. Wymaga jednak stosowania dużej ostrożności, gdyż jest metodą bardzo czułą. Różnice we fluorescencji plemników mogą być uzależnione nie tylko od biologicznych właściwości plemników i rodzaju użytego fluorochromu, ale również od koncentracji fluorochromu, jego pH i innych czynników, jakie mogą powstać w czasie przygotowywania preparatów.

Niski procent plemników żywych, zwłaszcza w próbkach nasienia kontrolnego, jaki obserwowano w naszych badaniach, był prawdopodobnie wynikiem złożonego procesu przygotowywania preparatów do badań mikroskopowych. Czynnikiem niekorzystnym, który prawdopodobnie miał wpływ na ilość plemników żywych, było schładzanie nasienia do temperatury $+4^{\circ}\text{C}$ i przechowywanie go w tej temperaturze przez okres 2-4 godz. Przeprowadzone wrywkowo badanie żywych i martwych plemników przy zastosowaniu zwykłego mikroskopu świetlnego, barwienia eozyną i nigroszyną, potwierdziło wyniki uzyskane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego, że fluorochrom wybarwia tylko plemniki zamierające i martwe.

PIŚMIENNICTWO

1. Bishop M. W. H., Smiles J.: Differentiation of the acrosome in living mammalian spermatozoa and spermatids by fluorescence microscopy. *J. Reprod. Fertil.* 6, 297, 1963.
2. Duijn C. van Inr.: Effects of rhodamine B and primuline on bull spermatozoa and their use for fluorimetric determination of live-dead ratios. *Mikr.* 19, 75, 1964.
3. Ericsson R. J.: A fluorometetric method for measurement of sperm capacitation. *Proc. of the Soc. for Exper. Biol. and Med.* 125, 1115, 1967.
4. Ericsson R. J., Baker V. F.: Binding of tetracycline to mammalian spermatozoa. *Nature* 214, 403, 1967.
5. Healey P.: Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. *J. Reprod. Fert.* 18, 21, 1969.
6. Kurilo J. G., Novikova O. N., Polivoda D. J.: Ispolzowanije lumine scentnoi mikroskopii dlja ocenki kaczestwa spermy chrjaka. *Swinowodctwo* 3, 122, 1966.
7. Onuma H.: Studies on the acrosomic system of spermatozoa of domestic animals. *Biul. of the Nation. Inst. of Anim. Industry* 3, 105, 1963.

8. Qinn P. J., White J. G., Cleland K. W.: Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing cold shock and freezing. J. Reprod. Fert. 18, 209, 1969.
9. Strugger S., Rosenberger G.: Vitalfärbung der Ziegen — Spermatozoen mit Akridinorange. Deut. tierärztl. Wschr. Rundschau 52/50, 375, 1944.
10. Van Demark N. L., Estergreen V. L., Schorr Jr. R., Kuhlman D. E.: Use of fluorescent dyes for observing bovine spermatozoa in opaque media. J. Dairy Sci. 42, 1314, 1959.
11. Věžník Z.: Použití primulinu k vitálně letálnimu barvení ve spermologii. Veterinarsvi 22, 65, 1967.
12. Věžník Z.: Fluorochromy ve spermologii. Docum. Vet. 6, 75, 1967.

М. Тишнер

ПРИГОДНОСТЬ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗАМОРОЖЕННОГО СЕМЕНИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Резюме

Исследовали семя 3 быков, 9 баранов и 1 хряка. Эякуляты разделяли на 3 части. Первую часть исследовали вскоре после получения семени; вторую часть эякулята погружали в термос с жидким азотом; третью часть разбавляли в разбавителях с добавлением глицерина и замораживали в жидком азоте по общепринятым методам для семени данного вида. Семя в жидком азоте сохраняется в течение нескольких часов до нескольких дней. Тетрациклин использовали в качестве флуорохрома. Препараты рассматривали под флуоресцентным микроскопом типа МЛ-2.

Сперматозоиды под флуоресцентным микроскопом отличались на контрастном голубом фоне своей желтой окраской. Изменения в интенсивности флуоресценции отдельных морфологических элементов сперматозоидов можно разделить на 4 группы: небольшой интенсивности флуоресценции сперматозоидов (I гр.), флуоресценции вставки и базальной части головки (II гр.), флуоресценции хвостовой части (спирали) и акросомы (III гр.) и интенсивной флуоресценции целых сперматозоидов (IV гр.). Изменения акросомов характеризовались как опухоль апикальной части головки в виде прозрачной „вуали”, а также и другими изменениями (деформациями) акросомов вместе с их частичной или полной потерей.

Наиболее явные различия в флуоресценции сперматозоидов появлялись между незамороженным и замороженным семенем без добавки глицерина. Больше всего изменений семени при добавке глицерина обнаружено в сперматозоидах барана и хряка. В некоторых случаях замораживаемое семя хряка отличалось 100%-ными изменениями в акросомах. Вполне возможно, что тетрациклин как и примулин (II) обесцвечивает только отмирающие и мёртвые сперматозоиды.

M. Tischner

SUITABILITY OF FLUORIMETRIC METHOD FOR EVALUATION OF FROZEN
SEMEN OF FARM ANIMALS

Summary

The semen of 3 bulls, 9 rams and 1 boar was investigated. Each ejaculate was divided into 3 parts. The first part was examined shortly after collection and the second one put into a vacuum flask containing liquid nitrogen. The third part was diluted with an addition of glycerol and frozen in liquid nitrogen according to the methods generally used for particular species. The semen was stored in liquid nitrogen over the period from several hours to several days. Tetracycline was used as a fluorophor throughout the experiment. Observations were carried out under the fluorescent microscope of ML 2 type.

Spermatozoa fluoresced bright yellow and therefore were marked very distinctly against the blue background. The changes in fluorescence intensity of particular morphotic elements were classified into 4 groups. Weakly fluorescent spermatozoa (Ist group), fluorescent middle piece and basal part of the head (IInd group), fluorescent tail and the acrosome (IIIrd group), and intensive fluorescence of the whole spermatozoa (IVth group). The acrosome changes consisted in swelling of the anterior part of the head forming a kind of a transparent "veil" and in other acrosome deformations, including its partial and complete detachment. Most distinct differences occurred between the structure of the spermatozoa from fresh ejaculates and that of the sperm cells frozen without the glycerol addition. Among spermatozoa frozen with the addition of glycerol most changes occurred in the semen of boar and ram. In some cases the thawed semen of boars showed as much as 100% of acrosomal changes. It seems that tetracycline like primuline (11) binds only to the spermatozoa already dead or dying.