

ZAGADNIENIA KRIOBIOLOGII W SZTUCZNYM UNASIENIANIU ZWIERZĄT

Stefan Wierzbowski

Instytut Tootechniki, Balice koło Krakowa
Dyrektor: dr Franciszek Klocek

Stosunkowo od niedawna stosowana metoda, jaką jest zamrażanie i długotrwała konserwacja nasienia, a także niektórych tkanek, posiada już tak bogatą historię, że warto pokrótce ją przedstawić, zwłaszcza obecnie gdy wydaje się, że postęp nauki jest osiągany już nie w drodze mniej lub więcej zamierzonych odkryć dokonywanych przez pojedynczych ludzi, a następuje w wyniku zorganizowanego wysiłku całych zespołów badawczych. Historia początków opanowywania metody zamrażania nasienia wskazuje, że przypadek, a pewnie także szczęście badającego, odgrywa nadal jeszcze niepoślednią rolę w odkryciach naukowych.

Profesor Parkes interesował się zagadnieniami zamrażania nasienia, gdyż widział w tym możliwość zahamowania procesu starzenia się komórki, co dla biologa stanowiło problem niesłychanie interesujący. Punktem wyjścia były wzmianki w 19-wiecznej literaturze o zdolności przeżywania pojedynczych plemników ludzkich poddawanych działaniu temperatur ciekłych gazów. Tak więc dr Polge, który jako młody człowiek, wówczas prawie bezpośrednio po ukończeniu studiów rolniczych (1947), podejmując pracę w zakładzie prof. Parkesa otrzymał jako zadanie opracowanie metody zamrażania spermy drobiu. Jedynie całkowita nieznajomość problemu i czekających go trudności, jak potem pisał Polge, mogła tłumaczyć lekkomyślność z jaką podjął się tego zadania.

Po wielu miesiącach mozolnych, a bezskutecznych prób, w których posługiwano się roztworem fruktozy i stosowano szybkie obniżanie temperatury, prace zostały przerwane na pół roku. Pozostały roztwór fruktozy, ze względu na powojenne braki i trudności w zaopatrzeniu, został schowany do lodówki. Po 6-miesięcznej przerwie próby zostały znowu podjęte. Tym razem wyniki były doskonałe i po każdym mrożeniu znaczny procent plemników zachowywał ruchliwość. Jednak po przygotowaniu nowego roztworu fruktozy (gdy tamten się kończył),

żadna próba mrożenia nie udawała się. Przeprowadzono wówczas analizę chemiczną pierwszego roztworu, która wykazała, że nie było w nim zupełnie fruktozy, natomiast znajdowała się znaczna ilość glicerolu i białka. Droga dedukcji ustalono, że w czasie przetrzymywania w lodówce, pomylono flaszki i zamiast roztworu fruktozy, prawdopodobnie wzięto nieopisaną flaszkę zawierającą albuminę Mayersa (mieszanina glicerolu i białka jaja kurzego używana rutynowo w laboratoriach histologicznych). W ten sposób zostało dokonane odkrycie decydującej dla zamrażania nasienia roli glicerolu.

Sposób w jaki dr Polge ustalił optymalny czas ekwilibracji przypomina odkrycie aparatu Golgiego, wskazując na powtarzalność przypadkowych odkryć w biologii. Z przyczyn, których szerzej nie omawia, określając je jedynie koniecznością odświeżenia się, pozostał poza laboratorium przez całą noc i mrożenie zaplanowane na wieczór, zostało przeprowadzone dopiero rano. W ten sposób ustalony został wówczas 18-godzinny okres ekwilibracji nasienia.

Nasienie buhaja zamrażane według metody opracowanej przez Polge'a zostało następnie przy współpracy z Rowsonem poddane kontroli biologicznej. Około 50% inseminowanych krów zacieliło się po pierwszym zabiegu. Metoda opracowana przez Polge'a została następnie podana do szerokiej wiadomości na II Międzynarodowym Kongresie Rozrodu Zwierząt w Kopenhadze w 1952 r. Od tego czasu rozwija się prawdziwa rewolucja techniczna w inseminacji bydła i wprowadzane zostają do praktyki zupełnie nowe metody hodowlane, oparte na możliwości długotrwałego konserwowania nasienia.

Opanowanie metody zamrażania nasienia i innych tkanek nastąpiło w wyniku wyłącznie empirycznych badań. Dopiero potem, głównie dla wyjaśnienia ograniczonej, względnie częściowej tylko skuteczności opracowanych metod mrożenia, zaczęto podejmować próby poznania zjawisk towarzyszących procesowi zamrażania. Prace te prowadzone dotychczas w bardzo nielicznych ośrodkach, pozwalają obecnie na tłumaczenie, niewątpliwie jeszcze tylko częściowe, przebiegu procesu zamrażania i niektórych niepowodzeń z nim związanych.

Woda znajdująca się w zamrażanej tkance, względnie zawieszanie komórek, wykryzalizowuje jedynie wokół drobin znajdujących się w przestrzeniach międzykomórkowych. Drobiny te stają się ośrodkami rosnących kryształków lodu. Wielkość tych ośrodków zamrażania wody jest uzależniona od szybkości obniżania temperatury. Im temperatura jest obniżana wolniej, tym ośrodki zamrażania wody muszą być większe i jest ich mniej. Natomiast w miarę obniżania temperatury, zmniejsza się również wielkość drobin koniecznych aby mogły się stać jądrami krystalizacji wody. Z wyjątkiem bardzo niskich temperatur zamrażania, jądrami krystalizacji wody są drobiny substancji znajdujących się normalnie w tkance.

Przy stosunkowo wolno przebiegającym zamrażaniu, kryształy lodu tworzą się jedynie w przestrzeniach międzykomórkowych. Po odpowiednim dobraniu szybkości odprowadzania wytwarzanego ciepła, temperatura zamrażanej tkanki będzie się utrzymywała w pobliżu punktu zamrażania. W efekcie cała woda będzie zamrażała na nielicznych, stopniowo rosnących kryształach lodu. Odciąganie wody następuje najpierw z przestrzeni międzykomórkowych, a następnie stopniowo także z komórek. Rosnące kryształy lodu pochłaniają całą zamrażalną wodę, która stanowi 90-95% wody znajdującej się w komórkach.

Jeżeli utrata ciepła w zamrażanej tkance jest gwałtowna, wówczas ciepło utajone powstające w procesie krystalizacji nie jest w stanie tego wyrównać i temperatura zamrażanej próbki spada coraz niżej, co prowadzi do powstawania rosnącej ilości coraz mniejszych kryształów lodu. Wraz ze wzrostem szybkości obniżania temperatury zaczynają powstawać kryształki lodu nie tylko w przestrzeniach międzykomórkowych, lecz również w obrębie komórek. W rezultacie szybko przebiegającego procesu zamrażania powstaje wielka liczba stosunkowo równomiernie rozmieszczonych kryształków o podobnej wielkości.

Moment, w którym rozpoczyna się krystalizacja wody w zamrażanej próbce, jest uzależniony od wielkości znajdujących się tam drobin, które mogą służyć jako ośrodki zamrażania wody. W rezultacie, przy zamrażaniu tkanek czy zawiesin komórkowych następuje po obniżeniu temperatury poniżej zera stan przemarzania, który utrzymuje się tak długo, aż przy dalszym obniżeniu temperatury znajdą się dostatecznie duże drobiny, które będą mogły służyć jako ośrodki krystalizacji wody.

W czasie przechodzenia wody w kryształy lodu następuje uwolnienie energii w postaci ciepła utajonego. Jeżeli to ciepło nie jest natychmiast odbierane z rosnących kryształów lodu, temperatura całej próbki wzrasta aż do punktu topnienia. Przebieg tego zjawiska zaznacza się bardzo wyraźnie na krzywych spadku temperatury zamrażanego nasienia. W zależności od wielkości próbek i szybkości obniżania temperatury następuje charakterystyczne wahnięcie, wywołane wzrostem temperatury w próbce nasienia w chwili rozpoczęcia tworzenia się kryształów lodu. Można sobie wyobrazić, że w następstwie opisanego przebiegu krystalizacji może dochodzić do tak znacznych uszkodzeń struktury komórkowej, że zamrażana tkanka ulega zniszczeniu.

Z alternatywną hipotezą tłumaczącą niszczące skutki zamrażania wystąpił Lovelock (1953), który na podstawie wyników badań przeprowadzonych nad zamrażaniem erytrocytów, wykazał niszczące skutki wzrostu koncentracji elektrolitów, do której dochodzi przez odwodnienie komórek w rezultacie wykrywania wody.

Przedstawione hipotezy przebiegu zjawisk zachodzących w czasie zamrażania nasienia prawdopodobnie są jeszcze bardzo niepełne i można oczekiwać ich dalszego rozwoju.

Wprowadzenie przez Polge'a Smitha i Parkesa [25] glicerolu do rozcieńczalników dodawanych do zamrażanego nasienia, pozwoliło na zabezpieczenie nasienia przed niszczącymi skutkami zamrażania. Działanie glicerolu polegać ma zarówno na niedopuszczeniu do powstawania dużych kryształów lodu, jak i na hamowaniu nadmiernego wzrostu koncentracji soli w komórkach. Glicerol posiada bowiem zdolność wiązania wody (1 mol glicerolu wiąże 3 mole wody), a przenikając przez błonę komórkową do wnętrza komórki zabezpiecza ją w ten sposób przed następstwami odwodnienia. Podobnie jednak jak zmieniają się poglądy na przebieg procesu zamrażania, tak i wiadomości o działaniu glicerolu będą ulegały dalszym modyfikacjom. Poza glicerolem prowadzone były bowiem próby stosowania innych środków o działaniu teoretycznie podobnym, jak np. dwuetylosulfotlenku, a dalej niektórych cukrów, jednak w praktyce stosowany jest nadal glicerol jako standardowy dodatek do każdego rozcieńczalnika używanego przy zamrażaniu nasienia.

Nie wchodząc w szczegóły metod zamrażania nasienia, które są już dobrze znane z codziennej praktyki zakładów unasienniania, należałoby jednak przedstawić podstawową technikę postępowania. Skład rozcieńczalników nasienia poza dodatkiem glicerolu może się różnić bardzo znacznie. Opierać się może bowiem, poza prawdopodobnie najczęściej stosowanym roztworem cytrynianu sodu, też na cukrach, mleku, lub też różnych kombinacjach tych składników, zwykle z dodatkiem żółtka. Po ekwilibracji trwającej od kilku do kilkunastu godzin (obecnie najczęściej ok. 5-7 godz.), nasienie zostaje schłodzone do temperatury kilku stopni powyżej zera. Od tego momentu istnieją dwie drogi postępowania. Stosując metodę opracowaną przez Nagase i Niwa [22] nasienie jest wkraplane na płyty dwutlenku węgla, gdzie w ciągu niecałych 3 min. osiąga temperaturę bliską -79°C , a następnie przekładane jest bezpośrednio do ciekłego azotu.

Drugi sposób postępowania, stosowany w odniesieniu do nasienia pakowanego w ampułkach i słomkach, polega na ciągłym obniżaniu temperatury od kilku stopni powyżej zera aż do dojścia do temperatury ciekłego azotu. Szczegółowe recepty postępowania wprowadzone jeszcze przez metodykę Polge'a i Rowsona [24], które określały z jaką szybkością nasienie może być ochładzane w poszczególnych zakresach temperatur, zostały bardzo znacznie uproszczone i obecnie temperatura nasienia zamrażanego w ampułkach w parach azotu jest obniżana z szybkością wynoszącą ok. $18^{\circ}\text{C}/\text{min}$. [23].

Poza eksploatowanymi jeszcze urządzeniami do zamrażania, typu Biological Freezer i podobnymi, najszerzej stosowane jest zamrażanie nasienia w kontenerach z szerokim otworem wlotowym. Metoda opracowana przez Fergassona i wsp. dla ampulek, a Jondeta [10] dla słomek, okazała się najbardziej ekonomiczna. Ampułki względnie słomki z na-

sieniem umieszczane na szerokiej tacy zawieszają się w kontenerze na wysokości 5-10 cm nad powierzchnią cieczy w temperaturze ok. -170° do -180°C w zależności od wysokości zawieszenia. Po 5 min. nasienie zanurza się w ciekłym azocie. Stosując taki sposób postępowania można mrozić tygodniowo w średniej wielkości zakładzie unasienniania 20-30 tysięcy porcji nasienia [1, 9, 11, 12].

Temperatura przechowywania, którą można uzyskać przy pomocy CO_2 , a więc zbliżona do -79°C , a także uzyskiwana przy pomocy mechanicznych urządzeń chłodzących, leżąca w granicach od -80° do -90°C , jest, jak się okazało, nie wystarczająca dla długotrwałego przechowywania nasienia. Niektóre zjawiska chemiczne przebiegające jeszcze w tych temperaturach, a także fizyczne, prowadzące do zmian w formowaniu się kryształów wody w temperaturach rzędu -120°C , przypuszczalnie mogą być uważane za przyczyną stopniowego obniżenia się płodności nasienia przechowywanego w temperaturach leżących poniżej -150°C . Nieuniknione są również wahania temperatury, którym ulega nasienie przechowywane w niższych temperaturach, a towarzyszące wszelkim manipulacjom. Wahania te muszą pociągać za sobą każdorazową rekrytalizację wody ze skutkami przypuszczalnie niekorzystnymi dla struktury komórkowej plemników.

Stosunkowo niewielka masa poszczególnych porcji mrożonego nasienia poddaje się bardzo łatwo wahaniom temperatury, jak to wykazał Hahn [8]. Wrażliwe jest zwłaszcza nasienie mrożone w kulkach, które po wyjęciu z azotu, dopuszczalną granicę temperatury -150°C osiąga już po 9 sek., podczas gdy w słomkach temperatura do tej granicy podwyższa się w ciągu 20, a w ampułkach w ciągu 26 sek. Wskazuje to na konieczność zachowywania szczególnej ostrożności, zwłaszcza przy wyjmowaniu nasienia z kontenerów, aby nie uszkodzić pozostałego nasienia.

Przy używaniu ciekłego azotu jako środka chłodzącego, nasienie jest przechowywane w temperaturze -196°C , lub też w temperaturach wynoszących od -180° do -150°C , które utrzymują się w kontenerze ponad powierzchnią cieczy. Dotychczasowa praktyka wykazuje, że są to warunki wystarczające dla zabezpieczenia w ten sposób przechowywanego nasienia przed spadkiem płodności [27]. Było nawet obserwowane zjawisko pewnego wzrostu niepowtarzalności krów inseminowanych nasieniem przechowywanym w ciągu 2 lat, w stosunku do wyników uzyskiwanych po nasieniu przetrzymywanym w ciągu krótszego czasu [7]. Nie ma jednak dotychczas wytłumaczenia tego zjawiska. Obserwacje Mixnera [18] przeprowadzone przy użyciu nasienia przechowywanego w ciągu 12 lat wskazują, że zachowało ono płodność, aczkolwiek jej obniżenie można przypisywać początkowemu 8-letniemu okresowi przechowywania w temperaturze dwutlenku węgla.

Całkowite prawie zahamowanie przebiegu wszystkich zjawisk chemicznych i fizycznych, jakie występuje w temperaturach leżących po-

niżej -150°C , wydaje się wskazywać, że jest to minimalna temperatura przechowywania nasienia. Wspomniane już obserwacje wskazują, że w ciągu 2-letniego okresu przechowywania nasienia w tej temperaturze nie nastąpił spadek jego płodności.

Zastępowanie nasienia płynnego nasieniem mrożonym stanowiło bodziec dla przeprowadzenia szeregu porównań nad płodnością nasienia konserwowanego tymi dwoma metodami. Okazało się bardzo szybko, że wyniki są zwykle o kilka procent lepsze po nasieniu mrożonym. Składa się na to szereg przyczyn, między innymi dokładna selekcja ejakulatów przed mrożeniem, konserwacja w jednolitych warunkach lepiej zabezpieczająca płodność nasienia jak przechowywanie w temperaturze topniejącego lodu i inne szczegóły oddziałujące na końcowy wynik. Wyrównana wartość nasienia mrożonego została podkreślona w zestawieniu sporządzonym przez Barriere [1]. Wykazał on, że przy nasieniu mrożonym skala wahań pomiędzy najwyższymi a najniższymi wynikami jest znacznie niższa, niż przy użyciu nasienia konserwowanego w stanie płynnym.

Wprowadzenie nasienia mrożonego zwróciło też uwagę na możliwość znacznie bardziej precyzyjnego operowania wielkością dawki inseminacyjnej i ilością plemników, niż miało to miejsce przy nasieniu płynnym. Mimo że dotychczas nie udało się jeszcze ustalić minimalnej ilości plemników w dawce, nastąpiło znaczne obniżenie stawianych wymagań. Ze względu na możliwość bardziej precyzyjnego postępowania przy słomkach niż przy stosowaniu innych metod aplikowania zamrożonego nasienia, warto bliżej rozpatrzyć wyniki badań Cassou [3]. Z początkowej średniej liczby $33,6 \times 10^6$ żywych plemników w 1,2 ml nasienia, następuje obniżenie do $18,6 \times 10^6$ w słomce o pojemności 0,5 ml, a wreszcie następuje zejście do $13,1 \times 10^6$ w tzw. mini-słomce o pojemności 0,25 ml. Równocześnie z obniżaniem objętości nasienia i ilości plemników w dawce, Cassou stwierdził istotną statystycznie poprawę wyników. Wskaźnik niepowtarzania rui wynosił odpowiednio 63,4%, 68,1% i 69,7%. Wyniki te znalazły potwierdzenie w pracy Malmberga i Dyrendahla [16], którzy w porównaniu średnich i małych słomek uzyskali niepowtarzalność wynoszącą odpowiednio 63,04% i 64,23%. Jeszcze dalej posunął się Jondet [11]. Nie stwierdził on istotnych różnic w zależności od tego, czy w dawce o objętości 0,2 ml było 13, 6, 5, czy 3,25 milionów żywych plemników. Zmniejszanie dawki do 0,1 ml, przy zachowaniu tej samej liczby plemników, wywołało już jednak wystąpienie pewnych wahań i obniżenie niepowtarzalności do 58,2% przy dawce $3,25 \times 10^6$ w stosunku do 63,7% niepowtarzania rui po dawce kontrolnej. Znacznie ostrożniejsze doświadczenia przeprowadzili Steward i Bennett [26], którzy porównując wyniki unasienniania dawkami zawierającymi 30, 20, 10 i 5 milionów żywych plemników, również nie stwierdzili różnic w liczbie krów niepowtarzających rui.

Sullivan i Elliott [28] zwrócili uwagę, że przy zmianie ilości plemników w dawce inaczej się układa niepowtarzalność po buhajach zaliczanych do różnych grup płodności. U buhajów określonych jako niskopłodne, zwiększanie ilości plemników z 5 do 10 i 15 milionów prowadziło każdorazowo do wzrostu niepowtarzalności krów o kilka procent. W grupie średniopłodnych buhajów wyraźny wzrost nastąpił tylko po podniesieniu ilości do 10 milionów, powyżej tej liczby progresja była bardzo nieznaczna. W grupie określonej jako buhaje wysokopłodne, wzrost wystąpił między 5 do 10 milionami, chociaż nie tak zdecydowany jak w poprzednich grupach, natomiast przy dalszym podnoszeniu ilości plemników w dawce do 15 milionów nastąpił już wyraźny spadek niepowtarzalności.

Wprowadzenie dawek inseminacyjnych o tak znacznie obniżonej liczbie plemników rokuje możliwość wielokrotnie wydajniejszej eksploatacji buhajów niż to ma miejsce obecnie. Równocześnie obniżenie objętości dawki wymaga stosowania bardzo precyzyjnych metod wprowadzania nasienia, aby zmniejszyć straty nasienia pozostającego na instrumentach. Tutaj zdecydowaną wyższość nad pozostałymi metodami wydają się mieć słomki.

Przed zabiegiem nasienie jest rozmrażane. Niezależnie od temperatury w jakiej się to odbywa, przygotowania te wraz z pozostałymi manipulacjami pochłaniają pewną ilość czasu, w sumie nieco większą niż przy posługiwaniu się nasieniem płynnym. W sezonie, gdy następuje znaczne spiętrzenie liczby wykonywanych zabiegów, może to posiadać tak duże znaczenie, że nawet zakłady stosujące wyłącznie nasienie mrożone okresowo przestawiają się na zaopatrywanie inseminatorów w nasienie płynne. W tej sytuacji zostały podjęte próby wprowadzania do szyjki macicznej nasienia nie rozmrożonego. Okazało się, że masa zamrożonego nasienia jest tak niewielka, że nie powoduje żadnych uszkodzeń błony śluzowej. Wyniki niepewtarzalności zaś nie odbiegały od uzyskiwanych po nasieniu rozmrożonym [14]. Tak więc został wyznaczony kierunek dalszego usprawniania metody. Dotychczas jednak nie udało się znaleźć dostatecznie prostego sposobu, który rozwiązałby sprawę bezpośredniego deponowania zamrożonego nasienia w szyjce macicznej czy macicy.

Przedłużenie czasu konserwacji nasienia doprowadziło do zwielokrotnienia potencjalnych możliwości oddziaływania na populację pojedynczych osobników. Skala tych możliwości jest nader sugestywnie przedstawiona na wykresie opracowanym przez Bartletta [2]. W stosunku do ok. 75 krów stanowionych rocznie przez jednego buhaja kryjącego w sposób naturalny, były już w USA buhaje, których nasieniem po zamrożeniu unasieniano ponad 125 000 krów rocznie. Możliwość tak szerokiego wykorzystywania osobników o sprawdzonej użyteczności może w sposób bardzo istotny wpływać na przyspieszenie postępu hodowla-

nego, ale rodzi też nowe problemy, np. związane z higieną nasienia. Pojedyncze przypadki poronień na tle warunkowo chorobotwórczych drobnoustrojów spotykanych w nasieniu i stanowiące zaledwie ułamek procentu inseminowanych krów, przy dziesiątkach tysięcy unasienionych sztuk nasieniem takiego buhaja, mogą urastać do strat wyraźnie odczuwalnych ekonomicznie.

Oczywisty wpływ na liczbę unasienionych krów w skali rocznej ma wydolność płciowa zwierząt, która określona ilością wydalanych plemników, może być ujęta w postaci typowej krzywej Gausa. W wyniku badań Morstina [19] ustalono, że od 8 do 18 miesięcy życia następuje bardzo szybki wzrost produkcji plemników, który potem już łagodniej zaznacza się jeszcze do 4 roku życia [6]. Nakłada się tu jeszcze drugie zjawisko, a mianowicie podatność nasienia do zamrażania. Podatność nasienia do zamrażania występuje z pewnym opóźnieniem w stosunku do wieku osiągnięcia dojrzałości płciowej i wieku, w którym rozpoczyna się oddawanie nasienia ocenianego jako przydatne do sztucznego unasieniania. Badania Wolfa i wsp. (1965) wykazały, że istnieje dosyć znaczna rozpiętość wieku, w którym buhaje zaczynają oddawać nasienie poddające się mrożeniu. W wieku od 9 do 12 miesięcy, na 19 badanych buhajów, nasienie mroziło się zadowalająco jedynie od 5. Podobne obserwacje zebrali Cunningham i wsp. [4], którzy od buhajów w wieku 56 tygodni uzyskali średnio 22% ejakulatów poddających się mrożeniu, oraz Morstin i wsp. [2] pobierając nasienie od buhajów w wieku 52-57 tygodni i uzyskując średnio 15% ejakulatów mrozących się.

Dalsze obserwacje Morstina [20] prowadzone na buhajach bliźniętach rasy ncb wykazały, że nasienie poddające się mrożeniu jest produkowane ze średnim opóźnieniem, wynoszącym ok. 2 miesiące w stosunku do pierwszych ejakulatów wykazujących cechy użytkowe. Równocześnie też została wysunięta sugestia, że to zjawisko ma tło uwarunkowane genetycznie, gdyż u 70% badanych zwierząt zamrażalność nasienia wystąpiła w tym samym czasie u obu bliźnięt z pary. Natomiast między parami zaznaczały się wyraźne różnice wieku występowania tej cechy nasienia.

Zestawione przez nas wyniki zamrażania nasienia buhajów starszych wydają się wskazywać, że z kolei w wieku powyżej 7 lat zaznacza się pewne obniżenie przydatności nasienia do zamrażania (Wierzbowski i wsp. dane niepubl.). Równolegle też maleje gęstość nasienia. Zbiega się to z obserwacjami Knudsen [13], który stwierdził, że obniżenie czynności nabłonka nasieniotwórczego zaczyna występować u buhajów w wieku 7 lat jako zjawisko związane z procesem starzenia się.

Obserwacje te wskazują, że aczkolwiek zamrażanie nasienia jest możliwe u pewnego odsetka buhajów kończących 12 miesięcy, to na skalę użytkową staje się celowe dopiero od ok. 15 miesięcy.

Operowanie nasieniem zamrożonym pociągnęło za sobą potrzebę, co

zresztą decyduje o wartości metody, tworzenia zapasów nasienia mrożonego. Jest to konieczne ze względu na realizację programów hodowlanych opierających się na możliwości długotrwałego przechowywania nasienia. Dopóki bowiem nie zostaną opanowane metody pozwalające na szybszą ocenę wartości użytkowej reproduktorów, nieodzowne jest opieranie się na wartości użytkowej potomstwa. Pociąga to jednak za sobą konieczność przechowywania nasienia do czasu uzyskania wyników oceny, a więc w ciągu 5-7 lat. W ten sposób zostaje równocześnie określona rotacja zapasów nasienia. W rezultacie pojemność banków nasienia w hodowli bydła musi być dostatecznie duża, aby pomieścić zapasy nasienia narastające w ciągu wspomnianych 5-7 lat.

Stosownie do założeń programów hodowlanych, które zakładają możliwość zgromadzenia od buhaja od kilku do kilkudziesięciu tysięcy, czy więcej, porcji nasienia, musi być obliczana pojemność takiego banku. Na ilość potrzebnej przestrzeni chłodzonej rzutuje też w sposób bardzo istotny stosowana forma w jakiej nasienie jest zamrażane.

Przy ograniczonym zakresie stosowania nasienia mrożonego praktykowane jest tworzenie centralnych banków nasienia, tak jak to ma miejsce u nas i wielu innych krajach. Banki te służą potrzebom hodowli całego kraju, tak więc centralny bank działa w powiązaniu z rejonowymi bankami nasienia oraz zakładami unasieniania stosującymi nasienie mrożone. Podstawowym zadaniem CBN jest przechowywanie depozytów nasienia buhajów znajdujących się w wycenie, a więc przechowywanie nasienia w ciągu wielu lat. Rozwiązanie takie odciąża zakłady unasieniania od stosunkowo znacznych kosztów związanych z wieloletnim przechowywaniem nasienia. Równocześnie rejonowe banki nasienia nastawione na szybszy obrót nasieniem, gromadzą przede wszystkim nasienie buhajów o sprawdzonej użytkowości, nastawiając się na przechowywanie go nie dłużej jak 1 do 2¹ lat. Stwarza to możliwość ekonomicznego wykorzystania sprzętu i podnosi jego wydajność.

W dalszej perspektywie rejonowe banki należy traktować jako zakłady, które będą się stopniowo przestawiały na wyłączne stosowanie nasienia mrożonego w rejonie swojej działalności. Początki tego procesu widzimy obecnie w województwach: opolskim i poznańskim.

Niewątpliwie bardzo dogodnie jest u nas rozmieszczenie zakładów produkujących ciekły azot w stosunku do lokalizacji banków nasienia i zakładów unasieniania stosujących nasienie mrożone. Odległości pomiędzy wytwórcami a użytkownikami azotu są stosunkowo niewielkie. Właściwego rozwiązania wymaga jednak transport ciekłego azotu, który obecnie jest organizowany przez każdego użytkownika we własnym zakresie. Istnieje potrzeba utworzenia wyspecjalizowanej dystrybucji ciekłego azotu, podobnie jak to ma już miejsce w innych krajach. Sytuacja wydaje się dojrzała, aby użytkowników ciekłego azotu, ale amatorów w zakresie produkcji i transportu ciekłych gazów, zastąpić wyspecjalizo-

wanym przedsiębiorstwem. Wobec rosnącego zapotrzebowania na ciekły azot zarówno ze strony zakładów sztucznego unasieniania, jak i innych użytkowników wchodzących na rynek, również celowe staje się określenie obecnego i spodziewanego w ciągu najbliższych lat zużycia azotu dla potrzeb inseminacji i zapewnienia pokrycia tych potrzeb w produkcji przemysłowej.

Regulacji wymaga sprawa zaopatrywania nasienia przeznaczonego do przechowywania w stanie zamrożonym w urzędowe świadectwo sanitarno-weterynaryjne, stwierdzające, że zarówno nasienie, jak i dawca, odpowiadają obowiązującym przepisom weterynaryjnym.

Nasienie w stanie zamrożonym winno bowiem być traktowane jako niezależnie istniejący produkt zwierzęcy, o którego przydatności i wartości decyduje zarówno wartość dawcy jak i posiadane cechy własne. Należy pamiętać, że w założeniu metody leży możliwość użytkowania nasienia w ciągu wielu lat od chwili jego pobrania. Znaczenie tego stwierdzenia wynika stąd, że nasienie może być wprowadzane do użytku na wiele lat po śmierci dawcy. Musi ono jednak wówczas odpowiadać takim samym wymogom jakie się stawia zwierzętom żyjącym. Tak więc istnieje konieczność zaopatrywania depozytów nasienia w komplet urzędowych świadectw sanitarno-weterynaryjnych, bez których wprowadzanie nasienia do użytku może napotykać na sprzeciwy organów kontroli weterynaryjnej. Nieregulowanie dotychczas tych spraw zaznacza się obecnie przy międzynarodowej wymianie nasienia, gdzie konieczne staje się ściąganie potrzebnych informacji z lat poprzednich. Przy braku urzędowego dokumentu władz weterynaryjnych, pochodzącego z czasu gdy nasienie było pobierane, tzn. gdy buhaj żył lub był zdrowy, brak jest podstaw do wystawiania świadectw zgodnie z wymogami obowiązującymi przy wymianie i eksporcie nasienia.

Na zakończenie warto może wspomnieć, że pomysł utworzenia banków nasienia ma już przeszło 100-letnią historię. Mianowicie w 1866 r. Mantegazza podejmował próby zamrażania nasienia ludzkiego do temperatury -15°C , co mu nasunęło pomysł utworzenia banku nasienia i wykorzystania możliwości długotrwałego przechowywania i transportu nasienia mrożonego w hodowli zwierząt, a u ludzi zamrażanie nasienia żołnierzy udających się na wojnę dla zabezpieczenia posiadania legalnego dziedzica na wypadek śmierci.

PIŚMIENNICTWO

1. Barriere J.: Efficacite economique et technique de la congelation du sperme de bovins en pellets. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2 993, 1968.
2. Bartlett D. E.: The A.V.M.A. N.A.A.N. Code and the U.S.L.S.A. Recommended Regulations. Proc. of 2nd Technic. Conf. on A.I. and Reprod. N.A.A.B. 37, 1968.

3. Cassou R.: La miniaturisation des paillettes. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1009, 1968.
4. Cunningham D. C., Almquist J. P., Pearson R. E.: Reproductive capacity of beef bulls. II. Postbuberal relations among ejaculation frequency, sperm freezability and breeding potential. J. Anim. Sci. 26, 182, 1967.
5. Fergasson J. L., Berry W. T., Goodwin E. E.: Freezing bull semen in liquid nitrogen vapor without instrumentation. J. Anim. Sci. 20, 970, 1961.
6. Foote R. H.: Evaluate the whole semen processing procedure periodically. Proc. 2nd Technic. Conf. on A.I. and Reprod. N.A.A.B. 91, 1968.
7. Goffaux M., Parez M., Thommassey M., Vuidepot R.: Effects d'une durée de conservation de 2 ans sur la motilité et le pouvoir fécondant du sperme de taureau. Elevage Insém. 92, 3, 1966.
8. Hahn R.: Zur Technik des TG-N₂ — Semen; hier Handhabung und Temperaturverhältnisse der Stickstoffbehälter. Zuchthygiene 3, 14, 1968.
9. Hunter W. K.: Glicerolisation and freezing techniques with bull semen. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1053, 1968.
10. Jondet R.: Congelation rapide du sperme de taureau conditionne en paillettes. Rep. 5th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 4, 463, 1964.
11. Jondet R.: Quatre années de congelation rapide du sperme de taureau. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1057, 1968.
12. Jondet R.: Influence de la reduction du volume de la dose de sperme congelé. Rep. 6th Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1061, 1968.
13. Knudsen.: Cytomorphological investigations into the spermatogenesis of bulls with normal fertility and bulls with required disturbances in spermiogenesis. Acta path. microbiol. scand., Suppl. Cl. 1954.
14. Leidl W.: Neue Verfahren in der Künstlichen Besamung der Wirbeltiere. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 951, 1968.
15. Lovelock J. E.: Acta Biochem. Biophys. 10, 414, 1953 (cyt. za Meryman H. T.: Preservation of living cells. Federation Proc. 22, 81, 1963).
16. Malmberg G., Dyrendahl I.: A comparison of conception rate with frozen semen in medium and fine straws. Nord. Vet. Med. 21, 115, 1969 (ABA, 37, 2524, 1969).
17. Mantegazza P.: Fisiologia sullo sperma umano. Rendic. reale Ist. Lomb. 3, 183, 1866 (cyt. za Sherman J. K.: Low temperature research on spermatozoa and eggs. Cryobiology 1, 103, 1964).
18. Mixner J. P.: Fertility of bull semen frozen for twelve years. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1095, 1968.
19. Morstin J.: Zachowanie płciowe i produkcja nasienia buhajów w pierwszym roku wczesnej eksploatacji rozplodowej. Acta Agraria et Silvestria 1969 (w druku).
20. Morstin J.: Susceptibility of young bull semen to freezing. Acta Biol., cracov. Ser. zool. 12, 131, 1969.
21. Morstin J., Smorąg Z., Wierzbowski S.: Zamrażalność nasienia młodych buhajów ras: Aberdeen-angus, Hereford i Simentaler. Med. wet. 25, 169, 1969.
22. Nagase H., Niwa T.: Deep freezing bull semen in concentrated form. Rep. 5th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 4, 410, 1964.
23. Pilch J., Wierzbowski S.: Zamrażanie nasienia w ampułkach polietylenowych w parach azotu. Med. wet. 25, 221, 1969.
24. Polge C., Rowson L. E.: Long-term storage of bull semen at very low temperatures (—79°C). Rep. 2nd Int. Congr. Animal Reprod. 3, 90, 1952.
25. Polge C., Smith A. U., Parkes A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164, 666, 1949.
26. Stewart D. L., Bennett G. H.: The minimum number of spermatozoa per fro-

- zen semen insemination compatible with normal fertility in Cattle. Rep. 6th Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1167, 1968.
27. Ström B.: Influence upon fertility of bull semen of storage time in liquid nitrogen. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1171, 1968.
28. Sullivan J. J., Elliott F. I.: Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination. Rep. 6th Int. Congr. Animal Reprod. and A.I. 2, 1307, 1968.

С. Вежбовски

ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ В ИСКУССТВЕННОМ ОСЕМЕНЕНИИ
ЖИВОТНЫХ

Резюме

Обзор проблематики, связанной с применением замороженного семени в искусственном осеменении, а также проблем, связанных с длительным хранением семени и организацией банков (хранилищ) семени.

S. Wierzbowski

CRYOBIOLOGY PROBLEMS IN A.I. OF ANIMALS

Summary

A review of problems concerning application of frozen semen in insemination of animals and those connected with the long-term preservation of semen and the organization of semen banks is given.