

PRÓBY LABORATORYJNE KONSERWOWANIA NASIENIA W TEMPERATURZE POKOJOWEJ

BOGUSZ KŁOSOWSKI, LECH JAŚKOWSKI

Zakład Fizjologii Rozrodu i Laktacji Instytutu Fizjologii Żywienia Zwierząt PAN
oraz Zakład Inseminacji i Zwalczania Bezpłodności Instytutu Weterynarii.
Oddział w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr L. Jaśkowski

W uprzednich badaniach nad przechowywaniem nasienia w temperaturze pokojowej (L. Jaśkowski, 1958; L. Jaśkowski, D. Biwejnisi-Kłowska, L. Wałkowski, 1958, L. Jaśkowski, D. Biwejnisi-Kłowska, 1961, L. Jaśkowski, D. Biwejnisi-Kłowska, S. Korycki, 1962) wykazano z jednej strony przydatność zmodyfikowanej metody Van Demarka do konserwacji nasienia w warunkach terenowych, z drugiej strony stwierdzono jednak, że szereg takich czynników jak temperatura, sposób przechowywania nasienia, sposób zatapiania ampulek, sposób transportu i obchodzenia się z nasieniem w punktach unasienniania może wpływać obniżająco na wyniki. Jedną z ujemnych stron badanego rozcieńczalnika okazała się jego mała lepkość, powodująca, że już w kilka godzin po zamknięciu ampulek plemniki opadają w postaci zbitego osadu na dno, co w pewnych okolicznościach (przewrócenie kartonu z ampulkami do góry dnem) może spowodować przedwczesne zamieranie plemników.

W międzyczasie ukazało się szereg publikacji podających różne modyfikacje metody przechowywania nasienia w temperaturze pokojowej, jak np. Bartletta i Van Demarka (1960), którzy zaproponowali zastąpienie dwutlenku węgla kwasem cytrynowym, Senegacnika (1960) — który zaproponował zastąpienie dwutlenku węgla kwasem askorbinowym i cytrynowym, Venkova i Peeva (1961), którzy proponowali zastąpienie dwutlenku węgla fosforanem potasu itp.

Celem niniejszych badań było więc z jednej strony sprawdzenie niektórych z wymienionych modyfikacji rozcieńczalników, z drugiej zaś — poszukiwania w kierunku znalezienia środka zwiększającego lepkość rozcieńczalnika IVT.

M e t o d y k a

Doświadczenia przeprowadzono metodą dzielenia każdego ejakulatu na szereg porcji, które rozrzedzano porównywanymi rozrzedzalnikami. Rozrzedzenie ostateczne nasienia przeprowadzono w temperaturze pokojowej, po schłodzeniu nasienia rozrzedzonego wstępnie rozrzedzalnikiem C. Ż. Rozrzedzenie ostateczne przeprowadzono w takim stopniu, aby w 1 ml nasienia znalazło się około $30 \cdot 10^6$ plemników.

Nasienie objętości 1,2 ml zatapiano w ampułkach o pojemności 2 ml. Kontrolę ruchliwości nasienia przeprowadzono w 48-godzinnych odstępach czasu, określając dla każdej próby czas przeżywania w godzinach i wskaźnik przeżywania.

Nasienie rozrzedzano następującymi rozrzedzalnikami:

1. IVTK (rozcieńczalnik IVT z dodatkiem katalazy, Jaśkowski i wsp., 1961)
2. IVTK-S (rozcieńczalnik IVTK z dodatkiem 20% inaktywowanej surowicy końskiej)
3. IVTK-A (rozcieńczalnik IVTK z dodatkiem 1% agaru).

Dodatek surowicy i agaru zastosowano w celu zwiększenia lepkości IVTK.

4. G4-B4-C6 — Rozcieńczalnik Bartletta i Van Demarka
G4-B4 — z dodatkiem 0,6% kwasu cytrynowego
5. G4-B4-C5 — „ „ z dodatkiem 0,5% kwasu cytr.
6. G4-B4-C4 — „ „ „ 0,4% „ „
7. G4-B4-C2 — „ „ „ 0,2% „ „
8. G4-B4-C1 — „ „ „ 0,1% „ „
9. G4-B4-C05 — „ „ „ 0,05% „ „
10. „N” — rozrzedzalnik Normana (1961)
11. N-Y-CO₂ — „ „ karbonizowany z dodatkiem
żółtka
12. V-P — „ Venkova i Peeva (1961).

Ponieważ dzielenie nasienia na wiele prób równoległych było praktycznie niewykonalne, badania przeprowadzono w 4 kolejnych doświadczeniach, przy czym w każdym nasienie rozrzedzone rozrzedzalnikiem IVTK służyło za kontrolę. W doświadczeniu 1 i 2 nasienie przechowywano w temperaturze 18—20°; w doświadczeniu 3 i 4 w temperaturze 21—26°C.

Wyniki przeanalizowano statystycznie używając testu T Student Fishera do określenia znamienności różnic między przeciętnymi.

W y n i k i

Doświadczenie 1 i 2. W doświadczeniu 1 porównano przeżywanie nasienia w rozcieńczalniku IVTK oraz w rozcieńczalnikach wymienionych pod poz. 2—6 (tab. 1). Z danych przeciętnych wynika, że mimo

T a b e l a 1

Żywotność nasienia w rozcieńczalnikach porównywanych w doświadczeniu 1 w temperaturze 16—22°C

| Rozcieńczalnik | Ilość prób | Czas przeżywania w godz. | Wskaźnik przeżywania |
|----------------|------------|-----------------------------|-------------------------|
| | | $X \pm E$ | $X \pm E$ |
| IVTK | 10 | 544 ± 21,2 | 214 ± 21,87 |
| IVTK-S | 10 | 564 ± 69,4 | 220 ± 29,07 |
| IVTK-A | 10 | 429 ± 36,1 | 206 ± 18,05 |
| G4-B4-C4 | 10 | 697 ± 72,5 | 234 ± 26,02 |
| G4-B4-C5 | 10 | 697 ± 72,5 | 275 ± 22,04 |
| G4-B4-C6 | 10 | 665 ± 92,7 | 275 ± 22,04 |

dość znacznych różnic w czasie przeżywania oraz różnych wskaźników przeżywania między poszczególnymi próbami — nie były one statystycznie istotne.

Podobnie w doświadczeniu 2 nasienie rozrzedzone rozrzedzalnikami G4-B4-C05 do G4-B4-C2 przeżywało gorzej niż w kontrolnym, wykazującym lepsze wskaźniki przeżywania; jednakże różnica między nimi a wskaźnikiem przeżywania dla IVTK nie była statystycznie istotna (tab. 2).

Doświadczenie 3 i 4. W doświadczeniu 3 porównano rozrzedzalnik IVTK z rozrzedzalnikiem Normana i rozcieńczalnikiem Venkova (VP). Porównanie to wykazało, że między właściwościami kon-

T a b e l a 2

Żywotność nasienia w rozcieńczalnikach porównywanych w doświadczeniu 2 w temperaturze 15—20°C

| Rozcieńczalnik | Ilość prób | Czas przeżywania w godz. | Wskaźnik przeżywania |
|----------------|------------|-----------------------------|-------------------------|
| | | $X \pm E$ | $X \pm E$ |
| IVTK | 5 | 696 ± 97,9 | 207 ± 21,09 |
| G4-B4-C05 | 5 | 492 ± 131,6 | 252 ± 52,3 |
| G4-B4-C1 | 5 | 581 ± 75,6 | 265 ± 42,14 |
| G4-B4-C2 | 5 | 681 ± 88,84 | 263 ± 46,46 |

serwującymi rozrzedzalnika IVTK i Venkova nie ma istotnych różnic, natomiast rozrzedzalnik Normana nie przedłużał wprawdzie okresu życia nasienia, jednakże wybitnie zwiększał wskaźnik przeżywania.

Tabela 3

Żywotność nasienia w rozrzedzalnikach porównywanych w doświadczeniu 3 w temperaturze 21—27°C

| Rozrzedzalnik | Liczba prób | Czas przeżywania w godz. | Wskaźnik przeżywania |
|---------------|-------------|-----------------------------|-------------------------|
| | | $X \pm E$ | $X \pm E$ |
| IVTK | 8 | $384 \pm 21,24$ | $107,4 \pm 11,1$ |
| N | 8 | $338 \pm 26,64$ | $152 \pm 12,9^{**}$ |
| VP | 8 | $285 \pm 31,96$ | $90,8 \pm 11,8$ |

** Różnica między N a IVTK istotna przy $P < 0,02$

„ „ N a VP „ „ $P < 0,01$

Tabela 4

Żywotność nasienia w rozrzedzalnikach porównywanych w doświadczeniu 4 w temperaturze 21—27°C

| Rozrzedzalnik | Liczba prób | Czas przeżywania w godz. | Wskaźnik przeżywania |
|---------------|-------------|-----------------------------|-------------------------|
| IVTK | 5 | $384 \pm 36,96$ | $138,9 \pm 10,96$ |
| N | 5 | $364 \pm 26,88$ | $175,9 \pm 14,68$ |
| NYC | 5 | $348 \pm 20,76$ | $177,8 \pm 9,92^*$ |
| VP | 5 | $331 \pm 14,02$ | $132,5 \pm 5,36$ |

Różnica między NYC a IVTK istotna przy $P < 0,05$

„ „ NYC a IVTK „ „ $P < 0,01$

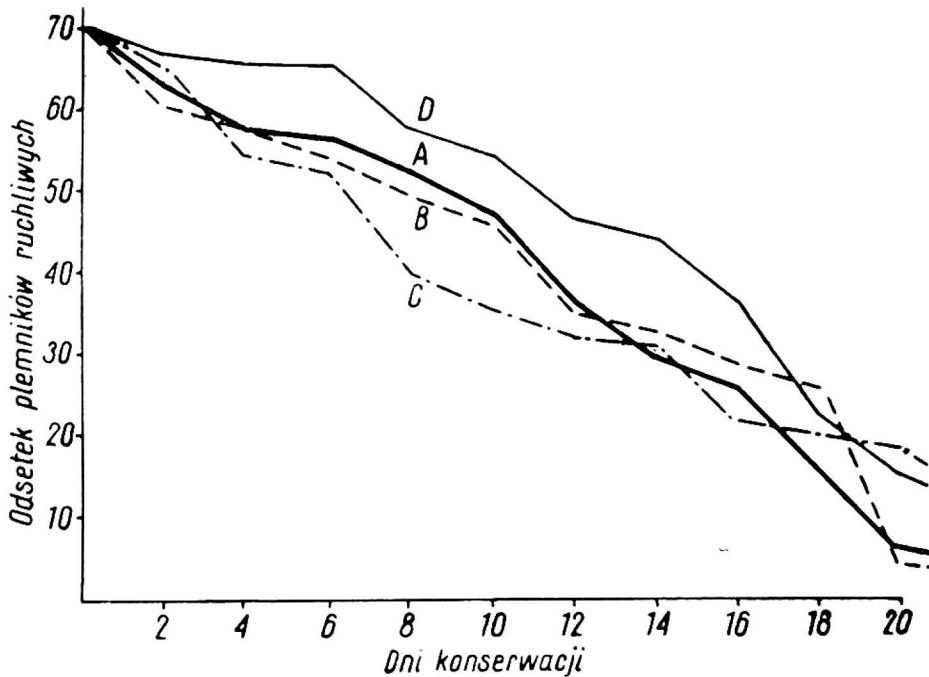
W doświadczeniu 4, które było powtórzeniem 3, wprowadzono obok rozrzedzalnika Normana, rozrzedzalnik Normana z dodatkiem 10% żółtka i dwutlenku węgla. Doświadczenie to potwierdziło wyniki doświadczenia 3, tzn. wyższość rozcieńczalnika Normana w postaci niezmodyfikowanej nad rozrzedzalnikami IVTK i VP.

Zachowanie się plemników w porównywanych rozrzedzalnikach

IVTK, podobnie jak to już stwierdzono poprzednio (Jaśkowski, 1962), oraz w rozcieńczalniku VP żywy i postępowy ruch plemników utrzymywał się przez szereg dni, przy czym powyżej 40% plemników o ruchu postępowym stwierdzono w zależności od wyjściowej jakości nasienia przez 4—10 dni.

W rozcieńczalniku IVTK z dodatkiem agaru ruchliwość kształtowała się podobnie, z tym że szybkość ruchu była mniejsza. W rozcieńczalniku IVTK z dodatkiem surowicy obserwowano stosunkowo szybkie obniżenie się ruchliwości nasienia w pierwszych dniach konserwowania, natomiast w późniejszym okresie (po 10 dniu) obniżanie ruchliwości było wolniejsze niż w innych rozrzedzalnikach użytych dla porównania (rys. 1).

W rozcieńczalniku G4-B4 Z dodatkiem różnych ilości kwasu cytrynowego obserwowano wprawdzie wolniejszy spadek ruchliwości nasienia niż w rozrzedzalniku kontrolnym, ale ruch plemników nie był całkowicie prawidłowy. Bardzo duży odsetek plemników wykazywał ruchy miota-



Rys. 1. Porównanie ruchliwości nasienia w kolejnych dniach konserwowania w temp. 15 do 22°C, a przechowywanego w rozrzedzalnikach: IVTK (A), IVTK-S(B), IVTK-A (C) oraz G4-B4-C4. (D)

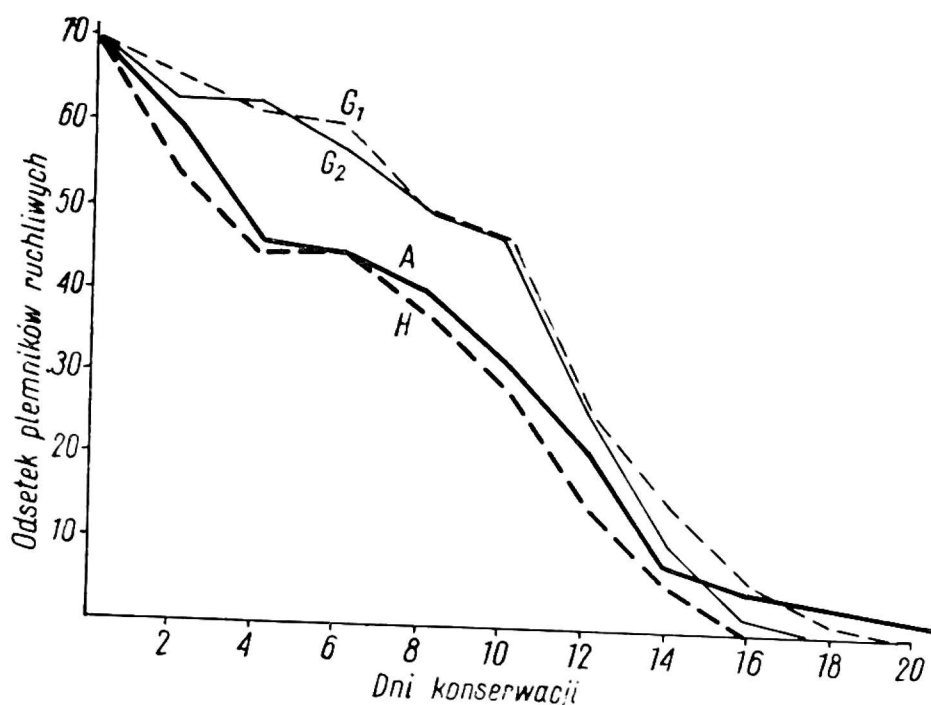
jące, które sprawiały, że plemniki posuwały się naprzód nie wzdłuż linii prostej lub lekko falistej, lecz zygzakowatej (rys. 2).

W obu modyfikacjach rozcieńczalnika *Normana* wysoki odsetek plemników o energicznym ruchu postępowym utrzymywał się dwa razy dłużej niż w rozcieńczalniku IVTK, po czym następował stosunkowo szybki spadek ruchliwości i obumarcie nasienia.

Omówienie wyników

Z badań niniejszych wynika, że zwiększenie lepkości nasienia za pomocą dodatków przez nas stosowanych nie polepszyło właściwości konserwacyjnych rozrzedzalnika IVTK. Również rozrzedzalnik G4-B4 z do-

datkiem kwasu cytrynowego w różnych ilościach, przy konserwowaniu nasienia w temperaturze pokojowej nie jest lepszy niż rozcieńczalnik kontrolny.



Rys. 2. Porównanie ruchliwości nasienia w kolejnych dniach konserwowania w temp. 21—26°C, a przechowywanego w rozcieńczalnikach: IVTK (A), N (G₁), NYC (G₂) i VP (H).

Van Demark i Bartlett (1958) uzyskali za jego pomocą znacznie lepsze wyniki niż za pomocą rozcieńczalnika IVT, ale przy konserwowaniu w temperaturze +4°C. Na temat wartości rozcieńczalnika G4-B4 z dodatkiem kwasu cytrynowego istnieją sprzeczne opinie (Hahn, 1961, Döcke, 1961), na ogół jednak brak jest danych przemawiających za tym, że w temperaturze pokojowej dawałby on lepsze wyniki niż rozciezczalnik IVT.

Rozciezczalnik Venkova i Peeva zdaje się posiadać podobne właściwości konserwujące jak IVT. Na specjalną uwagę zasługuje rozciezczalnik Normana. W swej oryginalnej postaci (bez żółtka i dwutlenku węgla) podtrzymywał energiczny ruch plemników przez znacznie dłuższy okres czasu niż pozostałe rozciezczalniki. Brak ciał osłaniających w wymienionym rozciezczalniku sprawia, że zastosowanie go w praktyce wydaje się ryzykowne. Jednakże jak to wykazały niniejsze badania, dodatek żółtka i lekkie zakwaszenie rozciezczalnika nie obniża jego właściwości konserwujących; dalsze badania i próba zastosowania w praktyce terenowej powinny dać odpowiedź na pytanie, czy posiada on wartość praktyczną.

PIŚMIENICTWO

1. Bartlett Jr. F. D., Van Demark N. L. (1960) — J. Anim. Sci: 19:1316.
2. Döcke F. (1961) — Zuchthyg. 5:29.
3. Hahn R. (1961) — Zuchthyg. 5:21
4. Jaśkowski L. (1958) — Med. Wet. 14:151.
5. Jaśkowski L., Biwejnis D., Wałkowski L. (1958) — Biul. Inst. Wet. 2:(3):31.
6. Jaśkowski L., Biwejnis-Kłosowska D. (1960) — Med. Wet. 16:(3): :170.
7. Jaśkowski L., Korycki S., Biwejnis-Kłosowska D (1961) — Zesz. Probl. Post. N. Roln. 31:143.
8. Jaśkowski L., Biwejnis-Kłosowska D., Korycki S. (1962) — Med. Wet. 18:34.
9. Senegačnik J. (1960) — Veterinaria. 9:309.
10. Venkov T., Peev G. (1961) — Application d'un milieu de phosphate et de carbonate pour la conservation du sperme de taureaux à la temperature de l'interieur. Proc. IV. Int. Congr. Anim. Reprod. IV :925.
11. Van Demark N. L., Bartlett F.D. (1958) — S. Dairy Sci:41:732.

Б. Клосовски Л. Яськовски

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОПЫТКИ ХРАНЕНИЯ СЕМЕНИ В КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Резюме

Пользуясь в отдельных опытах методом деления эякулятов, было проведено сравнение качества 4 разбавителей для хранения семени в комнатной температуре. Исследования проводились в 4 опытах, причем в каждом из них разбавитель IVTK (IV + каталаза) являлся контрольным разбавителем. В очередных опытах были сравнены следующие разбавители и их модификации.

I. IVTK—S (IVTK + 20% инактивированной лошадиной сыворотки), IVTK—A (IVTK + 1% агар), IVTK—C4, IVTK—C5, IVTK—C6 (IVTK + 0,4, 0,5 и 0,6% лимонной кислоты),

II. IVTK—CO5, IVTK—C1, IVTK—C2 (IVTK + 0,05, 0,1 и 0,2% лимонной кислоты).

III. N (разбавитель Нормана, 1961) и VP (разбавитель Венкова и Пеева, 1961).

IV. N, VP и NYC (разбавитель Нормана с добавкой CO₂ и 10% желтка куриного яйца).

Результаты, приведенные в таблицах 1—4 доказали, что ни в одном

из сравниваемых разбавителей живчики не жили дольше, чем в разбавителе IVTK, зато показатель переживаемости семени, хранимого в немодифицированной и модифицированной форме разбавителя Нормана, оказался высшим (разница статистически существенная при $P 0,5$ и $P 0,01$), чем в разбавителе IVTK.

B. Kłosowski and L. Jaśkowski

LABORATORY TESTS ON SEMEN PRESERVATION AT ROOM TEMPERATURE

Summary

Four diluents for semen preservation at room temperature were evaluated by comparison using for separate tests divided ejaculate method. Investigations were performed in four trials. In every trial a diluent IVTK (IVT + catalase) was used as control diluent. In successive trials the following diluents and modifications there were compared.

I. IVTK-S (IVTK + 20 per cent of inactivated horse serum), IVTK-A (IVTK + 1 per cent of agar), G4-B4-C4, G4-B4-C5, G4-B4-C6, G4-B4- + 0.4 per cent, 0.5 per cent and 0.6 per cent of citric acid).

II. G4-B4-C05, G4-B4-C1 and G4-B4-C2 (G4-B4- + 0.05, 0.1 and 0.2 per cent of citric acid).

III. N (Norman diluent, 1961) and VP Venkov and Peev diluent, 1961).

IV. N, VP and NYC (Norman diluent added CO_2 and 10 per cent of egg yolk).

Results presented in Tables 1—4 proved that spermatozoa were living longer in the IVTK diluent in any other diluent used, yet the survival index of semen preserved in non-modified and modified forms of Norman diluent proved to be higher (the difference statistically significant at $P 0.05$ and $P \leq 0.01$) than in the IVTK diluent.