

292. beretning fra forsøgslaboratoriet

Udgivet af Statens Husdyrbrugsudvalg

Forsøg med dybfrysning af tyresæd

Af

Kj. Friis Jakobsen

Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles
afdeling for obstetrik og gynækologi

*Experiments on Deep-freezing of Bull-Semen
(Summary)*

*Versuche über Tiefkühlung von Stiersamen
(Zusammenfassung)*



I kommission hos August Bangs forlag,

Ejvind Christensen.

Vesterbrogade 60, København V.

Trykt i Frederiksberg Bogtrykkeri

1956

STATENS HUSDYRBRUGSFORSØG

Statens Husdyrbrugsudvalg

Forstander *Johs. Petersen-Dalum*, Hjallese, formand,
gårdejer *Johs. Jensen*, Tostrup, Stege,

(valgte af De samvirkende danske Landboforeninger),

konsulent *J. Albrechtsen*, Aarhus,

parcellist *Th. Larsen*, Rye, Kirke-Saaby,

(valgte af De samvirkende danske Husmandsforeninger),

forstander *L. Lauridsen*, Graasten, næstformand,

(valgt af Det kongelige danske Landhusholdningsselskab),

proprietær *K. Røhr Lauritzen*, Demstrupgård, Sjørslev,

(valgt af Landsudvalget for Svineavlens Ledelse),

gårdejer *N. L. Hesselund Jensen*, Malling,

(valgt af Landsudvalget for Fjerkræavl),

gårdejer *J. Gylling Holm*, Tranebjerg, Samsø,

(valgt af De samvirkende Kvægavlsforeninger med kunstig sædooverføring).

Udvalgets sekretær: kontorchef, landbrugskandidat *H. Ærsøe*.

Landøkonomisk Forsøgslaboratorium

Dyrefysiologisk afdeling

Forstander: professor *P. E. Jakobsen*.

Forsøgsleder: cand. polyt. *I. G. Hansen*,

— landbrugskandidat *Grete Thorbek*.

Husdyrbrugsafdelingerne

Forsøg med kvæg:

Forstander: professor *L. Hansen Larsen*.

Forsøgsleder: landbrugskandidat *H. Wenzel Eskedal*,

— landbrugskandidat *K. Hansen*,

— landbrugskandidat *Johs. Brolund Larsen*.

Forsøg med svin, heste og pelsdyr:

Forstander: professor, dr. *Hj. Clausen*.

Forsøgsleder: landbrugskandidat *Fr. Haagen Petersen*,

— landbrugskandidat *N. J. Højgaard Olsen*,

— landbrugskandidat *R. Nørtoft Thomsen*.

Forsøg med fjerkræ:

Forsøgsleder: lektor, landbrugskandidat *J. Bælum*.

Avlsbiologiske forsøg:

Forsøgsleder: lektor, dr. agro. *J. Nielsen*.

Kemisk afdeling

Forstander: cand. polyt. *J. E. Winther*.

Afdelingsleder: ingeniør *H. C. Beck*,

— mejeribrugskandidat *K. Steen*.

Statistisk afdeling

Beregner: dyrlæge *A. Neimann-Sørensen*.

Kontor og sekretariat

Kontorchef: landbrugskandidat *H. Ærsøe*.

Sekretær: landbrugskandidat *H. Bundgaard*.

Bogholder: *Sv. Vind-Hansen*.

Udvalgets, forsøgslaboratoriets og afdelingernes adresse er:

Rolighedsvej 25, København V.

Til

Statens Husdyrbrugsudvalg.

Under henvisning til § 2, stk. 3, i forretningsorden for Fællesudvalget vedrørende Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles institut for steriliteitsforskning fremsendes hoslagt en fra professor N. O. Rasbech modtagen afhandling „Forsøg med dybfrysning af tyresæd“ af dyrlæge Kj. Friis Jakobsen, hvilken professoren gerne ønsker offentliggjort i Landøkonomisk Forsøgslaboratoriums publikationer.

København, maj 1956.

På fællesudvalgets vegne
N. Thorkil-Jensen.

/ *A. Paludan.*

Fællesudvalget vedrørende Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles institut for steriliteitsforskning har med foranstående følgeskrivelse fremsendt nærværende beretning, der har været forelagt Statens Husdyrbrugsudvalg. I henhold til § 11 i forretningsordenen for statens husdyrbrugsforsøg godkendes den hermed til offentliggørelse i forsøgsvirksomhedens publikationer.

København, september 1956.

Johs. Petersen-Dalum.

/ *Holger Ærsøe.*

INDHOLDSFORTEGNELSE

Forord	5
I. Indledning	7
II. Frysning af sædceller	8
Dybfrysningsteknikken	8
1. Sæden og 1. fortynding	9
2. Afkøling og 2. fortynding	13
3. Tilvænningsperioden	14
4. Nedfrysningsprocessen	15
5. Opbevaring af den dybfrosne sæd	18
6. Transport og optøning	22
III. Dybfrysningens anvendelse i flere lande	22
IV. Danske forsøg med dybfrysning	24
Egne undersøgelser	25
V. Diskussion	36
VI. Sammendrag og konklusion	43
VII. Summary og Conclusion	47
VIII. Zusammenfassung und Konklusion	51
IX. Litteratur	55

Forord.

Nærværende undersøgelser over dybfrysning af tyresæd er udført i Kvægavlsforeningen for Hjørring Amt i slutningen af 1954 og i 1955.

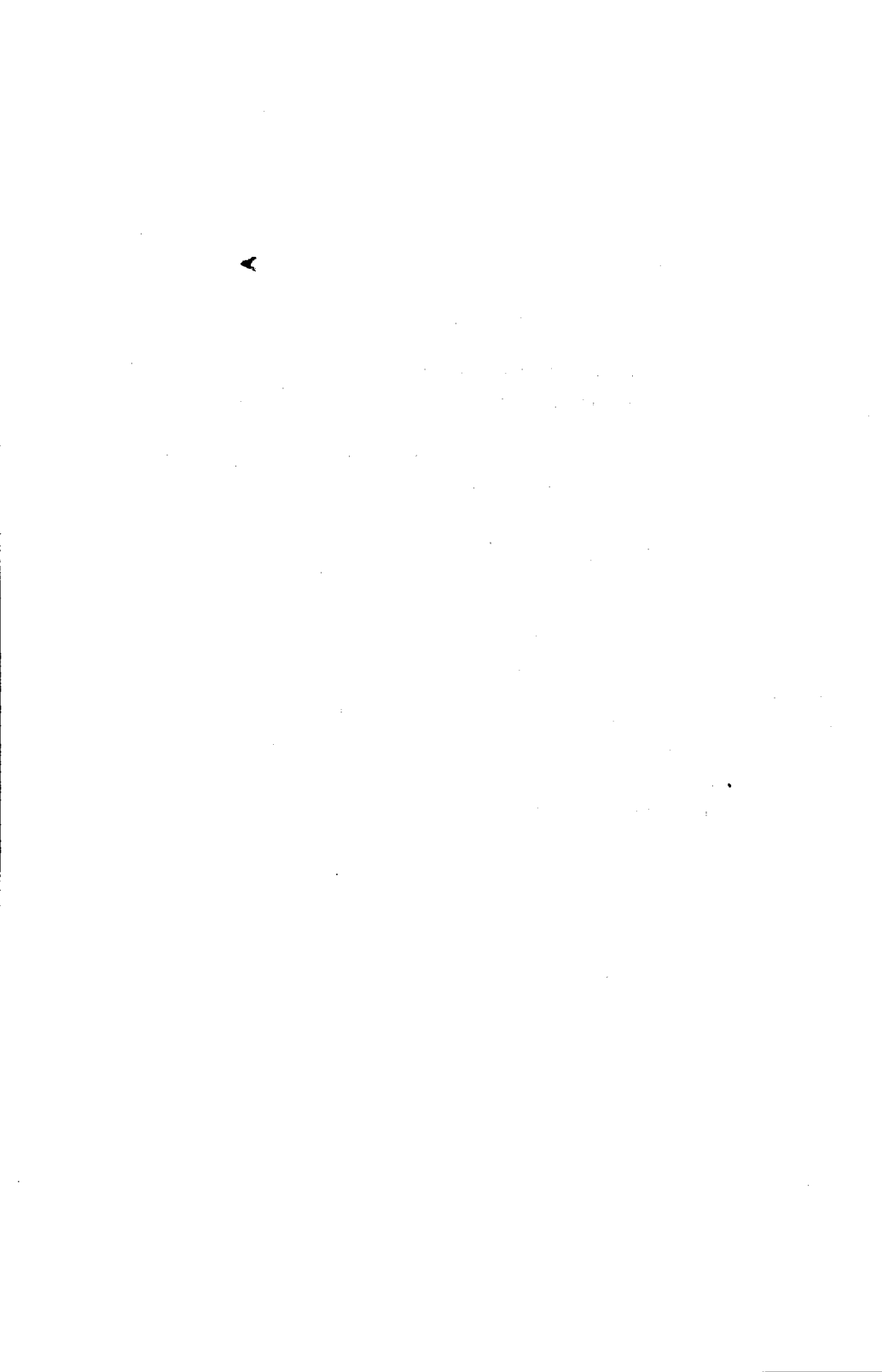
Undersøgelserne er udført med støtte fra Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, De samvirkende Kvægavlsforeninger m. k. S. og Kvægavlsforeningen for Hjørring Amt. Disse institutioner bringes en tak for den betydelige økonomiske hjælp, der er ydet.

Formålet har været at undersøge, hvilke befrugtningresultater der kan opnås med dybfrosen tyresæd under praktiske forhold her i landet. Det har især været forfatterens hensigt i første omgang at bedømme selve nedfrysningsprocessens virkning på sædens befrugtningsevne. Den dybfrosne sæd har derfor kun været opbevaret i så lang tid som forholdene tillod. Endvidere er muligheden for en rationalisering af den hidtil anvendte, ret komplicerede og tidsrøvende sædbehandling undersøgt.

For den medvirken og interesse, som Kvægavlsforeningen for Hjørring Amt har ydet ved gennemførelsen af disse undersøgelser, takkes foreningens bestyrelse og funktionærer.

København i april 1956.

Kj. Friis Jakobsen.



I. Indledning.

Opbevaring af sæd udenfor den dyriske organisme i så langt et tidsrum, at dette kan have nogen praktisk betydning, har blandt pattedyrene især vist sig muligt for tyrens vedkommende. Opbevaring af sæden i den tilstand, i hvilken den opsamles, kan dog ikke finde sted i længere tid uden at der indtræder skadelige følger deraf. Efter en særlig præparation af sæden kan dens levetid imidlertid forlænges betydeligt, idet mange af de skadelige exogene virkninger derved reduceres.

En særlig betydning for dette forhold har anvendelsen af specielle fortyndingsvædske. Stadige forbedringer af disse har medvirket til at forlænge sædcellernes levetid, hvilket har bevirket, at sædens befrugtningsevne i det første døgn efter opsamlingen stadig er blevet forbedret. Det må dog trods disse forbedringer i overlevningsevnen konstateres, at sædens befrugtningsevne hurtigt aftager. Med individuelle variationer indtræder der efter et døgns opbevaring et fald i befrugtningseresultaterne på gennemsnitlig et par procent. Efter et par døgns opbevaring aftager resultaterne med gennemsnitlig 5–6 procent, og derefter sker der et meget voldsomt fald. Det er således på nuværende tidspunkt ikke muligt at opbevare sæden udenfor organismen samtidig med bibeholdelse af tilfredsstillende befrugtningseresultater udover et par døgn.

Foruden fortyndingsvædskenes store betydning for opbevaringen af sæden er opbevaringstiden afhængig af opbevaringstemperaturen. Opbevaring ved stuetemperatur medfører en hurtig beskadigelse af sædcellerne, medens opbevaring ved lave positive temperaturer forlænger deres levetid. Der indtræder ved disse temperaturer et ophør af sædcellernes bevægelsesevne (kuldeanabiose). Almindeligvis opbevares sæden ved ca. 4 ° C. Da sædcellerne er følsomme overfor bratte temperaturfald, hvorved der kan ske en fatal beskadigelse (kuldechok), må der anvendes en langsom, gradvis afkøling, og nedkølingsperioden udstrækkes derfor i almindelighed til et par timer.

Medens det ved disse metoder indtil videre ikke har været muligt at løse problemet om opbevaring af tyresæd i tilfredsstillende befrugtningssdygtig tilstand over et længere tidsrum end et par dage, opdagede man i England i 1949 ved en tilfældighed, at opbevaring af sæd præpareret efter en særlig metode kunne foregå ved meget lave temperaturer i endog meget lang tid, således at sædcellernes befrugtningsevne blev bibeholdt.

II. Frysning af sædceller.

Allerede i 1776 bemærkede *Spallanzani*, at sæd kunne tåle „frysning“ i sne uden at bevægelsesevnen påvirkedes. Spredte undersøgelser i det 19. århundrede viste, at sædceller kunne overleve frysningstemperaturer på $0^{\circ} - \div 17^{\circ} \text{C}$. Disse iagttagelser forblev dog ubemærket indtil 1938, hvor *Jahnel* ved nogle spirochaeteundersøgelser erfarede, at humane sædceller opretholdt bevægelsesevnen efter nedfrysning til $\div 79^{\circ} \text{C}$. Samtidig demonstrerede *Luyet & Hodapp*, at frøsædceller kunne overleve nedfrysning til $\div 192^{\circ} \text{C}$., når de var fortyndet med en koncentreret sukkeropløsning før nedfrysningen. Efter lignende retningslinier kunne *Shaffner, Henderson & Card* (1941) opnå gode resultater ved nedfrysning af hanesædceller til $\div 79^{\circ} \text{C}$. Flere undersøgelser udførtes i 1940'erne, og i 1949 konstaterede *Smith, Polge & Parkes*, at overlevelsesevnen ved nedfrysning af hanesædceller til $\div 79^{\circ} \text{C}$. forbedredes, når fortyndingsvædsken tilsattes glycerin. Disse forskere inddrog andre dyrearters sæd i deres undersøgelser, men måtte for at opnå tilfredsstillende resultater med nedfrysning af tyresæd foretage nogle modifikationer af den metode, der var anvendt til nedfrysning af hanesæd. I 1952 lykkedes det *Polge & Rowson* at opnå en drægtighedsprocent på 79 efter inseminering af 38 køer med dybfrosset sæd. Det viste sig yderligere, at de nedfrosne sædcellers befrugtningsevne forblev usvækket ved opbevaring af sæden ved $\div 79^{\circ} \text{C}$. i længere tid (*Rowson & Polge*, 1953).

I det følgende er der givet en mere indgående beskrivelse af dybfrysningsteknikken og de problemer, der er forbundet hermed, baseret på de erfaringer, som er indvundet gennem talrige undersøgelser.

Dybfrysningsteknikken.

For at der kan foretages nedfrysning af tyresæd, må denne præpareres efter en særlig metode. Den trinvis behandlingsmåde er vist i følgende skema:

1. 1. fortynding.
2. Afkøling og 2. fortynding.
3. Tilvæning.
4. Nedfrysning.

Når sæden er blevet nedfrosset, knytter der sig før sædens anvendelse problemer til følgende to forhold:

5. Opbevaring.
6. Transport og optøning.

Til vurdering af et ejakulats værdi efter nedfrysningen har der hidtil været benyttet to metoder:

Overlevningsevnen. Denne defineres som antallet af overlevende sædceller, beregnet ved hjælp af selektive farvemetoder til differentiering af levende og døde sædceller.

Befrugtningsevnen. Her anvendes sædvanligvis 60–90 dages ikke-omløberprocent.

1. Sæden og 1. fortynding.

Det ville være af stor betydning for den kunstige sædovertførings effektivitet, hvis man før anvendelse af en sædportion var sikker på, at dennes befrugtningsevne var tilfredsstillende. De indtil nu anvendte undersøgelsesmetoder har imidlertid ikke formået at fremskaffe den eftertragtede relation mellem sædens kvalitet og dens befrugtningsevne. Til vurdering af sædens værdi til dybfrysning er denne mangel på sædundersøgelsesmetoder endnu mere iøjnefaldende. Det viser sig nemlig her, at nogle ejakulater af selv høj kvalitet ikke tåler nedfrysning uden et voldsomt fald i sædcellernes bevægelsesevne. Dette fald medfører, at sædens befrugtningsevne forringes så stærkt, at dens anvendelse er uden praktisk betydning. Erfaringsmæssigt har det vist sig, at antallet af overlevende sædceller er afgørende for et ejakulats befrugtningsevne; fra engelsk side opgives det således, at der ikke bør anvendes sædportioner med mindre end 30 pct. overlevende sædceller.

Dette forhold medfører, at tyrene kan deles i 3 grupper:

1. Tyre, hvis sæd efter dybfrysning aldrig viser en overlevningsevne over 30 pct. levende sædceller. Disse tyre må ganske negligeres i dybfrysningsarbejdet. Blandt engelske a. i.-tyre repræsenterer disse til nedfrysning uegnede tyre ca. $\frac{1}{5}$ af alle undersøgte tyre.

2. Tyre, hvis sæd viser svingende overlevningsevne. Det har i mange år været velkendt, at forskellige ejakulater fra samme tyr varierer be-

tydeligt i kvalitet. Et lignende forhold har gjort sig gældende for en del tyres vedkommende i dybfrysningssarbejdet, idet kun nogle ejakulater er tilstrækkelig modstandsdygtige overfor nedfrysning.

3. Tyre, hvis sæd altid viser god overlevningsevne. Disse er at finde blandt tyre, der optræder som konstante, solide sædproducenter. Overlevningsevnen vil for disse tyres vedkommende sædvanligvis være ens for forskellige ejakulater.

I bestræbelserne på at finde en metode, der kan afsløre et ejakulats modstandsevne mod dybfrysning, har man især koncentreret sig om iagttagelser over en eventuel forbindelse mellem dette og ejakulatets evne til at modstå kuldechok, men disse undersøgelser har ikke formået at løse spørgsmålet, og man er på nuværende tidspunkt overladt til at drage sine erfaringer alene efter dybfrysningen for hver enkelt tyr og for hvert enkelt ejakulat. Dette medfører, at en del ejakulater må kasseres efter nedfrysningen.

Fra engelsk side (*Report of the milk Marketing Board*, 1954) anbefales til dybfrysning kun at anvende ejakulater, hvor antallet af abnorme sædceller er mindre end 15 pct. af totalantallet af sædceller, og hvor antallet af levende sædceller umiddelbart før nedfrysningen er over 60 pct. Fra engelsk og amerikansk side påpeges det yderligere, at man ved fraktioneret sædopsamling oftest opnår de bedste resultater ved anvendelse af den sædportion, der opsamles i det andet spring i en serie opsamlet i samme seance.

Til fortynding af dybfrysningssæd anvendes i langt overvejende grad de fortyndingsvædske, der anvendes i det rutinemæssige insemineringsarbejde. Det drejer sig således fortrinsvis om citratfortynderen. I den senere tid er denne dog mange steder blevet fortrængt af særdeles velegnede mælke- og flødefortyndere, og fra amerikansk side foreligger meddelelse om, at mælkefortynderen også til dybfrysning er citratfortynderen jævnbyrdig. Fosfatfortynderen, der tidligere fandt udstrakt anvendelse, har også været forsøgt til dybfrysning, men er fra engelsk side erklæret for mindre velegnet. Derimod skulle en glycinfortynder, som man i England har eksperimenteret med, være særdeles velegnet til fortynding af dybfrysningssæd. Australske undersøgelser har vist, at en fortyndingsvædske bestående af 80 dele 3 pct. natriumcitratopløsning + 20 dele 0,1 M natriumfosfatopløsning bør foretrækkes. Endelig har svenske undersøgelser vist, at Milovanow' GPC₅-fortynder er bedre end 3 pct. natriumcitratopløsning.

Om citratfortynderens optimale citratkoncentration synes meningerne at være noget delte. Medens man i England anvender samme koncentrationer som her i landet, omkring 3,6 pct. (2 H₂O), arbejder man i U. S. A. med betydeligt lavere koncentrationer, 2–3 pct. (2 H₂O).

Tilblanding af æggeblomme til fortyndingsvædsken, således som det har været praktiseret siden *Philips & Lardy's* (1939) opdagelse af dette stofs betydning for sædcellernes overlevningsevne i fortyndet tilstand, foregik i dybfrysningens begyndelse således, at æggeblommen udgjorde 25 pct. af fortyndingsvædsken. Nyere amerikanske undersøgelser har vist, at den optimale overlevningsevne og de bedste befrugtningresultater efter dybfrysning opnås, når blommekoncentrationen i den endelige fortynding ligger mellem 16 og 20 pct.

Den gunstige virkning, der indtræder på sædcellernes overlevningsevne efter tilblanding af æggeblomme til fortyndingsvædsken, har især vist sig at bero på det forhold, at risikoen for kuldechok under sædens afkøling nedsættes. Denne effekt fremkaldes af en lipoiddel af et lipo-proteinkompleks, som findes i æggeblommen og som kan ekstraheres herfra i ren form. Tilsætning af denne ekstrakt, der indeholder fosfor-lipoider, lecithin og cephalin, vil give samme virkning som tilsætning af hele blommen. Enkelte undersøgelser viser, at overlevningsevnen efter dybfrysning forbedres lidt, når fortyndingsvædsken tilsættes disse stoffer.

Den optimale fortyndingstemperatur opgives i almindelighed at være 30 ° C. Nogle engelske undersøgelser viser, at antallet af overlevende sædceller efter dybfrysning kan forøges, hvis denne fortynding foretages ved 20 ° C.

Fortyndingsgraden, der ved anvendelse af gode sædprøver ikke synes at spille nogen væsentlig rolle i det daglige insemineringsarbejde, når den holdes inden for rimelige grænser, er i dybfrysningsarbejdet kun gjort til genstand for ganske få undersøgelser. Almindeligvis anvendes fortyndinger 1 : 10–1 : 30, men fortynding 1 : 100 har i et enkelt engelsk forsøg ikke påvirket befrugtningresultaterne. Samme engelske forsøg viste derimod, at sædcellernes overlevningstid ved ÷ 79 ° C. formindskedes betydeligt, når der anvendtes en så høj fortynding. Absolutte tal for fortyndingsgrader kan dog selvsagt ikke opstilles, da dette er så nær forbundet med sædens koncentration og kvalitet, at der for hvert enkelt ejakulat må tages stilling til, hvilken fortyndingsgrad det pågældende ejakulat kan udsættes for. Da det har vist sig, at der i en insemi-

neringsdosis skal være ca. 12 mill. levende sædceller, må fortyndingsgraden tilrettelægges efter dette princip.

For at spare plads ved opbevaring af dybfrossen sæd har amerikanske forskere søgt at foretage „koncentreret nedfrysning“, d. v. s. nedfrysning af ejakulater, der er fortyndet ganske svagt. Efter optøning ved 5 ° C. fortyndes disse ejakulater til den ønskede fortyndingsgrad; og transporteres således i optøet tilstand. Resultaterne efter anvendelse af denne metode er betydeligt lavere end de resultater, der opnås med den sædvanlige metode. Dette er i overensstemmelse med erfaringer, der viser, at resultaterne bliver betydeligt lavere, når optøningen efter nedfrysning på den sædvanlige måde foretages om morgenen før anvendelsen af sædportionen, og denne transporteres ved den sædvanlige transporttemperatur.

Tilsætning af antibiotika til fortyndingsvædsken, således som det har været praktiseret i de senere år, især ved tilsætning af streptomycin, anvendes også mange steder ved fortynding af dybfrysningssæd. Streptomycintilsætning i koncentrationer på indtil 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ viser sig at være uskadelig, medens tilsætning af succinylsulfathiazol efter hollandske undersøgelser synes at virke toksisk ved opbevaring ved -79°C . Om penicillintilsætning synes meningerne at være delte, idet det dels hævdes at være uskadeligt, dels at give lavere overlevningsevne. En amerikansk undersøgelse påpeger, at sulfanilamidtilsætning gør fortyndingsvædsken toksisk ved opbevaring ved -79°C .

Ved danske undersøgelser (*Adler*, 1954) er det ikke lykkedes at overføre *Vibrio fetus* ved inseminering med naturlig inficeret sæd fortyndet til dybfrysning. Glycerintilsætning synes således at påvirke vibriønernes infektionsevne. Dette forhold er i overensstemmelse med iagttagelser, der viser, at tilsætning af glycerin til fortyndingsvædsken har vist sig at hæve nogle lavt fertile tyres befrugtningresultater. Det må dog tilføjes, at der i relation til disse iagttagelser ikke foreligger data, der viser, at disse tyre har været inficeret med *Vibrio fetus*.

Tilsætning af særlige stoffer, der indgår i sædcellernes stofskifteprocesser, hævdes fra amerikansk side at kunne forbedre overlevningsevnen. Det drejer sig i de omtalte tilfælde om cystein og katalase. Tilsætning af forskellige sukkerarter, fruktose, glukose og arabinose har ingen indflydelse haft på overlevningsevnen, men det påpeges, at disse stoffers tilstedeværelse medfører, at tilvænningsperioden, der omtales nærmere på side 14, kan afkortes betydeligt.

2. Afkøling og 2. fortynding.

Efter 1. fortynding henstilles sæden i køleskab (temp. 4°C.) og efter en 3–4 timers periode vil den fortyndede sæd være nedkølet til denne temperatur. I køleskabet opbevares også fortyndingsvædsken til 2. fortynding, således at denne fortynding kan finde sted ved denne temperatur. Australske undersøgelser viser, at 2. fortynding kan ske uden skadelig effekt ved temperaturer indtil 15°C. , medens mange andre erfaringer viser, at en stigning i temperaturen over 4°C. ved 2. fortynding har en skadelig effekt på sædcellerne. Svenske undersøgelser viser, at overlevningsevnen forbedres, såfremt fortyndingen sker ved 0°C.

Sammensætningen af denne fortyndingsvædske, der med sit indhold af glycerin er af afgørende betydning for dybfrysningen, har været genstand for talrige undersøgelser med henblik på den rette koncentration af glycerin. Engelske undersøgelser demonstrerede, at tilsætning af glycerin til fortyndingsvædsken ikke påvirkede den friske sæds befrugtningsevne i uheldig retning, men at man tværtimod opnåede bedre resultater, hvilket forhold især gjorde sig gældende for visse lavt fertile tyre. Disse undersøgelser gennemførtes med tilsætning af 10 pct. glycerin. Stigende koncentrationer medførte et progressivt fald i antallet af levende sædceller. Nyere undersøgelser fra U. S. A. viser, at den optimale glycerinkoncentration ved anvendelse af citratfortyndingsvædske er 7,5 pct. glycerin. Det er fundet, at der består en relation mellem citratkoncentrationen og glycerinkoncentrationen, således at der med stigende citratkoncentration skal anvendes højere glycerinkoncentration. Ved anvendelse af mælkefortyndingsvædske anbefales tilsætning af 10 pct. glycerin.

Denne 2. fortynding udføres således, at der tilsættes den engang fortyndede sæd samme volumen fortyndingsvædske som den fortyndede sæds volumen udgør efter 1. fortynding. Dette betyder, at glycerinkoncentrationen i fortyndingsvædsken skal være dobbelt så høj, som ovenfor nævnt, idet disse tal refererer til koncentrationen i den endelige fortynding.

Da det viste sig, at der ved øjeblikkelig fortynding med glycerinfortyndingsvædsken indtræder et „glycerinchok“ på sædcellerne, hvilket giver sig til kende dels ved drab af nogle sædceller, dels ved fremkomst af en karakteristisk sløjfedannelse af sædcellernes hale, og for nogle ejakulators vedkommende tillige ved fremkomst af sædceller med en baglæns roterende bevægelse, forsøgte man at tilsætte denne fortyndings-

vædske på en sådan måde, at disse skadelige påvirkninger kunne undgås. Dette opnåede man ved tilsætning i små portioner med et bestemt tidsinterval mellem hver tilsætning (*fraktioneret tilsætning*). På denne måde påvirkes sædcellerne kun af små koncentrationer glycerin i begyndelsen. Der hersker nogen uenighed om, i hvor stor grad man bør fraktionere glycerinfortyndingsvædsken, dækkende opfattelser, efter hvilke man bør anvende mange fraktioner tilsat med 5–10 minutters interval, og opfattelser, efter hvilke man kan anvende 3 fraktioner tilsat med 10 minutters interval. En langvarig fortynding med dråbevis tilsætning hævdes fra hollandsk side at være værdifuld. På denne måde skulle tilvænningstiden (se nedenfor) kunne afkortes betydeligt.

Svenske undersøgelser har vist, at den anvendte glycerinsort er af stor betydning for opnåelse af optimale resultater. Der må således anvendes særdeles rene kvaliteter, således som de forefindes i analysesorter, idet den almindelige glycerin indeholder en del urenheder, hvis indhold af tunge metaller kan have en skadelig virkning på sædcellerne.

Medens der i almindelighed kun anvendes tilblanding af æggeblomme til 1. fortyndingsvædske, viser nyere amerikanske undersøgelser, at overlevnings- og befrugtningsevnen efter dybfrysning kan forbedres, såfremt også 2. fortyndingsvædske indeholder æggeblomme. Der anvendtes i dette forsøg tilsætning af 20 pct. blomme til såvel 1. som 2. fortyndingsvædske.

3. Tilvænningsperioden.

Når fortyndingen af sæden er tilendebragt, opbevares den fortyndede sæd i køleskabet i en såkaldt tilvænningsperiode. Om denne periodes længde hersker der en del uenighed, men det er dog fastslået, at den skal udgøre nogle timer. De fleste iagttagelser viser, at jo længere tilvænningsperioden er, des større vil overlevningsevnen være efter nedfrysningen, dog således, at perioden ikke bør udgøre mere end 24 timer. Almindeligvis synes 15–20 timer at blive anvendt. Som tidligere nævnt er det iagttaget, at denne periode kan afkortes betydeligt dels ved tilsætning af forskellige sukkerarter og dels ved dråbevis tilsætning af 2. fortyndingsvædske. Det er også bemærket, at tilvænningsperioden kan afkortes, når der til fortynding anvendes mælkepræparater.

I tilvænningsperioden optager sædcellerne glycerin i deres cellesubstans, og desuden omgives hver enkelt sædcelle med en beskyttende glycerinkappe. Det har vist sig at være af afgørende betydning, at glyceri-

nen optages intracellulært; således fandt man ved nedfrysning af røde blodlegemer, der var præpareret således, at glycerinen ikke kunne trænge gennem cellemembranen, en total destruktion af blodlegemerne efter nedfrysning til -79°C . Glycerinens største betydning antages dog at ligge i det forhold, at den virker som en stødpude overfor den stigning i saltkoncentrationen, der indtræder i den periode, hvor vandet i fortyndingsmediet begynder at udkrystallisere.

4. Nedfrysningsprocessen.

I 1951 offentliggjorde *Smith, Polge & Smiles* nogle undersøgelser over mikroskopiske observationer af levende hanesædceller under nedfrysning og optøning, muliggjort ved indretning af en speciel frysningsplade. Ved en temperatur på 5°C . viste kun nogle få sædceller bevægelse, og ved 0°C . var al bevægelse ophørt. Mellem 0°C . og -8°C . begyndte dannelsen af iskrystaller. Disse voksede hurtigt og skubbede sædcellerne foran sig. Krystallernes størrelse voksede indtil -25°C ., hvor der kun var meget snævre mellemrum mellem dem, og de fremtrådte som tynde lag af irregulært formede krystaller med sædcellerne sammentrykt i snævre mellemrum. Ved opvarmning aftog krystallerne eksplosivt i størrelse, og ved -2°C . var det meste af isen forsvundet, og sædcellerne fremtrådte i et mønster som en afstøbning af de mellemrum, der tidligere var mellem krystallerne. Der kunne ikke iagttages overlevende sædceller.

Gentoges dette forsøg efter tilsætning af glycerin til fortyndingsvædsken, viste det sig, at al bevægelse ophørte mellem -3°C . og -5°C . Mellem -10°C . og -20°C . dannedes fine, nåleformede iskrystaller, der voksede i størrelse til irregulære plader, der var adskilt ved velafgrænsede kanaler, hvori sædcellerne lå. Optøningen skete mellem -20°C . og -8°C . Som krystallerne herved gradvis adskiltes kunne sædcellerne iagttages i mellemrummene mellem disse. Ved ca. 0°C . begyndte nogle få sædceller at bevæge sig, og ved 10°C . var de fleste aktive. Ved 20°C . kunne præparatet ikke skelnes fra et normalpræparat.

Glycerinens gavnlige effekt viser sig således i en forandring af krystalformen under nedfrysningen, hvorved sædcellerne ikke udsættes for det store pres, der fremkommer på disse ved nedfrysning uden tilsætning af glycerin til fortyndingsvædsken, og ved en dæmpning af den eksplosive optøning af krystallerne, der indtræder efter nedfrysning uden til-

stedeværelse af glycerin. Yderligere synes glycerinens tilstedeværelse at hindre en intra-cellulær krystaldannelse.

Under de indledende dybfrysningsforsøg (Polge, 1953) blev det klart, at den største skade på sædcellerne skete i temperaturintervallet mellem -15°C . og -20°C . Det viste sig således, at kortvarige opbevaringer ved temperaturer i dette interval medførte større drabseffekt, end hvis sædcellerne blev opbevaret i samme tidsrum ved temperaturer udenfor de nævnte grænser. Denne skadelige indflydelse kunne hindres, hvis nedfrysningen udførtes således, at sædcellerne kun udsattes for den skadelige virkning i dette temperaturinterval i kort tid.

Som en almindelig regel kan det derfor siges, at sæden efter -15°C . skal nedkøles så hurtigt som muligt, men dog således, at man samtidig tager hensyn til, at der ikke indtræder chokfænomener. Ad erfaringens vej er det fastslået, at nedfrysningen bør ske med et temperaturfald på $1\frac{1}{2}-1^{\circ}\text{C}$. pr. minut indtil -15°C ., medens temperaturfaldet derefter bør være $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Efter -25°C . kan temperaturfaldet yderligere fremskyndes til $5-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Mange undersøgelser, især af amerikanske forskere, har vist, at overlevningsevnen ikke forandres væsentlig ved variationer i disse hastigheder, og med ubetydelige variationer anvendes denne metode da også alle steder, hvor dybfrysningen har opnået en praktisk anvendelse.

Fra hollandsk side er fremført, at der for forskellige tyre muligvis bør anvendes individuelle nedfrysningshastigheder.

I England er nedfrysning af sæden ved direkte anbringelse af denne i groft pulveriseret kulsyre blevet forsøgt. Nogle amerikanske undersøgelser har vist, at en så hurtig nedfrysning gav en lavere overlevningsevne end hvis sæden blev nedkølet gradvis.

Nedfrysningens praktiske udførelse. Før nedfrysningen afmåles den fortyndede sæd i portioner, der udgør en insemineringsdosis. Til dette formål anvendes fortrinsvis glasampuller, der efter påfyldningen tilsmeltes. Også specielle plasticampuller har fundet anvendelse. Anvendelse af små glasampuller, der lukkes med korkprop og efterfølgende forseglings med „Adaptosol“, et syntetisk medium, der tåler opbevaring i alkohol, har i England vundet nogen udbredelse.

Påfyldningen af disse ampuller må foregå ved ca. 4°C . Ligeledes må man ved tilsættningen hindre temperaturstigningen i den fortyndede sæd. Ved at nedsænke den sædfyldte del af ampullen i et vandbad af

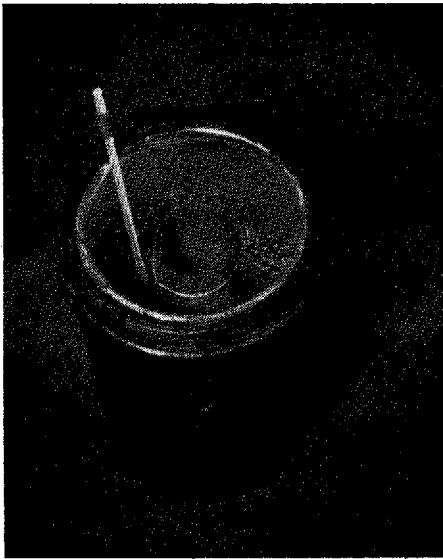


Fig. 1. Termokrukke.

denne temperatur under tils meltingen kan en sådan komplikation imødegås.

Nedfrysningen, der foregår i konc. alkohol, finder sted i store termokrukker.

Nogle steder har man til dette formål konstrueret særlige nedfrysningsbeholdere, hvor større portioner kan nedfryses på een gang. Temperaturfaldet frembringes ved tilsætning af passende stykker fast kulsyre til alkoholen. Da dette er en ret tidsrøvende proces, har man søgt at afkorte den, idet man har fjernet ampullerne fra alkoholbadet og anbragt dem direkte i et alkoholbad ved $\div 79^{\circ} \text{C}$. efter at den kritiske temperatur var nået. Denne metode har dog ingen anvendelse fundet, idet den medfører et fald i overlevningsevnen.

Sædcellernes påvirkning af nedfrysningen. Der sker ved nedfrysningen altid drab af nogle sædceller. Antallet er individuelt for hvert nedfrosset ejakulat. Dog viser – som tidligere nævnt – ejakulater fra visse tyre altid samme overlevningsevne. Almindeligvis må det siges, at overlevningsevnen for sæd fra de tyre, der egner sig til dybfrysning, og som er anvendt i de forskellige eksperimenter, rangerer mellem 35 pct. og 60 pct. Der forekommer således i ethvert ejakulat en gruppe sædceller,

der tåler denne ekstraordinært hårde belastning. Disse overlevende sædceller er dog ikke ganske upåvirkede af nedfrysningen. Undersøgelser af *White, Blackshaw & Emmens* (1952) viser, at cellernes iltoptagelse og glykolysekapacitet undergår en betydelig depression, og at sædcellerne hurtigt går til grunde ved opbevaring ved 5°C . efter optøningen. *Rasbech* (1955) fandt, at sædcellernes fruktolysekapacitet falder betydeligt efter nedfrysningen. Efter nedfrysning og optøning ved 5°C . er fruktoseforbruget ikke faldet væsentligt, men efter 24 timers opbevaring er det omtrent halveret. Dette er i overensstemmelse med undersøgelser af *Saroff & Mixner* (1955), der fandt, at antallet af overlevende sædceller efter optøning og opbevaring ved 5°C . i 24 timer aftog med halvdelen, og efter 3 døgns opbevaring var der kun få levende sædceller tilbage.

5. Opbevaring af den dybfrosne sæd.

Efter nedfrysningen anbringes ampullerne i specielle dybfrysningsbokse, hvor temperaturen er omkring -79°C . I de tidligste forsøg

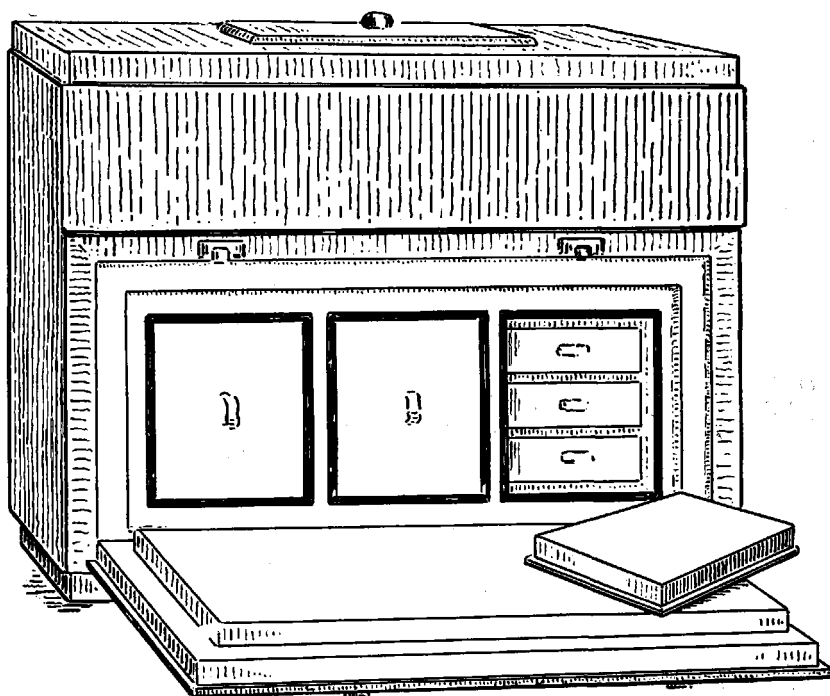


Fig. 2. Dybfrysningsboks, ældre model.

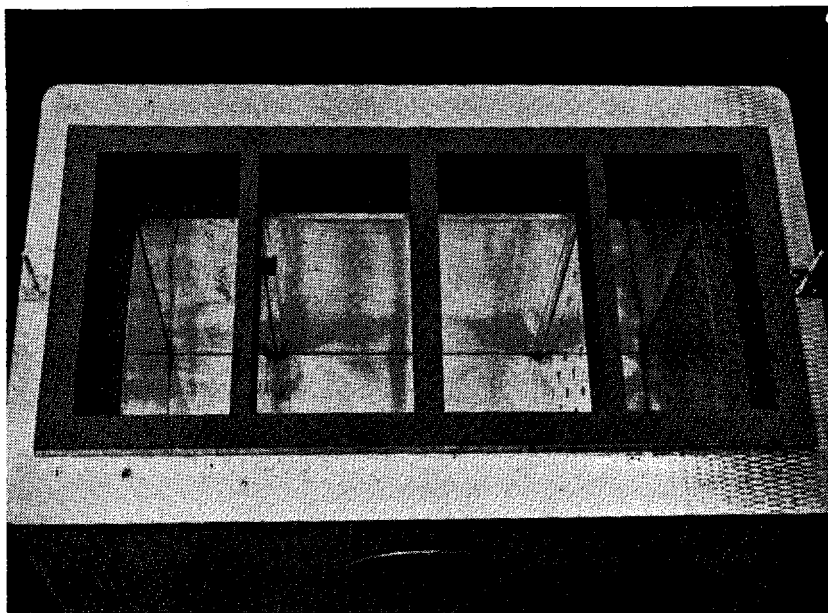


Fig. 3. Dybfrysingsboks, nyeste model.

blev sæden opbevaret i små termokrukker med alkohol og fast kulsyre. Disse blev igen anbragt i en isoleret kasse, hvor også kulsyre opbevarede. Da kravet om opbevaring af større portioner dybfrossen sæd meldte sig, blev der konstrueret særlige bokse. Der må til disse stilles følgende krav: opretholdelse af en effektiv temperaturkontrol under -70°C ., stor kapacitet og let adgang til de enkelte sædportioner uden for stort kuldatab. De først anvendte typer bestod af en opbevaringsafdeling, hvor ampullerne var anbragt i skuffer, og en afdeling, hvor kulsyren opbevarede. Fra denne, der var anbragt øverst, kunne den kolde luft trænge gennem en perforeret adskillelse mellem disse to afdelinger og opretholde en tilstrækkelig lav temperatur. Der skete dog for stort kuldatab, når nogle ampuller skulle fjernes fra boksen. I de nyere frysebokse har man derfor placeret adgangen til boksen foroven og anbragt kulsyren langs boksens sider.

Indretning af praktiske kassetter letter opbevaringen og udtagningen af ampullerne. Hele boksen er fyldt med alkohol, og gennem denne foranstaltning modvirkes en stigning af temperaturen i boksen selv ved ret lang tids fjernelse af boksens låger.

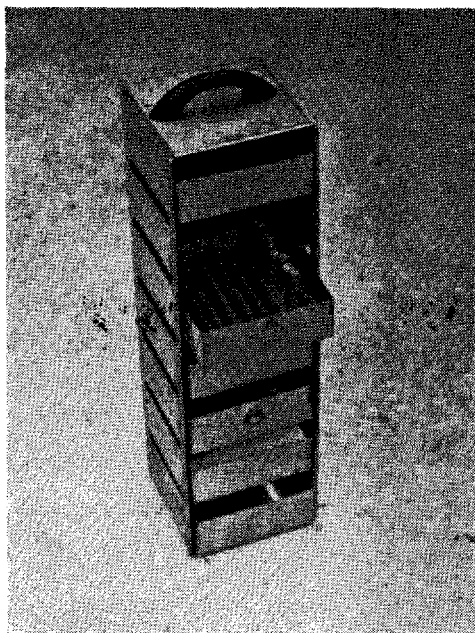


Fig. 4. Kasette til dybfrysningboks.

Opretholdelse af en effektiv temperaturkontrol ved ca. $\div 79^{\circ} \text{C}$. har vist sig at være afgørende for bevarelse af den overlevningsevne, som den nedfrosne sæd viser umiddelbart efter nedfrysningen. Undersøgelser over forskellige temperaturers indflydelse på overlevningstiden har vist, at der ved temperaturer, der ligger blot lidt over denne opbevaringstemperatur, sker et hurtigt drab af sædcellerne (figur 5). Selv ved $\div 79^{\circ} \text{C}$. sker der nogen skade på sædcellerne, og denne opbevaringstemperatur er derfor kun anvendelig ved kortvarige opbevaringer. Enkelte engelske undersøgelser på et lille materiale viser, at frugtbarhedsforholdene efter anvendelse af dybfrossen sæd, der har været opbevaret ved ca. $\div 79^{\circ} \text{C}$., ikke påvirkes væsentligt indenfor et års opbevaring. Ønsker man derimod at opbevare sæden i flere år, må opbevaringstemperaturen bringes endnu lavere ned. Ved opbevaring i flydende luft ved $\div 192^{\circ} \text{C}$. har det således vist sig, at sædkvaliteten overhovedet ikke påvirkes af opbevaringstiden. Der foregår i øjeblikket, især i U. S. A., forsøg med opbevaring ved meget lave temperaturer ($\div 100^{\circ} \text{C}$.— $\div 192^{\circ} \text{C}$.), fremkaldt ved anvendelse af mekaniske dybfrysningbokse.

Den skadelige indflydelse, der indtræffer ved opbevaring ved -79°C ., viser således, at der selv ved så lave temperaturer sker processer af uønsket natur. Ved undersøgelser af vegetabilsk væv (Joslyn, 1949) har det vist sig, at lave temperaturer og isdannelse ikke standser enzymaktiviteten, men kun hæmmer den. Da svækkelsesgraden yderligere ikke er ens for alle enzymer, kan afkøling bringe kæden af trin-vise enzymreaktioner ud af balance. Enzymerne varierer således i deres evne til at overleve frysetemperaturer, og forandringer i enzymsystemet ved partiel destruktion af de mere labile enzymer kan forandre såvel typen som størrelsen af de kemiske forandringer, der indtræffer. De samme forhold kan måske gøre sig gældende for sædcellernes enzymer og kan måske give en forklaring på den skade, der indtræffer ved disse lave temperaturer. Nærmere undersøgelser foreligger dog ikke på dette specielle felt.

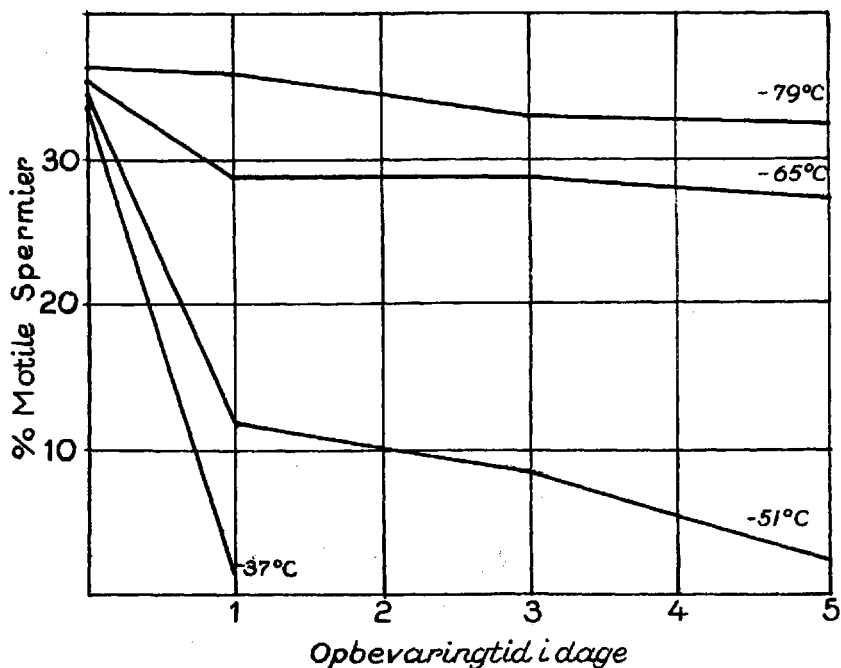


Fig. 5. Opbevaringstemperaturens indflydelse på sædens overlevningsevne.

6. Transport og optøning.

Forsendelse og transport af den dybfrosne sæd må foregå ved temperaturer omkring -79°C ., idet det har vist sig, at opbevaring ved ca. 4°C . efter optøningen har en skadelig effekt på sædcellerne (se side 18). Optøningen skal således foretages umiddelbart før anvendelsen. Denne bør udføres således, at der iagttages de samme forholdsregler som ved nedfrysningen. Det skadelige temperaturinterval mellem -15°C . og -20°C . må overskrides så hurtigt som muligt. Dette menes at være tilfældet, når optøningen foregår ved 40°C . En ligeså god effekt findes af nogle forskere at indtræffe ved optøning ved 5°C . *Dunn* (1953) har ikke fundet nogen forskel på befrugtningseresultaterne ved anvendelse af 5°C . og 40°C . Af praktiske hensyn sker optøningen mange steder under koldtvandshane. Ved optøning ved 40°C . risikerer man, at sæden, når den opsuges i en kold insemineringspipette, udsættes for kuldechok.

III. Dybfrysningens anvendelse i flere lande.

De gode resultater, der mange steder er opnået ved anvendelse af dybfrossen sæd, har medført, at der i mange kvægavlsforeninger i forskellige lande nu bliver anvendt dybfrossen sæd i det daglige insemineringsarbejde. Endnu sker dette mange steder på eksperimentel basis, men i mange foreninger er dybfrysningen blevet anerkendt som en sædpræservationsmetode, der har løst nogle af de problemer, som foreningerne i mange år har tumlet med.

Fra *England* foreligger ingen nærmere oplysninger om, i hvor stor udstrækning den dybfrosne sæd anvendes, men i nogle foreninger har den fundet en ret udstrakt anvendelse. Dette er især tilfældet, hvor kvægavlerne måtte ønske at anvende sæd fra en bestemt tyr i deres besætninger, og hvor foreningerne derfor må være leveringsdygtige med sæd fra de pågældende tyre på ethvert tidspunkt („nominated service“). Da der kun opsamles een portion sæd fra hver tyr om ugen, er der et udpræget behov for en sådan opbevaringsmetode, idet der ellers ikke ville være sæd fra en tyr disponibel i 5 af ugens dage. Yderligere anvendes nogle steder al sæd fra tyre, hvis race kun har fundet ganske ringe udbredelse, udelukkende til dybfrysning. Der kræves således, for at man kan efterkomme efterspørgslen på sæd fra disse tyre, et betydeligt mindre tyrehold end hvis sæden skulle anvendes i frisk tilstand. Resultaterne efter

anvendelse af dybfrossen sæd opgives at være tilfredsstillende, og fra en enkelt større forening foreligger der resultater efter et større antal insemineringer i perioden marts 1953–august 1954. Der er udført 15 635 insemineringer med dybfrossen sæd og 34 512 insemineringer med frisk sæd og ikke-omløberprocenten (efter 3 mdr.) har andraget henholdsvis 61 pct. og 66 pct.

I *U. S. A.* anvender halvdelen af 80 foreninger dybfrossen sæd, en del dog på eksperimentel basis. I de første 10 mdr. af 1955 er der hermed blevet insemineret 80 000 køer. I nedenstående tabel er opført resultaterne fra 14 foreninger, publiceret i årsberetningen for 1954 fra *National Association of Artificial Breeders*.

Resultaterne efter anvendelse af dybfrossen sæd i enkelte amerikanske a. i.-foreninger.

	antal køer ins.	60–90 dages i. o. — pct. frisk sæd	dybfr. sæd
1.	300	65	59
2.	540	67,8	58
3.	531	68	60,26
4.	30	65	50
5.	2.500	65	60
6.	56	71,4	72
7.	100	71	60
8.	1.500	75*)	76**)
9.	6	75	50
10.	4.000	70	70
11.	76	73,7	48,6
12.	121	73,2	73,5
13.	350	69	79,1
14.	20.000	68—71	50—68

*) 459 l. ins.

**) 147 l. ins.

Resultaterne har i de forskellige foreninger varieret betydeligt, idet man i nogle foreninger har haft de samme resultater efter anvendelse af frisk og dybfrossen sæd, i andre forskelle indtil 25 pct. til fordel for den friske sæd.

I *Canada* anvender een forening udelukkende dybfrossen sæd. I 1955 er der på 8 måneder udført 35 000 insemineringer. Befrugtningsresultaterne angives at være bedre end da foreningen brugte frisk sæd, idet ikke-omløberprocenten (60–90 dage) andrager 65–70. Sæden ned-

fryses og opbevares ved -110°C . på et speciallaboratorium, hvorfra den fordeles. Også nedfrysning af privatejede tyres sæd udføres.

I *Holland* er der i det sidste års tid (1955) på eksperimentel basis udført ca. 6–8 000 insemineringer. Resultaterne har været gode, idet der er opnået en drægtighedsprocent på ca. 60, hvilket ligger ca. 5–6 procentenheder lavere end efter anvendelse af frisk sæd. Der synes i *Holland* ikke at være basis for en udstrakt anvendelse af dybfrossen sæd.

Selv om der er store variationer i de offentliggjorte resultater, synes det dog berettiget at konkludere, at man efter de erfaringer, man har haft med dybfrossen sæd i de her omtalte lande, må regne med, at resultaterne efter anvendelse af dybfrossen sæd gennemsnitlig vil være 5–10 procentenheder lavere end de resultater, man opnår efter anvendelse af frisk sæd. Da tyrene reagerer individuelt overfor denne sædbehandlingsmetode, kan mange af de offentliggjorte resultater, hvor disse er betydeligt lavere end de opnås efter anvendelse af frisk sæd, påregnes at skyldes det forhold, at de anvendte tyre ikke har hørt til de mest velgnede til dybfrysning. Resultaterne bør efter forfatterens mening betragtes for hver enkelt tyr og ikke – som tilfældet er for den friske sæd, hvor resultaterne efter de tyre, der anvendes i foreningerne, gennemgående er ret ensartede – som et gennemsnit af resultaterne fra flere forskellige tyre.

IV. Danske forsøg med dybfrysning.

I Danmark blev undersøgelser over dybfrysning af tyresæd forsøgsmæssigt påbegyndt af Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskoles afdeling for obstetrik og gynækologi i efteråret 1952. I samarbejde med Sydsjællands Kvægavlsforening blev der nedlagt sæd i dybfrysningsboks fra nogle få af foreningens tyre i begyndelsen af 1953, og enkelte drægtigheder blev opnået efter et begrænset antal insemineringer med denne sæd, der da havde været opbevaret ved -79°C . i $1\frac{1}{2}$ år. I februar 1954 blev der indrettet et dybfrysningsanlæg på ovennævnte forenings tyrestation i Køng. Undersøgelserne i forbindelse hermed afslørede lavere befrugtningsresultater efter anvendelse af dybfrossen sæd end af frisk sæd (*Rasbech*, 1954).

For at undersøge, hvilke befrugtningsresultater, der kunne opnås efter anvendelse af dybfrossen sæd i det praktiske insemineringsarbejde i et større forsøg, udførte afdelingen for obstetrik og gynækologi i sam-

arbejde med De samvirkende Kvægavlsforeninger m. k. S. og Kvægavlsforeningen for Hjørring Amt i perioderne 1. december 1954–1. marts 1955, 1. august–1. oktober 1955 og 1. november–1. december 1955 dybfrysningforsøg på kvægavlsforeningens tyrestation ved Hjørring. En beretning om disse undersøgelser skal hermed forelægges.

Egne undersøgelser.

Forsøg 1.

Dette forsøg blev udført i perioden 1. december 1954–1. marts 1955.

Sæden og dens fortynding.

Sæden blev tidligt om morgenen på sædvanlig måde opsamlet i en kunstig vagina. Bedømmelse af sædens kvalitet blev foretaget i Bloms komparationskammer med henblik på koncentration, motilitet og sædcellernes egenbevægelser. Alle sædprøver, der ved denne undersøgelse viste tilfredsstillende kvalitet, blev anvendt til dybfrysning. Tre sædfortyndere, der blev anvendt i dette forsøg, havde følgende sammensætning: (a) 25 pct. æggeblomme + 75 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning; (b) 50 pct. æggeblomme + 50 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning; (c) 84 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning + 16 pct. glycerin (volumenprocent, glycerinum bidestillatum, 1,23 pro analysi, Merck). Til natriumcitratopløsningen var tilsat 500 μ g streptomycin pr. ml.

Sæden blev efter opsamlingen delt i to portioner. Den ene portion blev senest $1/2$ time efter opsamlingen fortyndet i forholdet 1 : 10–1 : 20 med fortyndingsvædske (a) ved ca. 30 ° C. og blev efter langsom afkøling til 5 ° C. anvendt til inseminering på opsamlingsdagen, emballeret i cellophanrør. Den anden portion blev anvendt til dybfrysning og behandlet efter følgende skema: sæden blev umiddelbart efter opsamlingen anbragt på vandbad (temp. 30 ° C.) og senest $1/2$ time efter opsamlingen fortyndet med fortyndingsvædske (b) ved 30 ° C., hvorefter vandbadet med den fortyndede sæd blev hensat i køleskab og i en 3–4 timers periode afkølet til 2–4 ° C. På dette tidspunkt blev den fortyndede sæd delt i to portioner, der blev fortyndet med fortyndingsvædske (c), dels ved fraktioneret tilsætning (4 lige store portioner tilsat med 5–10 minutters intervaller) og dels ved øjeblikkelig tilsætning. Den endelige fortyndingsgrad var 1 : 10–1 : 15. Efter en tilvænningsperiode på 18–22 timer ved 2 ° C. blev sæden påfyldt afkølede glasampuller i portioner på 1 ml. Ampullerne blev tilsmettet, under hvilken procedure den

sædfyldte del af ampullerne var anbragt i isvand. For nogle ejakulaters vedkommende blev nedfrysningen foretaget i de velkendte cellophanrør anbragt i en tilsmeltet plasticpose.

Nedfrysningen.

Nedfrysningen blev foretaget i en 6 liters termokrukke (se side 17) indeholdende konc. alkohol, og der blev anvendt følgende nedfrysnings-hastighed: $\frac{1}{2}$ –1 ° C./min. i intervallet 2 ° C.– ÷ 10 ° C. og derefter 3–4 ° C./min. indtil ÷ 79 ° C. Efter nedfrysningen, der med den valgte hastighed vil vare ca. 45 min., blev den dybfrosne sæd overført til et alkoholbad i en dybfrysningsskabs (temp. ÷ 77 ° C.). Antallet af overlevende sædceller blev bedømt ved subjektiv vurdering af et dråbe-præparat fra nogle ampuller.

Sædens anvendelse.

Dette forsøgs formål har været at undersøge nedfrysningsskaderne på sædens befrugtningdygtighed, og sæden blev derfor anvendt kort efter nedfrysningen, således at opbevaringstiden i boksen ikke har overskredet 14 dage. Sæden blev tilsendt inseminørerne i fast kulsyre og optøet umiddelbart før brugen under rindende koldt vandshane. Efter optøningen blev sæden opsøget i cellophanrør, således at en insemineringsdosis har andraget $\frac{1}{2}$ ml. Sæd nedfrosset i cellophanrør blev optøet i hånden umiddelbart før anvendelsen.

Resultater.

Sædopsamlingen blev for nogle ejakulaters vedkommende foretaget fraktioneret, og hver fraktion blev nedfrosset særskilt. Det viste sig herved, at de iagttagelser, der viser, at 2. og 3. spring er bedre egnet til dybfrysning end 1., ikke kunne bekræftes, idet overlevningsevnen var ens i de forskellige spring.

For at undersøge af hvor stor betydning sædens kvalitet er for nedfrysningseresultatet, blev der nedfrosset sæd af forskellig kvalitet, således som denne kan bedømmes i Bloms komparationskammer. Det viste sig, at overlevningsevnen aftager med stedse stigende hastighed jo ringere sædkvaliteten er. Af afgørende betydning for et heldigt resultat af nedfrysningen synes således at være anvendelse af sæd af bedste kvalitet.

Som bedømmelsesgrundlag med henblik på anvendelse af den dybfrosne sæd blev anvendt antallet af overlevende sædceller med tilfredsstillende motilitet. For 23 anvendte ejakulater har dette andraget mellem 40 og 70 pct. I tabel 1 er resultaterne opgjort på grundlag af såvel 30—60 dages som 60—90 dages i. o.-pct. Der er både for den dybfrosne

Tabel 1. Resultater efter anvendelse af frisk og dybfrossen sæd

(30—60 og 60—90 dg. i. o.-pct.).

(The results after use of fresh and deep-frozen semen

(30—60 and 60—90 days % N. R.)).

Tyr (bull)	Frisk sæd (fresh semen)		Dybfrossen sæd (deep-frozen semen)		
	antal ins. (no. of ins.)	i. o.-pct. (60—90 dg.) (% N. R.)	antal ins. (no. of ins.)	i. o.-pct. (30—60 dg.) (% N. R.)	i. o.-pct. (60—90 dg.) (% N. R.)
1	370	71,3	136	65,4	44,8
2	45	66,6	28	67,9	39,2
3	109	73,4	43	65,1	53,5
4	15	66,6	13	67,9	53,8
5	116	75,8	31	83,9	64,5

og den friske sæds vedkommende tale om 1. gangs insemineringer af køer og kvier. Resultaterne (60—90 dages i. o.-pct.) efter anvendelse af dybfrossen sæd har således for samtlige tyres vedkommende været 11,3—27,4 procentenheder lavere end resultaterne efter anvendelse af frisk sæd. Ved at sammenligne ikke-omløberprocenten efter 30—60 og 60—90 dage finder man, at der for de enkelte tyre sker et fald på mellem 11,6 og 28,7 procentenheder, et forhold, der muligvis kan skyldes, at den tidlige fosterdød har fundet sted i større udstrækning efter anvendelse af dybfrossen sæd end efter anvendelse af frisk sæd, hvor differencen mellem disse opgørelser almindeligvis udgør 10 procentenheder.

Nedfrysning i cellophanrør er udført med sæd fra tyrene 1, 3 og 5 i januar og februar for nogle ejakulaters vedkommende efter samme teknik, som er blevet anvendt ved nedfrysning i glasampuller. Overlevnings- evnen har ved denne metode været lige så god som ved nedfrysning i ampuller. I tabel 2 er opført de opnåede resultater og til sammenligning hermed de resultater, der er opnået ved nedfrysning i ampuller i samme periode. Yderligere er opført de resultater, der er opnået i december efter ampulmetoden.

Tabel 2. Resultater efter anvendelse af sæd nedfrosset i ampuller og cellophanrør (60—90 dg. i. o.-pct.).

(The results after use of semen frozen in ampules and straws (60—90 days % N. R.).)

Tyr (bull)	December			Januar—februar					
	ampulmetoden (frozen in ampules)			ampulmetoden (frozen in ampules)			rørmetoden (frozen in straws)		
	antal ins. (no. of ins.)	i. o. (N.R.)	i. o.- pct. (% N.R.)	antal ins. (no. of ins.)	i. o. (N.R.)	i. o.- pct. (% N.R.)	antal ins. (no. of ins.)	i. o. (N.R.)	i. o.- pct. (% N.R.)
1	61	26	42,6	28	13	46,4	47	22	46,8
3	32	16	50,0	7	4	57,1	4	3	75,0
5	11	4	36,4	4	4	100,0	16	12	75,0
gennemsnit (average)	104	46	44,2	39	21	53,8	67	37	55,2

Det vil heraf umiddelbart ses, at der ved anvendelse af nedfrysning i cellophanrør er opnået resultater, der svarer til de ved anvendelse af ampulmetoden opnåede. Yderligere iagttages en forbedring af resultaterne i perioden januar—februar sammenlignet med resultaterne i december. Denne forbedring antages at skyldes en forbedret insemineringsteknik, fremkommet ved forøget rutine hos inseminørerne i anvendelse af den flydende sæd.

Ved nogle indledende forsøg viste det sig, at overlevningsevnen ikke påvirkedes af en øjeblikkelig tilsætning af glycerinfortyndingsvædsken, skønt mange iagttagelser (se side 13) tyder på det modsatte. Der er derfor ved dette forsøg blevet gennemført en sammenligning mellem denne tilsætningsmetode og den sædvanligt anvendte fraktionerede tilsætningsmetode. Forsøget er udført på split-sample-basis, og som fraktioneret tilsætning er anvendt 4 portioner tilsat med 5—10 minutters intervaller. Der er ikke blandt de anvendte tyre blevet iagttaget de tidligere omtalte chokfænomener (se side 13), men i nogle ejakulater fra andre tyre er disse dog iagttaget, således at det ser ud til at være et forhold, der er individuelt for de forskellige tyre. Om disse chokfænomeners indflydelse på sædens befrugtningsevne kan der på nuværende tidspunkt ikke drages nogle konklusioner. Overlevningsevnen har efter anvendelse af de to forskellige tilsætningsmetoder af glycerinfortyndingsvædsken i dette forsøg været ens. I tabel 3 er resultaterne efter anvendelse af disse to fortyndingsmetoder opgjort.

Tabel 3. Resultater efter øjeblikkelig og fraktioneret tilsætning af glycerinfortyndingsvædsken (60—90 dg. i. o.-pct.).

(The results after initial and fractional addition of glycerol (60—90 days % N. R.)).

Tyr (bull)	Øjeblikkelig fort. (initial addition)		fraktioneret fort. (fractional addition)	
	antal ins. (no. of ins.)	i. o. (N.R.)	antal ins. (no. of ins.)	i. o. (N.R.)
1	59	29	52	20
2	8	5	13	2
3	5	3	10	4
4	6	4	7	3
5	10	6	17	13
gennemsnit (average)	88	47	99	42
i. o.-pct. (% N. R.)	53,4		42,4	

Den øjeblikkelige fortyndingsmetode har således været lige så effektiv som den fraktionerede fortyndingsmetode, der har været anvendt i dette forsøg, og der synes at være en tendens til bedre resultater ved anvendelse af førstnævnte fortyndingsmetode.

Til yderligere undersøgelse af sædens kvalitet efter nedfrysning og optøning er blevet anvendt en spermiebelastningsprøve, hvor sæden er blevet opbevaret i 3 på hinanden følgende dage ved 2 ° C., og motilitetsundersøgelse er blevet udført hver dag. Der fandtes herved et tydeligt fald i antallet af overlevende sædceller efter 24 timers opbevaring, ofte indtil halvdelen, og herefter aftog antallet af overlevende sædceller stærkt, således at antallet efter 48 timers opbevaring højst androg en trediedel af antallet umiddelbart efter optøningen, og efter 72 timers opbevaring var der kun få bevægelige sædceller i sædprøverne. Forholdet viste sig at være individuelt for de forskellige tyre, men på det foreliggende materiale har det ikke været muligt at afsløre en eventuel relation mellem sædens befrugtningsevne og dens levedygtighed efter optøning og opbevaring ved 2 ° C.

Forsøg 2.

Dette forsøg gennemførtes i perioderne 1. august—1. oktober og 1. november—1. december 1955.

Sæden og dens fortynding.

Forsøget har omfattet nedfrysningen af sæd fra 9 tyre, der konstant har været anvendt i det daglige insemineringsarbejde og hvis fer-

tilitet derfor var kendt. Normalt blev der opsamlet 2 ejakulater hver uge, sædvanligvis i 3 spring hver gang. Et af de ugentlige ejakulater blev brugt til dybfrysning og det andet i det daglige insemineringsarbejde, til hvilket formål det blev fortyndet med Rottenstens gelatinefortyndingsvædske tilsat 25 pct. æggeblomme i fortyndingsgrader 1 : 10–1 : 20, opsuget i cellophanrør og anvendt på opsamlingsdagen.

De til dybfrysning anvendte ejakulater blev efter opsamlingen, der blev foretaget på sædvanlig måde i kunstig vagina i to spring, hensat ved stuetemperatur indtil ejakulatets temperatur androg 25 ° C. (5–10 min.). De blev derefter fortyndet med en fortyndingsvædske bestående af 40 pct. æggeblomme + 60 pct. natriumcitratopløsning (temp. 25 ° C.). Den fortyndede sæd blev anbragt i køleskab til afkøling til 4 ° C. 8 timer senere blev den fortyndede sæd opdelt i to portioner, der blev fortyndet med en fortyndingsvædske bestående af 84 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning + 16 pct. glycerin (volumenprocent, glycerinum bidestillatum, 1,23 proanlysi, Merck) (temp. 4 ° C.), dels ved fraktioneret tilsætning (3 lige store portioner tilsat med 10 minutters interval) og dels ved øjeblikkelig tilsætning. Den anvendte sæd har for 22 ejakulaters vedkommende ved bedømmelse i Bloms komparationskammer været af koncentrationen D, og disse ejakulater er blevet fortyndet således, at den endelige fortynding har været 1 : 10–1 : 14. 6 ejakulater har været af koncentrationen SD, og disse blev fortyndet 1 : 6–1 : 9. Den endelige koncentration har således været minimalt 60×10^6 sædceller pr. cc. Efter en tilvænningsstid på 16–18 timer ved 4 ° C. blev den fortyndede sæd emballeret til dybfrysning i portioner på $\frac{1}{2}$ ml, dels i glasampuller og dels i cellophanrør. Ampullerne blev tilsmeltet, under hvilken procedure den sædfyldte del var nedsænket i isvand. Cellophanrørene blev anbragt i specielle plasticlystre, der blev tilsmeltet.

Ved således at anvende to forskellige tilsætningsmetoder af glycerinfortyndingsvædsken og to forskellige emballeringsmetoder fremkom følgende 4 grupper:

- a) 2. fortynding fraktioneret, emballeret i ampuller
- b) 2. „ øjeblikkelig, „ „ „
- c) 2. „ fraktioneret, „ „ cellophanrør
- d) 2. „ øjeblikkelig, „ „ „

Nedfrysningen.

Nedfrysning af ampullerne i gruppe a) og b) og nedfrysning af den halve portion cellophanrør i grupperne c) og d) blev foretaget i en 6 liters termokrukke (se side 17) indeholdende konc. alkohol, og der blev anvendt følgende nedfrysningshastighed:

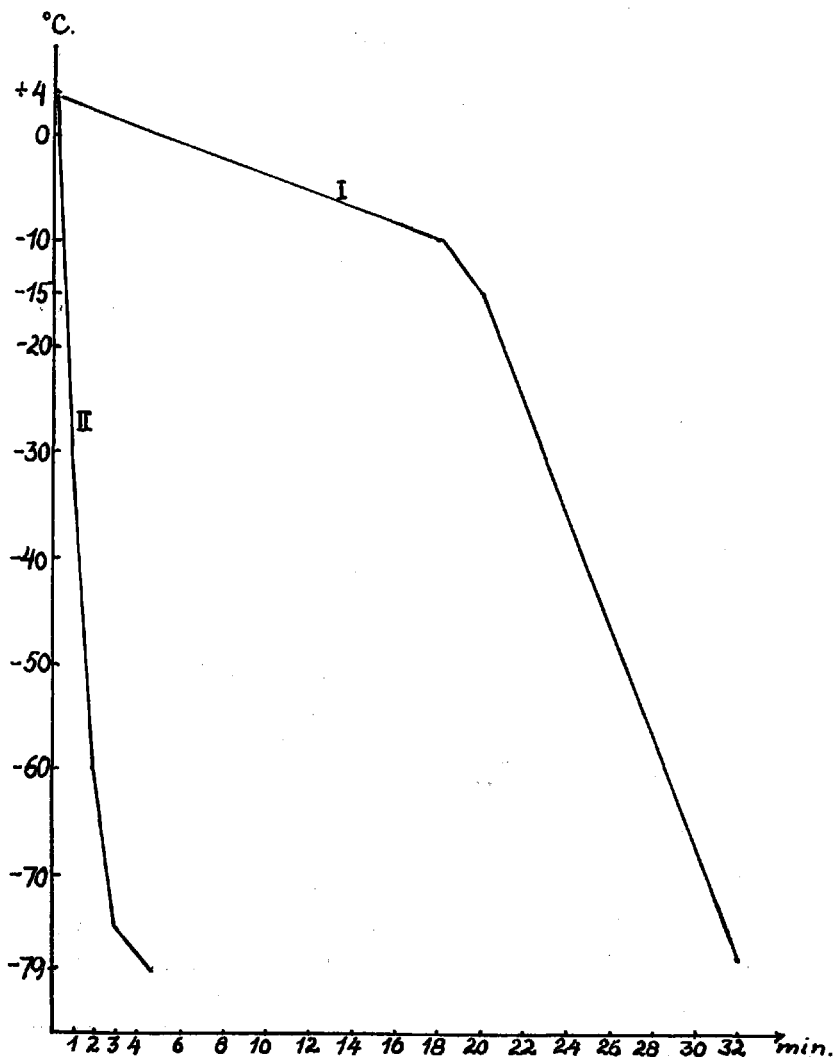


Fig. 6. Nedfrysningskurver.

$1/2-1^{\circ} \text{ C./min. i temperaturintervallet } \div 4^{\circ} \text{ C.} - \div 10^{\circ} \text{ C.}$
 $2^{\circ} \text{ C./min. „ „ „ } \div 10^{\circ} \text{ C.} - \div 15^{\circ} \text{ C.}$
 $5-6^{\circ} \text{ C./min. indtil } \div 79^{\circ} \text{ C.}$

Nedfrysningsskurven er fremstillet i figur 6^I. De øvrige portioner cellophanrør i grupperne c) og d) blev nedfrosset ved anbringelse i groft pulveriseret kulsyreis, og temperaturfaldet er foregået som vist i figur 6^{II}. Efter nedfrysningen blev den dybfrosne sæd overført til et alkoholbad ved $\div 77^{\circ} \text{ C.}$ i en dybfrysningssboks. Antallet af overlevende sædceller blev bedømt ved subjektiv vurdering af et dråbepræparat fra nogle ampuller og cellophanrør.

Sædens anvendelse.

Den anvendte sæd har været opbevaret i dybfrysningssboks i 6-21 dage efter nedfrysningen. Sæden blev tilsendt inseminørerne i fast kulsyre i små termokrukker og blev optøet umiddelbart før anvendelsen, ampullerne under koldt vandshane, hvorefter sæden blev opsuget i plastickatetre, cellophanrørene i hånden.

Resultater.

Ved anvendelse af ovennævnte fremgangsmåde fremkom der for hvert ejakulat følgende grupper:

Af. 2.	fortynding	fraktioneret, langsom nedfrysning i ampuller			
Ah. 2.	„	øjeblikkelig, „ „ „ „			
rf. 2.	„	fraktioneret, „ „ „ cellophanrør			
rh. 2.	„	øjeblikkelig, „ „ „			
tf. 2.	„	fraktioneret, hurtig „ „ „			
th. 2.	„	øjeblikkelig, „ „ „			

Som kriterium for sædens værdi med henblik på anvendelse til inseminering blev anvendt totalantallet af overlevende sædceller bedømt umiddelbart efter nedfrysningen i nogle få portioner fra hver gruppe. For alle anvendte ejakulaters vedkommende har dette antal andraget mindst 12×10^6 pr. $1/2$ cc. Der har for de forskellige metoders vedkommende ingen forskel været i overlevningsevnen. I tabel 4 er resultaterne opgjort på grundlag af 60-90 dages i. o.-pct.

Tabel 4. Resultaterne efter anvendelse af sæd nedfrosset efter 6 forskellige metoder (60—90 dg. i. o.-pct.).
(The results after use of semen frozen by 6 different methods (60—90 days % N. R.)).

Tyr (bull)	A						r						t						Gennem- snit (average)
	f			h			f			h			f			h			
	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%	
1	19	9	47,4	16	9	56,3	33	23	69,7	25	20	80,0	36	26	72,2	29	16	55,2	65,2
2	10	5	50,0	15	9	60,0	18	12	66,7	31	20	64,5	16	10	62,5	21	12	57,1	61,3
3	7	5	71,4	12	9	75,0	9	5	55,6	27	16	59,3	15	7	46,7	15	12	80,0	63,5
4	9	4	44,4	9	5	55,6	11	4	36,4	18	16	88,9	17	12	70,6	13	9	69,2	64,9
5	13	9	69,2	8	7	87,5	19	15	78,9	16	11	68,8	14	10	71,4	16	13	81,2	75,6
6	5	3	60,0	11	6	54,5	19	12	63,2	11	4	36,4	5	1	20,0	10	6	60,0	52,5
7	13	7	53,8	11	7	63,6	25	12	48,0	24	17	70,8	22	16	72,7	21	14	66,7	62,9
8	—	—	—	—	—	—	6	5	83,3	4	3	75,0	7	3	42,9	5	5	100,0	72,7
9	—	—	—	—	—	—	10	5	50,0	5	2	40,0	12	7	58,3	9	4	44,4	50,0
gennem- snit (average)	76	42	55,3 59,5 %	82	52	63,4	150	93	62,0 64,9 %	161	109	67,7	144	92	62,5 64,7 %	139	91	65,5	

En statistisk analyse af disse resultater giver følgende:

1. Sammenligning mellem en langsom og en hurtig nedfrysningssmetode.

Ved nedfrysning efter en langsom og en hurtig metode af sæd emballeret i cellophanrør er de opnåede resultater identiske (henholdsvis 64,9 pct. og 64,7 pct.).

2. Sammenligning mellem nedfrysningshastighed og emballeringsmetode.

Efter en langsom nedfrysning af sæd i ampuller og cellophanrør og efter hurtig nedfrysning af sæd i cellophanrør er de opnåede resultater identiske (henholdsvis 59,5 pct., 64,9 pct. og 64,7 pct.).

3. Sammenligning mellem øjeblikkelig og fraktioneret 2. fortynding.

Uafhængigt af emballerings- og nedfrysningssmetoder er der fundet differencer på disse to fortyndingsmetoder. De bedste resultater er for de tre hovedgruppers vedkommende opnået ved øjeblikkelig tilsætning. I tabel 5 er disse metoder sammenlignet for hver enkelt tyr. Forskellen på gennemsnittet for alle 9 tyre har været 4,6 pct. Denne forskel er imidlertid ikke statistisk sikker (tabel 5).

Tabel 5. Resultater efter øjeblikkelig (h) og fraktioneret (f) tilsætning af glycerinfertyndingsvædsken (60—90 dg. i. o.-pct.).

(The results after initial (h) and fractional (f) addition of glycerol (60—90 days % N. R.)).

Tyr (bull)	f			h		
	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (N.R.)	%
1	88	58	65,9	70	45	64,3
2	44	27	61,4	67	41	61,2
3	31	17	54,8	54	37	68,5
4	37	20	54,1	40	30	75,0
5	46	34	73,9	40	31	77,5
6	29	16	55,2	32	16	50,0
7	60	35	58,3	56	38	67,9
8	13	8	61,5	9	8	88,9
9	22	12	54,5	14	6	42,9
gennemsnit (average)	370	227	61,4	382	252	66,0

Den i forsøg 1 anvendte belastningsprøve til bedømmelse af sædens kvalitet er også for nogle tyres vedkommende anvendt i dette forsøg. Der er i lighed med de i forsøg 1 fundne resultater sket en forringelse af sædens kvalitet med ca. $1/2$ efter et døgnns opbevaring ved 4° C. efter optøningen, $2/3$ efter 2 døgnns opbevaring og efter 3 døgnns opbevaring er antallet af levende sædceller reduceret til ganske få procent. Evnen til overlevning efter optøning og opbevaring ved 4° C. har varieret for de forskellige tyre. For tyrene 2 og 3 fandtes en langsommere aftagen af overlevningsevnen end for tyr 5. Imidlertid har tyr 5 fremvist bedre resultater end såvel tyr 2 som 3. Denne belastningsprøve evner således ikke at udpege de ejakulater, der kan forventes at give de bedste resultater efter inseminering.

I forsøg 1 fremkom en overraskende stor procentdel af omløbnin-
gerne i perioden mellem 30—60 dages og 60—90 dages i. o.-pct. opgø-
relsen, og muligheden for fremkomst af et større antal tidlige aborter
efter anvendelse af dybfrossen sæd end efter anvendelse af frisk sæd
blev påpeget. En tilsvarende opgørelse er udført i dette forsøg, og re-
sultatet er opstillet i tabel 6. I samme tabel er fremstillet de resultater,
der er opnået efter anvendelse af frisk sæd fra de samme 9 tyre i forsøgs-
perioden.

**Tabel 6. Resultater efter anvendelse af dybfrossen sæd og frisk sæd
(30—60 og 60—90 dg. i. o.-pct.).**

(The results after use of deep-frozen semen and fresh semen
(30—60 days and 60—90 days % N. R.).)

Tyr (bull)	Dybfrossen sæd (deep-frozen semen)			Frisk sæd (fresh semen)			Diff. frisk sæd- dybfrossen sæd (diff. fresh semen-deep frozen semen)
	antal ins. (no. of ins.)	30—60 dg. i. o.-pct. (% N.R.)	60—90 dg. i. o.-pct. (% N.R.)	antal ins. (no. of ins.)	antal i. o. (no. of N.R.)	60—90 dg. i. o. pct. (% N.R.)	
1	158	75,9	65,2	78	45	57,7	÷ 7,5
2	111	65,8	61,3	107	79	73,8	+ 12,5
3	85	70,6	63,5	213	162	76,1	+ 12,6
4	77	71,4	64,9	167	118	70,7	+ 5,8
5	86	81,4	75,6	93	77	82,8	+ 7,2
6	61	75,4	52,5	231	168	72,7	+ 20,2
7	116	71,9	62,9	268	193	72,0	+ 9,1
8	22	77,3	72,7	229	172	75,1	+ 2,4
9	36	69,4	50,0	192	134	69,8	+ 19,8
gennemsnit (average)		73,0	63,7			72,7	

Af tabel 6 fremgår det, at differencen mellem 30–60 og 60–90 dages i. o.-procenten for de 9 tyre gennemsnitlig har andraget 9,3 procentenheder, hvilket resultat er identisk med de resultater, der er fundet i undersøgelser over dette forhold efter anvendelse af frisk sæd.

Efter anvendelse af frisk sæd fra de samme 9 tyre, som blev anvendt til dybfrysning, er der i forsøgsperioden opnået resultater, der med undtagelse af tyr 1 er højere end efter anvendelse af dybfrossen sæd. Differencen udgør fra 2,4–20,2 procentenheder. Differencen har været størst for tyr 6 og tyr 9, medens den for de øvrige 7 tyre har andraget de værdier, som man også i udenlandske forsøg har måttet konstatere, når der anvendes dybfrossen sæd.

V. Diskussion.

Resultater.

I 2 forskellige forsøgsperioder er undersøgt dybfrysningens indflydelse på tyresædens fertilitet. I et vinterforsøg (dec., jan., febr.) er fundet konceptionsresultater (60–90 dages i. o.-pct.), der for 5 undersøgte tyres vedkommende var 11,3–27,4 procentenheder lavere end de resultater, der opnåedes efter anvendelse af frisk sæd fra de samme tyre i samme periode. I et efterårsforsøg (aug., sept., nov.) har resultaterne efter anvendelse af dybfrossen sæd været betydeligt højere end i vinterforsøget for 9 undersøgte tyres vedkommende, men stadig lavere end efter anvendelse af frisk sæd.

En direkte sammenligning mellem disse 2 forsøg er ikke gennemførlig, idet der har været foretaget nedfrysning efter to fremgangsmåder, der adskiller sig fra hinanden på flere områder. Om disse forskelligheders betydning for resultatet kan der intet udtales, men det må antages, at dette forhold har haft stor indflydelse på den forbedring af resultaterne, der er opnået i efterårsforsøget. Yderligere er der også i de to forsøg anvendt forskellige tyre, dog således, at 3 af tyrene er anvendt i begge forsøg. Da der for disse 3 tyres vedkommende er opnået så betragtelige forbedringer af resultaterne i efterårsforsøget, at det fra forfatterens side synes diskutabelt, om hele forbedringen alene skyldes de tekniske ændringer ved sædens behandling og nedfrysning, er der i tabel 7 givet en sammenligning mellem disse 3 tyres resultater i såvel vinter- som efterårsforsøget.

Der synes ved så store udslag at være mulighed for, at også andre

Tabel 7. Sammenligning mellem resultaterne i de to forsøgsperioder for 3 tyres vedkommende (60—90 dg. i. o.-pct.).

(Comparison between the results during the 2 experimental periods concerning 3 bulls (60—90 days % N. R.).)

Vinterforsøg (winter experiment)			Efterårsforsøg (autumn experiment)		
tyr (bull)	antal ins. (no. of ins.)	60—90 dg. i. o.-% (N.R. %)	60—90 dg. i. o.-% (N.R.)	antal ins. (no. of ins.)	tyr (bull)
1	136	44,8	62,9	116	7
3	43	53,5	72,7	22	8
5	31	64,5	75,6	86	5

faktorer end ændringerne i forsøgsmetodikken kan have spillet en rolle. Opmærksomheden bør sikkert rettes mod den forskellige sædkvalitet, der har været disponibel ved de to forsøg. Ved de grove undersøgelsesmetoder, der har været anvendt til sædbedømmelse, har det ikke været muligt at konstatere nogen kvalitetsmæssig forskel i de to forsøgsperioder, men man har ved tidligere undersøgelser over sædcellernes fruktolyskapacitet fundet, at der eksisterer årstidsvariationer i sædens kvalitet. Som helhed må det da også siges, at nedfrysningen i efterårsforsøget forløb mere tilfredsstillende end i vinterforsøget, idet kun et enkelt ejakulat måtte kasseres efter nedfrysningen som uegnet til anvendelse ved efterårsforsøget, medens mange ejakulater måtte kasseres i vinterforsøget, selv om sædkvaliteten ved en undersøgelse før nedfrysningen syntes udmærket.

Selv om det ved betragtning af resultaterne fra disse to forsøg ikke er muligt at afgøre med sikkerhed, om sædkvaliteten kan have spillet en rolle, er det dog forfatterens mening, at en sådan mulighed bør tages i betragtning. At der yderligere i efterårssæsonen foreligger store mængder sæd, der ikke finder anvendelse, gør spørgsmålet om en nedfrysningssæson i disse måneder aktuel.

Mange tidligere undersøgelser har vist, at der består en relation mellem sædcellernes modstandsdygtighed overfor glycerin og metoden, hvormed denne tilblandes sæden. Disse iagttagelser viser, at overlevningsevnen efter nedfrysningen er bedst, når tilsætningen foregår fraktioneret. Der synes ikke at foreligge nogle undersøgelser, der viser tilsætningsmetodens indflydelse på sædens fertilitet. Dette forhold har været undersøgt i begge de omtalte forsøg, og det er fundet, at der er en tendens til bedre resultater, når glycerintilsætningen foregår øjeblikkelig.

Nedfrysningshastighedens betydning for overlevningsevnen er fastslået i *Polge & Rowson's* grundlæggende arbejde (1952), og nogle senere undersøgelser har alle bekræftet dette arbejdes konklusion, samt vist, at ekstreme variationer i nedfrysningshastigheden har en dårlig virkning på overlevningsevnen. Her er i forsøg 2 fundet identiske konceptionsresultater efter inseminering med sæd, der har været frosset efter den sædvanlige metode og efter en meget hurtig metode. Ved begge nedfrysningsmetoder har sæden været emballeret i cellophanrør. Da den hurtige nedfrysningsmetode ikke er forsøgt med sæd emballeret i ampuller, kan det på nuværende tidspunkt kun påregnes, at den hurtige nedfrysningsmetode er velegnet til nedfrysning af sæd i cellophanrør.

I de sammenlignende forsøg med nedfrysning af sæd i cellophanrør og i ampuller har optøningstemperaturen været forskellig. I enkelte udenlandske arbejder har man iagttaget, at optøningstemperaturen har haft indflydelse på sædens overlevningsevne. I disse to forsøg er det ikke muligt at konstatere, om dette forhold har haft nogen indflydelse på de opnåede resultater.

Engelske og amerikanske undersøgelser har vist, at den sædmængde, der opsamles i 2. spring, er bedre egnet til dybfrysning end sæd opsamlet i 1. spring. Disse iagttagelser er foretaget, hvor der kun er udført een sædopsamling om ugen pr. tyr. I disse to forsøg, hvor opsamlingsfrekvensen har været betydeligt højere, idet der har været opsamlet sæd to gange om ugen, sædvanligvis med 2–3 spring hver gang, har dette forhold ikke kunnet bekræftes. Den mindre overlevningsevne i 1. spring, som er fundet ved de udenlandske forsøg, kan formodentlig skyldes det forhold, at der i sæden fra dette spring er en større procentdel overmodne sædceller end i de efterfølgende spring. De sædceller, der overlever nedfrysningen, synes således at have en speciel modningsgrad.

I tidligere iagttagelser er det påpeget, at de overlevende sædceller har været udsat for en så hård belastning ved nedfrysningen, at de ikke er i stand til at forblive levende i ret lang tid efter optøningen. Såvel i vinter- som efterårsforsøget er bedømt, hvor længe sædcellerne opretholdt deres motilitet efter optøningen, når de blev opbevaret ved 2–4 ° C. I almindelighed var antallet af levende sædceller aftaget så stærkt efter 3 døgns opbevaring, at kun nogle få procent stadig viste motilitet. Forholdet viste sig at være individuelt for de enkelte tyres

vedkommende, men der synes ikke at være nogen relation mellem sædens fertilitet og en sådan belastningsprøve, således som det er tilfældet ved anvendelse af frisk sæd (*Swanson & Hermann, 1941*).

Fordele og ulemper ved nedfrysning.

Ønsket om i højere grad at kunne udnytte den foreliggende tyrebestands sædproduktion er i stedse stigende grad blevet fremsat fra alle interesserede kredse. Igennem indførelse af dybfrysning er der blevet åbnet store muligheder indenfor dette felt.

For den enkelte kvægavler vil den mest indlysende fordel være, at sæd fra en hvilken som helst tyr, hvis sæd er velegnet til dybfrysning, til enhver tid vil være disponibel. Denne fordel har han også i perioder, hvor en tyr er syg eller inde i en reproduktionsmæssig svag periode. Yderligere vil han være i stand til fra en hvilken som helst egn af landet og fra hele verden at kunne modtage ønskede sædportioner til enhver tid.

For en kvægavlsforening vil der også være mange fordele. Den muliggjorte optimale udnyttelse af sæden giver en bedre udnyttelse af tyrene, og der er derigennem skabt mulighed for udførelse af det samme arbejde ved hjælp af et mindre tyrehold. Foreningens tyrebestand kan gennem indkøb af dybfrosne ejakulater fra andre foreninger udvides til at omfatte et ubegrænset antal tyre. Det er desuden en kendt sag, at visse tyre ikke tåler så hyppig sædopsamling, som det almindeligvis anvendes her i landet. De „tomme dage“ for sådanne tyre kan da dækkes med dybfrossen sæd. I efterårssæsonen, hvor antallet af insemineringer udgør et minimum, og hvor store portioner sæd således lades uudnyttede, kan sæden nedfryses og således være et værdifuldt supplement i den travle tid. En særlig værdi vil denne fordel få for avlsmatadorernes vedkommende.

Ønsket om oplagring af „ventetyre“s sæd i det bestemte tidsrum, der dækker perioden fra udførelse af et tilstrækkeligt antal insemineringer til fremskaffelse af et afkomsprøvehold indtil resultaterne af en afkomsprøve foreligger, kan med den nuværende opbevaringsmetodik ikke siges at være opfyldt, idet en mangeårig opbevaring af den dybfrosne sæd ikke synes at være mulig. Undersøgelserne over en forlængelse af opbevaringstiden ved endnu lavere opbevaringstemperaturer synes på nuværende tidspunkt at give håb om, at det ad den vej vil være muligt at finde en løsning på dette spørgsmål.

Knyttet til disse fordele ved dybfrysning af sæd vil der fremtræde visse ulemper ved denne sædpræservationsmetode. Således varierer de resultater, der opnås efter anvendelse af dybfrossen sæd, ret betydeligt. Det er igennem de foreliggende undersøgelser vist, at der med visse tyre kan opnås resultater, der næsten er identiske med de resultater, der opnås efter anvendelse af frisk sæd. For en anden gruppe tyres vedkommende vil der ske en forringelse af resultaterne på 5–15 procentenheder efter anvendelse af dybfrossen sæd. Det synes dog som om en sådan forringelse i en del tilfælde kan opvejes af de fordele, som dybfrysningen frembyder. Yderligere er selve dybfrysningsprocessen en tidsrøvende proces, og udgifterne til de enkelte sædportioner vil derigennem i forbindelse med omkostningerne til drift af et opbevaringsanlæg blive forøgede. Endelig vil der med den mere intensive udnyttelse af en tyrs sædproduktion følge en større fare for indavl indenfor lokale kvæg-racer, således som det her i landet forekommer indenfor R. D. M. Ved en udbredt anvendelse af dybfrossen sæd under sådanne forhold er det således et spørgsmål, om der ikke bør drages omsorg for, at risikoen for en sådan følge reduceres mest muligt.

Indretning af fremtidige dybfrysningsanlæg.

Efter de enkelte foreningers behov og ønsker kan der indrettes anlæg, der vil være i stand til at opfylde de krav, der måtte blive stillet til nedfrysning og opbevaring af dybfrossen sæd, idet sådanne anlæg kan fremstilles således, at de kan dække ethvert behov. Ud fra erfaringer over drifts- og anlægsudgifter til et anlæg af den størrelse, der har været anvendt ved de her publicerede forsøg, skal der gives en orientering om de muligheder, der for de enkelte foreninger foreligger, når spørgsmålet om anvendelse af dybfrossen sæd og eventuel oprettelse af en sædbank må være aktuel.

Såfremt man udelukkende ønsker at anvende dybfrossen sæd for at tilfredsstille efterspørgslen fra kvægavlerne på sæd fra bestemte tyre, og hvor der således kun vil blive tale om ganske kortvarig opbevaring af den nedfrosne sæd, kan spørgsmålet løses gennem anvendelse af store termokrukker eller gennem anskaffelse af små dybfrysningsbokse. En sådan er afbildet nedenfor og har en kapacitet på ca. 1000 portioner. Anskaffelsesprisen er ca. 500 kr., og driftsudgifterne må påregnes at andrage ca. 400 kr. årlig med den nuværende pris på kulsyreis (kr. 0,95 pr. kg).

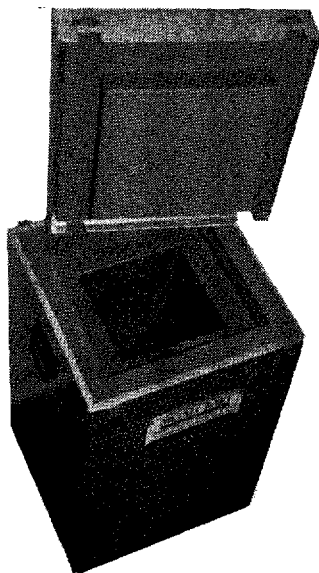


Fig. 7. Lille dybfrysningsskabs.

Ønsker man langtidsoptagelse af store portioner dybfrosset sæd, nødvendiggør dette opstilling af specielle dybfrysningsskabe med stor kapacitet. Af de forskellige typer, der har fundet anvendelse, forekommer den type, der har været anvendt ved de her publicerede forsøg, forfatteren mest tiltalende (fig. 3, side 19). Denne type er konstrueret i England og er beregnet til opbevaring af sæd nedfrosset i ampuller. En af forfatteren modificeret type af denne skab kan anvendes, såfremt man ønsker at anvende nedfrysning i cellophanrør (fig. 8). Anlægsudgifterne andrager ca. 4500 kr., og skabet har en kapacitet på ca. 10 000 portioner. Der vil til drift af en sådan skab medgå ca. 3000 kg tøris årligt.

De forøgede udgifter, der vil blive pålagt hver enkel nedfrosset portion, vil således være afhængige af, hvor stort et anlæg, der måtte finde anvendelse. Eksempelvis vil udgiften pr. portion, når et lille og et stort anlæg af ovenfor omtalte dimensioner er halvt fyldt med portioner (henholdsvis 500 og 5000 portioner) andrage henholdsvis 80 og 60 øre. Jo færre portioner, der opbevares i skabet, des større udgift pr. portion et vice versa. Til dette beløb må adderes de udgifter, som emballering af sæden og transport af denne i nedfrosset tilstand udgør.

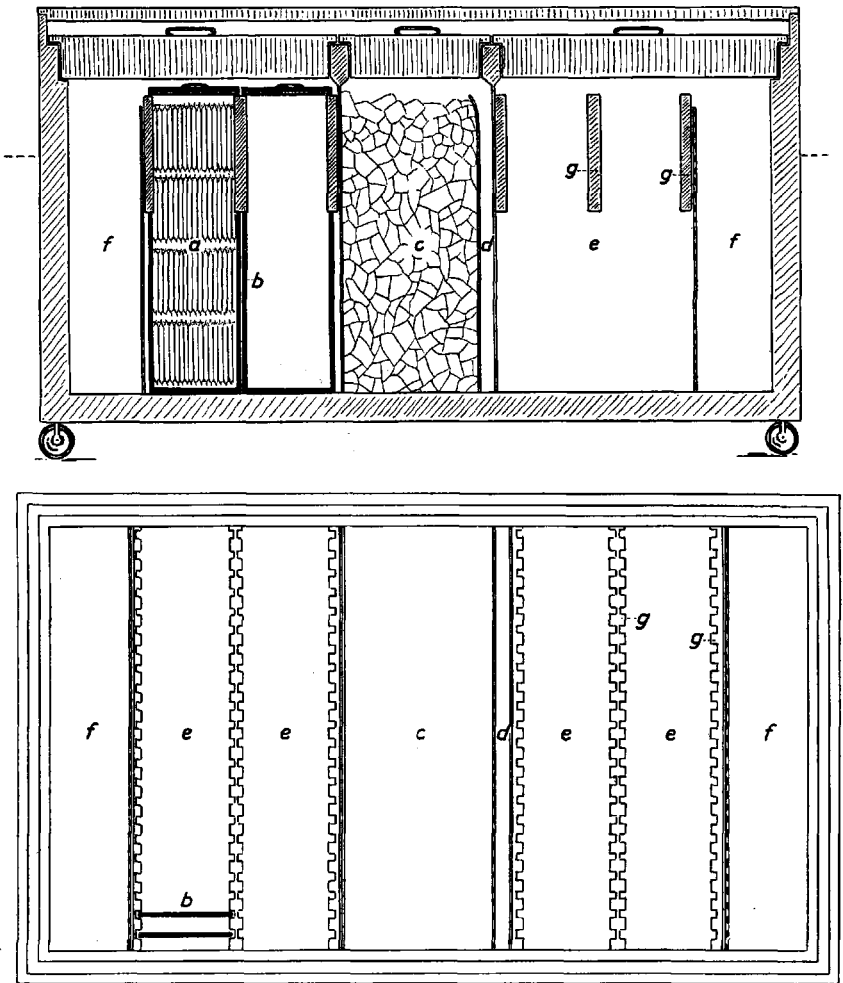


Fig. 8. Dybfrysningssboks til opbevaring af sæd nedfrosset i cellophanrør.

- a. Monteret ramme
- b. Ramme.
- c. Kulsyreisreservoir.
- d. Nedfrysningsrum.

- e. Opbevaringsrum.
- f. Kulsyreisdepot.
- g. Rammeholder.

VI. Sammendrag og konklusion.

Efter en oversigt over de hidtidige erfaringer med dybfrysning af tyresæd omtales to forsøg udført i Kvægavlsforeningen for Hjørring Amt. Ved forsøg 1, der udførtes i perioden 1. december 1954—1. marts 1955, anvendtes følgende procedure: efter sædopsamlingen blev sæden delt i to portioner, hvoraf den ene portion blev fortyndet med 25 pct. æggeblomme + 75 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning ved 30 ° C. og anvendt til inseminering på opsamlingsdagen. Den anden portion blev anvendt til dybfrysning og blev først fortyndet med 50 pct. æggeblomme + 50 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning og derefter i en 3—4 timers periode afkølet til 2—4 ° C. Den ene halvdel af den fortyndede sæd blev fortyndet 1 : 1 med en glycerinfortyndingsvædske (84 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning + 16 pct. analytisk glycerin) ved fraktioneret tilsætning (4 lige store portioner tilsat med 5—10 min. interval), den anden halvdel 1 : 1 ved øjeblikkelig tilsætning. Der anvendtes fortyndingsgraderne 1 : 10—1 : 15. Efter 18—22 timers tilvænningsperiode blev sæden nedfrosset i glasampuller i portioner på 1 ml, og der anvendtes følgende nedfrysningshastighed: $\frac{1}{2}$ —1 ° C./min. i intervallet 2 ° C.—÷ 10 ° C. og derefter 3—4 ° C./min. indtil ÷ 79 ° C. Den dybfrosne sæd blev anvendt til 1. gangs ins. af køer og kvier efter højst 14 dages opbevaring ved ÷ 77 ° C. Optøningen foregik under koldt-vandshane, og til inseminering blev anvendt $\frac{1}{2}$ ml. sæd. Enkelte portioner blev nedfrosset i cellophanrør efter samme metode. Optøningen af disse skete i hånden. Der blev opnået følgende resultater: ved anvendelse af 23 ejakulater fra 5 tyre med en overlevningsevne mellem 40 og 70 pct. til ins. af 251 køer og kvier fandtes resultaterne 11,3—27,4 procentenheder (60—90 dages i. o.-pct.) lavere end resultaterne efter anvendelse af frisk sæd (tabel 1). Der fandtes en overraskende stor forskel mellem 30—60 og 60—90 dages i. o.-pct. (tabel 1). Der fandtes ingen forskel på overlevningsevnen ved nedfrysning af 1., 2. og 3. spring opsamlet i samme seance. Ved nedfrysning af sæd emballeret i cellophanrør opnåedes resultater, der var identiske med resultaterne efter nedfrysning i glasampuller (tabel 2). Ved øjeblikkelig tilsætning af glycerinfortyndingsvædske fandtes en tendens til bedre resultater end efter

fraktioneret tilsætning (tabel 3). Ved en belastningsprøve, hvor sæden blev opbevaret ved 2°C . i 3 dage efter optøningen, fandtes efter 1 døgn opbevaring en halvering af antallet af overlevende sædceller; efter 2 døgn var $\frac{1}{3}$ af sædcellerne levende og efter 3 døgn opbevaring var kun få procent levende.

Ved forsøg 2, der udførtes i perioderne 1. august–1. oktober og 1. november–1. december 1955, anvendtes følgende procedure: efter sædopsamling blev sæden hensat ved stuetemperatur indtil dens temperatur androg 25°C ., og den blev derefter fortyndet med 40 pct. æggeblomme + 60 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning. Efter 8 timers opbevaring i køleskab ved 4°C . blev den fortyndet 1 : 1 med 84 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning + 16 pct. glycerin dels ved fraktioneret tilsætning (3 lige store portioner tilsat med 10 min. interval), dels ved øjeblikkelig tilsætning. Den endelige koncentration var minimalt 60×10^6 sædceller/cc. Efter en tilvænningsperiode på 16–18 timer blev sæden nedfrosset dels i glasampuller og dels i cellophanrør, og der anvendtes to nedfrysningshastigheder: a) $\frac{1}{2}$ – $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ i intervallet $4^{\circ}\text{C}.$ – $\div 10^{\circ}\text{C}.$, $2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ i intervallet $\div 10^{\circ}\text{C}.$ – $\div 15^{\circ}\text{C}.$ og derefter 5 – $6^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, og b) en meget hurtig metode, hvor sæden anbragtes direkte i groft pulveriseret kulsyre. Sæden blev opbevaret i 6–21 dage efter nedfrysningen ved $\div 77^{\circ}\text{C}$. Efter anvendelse af 28 ejakulater fra 9 tyre til ins. af 752 køer og kvier fandtes følgende (tabel 4): ved nedfrysning efter en langsom og en hurtig metode af sædemballeret i cellophanrør var de opnåede resultater identiske (henholdsvis 64,9 pct. og 64,7 pct.). Efter langsom nedfrysning af sæd i ampuller og cellophanrør og efter hurtig nedfrysning af sæd i cellophanrør var de opnåede resultater identiske (henholdsvis 59,5 pct., 64,9 pct. og 64,7 pct.). Uafhængigt af nedfrysnings- og emballeringsmetoder fandtes der en tendens til en forbedring af resultaterne efter øjeblikkelig fortynding med glycerinfortyndingsvædske sammenlignet med fraktioneret tilsætning (tabel 5). Som i forsøg 1 blev der ved anvendelse af en belastningsprøve forsøgt fremskaffet en metode til bedømmelse af sædens kvalitet efter nedfrysning, men der kunne ingen relation konstateres mellem sædens fertilitet og dens overlevningstid efter optøningen. Ved sammenligning af 30–60 og 60–90 dages i. o.-pct. fandtes normale forskelle (tabel 6). For de 9 tyre udgjorde forskellen mellem frisk sæd anvendt i samme periode og dybfrosset sæd 2,4–20,2 procentenheder til fordel for den friske sæd (tabel 6). I en efterfølgende diskussion er bl. a. be-

rørt muligheden af, at efterårssæd bedre tåler nedfrysningsbelastningen end vintersæd. Yderligere er diskuteret fordele og ulemper ved denne sædpræservationsmetode og indretning af fremtidige dybfrysingsanlæg.

Som et praktisk resultat af disse undersøgelser kan følgende simplificerede nedfrysningsmetode benyttes:

Efter sædopsamlingen, der foretages på normal måde i en kunstig vagina, henstilles sæden ved stuetemperatur, indtil dens temperatur andrager 25°C . 1. fortynding foretages lege artis med en vædske bestående af 60 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning + 40 pct. æggeblomme

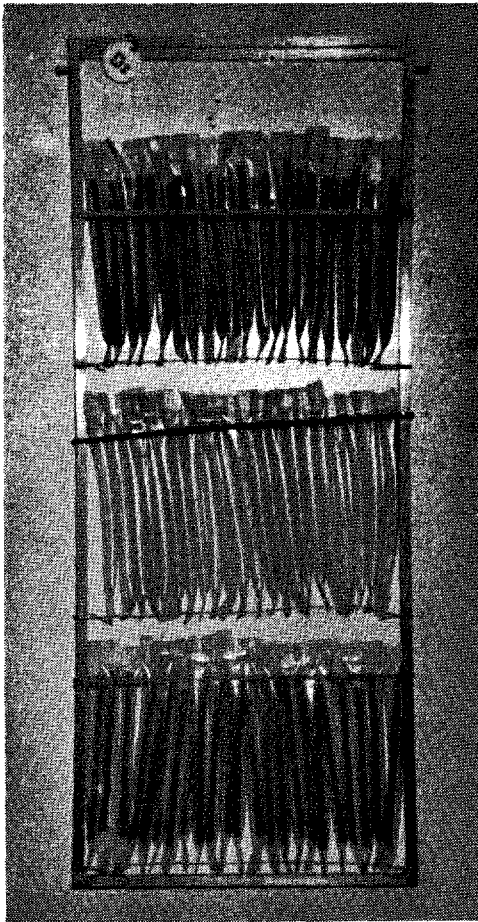


Fig. 9. Ramme med cellophanrør.

(temp. 25 ° C.). Sæden fortyndes til det halve af den endelige fortynding. Den fortyndede sæd henstilles i køleskab (temp. 4 ° C.) i 8 timer, hvorefter den fortyndes med en vædske af følgende sammensætning: 84 pct. 3,6 pct. natriumcitratopløsning + 16 pct. glycerin (volumenpct., glycerinum bidestillatum pro analysi). Der tilsættes samme volumen af denne fortyndingsvædske, som den fortyndede sæd udgør efter 1. fortynding, og fortyndingsvædsken tilsættes som ved almindelig sædfortynding. Efter denne endelige sædfortynding opbevares sæden i køleskabet i 15–20 timer.

Sædens emballering, der helst bør foregå umiddelbart før nedfrysningen, må udføres ved en temperatur på ca. 4 ° C. Før emballering og nedfrysning kan med fordel anvendes en forprøve, der vil vise, om der kan forventes en overlevningsevne i det pågældende ejakulat, der vil være tilfredsstillende. Nogle enkelte cellophanrør fyldes med den fortyndede sæd og emballeres i plasticemballagen, hvorefter de nedfryses ved anbringelse i groft pulveriseret kulsyreis. Der foretages en mikroskopisk bedømmelse efter 10 minutters forløb, og på denne afgøres, om man med fordel kan foretage nedfrysning af ejakulatet eller ikke. Anvendes sæden ikke til dybfrysning, kan den anvendes i frisk tilstand denne dag, således at der ikke foregår noget spild af sæd. Sæden anbringes i isvand, og cellophanrør og plasticemballage anbringes i en til formålet konstrueret beholder, der kan opretholde en temperatur på 4 ° C. I plasticemballagen anbringes et mærkat med tyrens navn og nedfrysningsdato. Efter anbringelse af de fyldte cellophanrør i plasticemballagen forsegles denne med en speciel lukker. Cellophanrørene monteres i rammer, der er konstrueret til formålet (fig. 9), og rammerne henstilles i de spor i dybfrysningsskabsens kulsyreisreservoir, der er beregnet til dette formål (fig. 8, side 42). Ved lejlighed (efter mindst 1 kvarters opbevaring heri) overføres rammerne til alkoholbadet i dybfrysningsskabskassen.

Når cellophanrørene skal anvendes klippes de fra rammen og anbringes i en termokrukke, der fyldes med pulveriseret kulsyreis. Denne proces bør ikke udsrækkes over $1\frac{1}{2}$ min. Umiddelbart før anvendelsen fjernes cellophanrørene fra plasticemballagen og optøes i hånden i ca. 1 minut.

VII. Summary and Conclusion.

After an account of previous experiences with deep-freezing of the semen of bulls, two experiments are mentioned which have been made at the „Kvægavlsforening for Hjørring Amt“. In experiment No. 1, which took place during the period December 1, 1954–March 1, 1955, the following procedure was applied: After collection the semen was divided into 2 portions, one of which was diluted by 25 % egg-volk + 75 % 3,6 % sodium citrate solution at 30 ° C and used for insemination on the day of collection. The second portion was used for deep-freezing and was at first diluted by 50 % egg-yolk + 50 % 3,6 % sodium citrate solution, where after it was cooled down to 2–4 ° C during a period of 3–4 hours. Half the diluted semen was diluted 1 : 1 with a glycerol diluter (84 % 3,6 % sodium citrate solution + 16 % analytic glycerol) by fractional addition (4 equal portions added at intervals of 5–10 minutes), the second half 1 : 1 by initial addition. Dilution rates 1 : 10–1 : 15 were applied. After an equilibration time of 18–22 hours the semen was frozen down in glass ampulles in portions of 1 ml and the following cooling rate was applied: $\frac{1}{2}$ –1 ° C/min. in the interval 2 ° C– $\div$ 10 ° C and thereafter 3–4 ° C/min. until $\div$ 79 ° C. The deep-frozen semen was applied for initial insemination of cows and heifers after no more than 14 days storage at $\div$ 77 ° C. Thawing took place by cold water and $\frac{1}{2}$ ml of semen was used per insemination. A few portions were cooled down in cellophane straws according to the same method. Thawing of these took place by the warmth of the hand. The following results were obtained: By application of 23 ejaculates from 5 bulls with survival rates between 40 and 70 % for insemination of 251 cows and heifers the results were found 11,3–27,4 percentage units (60–90 days % N. R.) lower than the results after application of fresh semen (Table 1). A surprisingly great difference between 30–60 and 60–90 days % N. R. was found (Table 1). No difference was found in survival rates on deep-freezing of first, second, and third jumps collected in the same seance. By deep-freezing semen packed in cellophane straws results were obtained which were identical with the results after freezing in glass ampulles (Table 2). By initial addition of glycerol di-

luter was found a tendency of better results than after fractional addition (Table 3). At a test where the semen was stored at 2 ° C for three days after thawing was found after 24 hours of storage only half the number of surviving spermatozoa, after 48 hours only one third and after 72 hours only a few per cent of the spermatozoa were alive.

By experiment No. 2, which was carried out during the periods August 1.–October 1. and November 1.–December 1. 1955, the following procedure was applied: After collection, the semen was placed at room-temperature until its temperature amounted to 25 ° C, it was thereafter diluted with 40 % egg-yolk + 60 % 3,6 % sodium citrate solution. After 8 hours storage in refrigerator at 4 ° C it was diluted 1 : 1 with 84 % 3,6 % sodium citrate solution + 16 % glycerol partly by fractional addition (3 equal portions added at intervals of 10 min.s) partly by initial addition. The final minimum concentration was 60×10^6 spermatozoa/cc. After an equilibration time on 16–18 hours the semen was frozen down partly in glass ampulles partly in straws and the following two cooling rates were applied: a) $\frac{1}{2}$ –1 ° C/min. in the interval 4 ° C–10 ° C, 2 ° C/min. in the interval 10 ° C–15 ° C and thereafter 5–6 ° C/min. and b) a very quick method where the semen was placed directly in roughly powdered carbon dioxyd. The semen was stored for 6–21 days after being frozen at -77 ° C. After application of 28 ejaculates from 9 bulls for insemination of 752 cows and heifers the following was found (Table 4): by cooling according to a slow and a quick method of semen packed in straws the results obtained were identical (64,9 % and 64,7 % respectively). After slow cooling of semen in ampulles and straws and after quick cooling of semen in straws the results obtained were identical (59,5 %, 64,9 % and 64,7 % respectively). Independent of packing- and cooling methods, a tendency of improvement of results was found after initial addition of glycerol diluter compared with fractional addition (Table 5). As mentioned in experiment No. 1, it was attempted by employing storage test to get at a method of determination of the quality the of the semen after cooling, but no relation could be ascertained between the fertility of the semen and its livability after thawing. By comparison between the non-return percentage of 30–60 days and 60–90 days normal differences were found (Table 6). For the 9 bulls the difference between fresh semen and deep-frozen semen applied during the same period amounted to 2,4–20,2 percentage units in favour of the fresh semen (Table 6). In a subse-

quent discussion the possibility have been mentioned that autumnal semen stands the freezing procedure better than winter semen. Furthermore the advantages and disadvantages of this method of preserving semen have been discussed along with arrangement of future deep-freezing plants.

As a practical result of these investigations the following simplified method of cooling can be applied:

After collection of semen, which is made in the normal way in an artificial vagina, the semen is placed at room temperature until its temperature is 25 ° C. Initial dilution is carried out *lege artis* with a solution consisting of 60 % 3,6 % sodium citrate solution + 40 % egg-yolk (temperature 25 ° C). The semen is diluted to half the final dilution. The diluted semen is placed in a refrigerator for 8 hours (temperature 4 ° C) whereafter it is diluted with a solution of the following composition: 84 % 3,6 % sodium citrate solution + 16 % glycerol (volume pct., glycerinum bidestillatum pro analysi). The same volume of this diluter as the diluted semen makes after initial dilution is added, and the diluter is added as in ordinary dilution of semen. After this final dilution the semen is stored in a refrigerator for 15–20 hours.

The packing of the semen, which preferably should take place immediately before the cooling, must take place at a temperature of about 4 ° C. Before packing and cooling a test can advantageously be applied, which will show whether a survivability of the ejaculate in question, which will be satisfactory, may be expected. A few straws are filled with the diluted semen and are packed in plastic-wrapping whereafter they are cooled down by being placed in roughly powdered carbon dioxide. A microscopic evaluation is made after 10 minutes and upon same it is decided whether cooling can advantageously be done of the ejaculate or not. If the semen is not used for deep-freezing it may be used fresh the same day, thus no waste of semen will take place. The semen is placed in ice-water, and straws and plastic-wrapping are placed in a container constructed for the purpose, which can keep up a temperature of 4 ° C. In the plastic-wrapping is placed a label provided with the name of the bull and the date of freezing. After placing the filled straws in the plastic-wrapping same is sealed with a special closing apparatus. The straws are placed in frames constructed for the purpose (fig. 9), and the frames are placed in the tracks of the carbon dioxide container of the deep-freezing box, which are intended for this purpose (fig. 8,

page 42). When convenient (after at least a quarter of an hour's storage here) the frames are transferred to the alcohol bath of the deep-freezing box.

When the straws are to be used they are cut off the frames and are placed in a thermo-jar, which is filled with powdered carbon dioxyd. This process must not take more than $1/2$ minute. Immediately before use, the straws are removed from the plastic-wrapping and are thawed by the warmth of hand for about one minute.

VIII. Zusammenfassung und Konklusion.

Nach einer Übersicht über die bisherigen Erfahrungen in Bezug auf Tiefkühlung von Stiersamen werden zwei Versuche im „Viehzuchtverein für Hjörning Amt“ erwähnt. Beim Versuch 1, der in der Periode 1/12–54 bis 1/3–55 ausgeführt wurde, benutzte man folgendes Verfahren: Nach der Spermagewinnung wurde der Samen in 2 Portionen aufgeteilt, von diesen wurde die eine Portion mit 25 % Eidotter + 75 % 3,6 % Natriumcitrat auflösung bei etwa 30 ° C verdünnt und für Inseminierung am Gewinnungstage angewandt. Die andere Portion wurde für Tiefkühlung benutzt und erst mit 50 % Eidotter + 50 % 3,6 % Natriumcitrat auflösung verdünnt, danach in einer 3–4 stündlichen Periode auf 2–4 ° C abgekühlt. Die eine Hälfte des verdünnten Samens wurde im Verhältnis 1 : 1 mit einer Glycerinverdünnungsflüssigkeit (84 % 3,6 % Natriumcitrat auflösung + 16 % analytisches Glycerins) bei fraktionierten Zusätzen (4 gleich grosse Portionen mit einem Intervall von 5–10 Min.) verdünnt, die andere Hälfte 1 : 1 bei sofortigem Zusetzen. Es wurden die Verdünnungsgrade 1 : 10–1 : 15 benutzt. Nach einer 18–22 stündigen Bearbeitungspause wurde der Samen in Glasampullen in Portionen vom 1 ml eingefroren, es wurde folgende Temperatursenkung benutzt: $\frac{1}{2}$ –1 ° C/min. im Intervall 2 ° C $\div$ 10 ° C und danach 3–4 ° C/min. bis auf $\div$ 79 ° C. Der tiefgefrorene Samen wurde für erstmalige Insemination von Kühen und Färsen nach einer Lagerung von höchst 14 Tagen bei $\div$ 77 ° C angewandt. Das Auftauen erfolgte unter Kaltwasserhahn und zur Inseminierung wurde $\frac{1}{2}$ ml Samen benutzt. Einige Portionen wurden nach demselben Verfahren in Cellophanröhrchen eingefroren. Diese wurden in der Hand aufgetaut. Folgende Resultate wurden erzielt: Bei Benutzung von 23 Ejakulaten von 5 Stieren mit einem Überlebensvermögen zwischen 40–70 % zur Inseminierung von 251 Kühen und Färsen wurden die Resultate 11,3–27,4 Prozenteinheiten (60–90 Tage Nicht-Umrindern-Prozent) niedriger als die Resultate bei Verwendung von frischen Samen (Tabelle 1) gefunden. Es erwies sich ein überraschend grosser Unterschied zwischen 30–60 und 60–90 Tage Nicht-Umrindern-Prozent (Tabelle 1). Es ergab sich kein Unterschied im Überlebensvermögen

bei der Tiefkühlung vom 1., 2. und 3. Sprung ejakuliert in derselben Seance. Bei der Tiefkühlung von Samen in Cellophanröhrchen emballiert, wurden Resultate erzielt, die mit Resultaten nach Tiefkühlung in Glasampullen (Tabelle 2) identisch waren. Bei sofortigem Zusatz von Glycerinverdünnungsflüssigkeit fand man eine Neigung zu besseren Ergebnissen als nach fraktioniertem Zusetzen (Tabelle 3). Bei einer Haltbarkeitsprobe, wo der Samen 3 Tage nach Auftauen bei 2°C aufbewahrt wurde, fand man nach 24 Stunden Aufbewahrung einer Halbierung der überlebenden Samenzellen; Nach 2×24 Stunden war $\frac{1}{3}$ der Samenzellen am Leben und nach 3×24 Stunden nur wenige Prozent.

Beim Versuch 2, der in den Perioden 1/8–1/10 und 1/11–1/12 1955 ausgeführt wurde, benutzte man folgendes Verfahren: Nach der Spermagewinnung wurde der Samen in Stubentemperatur hingestellt bis seine Temperatur 25°C betrug, danach wurde mit 40 % Eidotter + 60 % 3,6 % Natriumcitrat auflösung verdünnt. Nach 8-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C wurde er im Verhältnis 1 : 1 mit 84 % 3,6 % Natriumcitrat auflösung + 16 % Glycerin verdünnt, teils bei fraktioniertem Zusatz (3 gleich grosse Portionen mit 10 Minuten Intervall zugezetzt), teils bei sofortigem Zusetzen. Die endgültige Konzentration war minimal 60×10^6 Samenzellen/cc. Nach einer Bearbeitungspause von 16–18 Stunden wurde der Samen teils in Glasampullen und teils in Cellophanröhrchen eingefroren und es wurden zwei Temperatursenkungsmethoden benutzt: a) $\frac{1}{2}-1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ im Intervall $4^{\circ}\text{C}-\div 10^{\circ}\text{C}$, $2^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ im Intervall $\div 10^{\circ}\text{C}-\div 15^{\circ}\text{C}$ und darauf $5-6^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ und b) eine sehr schnelle Methode, wo der Samen direkt in grob pulverisierter Kohlensäureeis angebracht wurde. Der Samen wurde 6–21 Tage nach der Tiefkühlung bei $\div 77^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Nach Anwendung von 28 Ejakulaten von 9 Stieren zur erstmaligen Inseminierung von 752 Kühen und Färsen ergab sich folgendes (Tabelle 4): Bei Tiefkühlung nach einer langsamen und einer schnellen Methode von Samen in Cellophanröhrchen emballiert, waren die erzielten Resultate identisch (bezw. 64,9 % und 64,7 %). Nach langsamer Tiefkühlung von Samen in Ampullen und Cellophanröhrchen und nach schneller Tiefkühlung von Samen in Cellophanröhrchen waren die erzielten Resultate identisch (bezw. 59,5 %, 64,9 % und 64,7 %). Unabhängig von Emballierungs- und Tiefkühlungsmethoden fand man eine Neigung zu einer Verbesserung der Resultate nach sofortigem Verdün-

nen mit Glycerinverdünnungsflüssigkeit im Vergleich zu fraktioniertem Zusatz (Tabelle 5). Wie bei Versuch 1 wurde es mit Anwendung einer Haltbarkeitsprobe versucht, eine Methode zur Beurteilung der Samenqualität nach der Tiefkühlung zu finden, es konnte jedoch keine Relation zur Fertilität des Samens und seiner Überlebenszeit nach dem Auftauen festgestellt werden. Bei Vergleich von 30–60 und 60–90 Tage Nicht-Umrindern-Prozent fanden sich normale Unterschiede (Tabelle 6). Für die 9 Stiere machte der Unterschied zwischen frischem Samen und eingefrorenem Samen in derselben Periode angewandt 2,4–20,2 Prozenteinheiten zum Vorteil des frischen Samens aus (Tabelle 6). In einer nachfolgenden Diskussion ist u. a. die Möglichkeit berührt, dass Herbstsamen die Tiefkühlungsbelastung besser verträgt als Wintersamen. Ferner sind Vorteile und Nachteile bei dieser Samenpräservierungsmethode und die Einrichtung künftiger Tiefkühlungsanlagen diskutiert.

Als ein praktisches Ergebnis dieser Untersuchungen kann folgendes vereinfachtes Tiefkühlungsverfahren benutzt werden:

Nach der Samengewinnung, das in normaler Weise in einer künstlichen Vagina erfolgt, wird der Samen bei Zimmertemperatur angebracht bis die Temperatur 25 ° C beträgt. 1. Verdünnung erfolgt *lege artis* mit einer Flüssigkeit bestehend aus 60 % 3,6 % Natriumcitrat-auflösung + 40 % Eidotter (Temperatur 25 ° C). Der Samen wird auf die Hälfte der endgültigen Verdünnung verdünnt. Der verdünnte Samen wird 8 Stunden in Kühlschrank (Temp. 4 ° C) gestellt, worauf er mit einer Flüssigkeit folgender Zusammensetzung verdünnt wird: 84 % 3,6 % Natriumcitrat-auflösung + 16 % Glycerin (Volumenprozent, *glycerinum bidestillatum, pro analysi*). Dasselbe Volumen dieser Verdünnungsflüssigkeit, wie der verdünnte Samen nach der ersten Verdünnung, wird hinzugesetzt, und Verdünnungsflüssigkeit wird wie bei gewöhnlicher Samenverdünnung hinzugegeben. Nach dieser endgültigen Samenverdünnung wird der Samen 15–20 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.

Das Emballieren des Samens, das am liebsten unmittelbar vor der Tiefkühlung geschehen soll, ist bei einer Temperatur von etwa 4 ° C auszuführen. Vor dem Emballieren und Abkühlung kann mit Vorteil eine Vorprobe angewandt werden, die zeigen wird, ob in dem betreffenden Ejakulat ein befriedigendes Überlebensvermögen zu erwarten ist. Einige wenige Cellophanröhrchen werden mit dem verdünnten Samen angefüllt und in Plastikverpackung emballiert, wonach sie durch

Anbringung in grob pulverisiertem Kohlensäureeis eingefroren werden. Nach 10 Minuten wird eine mikroskopische Beurteilung vorgenommen und diese entscheidet, ob man mit Vorteil eine Tiefkühlung des Ejakulats unternehmen kann oder nicht. Wird der Samen nicht zum Tiefkühlung benutzt, so kann er an diesem Tage in frischem Zustande benutzt werden, sodass kein Verlust von Samen stattfindet. Der Samen wird in Eiswasser und Cellophanröhrchen und Plastikverpackung in einem zu diesem Zweck konstruierten Behälter, der eine Temperatur von 4°C halten kann, angebracht. Die Plastikemballage wird mit dem Namen des Stieres und Datum versehen. Nach Anbringen der gefüllten Cellophanröhrchen in der Plastikverpackung wird diese mit besonderem Verschluss versiegelt. Die Cellophanröhrchen werden in Rahmen montiert, die zu diesem Zweck konstruiert sind (Fig. 9) und hiernach in die Einrichtungen im Kohlensäureeisreservoir der Tiefkühlungstruhe, die zu diesem Zweck konstruiert sind, eingesetzt (Fig. 8, Seite 42). Bei Gelegenheit (nach einer Aufbewahrung von mindestens einer Viertelstunde) werden die Rahmen in das Alkoholbad in der Tiefkühlungstruhe überführt.

Wenn die Cellophanröhrchen benutzt werden sollen, schneidet man sie von Rahmen und legt sie in einen Thermogefäß, der mit pulverisiertem Trockeneis angefüllt wird. Dieser Vorgang darf nicht über $1/2$ Min. dauern. Unmittelbar vor dem Gebrauch entfernt man die Cellophanröhrchen von der Plastikverpackung and taut sie etwa 1 Min. in der Hand auf.

IX. Litteratur.

- Adler, H. C.*: Ikke offentliggjort data, 1954.
- Dunn, H. O.*: Proc. of 6. An. Conf. of N. A. A. B., 1953, 74.
- Jahnel, F.*: Klin. Wschr. 1938, 17, 1273.
- Joslyn, M. A.*: Adv. in Enzymol. 1949, 9, 613.
- Luyet, B. J.* og *E. L. Hodapp*: Proc. Soc. exp. Biol. 1938, 39, 433.
- Philips, P. H.* og *H. A. Lardy*: Proc. Amer. Soc. Anim. Prod. 1939, 1299.
- Polge, C.* og *L. E. A. Rowson*: II. Int. Cong. Phys. and Pathol. of Anim. Reprod. and of Artific. Ins., Copenhagen 1952, 3, 39.
- Polge, C.*: Vet. Rec. 1953, 65, 557.
- Rasbech, N. O.*: VII. Nord. Vet.-möte, Oslo 1954, 371.
- Rowson, L. E. A.* og *C. Polge*: Vet. Rec. 1953, 65, 677.
- Saroff, J.* og *J. P. Mixner*: J. Dairy Sci. 1955, 38, 292.
- Shaffner, C. S.*, *E. W. Henderson* og *C. G. Card*: Poultr. Sci. 1941, 20, 259.
- Smith, A. U.*, *C. Polge* og *A. S. Parkes*: Nature 1949, 164, 666.
- Smith, A. U.*, *C. Polge* og *J. Smiles*: J. of the Royal Microscop. Soc. 1951, 71, 186.
- Spallanzani, L.*: cit. fra *T. Mann*: The Biochemistry of Semen, 1954.
- Swanson, E. W.* og *H. A. Hermann*: J. Dairy Sci. 1941, 24, 321.
- White, I. G.*, *A. W. Blackshaw* og *C. W. Emmens*: Austr. Vet. J. 1952, 30, no. 4.