

Wpływ ilości i jakości nasienia oraz techniki unasienniania na wyniki zacieleń krów

JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, JERZY SZENFELD*

Pracownia Biotechniki Rozrodu Zwierząt Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Oddział w Bydgoszczy,
Al. Powstańców Wlkp. 10, 85-090, Bydgoszcz

*Prywatna Praktyka Weterynaryjna, ul. Kościuszki 4a/2, 66-400 Gorzów Wlkp.

Jaśkowski J. M., Szenfeld J.

The influence of the quantity and quality of semen and insemination techniques on results of pregnancies in cows

Summary

The mean number of spermatozoons in one insemination dose of frozen bull semen ranges from 15 to 25 milions. The article discusses relationships between the possibility to reduce the number of spermatozoons and the results of pregnancies in cows. It also presents new opinions on the significance of an appropriate quality of semen and insemination techniques.

Keywords: insemination, spermatozoons, fresh and frozen semen, insemination technique.

Typowa dawka nasienia mrożonego używanego do inseminacji krów zawiera na ogół około 15-20 mln plemników. Podobne wartości tj. od 15 do 25 mln plemników w dawce – z niewielkimi wyjątkami (Holandia, Francja), przyjmowane są za optymalne w krajach UE (6). Dotychczasowe wymagania krajowe odnośnie do wartości biologicznej nasienia mrożonego zawarte są w Instrukcji Ministerstwa Rolnictwa, Leśnictwa i Gospodarki Żywnościowej Departamentu Weterynarii z 1987 r. oraz instrukcji CHZH z 1994 r. W myśl przepisów jedna dawka inseminacyjna nasienia powinna zawierać nie mniej niż 10×10^6 plemników, o ruchu postępowym, przy założeniu, że ruch ten wykazuje przynajmniej 50% plemników (14, 19, 20). Podobne wartości w odniesieniu do wielkości dawki inseminacyjnej u buhajów przyjmowane są w nowo przygotowywanych rozporządzeniach Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej do ustawy z dn. 24 kwietnia 1997 r. o zwalczaniu chorób zakaźnych, badaniu zwierząt rzeźnych i mięsa oraz Państwowej Inspekcji Weterynaryjnej oraz ustawy o organizacji hodowli i rozrodzie zwierząt gospodarskich z dn. 20 sierpnia 1997 r.

Z nowszych obserwacji wynika jednak, że w odniesieniu do pewnej grupy buhajów – możliwe jest bez szkody dla uzyskiwania optymalnych wyników zacieleń – obniżenie liczby plemników w dawce inseminacyjnej.

Z historycznych już badań Sullivana (27) wynika, że optymalna dawka inseminacyjna powinna zawierać po rozmrożeniu – w odniesieniu do większości buhajów – około 10 milionów ruchliwych plemników

oraz około 15 milionów żywych plemników u buhajów o płodności poniżej średniej. W praktyce całkowita dawka inseminacyjna była dwukrotnie wyższa i wynosiła 20-30 mln plemników, proces mrożenia bowiem – uwzględniając stosowaną wówczas technikę zamrażania nasienia – przeżywało 40-50% plemników. Obecnie, biorąc pod uwagę stosowanie nowoczesnych metod konfekcjonowania, rozrzedzania, nowych generacji antybiotyków oraz metod mrożenia, odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu jest znacznie wyższy.

Kommisrud i wsp. (8) donoszą, że płodność krów nie ulega obniżeniu o ile do unasienniania użyta zostaje dawka zawierająca $12-18 \times 10^6$ plemników. Podkreślają oni, że w odniesieniu do buhajów o najlepszej płodności lepsze wyniki uzyskiwano korzystając z nasienia zawierającego nie 15 lecz 12 milionów plemników w dawce. Foote i Kaproth (3), przedstawili analizę ponad 30 tys. unasiennień dokonanych na przestrzeni kilkunastu lat przez firmę Genex. W tym okresie do inseminacji używano wyłącznie nasienia rozrzedzonego mlekiem pełnym z dodatkiem glicerolu, zawierającego w jednej dawce od 40 do 10 milionów plemników. W trzech różnych doświadczeniach porównywano wskaźnik niepowtarzalności. Uzyskane wyniki upoważniały do konkluzji, że całkowita liczba plemników w słonce o pojemności 0,5 ml, wystarczająca do uzyskania ponad 70% zacieleń może być obecnie obniżona do 10×10^6 (około 5×10^6 plemników ruchliwych), bez ujemnego wpływu na płodność krów, pod warunkiem korzystania z usług inseminatorów mających odpowiednie kompetencje. Gerard i Hum-

blot (4) donosili o nieistotnym obniżeniu się wskaźnika niepowtarzalności rzędu 3,5% jeśli do inseminacji użyto nasienia zawierającego 8×10^6 plemników w dawce zamiast porcji z dwukrotnie większą liczbą gamet męskich. Jeszcze mniejszą dawkę nasienia zastosował Pace i wsp. (17). Jeśli do inseminacji użyto dawek zawierających $18,2 \times 10^6$ lub $4,7 \times 10^6$ plemników ruchliwych wyniki niepowtarzalności obniżały się z 69 do 64%. Równocześnie dodają oni, że odsetek plemników ruchliwych wynosił od 35 do 60%.

Nehring i wsp. (15) oceniali wyniki niepowtarzalności po inseminacji nasieniem mrożonym zawierającym 16, 12, 8 lub 4×10^6 plemników w dawce inseminacyjnej. Nie stwierdzono istotnych różnic w odniesieniu do niepowtarzalności dla nasienia zawierającego 16 lub 12×10^6 plemników oraz 8 lub 4×10^6 plemników. Problemy płodności pojawiały się dopiero wówczas kiedy całkowita liczba plemników w dawce była niższa niż 10×10^6 . Ogółem w grupie ocenianych buhajów u 40% wyniki zacięleń obniżały się około 10% wówczas, kiedy porcja nasienia zawierała 4×10^6 plemników, u 20% rekomendowana była dawka zawierająca 12×10^6 plemników, u 40% pozostałych natomiast, wystarczającą była dawka o koncentracji plemników 8×10^6 plemników. Autorzy sugerują, że w przypadku czołowych buhajów, przed przystąpieniem do produkcji dawek nasienia o obniżonej liczbie plemników niezbędne wydaje się przeprowadzenie dokładniejszych testów (*in vivo* i *in vitro*) celem zabezpieczenia przed ewentualnym obniżeniem płodności u krów.

Pewnym coraz częściej podnoszonym problemem przy uzyskiwaniu nasienia o obniżonej liczbie plemników w dawce jest – w przypadku stosowania słomek firmy Cassou o pojemności 0,25 ml – konieczność większego rozrzedzenia nasienia. Silniejsze rozcieńczenie nasienia zwiększa ryzyko obniżenia jego parametrów jakościowych. W związku z tym zaproponowano, by konwencjonalnie rozcieńczane nasienie umieszczać w słomkach o pojemności 0,125 ml. W celu weryfikacji tej tezy oceniano po rozmrożeniu ruch plemników, odsetek plemników o ruchu postępowym oraz przeprowadzano próbę z błękitem anilinowym dla dawek zawierających od 5 do 15×10^6 plemników umieszczonych w słomkach o pojemności 0,250 i 0,125. Poszczególne porcje nasienia przygotowywano z rozcieńczonego nasienia zawierającego w 1 ml od 20 do 60×10^6 ml plemników. Zgodnie z przewidywaniami, zmniejszenie liczby plemników w dawce do 5×10^6 oraz zastosowanie słomek o pojemności 0,125 pozwoliło na zachowanie parametrów jakościowych nasienia porównywalnych do uzyskiwanych przy zastosowaniu słomek o pojemności 0,250 zawierających 15×10^6 plemników w dawce. We wcześniejszych badaniach wykazano nadto, że nie ma różnic w odniesieniu do temperatury zamrażania i rozmrażania dla słomek o pojemnościach tradycyjnych i pojemności zredukowanej o połowę (8). W konkluzji autorzy su-

gerują, że w odniesieniu do stosowanych obecnie technologii produkcji nasienia istnieje realna możliwość obniżenia całkowitej liczby plemników w dawce do 15×10^6 . Najniższą dawkę inseminacyjną w odniesieniu do nasienia mrożonego stosowali Shanonn i Vishwanath (26) oraz inni (25, 28). Pierwsi podają, że obniżenie dawki inseminacyjnej w przypadku nasienia mrożonego z 20 do 5 mln plemników powodowało 7 procentowy spadek niepowtarzalności. Autorzy zwracają uwagę na istotną interakcję pomiędzy liczbą plemników w dawce a buhajem, od którego pochodziło nasienie. Van Giessen i wsp. (28) z kolei porównywali wyniki niepowtarzalności u krów inseminowanych nasieniem mrożonym zawierającym 5, 7,5 lub 10×10^6 plemników oraz nasieniem świeżym zawierającym $2,5 \times 10^6$ plemników. Stwierdzając, że płodność w ten sposób unasięnianych samic nie różniła się istotnie. W renomowanych firmach amerykańskich prowadzących produkcję nasienia, przygotowuje się od wybitnych reproduktorów dawki nasienia zawierające 3-4 mln żywych plemników. Warunkiem skrajnego obniżenia liczby plemników w dawce – co należy podkreślić – jest dobra płodność buhaja. Określa ją wskaźnik niepowtarzalności. Dobra płodność (wskaźnik niepewtarzalności w granicach 67-69%) cechuje około 20% buhajów. Około 3/5 buhajów cechuje średnia płodność (skuteczność zacięleń w granicach 62-66%). Podobnie po unasięnianiu nasieniem około 20% buhajów uzyskuje się 57-61% niepewtarzalność. Tylko ta grupa wymaga inseminacji ogólnie akceptowaną dawką zawierającą 8-10 mln plemników (14).

Pewne różnice w odniesieniu do wyników unasięniania dotyczą stosowania nasienia mrożonego i świeżego. Ostatnie dane wskazują, że stosując dawkę zawierającą 10×10^6 plemników zawartych w słomce o pojemności 0,5 ml uzyskuje się 7,5% wyższą niepewtarzalność niż po zastosowaniu tego samego nasienia po rozmrożeniu. Jednocześnie niepewtarzalność gwałtownie się obniża jeśli nasienie jest przechowywane i używane ponad 2 dni (9). Różnicę 1,7% w wynikach niepewtarzalności notowano po zastosowaniu nasienia świeżego lub mrożonego zawierającego odp. 10 lub 20-25 milionów plemników (2).

Jeszcze mniejsze dawki nasienia stosowano z powodzeniem w przypadku używania nasienia świeżego. Na marginesie zaznaczyć należy, że świeże, konserwowane nasienie stosowane jest do inseminacji m.in. w Nowej Zelandii i Holandii (2, 12, 13). Najniższa z dotąd testowanych dawek inseminacyjnych wynosiła $0,5 \times 10^6$ plemników, zaś uzyskiwane przy jej zastosowaniu wyniki w odniesieniu do wyniku niepewtarzalności wyniosły 65% i były zaledwie o 3% gorsze niż po zastosowaniu dawki 5-cioкратно większej (23).

Z najnowszych badań Seidel'a i wsp. (23, 24) wynika, że dawkę inseminacyjną w odniesieniu do nie rozcieńczonego, świeżego nasienia można skrajnie obniżyć nawet do 100 tys. pod warunkiem przestrzegania określonej techniki unasięniania. Sugerują oni by na-

sienie wprowadzać nie do trzonu macicy lecz głęboko do jej rogów. Odsetek zacielonych krów po zastosowaniu tak niewielkiej liczby plemników wyniósł 41% i był nieistotnie niższy od (50%) uzyskiwanych po zastosowaniu dawki zawierającej $2,5 \times 10^5$ plemników w 0,100 ml słomce i oraz od (61%) uzyskiwanych po zastosowaniu nasienia zawierającego $2,5 \times 10^6$ plemników w dawce umieszczonej w słomce o pojemności 0,250 ml (24). Stosowane w praktyce i skuteczne przy stosowaniu ogólnie przyjętych dawek nasienia unasienianie do trzonu macicy, nie jest polecane przy stosowaniu dawek nasienia o obniżonej liczbie plemników. Przypuszcza się, że zawierający sialomucyny, gęsty śluz znajdujący się wewnątrz szyjki macicznej, może podczas rui przedostawać się i gromadzić wewnątrz trzonu macicy. W czasie depozycji nasienia uwięzione w śluzie plemniki mogą nie docierać w porę do komórki jajowej. Z drugiej strony dystans jaki muszą pokonać plemniki z miejsca depozycji do miejsca zapłodnienia jest w przypadku unasieniania do trzonu macicy znacznie dłuższy niż przy unasienianiu do rogów macicy. Równocześnie przy wprowadzaniu nasienia bezpośrednio do rogów macicznych, nasienie nie koniecznie musi być wprowadzone do obu rogów macicy. Bez ujemnego wpływu na wyniki unasieniania wystarczy je umieścić w jednym z rogów. Z badań poubojowych wynika, że bez względu na to czy nasienie wprowadzono do jednego czy do dwóch rogów, w każdym z nich znajdowała się porównywalna liczba plemników (2).

Jednym z warunków stosowania niewielkich dawek nasienia jest zdaniem Macmillana i wsp. (12) przestrzeganie ściśle określonego terminu inseminacji podczas rui. Jeśli inseminacja dokonywana jest nasieniem płynnym zawierającym $2,5$ lub $0,5 \times 10^6$ plemników pod koniec rui niepowtarzalność wynosi odp. 65,9 i 60,5%. Z kolei jeśli unasienianie przeprowadzane jest podczas wczesnej rui – 62 i 52,3%. Późne unasienianie krów podczas rui sugeruje się zwłaszcza w tych przypadkach, kiedy do unasieniania zastosowano nasienie o obniżonej zawartości plemników w dawce, zaś płodność buhaja określa się jako przeciętną lub poniżej przeciętnej (13).

W licznych publikacjach przedstawiano wpływ odpowiedniej jakości nasienia na płodność krów (10, 11, 12). Wysoka częstość przypadkowych lub specyficznych morfologicznych defektów plemników związana jest z obniżoną płodnością lub niepłodnością. Morfologiczna kondycja plemników jest funkcją procesów dojrzewania (16). Ostatnio, Saake i wsp. (22) stwierdzili istotne różnice w odniesieniu do jakości zarodków uzyskiwanych od krów poddanych superowulacji w efekcie unasieniania nasieniem o niedostatecznej jakości. Do inseminacji krów użyto nasienia pobranego od buhaja przed poddaniem jego jąder termicznej insultacji oraz 21 dni po zaburzeniu procesu spermatogenezy wywołanym termiczną insultacją jąder. Odsetek zarodków dostatecznej jakości lub zdegenerowanych wyniósł 56,5% i był o 30% wyższy niż w

grupie kontrolnej. Podobnie odsetek niezapłodnionych komórek jajowych był o 1/3 wyższy niż w grupie samic unasienianych nasieniem kontrolnym. Dodać należy, że nasienie charakteryzowało się podwyższonym odsetkiem plemników z kraterami główki (38%) oraz jej diademem (19%). Podobną reakcję na niewłaściwą jakość nasienia notował DeJarnette i wsp. (1) w odniesieniu do krów po spontanicznej owulacji. Biologiczna wartość nasienia coraz częściej kontrolowana jest nie na podstawie oceny ruchliwości plemników, koncentracji ATP czy integralności błon komórkowych plemników lecz przy pomocy testu przeprowadzanego w warunkach *in vitro* na izolowanych oocytach bydłych (5, 7, 18). Przykładowo Zhang i wsp. (29) oceniali odsetek zygot oraz uformowanych blastocyst po zapłodnieniu oocytów bydłych nasieniem konkretnych buhajów. Uzyskane wyniki konfrontowali z 56 dniowym wskaźnikiem niepowtarzalności dla wymienionych buhajów rejestrowanym w warunkach terenowych. W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono wysoką przydatność badania procesu zapłodnienia oocytów *in vitro* oraz ich hodowli do stadium blastocysty w ocenie potencjału biologicznego mrożonego nasienia buhajów.

Piśmiennictwo

1. DeJarnette J. M., Saake R. G., Bame J., Vogler C. J.: J. Anim. Sci. 70, 484, 1992.
2. DeJarnette J. M.: Proc. National Reprod. Symp., Pittsburgh Sept. 22, 139, 1994.
3. Foote R. H., Kaproth M. T.: J. Dairy Sci. 80, 1, 1997.
4. Gerard O., Humblot P.: Theriogenology, 36, 727, 1991.
5. Gordon L., Lu K. H.: Theriogenology 33, 77, 1990.
6. Haard M., van der Berg Th.: Proc. 9th European A. I. Vets Meeting, 8-10 October, Neuchatel, Questionnaire for European Qualivet-group. 1997.
7. Hillerey F. L., Parrish J. J., First N. L.: Theriogenology 33, 249, 1993.
8. Komisrud E. T., Steine T., Graffer T.: Reprod. Domest. Anim. 31, 359, 1996.
9. Ladwig C., Rothe L., Nehring H.: Reprod. Dom. Anim. Supl. 5, 85, 1998.
10. Lange M. M., Roberts K. D.: Gam. Res. 12, 183, 1985.
11. Linford E., Glover F. A., Bishop C., Stewart D. L.: J. Reprod. Fert. 47, 283, 1976.
12. Macmillan K. L., Curnow R. J.: NZ J. Exp. Ag. 5, 279, 1977.
13. Macmillan K. L., Watson J. D.: NZ J. Exp. Ag. 5, 11, 1977.
14. Morstin J.: Przegląd Hod. 66, 12, 1998.
15. Nehring H., Rothe L., Wolf R.: Reprod. Dom. Anim. Supl. 5, 86, 1998.
16. Pace M. M.: 9-th Internat. Congr. Anim. Reprod. & A. I. Madrid, 1, 133, 1980.
17. Lange M. M., Sullivan J. J., Elliott F. I., Graham E. F., Coulter G. H.: J. Anim. Sci. 53, 693, 1981.
18. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., Leibfried-Rutledge M. L., Crister E. S., Eyestone W. H., Frist N. L.: Theriogenology 25, 591, 1986.
19. Pilch J., Morstin J., Schmidt-Kalińska I., Pakula A.: Technologia mrożenia nasienia buhajów w słomkach. Instrukcja dla laboratoriów SHiUZ, CSHZ, Warszawa, 1994.
20. Roslanowski K.: Badanie i ocena przydatności rozplodowej buhajów Instrukcja Nr 2/87 MIn. Roln., Leśn. Gospod. Żywn. Dep. Wet. 1987.
21. Saake R. G.: J. Anim. Sci. 55 (supl. 2) 1, 1982.
22. Saake R. G., Nadir S., Dalton J., Bame J., DeJarnette J. M., Degelos S., Nebel R. L.: Proc. XV Tech. Conf. Art. Insem. Reprod. National Assoc. Anim. Breeders, New York, 1, 57, 1994.
23. Seidel G. E., Allen C. H., Brink Z., Graham J. K., Cattll M. B.: J. Dairy Sci. 73, Supl. 1, 232, 1995.
24. Seidel Jr. G. E., Allen C. H., Johnson L. A., Holland M. D., Brink Z., Welch G. R., Graham J. K., Cattell M. B.: Theriogenology 48, 1255, 1997.
25. Shannon P.: VII Int. Congr. Anim. Reprod. AI, München 11, 1441, 1972.
26. Shannon P., Vishwanath R.: Anim. Reprod. Sci. 39, 1, 1995.
27. Sullivan J. J., Elliott F. I.: VI Congr. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif. Paris, 2, 1307, 1968.
28. Van Giessen R. C., Zuidberg C. A., Wilmink W., den Daas V. N.: XII Int. Congr. Anim. Reprod. And AI, Hague, 3, 1493, 1992.
29. Zhang B. R., Larsson B., Lundeheim N., Rodriguez-Martinez H.: Theriogenology 48, 221, 1997.

Adres autora: doc. dr hab. Jędrzej M. Jaśkowski, ul. Św. Trójcy 35/50, 85-090 Bydgoszcz