

## LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY



*Neringa Sutkevičienė*

### FACTORS AFFECTING BOAR SEMEN QUALITY AND FERTILITY

Summary of doctoral dissertation  
Biomedical sciences, veterinary medicine (12 B)

Kaunas, 2008

The work was done in the Animal Reproduction Laboratory, in the Department of Noninfectious Diseases of Lithuanian Veterinary Academy and in the Department of Clinical Veterinary Sciences, Saari Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki (Finland).

#### **Research supervisor –**

Prof. Habil. Dr. Henrikas Žilinskas (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

#### **Research advisers:**

Acting Prof. Dr. Albina Aniulienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Prof. Dr. Bronius Bakutis (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

#### **Veterinary Medicine Science Council:**

##### **Chairman –**

Assoc. Prof. Dr. Vita Riškevičienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B).

##### **Members:**

Acting Assoc. Prof. Dr. Aloyzas Januškauskas (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Prof. Habil. Dr. Algimantas Matusevičius (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Dr. Jonas Kutra (LVA Institute of Animal Science, biomedical sciences, zootechny – 13 B);

Dr. Birutė Žilaitienė (Kaunas University of Medicine, biomedical sciences, medicine – 07 B).

##### **Opponents:**

Assoc. Prof. Dr. Eugenijus Aniulis (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12 B);

Prof. Habil. Dr. Ramutis Klimas (Šiauliai University, biomedical sciences, zootechny – 13 B).

Public defence of doctoral dissertation in Veterinary Science Council will take place at the Lithuanian Veterinary Academy I auditorium 1 p.m. on 26<sup>th</sup> of June, 2008.

Address: Tilžės str. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

The summary of dissertation has been sent on 26<sup>th</sup> of May, 2008, according to the confirmed address list.

The dissertation is available at the libraries of Lithuanian Veterinary Academy and LVA Veterinary Institute.

## LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA

*Neringa Sutkevičienė*

### VEIKSNIŲ ĮTAKA KULIŲ SPERMOS KOKYBEI IR APVAISINAMAJAI GALIAI

Daktaro disertacijos santrauka  
Biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina (12 B)

Kaunas, 2008

Disertacija rengta 2002–2008 metais Lietuvos veterinarijos akademijos Neužkrečiamųjų ligų katedros Gyvulių reprodukcijos laboratorijoje ir Helsinkio universiteto Veterinarijos fakulteto Saari padalinyje (Suomija).

#### **Mokslinio darbo vadovas –**

Prof. habil. dr. Henrikas Žilinskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

#### **Mokslinio darbo konsultantai:**

E. prof. p. dr. Albina Aniulienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Prof. dr. Bronius Bakutis (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

#### **Veterinarinės medicinos mokslo krypties taryba:**

##### **Pirmininkė –**

Doc. dr. Vita Riškevičienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B).

##### **Nariai:**

E. doc. p. dr. Aloyzas Januškauskas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Dr. Jonas Kutra (LVA Gyvulininkystės institutas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B);

Prof. habil. dr. Algimantas Matusevičius (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Dr. Birutė Žilaitienė (Kauno medicinos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 07 B).

##### **Oponentai:**

Doc. dr. Eugenijus Aniulis (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12 B);

Prof. habil. dr. Ramutis Klimas (Šiaulių universitetas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13 B).

Disertacija bus ginama viešame Veterinarinės medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2008 m. birželio 26 d. 13 val. Lietuvos veterinarijos akademijos I auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2008 m. gegužės 26 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą.

Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos veterinarijos akademijos ir LVA Veterinarijos instituto bibliotekose.

## INTRODUCTION

The quality of reproductive material is very important for pig reproduction. Sperm with high fertilization capacity can only be obtained from healthy and well-developed boars. Thus stable fertility results can be achieved when sperm quality is efficiently controlled.

Sperm used for AI must not be contaminated with pathological microorganisms. It has to be of high quality, fertilization capacity and genetic value. Sperm quality is not constant; there are a lot of factors that influence the health of reproductive animals, spermatogenesis, sperm qualitative and quantitative traits. Longer daytime length in spring, the genetic factors and intensive usage of breeder promotes spermatogenesis while the heat stress, low-quality and inferior feedstuff has a negative effect on sperm quality and sow reproduction (Johnson, 2000; Knox et al., 2003; Šermienė et al., 2005).

Sperm assessment techniques have considerably advanced in the recent decades – from morphological sperm analysis and subjective estimation of motility to modern research, when chromatin and membrane alterations are observed at the molecular level, and spermatozoa metabolism is assessed. Many techniques of sperm viability evaluation are based on determining the plasma membrane integrity. Most usually the fluorescent stains are used for the estimation of sperm viability. The stained spermatozoa can be evaluated with epifluorescence microscope (Althouse and Hopkins, 1995), automatic fluorometer (Halangk and Bohnensack, 1982; Alm et al., 2001) or flow cytometer (Garner and Johnson, 1995; Catt et al., 1997). Most of these techniques are expensive and depend on the researcher's skills and proficiency (Januskauskas and Zilinskas, 2002).

Boar sperm sampling, dilution and use for AI is a common practice all over the world. New technologies of boar sperm preparation such as freezing, spermatozoa separation by sex (sexation) are still uncommon in commercial insemination centres, hence it is of great importance to storage the diluted sperm as long as possible while preserving its quality and fertility results (Johnson, 1985; Harrison, 1997; Gadea, 2003; Roca et al., 2006). There are many commercial boar sperm diluents that differ in their individual features and sperm conservation period.

Feedstuff contaminated with mycotoxins is still an important problem in husbandry. Mycotoxins are biological toxins. It was established that mycotoxins have an immunosuppressive, carcinogenic, hepatogenic, mutagenic, nephrotoxic, neurotoxic, enterotoxic, photosensitizing, teratogenic, estrogenic and allergic effect on a living organism. Mycotoxin zearalenone, produced by *Fusarium* spp., causes the most extensive damage to animal reproduction, as it directly affects the reproductive system as an

estrogen antagonist. It has long been known that sows and gilts are sensitive to this toxin (Long and Diekman, 1984; Osweiler, 1992; Diekman and Green, 1992; Malekinejad et al., 2005). However little is known about the effect that zearalenone and its metabolites have on the boar reproductive system, and the available results are quite contradictory.

**Aim of the research** – to assess the factors that influence boar sperm quality and their fertility results.

### Objectives:

1. To compare the Danish Landrace and Duroc boar sperm quality and sow fertility results.
2. To analyse the influence that boar age and season has on the Danish Landrace and Duroc boar sperm quality, and sow fertility results.
3. To compare spermatozoa viability results assessed with three different techniques.
4. To estimate the impact of semen diluent to Finnish Landrace boar spermatozoa viability, motility and sow fertility results.
5. To establish the impact that the feedstuff contaminated with mycotoxin zearalenone has on boar sperm quality, testicle tissues and the amounts change of enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST).

### Novelty of the research:

Three different techniques for the evaluation of boar spermatozoa viability were estimated.

The effect of diluents X-CELL and MR-A to boar spermatozoa viability and motility was determined.

The impact of feedstuff contaminated with mycotoxins on boar testicle tissues and the amounts change of enzyme ALT and AST in blood serum was estimated.

## MATERIALS AND METHODS

The experiments of the trial No. 1 were conducted in the pig breeding farm and in the Animal Reproduction Laboratory, the Department of Non-Infectious Diseases of the Lithuanian Veterinary Academy, in the years 2002 – 2004. Semen samples from 43 selected boars (21 Danish Landrace and 22 Duroc) were examined for a period of 24 months. The semen was collected for averagely 3 times every 2 weeks. After collecting the boar ejaculates first the sperm color and consistence was evaluated, then the vol-

ume was measured (milliliters). Spermatozoa motility was estimated using a phase contrast microscope (Olympus BH2, Olympus Optical Co., Ltd., Japan, magnification 200 x) with a heating table. Single drop of sperm would be dripped on a prewarmed (37°C) glass slide with a sterile stick and then covered with a warm cover glass (18 mm × 18 mm). Subjective spermatozoa motility was evaluated by defining the percentage of motile spermatozoa in the five microscope's fields of view.

Concentration of spermatozoa was determined with phase contrast microscope (Olympus BH2, Olympus Optical Co., Ltd., Japan, magnification 200 x) with Gorjaev camera (Pakénas, 1985).

In order to evaluate sperm head pathologies the spermatozoa were stained with carbol-fuschin eosin stains as defined by Williams (Williams and Savage, 1925). For the estimation of sperm tails Hancock's method (wet samples) was used (Hancock, 1956).

For the experiment the boars were divided into four groups based on their age range. The first group consisted of boars that were from 9 to 14 months of age, the second group: 15 to 20, the third: 21 to 26, the fourth: 27 to 32 months.

In order to evaluate boar fertility 90 primiparous sows (Lithuanian White x Danish Landrace, LW×DL) were selected and twice inseminated with a fresh diluted sperm: on the rutting day and the next day with the same boar's diluted sperm.

The estimated fertility results were: the non-return rate (%) and the number of live piglets per farrow.

The trial No.2 was done in the Department of Clinical Veterinary Sciences, Saari Unit, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.

Semen of 45 selected boars (Finish Landrace) was examined for a period of two months. All boars were used for AI. Fertility data was obtained from the Agricultural Data-Processing Centre Ltd., Vantaa, Finland. Fertility was determined by the non-return rate within 60 days from the first insemination and the litter size of first primiparous and multiparous farrowings. Only those boars that were used for at least 50 first inseminations in recorded herds and those that had ≥12 litters recorded farrowings at the time of statistical analysis, were included. Semen samples were collected within the regular collecting schedule: once a week at the station. For the analysis semen was diluted with X-CELL (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, France) and MR-A (KUBUS, S.A., Spain) extender and placed into 90-ml plastic tubes. One AI dose was divided into 2 aliquots and stored at 17°C in Unitron climate box (Unitron Scandinavia S/A) in closed plastic tubes until examination. Analysis of the sperm motility and plasma membrane integrity (viabil-

ity) was conducted at 24h and after 168h storage.

For morphological evaluation, semen smears were stained using Giemsa staining method according to Watson. 200 spermatozoa were examined. The sperm concentration in each insemination dose was determined using a Bürker counting chamber (Fortuna, Germany). Sperm motility was evaluated both subjectively and with a computer-assisted semen analyzer (CASA) (Sperm Vision Minitube™ of America, Inc., 2002). For the analysis, a 300-μl aliquot of the thoroughly but gently mixed semen sample was placed into an open 3-ml tube. The tube was kept in a 35°C water bath (Grants Instruments Ltd., Cambridge, UK) for 5 min before semen analyses. A 5-μl aliquot was placed on a prewarmed 38°C microscope slide, covered with a coverslip (24 mm long × 24 mm wide × 1.5 mm high) and the proportion of progressively motile spermatozoa was recorded.

Calcein AM (CAM), propidium iodide (PI), and Hoechst 33258 (H258) dyes were purchased from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). One milligram of Calcein AM was diluted in 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Mallincrodt Bacer B.V.), mixed for 10 min, kept in the dark, and then stored in aliquots of 10 μl at -20°C. Twenty milligrams of propidium iodide (PI) were diluted in one litre of BTS (Beltsville Thawing Solution, Kubus S.A., Spain) and stored in aliquots of 3 ml at -20°C. Six milligrams of Hoechst 33258 were diluted in 200 ml of BTS, mixed for 30 min in the dark, and stored in aliquots of 2 ml at -20°C. Before use, the dyes were thawed in a dark chamber at 35°C (Thermax, B8000, Bergen, Norway).

Microscopic evaluation of plasma membrane integrity was carried out with a combination of two fluorescent stains, CAM and PI, according to Januskauskas and Rodriguez-Martinez. Instead of ethidium homodimer-1, PI was used. 10 μl of CAM (1 mg/ml) for a short period of time were mixed with 500 μl of BTS and 500 μl of PI (0.02 mg/ml) in BTS. For staining, 100-μl aliquots of semen were placed into 3-ml tubes, and 100 μl of CAM/PI solution was added. Further each sample was incubated for 10 min in the dark at 35°C. Subsamples of 5 μl of the stained suspension were placed on clean microscopic slides and carefully overlaid with coverslips. The smears were evaluated under an epifluorescence microscope (Olympus BH2 with epifluorescence optics, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) using 500× magnification. For each semen sample, 200 spermatozoa were differentiated into green (live) and red (dead) cell categories.

PI and Hoechst 33258 were used to measure the plasma membrane integrity in a fluorometer developed for reading the fluorescence output of 96-well plates (Fluoroscan Ascent, Thermo Labsystems Oy, Vantaa, Finland). Analysis was done in an incubation compartment at 32°C, according to Alm et al. 500-μl aliquots of fresh mixed semen were placed into 3-ml tubes and

closed for a short period of time. The tubes were rapidly frozen by directly immersing them into liquid nitrogen for 1 min. Then the tubes were kept at room temperature for 30 sec, before being placed in a 35°C water bath for 3 min to cause disruption of plasma membranes. For the analysis, equal 50- $\mu$ l aliquots of fresh mixed semen sample and PI were dispensed into the wells of the plate (Black Microtiter Plate 96 wells, Thermo Labsystems Oy, Vantaa, Finland) in three replicates. The plate was gently shaken for 2 min. Before the analysis, the plate had been incubated in the fluorometer for 8 min. Eleven samples and their blanks were analyzed simultaneously. The interference filter at the excitation path and the emission filter had maximum transmissions at 544 nm and 590 nm for PI, and 355 nm and 460 nm for Hoechst 33258, respectively.

Fluorescence viability was fixed. Percentage of fluorescence was calculated from the ratio of fluorescence intensities in the sample and in the rapidly frozen subsample, in relation to background fluorescence (blank), the blank being a combination of diluent and PI without spermatozoa and sperm plasma.

The experiments of the trial No.3 were accomplished in the Animal Reproduction Laboratory, the Department of Non-Infectious Diseases and in the pig-breeding centre. Biochemical blood analysis was done in the Large Animal Clinic laboratory. Histological examinations of testicle tissues were carried out in the Department of Infectious Diseases, LVA.

Mycotoxical feedstuff contamination was tested in the Mycotoxicology Laboratory, Department of Zoohygiene and Foodstuff Sanitation, LVA. The concentrations of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone, deoxinivalenol, T-2 toxin and ochratoxin were measured in feedstuff samples. Aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxinivalenol concentrations were estimated using a method of thin-layer chromatography as described in the Romer Labs. Inc. (Austria) approved methods. Concentrations of mycotoxins T-2 toxin and ochratoxin in composite feedstuffs were measured with immunoenzyme analysis (ELISA), using commercial Veratox® T-2 Toxin, Veratox® Ochratoxin (Neogen Europe, Scotland) kits. Toxin concentrations were determined in consonance with the producer's techniques. Mycotoxin concentration measures were ppm (mg/kg<sup>-1</sup>). Feedstuffs were periodically analyzed every three weeks. The concentrations did not vary during the experiment.

Six Danish Landrace boars were selected for the experiment and divided into groups: control (n=3) and experimental (n=3). The animals were kept in separate stalls and fed according to the state norms for AI boars (Jančienė, 2005).

Twice a day the boars were fed with high-quality composite feedstuff, as defined in the feeding norms (Leikus and Triukas, 1996; Jeroch et al., 2004)

and given water from automated watering systems. The trial period was divided into the preparatory (14 days) and the experimental (55 days). After the experimental period the boars were slaughtered and samples of their testicle tissues were taken for histological examination. Blood and sperm samples would be taken every five days at the time of the trial.

In the preparatory period all the boars were fed with high-quality composite feedstuff twice a day. Blood and sperm were analyzed three times prior to foddering with the feedstuff contaminated with mycotoxin zearalenone.

In the experimental period the boars were fed with the feedstuff containing mycotoxin (1.0 ppm). The boars would get approximately 4 ppm of zearalenone per day. The control boars were fed with high-quality composite feedstuff containing only traces of zearalenone (0.05 ppm).

The volume of ejaculate, spermatozoa concentration, motility and morphology was estimated as in the trial No.1. Sperm viability was determined with the hypoosmotic test (Vasquez et al., 1997) and staining spermatozoa with eosin-nigrosin (Dott et al., 1972).

The testicles were examined macroscopically, their size and weight was measured, and the form, position, sectional view's colour and consistency were estimated. After every sperm sampling blood samples for biochemical analysis were taken from the ear vein into glass tubes without coagulant. The samples were delivered into the laboratory within ½ – 1 hour. The separated blood serum was centrifuged at 3000 rpm. 2 ml of the centrifuged blood serum were transferred to Eppendorf-type 2-ml capped test tube, using 1 ml Paster pipette (Einweg-Pasteurpipetten, Carl Roth GmbH, Germany). The tubes with the serum were frozen and stored at -20°C until the experiment. The blood analysis was done with a computerized biochemical analyser *Hitachi 705* in the Large Animal Clinic, Clinical Research laboratory. *Roche* (Switzerland) reagents were used for the experiment. The concentrations of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were estimated in blood serum.

Statistical analysis was accomplished using *Microsoft Excel* (Microsoft Office Excel, 2003) and the version of the statistic package *SPSS No. 9* (SPSS for Windows 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 1989–1999). Statistical data analysis was done by descriptive statistics and using monofactorial analysis. Comparison among groups was made by *Post Hoc* multiple comparison method. Differences among groups were analyzed by LSD method. The data was considered to be statistically reliable when: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Correlation among dependent variables and strength of the direct relation was evaluated by Pearson and Spearman correlation matrixes.

## RESULTS OF INVESTIGATION AND DISCUSSION

There are a lot of factors that are important to the sperm quality and health of the breeders hence they influence animal reproduction. Boar age, breed, breeding conditions, feedstuff quality, frequency of sperm sampling – these is just few of many factors that effect sperm quality. The aim of this research was to estimate the factors that have influence on boar sperm quality and their fertility results.

In the first part of the experiment the analysis of some factor impact on Danish Landrace and Duroc boar reproduction was accomplished. Three factors that influence the whole organism, including the reproductive system, were selected: the boar breed, age and the season.

The boar breed's influence to the sperm qualitative and quantitative traits was analyzed. Significant correlation ( $p \leq 0.001$ ) was determined between the breed and the ejaculate volume, spermatozoa motility and concentration. It was established that Danish Landrace boar ejaculate volume was the highest ( $258.94 \pm 81.38$  ml), and the sperm concentration – the lowest ( $0.39 \pm 0.1$  billion/ml). Duroc boars have lesser volume ( $197.45 \pm 36.76$  ml), but higher sperm concentration ( $0.48 \pm 0.09$  billion/ml) in compare with the Danish Landrace boar ejaculate.

Duroc boar ejaculates are of lesser volume but their sperm concentration is higher in compare with the Danish Landrace boar ejaculates. Danish Landrace boar spermatozoa motility was 2.95 % higher then that of Duroc boars. Breed differences are statistically significant ( $p \leq 0.001$ ). Other researchers reported similar results (Kennedy and Wilkins, 1984; Dubiel et al., 1986; Contreras Acosta, 1987; Kommisrud et al., 2002).

Morphological evaluation of boar ejaculates showed that Duroc boar ejaculates were of worse quality than Danish Landrace boar ejaculates. Total concentration of pathological spermatozoa was higher in the Duroc boar ejaculates ( $20.06 \pm 13.73$  %). The concentration of spermatozoa with proximal and distal droplets and pathological pear-shaped heads was higher in Duroc boar ejaculates; also the concentration of spermatozoa with simple bent tails was higher in Danish Landrace boar ejaculates ( $p \leq 0.05$ ). Kondracki et al. (2006) reported of relatively high differences of spermatozoa with morphological alterations among different breeds. Our results confirm Huang et al. (2000) observation that Danish Landrace boar sperm is of better quality in compare with the Duroc or Yorkshire boar sperm in all seasons.

A lot of factors are important for sow reproductive performance: development of sow reproductive system, ovulation level, ovarian hypofunctions, hereditary factors, season of the year, climatic conditions, adaptation, illumination regime, improper work organization in farms, unbalanced feeding

of sows, stress, infectious diseases. Sperm quality is also very significant for the insemination (Jančienė, 2005; Kertenis et al., 2007). We have analyzed the fertility data of primiparous sows inseminated with Danish Landrace and Duroc boar sperm. It was noticed that the fertility was better when the sows were inseminated with Danish Landrace boar sperm rather than with Duroc boar sperm ( $p \geq 0.05$ ). The reason might be that Danish Landrace boar sperm is of better motility and higher quality.

After analyzing boar age importance it was established that is significant for the ejaculate volume ( $p \leq 0.001$ ). The research showed that ejaculate volume of young boars is not high but it increases as they mature. The highest ejaculate volume and the lowest spermatozoa concentration was diagnosed in the oldest boar group (27–32 months). The experimental results confirm other reports indicating that ejaculate volume increases with age, and spermatozoa concentration decreases (Šernienė, 2000).

This research showed that the highest percentage of spermatozoa with pathological tails was in 27–32 months of age Danish Landrace and Duroc boar sperm. The results coincide with other literature reports stating that the percentage of spermatozoa with pathological tails increases when the boars advance in age (Lotze, 1989; Huang and Johnson, 1996; Suriyasomboon et al., 2005).

Sows inseminated with 15–20 months old boar sperm had the highest non-return rate and the highest amount of alive-born piglets. The reason for it might be that 15–20 months old boars have better spermatozoa motility and higher sperm quality. Similar results are reported by Stemmler et al. (1982), stating that the percentage of pathological spermatozoa increases as the boar ages, thus the amount of fecundated sows and alive-born piglets per litter decreases.

Season had a significant effect on Danish Landrace and Duroc boar spermatozoa motility ( $p \leq 0.05$ ), but it was of no significance on ejaculate volume or spermatozoa concentration. Both Danish Landrace ( $p \leq 0.05$ ) and Duroc boar spermatozoa motility decreased in summer and autumn. Higher amounts of motile spermatozoa were identified in Danish Landrace boar ejaculates. Spermatozoa motility was the highest in springtime, and these results concur with Wettemann and Bazer (1985), Flowers (1997), Park and Yi (2002) reports which state that spermatozoa motility decreases during the hot weather months.

Seasonal impact on sperm qualitative traits was as an increase of percentage of pathological spermatozoa in both breeds' boar ejaculate in summer and in autumn. The possible reason is the heat stress that has a negative effect on spermatogenesis (Malmgren, 1989; Larsson, 1995; Šernienė et al., 2005). The lowest percentage of spermatozoa with pathological heads and

tails was in spring and winter. Other reports also indicate of sperm quality decline in the hot summer months (Huang et al., 2000; Suriyasomboon et al., 2005).

Negative seasonal effect on sow fertility results is the decreased non-return rate and higher amount of dead-born piglets when insemination was done in summer or in autumn in compare with the reproduction results when insemination was done in spring or in winter. Our results show that season had a significant impact on sow fertility results: LW×DL sows largely farrow in winter, and the results in summer and in autumn are worse. These results confirm the opinion that when inseminating sows in summer the mortality of embryos is higher and litter size is smaller (Trudeau and Sanford, 1986; Kertenis et al., 2007). Ciereszko et al. (2000) suggest that better sow performance during winter is determined by better sperm quality during the cold season.

The main sperm quality traits are spermatozoa membrane integrity (viability) and sperm motility. Spermatozoa motility depends on membrane integrity and the activity of its biosynthetic complex (Holt et al., 1997; Hoonstra et al., 2003). Therefore the evaluation of membrane integrity was selected as the main indicator of spermatozoa viability.

An integral plasma membrane is impermeable to such molecules as propidium iodide. When this dye is added to sperm, spermatozoa with integral plasma membrane do not get stained, and spermatozoa with defective plasma membrane get stained. Fluorescent dyes propidium iodide, calcein and Hoechst 33258 were used. The testing was done using different methods: subjective assessment of cells stained with a combination of calcein and propidium iodide under a microscope, and evaluation of cells stained with propidium iodide and Hoechst 33258 using an automatic fluorometer.

Calcein stains integral plasma membrane esterases making spermatozoa glow green (Johnsson et al., 1995; Januskauskas and Zilinskas, 2002), whereas propidium iodide and Hoechst 33258 affect cell nucleus. The dyes do not pass integral plasma membrane, only staining dead cells, so it is called an indicator of dead cells (Harrison and Vickers, 1990). Fluorescent dyes can be used in fluorescence microscopy, flow cytometry, fluorometry, etc. (Juonala et al., 1999; Adhikary et al., 2003; Gliozzi et al., 2003). These days fluorescence microscopy is often used for assessment of plasma membrane integrity. The cells are stained with dyes of live cells (calcein) and of dead cells (propidium iodide) at the same time (Fig.1). Then the cells are examined with a microscope. However the method is time-consuming, as one has to examine a lot of cells to get accurate results (Woelders, 1991). It is also very subjective and depends on technician's proficiency. Nevertheless fluorescence microscopy has an advantage of direct evaluation of stain

distribution in various sperm organelles, membranes or their sections, while a fluorometer calculates spermatozoa viability automatically (Juonala et al., 1999).

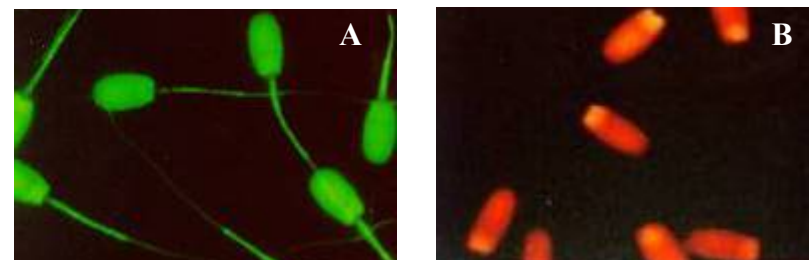


Fig. 1. Live (A) and dead (B) spermatozoa

Assessment of plasma membrane integrity with an automatic fluorometer is a fast and objective method. Several samples can be assessed at the same time; different fluorescent dyes can be used (Juonala et al., 1999; Alm et al., 2001). Propidium iodide and Hoechst 33258 were used to evaluate the plasma membrane integrity in the automatic fluorometer. Our results showed very similar numbers of live spermatozoa, when different fluorescent staining techniques were used, and the difference was statistically insignificant. According to Fraser (Fraser et al., 2002), their research results, when spermatozoa viability was assessed using different techniques, were similar. As there were no significant differences in results, we recommend testing of spermatozoa viability with a more simple and uncostly method of fluorescence microscopy.

Boar sperm sampling, dilution and use for insemination is a common practice all over the world. As freezing of boar sperm is still unusual in commercial insemination centres, it is of great importance to storage diluted sperm as long as possible while preserving its quality and fecundative ability (Johnson, 1985; Harrison, 1997). In our research we intended to compare two different long-term diluents X-CELL and MR-A, unfortunately, the quantitative composition of the media is unknown due to commercial interests (Gadea, 2003).

The results showed that spermatozoa viability assessed with a microscope (CAM/PI) and with an automatic fluorometer (propidium iodide PI), was higher in samples with MR-A than with X-CELL diluent (Fig. 2). Sperm motility is a very important sperm quality indicator (Britt et al., 1999; Shipley, 1999). The motility studies of stored semen can never be replaced entirely by aforementioned fluorescence viability studies, because semen

stored in an improper diluent can also show good fluorescence viability results, although the sperm are totally immotile at examination (Fraser et al., 2002; Juonala et al., 1999). Sperm motility does not prove its viability as spermatozoa in diluent might be in anabiosis and thus immotile (Althouse, 1997 a, b). Therefore the techniques are coherent and complementary (Johnson et al., 2000).

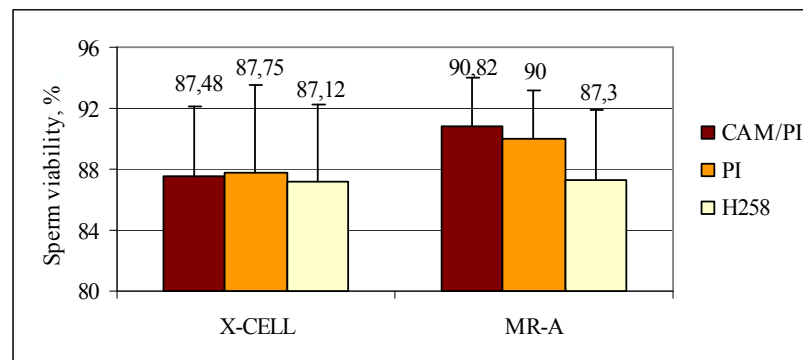


Fig. 2. Spermatozoa viability in samples with MR-A and X-CELL diluents assessed with different techniques on the first day

Sperm motility was assessed both with a light microscope and a computer-assisted semen motility analyser. Microscoping revealed subjective sperm motility and computer-assisted semen motility analyser showed progressive sperm motility. Motility of fresh sperm, diluted with long-term diluents (1D) was approximately 5 % higher than motility of sperm that was stored for 7 days at 17°C. Various researchers report about the decrease of sperm motility after long-lasting storage (Juonala et al., 1998; Juonala et al., 1999; De Amborgi et al., 2006).

Subjective sperm motility assessment with a light microscope is simple, it doesn't require a lot of labour expenditures, and therefore it is the main sperm test that is done in AI stations. However such assessment is very subjective and highly depends on technician's proficiency (Dunphy et al., 1989; Woelders, 1991; Vyt et al., 2004 b). Presently computer-assisted semen motility analysers are more frequently used for the objective sperm motility estimation. But this technique is still uncommon in AI stations because of the high costs (Verstegen et al., 2002).

Diluent did not have a significant effect on sow non-return rate and the amount of live piglets, but it was noticed that the fecundation results were

better when MR-A diluent was used. It might be explained by better sperm viability and motility results in samples with MR-A. The research revealed a significant correlation between the sperm viability and motility results, and sow non-return rate and the amount of live piglets, which confirms preceding reports (Xu et al., 1998; Juonala et al., 1999; Alm et al., 2006).

In the third trial we analysed the impact of feedstuff contaminated with mycotoxin zearalenone (1 ppm) on boar reproduction. Zearalenone is one of the most common fusariotoxins in Lithuania. It causes animal reproductive disorders. Of all animals swine are the most sensitive to zearalenone (Bakutis, 2004). The reports about its effects on adult boars are quite controversial. We experimented with adult boars and achieved the results, confirming the opinion that adult boars are not sensitive to zearalenone as long as the daily concentration in feedstuff is no more than 200 ppm (Ruhr et al., 1983).

Boars were fed with feedstuff contaminated with zearalenone for 8 weeks, i. e. for a longer period than the spermatogenesis cycle. No statistically significant correlation between alterations of sperm physiological traits and no differences in the control and the experimental group was observed. Young and King (1986) report that feedstuff containing less than 9 ppm had no negative effect on boar ejaculate volume and sperm motility.

No difference was established between the experimental group and the control group boars when the variation of the number of live spermatozoa during the trial was estimated. Tsakmakidis et al. (2006) observed that zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol reduce spermatozoa viability *in vitro*, but the report emphasizes that the effect of the toxin depends on the time period and dose.

Morphological sperm examination revealed no statistically significant correlation in the number of pathological spermatozoa between the control and the experimental group boar ejaculates. Similar result were reported by other authors, stating that zearalenone does not interfere with mature boar spermatogenesis and does not affect the sperm quality if the concentration in feedstuff is less than 60 ppm (Patience et al., 1995; Diekman and Green, 1992).

Metabolism of zearalenone takes place in liver (Malekinejad et al., 2006). The toxin suppresses metabolism of blood serum protein albumin, bile colours and cholesterol synthesis (Sutkevičius et al., 2000). Zearalenone toxicity to the liver can be estimated by examining it histomorphologically or by analysing the blood serum enzyme content.

In the trial we analysed the amounts of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in boar blood serum. The results showed that the concentrations of liver enzymes AST and ALT did not exceed the physiological norms, but the amounts of ALT in the experimental



group's boar blood serum were statistically significantly higher (Fig. 3). This implies that mycotoxin zearalenone might have an effect on boar organism. Reports of experiments with rats also mention the increased levels of ALT and AST in the blood serum of animals, directly injected with synthetic mycotoxin zearalenone (Maaroufi et al., 1996).

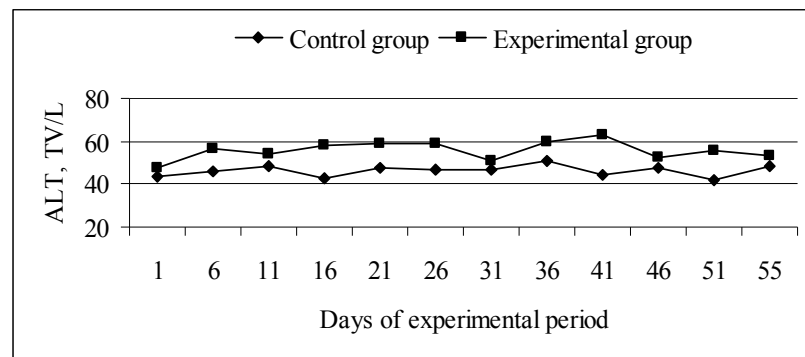


Fig. 3. Dynamics of ALT levels in the control and the experimental group boar blood serum during the experimental period

The results of the control and the experimental group boar testicles showed no statistically significant differences of testicles and epididymides weight between the groups. It concurs with the reports of Young and King (1986), stating that zearalenone does not affect adult boar testicles and epididymides if the doses are not high. The results showed that feedstuff's mycotoxin zearalenone (1 ppm) has no negative impact to adult boar testicle tissues and the sperm qualitative and quantitative traits. It can be stated that small doses of zearalenone (1 ppm) that are often present in contaminated feedstuff and cause sow reproductive disorders, do not interfere with adult boar reproductive function, yet it stimulates liver metabolic processes.

## CONCLUSIONS

1. The spermatozoa motility of Danish Landrace boars in compare with Duroc boars was better by  $2.95 \pm 0.8$  %, the ejaculate volume was higher by  $61.49 \pm 44.62$  ml, but the sperm concentration was lower by  $0.09$  bln/ml, and the total concentration of pathological spermatozoa was lower by  $8.47 \pm 0.01$  %. Boar breed had no significance on sow fertility results.

2. The highest ejaculate volume ( $349.23 \pm 89.2$  ml) and the highest total amount of pathological spermatozoa ( $14.2 \pm 13.61$  %) was in 27–32 months of age Danish Landrace and Duroc boar ejaculates ( $p \leq 0.001$ ) – respectively  $213.18 \pm 24.42$  ml and  $26.2 \pm 12.13$  %). Boar breed had no significance on sow fertility results.

3. Spermatozoa motility was the lowest ( $64.7 \pm 9.33$  %), and the amount of pathological spermatozoa was the highest ( $21.79 \pm 14.02$  %) in summer ( $p \leq 0.05$ ). When sows were inseminated with Danish Landrace boar sperm, the non-return rate was approximately 43 % lower in summer than in spring-time ( $p \leq 0.05$ ).

4. The boar spermatozoa viability was estimated with three different techniques, and neither was superior. Percentage of live spermatozoa was estimated microscopically using calcein/propidium iodide ( $87.48 \pm 4.68$  %), and with an automatic fluorometer using propidium iodide ( $87.75 \pm 5.83$  %) and Hoechst 33258 ( $87.12 \pm 5.06$  %). The results were similar ( $p \geq 0.05$ ).

5. Sperm viability results were better in samples with MR-A than in those with X-CELL diluent either assessed microscopically or with an automatic fluorometer with propidium iodide (respectively  $3.34 \pm 1.46$  % and  $2.25 \pm 2.64$  %). The spermatozoa motility was better by  $7.67 \pm 0.87$  in samples with MR-A than in those with X-CELL diluent ( $p \leq 0.05$ ).

6. The boars were fed with feedstuff contaminated with mycotoxin zearalenone (1 ppm) for 55 days, no testicle changes or negative impact on their sperm quality was observed. Prominently higher levels (by  $7.45 \pm 2.86$  TV/L) of the enzyme alanine aminotransferase (ALT) were observed in the blood serum of experimental boars ( $p \leq 0.001$ ).

## PROPOSALS

- We'd recommend estimation of spermatozoa viability using a simple and uncostly technique of fluorescence microscopy when the sample is stained with fluorescent dyes calcein and propidium iodide.
- To storage more viable and motile boar spermatozoa for a longer period of time we suggest diluting it with MR-A.

## REZIUOMĖ

**Darbo tikslas** – įvertinti veiksnius, turinčius įtakos kuilių spermos kokybei ir apvaisinamajai galiai.

### Uždaviniai:

1. Palyginti Danijos landrasų ir diurokų veislių kuilių spermos kokybę ir paršavedžių apvaisinimo rodiklius.
2. Ištirti kuilio amžiaus ir metų laiko įtakas Danijos landrasų ir diurokų veislių kuilių spermos kokybei ir paršavedžių apvaisinimo rodikliams.
3. Palyginti spermatozoidų gyvybingumo rezultatus gautus tiriant trimis skirtingomis metodikomis.
4. Įvertinti skiediklio įtaką Suomijos landrasų veislės kuilių spermatozoidų gyvybingumui, judrumui ir paršavedžių apvaisinimo rodikliams.
5. Ištirti mikotoksinu zearalenonu užteršto pašaro poveikį kuilių spermos kokybei, fermentų aspartato aminotransferazės (AST) ir alanino aminotransferazės (ALT) kitimui bei sėklidžių audiniams.

### Mokslinio darbo naujumas:

Įvertintos skirtingos spermatozoidų gyvybingumo tyrimo metodikos.  
Nustatytas skiediklių X-CELL ir MR-A poveikis kuilių spermatozoidų gyvybingumui ir jų judrumui.  
Įvertintas mikotoksinais užteršto pašaro poveikis kuilių sėklidžių audiniams ir fermentų ALT ir AST kiekio kitimui kraujo serume.

## TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Gyvulių reprodukciją įtakoja daugelis išorės ar vidinių veiksnių, turinčių didesnę ar mažesnę poveikį reproduktorių sveikatai ir spermos kokybei. Gyvulio amžius, veislė, laikymo sąlygos, pašaro kokybė, spermos ėmimo dažnis – tik keletas veiksnių, kurių poveikyje spermos kokybė kinta. Savo tiriamuoju darbu siekėme įvertinti veiksnius, turinčius įtakos kuilių spermos kokybei ir apvaisinamajai galiai.

Pirmojoje tyrimų dalyje buvo atlikta kai kurių veiksnių įtakos Danijos landrasų ir diurokų veislių kuilių reprodukcijai analizė. Tyrimui buvo pasirinkti trys, visas organizmo sistemas, tarp jų ir reprodukcinę, veikiantys veiksniai: kuilio veislė, amžius bei metų laikas.

Atlikus veislės įtakos analizę spermos kokybiniais ir kiekybiniais rodikliais, nustatyta reikšminga ( $p \leq 0,001$ ) kuilio veislės veiksnio įtaka ejakulato tūriui, spermatozoidų judrumui ir koncentracijai. Tyrimo metu nustatyta, kad Danijos landrasų veislės kuilių ejakuliatų tūris yra didesnis ( $258,94 \pm$

$81,38$  ml), o spermatozoidų koncentracija mažesnė ( $0,39 \pm 0,1$  mlrd./ml) nei diurokų veislės kuilių. Diurokų veislės kuilių ejakuliatų pasišėmimo mažesniu tūriu ( $197,45 \pm 36,76$  ml), tačiau didesne spermatozoidų koncentracija ( $0,48 \pm 0,09$  mlrd./ml), palyginti su Danijos landrasų veislės kuilių ejakuliatais. Spermatozoidų judrumas Danijos landrasų veislės kuilių ejakuliatuose buvo  $2,95$  proc. didesnis nei diurokų. Skirtumai tarp veislių statistiškai patikimi ( $p \leq 0,001$ ). Panašius tyrimo rezultatus yra gavę ir kiti tyrėjai (Kennedy and Wilkins, 1984; Dubiel et al., 1986; Contreras Acosta, 1987; Kommisrud et al., 2002).

Morfologiškai įvertinus tiriamųjų veislių kuilių ejakuliatų nustatyta, kad diurokų veislės kuilių ejakuliatų yra blogesnės kokybės nei Danijos landrasų veislės kuilių ejakuliatų. Diurokų veislės kuilių ejakuliatuose nustatytas didesnis bendras patologinių spermatozoidų kiekis ( $20,06 \pm 13,73$  proc.). Diurokų veislės kuilių ejakuliatuose nustatyta daugiau spermatozoidų su proksimaliniais bei distaliniais lašeliais ir patologinėmis kriaušės formos galvutėmis, o spermatozoidų su paprastai susisukusiomis uodegėlėmis daugiau užfiksuota Danijos landrasų veislės kuilių ejakuliatuose ( $p \leq 0,05$ ). Mokslininkas Kondracki su bendraautorais (2006) nustatė gana didelius spermatozoidų su morfologiniais pakitimais skaičiaus skirtumus tarp veislių. Mūsų tyrimo metu gauti rezultatai patvirtina Huang su bendraautorais (2000) nuomonę, kad Danijos landrasų veislės kuilių sperma visais metų laikais pasižymi geresne kokybe, palyginti su diurokų ar jorkšyrų veislių kuiliais.

Paršavedžių reprodukciniams produktyvumui turi įtakos daugelis veiksnių: paršavedžių lytinės sistemos išsivystymas, ovuliacijos lygis, kiaušidžių hipofunkcijos, paveldimi faktoriai, metų laikas, gamtinės klimatinės sąlygos, adaptacija, šviesos režimas, netinkamas darbo organizavimas ūkiuose, nesubalansuotas kiaušinių šėrimas, stresas, užkrečiamos ligos. O taip pat apvaisinimo rodikliams didelę reikšmę turi naudojamos spermos kokybė (Jančienė, 2005; Kertenis ir kt., 2007). Mūsų darbe buvo analizuojami pirmą kartą paršavedžių, sėklintų Danijos landrasų ir diurokų veislių kuilių sperma, sėklinimo duomenys. Pastebėta, kad apvaisinimas yra geresnis paršavedžių sėklinant Danijos landrasų nei diurokų veislės kuilių sperma ( $p \geq 0,05$ ). Tai galima paaiškinti geresniu Danijos landrasų veislės kuilių spermos judrumu ir geresne spermos kokybe.

Atlikus kuilio amžiaus veiksnio įtakos analizę nustatyta, kad amžius yra reikšmingas ejakulato tūriui ( $p \leq 0,001$ ). Tyrimais nustatyta, kad jaunų kuilių ejakulato tūris yra mažas, o jiems augant ir bręstant ejakulato tūris didėja. Didžiausias ejakulato tūris ir mažiausia spermatozoidų koncentracija nustatyta vyriausiojoje (27–32 mėnesiai) kuilių amžiaus grupėje. Tyrimo rezultatai patvirtina literatūroje pateikiamus duomenis, kad didėjant kuilių

amžiui ejakulato tūris didėja, o spermatozoidų koncentracija mažėja (Šernienė, 2000).

Tyrimo metu, daugiausia spermatozoidų su uodegėlių patologijomis nustatyta 27–32 mėnesių amžiaus Danijos landrasų ir diurokų veislių kuilių spermoje. Gauti tyrimų rezultatai patvirtina literatūroje nurodytus duomenis, kad kuiliams senstant spermatozoidų su pataloginėmis uodegėlėmis skaičius didėja (Lotze, 1989; Huang and Johnson, 1996; Suriyasomboon et al., 2005). Geriausiai apsivaisino ir daugiausiai gyvų paršelių atvedė paršavedės, sėklintos 15–20 mėnesių amžiaus kuilių sperma. Tai galima paaiškinti geresniu 21–26 mėn. amžiaus kuilių spermatozoidų judrumu ir spermos kokybe. Panašius rezultatus nurodo ir Stemmler su bendraautoriais (1982), teigdamas, kad didėjant kuilio amžiui daugėja pataloginių spermatozoidų skaičius, o kartu ir mažėja paršavedžių apsivaisinimo procentas bei atvestų gyvų paršelių skaičius vadoje.

Reikšminga metų laiko įtaka nustatyta Danijos landrasų ir diurokų veislių kuilių spermos spermatozoidų judrumui ( $p \leq 0,05$ ). Tuo tarpu ejakulato tūriui ir spermatozoidų koncentracijai metų laikas reikšmingos įtakos neturėjo. Metų laiko įtaka pasireiškė spermatozoidų judrumo sumažėjimu vasaros rudens mėnesiais tiek Danijos landrasų ( $p \leq 0,05$ ), tiek ir diurokų veislių kuilių spermoje. Daugiau judrių spermatozoidų nustatyta Danijos landrasų veislės kuilių ejakulatuose. Didžiausias spermatozoidų judrumas nustatytas pavasarį ir šie mūsų gauti rezultatai patvirtina Wettemann ir Bazer (1985), Flowers (1997), Park ir Yi (2002) gautus rezultatus, kurie nurodo spermatozoidų judrumo sumažėjimą karštais metų mėnesiais.

Metų laiko įtaka spermos kokybiniais rodikliais pasireiškė pataloginių spermatozoidų skaičiaus padidėjimu vasaros ir rudens mėnesiais abiejų veislių kuilių ejakulatuose. Tai siejama su karščio stresu, kuris neigiamai veikia spermatogenezę (Malmgren, 1989; Larsson, 1995; Šernienė ir kt., 2005). Mažiausi spermatozoidų su pataloginėmis galvutėmis bei pataloginėmis uodegėlėmis skaičiai nustatyti pavasario ir žiemos mėnesiais. Literatūroje taip pat nurodoma, kad spermos kokybė blogėja karštais vasaros mėnesiais (Huang et al., 2000; Suriyasomboon et al., 2005).

Neigiama metų laiko įtaka paršavedžių reprodukcijai pasireiškia mažesniu apsivaisinimo procentu ir didesniu atvestų negyvų paršelių skaičiumi sėklinant vasaros ir rudens mėnesiais, palyginti su reprodukcijos rezultatais sėklinant pavasarį ar žiemą. Mūsų tyrimų duomenimis, sezonas ženkliai paveikė paršavedžių apsivaisinimo rezultatus: LB×DL paršavedės apsivaisina ir daugiausia paršelių atveda žiemą, vasarą ir rudenį rezultatai būna prastesni. Mūsų tyrimo rezultatai patvirtina mokslininkų nuomonę, kad sėklinant paršavedes karštais vasaros mėnesiais būna didesnis embrioninis mirtingumas ir mažesnė vada (Trudeau and Sanford, 1986; Kertenis ir kt.,

2007). Ciereszko su bendraautoriais (2000) geresnį paršavedžių produktyvumą žiemos periodu sieja su geresne spermos kokybe šaltojo sezono metu.

Pagrindiniai spermos kokybės parametrai yra spermatozoidų membranos vientisumas, t.y. gyvybingumas ir spermos judrumas. Spermatozoidų gyvybingumas priklauso nuo spermatozoidų membranų vientisumo ir nuo jų biosintetinio komplekso aktyvumo (Holt et al., 1997; Hoonstra et al., 2003), todėl pagrindiniu spermatozoidų gyvybingumo indikatoriumi buvo pasirinktas spermatozoidų membranos vientisumo vertinimas. Vientisa plazminė membrana nepraleidžia į spermatozoidą medžiagų, tokių kaip propidium jodidas, todėl į spermą įdėjus šių dažų, spermatozoidai, turintys vientisas membranas nenusidažo, o tie kurių membrana suplyšusi, nusidažo tam tikros spalvos dažais. Šiam tikslui naudojome fluorescentinius dažus: propidium jodidą, kalceiną ir heochst 33258. Fluorescentiniai spermatozoidų tyrimai atlikti skirtingais metodais: subjektyviu, naudojant kalceino ir propidium jodido dažų derinį, mikroskopuojant ir automatinio fluorometru naudojant propidium jodido ir heochst 33258 dažus.

Kalceinas nudažo sveikų membranų estarazes ir spermatozoidas švyti žalia spalva (Johnsson et al., 1995; Januskauskas and Zilinskas, 2002). Tuo tarpu propidium jodidas ir heochst 33258 yra ląstelės branduolio dažai, kurie nepraeina sveikos ląstelės plazmos membranos, tad nudažo tik negyvas ląsteles, dėl ko ir vadinami mirusių ląstelių indikatoriais (Harrison and Vickers, 1990). Fluorescentiniai dažai naudojami fluorescentinėje mikroskopijoje, tekės citometrijoje, fluorometrijoje ir kt. (Juonala et al., 1999; Adhikary et al., 2003; Gliozzi et al., 2003). Pastaraisiais metais fluorescentinė mikroskopija plačiai naudojama plazmos membranų vientisumui nustatyti. Šis tyrimo metodas pagrįstas tuo, kad ląstelės vienu metu dažomos gyvų (kalceinu) ir negyvų ląstelių (propidium jodido) dažais, ir preparatas vetinamas mikroskopuojant. Tačiau šis tyrimo metodas ilgai užtrunka, nes norint gauti kuo tikslesnius rezultatus reikia įvertinti labai daug ląstelių (Woelders, 1991). Taip pat tai yra gana subjektyvus tyrimo metodas, priklausantis nuo techninio darbuotojo įgūdžių. Vis dėlto fluorescentinės mikroskopijos privalumas yra tas, kad galima tiesiogiai įvertinti dažų pasiskirstymą įvairiuose spermatozoido organoiduose, membranose ar tam tikrose jų dalyse, o fluorometro pagalba spermatozoidų gyvybingumas apskaičiuojamas automatiškai (Juonala et al., 1999).

Plazmos membranos vientisumo tyrimas automatinio fluorometru yra gana greitas ir objektyvus tyrimo metodas, vienu metu galima tirti keletą mėginių, naudoti įvairius fluorescencinius dažus (Juonala et al., 1999; Alm et al., 2001). Tiriant automatinio fluorometru naudojome negyvų ląstelių dažus: propidium jodidą ir heochst 33258. Mūsų tyrimo duomenimis, gyvų spermatozoidų skaičius, nustatytas skirtingais fluorescenciniais dažymo me-

todais, labai panašus, o skirtumas statistiškai nepatikimas. Mokslininkas Fraser su bendraautoriais (Fraser et al., 2002) tirdami spermatozoidų gyvybingumą skirtingomis metodikomis taip pat yra gavę panašius rezultatus. Nenustačius didelių ir patikimų skirtumų tarp gautų rezultatų, spermatozoidų gyvybingumą tirti rekomenduojame paprastesniu ir pigesniu fluorescencinės mikroskopijos metodu, naudojant gyvų ir negyvų ląstelių dažus.

Kuilių spermos ėmimas, skiedimais ir panaudojimas sėklinimui plačiai praktikuojamas visame pasaulyje. Kadangi kuilių spermos iššaldymas vis dar nėra naudojamas komerciniuose sėklinimo centruose, todėl labai svarbu kuo ilgiau išlaikyti atskiestą spermą išsaugant jos kokybę bei apvaisinamąją galią (Johnson, 1985; Harrison, 1997). Savo tyrimais norėjome palyginti du skirtingus ilgalaikius skiediklius: X-CELL ir MR-A, kurių sudėtis laikoma komercine paslaptimi, ir todėl, deja, nėra žinoma (Gadea, 2003).

Tyrimo rezultatai parodė, kad spermatozoidų gyvybingumas nustatytas mikroskopuojant (CAM/PI), ir automatinio fluorometru panaudojus propidium jodido dažus (PI), buvo aukštesnis mėginiuose su MR-A, nei su X-CELL skiedikliu. Didesnį gyvų spermatozoidų kiekį mėginiuose su MR-A skiedikliu yra nustatęs ir De Amborgi (2006) su bendraautoriais.

Spermos judrumas yra labai svarbus spermos kokybės rodiklis (Britt et al., 1999; Shipley, 1999). Spermatozoidų judrumo nustatymas negali būti pakeistas anksčiau minėtais fluorescenciniais gyvybingumo nustatymo metodais, todėl, kad spermatozoidai, laikomi „nešvariuose“ skiedikliuose, t.y. esant dideliame spermos mikrobiniame užterštumui, mikroskopuojant ar automatinio fluorometru naudojant fluorescencinius dažus nustatomi gyvybingi, kai tuo tarpu jie nustatomi visiškai nejudrūs mikroskopuojant (Fraser et al., 2002; Juonala et al., 1999). Taip pat spermatozoidų judrumas dar neįrodo jų gyvybingumo, nes skiediklyje laikomi spermatozoidai gali būti anabiozės būsenoje ir nejudėti (Althouse, 1997 a, b). Todėl šie tyrimai yra neatšiejami ir tik papildantys vienas kitą (Johnson et al., 2000).

Tyrimo metu spermos judrumą nustatinėjome šviesiniu mikroskopu ir kompiuteriniu spermos judrumo analizatoriumi. Mikroskopuojant buvo fiksuojamas subjektyvus spermos judrumas. Kompiuterinis spermos judrumo analizatorius fiksavo progresyvų spermos judrumą. Tyrimais nustatėme, kad šviežios ilgalaikiais skiedikliais skiestos spermos judrumas (1D) būna apie 5 proc. didesnis nei tiriant po septynių dienų, spermą laikant 17°C temperatūroje. Spermatozoidų judrumo sumažėjimas, laikant spermą ilgesnį laiką, literatūroje taip pat plačiai aprašytas (Juonala et al., 1998; Juonala et al., 1999; De Amborgi et al., 2006).

Subjektyvus spermos judrumo tyrimas šviesiniu mikroskopu nėra sudėtingas, nereikalauja didelių darbo sąnaudų, dėl to spermos judrumas yra pagrindinis spermos tyrimas atliekamas spermos ėmimo stotyse. Tačiau šis

spermos judrumo vertinimas yra labai subjektyvus, daugiausia priklausantis nuo techninio darbuotojo įgūdžių ir meistriškumo (Dunphy et al., 1989; Woelders, 1991; Vyt et al., 2004 b). Šiuo metu vis dažniau naudojami kompiuteriniai spermos judrumo analizatoriai objektyvesniam spermos judrumui įvertinti. Tačiau spermos ėmimo stotyse šis metodas vis dar nėra labai plačiai naudojamas dėl aukštų įkainių (Verstegen et al., 2002).

Daugiau tiesia eiga judrių spermatozoidų vertinant tiek subjektyviai, tiek kompiuteriniu spermos judrumo analizatoriumi nustatėme mėginiuose su MR-A skiedikliu.

Skiediklis paršavedžių apvaisinimo procentui ir gyvų paršelių skaičiui reikšmingos įtakos neturėjo. Tačiau pastebėjome, kad jas sėklinant MR-A skiedikliu gauti geresni rezultatai nei sėklinant X-CELL skiedikliu. Tai galima paaiškinti geresniais spermos gyvybingumo ir judrumo rezultatais mėginiuose su MR-A skiedikliu. O tyrimo metu nustatyta stipri koreliacija spermatozoidų gyvybingumo ir judrumo rezultatų ir paršavedžių apvaisinimo bei paršavedžių vados dydžio tik patvirtina ankstesnių autorių gautus rezultatus (Xu et al., 1998; Juonala et al., 1999; Alm et al., 2006).

Trečiuoju bandymu tyrėme mikotoksinu zearalenonu užteršto pašaro (1 ppm) poveikį kuilių reprodukcijai. Zearalenonas yra vienas dažniausiai Lietuvoje aptinkami fuzariotoksinų, sukeliantis gyvulių reprodukcinius sutrikimus. Iš visų žemės ūkio gyvulių zearalenonui jautriausios yra kiaulės (Bakutis, 2004). Apie suaugusių kuilių jautrumą šiam toksinui literatūroje pateikiami gana prieštaringi duomenys. Mes atlikome tyrimus su suaugusiais kuiliais. Gauti mūsų tyrimo rezultatai patvirtina kitų autorių teiginius, kad suaugę kuiliai nėra jautrūs mikotoksinui zearalenonui, jei jo paros dozės pašare neviršija 200 ppm (Ruhr et al., 1983).

Tyrimo metu kuiliai zearalenonu užkrėstu pašaru buvo šeriami 8 savaites, t.y. ilgiau nei per visą spermatogenezės ciklą. Statistiškai patikimų spermos fiziologinių rodiklių pakitimų ir jų skirtumų tarp tiriamosios ir kontrolinės grupių kuilių nenustatyta. Mokslininkai Young ir King (1986) taip pat nustatė, kad pašaras, kurio sudėtyje yra mažiau nei 9 ppm zearalenono, kuilių ejakulato tūriui ir spermatozoidų judrumui neigiamos įtakos neturi.

Išanalizavus gyvų spermatozoidų skaičiaus dozėje kitimą bandymo metu, gyvų spermatozoidų skaičiaus ejakulate skirtumas tarp tiriamosios ir kontrolinės grupių kuilių nenustatytas. Mokslininkas Tsakmakidis su bendraautoriais (2006), atlikęs tyrimus kuiliams, nustatė, kad *in vitro* sąlygomis zearalenonas ir  $\alpha$ -zearalenolis lemia spermatozoidų gyvybingumo sumažėjimą, tačiau taip pat pabrėžiama toksino poveikio priklausomybė nuo veikimo laiko ir dozės.

Morfologiškai ištyrus spermą didelių statistiškai patikimų patologinių

spermatozoidų kiekio skirtumų tarp kontrolinės ir tiriamosios grupių kuilių ejakuliatų nenustatyta. Panašius rezultatus gavo ir kiti autoriai, teigiantys, kad zearalenonas, kai jo pašare yra mažiau nei 60 ppm., suaugusių, lytiškai subrendusių kuilių spermatogenezės neblokuoja ir spermos kokybės neveikia (Patience et al., 1995; Diekman and Green, 1992).

Kaip jau minėta, mikotoksino zearalenono metabolizmas vyksta kepenyse (Malekinejad et al., 2006). Mikotoksinas zearalenonas slopina kraujo serumo baltymo albumino, cholesterolio sintezę ir tulžies dažų apykaitą kepenyse (Sutkevičius ir kt., 2000). Nustatyti zearalenono toksiškumą kepenims galima jas ištyrus histomorfologiškai arba nustatant fermentų kieki kraujo serume.

Bandymo metu tyrėme aspartato aminotransferazės (AST) ir alanino aminotransferazės (ALT) kieki kuilių kraujo serume. Ištyrus tiriamųjų ir kontrolinių kuilių kraujo serumą nustatėme, kad fermentų AST ir ALT kiekiai kraujo serume tiriamuoju metu neviršijo fiziologinių normos ribų. Tačiau nustatyti statistiškai patikimai aukštesni ALT kiekiai tiriamosios grupės kuilių kraujo serume. Tai leidžia manyti, kad pašare esantis mikotoksinas zearalenonas turi poveikį kuilių organizmui. Atliktų mokslinių tyrimų su žiurkėmis rezultatai taip pat parodė, padidėjusį AST ir ALT kieki tiriamųjų gyvūnų, kuriems buvo tiesiogiai injekuotas sintetinis mikotoksinas zearalenonas, kraujo serume (Maaroufi et al., 1996). Šio tyrimo rezultatai parodė, kad pašare esantis mikotoksinas zearalenonas (1 ppm) suaugusių kuilių sėklidžių audiniams, spermos kiekybiniais ir kokybiniais rodikliais neigiamos įtakos neturėjo. Galima teigti, kad zearalenonas tokiomis dozėmis (1 ppm), kurios dažniausiai randamos užkrėstame pašare, ir sukeliantis reprodukcinę sutrikimų kiaulaitėms, subrendusių kuilių reprodukcinės veiklos nesutrikdo, tačiau suintensyvina kepenų metabolinius procesus.

## IŠVADOS

1. Danijos landrasų veislės kuiliai, palyginti su diurokais, pasižymėjo  $2,95 \pm 0,8$  proc. geresniu spermatozoidų judrumu,  $61,49 \pm 44,62$  ml didesniu ejakuliatu tūriu, bet  $0,09$  mlrd./ml mažesne spermatozoidų koncentracija ir  $8,47 \pm 0,01$  proc. mažesniu bendru patologinių spermatozoidų kiekiu ejakuliate ( $p \leq 0,001$ ). Kuilių veislė paršavedžių apvaisinimui įtakos neturėjo.

2. Didžiausias ejakuliatu tūris ( $349,23 \pm 89,2$  ml) ir bendras patologinių spermatozoidų kiekis ( $14,2 \pm 13,61$  proc.) nustatytas 27–32 mėnesių amžiaus Danijos landrasų ir diurokų (atitinkamai  $213,18 \pm 24,42$  ml ir  $26,2 \pm 12,13$  proc.) veislių kuilių ejakuliatuose ( $p \leq 0,001$ ). Kuilio amžius paršavedžių apvaisinimui įtakos neturėjo.

3. Mažiausias spermatozoidų judrumas ( $64,7 \pm 9,33$  proc.) ir didžiausias patologinių spermatozoidų kiekis ( $21,79 \pm 14,02$  proc.) ejakuliatuose nustatytas vasaros periodu ( $p \leq 0,05$ ). Paršavedžių apvaisinimas, sklinant jas Danijos landrasų veislės kuilių sperma, vasarą vidutiniškai buvo 43 proc. mažesnis nei pavasarį ( $p \leq 0,05$ ).

4. Vertinant kuilių spermatozoidų gyvybingumą trimis skirtingais metodais, nepasiektas nė vieno pranašumas. Gyvų spermatozoidų skaičius nustatytas mikroskopuojant panaudojus kalceino/propidium jodido dažus ( $87,48 \pm 4,68$  proc.), automatinio fluorometru panaudojus propidium jodido ( $87,75 \pm 5,83$  proc.) ir heochst 33258 ( $87,12 \pm 5,06$ ) dažus, gautas panašus ( $p \geq 0,05$ ).

5. Spermatozoidų gyvybingumas mikroskopuojant ir automatinio fluorometru panaudojus propidium jodido dažus spermos mėginiuose su MR-A, nustatytas didesnis (atitinkamai  $3,34 \pm 1,46$  proc. ir  $2,25 \pm 2,64$  proc.) nei mėginiuose su X-CELL skiedikliu. Mėginiuose su MR-A spermatozoidų judrumas buvo  $7,67 \pm 0,87$  proc. geresnis nei mėginiuose su X-CELL skiedikliu ( $p \leq 0,05$ ).

6. Kuilius šeriant 55 dienas mikotoksinu zearalenonu (1 ppm) užterštu pašaru, jų spermos kokybės ir sėklidžių morfologinių pokyčių nenustatyta. Ženkliai kito ir buvo  $7,45 \pm 2,86$  TV/L didesnis ( $p \leq 0,001$ ) fermento alanino aminotransferazės kiekis tiriamosios grupės kuilių kraujo serume.

## PASIŪLYMAI

- Spermatozoidų gyvybingumą rekomenduojame tirti paprastu ir pigiu tyrimo metodu mikroskopuojant fluorescetine mikroskopu, nudažius preparatą fluorescentiniais kalceino ir propidium jodido dažais.
- Kuilių spermatozoidų gyvybingumo ir judrumo ilgesniam išsaugojimui rekomenduojame spermą skiesti MR-A skiedikliu.

## PASKELBTŲ STRAIPSNIŲ SĄRAŠAS

- Neringa Jankevičiūtė, Henrikas Žilinskas. Kai kurių veiksnių įtaka įvairių veislių kulių spermos kokybei. Veterinarija ir Zootechnika, 2002. T. 19 (41). P. 15–19.
- Neringa Sutkevičienė, Henrikas Žilinskas. Sperm morphology and fertility in artificial insemination boars. Veterinarija ir Zootechnika, 2004. T. 26 (48). P. 11–13.
- Neringa Sutkeviciene, Maria A. Andersson, Henrikas Žilinskas, Magnus Andersson. Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. Theriogenology, 2005. Vol. 63. P. 739–747.

## TRUMPAS GYVENIMO APRAŠYMAS

NERINGA SUTKEVIČIENĖ (Jankevičiūtė) gimė 1976 m. lapkričio 13 dieną, Pasvalio rajone, Talkonių kaime. 1995 m. baigė Pumpėnų vidurinę mokyklą. 1995–2000 m. studijavo Lietuvos veterinarijos akademijoje ir įgijo veterinarijos gydytojos kvalifikaciją, o 2002 m. įgijo ir Veterinarijos gydytojos Magistro kvalifikaciją. 2002 m. rugsėjo mėn. įstojo į doktorantūros studijas Neužkrečiamųjų ligų (buv. Akušerijos ginekologijos) katedroje. Doktorantūros studijų metais pagal SOCRATES/ERASMUS programą 2003 kovo 31 d. – liepos 1 d. laikotarpiu stažavosi Helsinkio universiteto Veterinarijos fakulteto Saari padalinyje (Suomija).

### Aktyvumas:

2003 m. sausio mėn. 22–23 dienomis dalyvavo mini-simpoziume „Farm animal reproduction – reducing infectious diseases“, kuris vyko Latvijos žemės ūkio universitete, Veterinarijos fakultete, Jelgavoje.

2003 m. liepos mėn. 8 d. dalyvavo konferencijoje „Kiaulių gydymas ir profilaktika dideliame auginimo sektoriuje“, kuri vyko Lietuvos veterinarijos akademijoje.

2003 m. rugsėjo mėn. 13–15 dienomis dalyvavo mini-simpoziume „Farm Animal Reproduction – Conserving Local Genetic Resources“, kuris vyko Lietuvos veterinarijos akademijoje.

2003 m. gruodžio mėn. 8–9 dienomis dalyvavo konferencijoje „Aukštesniųjų organizmų ir biotechnologijos plėtra ir perspektyvos Lietuvoje“ ir seminare „Gyvulininkystės būklė ir plėtra Lietuvos ir ES kontekste“, kurie vyko Vytauto Didžiojo universitete.

2004 m. gegužės mėn. 10–14 dienomis dalyvavo konferencijoje „Reproductive Endocrinology in Vertebrates“, kuri vyko Švedijos žemės ūkio

mokslų universitete, Uppsaloje.

2004 m. birželio mėn. 28 – liepos 2 dienomis dalyvavo NOVA-BOVA doktorantų kursuose „Methods in cell biology and cell culturing science“, kurie vyko Lietuvos veterinarijos akademijoje.

2004 m. spalio mėn. 14–15 dienomis dalyvavo mokslinėje konferencijoje „Animals. Health. Food Quality“, kuri vyko Latvijos žemės ūkio universitete, Veterinarijos fakultete, Jelgavoje.

2006 m. rugsėjo mėn. 21–22 dienomis dalyvavo tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „Gyvūnų mitybos, sveikatingumo ir produkcijos kokybės aktualijos“, skirtoje LVA 70-mečiui paminėti, kuri vyko Lietuvos veterinarijos akademijoje.

2006 m. lapkričio mėn. 6–11 dienomis dalyvavo NOVA doktorantų kursuose „Reproductive toxicology with emphasis on persistent endocrine disrupting chemicals in the environment“, kurie vyko Norvegijos veterinarijos mokykloje, Osle.

2007 m. rugsėjo mėn. 20–23 dienomis dalyvavo ESDAR organizuotoje konferencijoje, kuri vyko Celėje, Vokietijoje.

2008 m. gegužės mėn. 12–16 dienomis dalyvavo Švedijos žemės ūkio mokslų universiteto (CRU) ir Lietuvos veterinarijos akademijos (LVA) organizuotuose doktorantų kursuose „Morphological Techniques in Reproductive Biology“, kurie vyko Palangoje.

Maketavo R. Trainienė

Už teksto turinį ir redagavimą atsakingas autorius

Spausdino LVA Spaudos ir leidybos skyrius

Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas

Tiražas 50. \_\_\_\_\_ sp.l. Užs. Nr. \_\_\_\_\_. 2008