
Skiediklio ir spermos laikymo trukmės įtaka kuilių spermos kokybei

**Loreta Šernienė,
Vita Riškevičienė,
Antanas Banys,
Henrikas Žilinskas**

*Lietuvos veterinarijos akademija,
Tilžės g. 18,
LT-3022 Kaunas*

Bandymų metu buvo analizuojama skiediklio, spermatozoidų išgyvenimo skiediklyje laiko, spermos ėmimo datos bei kuilio įtaka spermatozoidų judrumui, aktyvumui, gyvybingumui ir apvaisinamajai galiai. Įvertinus veiksnų įtaką glaudžiai tarpusavyje besisiejantiems spermatozoidų judrumui skiediklyje ir jų judėjimo aktyvumui ($r = 0,78$), nustatyta statistiškai reikšminga skiediklio, spermatozoidų išgyvenimo skiediklyje laiko ir jų sąveikos įtaka ($p \leq 0,01$). Spermatozoidų judėjimo aktyvumui dar turi įtakos kuilis ir spermos ėmimo data ($p \leq 0,05$). Išanalizavus skiediklio ir skiestos spermos laikymo trukmės įtaką, nustatyta, kad spermatozoidų judrumas pirmąsias 12–72 valandas nėra mažesnis kaip 60% visuose skiedikliuose, išskyrus BTS (PSE). Spermatozoidų judrumas šiame skiediklyje 3 dieną sumažėja iki 40% ir skirtumas tarp skiediklių 3 dieną statistiškai patikimas ($p \leq 0,05$). Ilgiau laikant skiestą spermą (72–144 val.) skirtumai tarp spermatozoidų judrumo skirtinguose skiedikliuose statistiškai nepatikimi.

Pirmas 24 valandas po praskiedimo spermatozoidai labai aktyvūs (2,5–3 balai) visuose skiedikliuose, o po 48–72 valandų mažiausias spermatozoidų aktyvumas užregistruotas Baisogalos ir BTS (PSE) skiedikliuose (atitinkamai 1,0 ir $0,8 \pm 0,84$ balo, $p \leq 0,05$). Šis 1,5–2 balų skirtumas išlieka ir ilgiau laikant skiestą spermą, tik tarp skiediklių jis statistiškai nepatikimas.

Išanalizavus veiksnų įtaką spermatozoidų agliutinacijos laipsniui, nustatyta reikšminga skiediklio, skiestos spermos laikymo trukmės ir spermos ėmimo datos įtaka, o kuilio veiksnys neturi reikšmingos įtakos šiam rodikliui. Praskiedimo dieną spermatozoidų agliutinacijos laipsnio skirtinguose skiedikliuose skirtumas statistiškai nepatikimas, po 48–72 valandų spermatozoidai labiau agliutinauja BTS (PSE) ir BTS (Minitub) skiedikliuose ($p \leq 0,05$). Spermatozoidų agliutinacija padidėja 96–192 skiestos spermos laikymo valandomis visuose skiedikliuose ($p \leq 0,05$), palyginti su 12–24 valandomis, tačiau didžiausia išlieka BTS (Minitub) ir BTS (PSE) skiedikliuose. Mažiausiai spermatozoidai agliutinauja Baisogalos ir BTS (IMV technology) skiedikliuose.

Spermatozoidų gyvybingumui statistiškai reikšmingos įtakos turi skiediklio ir skiestos spermos išgyvenimo laiko veiksniai. Mažiausias gyvų, su vientisa membrana spermatozoidų skaičius buvo nustatytas hiposmotiniu testu ($p \leq 0,05$); tarp skiediklių šis rodiklis statistiškai nesiskyrė.

Analizuojant apvaisinimo rezultatus buvo vertinta tik dviejų veiksnų – skiediklio ir kuilio įtaka. Nustatyta, kad nė vienas iš jų atskirai ar sąveikoje vienas su kitu neturi reikšmingos įtakos paršavedžių apvaisinimo procentui, vados dydžiui ir atvestų gyvų paršelių skaičiui.

Raktažodžiai: skiedikliai, spermatozoidų judrumas, aktyvumas, agliutinacija, membranų vientisumas

IVADAS

Kuilių spermos ėmimas, skiedimas ir panaudojimas sėklinimui vis plačiau praktikuojama visame pasaulyje. Spermą kriokonservuojant ar laikant tam tikrą laiką praskiedus skiedikliu, šiek tiek spermatozoidų praranda apvaisinamąją galią. Taip atsitinka dėl įvai-

rių priežasčių: spermatozoidų membranos vientisumo pažeidimų ar akrosomų degeneracijos [8]. Kuilių spermos skiedimo ir laikymo technika reikalauja patikimų jos kokybės vertinimo metodų, įgalinančių nustatyti daugybės veiksnų – skiediklio, laikymo trukmės, temperatūros ir transportavimo įtaką spermatozoidų gyvybingumui ir apvaisinamajai galiai. Veiks-

nių, turinčių įtakos spermos kokybės ir gyvybingumo pokyčiams po praskiedimo, analizė yra svarbus kuilių spermos kokybės tyrimų etapas.

Nors kai kurie spermos skiediklių gamintojai ir vartotojai gauna gerus apvaisinimo rezultatus sėklindami kiaušes 4–os ir 6-os dienų skiesta sperma [16], tačiau realiai labai mažai skiestos spermos yra naudojama sėklinimui ilgiau nei 3 dienas po jos paėmimo ir praskiedimo [10, 11]. Be abejo, tam yra priešasčių – pasaulyje gaminama ir naudojama daugybė spermos skiediklių, kurių individualios savybės ir spermos išsaugojimo laikas yra skirtingi. Šiuo metu pasaulyje plačiausiai naudojama keletas skiediklių: Kijev [11], BTS, skystas Beltsvil'io skiediklis (BL-1), Illinois variable temperature (IVT, [4]), SCK-7 pieno skiediklis, Zorlesko.

Skiedžiant spermą BTS, Kortowo, Pliszko ir Kijev skiedikliais spermatozoidų judrumas ir sveikų membranų skaičius sumažėjo, palyginti su pirmos ir trečios dienos rezultatais ($p \leq 0,05$). Didžiausias 1-os ir 3-ios dienų rezultatų skirtumas gautas BTS ir Kijev skiedikliais skiestoje spermoje [3].

Skiedžiant spermą BTS skiedikliu vislumo rodikliai geresni, palyginti su Kijev, Zorlesko ar Modena skiedikliais skiestos spermos rodikliais. Tačiau palyginus BTS ir Androhep skiedikliais skiestos spermos apvaisinimo duomenis, nustatyta, kad 2-ą dieną sėklinant Androhep skiedikliu skiesta sperma gaunami geresni rezultatai, nei sėklinant 1-os dienos BTS skiedikliu skiesta sperma. Sėklinant kitų (3–4) dienų sperma, skirtingais skiedikliais skiestos spermos apvaisinimo rezultatai vienodi. Nors Androhep skiediklyje yra GSA, palaikančio spermatozoidų išgyvenimą, tačiau nuo senėjimo, neigiamai koreliuojančio su apvaisinimu (%), jis ląstelių neapsaugo [15–17].

Šio darbo tikslas buvo nustatyti skiediklio, skiestos spermos laikymo trukmės, kuilio veiksnius bei jų sąveikas, turinčius įtakos spermatozoidų judrumui, aktyvumui, agliutinacijos laipsniui bei gyvybingumui skiestoje spermoje ir skiestos spermos apvaisinimo rodikliams.

TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Bandymai buvo atliekami UAB „Litgenas“ 1998–1999 m. Tyrimams buvo atrinkti 5 veisliniai kuiliai – 3 Lietuvos baltųjų veislės kuiliai analogai ir 2 vienodo amžiaus Vokietijos didžiųjų veislės kuiliai. Visi tyrimuose panaudoti kuiliai buvo laikomi vienodomis sąlygomis, šeriami 2 kartus per dieną pagal subalansuotus racionus, vandens gaudavo iki soties. Sperma buvo imama manualiniu būdu 3 kartus per 2 savaites.

Tyrimais siekta nustatyti skiediklio ir skiestos spermos laikymo trukmės įtaką spermatozoidų judrumui, gyvybingumui, membranų būklei ir išgyvenimo truk-

mei. Pasirinkti 4 skiedikliai – Baisogalos, BTS* (*platiną firma „Minitub“, gaminamas Vokietijoje), BTS** (**PSE, platiną firma ANIVITA, gaminamas Prancūzijoje), BTS*** (**platina „IMV technology“, gaminamas Prancūzijoje).

Bandymų pradžioje buvo atliktas kiekvieno bandymuose naudojamo kuilio šviežios spermos kokybės (spermatozoidų su pataloginėmis uodegėlėmis, galvutėmis bei pažeista akrosoma ir gyvų spermatozoidų skaičius ejakuliate tyrimas [7, 18]) ir spermatozoidų išgyvenimo neskiestoje spermoje [6] bei kontroliniame 100 mOsm/L natrio citrato skiediklyje palyginimas.

Spermatozoidų judrumas buvo vertinamas 100 balų sistema, aktyvumas ir agliutinacijos laipsnis – naudojantis 3 balų skale: 3 balai atitinka didžiausią aktyvumą ir agliutinacijos laipsnį, 0 balų – mažiausią [13]. Spermatozoidų gyvybingumas buvo tiriamas hiposmotiniu testu [14].

Kiaušės buvo sėklinamos Marijampolės rajono Balčiūnų gamybinėje fermoje. Sėklinimui buvo atrinktos vienos veislės ir vienodo amžiaus paršavedės (trečiaparšės). Kiekvienu tiriamu skiedikliu skiestos spermos apvaisinamajai galiai nustatyti buvo atrinkta ne mažiau kaip 6 tokios paršavedės. Sėklinta 2 kartus vienos rujos metu, antrą kartą pakartojant tuo pačiu skiedikliu atskiestos kuilio spermos doze. Buvo vertinamas apvaisinimo procentas, atvestų paršelių skaičius (vados dydis), gyvų paršelių skaičius.

Analizuojant tyrimų duomenis buvo vertinama skiediklio, spermatozoidų išgyvenimo skiediklyje trukmės, kuilio ir spermos ėmimo datos veiksnių bei jų tarpusavio sąveikų įtaka spermos kokybei – spermatozoidų judrumui skiediklyje, judėjimo aktyvumui, agliutinacijos laipsniui ir gyvybingumui. Apvaisinimo rodikliams (apvaisinimo procentui, vados dydžiui ir gyvų paršelių skaičiui) analizuoti buvo naudojami tik skiediklio ir kuilio veiksniai. Statistinė analizė buvo atlikta SPSS statistiniu paketu (SPSS Inc, 1989–1995). Duomenys buvo analizuojami naudojantis dispersinės analizės metodu (GLM, [20]). Skirtumo tarp grupių patikimumo kriterijui (p) nustatyti buvo naudojama Sheffe daugybinio palyginimo metodu. Skirtumas buvo statistiškai patikimas, jei $p \leq 0,05$.

TYRIMŲ REZULTATAI

Bandymų pradžioje buvo įvertinti visų bandymuose naudotų kuilių spermatozoidų morfologiniai rodikliai ir spermatozoidų išgyvenimo šviežioje (natyvinėje) spermoje bei kontroliniame natrio citrato skiediklyje trukmė, siekiant nustatyti individualias kiekvieno kuilio spermos kokybės charakteristikas. Šie spermos kokybiniai rodikliai bandymų periodu nebuvo didesni už leistiną dinaminę normą (1 lent.),

Šviežios spermos kokybės rodiklis	N	Min	Max	M ± m
Spermatozoidų su patolog. galvutėmis skaičius %	363	0,2	3,5	1,333 ± 0,907
Spermatozoidų su patolog. uodegėlėmis skaičius %	363	0,5	11	5,536 ± 6,449
Spermatozoidų su pažeista akrosoma skaičius %	363	0	5	0,534 ± 1,163
Gyvų spermatozoidų šviežioje spermoje skaičius %	312	84	90	86,382 ± 2,649

todėl visų eksperimentui parinktų kuilių ejakuliatui buvo naudojami tolesniuose tyrimuose.

Vertinant kiekvieno kuilio spermatozoidų judrumą šviežioje ir kontroliniu natrio citrato skiedikliu skiestoje spermoje, statistiškai patikimo skirtumo tarp kuilių minėtų rodiklių nenustatyta (2 lent.), todėl galima teigti, kad individualūs kuilių spermatozoidų išgyvenimo rodikliai yra vienodi.

Įvertinus bandyme naudotų kuilių šviežios spermos morfologines charakteristikas, kiekvieno kuilio ejakuliatu spermatozoidų judrumą bei išgyvenimą ir nenustačius tarp jų patikimo skirtumo, kiekvienas ejakuliatas buvo skiedžiamas 4 skirtingais skiedikliais ir vertinami spermatozoidų judrumo (SJ), aktyvumo (SA), agliutinacijos laipsnio skiediklyje (AL) bei sper-

matozoidų membranų vientisumo kitimai, laikant spermą iki 196 valandų.

Spermatozoidų judrumui (SJ) ir judėjimo aktyvumui (SA) visų pavienių veiksmų įtaka yra reikšminga ($p < 0,05$), tik SJ spermos ėmimo datos veiksnys reikšmingos įtakos neturi. Kai kurios veiksmų sąveikos taip pat reikšmingai veikia šiuos rodiklius (3 lent.), tačiau pagrindinis darbo akcentas skiriamas skiediklio ir spermos išgyvenimo laiko (SK·SIL) įtakos analizei. Šių veiksmų sąveika abiemis analizuojamiems rodikliams yra statistiškai reikšminga (atitinkamai $p = 0,001$; $p = 0,01$).

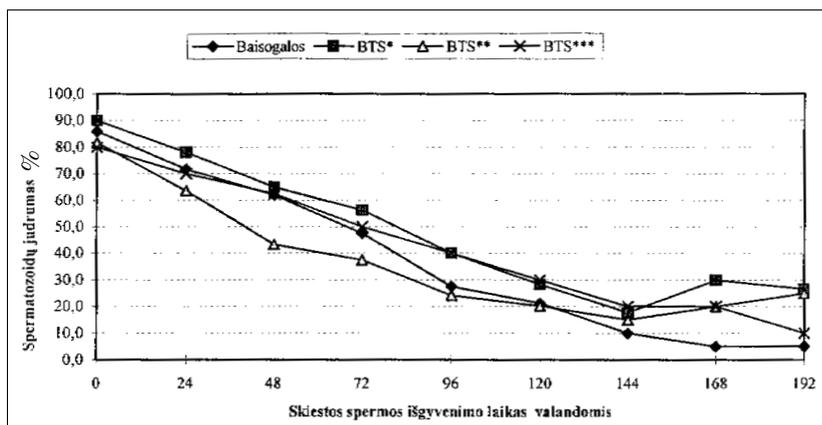
Vertinant SK·SIL įtaką SJ ir SA, pirmas 24 valandas skirtumas tarp skiediklių nepatikimas, o vėliau (24–72 val.) SJ ir SA BTS (PSE) skiediklyje bei SA Baisogalos skiediklyje mažesni nei BTS (Minitub) ir BTS (Benelux) skiedikliuose ($p < 0,05$; 1 pav.). Paskutines spermatozoidų gyvenimo valandas (144–192 val.) Baisogalos skiedikliu skiestos spermos SJ ir SA buvo mažesni, nei kitais skiedikliais skiestos spermos ($p < 0,05$). Skirtumai tarp skiediklių SJ ir SA rodiklių 96–144 skiestos spermos saugojimo valandas statistiškai nepatikimi (2 pav., 4 lent.).

Spermatozoidų agliutinacijos laipsniui statistiškai reikšmingos įtakos turi pavieniai skiediklio, spermatozoidų išgyvenimo skiediklyje

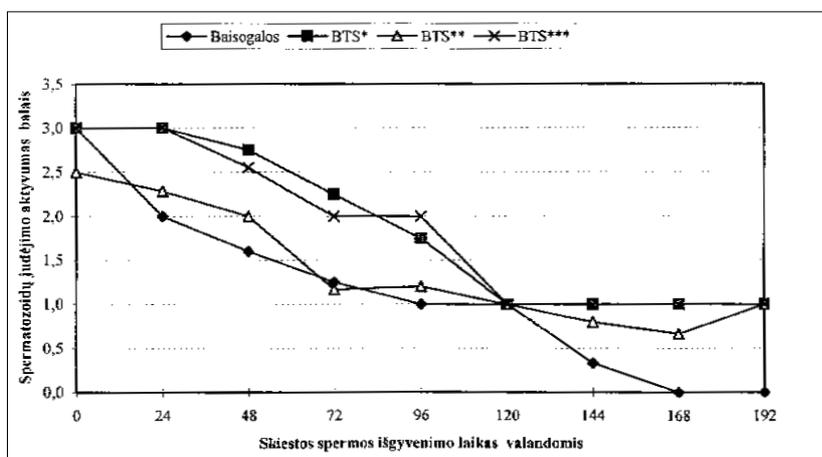
Kuilio numeris	Spermatozoidų judrumas natrio citrate %	Spermatozoidų judrumas šviežioje spermoje %
1	15,473 ± 31,335	38,273 ± 36,432
2	13,479 ± 24,446	34,701 ± 34,349
3	13,986 ± 25,033	44,444 ± 33,813
4	13,202 ± 25,712	45,131 ± 34,064
5	14,063 ± 27,155	36,563 ± 40,279

3 lentelė. Pavienių veiksmų ir jų sąveikų, įtrauktų į modelį, reikšmingumo lygmenys (veiksniai įtraukiami į modelį kaip reikšmingi, kai $p < 0,05$, kai $p > 0,05$ – veiksniai iš modelio išmetami (n))

Pavienis veiksnys	Priklausomas kintamasis						
	SJ	SA	AL	HOT	AP	VD	GPS
Skiediklis (SK)	0,001	0,001	0,001	0,0001	n	n	n
Spermatozoidų išgyvenimo skiestoje spermoje laikas (SIL)	0,001	0,001	0,001	0,001	–	–	–
Spermos ėmimo data (SĖD)	n	0,001	0,001	0,001	–	–	–
Kuilio efektas (KE)	n	0,056	n	n	n	n	n
Veiksmų sąveikos							
SK*SIL	0,001	0,01	0,001	n	–	–	–
SK*KE	0,01	n	n	0,002	–	–	–
SK*SĖD	n	0,001	0,001	n	–	–	–
SIL*KE	0,001	n	n	0,034	–	–	–
SIL*SĖD	0,001	n	0,027	0,001	–	–	–



1 pav. Spermatozoidų judrumo priklausomybė nuo skiediklio ir spermos išgyvenimo laiko



2 pav. Spermatozoidų aktyvumo priklausomybė nuo skiediklio ir spermos išgyvenimo laiko

laiko ir spermos ėmimo datos (SED) veiksniai ($p = 0,001$) bei skiediklio ir spermos išgyvenimo laiko, skiediklio ir spermos ėmimo datos bei spermatozoidų išgyvenimo laiko ir spermos ėmimo datos veiksnių sąveikų įtaka. Kuilio efektas AL statistiškai nereikšmingas (3 lent.). Vertinant spermatozoidų AL pokyčius skiediklių skirtumai buvo didžiausi (3 pav.). Baisogalos ir BTS (Benelux) skiedikliu skiestos spermos spermatozoidų agliutinacijos laipsnis buvo mažiausias (atitinkamai $0,06 \pm 0,24$ ir $0,18 \pm 0,4$), o BTS (Minitub) ir BTS (PSE) skiedikliu skiestos spermos – didžiausias (atitinkamai $1,27 \pm 1,18$; $0,84 \pm 1,24$; $p = 0,01$; $p = 0,05$). BTS (Benelux) skiedikliu ir Baisogalos skiedikliu skiestų spermatozoidų agliutinacijos laipsnių skirtumas statistiškai nepatikimas (4 lent.). Pirmas 48 išgyvenimo valandas statistiškai patikimo skirtumo tarp BTS (Minitub) bei Baisogalos ir BTS (Benelux) skiedikliais skiestos spermos AL nepastebėta, šis skirtumas statistiškai patikimai padidėja tik vėliau (72–196 val.). Spermatozoidų agliutinacijos laipsnio vidurkių skirtumai tarp BTS (PSE) bei BTS (Benelux) ir Baisogalos skiediklių statistiškai patikimi jau nuo 24 valandos ($p < 0,05$).

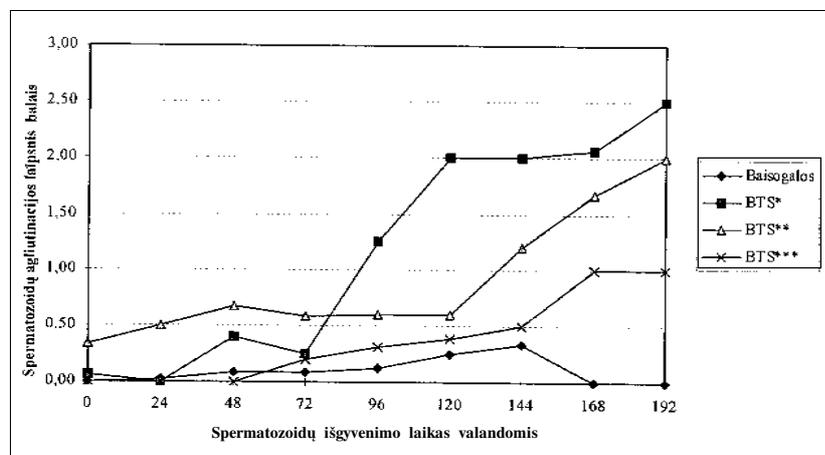
 4 lentelė. Spermatozoidų judrumo ir judėjimo aktyvumo (SJ ir SA), spermatozoidų agliutinacijos laipsnio (AL), spermatozoidų membranų vientisumo (HOT) priklausomybė nuo skiediklio ir spermatozoidų išgyvenimo laiko (* $p \leq 0,01$)

Skiediklis	Saugojimo trukmė	SA	SA	AL	HOT
1	2	3	4	5	6
Baisogalos	0	86,00 ± 5,48	3,00 ± 0	0 ± 0,55	72,00 ± 4,30*
	24	71,67 ± 7,53	2,00 ± 0*	0,03 ± 0,51*	53,17 ± 7,17
	48	62,00 ± 13,04*	1,60 ± 0,55*	0,05 ± 0,15*	33,60 ± 10,88
	72	47,50 ± 5,00	1,25 ± 0,50*	0,09 ± 0,05*	23,25 ± 4,35
	96	27,50 ± 12,58	1,00 ± 0	0,12 ± 0,45*	16,50 ± 4,04
	120	21,25 ± 11,81	1,00 ± 0	0,25 ± 0,50*	10,75 ± 5,56
BTS (Minitub)	144	10,00 ± 10,00	0,33 ± 0,58	0,33 ± 0,58*	7,67 ± 8,33
	0	90,00 ± 0,02	3,00 ± 0*	0	61,25 ± 7,27*
	24	78,00 ± 4,47*	3,00 ± 0	0,40 ± 0,55	51,40 ± 2,88
	48	65,00 ± 10,0*	2,75 ± 0,50*	0,25 ± 0,50*	42,00 ± 11,80
	72	56,25 ± 11,09	2,25 ± 0,96*	1,25 ± 0,96	27,25 ± 6,95
	96	40,00 ± 21,60	1,75 ± 0,50*	2,00 ± 1,15*	25,00 ± 12,46
BTS (PSE)	120	28,33 ± 22,55	1,00 ± 1,0	2,00 ± 1,00*	22,67 ± 15,95
	144	17,75 ± 20,34	0,50 ± 0,58*	2,00 ± 1,26*	14,50 ± 15,93
	0	81,67 ± 7,53	2,50 ± 0,55	0,33 ± 0,82	55,83 ± 7,28*
	24	63,57 ± 7,48*	2,29 ± 0,49*	0,50 ± 1,46	45,00 ± 8,02

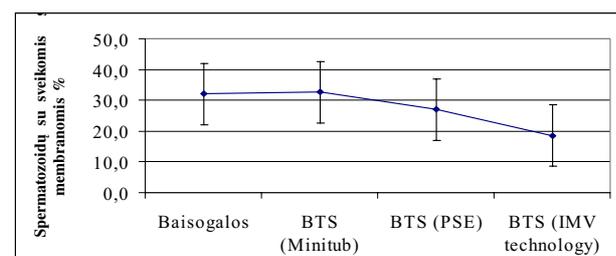
4 lentelė (tęsinys)

	1	2	3	4	5	6
BTS (Benelux)		48	43,33 ± 13,66*	2,00 ± 0,89	0,68 ± 1,22*	31,50 ± 11,29
		72	37,50 ± 14,75	1,17 ± 0,41*	0,59 ± 1,55	21,67 ± 5,32
		96	24,20 ± 20,45	1,20 ± 0,45	0,60 ± 1,34*	15,20 ± 7,95
		120	20,20 ± 19,75	1,00 ± 0,71*	0,60 ± 1,34*	12,20 ± 7,98
		144	15,00 ± 18,71	0,80 ± 0,84	1,20 ± 1,10*	9,00 ± 9,14
		0	80,00 ± 7,53	3,00 ± 0,49	0,00 ± 1,22	60,00 ± 5,32
		24	70,00 ± 7,48	3,00 ± 0,89*	0,00 ± 1,55*	52,00 ± 7,95*
		48	62,50 ± 3,54*	3,00 ± 0,04	0,00 ± 0,96*	44,50 ± 3,54
		72	50,00 ± 11,09*	2,00 ± 0,71*	0,20 ± 0,12*	43,00 ± 7,95
		96	40,00 ± 21,60	2,00 ± 0,84	0,31 ± 1,34*	41,00 ± 7,98
		120	30,00 ± 0,00	1,00 ± 0,01	0,39 ± 0,68*	40,00 ± 1,41
		144	20,00 ± 11,81	1,00 ± 0,50	0,50 ± 0,55*	32,00 ± 11,80

Pavieniai skiediklio, spermos išgyvenimo laiko ir spermos ėmimo datos veiksniai yra statistiškai reikšmingi spermatozoidų membranų vientisumui, nustatytam HOT ($p < 0,01$), o kuilio efektas neturi įtakos šiam rodikliui (3 lent.). Taip pat reikšminga ir kai kurių veiksmų sąveikos įtaka. Pirmą skiestos spermos laikymo dieną spermatozoidų membranų mažiausiai buvo pažeistos Baisogalos skiediklyje, o kitomis spermos laikymo dienomis patikimų šio rodiklio skirtumų nenustatyta (4 pav.).



3 pav. Spermatozoidų aglutinacijos laipsnio priklausomybė nuo skiediklio ir spermatozoidų išgyvenimo laiko



4 pav. Spermatozoidų su sveikomis membranomis skaičiaus priklausomybė nuo skiediklio

Analizuojant apvaisinimo rezultatus buvo panaudoti tik du – skiediklio ir kuilio – veiksniai. Kiti šiame darbe išskirti veiksniai buvo fiksuoti. Nustatyta, kad nei skiediklio, nei kuilio įtaka paršavedžių apvaisinimo procentui, vados dydžiui bei gyvų paršelių skaičiui statistiškai nėra reikšminga (3 lent.).

APTARIMAS IR IŠVADOS

Bandymų metu buvo analizuojama skiediklio, spermatozoidų išgyvenimo skiediklyje laiko, spermos ėmimo datos (šis veiksnys savo ruožtu susideda iš keleto papildomų veiksnių – metų laiko, šėrimo, aptarnaujančio personalo pasikeitimų ir kitų) bei kuilio įtaka spermatozoidų kokybei, gyvybingumui ir apvaisinamajai galiai. Kaip atsparos taškas tolimesniems bandymams su skiesta sperma iš pradžių buvo palyginti šiame bandyme naudotų kuilių spermos kokybiniai rodikliai ir spermatozoidų išgyvenimas šviežioje spermoje bei kontroliniame natrio citrato skiediklyje. Įvertinus pradinis duomenis, nustatyta, kad kokybiniai spermos rodikliai – pataloginių ir gyvų spermatozoidų skaičius ejakulate – nebuvo didesni už normą, o spermatozoidų išgyvenimas neskiestame ejakulate tarp kuilių statistiškai patikimai nesiskyrė, todėl buvo nuspręsta, kad kuiliai spermatozoidų išgyvenimo trukme ir spermos kokybe tarpusavyje nesiskiria.

Vertinant veiksmų įtaką glaudžiai tarpusavyje besisiejantiems spermatozoidų judrumui skiediklyje ir jų judėjimo aktyvumui ($r = 0,78$) mūsų tyrimų rezultatais nustatyta reikšminga skiediklio, spermatozoidų išgyvenimo skiediklyje ir jų sąveikos įtaka ($p \leq 0,01$).

Spermatozoidų judėjimo aktyvumui dar turi įtakos kuily ir spermos ėmimo data ($p \leq 0,05$). Išanalizavus skiediklio ir skiestos spermos laikymo trukmės įtaką, nustatyta, kad spermatozoidų judrumas pirmas 12–72 valandas, kol sperma dar naudojama sėklinimui [10, 11], nėra mažesnis kaip 60% visuose skiedikliuose, išskyrus BTS (PSE). Spermatozoidų judrumas šiame skiediklyje 3 dieną sumažėja iki 40% ir skirtumas tarp skiediklių yra statistiškai patikimas ($p \leq 0,05$). Ilgiau laikant skiestą spermą (72–144 val.) spermatozoidų judrumo skirtinguose skiedikliuose skirtumai statistiškai nepatikimi.

Pirmas 24 valandas po praskiedimo spermatozoidai labai aktyvūs (2,5–3 balai) visuose skiedikliuose, o po 48–72 valandų mažiausias spermatozoidų aktyvumas užregistruotas Baisogalos ir BTS (PSE) skiedikliuose (atitinkamai 1,0 ir $0,8 \pm 0,84$ balo, $p \leq 0,05$). Šis 1,5–2 balų skirtumas išlieka ir ilgiau laikant skiestą spermą, tik tarp skiediklių jis statistiškai nepatikimas.

Svarbus spermos kokybės rodiklis yra spermatozoidų agliutinacijos laipsnis skiestoje spermoje. Analizuojant veiksnių įtaką agliutinacijos laipsniui mūsų tyrimais nustatyta reikšminga skiediklio, skiestos spermos išgyvenimo laiko ir spermos ėmimo datos įtaka, o kuily reikšmingos įtakos šiam rodikliui neturi. Gauti rezultatai paneigia spermos gamyboje paplitusią nuomonę apie didesnę kai kurių kuilių spermatozoidų polinkį agliutinuoti. Tolesniuose tyrimuose analizuojant įvairių veiksnių įtaką spermatozoidų agliutinacijai, vertėtų sukaupti ir išanalizuoti daugiau su spermos ėmimo data susijusių veiksnių – mėnesio, dienos, šėrimo pokyčio, mėnulio fazės ir kitų. Tai galėtų padėti išsiaiškinti tikrąją agliutinacijos priežastį. Analizuojant skiediklio įtaką nustatyta, kad praskiedimo dieną skirtumas tarp spermatozoidų agliutinacijos laipsnio skirtinguose skiedikliuose statistiškai nepatikimas, po 48–72 valandų spermatozoidai labiau agliutinuoja BTS (PSE) ir BTS (Minitub) skiedikliuose ($p \leq 0,05$). Spermatozoidų agliutinacija padidėja 96–192 skiestos spermos laikymo valandomis visuose skiedikliuose ($p \leq 0,05$), palyginti su 12–24 valandomis, tačiau didžiausia išlieka BTS (Minitub) ir BTS (PSE) skiedikliuose. Mažiausiai spermatozoidai agliutinuoja Baisogalos ir BTS (IMV technolog) skiedikliuose.

Žinoma, kad spermatozoidų judrumo ir judėjimo aktyvumo vertinimas yra subjektyvus, daugiausia priklausantis nuo techninio darbuotojo patirties ir sugebėjimų [5]. Spermatozoidų judrumas neįrodo ir spermatozoidų gyvybingumo, nes skiediklyje laikomi spermatozoidai gali būti anabiozės būsenoje ir nejudėti [1, 2]. Taip pat žinoma, kad spermatozoidų gyvybingumas priklauso nuo spermatozoidų membra-

nų vientisumo ir nuo jų biosintetinio komplekso aktyvumo [9, 12], todėl pagrindiniu spermatozoidų gyvybingumo indikatoriumi buvo pasirinktas spermatozoidų membranų vientisumo vertinimas. Vertinimas buvo atliekamas naudojant hipoosmotinį testą. Nustatyta, kad pavieniai skiediklio, spermos išgyvenimo laiko ir spermos ėmimo datos veiksniai spermatozoidų membranų vientisumui yra reikšmingi ($p < 0,01$), o kuilio efektas įtakos šiam rodikliui neturi. Pirmą skiestos spermos laikymo dieną spermatozoidų membranos mažiausiai buvo pažeistos Baisogalos skiediklyje, o kitomis spermos laikymo dienomis patikimų skirtumų tarp šių rodiklių nenustatyta. Manoma, kad skiediklyje esantys komponentai apsaugo spermatozoido membraną nuo pažeidimo, kartu mažindami jų polinkį agliutinuoti [15–17].

Analizuojant apsivaisinimo rezultatus buvo vertinta tik dviejų veiksnių – skiediklio ir kuilio įtaka. Mūsų atliktais tyrimais nustatyta, kad nė vienas iš jų atskirai ar sąveikoje vienas su kitu neturi reikšmingos įtakos paršavedžių apsivaisinimo procentui, vados dydžiui ir atvestų gyvų paršelių skaičiui. Literatūroje gausu duomenų, paaiškinančių mūsų gautus rezultatus – manoma, kad visiems šviežios ir skiestos spermos rodikliams esant dinaminės normos ribose bei sėklinimui naudojant 2–3-ios dienų skiestą spermą yra užtikrinami statistiškai nesiskiriantys tos pačios veislės, vienodo amžiaus ir paršingumo kiaulių reprodukciniai rodikliai, sunku nustatyti biologiškai reikšmingus skirtumus tarp skirtingų kuilių ar skiediklių. Antra vertus, esant dideliame skaičiui spermatozoidų sėklinimo dozėje, bandymo jautrumas gali būti sumažėjęs [19].

Gauta
2002 02 21

Literatūra

1. Althouse G. C. Evaluating porcine semen for artificial insemination. Part 1. Standard tests // Swine Medicine, The compendium January 1997.
2. Althouse G. C. Evaluating porcine semen for artificial insemination. Part 2. Assessment of cell membranes and viability // Swine Medicine, The compendium March 1997.
3. Ciereszko A., Glogowski J., Strzezek J., Demianowicz W. Low stability of aspartate aminotransferase activity in boar semen // Theriogenology. 1989. N 37.
4. Du Mensil du Buisson F., Paquignon M., Courot M. Boar sperm production: use in artificial insemination // Livestock Production Science. 1978. N 5. P. 293–302.
5. Dunphy B. C., Kay R., Barratt C. L. R., Cooke I. D. Quality control during the conventional analysis of semen an essential exercise // Journal of Andrology, 1989. N 10. P. 378–385.

6. Hashizume T., Tanimura I., Kanematsu S. Morphological changes of the acrosome in boars spermatozoa during and after cell death // Laboratory of Animal Reproduction. 1990. Nr. 36. P. 35–40.
7. Hancock J. L. The morphology of boar spermatozoa // J Roy Microscopy Soc. 1956. N 76. P. 84–97.
8. Holt W. V., Medrano A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage // Journal of Reproduction and Fertility Supplement. 1997. N 52. P. 213–222.
9. Holt C., Holt W. V., Moore H. D. M., Reed H. C. B., Curnock R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials // Journal of Andrology. 1997. T. 18(3). P. 312–323.
10. Johnson L. A., Aalbers J. G., Williams, Grooten H. J. G. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection // Zuchthygiene. 1988. N 23. P. 49–55.
11. Johnson L. A., Aalbers J. G., Williams C. M. T., Rademaker J. H. M. and Rexroad C. E. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville Liquid and Kiev extenders for three days at 18 C // Journal of Animal Science. 1989. Vol. 54. N 1. P. 132–136.
12. Majumder G. C., Dey C. S., Haldar S., Barua M. Biochemical parameters of initiation and regulation of sperm motility // Archives of Andrology. 1990. N 24. P. 287–303.
13. Pakėnas P. Gyvulių veisimosi biologija ir sėklinimas. Vilnius: Mokslas, 1985. 250 p.
14. Vaskquez J. M., Martinez E. A., Martinez P., Garsia-Artiga C., Roca J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane // Theriogenology. 1997. Vol. 47(4). P. 913–922.
15. Waberski D., Weitze K. F., Rath D., Sallmann H. P. Wirkung von bovinem Serumalbumin and Zwitterionen-puffer auf flüssigkonservierten Ebersamen // Zuchthygiene. 1988. N. 24. P. 128–133.
16. Weitze K. F. Long-term storage of extended boars semen // Boar semen preservation II. Proceedings of the Second International Conference on Boar Semen Preservation held at Beltsville, Maryland. Berlin and Hamburg: Paul Parey Scientific Publishers, 1990. N 191. P. 231–253.
17. Weitze K. F., Habeck O., Willmen T., Rath D. Detection of ovulation in the sow using transcutaneous sonography // Zuchthygiene. 1989. N 24. P. 40–42.
18. Williams W. W., Savage A. Observations on the seminal micropathology of bulls // Cornell Veterinary. 1925. N 15. P. 353–375.
19. Woelders H. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality / Proceedings of 2nd International Conference on Boar Semen Preservation. 1990. P. 145–164.
20. Глантз С. А. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика, 1999. 459 с.

Loreta Šernienė, Vita Riškevičienė, Antanas Banys, Henrikas Žilinskas

EFFECT OF EXTENDER AND SPERM STORAGE ON THE BOAR SPERM QUALITY

S u m m a r y

The objectives of the study was to assess the factors that are influencing motility, viability and fertilizing capacity of spermatozoa in extended boar semen.

Sperm motility in extended semen and the vigor of the motion ($r = 0.780$) were significantly influenced by extender, sperm survival time in the extender and the interaction of both factors ($p \leq 0.01$). Sperm motility during the first 12 to 72 hours after extension decreased below 60% in all extenders, apart from BTS (PSE). During the further incubation of diluted semen (72 to 144 hours) differences in sperm motility among different extenders were not statistically significant. During the first 24 hours after extension, spermatozoa are very agile (2.5 to 3 grade on a 3-grade scale) in all extenders, however, following 48–72 hours of incubation, the lowest sperm agility was recorded in Baisogala and BTS (PSE) extenders (1.0 and 0.8 ± 0.84 grade, respectively ($p \leq 0.05$)). The difference of 1.5 to 2.0 grades remained in the incubated semen, although it was not statistically significant. Extender, incubation time of the extended semen and sperm collection date had a significant ($p \leq 0.01$) effect on the sperm agglutination rate. At the day of extension, differences in the degree of sperm agglutination among various extenders were not statistically significant, however, 48 to 72 hours after extension spermatozoa agglutinated more intensively ($p \leq 0.05$) in BTS (PSE), BTS (Minitub) extenders. The effect of extender and incubation time of extended semen had a significant effect ($p \leq 0.01$) on sperm viability. The effect of extender and boar was not significant on the conception rate of the female, farrowing rate and the number of live-born piglets either.

Key words: extenders, sperm motility, agility, agglutination, viability

Лорета Шярнене, Вита Ришквичиене, Антанас Банис, Хенрикас Жилинскас

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ХРАНЕНИЯ РАЗБАВИТЕЛЯ И СПЕРМЫ НА КАЧЕСТВО СПЕРМЫ ХРЯКОВ

Р е з ю м е

Опытным путем осуществлён анализ предположительно влияющих на подвижность, активность, жизнеспособность спермиев и оплодотворительную способность спермы факторов: разбавителя, продолжительности хранения в нем спермиев, даты получения эякулята и хряка. В результате анализа влияния этих факторов на тесно взаимосвязанные подвижность и активность спермиев ($r = 0,78$) выявлено статистически достоверное влияние разбави-

теля, продолжительности хранения спермиев в разбавителе и их взаимодействия ($p \leq 0,01$). В первые 12–72 ч после разбавления подвижность спермиев не падает ниже 60% во всех разбавителях, за исключением БТС (ПСЕ). В последнем она в течение 3-его дня падает до 40%. Разница в подвижности спермиев во всех трех разбавителях статистически достоверна ($p \leq 0,05$). В дальнейшем она статистически недостоверна.

В первые 24 ч активность спермиев во всех трех разбавителях очень высока (2,5–3 балла), а через 48–72 ч в Байсогальском и БТС (ПСЕ) разбавителях она падает ($1,0-0,8 \pm 0,84$ соответственно; $p \leq 0,05$). Разница в 1,5–2 балла сохраняется и далее, но является статистически не достоверной. Статистически достоверное влияние на степень агглютинации спермиев имеют разбавитель, продолжительность нахождения спермиев в разбавителе, дата получения эякулята; фактор хряка на этот показатель влияния не имеет. В первые часы степень агглютинации статистически не достоверна, а через 48–72 ч она

повышается в разбавителях БТС (ПСЕ) и в БТС (Минитуб) ($p \leq 0,05$). По сравнению с 12–24-часовой степень агглютинации в течение 96–192 ч повышается во всех разбавителях, но в разбавителях БТС (ПСЕ) и БТС (Минитуб) она остаётся более высокой ($p \leq 0,05$). Самая низкая степень агглютинации установлена в Байсогальском и БТС (IMV technology) разбавителях.

На выживаемость спермиев статистически достоверное влияние оказывают факторы разбавителя и продолжительности нахождения спермиев в разбавителе. Наименьшее число спермиев с интактной мембраной было установлено гипоосмотическим тестом ($p \leq 0,05$). Этот показатель при разных разбавителях статистически достоверно не различается.

Анализ показателей оплодотворения позволил заключить, что факторы разбавителя и хряка не влияют на процент оплодотворения, количество выводка и число жизнеспособных поросят.

Ключевые слова: разбавитель, сперма хряка, продолжительность хранения