DOROTA LECHNIAK, IAN R. CUMMING*, JANINA KACZMAREK**

Wykorzystanie testu oporności osmotycznej plemników w rutynowej ocenie jakości nasienia buhajów

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań
*University of Bristol, School of Veterinary Sciences, Langford House, BS18 7DU Bristol (Anglia)
**SHiUZ w Poznaniu, Zakład Unasieniania Zwierząt w Gostyniu, ul. Mickiewicza 2, 63-800 Gostyń

Uzyskiwanie dobrych wyników w rozrodzie bydła jest podstawowym celem zarówno hodowców jak i ośrodków zajmujących się pozyskiwaniem, mrożeniem i sprzedażą nasienia. O zapłodnieniu w dużym stopniu decyduje obecność żywych plemników, z nie uszkodzonym akrosomem, które powinny znajdować się w jajowodzie samicy krótko po owulacji. Zatem wybór właściwego momentu unasieniania jest jednym z podstawowych czynników limitujących efektywność zabiegu inseminacji. Wykazano, że plemniki zdolne do zapłodnienia docierają do cieśni jajowodu krowy około 8 godzin po inseminacji lub kryciu i pozostają tam do momentu owulacji. Jednocześnie zauważono, że część plemników dociera do tego miejsca już w kilka minut po kryciu lub unasienianiu, jednakże z niewyjaśnionych do tej pory przyczyn nie są one zdolne do zapłodnienia, gdyż większość z nich jest martwa i posiada uszkodzoną błonę komórkową (11). Ponadto stwierdzono, że żywe plemniki przesuwają się w domaciczną część cieśni jajowodu tylko w czasie bliskim owulacji. Odpowiednia liczba plemników z nieuszkodzonym akrosomem i zdolnych do zapłodnienia powinna znaleźć się w układzie rozrodczym krowy około 6-12 godzin przed owulacją (11).

Laboratoryjna ocena jakości nasienia

Rutynowe badania nasienia buhajów w stacjach unasieniania obejmuje szereg parametrów, m.in. ocenę koncentracji plemników, ich ruchliwość, morfologię oraz przydatność do długotrwałego przechowywania (2). Manipulacje towarzyszące pozyskiwaniu, ocenie i rozrzedzaniu ejakulatu oraz proces mrożenia wywierają z pewnością negatywny wpływ na jakość i żywotność plemników. Najnowsze badania wykazały, że podczas zamrażania i rozmrażania plemników buhaja, część białek błony komórkowej ulega zniszczeniu, co prawdopodobnie obniża – w porównaniu ze świeżym nasieniem – przydatność plemników mrożonych do zapłodnienia (16). W ostatnim czasie dużym zainteresowaniem cieszy się analiza jakości nasienia przy użyciu cytometrii przepływowej (3, 22). Pomimo interesujących wyników, koszt zakupu urządzenia nadal utrudnia zastosowanie tej metody badawczej w rutynowej ocenie nasienia.

Obecnie za podstawowy parametr charakteryzujący przydatność nasienia po rozmrożeniu do inseminacji, przyjmuje się procent plemników o ruchu postępowym. Do inseminacji kwalifikowane są ejakulaty, w których co najmniej 50% plemników przeżywa proces zamrożenia i rozmrożenia oraz wykazuje ruch postępowy. Trudno jednak na podstawie wymienionych parametrów przewidywać płodność buhajów, bowiem ogólnie uważa się, że korelacja pomiędzy tymi parametrami a płodnością jest niska (9, 14, 21). Również metoda dojrzewania i zapłodnienia oocytów *in vitro* okazuje się mało przydatna w przewidywaniu płodności buhaja. Najnowsze badania wykazały brak korelacji pomiędzy wskaźnikiem penetracji oocytów w warunkach *in vitro* a uzyskiwanymi parametrami niepowtarzalności rui (NR) dla danego buhaja (9). Dodatkowym elementem utrudniającym przewidywanie płodności na podstawie oceny nasienia jest wysoka zmienność jakości poszczególnych ejakulatów tego samego samca w zależności od pory roku, sposobu i poziomu żywienia oraz warunków utrzymania (17). Jednakże ostatnie dane wykazują istnienie korelacji między płodnością buhajów a pewnymi parametrami jakościowej oceny nasienia po rozmrożeniu, np. ruchliwością plemników ($r = 0,53$) oraz udziałem plemników o prawidłowej budowie morfologicznej ($r = 0,59$), chociaż zakres prób biologicznych nie był w tych doświadczeniach zbyt szeroki (1, 6). Jedynie eksperyment przeprowadzony przez Cumminga (8), w którym wykazano brak istotnej korelacji pomiędzy udziałem plemników z prawidłowym akrosomem a płodnością buhaja, było potwierdzone obszernym testem biologicznym.

W hodowli zdarzają się buhaje, których nasienie, mimo dobrych wyników oceny laboratoryjnej, nie sprawdza się w warunkach *in vivo*. Obserwowano buhaje, których nasienie posiadało 60-70% plemników o ruchu postępowym, a uzyskany wskaźnik niepowtarzalności rui wynosił zaledwie 50-55%, a wskaźnik cielności – 40-45%. I na odwrót; są buhaje, które uzyskują wysoki współczynnik NR pomimo słabych wyników oceny jakościowej nasienia (14). W Polsce spotyka się również buhaje oddające ejakulaty z niższym udziałem plemników o ruchu postępowym (30-40%) uzyskujące wskaźnik NR na poziomie 65-75%, a faktyczny wskaźnik zapładnialności równy 60%.

Czas oczekiwania na wyniki prób biologicznych u bydła jest długi, wiążą się one z konkretnymi kosztami, które w przypadku jałowości z przyczyn nieskutecznego zabiegu inseminacji ponosi hodowca. Dodatkowo, w komercyjnym systemie inseminacji, przy coraz wyższej konkurencji, bardzo istotnym elementem staje się ustalenie optymalnej liczby plemników w

dawce inseminacyjnej, indywidualnie dla każdego buhaja. Pozwoli to osiągnąć maksymalne efekty i zyski. W Polsce obowiązują normy jakościowe dla nasienia mrożonego określone instrukcją prac laboratoryjnych (18). Dawka inseminacyjna nasienia buhaja musi zawierać po rozmrożeniu minimum 10 mln plemników wykazujących ruch postępowy, co stanowi co najmniej 50% wszystkich plemników w dawce. Przy ustalaniu optymalnej liczby plemników w dawce nie uwzględnia się bieżącego wskaźnika NR dla konkretnego buhaja. System ten jednakże wymaga wprowadzenia ciągłej kontroli wyników inseminacji (niezbędny jest sprawny system komputerowy), które na bieżąco byłyby przekazywane przez inseminatorów i hodowców do stacji unasieniania i wykorzystywane w ustalaniu optymalnej liczby plemników w dawce inseminacyjnej danego buhaja. Z tych powodów duże znaczenie miałoby poszerzenie dotychczasowych metod oceny nasienia o technikę lub techniki, które wykazywałyby wysoką korelację z płodnością buhajów.

Tab. 1. Skład roztworu testowego (wg Revella, 19)

Składniki i osmolarność	Nasienie*	
	świeże	mrożone
Fruktoza	13,51 g	9,0 g
Cytrynian sodu	7,35 g	4,9 g
Osmolarność mOsm kg^{-1}	150	100
Woda**	uzupełnić do 1000 ml	

Objaśnienia: * w tabeli przedstawiono optymalny skład roztworu testowego i jego osmolarność, dla których to parametrów uzyskano powtarzalne wyniki odpowiednio dla nasienia świeżego i mrożonego; ** zaleca się używanie wody wysokiej jakości np. z systemu Milipore.

Charakterystyka testu oporności osmotycznej

Błona komórkowa plemnika odgrywa wiele ważnych funkcji zarówno w jego metabolizmie, jak i prawidłowym przebiegu procesu kapacytacji, reakcji akrosomalnej i fuzji z błoną oocytu, co w zasadniczy sposób wpływa na wyniki w rozrodzie. Już w latach sześćdziesiątych stwierdzono, że plemniki buhaja pęcznieją w roztworze hipotonicznym, co jest efektem zjawiska wyrównywania różnicy stężeń między wnętrzem plemnika a ośrodkiem o wyższym ciśnieniu osmotycznym (10). Zdolność plemnika do pęcznienia w roztworze hipoosmotycznym jest dowodem posiadania aktywnej biologicznie błony komórkowej, zdolnej do przewodzenia wody w celu wyrównania stężeń. Powszechnie znana metoda różnicującego barwienia plemników mieszaniną eozyny z nigrozyną ujawnia jedynie ciągłość morfologiczną błony. Jeżeli plemnik posiada nie uszkodzoną błonę, wówczas pozostaje niewybarwiony, natomiast w przypadku jej mechanicznego uszkodzenia eozyna wnika do wnętrza plemnika i wybarwia go (23). W grupie plemników niewybarwionych, a więc żywych w chwili barwienia, znajdują się również takie, które pomimo posiadania błony nieuszkodzonej mechanicznie, nie są zdolne do zapłodnienia, gdyż ich błona jest zmieniona pod względem funkcjonalnym i niezdolna do przewodzenia wody (13). Barwienie różnicujące nie pozwala na ocenę stanu funkcjonalnego błony plemników, który decyduje o zachowaniu przez nie zdolności do zapłodnienia. Test oporności osmotycznej różnicuje plemniki zależnie od stanu funkcjonalnego błony komórkowej. Plemniki mające biologicznie funkcjonalną błonę, po umieszczeniu w środowisku hipoosmotycznym wykazują pęcznienie witki, a ich ruchliwość zanika. W tych samych warunkach plemniki z uszkodzoną funkcjonalnie błoną nie podlegają pęcznieniu.

Zjawisko pęcznienia zostało wykorzystane w ocenie jakości nasienia człowieka (13), buhaja (19), knura (20, 24), ogiera (4) oraz psa (12) i jest określone mianem testu pęcznienia hipoosmotycznego plemników człowieka (HOS – hypoosmotic swelling) oraz testu oporności osmotycznej plemników bydła (ORT – osmotic resistance test). Wyniki dotychczasowych badań nad wykorzystaniem testu ORT do oceny płodności samców nie są jednoznaczne. Z jednej strony stwierdzono wysoką korelację między wartością ORT a wynikami w rozrodzie, również w produkcji zarodków w warunkach *in vitro* u bydła i ludzi, podczas gdy inne dane nie wykazywały żadnych zależności (cyt. 18). Pozytywne wyniki wskazują na wysoką korelację między wartością ORT a współczynnikiem NR u bydła – r = 0,79 (17) i r = 0,57 (6) oraz stopniem penetracji pozbawionych osłonki przejrzystej oocytów chomika złocistego przez plemniki ludzkie – r = 0,9 (13). W ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się test

Tab. 2. Wyniki badań nasienia buhajów z wykorzystaniem testu oporności osmotycznej (wg Revella, 19)

Analizowany materiał	Procentowy udział napęczniałych plemników w stosunku do ogółu policzonych	Procentowy udział napęczniałych plemników nie wykonujących drgań, w stosunku do liczby napęczniałych komórek
Nasienie świeże	1-22%	1,5-91,7%
Nasienie mrożone	9-46%	19,5-68,2%

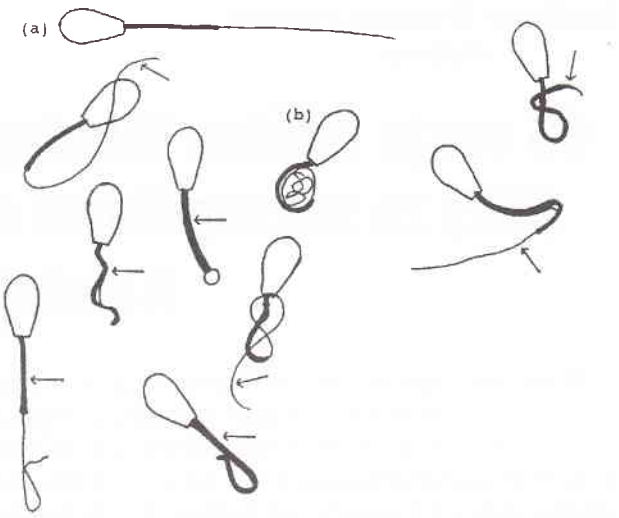
ORT jako jeden z elementów oceny jakości nasienia buhajów, również w celu sprawdzenia wpływu różnych czynników zawartych w pożywkach używanych do zapłodnienia *in vitro* (np. kofeiny) oraz warunków zamrażania i rozmrażania nasienia (5). Correa i wsp. (5) stwierdzili, że udział gamet z funkcjonalną błoną był niższy od procentu ruchliwych plemników w próbie, co może oznaczać, że po rozmrożeniu część ruchliwych plemników posiada niefunkcjonalną błonę, uszkodzoną podczas tych procesów. Ponieważ metoda ta jest szybka i łatwa w przeprowadzeniu, zalecana jest szczególnie w zakładach inseminacji. Od kilku lat, z dużym powodzeniem stosowana jest ona w centrum mrożenia nasienia buhajów należącym do korporacji Genus w Llanrhydd w Wielkiej Brytanii.

Opis testu oporności osmotycznej dla nasienia buhaja, świeżego i mrożonego (wg Revella, 19)

Wykazano, że błona otaczająca witkę plemnika jest luźniej z nią połączona niż błona główki plemnika (24), i w warunkach hipoosmotycznych oznacza się szczególną wrażliwością, dlatego przedmiotem oceny jest stopień jej pęcznienia (ryc. 1). Ponadto obserwacje mikroskopowe kształtu witek obarczone są dużo mniejszym błędem niż główek plemników, gdyż kształt witki nie zależy od płaszczyzny jej ułożenia na preparacie, co ma zdecydowane znaczenie przy ocenie kształtu główek. Dodatkowo obserwuje się wyginanie, skracanie i skręcanie witek. Po napęcznieniu plemniki nie wykazują ruchu, chociaż w przypadku nasienia buhaja stwierdzono pewien procent drgających plemników mimo oznak napęcznienia (miganie witek w regionie wstawki; ryc. 1). Dlatego dla każdej próby dodatkowo ustalano proporcję drgających plemników. Ta obserwacja może mieć związek z badaniami Morella (15), który wykazał, że oceniając plemniki buhaja przy pomocy cytometrii przepływowej można wyróżnić trzy grupy gamet: plemniki żywe, martwe oraz plemniki ruchliwe z ograniczoną żywotnością. Być może ten trzeci rodzaj odzwierciedla grupę drgających plemników pomimo oznak napęcznienia.

Wykonanie testu

5-10 µl świeżego nasienia lub zawartość jednej słomki (0,25 ml) miesza się po rozmrożeniu z 1 ml roztworu testowego (tab. 1) i inkubuje w cieplarce w temp. 35°C przez 40-60 minut. Po okresie inkubacji próbę dokładnie miesza się i nanosi kroplę około 10 µl zawiesiny na ogrzane szkiełko mikroskopowe, które przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym. Obserwacji dokonuje się na podgrzewanym stoliku mikroskopu wyposażonego w urządzenie kontrastowo-fazowe, przy powiększeniu 400-krotnym. Z każdej próbki nasienia wykonuje się 2 preparaty. Na każdym z nich liczy się po 100 plemników w czterech różnych miejscach preparatu i ustala procentowy udział napęczniałych plemników w stosunku do ogółu policzonych, a także udział napęczniałych komórek nie wykonujących drgań w stosunku do ogólnej liczby napęczniałych plemników (tab. 2).



Ryc. 1. Rodzaje pęcznienia plemników buhaja obserwowane w teście hipoosmotycznym (ORT): a – plemnik bez zmian; b – plemnik napęczniały bez oznak ruchliwości. Strzałki wskazują miejsca, gdzie pomimo napęcznienia najczęściej widoczne są oznaki aktywności (wg Revell & Mrode, 1944)

Podsumowanie

Ponieważ u bydła reakcja akrosomalna zachodzi przy zetknięciu się plemnika z powierzchnią osłonki przejrzystej oocytu, błona plemnika musi pozostać w stanie nie zmienionym aż do tego momentu (7). Z tego powodu najważniejszym elementem, z punktu widzenia przewidywania płodności buhaja, wydaje się być zdolność długotrwałego (min. 6-12 godzin) zachowywania żywotności plemników oraz ciągłości i funkcjonalności ich błony komórkowej. Dlatego celowe wydaje się być włączenie testu ORT do rutynowej oceny jakości nasienia buhajów oraz poszerzenie jej o ocenę czasu przeżywania plemników po rozmrożeniu.

Piśmiennictwo

1. *Berndtson W. E., Olar T. T., Pickett W.*: J. Dairy Sci. 64, 346, 1981.
2. *Bielański W.*: Rozród zwierząt, PWRiL, Warszawa, 1977.
3. *Bochenek M.*: Medycyna Wet. 2, 101, 1998.
4. *Caiza de la Cueva F. I., Rigau T., Bonet S., Miro J., Briz M., Rodriguez-Gil J. E.*: Theriogenology 47, 765, 1997.
5. *Correa J. R., Pace M. M., Zavos P. M.*: Theriogenology 48, 721, 1997.
6. *Correa J. R., Zavos P. M.*: Theriogenology 46, 1225, 1996.
7. *Crozet N.*: Gam. Res. 10, 241, 1984.
8. *Cumming I. R.*: Vet. Rec. 136, 289, 1995.
9. *Daas den N.*: Predicting fertility of the bull, Praca dokt., Uniwersytet Wageningen, Holandia, 1997.
10. *Drevius L. O., Eriksson H.*: Exp. Cell Res. 42, 136, 1966.
11. *Hawk H. W.*: J. Dairy Sci. 70, 1487, 1987.
12. *Kumi-Diaka J.*: Theriogenology 39, 1279, 1993.
13. *Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M., Crabo B. G., Zaneveld L. J. D.*: J. Reprod. Fertil. 70, 219, 1984.
14. *Linford E., Glover F. A., Bishop C., Stewart D. L.*: J. Reprod. Fertil. 47, 283, 1976.
15. *Morell J. M.*: Vet. Rec. 129, 375, 1991.
16. *Ollero M., Bescos O., Cebrian-Perez J. A., Muino-Blanco T.*: Theriogenology 49, 547, 1998.
17. *Parkinson T. J.*: Vet. Rec. 21, 303, 1985.
18. *Pilch J., Morstin J., Schmidt-Kalińska I., Pakuła A.*: Instrukcja prac laboratoryjnych, 1994.
19. *Revell S. G., Mrode R. A.*: Anim. Reprod. Sci. 36, 77, 1994.
20. *Schilling E., Vengust M.*: Zuchthygiene 20, 61, 1985.
21. *Soderquist L., Janson L., Larsson H., Einarsson S.*: J. Vet. Med. 38, 534, 1991.
22. *Thomas C. A., Garner D. L., Dejarnette J. M., Marshall C. E.*: Biol. Reprod. 56, 991, 1997.
23. *Wierzbowski S.*: Andrologia, Wydawnictwo Platan Kryspinów, 1996.
24. *Vazquez J. M., Martinez E. A., Martinez P., Garcia-Artiga C., Roca J.*: Theriogenology 47, 913, 1997.

Adres autora: dr Dorota Lechniak, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań