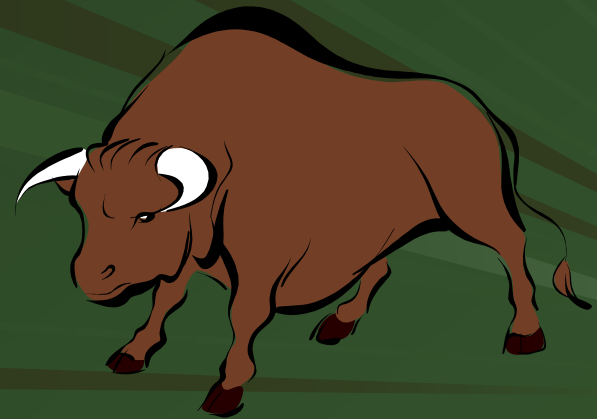


KONSERWACJA
NASIENIA SAMCÓW
ZWIERZĄT
DOMOWYCH



Konserwacja nasienia – jest to takie postępowanie z ejakulatem lub jego częścią, w wyniku którego uzyskujemy możliwość jego wykorzystania w innym miejscu i czasie bez znaczących strat dla jego wartości zapładniającej

Sposoby konserwacji nasienia:

- w stanie płynnym
- w stanie głębokiego zamrożenia (-196°C)

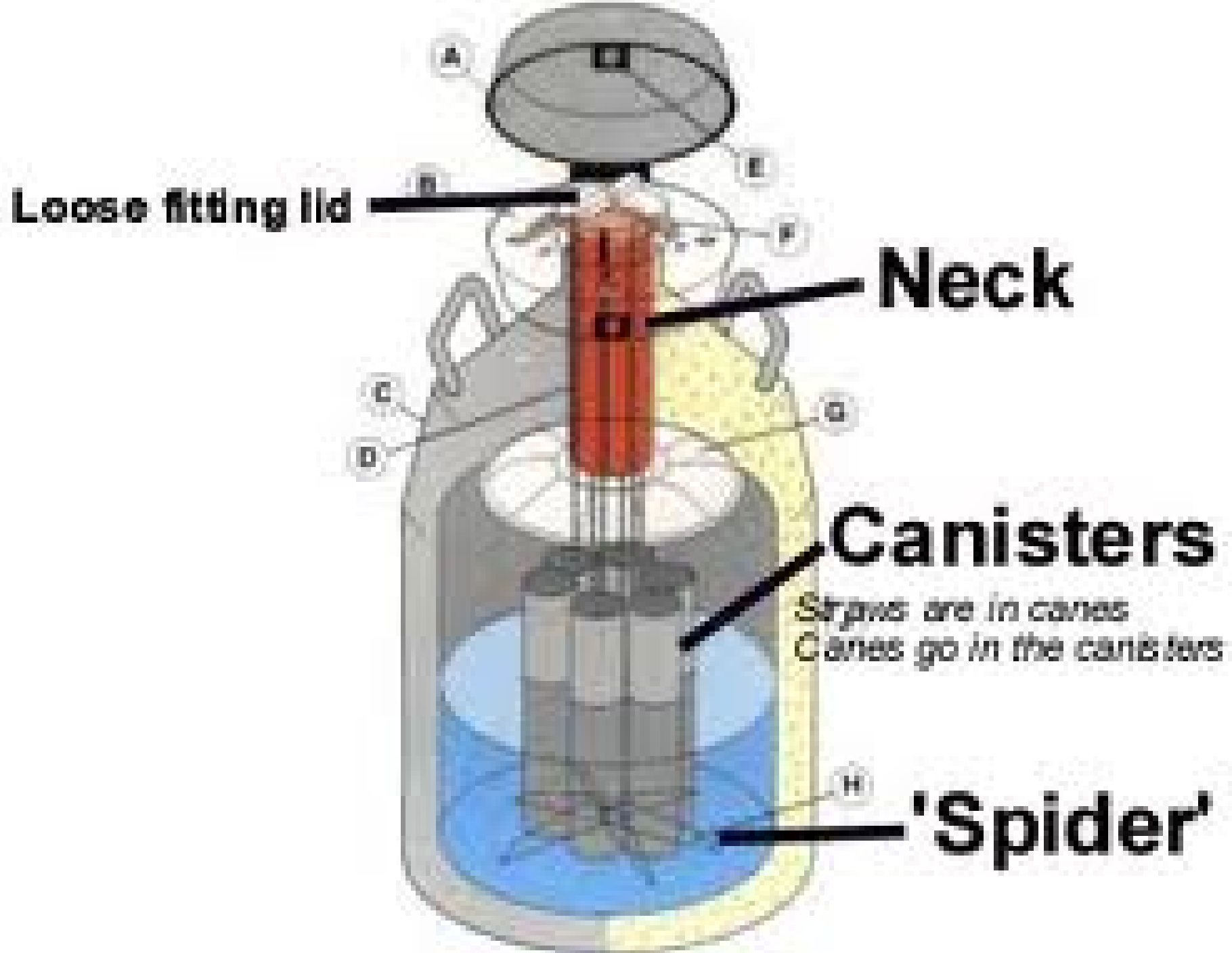


Zestaw do przygotowywania schłodzonego nasienia





Loose fitting lid



Neck

Canisters

*Straws are in canes
Canes go in the canisters*

'Spider'

Cechy dobrego rozrzedzalnika

- zapewnia ochronę plemników podczas konserwacji i długotrwałego przechowywania
- stanowi źródło energii dla plemników
- zapewnia odpowiednie pH (kwasowość), osmolarność i siłę jonową plazmy

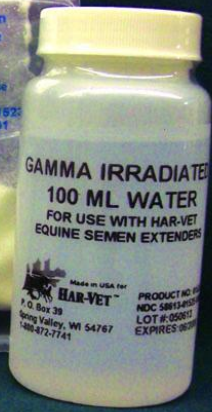
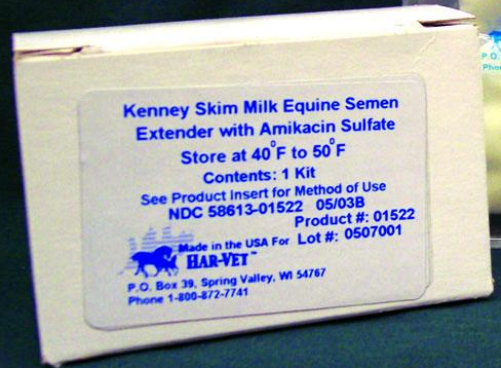


Substancje dodawane do rozrzedzalników utrzymujące stałe pH (około 7,0):

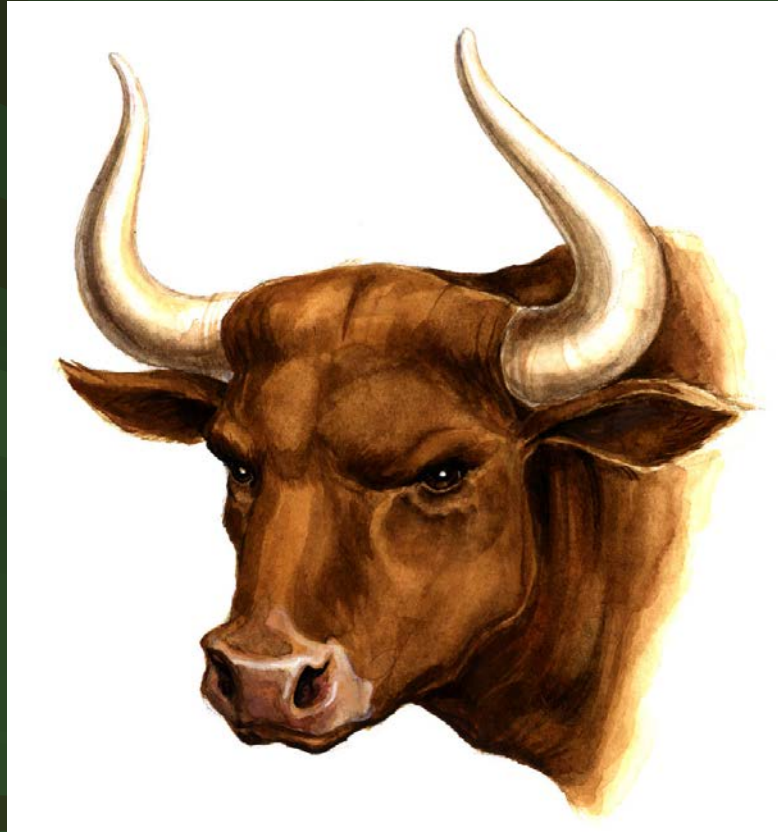
- 1) Bufor fosforanowy
- 2) Żółtko jaja kurzego
- 3) Białko mleka
- 4) Bufory komercyjne



Lipoproteiny żółtka jaja kurzego o niskiej gęstości (LDL) i fosfolipidy są składnikami chroniącymi plemniki przed zjawiskiem szoku chłodowego poprzez opłaszczanie błony komórkowej plemnika, modyfikując wymianę dyfuzyjną pomiędzy środowiskiem wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym.

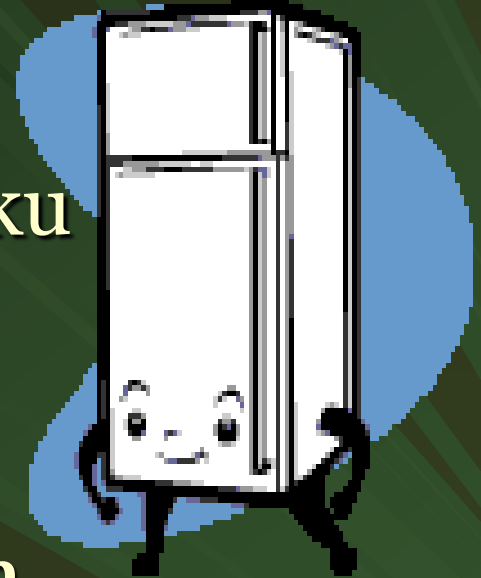


Konserwacja nasienia buhaja



Konserwacja przez zamrożenie w ciekłym azocie:

- 1) wstępne rozrzedzenie rozcieńczalnikiem I w stosunku 1:1
- 2) ochłodzenie do temperatury 5°C
- 3) ponowne rozrzedzenie 1:1 tym rozrzedzalnikiem ale z dodatkiem rozrzedzalnika II
- 4) pozostawienie nasienia w tym środowisku przez 6 h



Ekwilibracja

(proces równoważenia) – zmiany osmotyczne zachodzące we wnętrzu plemników w wyniku przenikania glicerolu

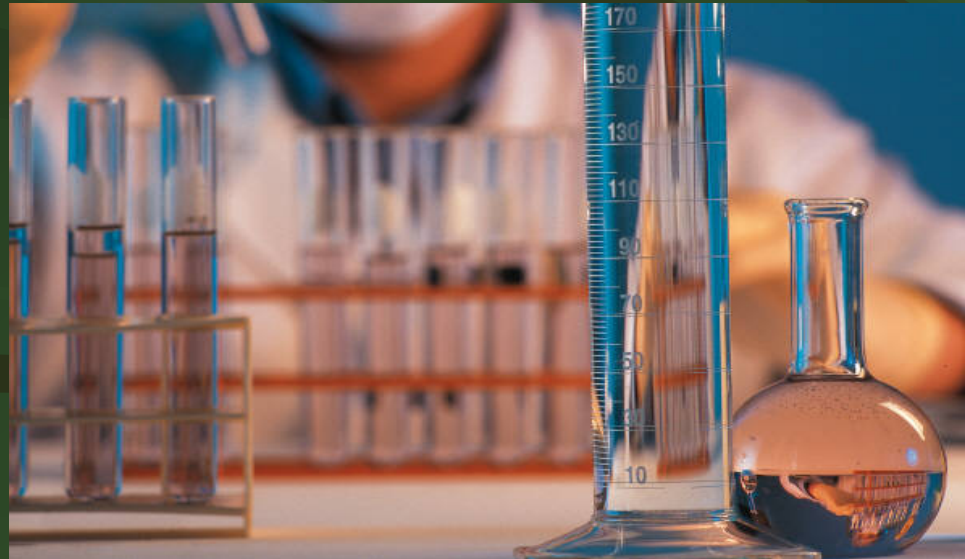


🔹 Rozrzedzalnik I:

- Roztwór podstawowy
- Woda redestylowana
- Żółtko jaja kurzego

🔹 Rozrzedzalnik II:

- Roztwór podstawowy
- Glicerol (w tej samej objętości co woda w rozrzedzalniku I)
- Żółtko jaja kurzego



Sposoby mrożenia nasienia:

- zamrażanie w kulkach
- zamrażanie w słomkach

Schemat mrożenia nasienia w kulkach:

Pobranie nasienia i ocen wstępna

Rozrzedzenie wstępne, temp. 22-23 °C,
Bez dodatku glicerolu

Rozrzedzenie ostateczne w temp. 5°C
Z dodatkiem 4% glicerolu

30-90 min. ekwilibracji

Mrożenie na tafli suchego lodu 10 min.

Mrożenie w parach ciekłego azotu (– 140°C) - 10 min.

Mrożenie i przechowywanie w ciekłym azocie (- 196 °C)

Rozmrożenie w 2,5 ml soli fizjologicznej 37 °C

Schemat mrożenia w słomkach

Pobranie nasienia i ocen wstępna

Rozrzedzenie wstępne, temp. 22-23 °C,
Bez dodatku glicerolu

Rozrzedzenie ostateczne w temp. 5°C
Z dodatkiem 4% glicerolu

30-90 min. ekwilibracji

Napełnianie słomek rozrzedzonym nasieniem,

Mrożenie w parach ciekłego azotu (– 140°C) - 10 min.

Mrożenie i przechowywanie w ciekłym azocie (- 196 °C)

Rozmrożenie w łaźni wodnej 37 °C

Konserwacja nasienia knura



Nasienie w stanie płynnym

- Stosowane częściej
- Lepsze wyniki zapłodnialności niż nasieniem mrożonym
- Rozrzedzanie 1:1 do 1:5, gdyż nasienie knura ma dużą koncentrację plemników
- Chłodzimy do 5°C
- Nasienie zachowuje żywotność do 3 dni

Konserwacja nasienia knura

❖ Konserwacja w stanie płynnym

1. Usunięcie frakcji galaretowatej
2. Wstępne obniżenie temp. łaźni wodnej 32-35 °C
3. Ocena nasienia
4. Rozrzedzenie:
 - a) **jednostopniowe**
 - do końcowej objętości
 - pakowanie
 - a) **dwustopniowe**
 - rozrzedzenie 1:3 lub 1:6
 - pakowanie
 - końcowe rozrzedzenie przed inseminacją

Rodzaje rozrzedzalników dla knura:

- ❖ rozrzedzalnik CO₂ (ITV) do przechowywania nasienia w temp. pomieszczenia
- ❖ rozrzedzalnik zawierający w składzie EDTA (rozrzedzalnik Kiev, Gueldph, Zorlesco, Modena, Androhep) do przechowywania w temp. 5°C
- ❖ rozrzedzalnik Bestville do przechowywania w temp. 20 °C lub 16 °C



Konserwacja nasienia w niskich temperaturach

- Mrożenia stosowane głównie przy eksporcie
- Użycie w praktyce ograniczone
- Pracochłonne
- Kosztowne
- Gorsze wyniki zapłodnialności
- Nasienie knura źle znosi zamrażanie i rozmrażanie

- Nasienie knura wrażliwe na szok temperaturowy
- Obniżenie temperatury powoduje
 - Ubytek jonów potasu i magnezu
 - Wzrost jonów sodu i wapnia
- Plemniki pobierają jony wapnia do wnętrza i zmieniają ultrastrukturę

❖ Konserwacja nasienia w stanie zamrożenia:

1. Usunięcie frakcji galaretowatej
2. Rozrzedzenie do 180-240 ml (z EDYTA)
3. Ocena koncentracji ruchliwych plemników
4. Powolne ochładzanie do 15°C
5. Wirowanie 10 min. 1900g
6. Rozrzedzenie (laktoza 11% + żółtko 20%)
7. Oziębienie przez 1,5 h do 5°C
8. Rozrzedzenie końcowe (laktoza + żółtko + glicerol 6% + pasta Orvus 1,5%)
9. Napełnienie słomek 5 ml (mogą też być słomki o pojemności 2 ml i 0,5 ml)
10. Zamrażanie 20 min. w parach ciekłego azotu
11. Przechowywanie w ciekłym azocie

Rozrzedzalniki do mrożenia nasienia knura:

- TES-NaK
- TEST
- Bestville (BF3, BF5)
- TRIS-Fruktoza-EDTA
- Żółtkowo-glukozowy
- Laktozowo-żółtkowy-LEY



❖ Zawierają w swoim składzie:

- cukry (glukozę, fruktozę lub laktozę)
- białka lub proteiny (żółtko jaja kurzego, mleko lub kazeinę)
- bufony (TES, TRIS, cytrynian sodu)
- glicerol

Glicerol

- 4-8% zapewnia maksymalną ruchliwość plemników, ale negatywny wpływ na jakość akrosomu
- 0,05-1% mniejsza ruchliwość plemników

Najczęściej stosujemy stężenie 1-4%

Konserwacja nasienia tryka



Przechowywanie nasienia

- Konserwacja w stanie płynnym
 - 0.5°C lub $10-15^{\circ}\text{C}$
- Konserwacja w stanie zamrożonym
 - -196°C

Przykładowy skład najbardziej przydatnych rozrzedzalników:



- Laktoza 9%, dekstran 5%, EDTA – Na 0,135%, Tris 0,105%, żółtko 20%, glicerol 14% (włączony w drugie rozrzedzenie) oraz antybiotyki
- Sacharoza 9%, EDTA 0,84%, antyoksydant DTBK 0,5%, żółtko 10%, glicerol 5%, antybiotyki
- Metoda Kaznitio: sacharoza 10%, EDTA 0,8%, fosforan potasu 1%, octan α -tokoferolu 0,2-0,6%, żółtko 20%, glicerol 4%

Konserwacja nasienia ogiera



Przechowywanie nasienia w stanie płynnym

Rozrzedzalnik według Kenney'a i wsp.:

- sproszkowane i odtłuszczone mleko krowie 2,4 g
- glukoza 4,9 g
- dwuwęglan sodu (roztwór 7,5%) 2 ml
- gentamycyna 50mg/ml – 2 ml
- woda redestylowana 92 ml
- osmolarność 365 mOsm/kg
- pH 6,99



Przechowywanie nasienia w ciekłym azocie

Rozrzedzalnik według Naumienkova i Romankowej:

- woda destylowana 100 ml
- laktoza 6,6 g
- mannitol 2,1 g
- EDTA 0,15 g
- cytrynian sodu 35,7% - 0,45 ml
- kwaśny węglan sodu 4,2% - 0,35 ml
- żółtko jaja kurzego 2,5 g
- glicerol 3,5 ml

Sposób rozrzedzania i mrożenia nasienia ogiera w modyfikacji Palmera

Rozrzedzalnik INRA-82:

- sterylne mleko UHT – 1 l
- roztwór (glukoza 50 g, laktoza 3 g, rafinoza 3 g, cytrynian sodu 0,6 g, cytrynian potasu 0,82 g, penicylina 100 tys. j.m., gentamycyna 100 mg) – 1 l
- żółtko jaja kurzego 2%
- glicerol 2,5%

Technika mrożenia

Rozrzedzić 1 cz. nasienia i 4 cz. roztworu INRA-82, schłodzić do temp. 4°C. Końcowa koncentracja plemników powinna wynosić 100 mln/ml, dokonać 1-godzinnej ekwilibracji w 4°C, następnie napełnić 0,5 ml słomki i zamrozić w parach ciekłego azotu.

Do inseminacji używa się 8 słomek, które po wyjęciu z ciekłego azotu zanurza się w łaźni wodnej o temp. 37°C na 30 sek. Rozmrożone nasienie rozrzedza się w 16 ml rozrzedzalnika (INRA-82 bez dodatku glicerolu) podgrzanego do temp. 37°C i dokonuje się unasienniania klaczy.

Konserwacja nasienia psa



Sposoby postępowania z nasieniem psa:

- ❖ użycie nasienia świeżego bezpośrednio po pobraniu
- ❖ schłodzenie do temp. 5-10°C i przechowywanie przez 24 godz.
- ❖ rozrzedzenie i użycie do inseminacji
- ❖ rozrzedzenie oraz schłodzenie do temp. około 4°C i przechowywanie przez kilka dni
- ❖ odpowiednie rozrzedzenie nasienia i konserwacja poprzez zamrożenie w kulkach bądź słomkach.

Rodzaje rozrzedzalników dla nasienia psa:

- chude mleko po ogrzaniu do 92-94°C, przez 10 min. I schłodzone
- mleko UHT zawierające 2% tłuszczu
- Cytrynian sodu (2,9%) - 80%, żółtko – 20%
- Tris – żółtkowy zawierający 8% glicerolu i 20% żółtka
- rozrzedzalniki komercyjne: Triadyl, Laiciphos, Biociphos, Clone – skład zastrzeżony przez producenta.



Konserwacja nasienia kota



Konserwacja nasienia kota



Rozrzedzalnik zwykle zawiera: 20% żółtka, 11% laktozy, i 4% glicerolu oraz antybiotyki – penicylinę 1000 j.m., streptomycynę 1000 µg/ml. Bezpośrednio po pobraniu nasienie jest rozrzedzane 200 µl 0,9% NaCl oraz 200 µl rozrzedzalnika w temp. pokojowej. Następnie po ekwilibracji trwającej 20 min. w temp. 5°C, nasienie jest ponownie rozrzedzane 200 µl i zamrażane w formie kulek na suchym lodzie lub w ciekłym azocie. Najwyższą liczbę żywych plemników uzyskuje się po szybkim rozmrożeniu nasienia w temp. 37°C w płynie o 0,154 mol NaCl. DO inseminacji nasieniem mrożonym używa się dawki zawierającej 50 – 100 x 10⁶ plemników ruchliwych w objętości 0,1 ml.



Dziękuję za uwagę.