

## SEZONIŠKUMO ĮTAKA ERŽILŲ SPERMOS KOKYBEI

Vidmantas Pileckas, Algirdas Urbšys, Artūras Šiukščius, Jonas Kutra

Lietuvos veterinarijos akademijos Gyvulininkystės institutas,

R. Žebenkos g. 12, LT-82317 Baisogala, Radviliškio r., el. paštas vidmantas@lgi.lt

Gauta 2008-10-23; priimta spausdinti 2009-06-01

### SANTRAUKA

*Darbo tikslas – nustatyti šviežios ir kriokonservuotos eržilų spermos fiziologinių rodiklių priklausomybę nuo sezoniškumo. Darbas atliktas LVA Gyvulininkystės instituto Gyvūnų reprodukcijos skyriuje ir UAB „Vilniaus žirgynas“. Buvo nustatomi kokybiniai ir morfologiniai atskiestos šviežios bei kriokonservuotos eržilų spermos rodikliai. Tiriant eržilų spermos šaldymo savybes buvo naudojama eržilų sperma, kuri atitiko minimalius šviežiai eržilų spermai keliamus reikalavimus.*

*Tyrimų metu nustatėme, kad metų sezonas neturėjo ženklios įtakos spermos pH, bet įtakojė ejakulianto tūrį bei spermatozoidų koncentraciją. Eržilų spermos pH metų bėgyje svyravo nuo 7,28 iki 7,21, tačiau atitiko fiziologines normas (6,8–7,7).*

*Ejakulianto tūris labiausiai sumažėjo rudenį, vidutiniškai iki 20,9 cm<sup>3</sup>, tačiau kitais metų laikotarpiais jis išliko palyginti stabilus ir svyravo nuo 27,4 iki 27,8 cm<sup>3</sup>. Mažiausia spermatozoidų koncentracija šviežioje spermoje buvo birželio–rugpjūčio mėnesiais. Spermatozoidų judrumas pavasarį buvo mažesnis (38 %) negu kitais laikotarpiais (54–59 %). Vizualiai vertinant, normalių spermatozoidų buvo vidutiniškai 60–65 %. Vertinant programą SCA, reikšmingai skyrėsi spermatozoidų kiekis su normaliomis galvutėmis: vasarą jų buvo 21 %, o kitais sezonais – 30–33 %. Nei gyvų spermatozoidų skaičius atšildytoje eržilų spermos dozėje po kriokoservavimo, nei spermatozoidų judrumas po atšildymo nepriklausė nuo sezono, dozėje buvo atitinkamai 53–57 mln. spermatozoidų, 20–23 % sudarė tiesiai judantys spermatozoidai.*

**Raktažodžiai:** eržilai, spermos kokybė, sezoniškumas

### ĮVADAS

Laukiniai gyvuliai poruojasi tam tikru metų laiku, kuris vadinamas veisimosi sezonu. Jis susidarė evoliucijos metu, veikiant natūraliai atrankai. Kai kuriuos gyvūnus prijaukinus, veisimosi sezoniškumas išnyko. Jie gali apsisivaisinti ir atvesti prieauglį bet kuriuo metų laiku. Kumelės taip pat gali poruotis beveik ištisus metus, nors pavasarį jų lytinis aktyvumas sustiprėja. Sukergus kumeles pavasarį, kumeliukai taip pat gimsta pavasarį, ir iki žiemos paauga, sustiprėja [15]. Geriausius eržilus reproduktorius panaudoti kergimui sunku dėl to, kad per sezoną vienu eržilu vidutiniškai galima

sukergti 30–40 kumelių, priklausomai nuo spermatozoidų skaičiaus dozėje [11], reproduktoriaus šėrimo ir laikymo sąlygų [16], spermos kokybės, kuri įvairiu metu laikotarpiu gali kisti [8, 9].

Vienas iš būdų, kaip veisimosi metu efektyviau panaudoti geriausių reproduktorių spermą, yra jos praskiedimas ir laikymas pliusinėje temperatūroje, transportuojant ją į atskirus regionus [2, 14], arba spermos kriokonservavimas ne sezono metu, sukauptam pakankamą išaldytos spermos dozių skaičių, reikalingą prognozuojamam kumelių skaičiui [18]. Žinoma, kumelių apvaisinimas naudojant kriokonservuotą spermą su mažesniu spermatozoidų skaičiumi dozėje, yra mažesnis, lyginant su rezultatais, gautais naudojant eržilus reproduktorius [5]. Taip yra dėl spermos kriokonservavimo technologinių procesų, kurie sąlygoja spermos kokybę, įtakos [17,19].

Atskirais metų laikais buvo stebimi spermos kokybės svyravimai [9], nors kai kurie autoriai nurodo, kad sezoniškumas turi įtaką tik spermatozoidų judrumui [10]. Tačiau eržilų spermos kokybės ir kumelių apvaisinimo koreliacija nedidelė [7]. Be to, spermos kokybę apsprendžia spermos ėmimo dažnumas, ėmimo technika [12] bei naudojamos technologinės priemonės [13]. Kumelių apvaisinimą didele dalimi apsprendžia ir į lytinius takus įvedamų spermatozoidų skaičius. Mažinant įvedamų spermatozoidų skaičių, kumelių apvaisinimo procentas mažėja [5]. Siekiant sukaupti sėklinimui reikalingą išaldytos spermos kiekį ne sezono metu, būtina nustatyti spermos kokybės kitimo dinamiką metų laikotarpyje, tiriant šviežios ir kriokonservuotos spermos fiziologinius parametrus.

Lietuvoje spermos tyrimai ir kokybės pokyčiai, priklausomai nuo metų laiko, iki šiol nebuvo atliekami, todėl šio darbo tikslas ir buvo nustatyti šviežios ir kriokonservuotos eržilų spermos fiziologinių rodiklių priklausomybę nuo sezoniškumo.

## TYRIMŲ SĄLYGOS IR METODAI

Darbas atliktas LVA Gyvulininkystės instituto Gyvūnų reprodukcijos skyriuje ir UAB „Vilniaus žirgynas“. Buvo nustatomi atskiestos šviežios bei kriokonservuotos eržilų spermos kokybiniai ir morfologiniai rodikliai.

Tyrimams buvo naudojama penkių veislių lytiškai subrendusių eržilų sperma, kurioje spermatozoidų judrumas buvo ne mažesnis kaip 6 balai (60 %), o koncentracija – ne mažesnė kaip 0,15 mlrd./cm<sup>3</sup>.

Po spermos įvertinimo pirmą kartą santykiu 1:1 27±1 °C skiedikliu atskiesta sperma 10 min buvo koncentruojama centrifugoje 3500 aps./min greičiu. Spermatozoidų koncentratas antrą kartą buvo skiedžiamas tokiu pat skiedikliu su krioprotektoriais. Po atskiedimo tiriama sperma buvo išfasuota į 0,25 cm<sup>3</sup> šiaudelius ir vėsinama 0,3 °C/min režimu iki 4±2 °C temperatūros, šioje temperatūroje sperma laikyta 2,5 h, po to užšaldyta. Sperma per 8 min. buvo išaldoma saugykloje KS–40 ant spermos išaldymo įrenginio –160 °C temperatūroje. Temperatūra spermos išaldymo metu buvo kontroliuojama elektroniniu termometru su termoporiniu jutikliu. Praėjus 48 h po išaldymo, sperma per 10 s buvo atšildoma 40 °C temperatūroje.

Atliktas eržilų spermos kokybės rodiklių tyrimas. Vykdamas spermos tyrimus, buvo nustatytas ejakulianto tūris, pradinis spermatozoidų judrumas, išgyvenimo trukmė, koncentracija ir patologiinių spermatozoidų kiekis ejakuliate.

**Spermos tyrimas.** *Ejakulianto tūris* buvo išmatuotas matavimo cilindru.

*Pradinis spermatozoidų judrumas* buvo vertinamas vizualiai, naudojant binokuliarinį mikroskopą su iki 40–42°C pašildomu staleliu, trijuose matymo laukuose ir įvertintas 10 balų sistema (100 % judrių spermatozoidų). Spermos kokybiniai rodikliai buvo įvertinti naudojant optinį mikroskopą NICON ECLIPSE E200, kompanijos MICROPTIC Ltd. spermos kokybinių parametrų įvertinimo programą SCA.

*Spermatozoidų gyvybingumas* vertintas inkubuojant spermą +38±0,5°C temperatūroje, kol neliko judrių spermatozoidų.

*Spermatozoidų koncentracija* (mlrd./cm<sup>3</sup>) nustatyta Gorajjevo kamera. Duomenų įvertinimo metu buvo apskaičiuoti išvestiniai dydžiai, leidžiantys išsamiai išanalizuoti spermos rodiklius. *Bendras spermatozoidų skaičius ejakuliate* (mlrd.) gautas, sudauginus ejakulianto tūrio ir spermatozoidų koncentracijos rodiklius.

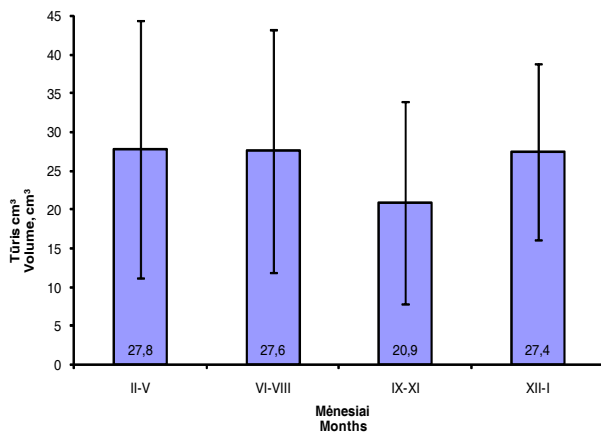
*Morfologiniai spermos tyrimai ir sveikų spermatozoidų kiekis ejakuliate (%)* nustatytas, dažant spermą eozino dažais ir mikroskopuojant. Sveiki, su nepažeista membrana spermatozoidai nenusidažo, o pažeisti nusidažo rusva spalva.

Skirtumai, pagrįsti vienfaktorinės dispersinės analizės rezultatais, laikomi reikšmingais, kai P<0,05. Aprašyme pateikiamos rodiklių vidutinės reikšmės su standartinė dispersija – M±SD. Statistiniams skaičiavimams naudota *Microsoft Excel 2000* programa.

## TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

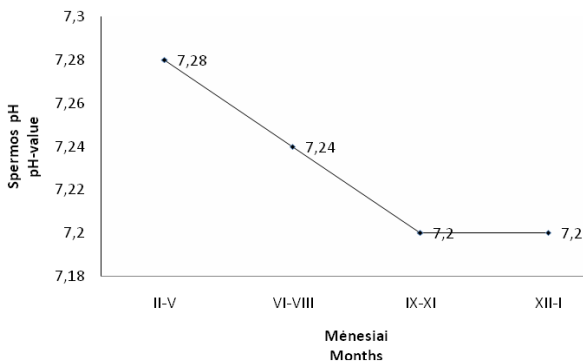
Metų sezonas neturėjo ženklios įtakos spermos pH (2 pav.), bet turėjo įtakos ejakulianto tūriui bei spermatozoidų koncentracijai. Eržilų spermos pH metų bėgyje svyravo nuo 7,28 iki 7,21, tačiau atitiko fiziologines normas (6,8–7,7), dėl ko galima teigti, kad sezoniškumas spermos pH įtakos neturėjo ir išliko stabilus ištisus metus.

Ejakulianto tūris labiausiai sumažėjo rudenį – vidutiniškai iki 20,9 cm<sup>3</sup> (1 pav.), tačiau kitais metų laikotarpiais jis išliko palyginti stabilus ir svyravo tarp 27,4–27,8 cm<sup>3</sup>. Spermatozoidų koncentracija šviežioje spermoje mažiausia buvo birželio–rugpjūčio mėnesiais (3 pav.). Spermatozoidų judrumas (4 pav.) pavasarį buvo mažesnis (38 %) negu kitais laikotarpiais (54–59 %). Tai galima paaiškinti tuo, kad eržilus reproduktorius šeriant įvairiu metų laiku besikeičiančiais racionalais, spermos kokybė pablogėja. Stabilūs racionalai, kurie nesikeistų ištisus metus, nėra sudaromi, nors gera eržilų sveikata, normali gyvenimo trukmė, spermos kokybė daugiausia priklauso nuo kokybiškų pašarų, taisyklingo šėrimo ir tinkamo laikymo. Be to, eržilai dažnai naudojami ne tik spermos ėmimui bei kergimui, jie taip pat dalyvauja ir varžybose, kas savo ruožtu blogina gyvulio reprodukcinės savybės.



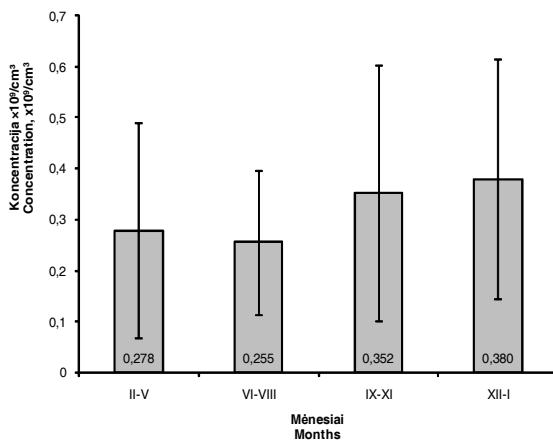
1 pav. Ejakulato tūrio priklausomybė nuo sezono (n=69)

Fig. 1. The effect of season on ejaculate volume (n=69)



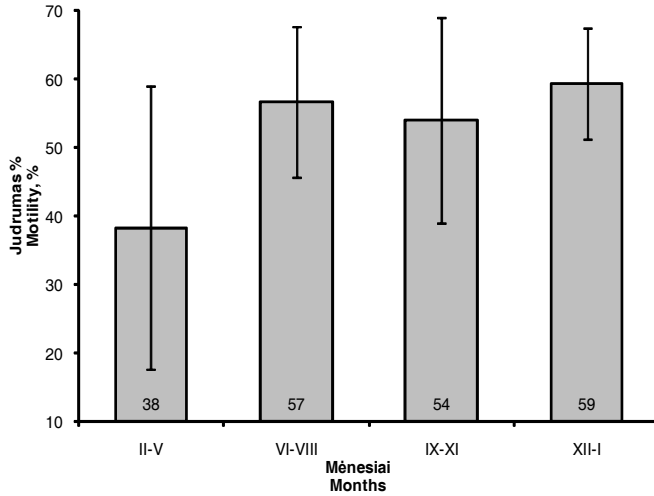
2 pav. Šviežios spermos pH priklausomybė nuo sezono (n=26)

Fig. 2. The effect of season on pH-value of fresh semen (n=26)



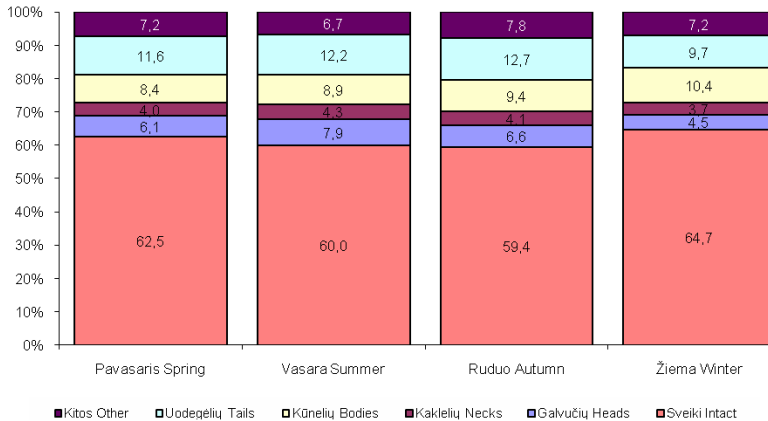
3 pav. Spermatozoidų koncentracijos šviežioje spermoje priklausomybė nuo sezono (n=69)

Fig. 3. The effect of season on sperm concentration in fresh semen (n=69)



4 pav. Spermatozoidų judrumo šviežioje spermoje priklausomybė nuo sezono (reikšmingi skirtumai,  $M \pm SD$ ;  $n=69$ )

Fig. 4. The effect of season on sperm motility in fresh semen ( $n=69$ )

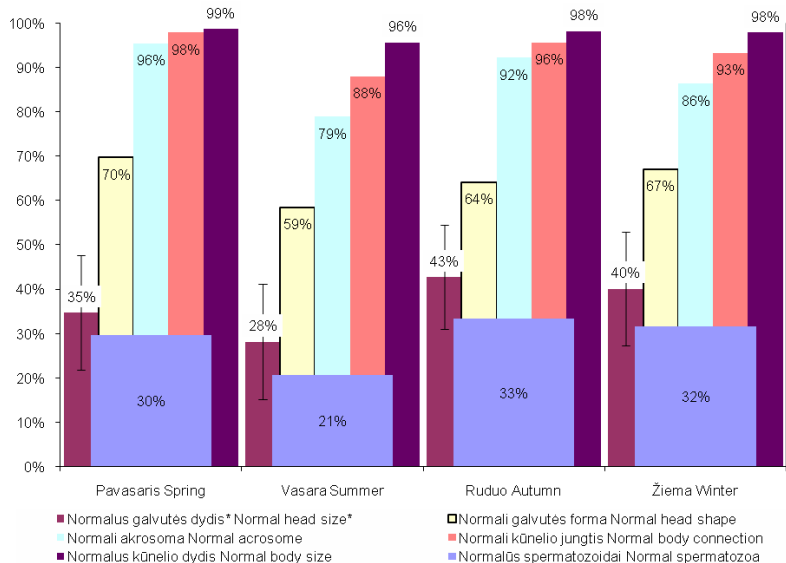


5 pav. Šviežios spermos, paimtos iš eržilų skirtingais sezonais, vizualus morfologinis vertinimas ( $n=25$ )

Fig. 5. Visual morphological analysis of fresh semen collected in different seasons ( $n=25$ )

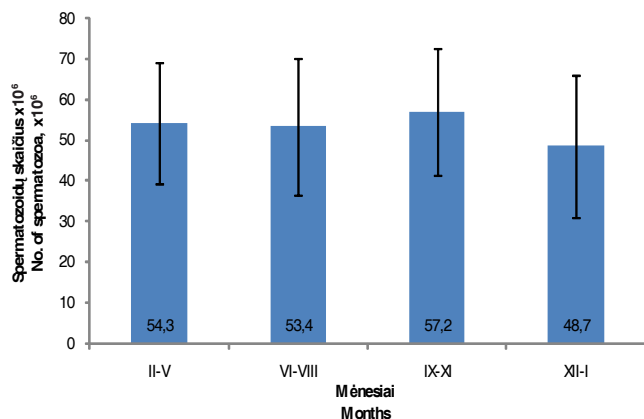
Vizualiai vertinant, morfologinis šviežios eržilų spermos vaizdas skirtingais sezonais nesiskyrė (5 pav.; normalių spermatozoidų buvo vidutiniškai 59–65 %). Reikšmingai skyrėsi spermatozoidų kiekis su normaliomis galvutėmis: vasarą jų buvo 21 %, o kitais sezonais – 30–33 % (6 pav.)

Nei gyvų spermatozoidų skaičius atšildytoje eržilų spermos dozėje (7 pav.), nei spermatozoidų judrumas po atšildymo (8 pav.) nepriklausė nuo sezono, ir buvo atitinkamai 53–57 mln. bei 20–23 %.



6 pav. Šviežios spermos, paimtos iš eržilų skirtingais sezonais, morfologinis vertinimas, programa SCA (\*reikšmingi skirtumai,  $M \pm SD$ )

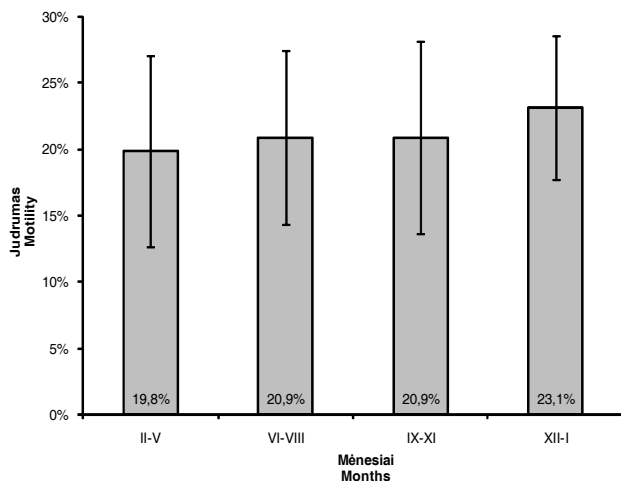
Fig. 6. Morphological analysis of fresh semen collected in different seasons, SCA program



7 pav. Gyvų spermatozoidų skaičius kriokonservuotos spermos dozėje (šiaudelyje) priklausomybė nuo sezono ( $n=109$ )

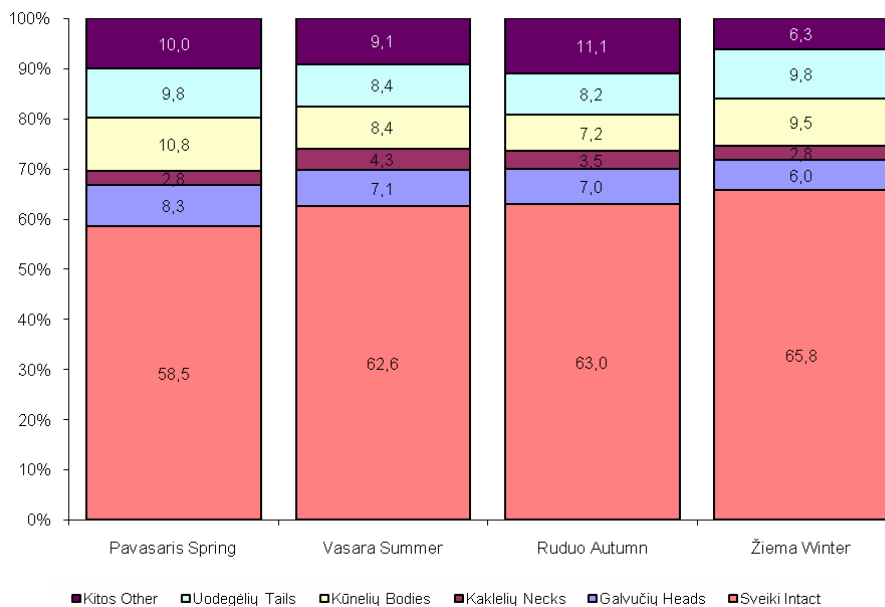
Fig. 7. The effect of season on the number of live spermatozoa in a semen dose ( $n=109$ )

Kaip ir šviežioje spermoje, vizualiai vertinant, morfologinis atšildytos eržilų spermos vaizdas skirtingais sezonais nesiskyrė (9 pav.; normalių spermatozoidų buvo vidutiniškai 59–66 %).



8 pav. Spermatozoidų judrumo atšildytoje spermoje priklausomybė nuo sezono (n=109)

Fig. 8. The effect of season on sperm motility in thawed semen (n=109)



9 pav. Atšildytos spermos, paimtos iš eržilų skirtingais sezonais, vizuali morfologinė analizė (n=25)

Fig. 9. Visual morphological analysis of thawed semen collected in different seasons (n=25)

## IŠVADOS

1. Ejakulianto tūris labiausiai sumažėjo rudenį, vidutiniškai iki 20,9 cm<sup>3</sup>, tačiau kitais metų laikotarpiais jis išliko palyginti stabilus ir svyravo nuo 27,4 iki 27,8 cm<sup>3</sup>.

2. Spermatozoidų judrumas pavasarį buvo mažesnis (38 %) negu kitais metų laikotarpiais (54–59 %).

3. Nei gyvų spermatozoidų skaičius atšildytoje eržilų spermos dozėje, nei spermatozoidų judrumas po atšildymo nepriklausė nuo sezono.

## Literatūra

1. Blanchard T., Varner D. Breeding with cooled transported equine semen: the advantages and success rate. *Veterinary Medicine*. 1998. No. 5. P. 275–279.
2. Blanchard T., Varner D. Breeding with cooled, transported equine semen: testing and preparing semen for travel. *Veterinary Medicine*. 1998. No. 5. P. 474–479.
3. Blottner S., Warnke C., Tuchscherer A. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*. 2001. Vol. 65. P. 75–78.
4. Borg K., Colenbrander B., Fazeli A. et al. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 1997. Vol. 48. P. 531–536.
5. Gahne S., Gonheim A., Malmgren L. Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*. 1998. Vol. 49. P. 1071–1074.
6. Graham J. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. 2001. Vol. 68. P. 239–247.
7. Heather A., Goolsby D., Elanton J. et al. Preliminary comparisons of a unique freezing technology to traditional cryopreservation methodology of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2004. Vol. 24. P. 314–318.
8. Hoffman B., Landesk A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal Reproduction Science*. 1999. Vol. 57. P. 89–98.
9. Janet F., Thum R., Niederer K. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*. 2003. Vol. P. 453–461.
10. Kavak A., Johannisson J., Lundheim N., et al. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*. 2003. Vol. 76. P. 205–216.
11. Lindsey A.C., Bruemmer J.E., Squires E.L. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science*. 2001. Vol. 68. P. 279–289.
12. Love C. Semen collection techniques. *Equine Practice*. 1992. Vol. 28. P. 111.
13. Malmgren L. Assessing the quality of raw semen. *Theriogenology*. 1997. Vol. 48. P. 523–530.
14. Malmgren L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. *Theriogenology*. 1998. Vol. 50. P. 833–839.
15. Pakėnas P. Gyvulių veisimosi biologija ir sėklinimas. V: Mokslas, 1985. P. 33.
16. Pakėnas P. Veislinių bulių laikymo ir naudojimo Lietuvos technologija. V: Academia, 1993. P. 21.
17. Saacke R.G. Semen quality in relation to semen preservation. *Journal of Dairy Science*. 1983. Vol. 66. P. 2635–2644.
18. Tischner M. Equine artificial insemination in Central and East Europe. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1992. No. 88. P. 111–1155.
19. Vidament M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 2005. Vol. 89. P. 115–136.

## **SEASONAL EFFECTS ON THE QUALITY OF STALLION SEMEN**

**Vidmantas Pileckas<sup>1</sup>, Algirdas Urbšys, Artūras Šiukščius, Jonas Kutra**

Institute of Animal Science of LVA,

*R. Žebenkos str. 12, LT-82317 Baisogala, Radviliškis distr., Lithuania*

### Summary

A study was carried at the Animal Reproduction Department of the LVA Institute of Animal Science and Vilnius Stud to determine the effects of the season on the physiological responses of fresh and preserved stallion semen. Qualitative and morphological parameters of fresh diluted and cryopreserved stallion semen were estimated. Semen freezing qualities were determined using stallion semen that met the requirements for fresh semen, i.e. the semen with the sperm motility not lower than 6 points (60 %) and concentration not lower than 0.15 mlrd./cm<sup>3</sup>. The study indicated that the season had no significant influence on the pH-value of semen, yet influenced the ejaculate volume and sperm concentration. Semen pH values ranged from 7.28 to 7.21 throughout the year, however, these values corresponded to the physiological standard (6.8-7.7).

The ejaculate volume was lowest in autumn (approx. 20.9 cm<sup>3</sup>), but in other seasons it remained comparatively stable and ranged from 27.4 to 27.8 cm<sup>3</sup>. The lowest sperm concentration in fresh semen was determined from June to August. Sperm motility was lower in spring (38 %) if compared with other seasons (54-59 %). Visual estimation indicated that the number of normal spermatozoa accounted for approximately 60-65 %. There was a significant difference in the number of spermatozoa with normal heads in different seasons: 21 % in summer and 30-33 % in other seasons. The season had no influence either on the number of live spermatozoa in a thawed semen dose (53-57 million) or on the post-thawed sperm motility (20-23 % spermatozoa with progressive movement).

**Key words:** stallions, semen quality, season

---

<sup>1</sup> Corresponding author. Tel. +370 422 65383, e-mail: vidmantas@lgi.lt

## ВЛИЯНИЕ СЕЗОНА ГОДА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЕМЕНИ ЖЕРЕБЦОВ

Видмантас Пиляцкас<sup>2</sup>, Альгирдас Урбшис, Артурас Шюкщюс, Йонас Кутра

Институт животноводства Литовской ветеринарной академии,  
*Р. Жебенкос ул. 12, LT-82317 Байсогала, Радвилишкский р-он, Литва*

### Резюме

Целью исследований было установить влияние сезона года на физиологические показатели свежего и криоконсервированного семени жеребцов. Работа выполнена в Институте животноводства Литовской ветеринарной академии и ЗАО „Vilniaus žirgynas“. Во время исследований установили, что сезон года не оказал влияния на pH семени, но влиял на объем и концентрацию эякулята. Наивысший объем эякулята был установлен осенью – 20,9 см<sup>3</sup>, а в остальные сезоны – 27,4–27,8 см<sup>3</sup>. Наименьшая концентрация неразбавленного семени жеребцов установлена в июне–августе. Самая низкая подвижность сперматозоидов отмечена весной (38 %), в остальные сезоны года – 54–59 %. При визуальной оценке нормальных сперматозоидов в среднем обнаружено 60–65 %. Количество живых и подвижных сперматозоидов в криоконсервированном семени после оттаивания не зависило от сезона года, и в среднем было 53–57 млн. в дозе при подвижности 20–23 %.

**Ключевые слова:** жеребец, качество спермы, сезонность

---

<sup>2</sup> Автор для переписки. Тел. +370 422 65383, e-mail: vidmantas@lgi.lt