

KONSERWACJA NASIENIA KNURA *IN VITRO* W ROZCIEŃCZALNIKU Z WERSENIANEM DWUSODOWYM (EDTA)

*Krystyna Rzeźnik-Kareta, Danuta Plewińska-Wierzbowska,
Edward Wierzchoś*

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania
Zwierząt Instytutu Zootechniki, Balice k. Krakowa
Kierownik: prof. dr hab. Stefan Wierzbowski

Rozwój hodowli trzody chlewnej zależy m.in. od wprowadzenia do szerokiej praktyki sztucznej inseminacji loch. W związku z tym konieczne jest zastosowanie odpowiedniego rozcieńczalnika, który umożliwiłby konserwację nasienia knura przez okres 24-48 godzin.

W celu zapewnienia odpowiedniej zdolności zapładniającej konserwowanego nasienia, Pliško [7] wprowadził do rozcieńczalnika glukozowo-cytrynianowego dodatek soli sodowej kwasu etylenodiamino-tetraoctowego (EDTA), zwanego Chelatonem. Substancja ta ma zabezpieczyć błonę komórkową i akrosom plemników przed litycznym działaniem enzymów osocza w czasie konserwacji nasienia.

Podjęte badania miały na celu sprawdzenie przydatności do konserwacji nasienia knurów — krajowego preparatu o nazwie wersenian dwusodowy (EDTA), który pod względem składu chemicznego i właściwości fizyko-chemicznych jest odpowiednikiem preparatu Chelaton stosowanego przez Pliškę.

MATERIAŁ I METODA

Przeprowadzone badania polegały na porównaniu przeżywania plemników w temperaturze 18-20°C w nasieniu konserwowanym w rozcieńczalnikach z EDTA wg Pliški [7], Podany'ego i wsp. [8], z przeżywaniem nasienia konserwowanego w rozcieńczalniku żółtkowo-glukozowym wg Hoffmanna [4] i nasieniem nierozcieńczonym.

Nasienie od 4 knurów rasy wbz w wieku dwu lat i wadze od 150 do 250 kg, pobierano co drugi dzień metodą manualną, umożliwiającą do-

kładne oddzielenie poszczególnych frakcji ejakulatu. Frakcję II — ubogą w plemniki i III — żelową odrzucano, a do dalszych badań używano około 50 ml frakcji nasiennej o dużej zawartości plemników zakładając, że wskutek dużej koncentracji plemników w tej frakcji, ewentualne toksyczne działanie wersenianu dwusodowego powinno dość szybko zaznaczyć się w spadku ich ruchliwości w czasie przechowywania nasienia.

Uzyskane nasienie dzielono na cztery części, z których trzy rozcieńczano w stosunku 1 : 4 następującymi rozcieńczalnikami, sporządzonymi ściśle wg receptury podanej przez poszczególnych autorów:

rozcieńczalnik wg Pliški (1965)

H ₂ O dest.	— 1000 ml
glukoza	— 60 g
35,7% cytrynian sodu × 2H ₂ O	— 10 ml
4% NaOH	— 8 ml
wersenian dwusodowy	— 3,7 g
penicylina	— 500 000 j.m.
streptomycyna	— 500 mg

rozcieńczalnik wg Podany'ego i Muzikanta (1970)

H ₂ O dest.	— 1000 ml
glukoza	— 51 g
cytrynian sodu × 5H ₂ O	— 1,8 g
Na ₂ CO ₃ × 10 H ₂ O	— 1,35 g
wersenian dwusodowy	— 0,665 g
żółtko	— 30 ml

rozcieńczalnik wg Hoffmanna (1959)

H ₂ O dest.	— 1000 ml
glukoza	— 35 g
żółtko	— 250 ml
streptomycyna	— 1000 mg
penicylina	— 1 000 j.m.

Czas przeżywania plemników w nasieniu konserwowanym porównywano z czasem przeżywania plemników w nierozcieńczonej frakcji nasiennej ejakulatu, przetrzymywanej w temperaturze 18-20°C oraz z przeżywaniem plemników w 14 porcjach nasienia zmieszanego z ejakulatem, pobranych od czterech knurów w tym samym czasie i rozcieńczonych rozcieńczalnikiem Pliški w takim stosunku, aby w objętości 100 ml znajdowało się około 10 mld ruchliwych plemników. Porcję tę traktowano także jako ewentualną dawkę nasienia, która mogłaby być stosowana w praktyce inseminacyjnej.

Rozcieńczone nasienie oraz porcję nasienia nierozcieńczonego rozlewano do 10 ml probówek i po szczelnym zakorkowaniu umieszczano w termosie z wodą, w którym temperatura wahała się w granicach 18-20°C. Ocenę ruchliwości plemników w konserwowanym nasieniu przeprowadzano co 24 godziny po uprzednim 5-10 minutowym, energicznym wytrząsaniu (każdej próbki) przy dostępie powietrza.

WYNIKI

Najwyższymi wartościami czasu i współczynnika przeżywania plemników odznaczało się nasienie zmieszane z czterech ejakulatów od różnych knurów. Przeżywało ono średnio 216 godzin, a współczynnik przeżywania wynosił średnio 62,03/22,7. Ogólna ruchliwość plemników w tym nasieniu po 3 godzinach konserwowania wynosiła 70-80%, po 24 godzinach — 60%, po 48 godzinach — 50% oraz po 72 godzinach konserwacji — 40 procent.

Plemniki z frakcji nasiennej ejakulatu od poszczególnych knurów, konserwowanej w rozcieńczalniku Pliški [7], przeżywały średnio 78,9 godzin, a współczynnik wynosił średnio 33,2/11,7. Nasienie konserwowane w rozcieńczalniku Podany'ego [8], przeżywało średnio 50 godzin, a współczynnik wynosił średnio 20,8/9,1, czas przeżywania nasienia w rozcieńczalniku wg Hoffmanna [4] wynosił średnio 42,7 godzin, a współczynnik średnio 19,8/7,8. Plemniki z frakcji nierozcieńczonej stanowiącej materiał kontrolny, przeżywały średnio 56,1 godzin, natomiast wartość współczynnika przeżywania wynosiła średnio 16,6/7,7.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przechowywanie nasienia knura przez okres 2-3 dni w rozcieńczalnikach żółtkowo-glukozowym, glukozowo-cytrynianowo-żółtkowym i glukozowo-winianowo-żółtkowym [5] lub glukozowo-dwuwęglanowo-żółtkowym [13] prowadzi do odłączenia się akrosomów, a także do utraty DNA zawartego w plemnikach [7, 10, 11]. Jest to spowodowane litycznym działaniem enzymów osocza nasienia, jak też enzymów uwalnianych przez błonę komórkową zamierających plemników. Tym również należy tłumaczyć zmniejszanie się zdolności zapładniającej nasienia knura przechowywanego przez dłuższy okres czasu [7, 12].

Ponieważ EDTA odznacza się własnością wiązania dwuwartościowych kationów wapnia i magnezu w kompleks unieczynnający te enzymy, Pliško [7] wprowadził do 1000 ml rozcieńczalnika glukozowo-cytrynianowego 3,7 g Chelatonu. Kompleks EDTA-Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ osłaniając błonę komórkową plemników uniemożliwia jednocześnie przenikanie jednowar-

tościowych anionów z osocza do wnętrza komórki, przez co utrzymuje się także na stałym poziomie układ osmotyczny osocze — cytoplazma komórki [9]. Zakładając, że do utrzymania metabolizmu plemników podczas konserwowania nasienia niezbędna jest obecność niewielkich ilości dwuwartościowych kationów, Sadownikova [10] zmniejszyła ilość dodawanego Chelatonu do 1,6 g/1000 ml rozcieńczalnika, a w celu zapewnienia odpowiedniego ciśnienia osmotycznego roztworu zastosowała dodatek niewielkich ilości dwuwęglanu sodu. Podobnie postępował Podany [8], przy czym zamiast Chelatonu stosował 0,665 g/1000 ml rozcieńczalnika Komplexonu III oraz 30 ml żółtka, zalecając obniżenie temperatury w czasie przechowywania nasienia do 4°C.

Możliwość konserwowania nasienia knura w temperaturze 4°C w rozcieńczalniku z EDTA wykazali także Serdjuk i Belikov [11], zalecając wprowadzenie do rozcieńczalnika glukozowo-cytrynianowego 30-50 ml żółtka jaja kurzego oraz zmniejszenie ilości Chelatonu do 1 g/1000 ml. Archipovec [1] zaleca natomiast zwiększenie ilości EDTA do 5 g/1000 ml i zastąpienie glukozy fruktozą lub miodem.

Obserwacje przeprowadzone przez Doroškova i Kištymową [3], Novikovą [6], Serdjuka i Belikova [11] oraz Vysockiego i wsp. [15] wykazały, że nasienie konserwowane w rozcieńczalniku z dodatkiem EDTA można przewozić po różnej nawierzchni dróg i na duże odległości, przy czym należy je umieszczać w szczelnych naczyniach tak, aby między korkiem a nasieniem nie było warstwy powietrza.

Konserwowanie nasienia w rozcieńczalnikach z EDTA, niezależnie od ilości i rodzaju użytego preparatu, daje zadowalające rezultaty. Archipovec [1] i Sadownikova [10], stosując w rozcieńczalniku 5 g/1000 ml i 1,6 g/1000 ml Chelatonu, stwierdzili po 3-5 dniach konserwowania, 50-70% ruchliwych plemników. Podany [8], używając do rozcieńczalnika 0,665 g/1000 ml Komplexonu III, stwierdził po 24 godzinach konserwowania w temperaturze 20°C 50% ruchliwych plemników, a w temperaturze 4°C taką samą ilość po upływie 120 godzin.

Po zmodyfikowaniu rozcieńczalnika wg Pliški, przez zastąpienie Chelatonu Chelaplexem III plemniki zachowywały ruchliwość przez dwie doby przy konserwowaniu nasienia w temperaturze 20°C; potwierdzili to Busch i Stolze [2] zastępując w rozcieńczalnikach wg Pliški, Serdjuka i Sadownikovej Chelaton — 3,7 g/1000, 1 g/1000 i 1,6 g/1000 ml Chelaplexu III.

Na podstawie oceny czasu i analizy współczynnika przeżywania nasienia knura w temperaturze 18-20°C w przeprowadzonym przez nas doświadczeniu stwierdzono, że frakcje nasienne konserwowane w rozcieńczalniku wg Pliški i Podany'ego miały większą wartość w porównaniu z rozcieńczalnikiem glukozowo-żółtkowym i nierozcieńczonym nasie-

niem. Widać z tego, że wersenian dwusodowy nie wywiera ujemnego działania na plemniki knura w stężeniu 3,7 i 0,665 g/1000 ml. Czas przeżywania zaś plemników w nasieniu rozcieńczonym wg Pliški w temperaturze 18-20°C przez 9 dni i zachowanie do 72 godzin co najmniej 40% plemników ruchliwych w dawce inseminacyjnej wskazuje na to, że rozcieńczalnik ten może być stosowany do inseminacji trzody chlewnej.

WNIOSKI

1. Krajowy preparat o nazwie wersenian dwusodowy (EDTA) nie wykazuje toksycznego działania na plemniki knura.

2. Rozcieńczalnik wg Pliški z dodatkiem wersenianu dwusodowego może być użyty do konserwowania nasienia knura przez okres około trzech dni w temperaturze 18-20°C.

PISMIENNICTWO

1. Archipovec A. I.: Primenenie razbavitelej i konservatov pri chranenii spermy chrjakov; Svinovodstvo 11, 28, 1966.
2. Busch W., Stoze R.: Ein Beitrag zur Konservierung von Ebersperma; Fortpfl. Besam Haustiere, 5, 212, 1969.
3. Doroskov V. B., Kistymova V. V.: Osemenenie swinej transportirovannoj spermoj; Svinovodstvo, 6, 34, 1966.
4. Hoffmann H. H.: Experiments with preservation of boar semen by freezing; Lnaug. Dis. Münschen 1959.
5. Miłovanov V. K.: Biologija vozproizvedenija i iskusstvennoe osemenenie životnych. Moskva 1962.
6. Novikova O. H.: Transportirovka spermy chrjakov; Svinovodstvo, 10, 15, 1966.
7. Pliško N. T.: Sposob prodlenija žizni i oplodotvorjajuscej sposobnosti połovych kletok chrjaka; Svinovodstvo 6, 37, 1965.
8. Podany J., Muzikant J.: Konzervace kanciho spermatu in vitro; Vet. Med. Praga 15, 39, 1970.
9. Popov P. S.: Vlijanie kationov i anionov na pereživaemost spermy chrjaka; Svinovodstvo, 4, 13, 1968.
10. Sadovnikova M. T.: Chranenie semeni chrjakov bez chladoagentov; Svinovodstvo, 5, 28, 1966.
11. Serdžuk S. J., Belikov A. A.: Osemenenie svinej transportirovannoj spermoj. Svinovodstvo, 8, 28, 1967.
12. Shannon P. C., Curson B.: Tixic affect and action of dead sperm on dilutet bovine semen J. Dairy Sci. 55(5), 615, 1972.
13. Sojołovskaja J. V.: Iskustviennoje osemenenie svinej. Sielchozizdat Moskva 1962.
14. Tschinkel J., König K.: Die anwendung von Verdünnermedien mit ADTA zur Konservierung von Ebersperma, Fortpfl. 6, 14, 1970. Besam. Haustiere.
15. Vysockij N., Reguzov A., Gołysev N.: Dalnjaja transportirovka semeni chrjaka s primenenem oksigenacii; Životnovodstvo [2], 57, 1968.

Streszczenie

Krajowy preparat o nazwie wersenian dwusodowy (EDTA) okazał się w pełni przydatny do konserwowania nasienia knura. Analiza czasu i współczynnika przeżywania plemników w nasieniu knura w temperaturze 18-20°C wykazała, że frakcje nasienne konserwowane w rozcieńczalniku wg Pliški i Podany'ego odznaczają się lepszą przeżywalnością, niż nasienie w rozcieńczalniku glukozowo-żółtkowym wg Hoffmana. Plemniki konserwowane rozcieńczalnikiem wg Pliški z dodatkiem 3,7 g/1000 ml wersenianu dwusodowego przeżywały średnio 79 godz., rozcieńczalnikiem wg Podany'ego z 0,665 g/1000 ml EDTA — 50 godz., natomiast rozcieńczalnikiem wg Hofmanna — 42,7 godzin. Nasienie traktowane jako ewentualna dawka inseminacyjna przeżywało średnio do 72 godzin. Wersenian dwusodowy nie wykazywał toksycznego działania na plemniki knura w stężeniach 3,7 g/1000 ml i 0,665 g/1000 ml.

K. Жезник-Карета, Д. Плевиньска-Вежбовска, Э. Вежхось

ХРАНЕНИЕ СЕМЕНИ ХРЯКА *IN VITRO* В РАЗБАВИТЕЛЕ
С СОЛЬЮ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРАУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ
ДВУЗАМЕЩЕННОГО НАТРИЯ (ЕДТА)

Резюме

Отечественный препарат — соль этилендиаминтетрауксусной кислоты двузамещенного натрия (ЕДТА), оказался полностью пригодным для хранения семени хряка. Анализ времени и коэффициента переживаемости семени хряка в температуре 18°-20° показал, что семенные фракции хранимые в разбавителе — рецептура Плишко и Доманы — отличаются более высокими величинами этих показателей по сравнению с семенем разбавленным глюкозо-желточным разбавителем по Гоффману. Семенная фракция, хранимая в разбавителе Плишко с добавлением 3,7 г/1000 мл соли этилендиаминтетрауксусной кислоты двузамещенного натрия переживала в среднем 79 часов, в разбавителе Поданы с добавкой 0,665 г/1000 мл ЕДТА — 50 часов, а в разбавителе Гоффмана — 42,7 часа. Семя принятое за достаточную дозу для осеменения переживало в среднем около 72 ясов. Соль этилендиаминтетрауксусной кислоты двузамещенного натрия в концентрациях 3,7 г/1000 мл и 0,665/1000 мл не отличалась токсическим влиянием на живчиков хряка.

K. Rzeźnik-Kareta, D. Plewińska-Wierzbowska, E. Wierzchoś

PRESERVATION OF BOAR SEMEN *IN VITRO* IN DILUENT
WITH ADDITION OF VERSENATE (EDTA)

Summary

The Polish preparation Versenate (EDTA) has been found to be fully satisfactory for the preservation of boar semen. Analysis of survival time and survival rate of boar semen stored at 18-20°C indicated that sperm-rich fractions preserved

in the diluent, according to Plisko and Podany, represent in comparison with semen diluted in glicerol-yolk-citrate higher values of these rates.

The survival time of a sperm-rich fraction preserved in diluent, according to Plisko, with addition of 3.7 g/1000 ml of Versenate was on the average 79 hours, in diluent according to Podany with addition of 0.665 g/1000 ml of EDTA-50 hours, and in diluent according to Hoffmann — 42.7 hours. The survival time of 72 hours was considered as satisfactory, in rating a semen sample as suitable for insemination. The concentrations of 3.7 g/1000 ml and 0.665 g/1000 ml Versenate did not manifest toxicity on boar spermatozoa.