



dr inż. Beata Irena Cejko,
dr inż. Radosław Kajetan Kowalski
*Zakład Biologii Gamet i Zarodka,
 Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań
 Żywności Polska Akademia Nauk, Olsztyn*

Podstawowym wyznacznikiem jakości mleczu ryb jest ruchliwość plemników. W oparciu o ten parametr dokonuje się oceny jakości gamet samców ryb i szacuje się ich predyspozycję do zapłodnienia ikry, krótkookresowego przechowywania lub kriokonserwacji mleczu. Standardowa ocena ruchliwości plemników ryb prowadzona jest w oparciu o metodę subiektywną z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego. Wykorzystywana powszechnie w diagnostyce mleczu w wylęgarniach, metoda subiektywna obciążona jest dużym błędem wynikającym z subiektywności oceny obserwatora. Oko każdego z nas rejestrując ten sam obraz skupia uwagę na innych detalach. Zatem każdy z nas może zobaczyć mniej lub więcej poruszających się w tym samym polu widzenia plemników, dlatego dokładność metody subiektywnej określa się na $\pm 10\%$. Z punktu praktyki, gdzie najczęściej zapładnia się ikry znacznym nadmiarem mleczu, dokładność tej metody jest akceptowalna, ale biorąc pod uwagę doskonalenie technik rozrodu gatunków nowych w akwakulturze, czy opracowywania metod mrożenia gamet cennych gatunków ryb, gdzie każdy plemnik jest niemal na wagę złota, błąd taki może zaważyć na przyszłości przedsięwzięcia.

Historię ludzkości określa się często jako historię postępu. Taki postęp miał (i nadal ma) miejsce w wielu dziedzinach nauki. Nauki rolnicze, do których należy zaliczyć Rybactwo, sporą część swoich osiągnięć budowały na gruncie opracowanym wcześniej chociażby dla medycyny. Takim przykładem jest wdrożenie do badań nad biologią gamet ryb technik wcześniej wykorzystywanych

u kręgowców wyższych, w tym człowieka. W latach 90-tych XX wieku wraz z rozwojem technologii komputerowej powstała nowa metoda diagnozowania ruchliwości plemników. System CASA (Computer Assisted Semen Analysis), bo tak w skrócie się go określa, wykorzystywano początkowo w laboratoriach klinicznych w celu określania kondycji nasienia ludzkiego. Jako wiarygodne narzędzie badawcze i diagnostyczne w określaniu płodności gamet męskich system CASA został zaakceptowany przez międzynarodo-

kowość ruchu (STR tj. $VSL \times VAP - 1 \times 100\%$) oraz wskaźnik drgań plemnika (WOB tj. $VAP \times VCL - 1 \times 100\%$). Oko ludzkie (metoda subiektywna) ocenić jedynie może przybliżony odsetek plemników poruszających się, oraz ewentualnie charakter tego ruchu (liniowy lub kołowy). W odróżnieniu od metody subiektywnej, analiza CASA pozwala na obiektywny pomiar nie tylko odsetka plemników ruchliwych, czy czasu trwania ruchu, ale pozwala na wyznaczenia licznych parametrów ruchu tj. prędkości plemników,



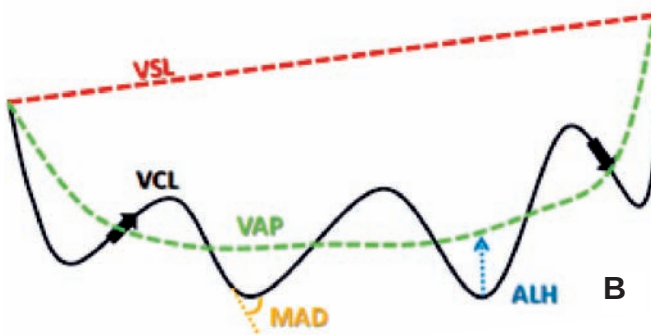
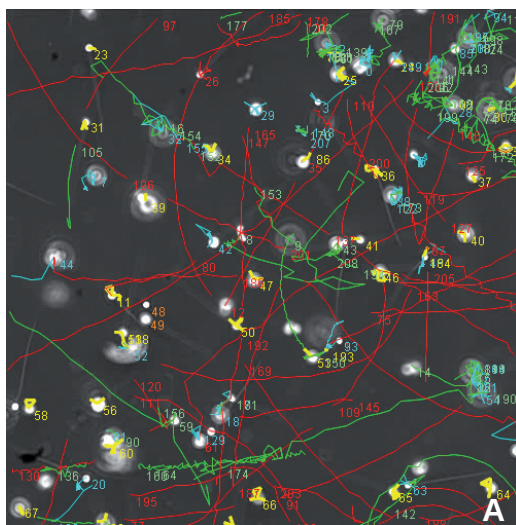
Fot. 1. Systemy komputerowe wyposażone w monitor, kamerę zintegrowaną z mikroskopem oraz oprogramowanie komputerowe firmy IHN Medical (A) oraz Hobson Vision (B) – fot. B.I. Cejko.

we gremia eksperckie i wykorzystywany jest obecnie na szeroką skalę w badaniach diagnostycznych mleczu ssaków oraz ryb.

Analiza ruchliwości plemników w oparciu o system CASA, określana jest na podstawie I i II-rzędowych parametrów ruchu. Do I-rzędowych zalicza się: odsetek plemników ruchliwych (MOT, %), odsetek plemników o ruchu progresywnym (PRG, %), średnią prędkość plemników (VAP, μm s⁻¹), prędkość całkowitą plemników (VCL, μm s⁻¹), prędkość prostoliniową plemników (VSL, μm s⁻¹), średnią kątową zmianę kierunku ruchu (MAD, °), amplitudę bocznych wychyleń główki (ALH, μm s⁻¹), częstotliwość uderzeń wtyki (BCF, Hz). Do II-rzędowych parametrów zalicza się natomiast: liniowość ruchu (LIN tj. $VSL \times VCL - 1 \times 100\%$), kierun-

trajektorii ruchu, odchylen główki czy pracy wtyki. Podstawowa zaleta wykorzystania systemów automatycznych polega właśnie na obiektywności uzyskanych wyników a także wysokiej ich szczegółowości. To natomiast zapewnia porównywalność wyników badań otrzymywanych w różnych laboratoriach oraz ich właściwą interpretację.

O sukcesie zapłodnienia decyduje szereg czynników. Odpowiednia kondycja tarlaków, właściwe obchodzenie się z samicami i samcami, unikanie nadmiernego stresu podczas akcji tarłowej czy wykorzystanie do zapłodnienia produktów płciowych o najwyższej jakości. O jakości mleczu decyduje, jak już wspomnieliśmy, ruchliwość plemników, ale w metodzie CASA są takie parametry, które w sposób istotny decydują

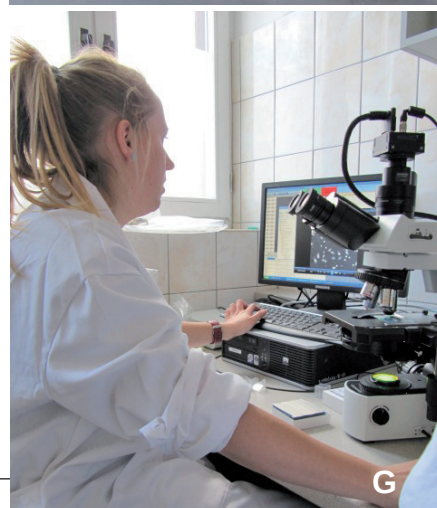
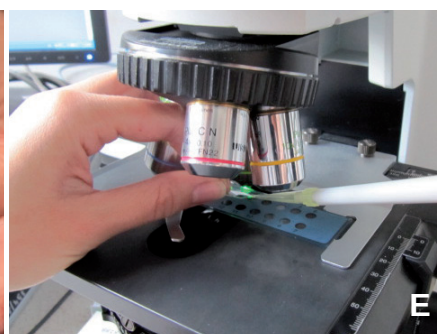
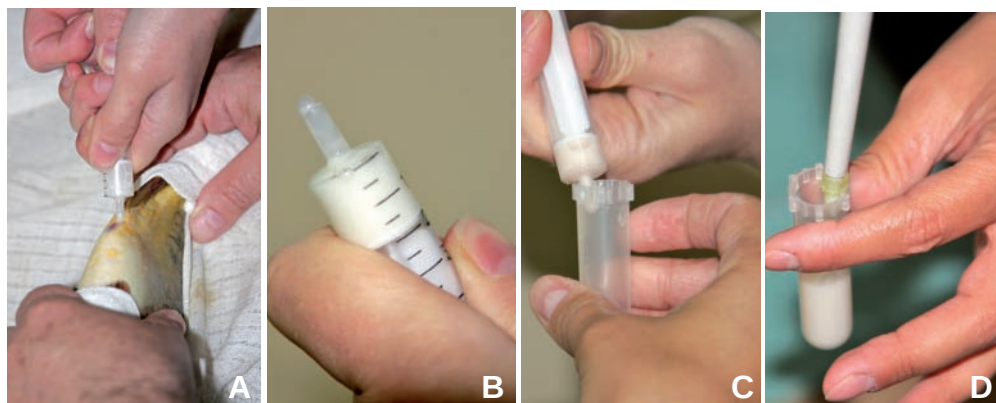


Fot. 2. Przykładowe trajektorie ruchu plemników zarejestrowane w czasie analizy (A) oraz schemat pomiaru parametrów pierwszorzędowych przez systemy CASA (B).

o zapłodnieniu. Do parametrów takich należy parametr MOT, czyli odsetek plemników ruchliwych oraz parametr VCL, czyli prędkość krzywoliniowa plemnika. Niejedno-

plemników w mleczu, osmolalność czy pH plazmy nasienia) podlega licznym zmianom w trakcie sezonu rozrodczego, które z jednej strony wynikają z naturalnie zachodzących w męskim układzie rozrodczym procesów biologicznych (dojrzwianie i starzenie się plemników), a z drugiej mogą być wynikiem niekorzystnych zmian związanych ze stresem środowiskowym (niekorzystne warunki zewnętrzne) lub też infekcjami. Dane literaturowe oraz badania własne wskazują, że wpływ na parametry

stosowanie w wylęgarniach? Cena takiej aparatury jest dość wysoka, jej obsługa wymaga doświadczenia, a analiza uzyskanych wyników jest czasochłonna. Wydaje się jednak, że systemy komputerowe spełniają swoją rolę przede wszystkim tam, gdzie są niezastąpione, a więc w badaniach medycznych i w nauce. Wyniki, jakie przy ich pomocy udaje się uzyskać są na tyle ważne, że ich transfer do praktyki rybackiej nie powinien pozostawiać wątpliwości, a ich aplikacja jest jedynie kwestią czasu.



krotnie potwierdzono pozytywną korelację (zależność) między MOT i VCL, a odsetkiem zapłodnienia ikry, co świadczy o ich bezpośrednim wpływie na proces zapłodnienia. Być może kolejnym parametrem w analizie CASA, którego wartość może wskazywać na zdolność zapładniającą plemników jest parametr ALH. W świetle ostatnich badań stwierdzono, że wartości tego parametru obniżają się dla plemników wraz z upływem czasu w sezonie tarlowym, a więc najprawdopodobniej wraz ze starzeniem się plemników. Ocena ruchliwości plemników pod kątem analizy istotnych wyznaczników jego jakości jest zatem uzasadniona.

Ruchliwość plemników, podobnie jak inne wyznaczniki jakości (koncentracja

ruchu plemników mają liczne czynniki w tym, stymulacja hormonalna oraz rodzaj zastosowanego do jej przeprowadzenia preparatu hormonalnego, metale ciężkie, ksenobiotyki czy krioprotektory wykorzystywane w procesie mrożenia gamet. Wykorzystanie systemu CASA w diagnostyce mleczu gatunków cennych z gospodarczego punktu widzenia bądź zagrożonych wyginięciem pozwala na śledzenie zmian jakości mleczu pod wpływem wielu, często złożonych czynników. Uchwycenie tych zmian i ich właściwa interpretacja pozwala w dalszej perspektywie na wyznaczenia swoistych markerów jakości mleczu, mających bezpośrednie znaczenie w jego ocenie.

Czy systemy komputerowe znajdują za-

Fot. 3. Pozyskiwanie mleczu (A), jego konfekcjonowanie (B-C), pobór próbek mleczu (D) i jej nanoszenie po aktywacji na szkiełko pokryte teflonową powłoką (E-F), analiza obrazu (G) – fot. B.I. Cejko.