

PRÓBA OKREŚLANIA ZAWARTOŚCI AKTYWNYCH PLEMNIKÓW W NASIENIU PRZY POMOCY BARWIENIA KONTRASTOWEGO

LECH JAŚKOWSKI

Zakład Inseminacji i Zwalczenia Bezpłodności, Instytut Weterynarii, Bydgoszcz

Kierownik: prof. dr L. Jaśkowski

Pomysł opisanej niżej metody powstał przed kilku laty w czasie prób sporządzania mikrofotografii plemników uszkodzonych przez obniżenie ciśnienia osmotycznego środowiska. W czasie tych prób zauważono, że charakterystyczne zawinięcie witek opisane przez Miłowa nowa (1940) występuje tylko w części populacji plemników proporcjonalnej do zawartości plemników ruchliwych w nasieniu. W praktyce jednak zastosowanie tej próby natrafiło na szereg trudności technicznych, tak że zarzuciliśmy na pewien czas badania nad jej wartością. Dopiero niedawno kiedy połączono uszkodzenie plemników roztworem hypotonicznym, z barwieniem kontrastowym nigrozyną-eozyną, uzyskano wyniki, które wskazują iż metoda ta może znaleźć zastosowanie w praktyce.

Ogólne założenia metody

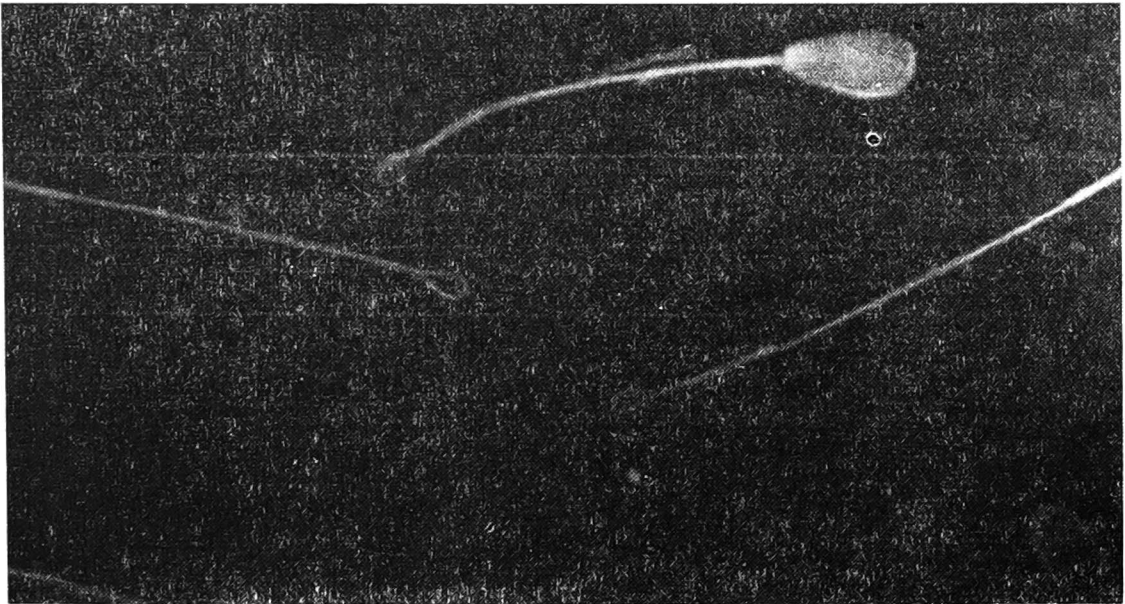
Jeżeli nasienie ochłodzone po pobraniu do temperatury poniżej 26°C, umieści się w ogrzonym roztworze barwnika sporządzonego z eozyny i nigrozyny rozpuszczonych w wodzie destylowanej, i po 30 sekundowym barwieniu, sporządzi się z niego rozmaz, w preparacie mikroskopowym stwierdza się, że wszystkie plemniki martwe mają witekę wyprostowaną, lub zawiniętą w miejscu przejścia wstawki w biczyk. Część plemników niezabarwionych (żywych) ma również witekę wyprostowaną, natomiast część i to część proporcjonalna do zawartości plemników o energicznym ruchu postępowym wykazuje charakterystyczne zawinięcie

zakończenia witki, przypominające luźno zaplątany węzeł. Zawinięcie to może wykazywać różne modyfikacje, czasami węzełek jest bardziej ciasny, czasami przypomina pętlę, zawsze jednak występuje w końcowym odcinku, poniżej przejścia wstawki w witkę.

Dotychczasowe badania wykazały dużą zgodność między odsetkiem plemników wykazujących opisane zawinięcie a szacunkową oceną ruchliwości nasienia. Przeprowadzona ocena nasienia w 20 ejakulatach dała średnią zawartość plemników o ruchu postępowym (metodą szacunkową) 46%, podczas gdy metodą barwienia stwierdzono w 20 ejakulatach 47,5% plemników niezabarwionych wykazujących zawinięcie końcowego odcinka witki. Między metodą szacunkową a metodą „obiektywną“ istniał wysoki współczynnik korelacji $r = +0,932$. Zawartość plemników zabarwionych w zbadanych ejakulatach nie przekraczała 19% i dawała bardzo ogólną informację o faktycznej ruchliwości nasienia.

Technika wykonania próby

Warunkiem udania się próby jest, ażeby nasienie w chwili jej wykonywania nie miało temperatury wyższej niż 26°C , żeby znalazło się w środowisku hypotonicznym, oraz żeby równocześnie pobudzić gwałtownie

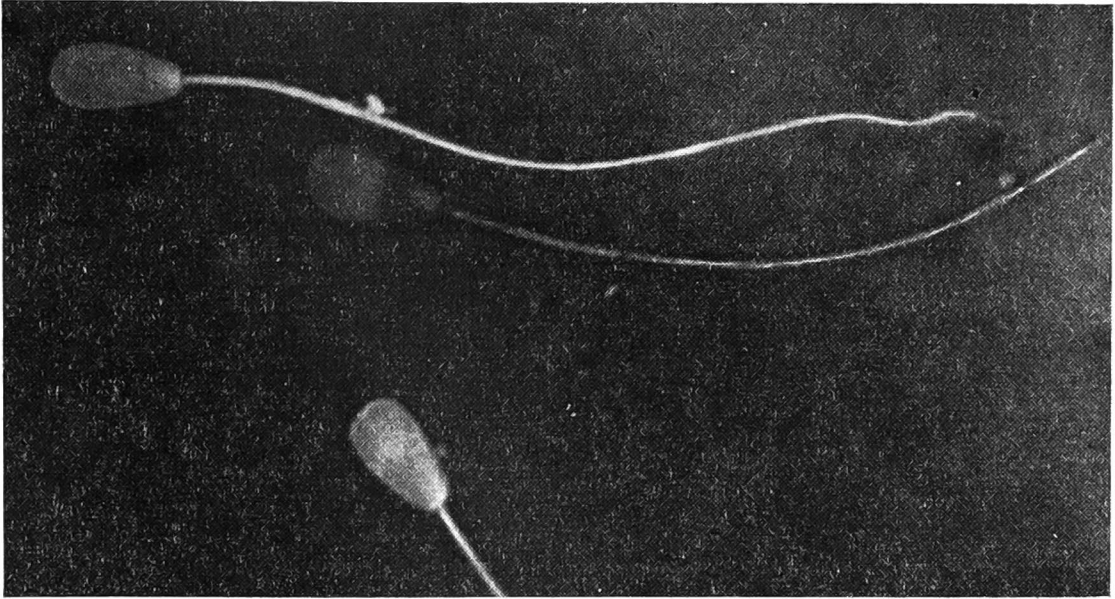


Rys. 1. Typowe zawinięcie zakończenia witki występujące w plemnikach ruchliwych

ruchliwość nasienia (kropla barwnika powinna wykazywać temperaturę około 45°C). Najlepsze wyniki uzyskuje się gdy stosunek nasienia do hypotonicznego barwnika wahał się od 1 : 7 do 1 : 10.

Praktyczne wykonanie próby. Dokładnie odtłuszczone szkiełko podstawowe umieszcza się na płycie ultratermostatu nastawionego na $46,5^{\circ}\text{C}$.

Na szkiełku tym umieszcza się dużą kroplę barwnika (nierozmazany barwnik powinien tworzyć tarczę o wielkości monety 20-groszowej) ogrzanego uprzednio do $46,5^{\circ}$. Do barwnika dodaje się małą kroplę nasienia i bezpośrednio po tym szklaną bagietką miesza się nasienie z barwnikiem. Po 30—45 sekundach przykłada się do mieszaniny nasienia z barw-



Rys. 2. Martwe plemniki (zabarwione) oraz nieruchome żywe nie wykazują tego zawinięcia

nikiem krawędź szkiełka, którym wykonuje się rozmaz i wykonuje się rozmaz na innym odtłuszczonym i podgrzanym szkiełku podstawowym. Aby przyspieszyć wysychanie preparatu celowe jest umieszczenie szkiełka w strumieniu gorącego powietrza.

Do sporządzenia barwnika służy 4% roztwór wodny eozyny i 8% roztwór wodny nigrozyny (na wodzie destylowanej). Oba barwniki miesza się w stosunku 1 część roztworu eozyny i 2—3 części roztworu nigrozyny.

U w a g i k o ń c o w e

Metoda jest w okresie wstępnych badań i byłoby przedwczesnym zalecać ją do powszechnego stosowania. Istnieje szereg okoliczności, polegających głównie na błędach technicznych, które powodują poważne różnice między odczytem szacunkowym a „obiektywnym“. Po standaryzacji metody i dokładniejszym poznaniu jej wartości w ocenie nasienia, będzie można dopiero określić w jakich okolicznościach może ona znaleźć zastosowanie w praktyce.

Л. Яасковски

ПОПЫТКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
АКТИВНЫХ ЖИВЧИКОВ В СЕМЕНИ
ПРИ ПОМОЩИ КОНТРАСТНОЙ ОКРАСКИ

Резюме

Метод основан на контрастном окрашивании (живой-мертвый) при помощи гипотонического раствора эозина с нигрозином. Одну часть семени, охлажденного до комнатной температуры, следует смешивать с 7—10 кратным количеством красителя, имевшего температуру 45°C и подвергать окраске 30—45 секунд.

Процент содержания неокрашенных живчиков с завернутым концом ветки, в размазе, соответствует проценту живчиков, оюладающих поступательным движением.

L. Jaśkowski

A SIMPLE METHOD FOR OBJECTIVE ESTIMATION
OF SEMEN ACTIVITY

Summary

The method consists in live dead staining of spermatozoa with a hypotonic eosin-nigrosin solution. One portion of the semen cooled before staining to room temperature should be mixed with 7—10 parts of the stain warmed to 45°C, and stained for 30—45 seconds. In smears the proportion of unstained spermatozoa with bent ends of the tail is equal to the proportion of progressively moving spermatozoa.