

## SKIEDIKLIO SUDĖTIES ĮTAKA BULIŲ SPERMOS KOKYBINIAMS RODIKLIAMS

Vidmantas Pileckas

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 2008-12-15

### SANTRAUKA

Darbo tikslas – nustatyti atskirų skiediklio komponentų kiekybinę įtaką spermatozoidų fiziologiniams rodikliams kriokonservuotoje spermoje.

Paimta ir įvertinta sperma (spermatozoidų judrumas ne mažesnis kaip 7 balai – 70% judrių spermatozoidų, koncentracija ne mažesnė kaip 0,8 mln.) buvo praskiesta skiedikliu. Sperma buvo skiedžiama du kartus. Pirmą kartą  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  skiedikliu santykiu 1:1 ir vėsinama 15 min  $19\pm 1^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Po to skiedžiama  $19\pm 1^{\circ}\text{C}$  skiedikliu iki reikiamos spermatozoidų koncentracijos. Sperma buvo fasuojama į  $0,25\text{ cm}^3$  polipropileno šiaudelius spermos išfasavimo ir užkimšimo automatu.. Šiaudeliai išdėstymo liniuote buvo sudedami į rėmelius, kurie vėsinti šaldytuve  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, išaldomi ant išaldymo įrenginio-skydo saugykloje KV6202. Spermai išaldyti naudotas laktozės-glicerino-kiaušinio trynio skiediklis susidedantis iš 11,5 g laktozės,  $5\text{ cm}^3$  glicerolio,  $20\text{ cm}^3$  kiaušinio trynio ir  $100\text{ cm}^3$  distiliuoto vandens (kontrolė-bazinis skiediklis), taip pat ruošti skiedikliai su 8, 9, 10, 10,5, 11,5 (kontrolė), 12 g laktozės – kiti skiediklio komponentai išliko tie patys. Sumaišyti buliaus ejakuliatu buvo dalijami ir skiedžiami atitinkamu laktozės kiekiu skiediklyje. Toliau sperma buvo fasuojama, atvėsinama ir išaldoma pagal tuos pačius technologinius procesus ir režimus. Nustačius tinkamiausią laktozės kiekį skiediklyje, išaldant spermą, išfasuotą lietuviškuose šiaudeliuose, papildomai buvo įdėta 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 mg natrio citrato. Nustatėme, kad geriausias spermatozoidų judrumas išaldant spermą, išfasuotą į  $0,25\text{ cm}^3$  polipropileno šiaudelius, buvo spermoje, praskiestoje skiedikliu su 10 ir 10,5 g laktozės /  $100\text{ cm}^3$ . Lyginant su kontrole, šis rodiklis buvo atitinkamai 5,9% ( $P < 0,025$ ) ir 3,9% ( $P > 0,1$ ) didesnis. Gyvų spermatozoidų 11% ( $P < 0,005$ ) mažiau aptikta skiediklyje su 12 g laktozės (lyginant su kontrole). Didžiausias spermatozoidų su nepažeistomis akrosomomis skaičius buvo spermoje, kriokonservuotoje panaudojant skiediklius su 10 ir 10,5 g laktozės/  $100\text{ cm}^3$ , – atitinkamai  $55,0\pm 7,8$  ir  $53,4\pm 11,9\%$ , kontroliniame skiediklyje su 11,5 g laktozės –  $51,8\pm 7,1\%$ . Spermatozoidų gyvybingumas po 5 h laikymo  $38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  temperatūroje buvo didžiausias spermoje, praskiestoje su 10, 5 g laktozės –  $2,9\pm 1,2$  balo, su 10 g laktozės –  $2,8\pm 1,6$  balo, t.y. atitinkamai 26%

( $P < 0,005$ ) ir 21,7% didesnis, lyginant su kontrole. Siekdami pagerinti spermos fiziologinius rodiklius, į skiediklį su 10,5 g laktozės papildomai įvedėme nuo 50 iki 400 mg natrio citrato, intervale kas 50 mg. Nustatėme, kad natrio citratas turi įtakos spermatozoidų judrumui ir išgyvenimo trukmei, tačiau neturi didesnės įtakos akrosomų išsaugojimui. Geriausias spermatozoidų judrumas po spermos išaldymo-atšildymo buvo tuo atveju, kai skiediklyje buvo 200 mg natrio citrato –  $5,7 \pm 0,1$  balo arba 35,7% ( $P < 0,001$ ) didesnis, gyvų spermatozoidų nustatyta 12,6% ( $P < 0,001$ ) daugiau, lyginant su kontrole.

**Raktažodžiai:** sperma, skiediklis, komponentai, kriokonservavimas

## IVADAS

Spermos kokybinius rodiklius didele dalimi apsprendžia reproduktoriaus šėrimo ir laikymo sąlygos [2, 14], aplinkos ir genetiniai faktoriai [20]. Dėl šių priežasčių ne visada pasiseka gauti geros kokybės spermą, todėl stengiamasi mažinti spermatozoidų kiekį sėklinimo dozėje [5, 22].

Kartu su spermatozoidais išskiriamas lytinių liaukų sekretas neigiamai veikia spermatozoidus, mažindamas jų gyvybingumą bei išgyvenimo trukmę. Spermatozoide daugiausiai vyksta katabolitiniai procesai, išsiskiria pieno rūgštis, kuri yra viena iš pagrindinių spermatozoidų žuvimo priežasčių. Todėl vienas iš svarbiausių uždavinių kriokonservuojant spermą – sukurti skiediklius, kurie ne tik padidintų spermos tūrį, bet ir apsaugotų spermatozoidus nuo neigiamų faktorių spermos praskiedimo, atvėsavimo bei išaldymo-atšildymo metu [15]. Kaip komponentai, į skiediklio sudėtį įeina neelektrolitai, elektrolitai, fosfolipidai, tiek gyvulinės, tiek ir augalinės kilmės [1, 4, 6, 8] antibiotikai. Visi komponentai turi būti netoksiški, apsaugoti spermatozoidus nuo šalčio smūgio ir agliutinacijos, išlaikyti pastovų pH ir osmosinį slėgį [3, 5, 6, 7, 16, 18, 21, 25]. Daugelio skiediklių sudėtis nežinoma (Laicipfos 478, Biociphos PLUS, TRILADYL Konzentrat). Jie pateikiami vartotojui, nurodant tik jų paruošimo būdus. Šie siūlomi skiedikliai palyginti brangūs, didina ruošiamos spermos savikainą [8, 12]. Yra rekomenduojama eilė skiediklių, kurių sudėtis žinoma, tačiau dažnai jie susideda iš daugelio komponentų, – tai apsunkina skiediklio paruošimą, be to, jie neduoda laukiamo efekto [13, 17, 23, 24]. Įtakos tam turi tai, kad skiedikliai kuriami pasirinktai spermos kriokonservavimo technologijai ir spermos išfasavimo formai, todėl mūsų darbo tikslas – nustatyti atskirų skiediklio komponentų kiekybinę įtaką bulių spermatozoidams, išaldant spermą polipropileno šiaudeliuose.

## TYRIMŲ SĄLYGOS IR METODAI

Darbas atliktas LVA Gyvulininkystės instituto Gyvūnų reprodukcijos skyriuje bei AB „Marijampolės regiono veislininkystė“. Bandyams naudota sperma, kurioje spermatozoidų judrumas – ne mažesnis kaip 7 balai (70%), koncentracija – ne mažesnė kaip 0,8 mlrd./cm<sup>3</sup>. Bandyto metu buvo naudojami sumaišyti ir padalinti to paties buliaus ejakuliatai.

Spermai atvėsinti buvo naudojamas termostatas, susidedantis iš korpuso ir elektrinės dalies. Į korpusą įstatomas stovas ir palaikoma  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  temperatūra. Į termostatą įde-

dama 500 cm<sup>3</sup> kolba su skiedikliu, naudojamu pirminiam spermos praskiedimui. Sperma buvo praskiedžiama du kartus. Pirmą kartą – 27±1°C skiedikliu santykiu 1:1 ir laikoma 15 min 19±1°C temperatūroje (aplinkos temperatūra). Po to praskiedžiama 19±1°C skiedikliu iki reikiamos spermatozoidų koncentracijos.

Sperma buvo fasuojama į 0,25 cm<sup>3</sup> šiaudelius spermos išfasavimo ir užkimšimo mašina. Šiaudeliai išdėstymo liniuote buvo sudedami į rėmelius, kurie vėsinti šaldytuve 240 min. 4±2°C temperatūroje, iššaldomi ant iššaldymo įrenginio-skydo saugykloje KV 6202. Siekiant geriau stabilizuoti temperatūrą spermos iššaldymo metu iššaldymo įrenginys buvo pagamintas iš vario. Prieš iššaldymą nuo saugyklos buvo nuimamas dangtis ir prie šono tvirtinamas metalinis stalėlis, ant kurio išdėstomos iš šaldytuvo išimtos dėžutės su rėmeliais. Ant saugyklos KV 6202 iššaldymo įrenginio vienu metu buvo sudedama iki 8 rėmelių su 1144 šiaudeliais. Temperatūra spermos iššaldymo metu saugyklose, iššaldymo įrenginyje ir šiaudeliuose buvo kontroliuojama elektroniniais termometrais TE-200 M arba ST-200 [19].

**Laktozės kiekio įtaka spermos fiziologiniams rodikliams.** Spermai iššaldyti naudotas laktozės-glicerino skiediklis, susidedantis iš 11,5 g laktozės, 5 cm<sup>3</sup> glicerolio, 20 cm<sup>3</sup> kiaušinio trynio ir 100 cm<sup>3</sup> distiliuoto vandens(kontrolė).Skiedikliui ruošti imta 8, 9, 10, 10,5, 11,5 (kontrolė), 12 g laktozės, kiti skiediklio komponentai ir jų kiekybinė sudėtis išliko tie patys. Sumaišyti buliaus ejakuliatai buvo dalijami ir skiedžiami su atitinkamu laktozės kiekiu skiediklyje. Toliau sperma buvo fasuojama, atvėsinama ir iššaldoma pagal tuos pačius technologinius procesus ir režimus.

**Natrio citrato kiekio įtaka spermos fiziologiniams rodikliams.** Į laktozės-glicerolio-kiaušinio trynio skiediklį papildomai buvo įdėta 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 mg natrio citrato. Bandymui buvo naudojami sumaišyti ir padalinti ejakuliatai, praskiesti skiedikliu su atitinkamu natrio citrato kiekiu. Po spermos iššaldymo-atšildymo buvo vertinami spermatozoidų fiziologiniai rodikliai. Taip pat išbandyti skiedikliai su įvairiais laktozės ir natrio citrato kiekiais, esant vienodam glicerolio ir kiaušinio trynio kiekiui (1 lentelė). Nustatytas optimalus laktozės bei natrio citrato kiekis skiediklyje, iššaldant spermą, išfasuotą į 0,25 cm<sup>3</sup> šiaudelius.

1 lentelė Laktozės ir natrio citrato kiekio įtaka spermos kokybiniams rodikliams														
Table 1. The effects of lactose and sodium citrate on semen quality														
Kiekis Content														
Laktozė g Lactose, g														
10	10	10	10,25	10,25	10,5	10,5	10,5	11	11	11	11,25	11,5	11,5	11,5
Natrio citratas mg Sodium citrate mg														
-	100	200	-	200	-	100	200	-	100	200	-	-	100	200

**Tyrimo duomenų biometrinis įvertinimas.** Duomenų sisteminiui ir analizei buvo naudotas biometrinis metodas. Sudarant imtį tyrimams buvo siekiama, kad ji būtų tipinė ir reprezentatyvi, atspindinti populiaciją (generalinę visumą). Imties statistikai išreikšti

buvo apskaičiuoti biometriniai požymių rodikliai. Parametrų ir statistikos skirtumams įvertinti buvo nustatytos imties paklaidos.

Biometriniais rodikliais apskaičiuoti buvo naudota skaičiuoklė EXCEL bei LVA Gyvulininkystės instituto skaičiavimo centre sukurta biometrinės analizės programa. Pagal tyrimų tikslus atskiriems požymiams buvo apskaičiuotos tokios biometrinių rodiklių grupės:

- poslinkio charakteristikai – paprastas aritmetinis vidurkis ir moda;
- sklaidos charakteristikai – variacijos rodikliai (maksimalios bei minimalios požymių reikšmės, variacijos amplitudė, vidutinis kvadratinis nuokrypis bei variacijos koeficientas);
- tyrimuose gautų rezultatų reprezentatyvumui įvertinti – aritmetinio vidurkio paklaida bei dviejų imčių aritmetinių vidurkių skirtumo patikimumas.

Atliekant atrankinius stebėjimus, tyrimuose gautos statistinės paklaidos daugumoje atvejų nuo vidurkio skyrėsi ne daugiau kaip 5%. Tai įrodo, kad bandymai buvo atlikti metodiškai teisingai.

Dviejų imčių tam tikro rodiklio vidurkio skirtumo patikimumui nustatyti buvo apskaičiuotas tikimybinis kriterijus  $t_d$ :

$$t_d = \frac{d}{m_d},$$

kur  $d = x_1 - x_2$  – vidurkių skirtumas;

$m_d = \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$  – vidurkių skirtumo paklaida.

Skirtumas  $d$  laikomas statistiškai patikimu, jei tikimybė  $P \leq 0,05$ . Ji įvertinta skaičiuoklės EXCEL TTEST funkcijos pagalba.

Tyrimų duomenys lentelėse ir paveiksluose yra pateikiami, nurodant požymių aritmetinį vidurkį ( $M$ ) bei jo paklaidą ( $m_x$ ). Kiti biometriniai rodikliai yra komentuojami bandymų medžiagos analizėje.

## REZULTATŲ APTARIMAS

Paimtus ejakuliatų po įvertinimo maišėme ir dalinome į 6 dalis, kurias skiedėme skiedikliu su 8, 9, 10, 10,5, 11,5 (kontrolė), 12 g laktozės/100 cm<sup>3</sup> skiediklio. Geriausias spermatozoidų judrumas buvo spermose, praskiestoje skiedikliu su 10 ir 10,5 g laktozės/100 cm<sup>3</sup> (2 lentelė).

Lyginant su kontrole, šis rodiklis buvo atitinkamai 5,9% ( $P < 0,025$ ) ir 3,9% ( $P > 0,1$ ) didesnis. Skiediklyje su 8 ir 9 g laktozės judrumas didesnis 1,9% ( $P < 0,4$ ), o skiediklyje su 12 g laktozės – 11,8% ( $P > 0,001$ ). Gyvų spermatozoidų 11% ( $P < 0,005$ ) mažiau aptikta skiediklyje su 12 g laktozės (lyginant su kontrole). Didžiausias spermatozoidų su nepažeistomis akrosomomis skaičius buvo spermose, kriokonservuotoje panaudojant skiediklius su 10 ir 10,5 g laktozės / 100cm<sup>3</sup> – atitinkamai 55,0±7,8 ir 53,4±11,9%, kontroliniame skiediklyje su 11,5 g laktozės – 51,8±7,1%. Spermatozoidų gyvybingumas po 5 h išlaikymo 38±0,5°C temperatūroje buvo didžiausias spermose, praskiestoje

2 lentelė. Laktozės kiekio įtaka į 0,25 cm<sup>3</sup> polipropilėninius šiaudelius (n = 40) išfasuotos spermos fiziologiniams rodikliams  
 Table 2. The effect of lactose content on physiological responses of semen packaged into 0.25 cm<sup>3</sup> straws (n=40)

Laktozės kiekis g/100cm <sup>3</sup> Lactose content, g/100cm <sup>3</sup>	Spermatozoidų rodikliai po atšildymo Sperm indicators after thawing			Spermatozoidų rodikliai po 5 h išlaikymo prie 38±0,5 °C temperatūros Sperm indicators after 5 h exposure at 38±0,5°C			
	Judrumas balais Motility, points	Gyvų spermatozoidų % Live spermatozoa, %	Nepažeistų akrosomų % Intact acrosomes, %	Judrumas balais Motility, points	Gyvų spermatozoidų % % Live spermatozoa, %	Gyvybingumas Survival	Absolūtus gyvybingumas Absolute survival
8	5,2±0,9	58,0±2,7	46,7±11,9	2,1±1,9	27,0±5,6	5,9±0,3	19,6±0,1
9	5,2±0,6	57,7±2,3	51,0±6,1	2,6±1,4	33,8±4,1	6,2±0,3	22,8±0,1
10	5,4±0,7*	57,2±1,9	55,0±7,8	2,8±1,6	33,8±3,9	7,3±0,3***	28,6±0,1****
10,5	5,3±0,8	56,5±2,8	53,4±12,0	2,9±1,2	36,3±4,2	7,5±0,6****	25,3±0,1
11,5 (kontr.) (Control)	5,1±1,0	55,7±3,7	51,8±7,1	2,3±1,3	26,5±5,8	6,9±0,2	20,8±0,1
12	4,5±1,2****	44,7±4,2***	42,9±5,2	2,3±1,5	30,0±5,8	6,7±0,8	21,4±0,1

\*P<0,025; \*\*\*P<0,005; \*\*\*\*P<0,001.

su 10,5 g laktozės – 2,9±1,2 balo, su 10 g laktozės – 2,8±1,6 balo; tai atitinkamai 26 ir 21,7% (P<0,005) daugiau, lyginant su kontrole. Ilgiausiai spermatozoidai išgyveno skiediklyje su 10,5 g laktozės – 7,5 h tai 8,7% ilgiau lyginant su kontrole. Pagal absoliutų gyvybingumą geriausi spermatozoidų rodikliai buvo skiediklyje su 10 g laktozės – 35,7% (P<0,001) didesni nei kontrolėje. Siekdami pagerinti spermos fiziologinius rodiklius, į skiediklį su 10,5g laktozės papildomai įvedėme natrio citratą nuo 50 iki 400 mg intervale kas 50 mg (3 lentelė).

Nustatėme, kad natrio citratas turi įtakos spermatozoidų judrumui ir išgyvenimo trukmei, tačiau neturi didesnės įtakos akrosomų išsaugojimui. Geriausias spermatozoidų judrumas po spermos išaldymo-atšildymo buvo tuo atveju, kai skiediklyje buvo 200 mg natrio citrato – 5,7±0,1 balo, 35,7% (P<0,001) didesnis, gyvų spermatozoidų nustatyta 12,6% (P<0,001) daugiau, lyginant su kontrole. Į skiediklį įdėjus 250 mg / 100 cm<sup>3</sup> natrio citrato, spermatozoidų judrumas sumažėjo 7,0% (P<0,01), lyginant su spermos, praskiestos skiedikliu su 200 mg natrio citrato, rodikliais, ir 26,2% (P<0,001) padidėjo, lyginant su kontrole (skiedikliu be natrio citrato). Akrosomos geriausiai išsisaugojo skiediklyje su 250 mg /100 cm<sup>3</sup> natrio citrato – 58,2±0,78 %, tačiau skirtumas buvo statistiškai nepatikimas, lyginant su kontrole. Po 5 h laikymo 38±0,5°C temperatūroje spermatozoidų judrumas spermoje, kriokonservuotoje panaudojus skiediklį su 10,5 g laktozės ir 200 mg natrio citrato, buvo du kartus didesnis nei kontrolėje ir siekė 3,1±0,1 balo.

Papildomai išaldėme spermą, praskiestą skiedikliais su 10–11,5g laktozės ir 100 bei 200 mg natrio citrato bei be jo (4 lentelė).

Skiediklis su 11,5 g laktozės / 100 cm<sup>3</sup> skiediklio nėra tinkamiausias praskiesti ir išaldyti spermą, išfasuotą į 0,25 cm<sup>3</sup> polipropileno šiaudelius. Šiuo atveju po išaldymo-

3 lentelė. Natrio citrato kiekio įtaka spermoms fiziologiniams rodikliams, išaldant į 0,25 cm<sup>3</sup> šiaudelius (n = 12) išfasuotą spermą su 10,5 g laktozės  
 Table 3. The effect of sodium citrate on semen physiological responses at semen freezing with 10.5 g lactose packaged into 0.25 cm<sup>3</sup> straws (n = 12)

Spermoms fiziologiniai rodikliai Sperm physiological responses								
Natrio citrato kiekis mg Sodu m citrate content, mg	Po atšildymo After thawing			Po 5 h išlaikymo 38±0,5°C After 5 h exposure at 38±0.5°C			Gyvybin-gumas Survival	Absoliutus gyvybin-gumas Absoliute survival
	Judrumas balais Motility points	Gyvų spermato-zoidų % Live sperma-tozoa, %	Sveikų akrosomų % Intact acroso-mes, %	Judrumas balais Motility points	Gyvų spermato-zoidų % Live spermatoz-oa, %	Sveikų akrosomų % Intact acroso-mes, %		
kontr. (Cont-rol)	4,2±0,1	46,7±1,5	56,3±1,6	1,5±0,3	20,6±1,3	32,6±1,1	18,6±1,0	6,7±0,3
50	5,0±0,3	52,8±1,0	56,2±1,1	1,8±0,2	18,1±0,3	32,4±1,3	21,6±1,5	7,2±0,2
100	5,0±0,2	52,2±0,9	57,7±1,3	2,0±0,3	28,0±0,8	33,5±1,0	22,5±1,6	7,8±0,3
150	5,2±0,3	57,1±1,7	57,9±1,6	2,3±0,2	28,4±0,7	31,2±0,7	25,0±1,2	8,3±0,3
200	5,7 ±0,1****	59,3±1,1	57,4±0,9	3,1 ±0,1****	32,7±1,0	31,1±0,8	33,9 ±0,4****	10,0 ±0,2****
250	5,3 ±0,1****	56,0±0,7	58,2±0,8	2,7±0,1	24,2±0,9	28,7±0,6	26,4±0,9	9,0±0,2
300	4,8±1,1	51,9±0,7	55,6±0,7	2,0±0,2	21,4±1,1	26,7±0,9	21,7±1,6	8,0±0,4
350	4,5±0,0	46,9±0,8	55,8±1,3	1,7±0,2	20,7±1,5	28,7±0,7	18,1±0,9	6,8±0,3
400	4,5±0,2	46,8±1,1	53,6±1,5	1,3±0,2	13,4±0,7	26,9±0,6	16,5±0,5	6,7±0,5

\*\*\*\*P<0,001.

4 lentelė. Spermoms, išaldytos su įvairiais laktozės ir natrio citrato kiekiais, fiziologiniai rodikliai  
 Table 4. Physiological responses of semen frozen with various contents of lactose and sodium citrate

Skiediklio sudėtis (n=24) Diluent composition (n=24)		Spermatozoidų judrumas po atšildymo Post-thaw sperm motility	Spermatozoidų judrumas po 5 h laikymo 38±0,5°C temperatūroje Sperm motility after 5 h exposure at 38±0.5°C	Absoliutus gyvybingumas Absolute survival	Gyvybingu-mas Survival
Laktozės kiekis g/100 cm <sup>3</sup> Lactose content, g/100 cm <sup>3</sup>	Natrio citrato kiekis mg/100 cm <sup>3</sup> Sodium citrate content, mg/100 cm <sup>3</sup>				
10	–	4,8±0,6	3,0±0,1	32,1±0,9	10,2±0,1
10	100	5,1±0,1	2,9±0,6	32,4±0,7	10,3±0,2
10	200	5,0±0,7	3,4±0,1	36,1±0,6	10,6±0,2
10,25	–	4,8±0,1	2,8±0,1	31,7±0,6	10,8±0,4
10,25	200	5,0±0,1	3,6±0,3	39,1±0,8	11,5±0,2
10,5	–	4,9±0,1	3,2±0,1	34,1±0,6	11,2±0,1
10,5	100	5,1±0,1	3,4±0,1	38,7±0,9	11,7±0,2
10,5	200	5,5±0,1**	3,9±0,1***	44,1±1,1****	12,9±0,1****
11	–	4,6±0,1	2,8±0,1	29,9±0,9	9,4±0,2
11	100	5,2±0,6	3,1±0,2	33,9±1,2	10,1±0,2
11	200	4,7±0,1	3,5±0,1	27,9±0,7	9,2±0,2
11,25	–	4,5±0,2	2,1±0,1	24,2±0,8	8,1±0,2
11,5 (kontr.) (Control)	–	4,5±0,1	2,1±0,1	23,9±0,4	8,4±0,2
11,5	100	4,4±0,1	2,3±0,1	25,5±1,1	8,8±0,2
11,5	200	4,5±0,1	2,0±0,1	24,7±0,6	8,5±0,2

\*\*P<0,01; \*\*\*P<0,005; \*\*\*\*P<0,001.

atšildymo bei po 5 h išlaikymo  $38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  temperatūroje gautas mažiausias spermatozoidų judrumas, įskaitant absoliutų gyvybingumą ir gyvybingumą. Papildomai į skiediklį su 11,5 g laktozės/100 cm<sup>3</sup> įdėjus 100 arba 200 mg natrio citrato, spermos kokybiniai rodikliai pakito neženkiai. Geriausi spermos rodikliai buvo tuo atveju, kai sperma buvo išaldyta skiediklyje su 10,5 g laktozės ir 200 mg natrio citrato. Siūlomas skiediklis yra ruošiamas vartojimui sekančia tvarka:

Į švarią sterilią, temperatūrai atsparią kolbą įpilamas reikalingas kiekis vandens, uždengiama ir virinama 20 min. Po to į 90–95°C karštą vandenį suberiama ir ištirpinama laktozė, supilamas glicerolis, išmaišoma, kolba uždengiama pergamentiniu popierium ir vandens vonioje virinama 10–15 min. Po to tirpalas atvėsina iki 28–30°C, įdedama sanuojanti medžiaga, kiaušinio trynys, paskiausiai įdedama 200 mg natrio citrato. Sukant kolbą, tirpalas kruopščiai išmaišomas.

Atlikę karvių sėklinimą kriokonservuota sperma, nustatėme, kad naujo skiediklio panaudojimas, lyginant su baziniu, apie 4,5% padidino karvių apvaisinimą (panaudota 50 tūkst. v.v. spermosano–3 dozė 100 cm<sup>3</sup> skiediklio) (5 lentelė).

5 lentelė. **Karvių apvaisinimo rezultatai priklausomai nuo panaudoto skiediklio**  
Table 5. **Fertilization of cows depending on the extender used**

Skiediklis Extender	Sanuojanti medžiaga Detergent	Sanuojančių medžiagų kiekis tūkst. v.v./100 cm <sup>3</sup> skiediklio Amount of detergent	Sėklinta karvių No. of cows	Apsvaisino karvių No. of fertilized	Apsvaisini- mo % Fecundation rate
LGK (kontrolė) (Control)	Spermosanas-3	50,0	222	116	52,3
LGCK	Spermosanas-3	50,0	192	109	56,8

## IŠVADOS

1. Geriausias spermatozoidų judrumas buvo spermoje, praskiestoje skiedikliu su 10 ir 10,5 g laktozės /100cm<sup>3</sup>. Lyginant su kontrole, šis rodiklis buvo atitinkamai 5,9 (P<0,025) ir 3,9% (P>0.1) didesnis. Spermatozoidų gyvybingumas po 5 val. laikymo  $38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  temperatūroje buvo didžiausias spermoje, praskiestoje su 10,5 g laktozės –  $2,9\pm 1,2$  balo arba atitinkamai 26% (P<0,005) didesnis, lyginant su kontrole. Ilgiausiai spermatozoidai išgyveno skiediklyje su 10,5g laktozės – 7,5 h, kas 8,7% daugiau, lyginant su kontrole.

2. Natrio citratas turi įtakos spermatozoidų judrumui ir išgyvenimo trukmei, tačiau nepadedą išsaugoti akrosomas. Geriausias spermatozoidų judrumas po spermos išaldymo-atšildymo buvo tuo atveju, kai į skiediklį su 10,5 g laktozės buvo įdėta 200 mg natrio citrato –  $5,7\pm 0,1$  balo, arba 35,7% (P<0,001) didesnis, gyvų spermatozoidų, esant tam pačiam laktozės kiekiui, nustatyta 12,6% (P<0,001) daugiau, lyginant su kontrole.

3. Naujas skiediklis, palyginti su baziniu, apie 4,5% padidino karvių apvaisinimą (panaudota 50 tūkst. v.v. spermosano–3 dozė 100 cm<sup>3</sup> skiediklio).

## Literatūra

1. Aisen E.G., Medina V.H., Venturina A. Cand post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 2002. Vol. 57. P. 1801–1808.
2. Alm K., Dahlbom M., Saynäjärvi M., Andersson S. Impaired semen quality of AI bulls fed with moldy hay: a case report. *Theriogenology*. 2002. Vol. 58. P. 1497–1502.
3. Aman R.P., Hammersted R.H. In vitro evaluation of sperm quality, an opinion. *Journal of Andrology*. 1993. Vol. 14. P. 397–406.
4. Anderson S., Harkness W., Akin Y. et al. Categorical data analysis of the effect on bull fertility of butylated hydroxytoluene addition to semen extenders prior to freezing. *Journal Dairy Science*. 1994. Vol. 77. P. 2302–2307.
5. Ballester J., Johannisson A., Saravia F. et al. Post-thaw viability of bull AI-doses with law-sperm numbers. *Theriogenology*. 2007. Vol. 68. P. 934–943.
6. Bousslau S., Brillard J., Marquant-de Guienne B. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 1998. Vol. 50. P. 699–706.
7. Chen Y., Foote R., Tobback C. et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen of different rates in egg yolk–tris and whole milk extenders. *Journal Dairy Science*. 1993. Vol. 76. P. 1028–1034.
8. Christensen P., Guo Z., Pedersen K. et al. The viability, motility and fertility of bovine semen frozen in triladyl and biociphos plus. *Proc. 4<sup>th</sup> Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction*. Prague, 2000, 23–24 November. P. 25.
9. Foote R. Bull sperm surface „craters“ and other aspects of semen quality. *Theriogenology*. 1999. Vol. 51. P. 767–776.
10. Foote R., Arriola J. Motility and fertility of bull sperm frozen–thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. *Journal of Dairy Science*. 1987. Vol. 70. P. 2642–2647.
11. Garner D., Thomas A., Gravance C. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*. 2001. Vol. 56. P. 31–40.
12. Gil J., Januskauskas A., Håård MCh. et al. Functional sperm parameters and fertility of bullsemen extended in Biociphos–Plus and Triladyl. *Reproduction Domestic Animal*. 2000. Vol. 35. P. 69–77.
13. Gil J., Lundeheim N., Soderquist L., Rodriguez H. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 2003. Vol. 59. Issue 5–6. P. 1241–1255.
14. Haugan T., Grohn Y., Kommisrud E. Effects of sperm concentration at semen collection and storage of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science*. 2007. Vol. 97. P. 1–11.
15. Karabinus D.S., Evenson D.P., Kaproth M.T. Effects of egg yolk–citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *Journal Dairy Science*. 1991. Vol. 74. P. 3836–3848.
16. Kominisrudd E., Graffer T., Steine T. Comparison of two processing systems for bull semen with regard to post–thaw motility and nonreturn rates. *Theriogenology*. 1996. Vol. 45. P. 1515–1521.
17. Lary J., Thomas J., DeLiberto. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2005. Vol. 64. P. 1898–1912.
18. Lindemann C.B., O’Brien J.A., Giblin F.J. An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bulls sperm models. *Biology of Reproduction*. 1988. Vol. 38. P. 114–120.



19. Pakėnas P. Veislinių bulių laikymo ir naudojimo Lietuvos technologija. V.: Academia, 1993. P. 57–58.
20. Stalhammar E., Janson L., Philipsson J. Genetic studies on fertility in AI bull. II. Environmental and genetic effects on nonreturn rates of young bulls. *Animal Reproduction Science*. 1994. Vol. 34. P. 193–207.
21. Van Wagendonk-De Leeuw A.M., Haring R.M., Kaal-Lansbergen L.M.T.E., Den Daas J.H.G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extender based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*. 2000. Vol. 54. Issue 1. P. 57–56.
22. Verberskmoes Steven, Van Soom Ann, Dewulf Jeroen. Low dose insemination in cattle with the Ghent device. *Theriogenology*. 2005. Vol. 64. P. 1716–1728.
23. Verberskmoes Steven, Van Soom Ann, Dewulf Jeroen. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*. 2005. Vol. 63. P. 912–922.
24. Watson P.F. The sauses of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000. Vol. 60–61. P. 481–492.
25. Zeng W., Terada T. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*. 2001. Vol. 55. P. 615–627.

*Gyvūnų reprodukcijos skyrius*

## THE EFFECTS OF DILUENT COMPOSITION ON THE QUALITATIVE INDICATORS OF BOVINE SEMEN

Vidmantas Pileckas<sup>1</sup>

Institute of Animal Science of LVA,

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

### Summary

The semen with the sperm motility of not lower than 7 points (70% motile spermatozoa) and concentration not lower than 0.8 million was diluted two times. The first dilution was at a rate of 1:1 with a diluent of 27±1°C and cooled for 15 minutes at 19±1°C. Afterwards, the semen was diluted with a diluent of 19±1°C up to the required sperm concentration. The semen was packaged into 0.25 cm<sup>3</sup> polypropylenic straws with the semen packaging and sealing machine. The straws were placed into racks and cooled in a refrigerator at 4±1°C, then frozen on the freezing device-shield in the container KV 6202. The lactose-glycerol-egg yolk extender was used for semen freezing. The control extender contained 11.5 g lactose, 5 cm<sup>3</sup> glycerol, 20 cm<sup>3</sup> egg yolk and 100 cm<sup>3</sup> distilled water. Also extenders with 8, 9, 10, 10.5 and 12 g of lactose were prepared with the other extender components remaining unchanged. Mixed bull ejaculates were divided and diluted with a corresponding lactose content in the extender. Afterwards, the semen was packaged, cooled and frozen on the basis of the same technological processes and regimes. After determination of the most suitable lactose content in the extender for semen packaging, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 mg of sodium citrate was added. Our study indicated that the highest sperm motility at semen packaging into 0.25 cm<sup>3</sup> polypropylenic straws was found in the semen diluted with the extender containing 10 and 10.5 g lactose / 100 cm<sup>3</sup>, and this result was 5.9% (P<0.025) and 3.9% (P>0.1) higher in comparison with the control extender. The percentage of live spermatozoa was 11% (P<0.005) lower when the extender containing 12 g lactose was used. The highest number of spermatozoa with intact acrosomes was found in the semen frozen with the extenders containing 10 and 10.5 g lactose / 100 cm<sup>3</sup>, this indicator was, respectively, 55±7.7% and 53.4±11.9% if compared with 51.8±7.1% when the control extender was used. Sperm viability after 5 h storage at 38±0.5°C was highest in the semen diluted with the extender containing 10.5 g lactose (2.9±1.2 points) and 10 g lactose (2.8±1.6 points). These results were, respectively, 26 (P<0.005) and 21.7% higher in comparison with the control extender. In order to improve the physiological responses of semen, sodium citrate from 50 to 400 mg, at an interval of 50 mg, was added into the extender containing 10.5 g lactose. Our study indicated that sodium citrate had influenced sperm motility and survival time but had no significant influence on acrosome survival. The highest post-thaw motility of spermatozoa was determined when the extender contained 200 mg sodium citrate (5.7±0.1 points), 250 mg / 100 cm<sup>3</sup> sodium citrate addition reduced sperm motility by 7.0% (P<0.015) in comparison with 200 mg / 100 cm<sup>3</sup> sodium citrate addition (P<0.001). However, sperm motility was 26.2% higher (P<0.001) if compared with the control extender without sodium citrate. The acrosomes were best preserved in the extender with 250 mg / 100 cm<sup>3</sup> sodium citrate (58.2±0.78%) but the difference was statistically insignificant. After 5 hour exposure at 38±0.5°C, sperm motility in the semen frozen with the extender containing 10.5 g lactose and 200 mg sodium citrate was twice higher than that with the control extender and made up 3.1±0.1 points.

**Keywords:** semen, extender, components, cryopreservation

---

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

## **ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЕМЕНИ БЫКОВ**

**Видмантас Пиляцкас<sup>2</sup>**

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

### **Резюме**

Для исследований использовалось семя быков с подвижностью сперматозоидов не менее 7 баллов и их концентрацией не менее 0,8 млрд. в 1 мл.

В связи с тем, что применяемая лактозо-глицерино-желточная (ЛГЖ) среда предназначена для замораживания семени в гранулах, провели исследования по ее усовершенствованию.

В опытах изучено влияние различных количеств лактозы: 8, 9, 10, 10,5, 11,5 (контроль) и 12 г на 100 см<sup>3</sup> бидистиллированной воды на физиологические показатели семени. Во все среды с различным количеством лактозы добавляли по 5 мл глицерина и 20 мл желтка куриного яйца.

Лучшие биологические показатели сперматозоидов после замораживания семени в соломинках были при использовании сред с 10 и 10,5 г лактозы: соответственно подвижность сперматозоидов (ППД) – 5,3±0,8 и 5,4±0,7 балла; эозинотрицательных сперматозоидов было 56,5±2,8 и 57,2± 1,9%; с неповрежденной акросомой – 53,4±12,0 и 55,0±7,8%. После 5-часовой выдержки при 38±0,5°C ППД было 2,8±1,6 и 2,9±1,2 балла, эозинотрицательных сперматозоидов – 33,8±3,9 и 36,3±4,2%, показатель абсолютной выживаемости (S) – 25,3±0,1 и 28,6±0,1 усл. ед., выживаемость в часах (ч) – 7,3±0,3 и 7,5±0,6. Эти показатели были выше по сравнению с контролем соответственно на 3,9–5,9, 1,4–2,7, 3,1–6,2, 21,7–26,1, 27,5–37,0, 21,6–37,5, 5,8–9,7% (P> 0,5 – P< 0,001).

Увеличение количества лактозы до 12 г или же снижение его до 9 и 8 г/100 см<sup>3</sup> воды ведет к снижению биологических показателей семени.

В последующих опытах изучено влияние разных доз натрия цитрата на биологические показатели замороженного-оттаянного семени. К 100 см<sup>3</sup> среды оптимального варианта (с 10,5 г лактозы) добавляли 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 и 400 мг натрия цитрата. Контролем служила среда без натрия цитрата.

Лучшие биологические показатели семени после оттаивания были при использовании среды с 200 мг натрия цитрата. По сравнению с контролем (при использовании среды без натрия цитрата) ППД было выше на 35,7% (P<0,001), эозинотрицательных сперматозоидов было больше на 12,6% (P<0,005), с неповрежденной акросомой – на 1,1% (P>0,5). После 5-часовой выдержки при 38±0,5°C

---

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

ППД было выше в 2 раза, эозинотрицательных сперматозоидов было больше на 12,1% ( $P < 0,005$ ), S – на 82,3% и ч – на 49,3% ( $P < 0,001$ ).

На основании результатов проведенных исследований была предложена лактозо-глицерино-цитратно-желточная среда (ЛГЦЖ), для замораживания семени быков в соломинках следующего состава: лактоза – 10,5 г, цитрат натрия – 0,2 г, глицерин – 5,0 см<sup>3</sup>, желток куриных яиц – 20 см<sup>3</sup>, вода бидистиллированная – 100 см<sup>3</sup>. Как saniрующий препарат применяли спермосан-3 в дозе 50,0 тыс. ЕД/ 100 см<sup>3</sup> среды.

**Ключевые слова:** семя быков, разбавитель, компоненты, замораживание