CVŽV NITRA
CENTRUM VÝSKUMU ŽIVOČÍŠNEJ VÝROBY NITRA

ZLEPŠENIE FERTILIZAČNEJ KAPACITY SEMENA BARANOV POUŽITÍM NIEKTORÝCH IMPLEMENTOROV

(Metodika)

A. Makarevič, E. Kubovičová, E. Špaleková, L. Olexiková, D. Apolén, J. Pivko

Nitra, 2011

Recenzent: Doc. Ing. Jozef Trandžík, PhD. - Fakulta prírodných vied, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Trieda Andreja Hlinku 1, 949 74, Nitra

Poďakovanie: Predložená metodika bola spracovaná v rámci riešenia projektu APVV-0514-07 „**Vplyv vybraných implementorov na fertilizačnú kapacitu semena baranov“**

Úvod

V oblasti inseminácie oviec sa v súčasnosti dostáva do popredia technológia spracovania, hodnotenia a uskladňovania semena. V súvislosti s problematikou dlhodobého uchovávania spermií barana je ešte veľa nedoriešených otázok, hlavne čo sa týka prežívania spermií po kryokonzervácii. Je to podmienené skutočnosťou, že zmrazovanie semena baranov spôsobuje zmeny v morfológii spermií, vrátane poškodenia membrán, mitochondrií, akrozómu a bičíka. Ako alternatíva kryokonzervácie sa využíva uchovávanie semena baranov v schladenom stave. Ukázalo sa, že prídavky niektorých aditív (napr. BSA, vitamín E, kyselina askorbová, glutatión) do riedidiel semena pozitívne vplývajú na udržanie motility baraních spermií skladovaných pri 5 °C po dobu 48 až 72 hodín. Avšak nie je celkom jasné, či sa zachovanie vysokej motility spermií odrazí na ich schopnosti oplodniť vajíčko. Preto sa stále hľadajú nové implementory, ako aditíva do komerčných riedidiel, ktoré by pomohli udržiavať životaschopnosť a oplodňovaciu schopnosť spermií čo najdlhšiu dobu. Predmetom výskumu je tiež rozpracovanie nových metód a techník hodnotenia kvality ejakulátov zvierat, ktoré by umožnili spoľahlivo predpovedať budúcu oplodňovaciu schopnosť spermií po niekoľkodňovom uchovávaní v schladenom stave. Metodické postupy aseptického odberu, hodnotenia, riedenia, ekvilibrácie, zmrazovania, uchovávania a rozmrazovania semena baranov, musia spĺňať požiadavky kladené na prežívateľnosť spermií. Spracovanie semena má vplyv na jeho kvalitu, významne ovplyvňuje pohyblivosť, oplodňovaciu schopnosť, funkčnú celistvosť membrán spermií a ich celkovú životaschopnosť. Využitie niektorých implementorov, ako aditív do komerčných riedidiel, môže tieto parametre zlepšovať.

1. Cieľ

Predložená metodika bola spracovaná v rámci riešenia projektu Slovenskej Agentúry pre výskum a vývoj (APVV). Cieľom riešenia bolo otestovať implementory: epidermálny rastový faktor (EGF; v koncentráciách 100, 200 a 400 $ng.ml^{-1}$), inzulínu podobný rastový faktor I (IGF-I; v koncentráciách 10, 100 a 200 $ng.ml^{-1}$), glutatión (v koncentráciách 0,5; 1,5 a 5 mM) a kofeín (v koncentráciách 1,0; 2,0 a 4,0 mM) ako aditíva do čerstvého semena baranov za účelom zistenia, ktoré z testovaných látok sú schopné udržiavať funkcie potrebné pre oplodnenie u semena skladovaného po dobu niekoľkých dní v schladenom stave (+4 °C).

Autori predpokladajú, že odporučený metodický postup spracovania a hodnotenia semena baranov uchovávaného v schladenom stave s prídavkom implementorov poslúži chovateľom pri zlepšovaní fertilizačnej kapacity semena využívaného v umelej inseminácii.

2. Súčasný stav riešenej problematiky

Štúdiom a riešením problematiky inseminácie oviec, či už krátkodobo uchovávanou, resp. hlbokozmrazenou spermou, sa zaoberalo viacero domácich i zahraničných autorov. Pri testovaní oplodňovacej schopnosti čerstvého a krátkodobo konzervovaného semena v biologickom teste sa zistila preukazne vyššia plodnosť po inseminácii oviec čerstvým semenom. Čerstvé, rozriedené a schladené baranie semeno by mohlo byť alternatívou k zmrazenému semenu v prípade, že sa použije pre umelú inseminácia počas krátkej doby (3-5 dní) po odbere. V porovnaní so zmrazeným, schladené semeno nemá pokles motility a morfologickej integrity, čo prispieva k zvyšovaniu prežívateľnosti spermií v samičom pohlavnom trakte a znižovaniu embryonálnych strát (mortality). Ukázalo sa, že pri rozriedenom a ochladenom semene je výskyt poškodení v porovnaní so zmrazeným-rozmrazeným baraním semenom nižší.

Významnú úlohu pri udržaní kvality semena zohrávajú riedidlá. Musia mať adekvátne pH a osmolaritu, pretože ich úlohou je zachovať funkčnosť spermií. V súčasnej dobe používané riedidlá semena sú založené na báze citrátu a cukrov (arabinóza, glukóza, fruktóza), mlieka, laktózy, sacharózy, rafinózy, TRISu a tiež pufrov typu TES, HEPES a PIPES.

Ukázalo sa, že **okrem riedidiel môžu kvalitu semena a prežívateľnosť spermií po dlhodobom uchovávaní v schladenom stave ovplyvniť aj substancie, tzv. implementory.** Za potenciálne implementory môžeme považovať niektoré stimulujúce látky, ako sú rastové faktory (EGF, IGF-I), antioxidanty (glutatión), inhibítory cAMP-závislých fosfodiesteráz (kofeín, heparín...) a iné.

Epidermálny rastový faktor (EGF) je jeden z cytokínov, ktorý zohráva dôležitú úlohu v regulácii reprodukčných funkcií a najmä plodnosti samcov (Ahmad and Naz, 1993). Reguluje kapacitáciu a akrozómovú reakciu spermií cestou aktivácie špecifických receptorov (Oliva-Hernandez a Perez-Gutierrez, 2008). Predpokladá sa, že jeho efekt na spermie je závislý od použitej koncentrácie (Oliva-Hernandez and Perez-Gutierrez, 2008).

Inzulínu podobný rastový faktor I (IGF-I) je dôležitý regulátor fertilizačného procesu (Henrick et al., 1998). Sú známe jeho stimulačné účinky na motilitu, životaschopnosť, kapacitáciu a akrozómovú reakciu spermií býkov (Henricks a kol., 1998), kancov (Miah a kol., 2008), žrebcov (Champion et al., 2002) a králikov (Minelli et al., 2001). Vplyv IGF-I na spermie je sprostredkovaný cez špecifické receptory s tyrozínkinázovou aktivitou (Henrick et al., 1998).

Kofeín, inhibítor cAMP-závislých fosfodiesteráz, má výrazný stimulujúci účinok na respiráciu a motilitu ejakulovaných spermií (El-Gaafary, 1994). Efekt kofeínu je závislý od koncentrácie. Kofeín pridaný do TRISového riedidla v koncentrácii 10 alebo 20 mM pozitívne ovplyvňoval spermie býkov a capov (El-Gaafary et al., 1990; Sinha, 1995). Avšak vyššie dávky môžu škodlivo vplývať na spermie, napríklad vyvolávajú polyspermiu (Mao et al., 2005), alebo spôsobujú spomalenie alebo úplne pozastavenie vývoja embryí (Tatham a kol., 2003).

Glutatión má viacero dôležitých funkcií v bunkovej fyziológii a metabolizme, vrátane syntézy bielkovín a DNA, ochrany buniek pred oxidačným stresom a pri oplodnení. Glutatión ovplyvňuje bunkový metabolizmus mechanizmom detoxikácie a prevencie tvorby voľných radikálov kyslíka v spermiách (Wijaya, 1996). Pridanie glutatiónu do riedidla zlepšovalo motilitu, viabilitu a vlastnosti plazmatickej membrány spermií baranov, chránilo ich proti poškodeniam voľnými radikálmi a zlepšovalo prežívateľnosť spermií po 6 hodinách uchovávania pri 5 ºC (Bucak a Tekin, 2007).

Ďalším dôležitým faktorom, ktorý môže výraznou mierou ovplyvniť výsledky umelej inseminácie je hodnotenie semena. Hlavný cieľ každej analýzy semena je predpovedať jeho oplodňovaciu schopnosť presne, objektívne, rýchlo a s čo najnižšími nákladmi. Okrem základného, bežne využívaného hodnotenia semena, boli do súčasnej doby rozpracované ďalšie techniky založené na hodnotení parametrov ako sú vitalita, integrita akrozómu, či stav mitochondrií atď.

Základné laboratórne hodnotenie ejakulátu baranov sa rovnako ako u iných druhov hospodárskych zvierat robí subjektívne na úrovni makroskopickej a mikroskopickej.

V poslednom období sa v humánnej a veterinárnej andrológii dostalo do popredia používanie počítačových metód hodnotenia spermií. Využívajú sa prístroje, ktoré sú zahrnuté do skupiny pod spoločným označením **CASA (computer assisted sperm analysis - automatizovaná počítačová analýza spermií).**

Hodnotenie funkčnej kapacity spermií - okrem klasicky využívanej metódy farbenia podľa Hancocka farbivom Giemsa-Romanovski sa do popredia dostávajú metódy využívajúce kombináciu dvoch až troch farbív, čo umožní determináciu funkčných parametrov spermií. Analýzy sa orientujú predovšetkým na posúdenie integrity membrán, funkčného stavu organel, akrozómu, kapacitačného statusu a iných parametrov spermií.

Penetračný test *in vitro* - testovanie plodnosti jednotlivých samcov na základe výsledkov umelej inseminácie je finančne a časovo náročné. Vhodnou metódou hodnotenia fertilizačnej kapacity semena je *in vitro* oplodnenie (IVF). Ko-inkubáciu spermií barana s oocytmi hovädzieho dobytka v *in vitro* fertilizačnom teste použili Garcia-Alvarez a kol. (2009) a Makarevich a kol. (2011), ktorí konštatovali že heterologický systém IVF môže byť vhodný pre predpoveď fertilizačnej schopnosti baranov *in vivo*.

Ultraštrukturálna analýza spermií - neporušené bunkové membrány sú nevyhnutné pre život bunky. Membrány spermií barana sú bohaté na obsah nesaturovaných mastných kyselín a sú veľmi citlivé na poškodenia indukované peroxidáciou lipidov. Elektrónovým mikroskopom je možné na spermiách barana pozorovať zmeny na akrozóme, plazmatickej membráne a mitochondriách. Pri týchto zmenách dochádza k predčasnému uvoľneniu akrozomálnych enzýmov a poklesu denzity akrozómovej hmoty. Plazmatická membrána nadobúda nepravidelný tvar. Poškodenie plazmatickej a akrozómovej membrány spôsobuje uvoľnenie a únik akrozomálnych enzýmov, a tým aj zníženie fertilizačnej kapacity.

3. Odber a spracovanie ejakulátov baranov

1. Ejakulát sa odoberie od zdravotne preverených, rozoskákaných plemenných baranov pomocou vydezinfikovanej umelej vagíny do skleneného semenozberača.

Obrázok 1 Umelá vagína na odber semena barana s ochranným termoizolačným puzdrom

2. V laboratóriu sa ejakulát vyhodnotí makroskopicky a mikroskopicky a iba ejakulát zodpovedajúci ON 46 62 19 môže byť použitý pre inseminácia.

Makroskopické hodnotenie zahŕňa stanovenie:

- Objemu ejakulátu - v priemere 1-1,5 cm^3 u pohlavne dospelého barana
- Farby (zakalenia) – vzorka semena musí byť homogénna, smotanovo-sivobielej až krémovo-sivej farby
- Pachu - nie je špecifický (ejakulát málo páchne po baranovi-vlne)
- Konzistencie (viskozity) – ejakulát dobrej kvality má konzistenciu hustú, smotanovitú, s vysokou viskozitou a dobrou zrnitosťou
- Primiešanín – semeno môže obsahovať chĺpky, prepuciálne nečistoty, vazelínu, kožné parazity, prach, piesok, krv, moč, prípadne hnis. Na umelú inseminácia sa môže používať iba čisté semeno.
- Hustoty ejakulátu – nesmie klesnúť pod 2,5 x 10^6 spermií v mm^3

- Koncentrácie vodíkových iónov (pH) – pH ejakulátu dobrej kvality v rozmedzí 6,4 – 6,6 horšej kvality 6,9 – 7,2.

Mikroskopické hodnotenie semena zahŕňa stanovenie:

- Aktivity (masová aktivita, progresívny pohyb) – minimálne 60%
- Aglutinácie spermií
- Koncentrácie spermií – minimálna 2,5 x 10^6 spermií v mm^3
- Výskytu morfologických abnormalít spermií – nesmie presiahnuť viac ako 18%
- Obsahu patogénnych zárodkov pre človeka a zvieratá – nesmú byť prítomné

Obr. 2 **Fotometer s mikroskopom, ktorý sa využíva pri mikroskopickom hodnotení ejakulátu**

3. Ejakulát, ktorý na základe laboratórneho hodnotenia (makroskopického a mikroskopického) zodpovedá ON 46 62 19 sa upraví do koncentrácie určenej pre inseminácu riedením v riedidle Triladyl (100.10^6 aktívnych spermií v inseminačnej dávke).
4. Pre uchovávanie semena v schladenom stave pri 5 ^{0}C (do 5 dní) sa do semena odporúča pridať implementory **inzulínu podobný rastový faktora I (IGF-I) v koncentráciách 10 alebo 100 ng.ml^{-1}, alebo glutatión v koncentrácii 1,5 mM**, ktoré majú dlhodobý (postupný) účinok na udržiavanie stability a životaschopnosti spermií baranov počas hypotermického uskladnenia.

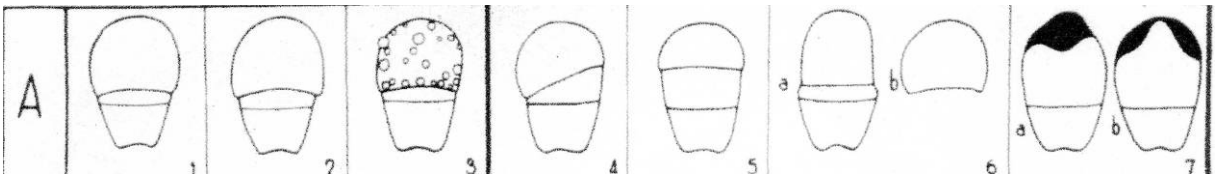
4. Laboratórne analýzy semena baranov

4.1 Hodnotenie aktivity a morfológie spermií

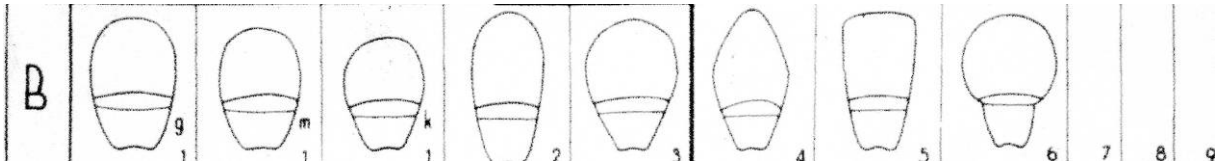
Krátkodobý test termorezistencie - semeno nariedené riedidlom Triladyl s prídavkom implementorov je počas krátkodobého termického testu uložené v termostate pri teplote 38 ^{o}C. V časových intervaloch 15, 30, 60 a 90 min. 2, 4 až 6 hodín sa odoberajú vzorky a stanovuje sa % progresívne sa pohybujúcich spermií.

Dlhodobý test termorezistencie - semeno nariedené riedidlom Triladyl s prídavkom implementorov skladované počas 5 dní pri 5 $^{\circ}$C sa podrobí dlhodobému testu termorezistencie. Každý deň sa z jednotlivých vzoriek odoberie časť semena, vloží do termostatu, ktorý je vytemperovaný na 38 $^{\circ}$C a v časových intervaloch 15 minút, 1, 3 a 5 hodín sa odoberajú vzorky a stanovuje sa % progresívne sa pohybujúcich spermií.

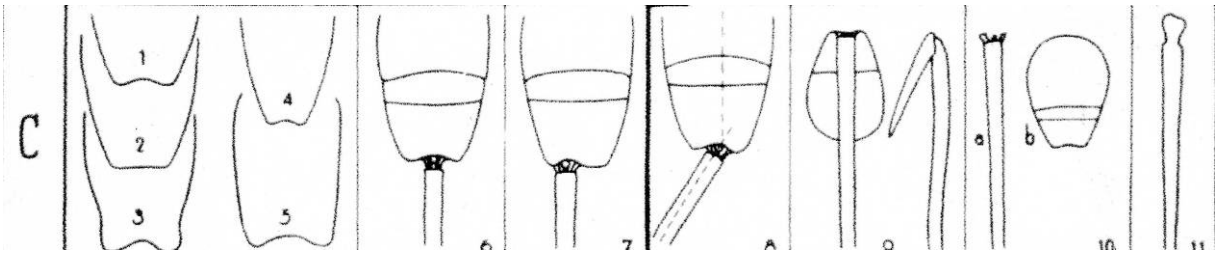
Morfologické hodnotenie spermií - Z nariedeného ejakulátu v pomere 1:5 (0,5% fyziologickým roztokom) sa urobia preparáty (nátery), ktoré sa ofarbia metódou Giemsa. Z každého preparátu sa vyhodnotí minimálne 100 spermií. Posudzujú sa nasledovné morfologické zmeny: patologické tvary hlavičiek, tvarové zmeny na báze hlavičky, zmeny vnútornej štruktúry, zmeny spojovacej časti bičíka, akrozómové zmeny, tvarové anomálie bičíka, nezrelé spermie. Výskyt jednotlivých zmien sa vyjadrí v percentách. Medzi zmeny na hlavičke zaraďujeme malé, resp. veľké hlavičky, stočené, zakrivené hlavičky alebo hlavička chýba. Zmeny na spojovacej časti zahŕňajú zúženie, zhrubnutie resp. skrútenie spojovacej časti (Obr. 3 A-F).



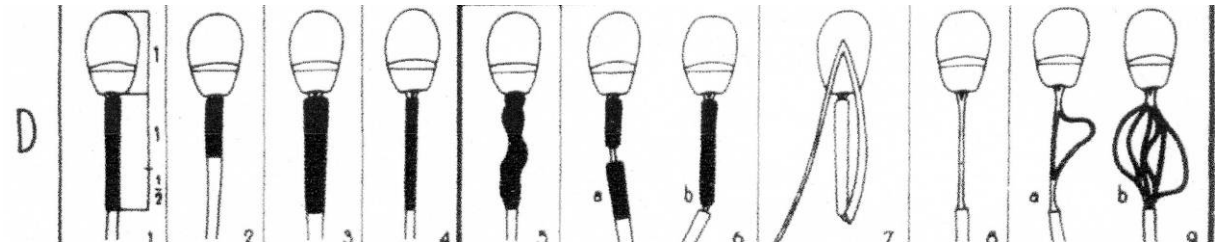
Obrázok 3 A – akrozómová čiapka: 1 – normálna, 2 – veľmi široká, 3 – granulárna 4 – široká, 5 – malá, 6 – uvoľnená, 7 – deformovaná



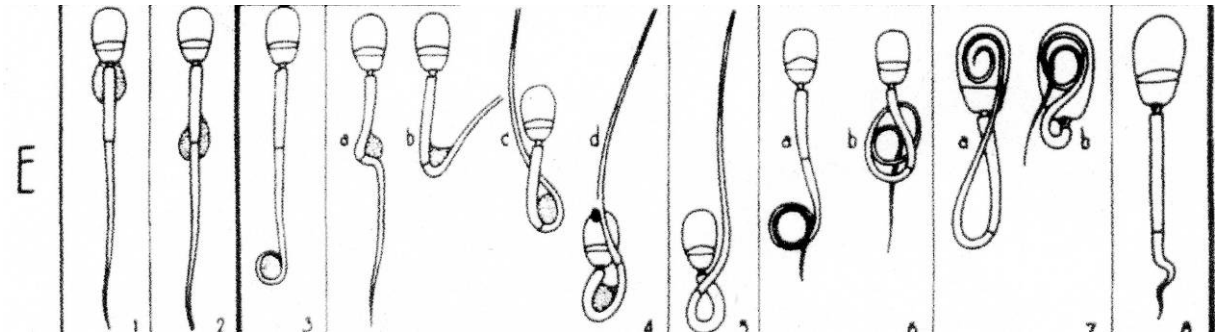
Obrázok 3 B – tvar a veľkosť hlavičky: 1g – hlavička zväčšená, 1m – normálna, 1k – zmenšená, 2 – pretiahnutá, 3 – hruškovitá, 4 – kopijovitá, 5 – lopatkovitá, 6 – bankovitá



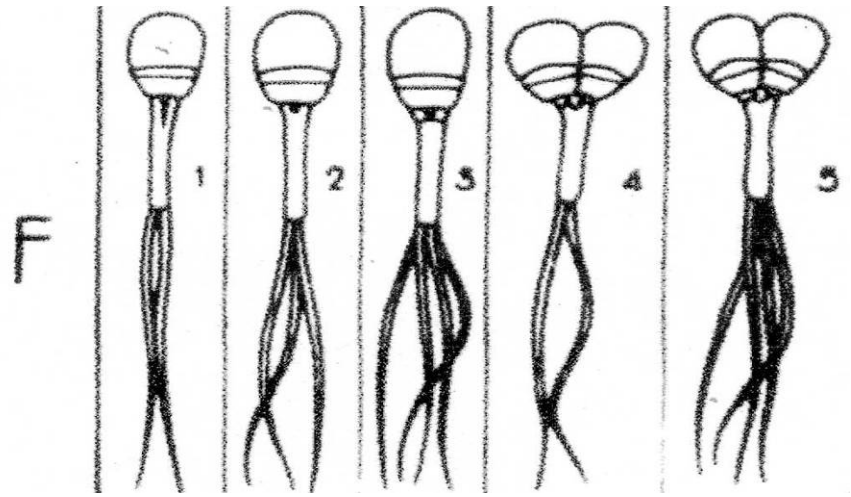
Obrázok 3 C – báza hlavičky a kŕčok: 1 – báza hlavičky normálna, 2 – lineárna, 3 – rozšírená po okrajoch, 4 – úzka, 5 – široká, 6 – kŕčok symetrický, 7 – excentrický, 8 – paraxiálny 9 – retroaxiálny, 10-11 ulomený (genetického pôvodu)



Obrázok 3 D – mitochondriálny oddiel: 1 – normálny, 2 – krátky, 3 – široký, 4 – tenký, 5 – deformovaný, 6 – prerušený, 7 – poskladaný, 8 – axiálny typ, 9 – fibrilárny typ.



Obrázok 3 E – bičík: cytoplazmatická kvapka – 1 – na kŕčku v proximálnej časti, 2 – na konci spojovacieho oddielu v distálnej polohe, 3 – otáčanie bičíka okolo cytoplazmatickej kvapky na konci bičíka, 4 – ohyby bičíka súvisiace s cytoplazmatickou kvapkou, 5 – špirálovite ohnutý bičík, 6 – kľučkovite uložený bičík, 7 – bičík uložený na hlave, 8 – rudimentárny bičík



Obrázok 3 F – teratómy: 1 – zdvojený bičík, 2 – trojitý bičík, 3 – štyri bičíky, 4 – zdvojená hlavička, 5 – dve hlavičky so štyrmi spoločnými bičíkmi (Massányi, 1991)

4.2. Analýza pohyblivosti (motility) spermií počítačovou metódou (CASA)

CASA (computer assisted sperm analysis; Obr. 4) systém je vybavený analyzačnou komorou, inverzným mikroskopom, počítačom a príslušným softvérom. CASA systém hodnotí ejakulát v dvoch hlavných úrovniach. Primárne sa hodnotia ukazovatele identifikácie rýchlosti pohybu analyzovaných spermií a sekundárne kvalitatívne parametre ejakulátov. Vyhodnotenie sa uskutočňuje na základe veľkosti, pohyblivosti, svetlosti, odrazu a zadržania svetelných lúčov spermiami. Optický systém prístroja produkuje obraz vzorky, ktorý sa digitalizuje a prenáša na monitor. Špeciálnym algoritmom sa rozlišujú nepohyblivé objekty od pohyblivých a identifikujú sa dráhy ich pohybu. Prístroj vypočíta priemernú veľkosť a intenzitu jasu pohyblivých spermií. Kvapka ejakulátu sa prenesie na špeciálne upravené

podložné sklíčko s mikrocelulami o objeme 2, 10, 15, 20 a 200 mm^3 na vyhrievanom stolíku. Analýza prebieha pri vlnovej dĺžke 660 nm (použitím fázového kontrastu) alebo 882 nm (použitím tmavého poľa).

Obrázok 4 CASA sperm analyzátor vybavený softwerom SpermVision

Samotná dĺžka analýzy trvá maximálne 3 minúty a systém stanoví nasledovné charakteristiky ejakulátu:

- Pohyblivosť (motilita) v (%)
- Celkový počet spermií (10^6 v ml, v celej vzorke, v inseminačnej dávke)
- Stredná dráhová rýchlosť – VAP ($\mu m.s^{-1}$)
- Progresívny pohyb vo vzorke, v dávke (%)
- Priamosť pohybu – STR (%)
- Rýchlosť dráhy ($\mu m.s^{-1}$)
- Progresívna rýchlosť ($\mu m.s^{-1}$)
- Linearita – priamosť pohybu (%)
- Laterálna pohyb hlavičky (µm)
- Plocha hlavičky (μm^2)

5. Návrh na využitie v praxi

Pre účely niekoľkodňového skladovania semena baranov v schladenom stave považujeme za vhodný prídavok implementora IGF-I pri koncentráciách 10 a 100 ng/ml a glutatión pri koncentrácii 1,5 mM. Tieto implementory majú dlhodobý (postupný) účinok na udržiavanie stability a životaschopnosti spermií baranov počas hypotermického uskladnenia.

6. Uplatnenie metodiky

Vzhľadom na rozmanitosť popísaných metodických prístupov analýzy spermií predpokladáme, že metodika sa stane vhodnou pracovnou pomôckou ako pre chovateľskú prax (inseminačné stanice, plemenárske podniky, zväzy chovateľov oviec a kôz), tak aj pre vedecko-výskumných pracovníkov zaoberajúcich sa aplikáciou moderných biotechnických metód v praxi (výskumné ústavy a výskumné stanice) a tiež v pedagogickom procese pri vzdelávaní študentov a doktorandov (stredné odborné školy poľnohospodárskeho zamerania, vysoké školy a univerzity). Okrem toho, predložená metodika má za cieľ oboznámiť chovateľskú verejnosť s možnosťami komplexnej analýzy ejakulátov hospodárskych zvierat na pracovisku Centra výskumu živočíšnej výroby v Nitre.

7. Zoznam použitej literatúry

1. Ahmad, K., Naz, R. K.: Role of epidermal growth factor in reproduction. Assist. Reprod. Techn. Androl. **4**, 1993, 85-92.
2. Bucak, M., Tekin, N.: Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. In: Small Ruminant Research **73,** (1), 2007, 103-108.
3. Champion, Z. J., Vickers, M. H., Gravance, C. G., Breier, B. H., Casey, P. J.: Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. Theriogenology **15** (7), 2002, 1793-1800.
4. El-Gaafary, M.N.: Quality and Fertility of cooled rabbit semen suplemented with cyclic-AMP stimulators. Anim. Reprod. Sci. **34**, 1994, 307–313.
5. El-Gaafary, M.N., Daader, A.H., Ziedan, A.E.: Effects of caffeine on bull semen quality and sperm penetration into cervical mucus. Anim. Reprod. Sci. 23, 1990, 13-19.

6. Henrick, D. M., Kouba, A. J., Lackey, B. R., Boone, W. R., Gray, S. L.: Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. Biol. Reprod. **59**, 1998, 330-337.
7. Mao, J., Wu, G.M., Prather, R.S., Smith, M.F., Cantley, T., Rieke, A., Didion, B.A., Day, B.N.: Effect of methyl-beta-cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. Theriogenology **64**, 2005, 1913-1927.
8. Miah A.G., Salma U., Takagi Y., Kohsaka T., Hamano K.I., Tsujii H.: Effect of relaxin and IGF-I on capacitation, acrosome reaction, cholesterol efflux and utilization of labeled and unlabeled glucose in porcine spermatozoa. Reprod. Med. Biol. **7**, 2008, 29-36.
9. Minelli, A., Liguori, L., Collodel, G., Lattaioli, P., Castellini, C. Effects of the purified IGF-I complex on the capacitation and acrosome reaction of rabbit spermatozoa. J. Exp. Zool. 290, 2001, 311-317.
10. Oliva-Hernandez, J., Perez-Gutierrez, J.F.: Localization of the epidermal growth factor (EGF) in the epididymis and accessory genital glands of the boar and functional effects on spermatozoa. Theriogenology **70**, 2008, 1159-1169
11. Sinha, M.P.: Effect of methylxanthines on motility and fertility of frozen-thawed goat semen. Theriogenology **44** (6), 1995, 907-914.
12. Tatham, B. G., Feehan, T., Pashen, R.: Buffalo and cattle hybrid embryo development is decreased by caffeine treatment during in vitro fertilization. Theriogenology **59**, 2003, 709-717.
13. Wijaya, A.: Radikal bebas and parameter status antioksidan. Forum Diagnostikum No.1. Lab. Klinik Prodia, 1996.