

Próba ustalenia korelacji między wybranymi parametrami oceny ruchu indywidualnego plemników w nasieniu knurów a czasem jego przechowywania w warunkach standardowych

ZYGMUNT WRONA, MICHAŁ KLIMONT, LESZEK KRAKOWSKI

Zakład Andrologii i Biotechnologii Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Wrona Z., Klimont M., Krakowski L.

Attempt at estimating the correlation between selected parameters of boar spermatozoa movement indicators and the time of spermatozoa storage in standard conditions

Summary

The objective of the study was to determinate the correlation between selected parameters of boar sperm movement (type of movement and speed of movement) and the storage time of a liquid insemination dose. For dose preparation semen was diluted in a solvent that supports spermatozoa vitality for five days. Nine reproduction boars were used for the study. The spermatozoon was examined with the use of the computer sperm analyzer SCA produced by MICROPTIC S.L. The evaluation concerned the type of movement (progressive movement and other types of movement) and speed of movement (fast, medium, slow and static). Spermatozoa morphology examination was also performed and the percentage of dead spermatozoa was established.

Data obtained in the study indicated that spermatozoa dose was suitable for use for 48 hours after collection. On the fourth day and later the quality parameters of the sperm insemination dose did not guarantee a sufficient fertilization rate. The method of evaluation used in the study makes it possible to verify sperm dose quality indicators over the whole time of spermatozoa storage

Keywords: computer sperm analyzer, spermatozoa individual movement, semen quality

Intensyfikacja chowu i hodowli trzody chlewnej spowodowała wzrost zapotrzebowania na wysokiej jakości nasienie, pozyskiwane od knurów w centrach pozyskiwania nasienia lub importowane. Obecnie nasienie knurów w Polsce konserwowane jest w postaci płynnej. Nowoczesne rozrzedzalniki nasienia pozwalają na zachowanie jego przydatności do inseminacji nawet do 10 dni (1, 7) i umożliwiają przesyłanie na duże odległości. Problemem jest w dalszym ciągu zbyt szybki spadek wartości zapładniającej nasienia wraz z upływem czasu od jego wyprodukowania (1, 13). Na zachowanie zdolności zapładniającej plemników wpływ mają zarówno jakość samych rozrzedzalników, jak i rasa, wiek, żywienie, sposób utrzymania i użytkowania knura reproduktora (2, 3, 5, 7, 14).

Intensyfikacja produkcji, jak i ograniczanie kosztów produkcji, wymuszają maksymalne wykorzystywanie reproduktorów, co może mieć negatywny wpływ na wartość biologiczną ich nasienia. Także stała selekcja knurów w kierunku pożądanych przez hodowców cech

niejednokrotnie prowadzi do zmniejszenia zdolności zapładniającej nasienia. Dlatego też coraz większego znaczenia nabierają metody oceny nasienia, pozwalające na ustalenie jego wartości zapładniającej w różnym czasie od jego przygotowania do unasienniania (5, 6, 8). Szczególnie istotne jest prześledzenie wskaźników jakości nasienia dla porcji nasienia przygotowanych do inseminacji i przechowywanych powyżej trzeciej doby od ich przygotowania. Konieczność częstszej niż dotychczas oceny jakości nasienia knurów poddyktowana jest pojawiającą się podczas eksploatacji okresową, niską jakością ich ejakulatów. Niska jakość nasienia jest przyczyną największego odsetka (33,34%) brakowania knurów jako reproduktorów (14).

Celem przeprowadzonych badań była próba ustalenia korelacji pomiędzy wybranymi wskaźnikami ruchu indywidualnego plemników knurów reproduktorów, dokonywana z wykorzystaniem komputerowego systemu jego oceny a czasem przechowywania nasienia w warunkach przewidzianych dla nasienia knurów.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło nasienie pochodzące od 9 knurów produkcyjnych, w wieku 12-30 miesięcy, żywionych standardową paszą przeznaczoną dla knurów reproduktorów. Nasienie dla celów produkcyjnych pobierano 2 razy w tygodniu. Po pobraniu i oddzieleniu frakcji galaretowatej nasienie rozrzedzono rozrzedzalnikiem komercyjnym, pozwalającym na zachowanie żywotności plemników do 5 dni i konfekcjonowano zgodnie z przyjętą procedurą dla nasienia knurów, a następnie przechowywano w temperaturze 18°C. Parametry nasienia, w porcjach przygotowanych do inseminacji, oceniane były bezpośrednio po przygotowaniu oraz w 24., 48., 72. godzinie od pobrania. Przed każdą analizą materiał w potrzebnej do oceny objętości był podgrzewany w łaźni wodnej do temperatury 37°C.

Do oceny wybranych wskaźników ruchu indywidualnego plemników knurów reproduktorów wykorzystano komputerowy system analizy nasienia SCA (Sperm Class Analyzer) firmy Microptic S.L. Ruchliwość plemników określana była w zakresie rodzaju ruchu indywidualnego (ruch postępowy, ruchy nieprawidłowe, plemniki w bezruchu) i szybkości ruchu – ruch szybki ($> 35 \mu\text{m s}^{-1}$), ruch średni ($10\text{-}34 \mu\text{m s}^{-1}$), ruch wolny ($< 10 \mu\text{m s}^{-1}$). Do plemników o ruchu postępowym zaliczano wszystkie plemniki poruszające się ruchem szybkim i te plemniki w grupie plemników o ruchu średnim, które poruszały się z szybkością powyżej $20 \mu\text{m s}^{-1}$.

W celu określenia indywidualnej ruchliwości plemników i koncentracji wykorzystano czterokomorowe szkiełka Leja 20 o objętości komory $20 \mu\text{L}$. Do analizy używano po $5 \mu\text{L}$ nasienia podgrzanego do temperatury 37°C, uprzednio rozrzedzonego komercyjnym rozrzedzalnikiem 1 : 10. Oceny wymienionych parametrów dokonano przy użyciu mikroskopu świetlnego marki Olympus CX4 w powiększeniu $10 \times$ – obiektyw specjalistyczny NH UIS 2-V Plan FL N $10 \times / 0.30 \text{ Ph1}$

(końcowe pow. 10×10) z użyciem zielonego filtru i odpowiedniego modułu programu SCA. Dokumentację badań stanowiły zapisy w systemie komputerowym przy wykorzystaniu kamery Baslera A312 FC. Zaletą systemu jest kolorowa wizualizacja poszczególnych typów ruchu plemników.

Objętość ejakulatu (bez frakcji galaretowatej) wahała się od 140,0 ml do 220,0 ml, natomiast koncentracja nasienia w ejakulacie (bez frakcji galaretowatej) wynosiła od 554 do 601 mln/cm³. Odsetek plemników martwych oceniano w oparciu o rozmazy nasienia barwione tradycyjną metodą tzw. nigrozynowo-eozynową.

Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskanych badań zestawione zostały w postaci wykresów oraz w formie opisowej. W pierwszym badaniu wykonanym zaraz po pobraniu nasienia, ruchliwość wykazywało 90,6% plemników (od 67,5 do 98,9) u poszczególnych reproduktorów (ryc. 1 i tab. 1). Obserwowano przy tym sporadyczną, pojedynczą aglutynację (A). W grupie plemników o ruchu postępowym szybki ruch wykazywało 64,17% plemników, średniej prędkości ruchliwość wykazywało 14,31%, a 12,17% wykazywało ruch wolny. Po upływie 24 godzin obserwowano spadek odsetka plemników o ruchu postępowym (33,47%), przy równoczesnym wzroście odsetka plemników o ruchu nieprawidłowym – 31,26% (plemniki poruszające się zbyt wolno, o ruchu zegarowym, kołowym itp.) i plemników nie wykazujących ruchu (35,28%). Po 48 godzinach nastąpił dalszy wyraźny wzrost odsetka plemników nie wykazujących ruchu (76,92%) i spadek liczby plemników o ruchu postępowym (tylko 7,19%). Po upływie 72 godzin nie obserwowano plemników o ruchu postępowym, a odsetek plemników nie wykazujących ruchu osiągnął wartość 97,21%.

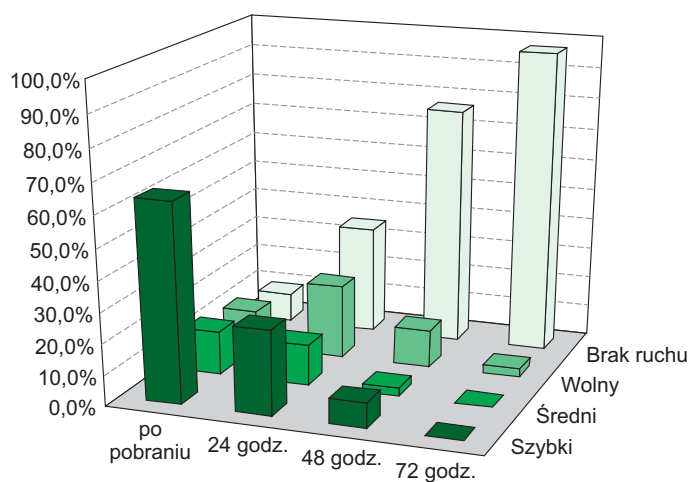
Tab. 1. Szybkość ruchu plemników w ejakulatach poszczególnych knurów reproduktorów w zależności od czasu przechowywania (n = 9)

Czas	Rodzaj ruchu	Nr identyfikacyjny knurów									Średnie
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Po pobraniu	szybki	87,6%	80,8%	83,8%	50,6%	56,3%	86,6%	63,4%	26,9%	41,6%	64,16%
	średni	7,1%	10,9%	6,6%	31,6%	15,9%	6,6%	11,7%	21,7%	16,7%	14,30%
	wolny	4,2%	3,0%	6,6%	12,9%	17,0%	3,8%	18,5%	18,9%	24,7%	12,18%
	brak ruchu	1,1%	5,3%	3,0%	4,9%	10,9%	3,0%	6,5%	32,6%	17,0%	9,37%
24 godz.	szybki	22,3%	1,4%	30,5%	36,9%	7,7%	82,0%	39,0%	27,3%	0,7%	27,54%
	średni	13,7%	2,3%	16,9%	33,5%	12,6%	8,9%	16,9%	13,3%	2,2%	13,39%
	wolny	25,8%	18,1%	40,2%	16,7%	40,6%	4,9%	33,5%	20,5%	13,9%	23,80%
	brak ruchu	38,2%	78,2%	12,4%	12,8%	39,1%	4,2%	10,5%	39,0%	83,2%	35,27%
48 godz.	szybki	0,0%	0,5%	0,2%	58,3%	1,5%	5,2%	7,3%	0,1%	0,0%	8,14%
	średni	0,6%	3,5%	0,7%	9,3%	0,9%	7,1%	2,0%	0,2%	0,4%	2,74%
	wolny	8,9%	3,0%	19,7%	12,2%	7,1%	35,1%	10,0%	4,5%	9,3%	12,20%
	brak ruchu	90,5%	93,0%	79,4%	20,2%	90,5%	52,6%	80,7%	95,1%	90,3%	76,92%
72 godz.	szybki	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%	0,02%
	średni	0,2%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%	0,08%
	wolny	2,5%	0,0%	3,3%	4,6%	0,0%	4,6%	0,0%	4,6%	4,6%	2,69%
	brak ruchu	97,2%	100,0%	96,7%	95,3%	100,0%	95,1%	100,0%	95,2%	95,4%	97,21%

Szybkość plemników o ruchu prawidłowym przedstawiono na ryc. 2 i w tab. 2. Bezpośrednio po przygotowaniu płynnych porcji nasienia do inseminacji odsetek plemników poruszających się ruchem postępowym szybkim sięgał 64,17%, po 24 godzinach spadał do wartości 27,53%, aby po 48 godzinach przyjąć wartość 8,12%. Po upływie 72 godzin jedynie znikoma liczba plemników poruszała się szybkim ruchem postępowym (0,03%). Dynamika zmniejszania się odsetka plemników o średniej szybkości ruchu była mniejsza. Bezpośrednio po przygotowaniu nasienia odsetek plemników o średniej szybkości ruchu wynosił 14,31%, po upływie 24 godzin spadł nieznacznie do wartości 13,36%,

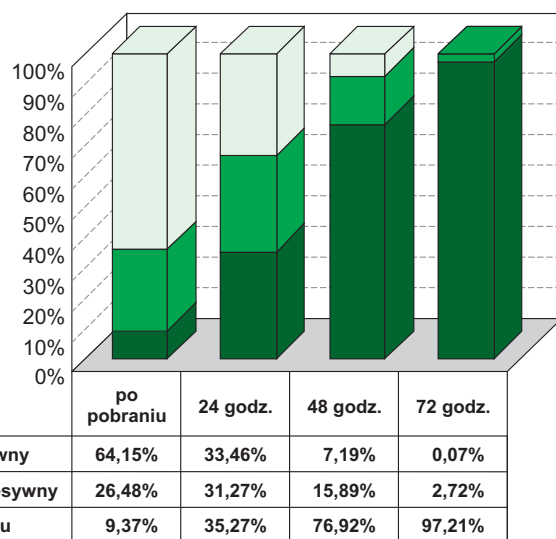
natomiast w 48 godzin po przygotowaniu miał wartość jedynie 2,74%. Odsetek plemników o powolnym ruchu zachowywał się nieco odmiennie. Przy pierwszym badaniu, bezpośrednio po przygotowaniu nasienia, wynosił on 12,17%, po 24 godzinach przyjął wartość 23,8%, po 48 godzinach 12,2%, a po 72 godzinach jedynie 2,69%.

Odsetek plemników martwych w nasieniu wynosił średnio 8,3% (5-15), a wyniki oceny morfologicznej plemników były następujące: plemników prawidłowych 93,3% (98,7-81,00), plemników z wadami głównymi 3,4% (0,67-9,0) i plemników z wadami podrzędnymi 3,3% (0,67-11,33). Z wad głównych dominowała kropla protoplazmatyczna w położeniu proksymalnym, a z wad podrzędnych kropla protoplazmatyczna w położeniu dystalnym oraz zawinięta wówka. Ocena budowy mor-



	po pobraniu	24 godz.	48 godz.	72 godz.
■ Szybki	64,2%	27,5%	8,1%	0,0%
■ Średni	14,3%	13,4%	2,7%	0,1%
■ Wolny	12,2%	23,8%	12,2%	2,7%
□ Brak ruchu	9,4%	35,3%	76,9%	97,2%

Ryc. 1. Dynamika zmian szybkości ruchu plemników w ejakulatach poszczególnych knurów reproduktorów w zależności od czasu ich przechowywania (n = 9)



	po pobraniu	24 godz.	48 godz.	72 godz.
□ Progresywny	64,15%	33,46%	7,19%	0,07%
■ Nieprogresywny	26,48%	31,27%	15,89%	2,72%
■ Brak ruchu	9,37%	35,27%	76,92%	97,21%

Ryc. 2. Dynamika zmian rodzaju ruchu plemników w ejakulatach knurów reproduktorów w zależności od czasu ich przechowywania (n = 9)

Tab. 2. Rodzaje ruchu plemników w ejakulatach poszczególnych knurów reproduktorów w zależności od czasu ich przechowywania (n = 9)

Czas	Rodzaj ruchu	Nr identyfikacyjne knurów									Średnie
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Po pobraniu	brak ruchu	1,1%	5,3%	3,0%	4,9%	10,9%	3,0%	6,5%	32,6%	17,0%	9,37%
	nieprogresywny	29,4%	6,0%	26,6%	30,9%	30,8%	29,4%	27,2%	22,6%	35,4%	26,48%
	progresywny	69,4%	88,6%	70,4%	64,2%	58,3%	67,7%	66,3%	44,9%	47,6%	64,15%
24 godz.	brak ruchu	38,2%	78,2%	12,4%	12,8%	39,1%	4,2%	10,5%	39,0%	83,2%	35,27%
	nieprogresywny	34,6%	18,8%	50,9%	24,8%	44,2%	18,5%	40,6%	34,3%	14,7%	31,27%
	progresywny	27,3%	3,0%	36,7%	62,4%	16,8%	77,3%	48,9%	26,8%	2,1%	33,46%
48 godz.	brak ruchu	90,5%	93,0%	79,4%	20,2%	90,5%	52,6%	80,7%	95,1%	90,3%	76,92%
	nieprogresywny	9,2%	5,0%	20,1%	33,8%	8,0%	37,9%	15,0%	4,6%	9,5%	15,89%
	progresywny	0,4%	2,0%	0,5%	46,0%	1,5%	9,5%	4,3%	0,3%	0,2%	7,19%
72 godz.	brak ruchu	97,2%	100,0%	96,7%	95,3%	100,0%	95,1%	100,0%	95,2%	95,4%	97,21%
	nieprogresywny	2,6%	0,0%	3,3%	4,6%	0,0%	4,7%	0,0%	4,6%	4,6%	2,72%
	progresywny	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%	0,1%	0,07%

Objaśnienia: ruch progresywny – ruch postępowy o szybkości $\leq 20 \mu\text{m s}^{-1}$

fologicznej i odsetka plemników martwych dokonywano jedynie bezpośrednio po pobraniu nasienia.

Kryteria oceny przydatności nasienia rozrzedzonego i przygotowanego w stanie płynnym do inseminacji są newralgicznym punktem w procedurze prawidłowej kwalifikacji i przygotowania nasienia z uwagi na ryzyko utraty wiarygodności, jakie jest zawsze związane z wykorzystywaniem do inseminacji nasienia, które teoretycznie powinno posiadać dostateczną wartość zapładniającą, a praktycznie jest już zbyt mało żywotne. Warunkami dopuszczającymi nasienie do dalszej obróbki technologicznej i konfekcjonowania jest zawsze odpowiednia jego objętość, dostateczny odsetek plemników o prawidłowej budowie morfologicznej, odpowiednia ich żywotność (niski odsetek plemników martwych) oraz zgodna z normami liczba plemników o prawidłowym ruchu indywidualnym (9). Regulują to odpowiednie normy dotyczące nasienia zwierząt gospodarskich (10-12). Budowa morfologiczna i odsetek plemników martwych w nasieniu są kryteriami, których zmiana warunkowana jest stanem zdrowia zwierzęcia, zmianami w jego żywieniu lub warunkach trzymania czy użytkowania. Ruch indywidualny plemników jest natomiast kryterium oceny, w którym jego zmiany związane są także z nieprzestrzeganiem procedury przygotowania nasienia, jak również jego przechowywania. Powoduje to szybszy spadek ruchliwości plemników, który w konsekwencji prowadzi do szybszej utraty zdolności zapładniającej niż wynika to z zastosowanych rozrzedzalników. W badaniach własnych zaobserwowano wyraźnie zróżnicowanie tego ruchu w nasieniu poszczególnych knurów reproduktorów (tab. 1 i tab. 2).

Biorąc pod uwagę kryteria minimalnych wymogów, jakie powinno spełniać nasienie płynne przeznaczone do inseminacji, oceniane nasienie spełniało kryteria jedynie w pierwszych 24 godz. W drugiej dobie następował spadek ocenianych parametrów, tak że pod koniec drugiej doby analizowane wskaźniki jakości nasienia wskazywały na brak jego przydatności do inseminacji. Jak podaje Rozeboom (9), po 24 godzinach od rozrzedzenia nasienia minimalne kryteria wskaźników oceny powinny być następujące: ruch postępowy 62%, plemniki z zawiniętą wtką nie więcej niż 10%, plemniki z kroplą cytoplazmatyczną nie więcej niż 15%. Zamieszczanie informacji o przeżywaniu plemników w rozrzedzalniku określane np. na 5 dni, bez podania odsetka plemników o ruchu postępowym w poszczególnych dobach, nie jest zatem dostatecznym kryterium oceny z punktu widzenia skuteczności wykonania unasiennienia takim nasieniem. Posłużenie się komputerowym systemem oceny nasienia SCA umożliwiło autorom dokładną wizualizację ruchu oraz określenie odsetka plemników o ruchu postępowym w dowolnym czasie od jego konfekcjonowania, a także kwalifikowanie plemników ruchliwych w zależności od jego szybkości, na plemniki o ruchu wolnym, średnim i szybkim.

Komputerowy system analizy nasienia SCA (Sperm Class Analyzer) firmy Microptic S.L. umożliwia dokładną analizę ruchu indywidualnego plemników poprzez określenie rodzaju ruchu, odsetka plemników o ruchu

postępowym (postępowym) i niepostępowym (ruch wolniejszy) oraz nieprawidłowych form ruchu, tj. ruchu kołowy zegarowy, wsteczny itp., szybkość ruchu plemników w $\mu\text{m/s}$, częstotliwość odchylenia od linii prostej, itp. Do plemników o ruchu postępowym zaliczano te o szybkości powyżej $20 \mu\text{m s}^{-1}$ (13).

Ponadto system analizy SCA pozwala na określenie koncentracji plemników w ejakulacie, budowy morfologicznej plemników, w tym oceny integralności akrosomu, oceny morfometrycznej poszczególnych struktur plemnika oraz odsetka plemników martwych. Możliwe jest także oznaczenie stopnia dezintegracji DNA w plemnikach. Parametry te umożliwiają ocenę przydatności nasienia do obróbki technologicznej, związanej z przygotowaniem porcji nasienia do inseminacji i oceną jego wartości biologicznej na każdym etapie przygotowania i przechowywania. Pozwalają zatem na określenie w momencie zakupu nasienia płynnego, jego potencjalnych możliwości zapładniających, zmniejszających się wraz z upływem czasu od jego wyprodukowania (1, 4, 6, 8).

Wprowadzenie do centrów pozyskiwania nasienia komputerowych systemów jego oceny pozwoliłoby na badanie nasienia bezpośrednio przed zakupem przez hodowcę, co na pewno zwiększy wiarygodność metody oceny i umożliwi zakup nasienia o parametrach jakościowych, wystarczających do zapłodnienia samic.

Piśmiennictwo

1. Boe-Hansen G. B., Ersbøll A. K., Greve T., Christensen P.: Increasing storage time of extended boar semen reduced sperm DNA integrity. *Theriogenology* 2005, 63, 2006-2019.
2. Borowiecka de Martin E., Garcia Ruvalcaba J. A., Gasiński M.: Błędy w rozrodzie związane z nieprawidłową eksploatacją knura lub inseminacją. *Magazyn Wet. Supplement – Świnie*, 2005, 37-41.
3. Falkowski J., Kozera W.: Próba analizy długości użytkowania rozplodowego knurów w fermie przemysłowej. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 491-493.
4. Garcia-Herreros M., Aparicio M., Baron F. J., Garcia-Martin L. J., Gil M. C.: Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for auto-mated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Internat. J. Andrology* 2006, 29, 553-563.
5. Lipiński K., Tywończuk J.: Żywienie knurów. *Magazyn Wet. Supplement – Świnie*, 2005, 55-56.
6. Lopez-Fernandez C., Perez-Llano B., Garcia-Casado P., Sala R., Gosalbez A., Arroyo F., Fernandez J. L., Gosálvez J.: Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Anim. Reprod. Sci.* 2008, 103, 87-98.
7. Milewska W.: Ocena przyżyciowa knurów rasy hampshire i pietrain oraz mieszańców dwurasowych a efekty użytkowania rozplodowego w stacjach unasienniania loch. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 708-711.
8. Quintero-Moreno R. T., Rodriguez-Gil J. E.: Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 2004, 61, 673-690.
9. Rozeboom K. J.: Evaluating Boar Semen Quality. *Animal Science Facts*, publ. number ANS00-812S, 2000.
10. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 11 marca 2003 r. w sprawie szczegółowych warunków weterynaryjnych wymaganych przy prowadzeniu produkcji, pozyskiwaniu, konserwacji, obróbce, przechowywaniu, wprowadzaniu do obrotu lub wykorzystaniu materiału biologicznego. *Dziennik Ustaw* Nr 61, poz. 542, 2003 r.
11. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 27 kwietnia 2004 r. w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych mających zastosowanie do nasienia świń. *Dziennik Ustaw* Nr 100, poz. 1017, 2004 r.
12. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 30 kwietnia 2004 r. w sprawie materiału biologicznego wykorzystywanego w rozrodzie zwierząt gospodarskich. *Dziennik Ustaw* Nr 111, poz. 1177, 2004 r.
13. Schmit H., Kamp G.: Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 2004, 128, 171-179.
14. Sujka E.: Organizacyjne przyczyny brakowania knurów rozplodowych. *Magazyn Wet. Supplement – Świnie*, 2006, 42-44.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Wrona, ul. Emancypantek 3/7, 20-636 Lublin; e-mail: zygmunt.wrona@up.lublin.pl