

# Ocena *in vivo* zdolności zapładniających plemników knura uwarunkowana składem rozcieńczalnika

Magdalena Bryła, Monika Trzcńska

Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy w Balicach

W ostatnich dziesięcioleciach sztuczne unasienianie jest szeroko stosowane przez większość hodowców i producentów trzody chlewnej. Stosowanie inseminacji loch zmniejsza koszty rozrodu, chroni przed rozprzestrzenianiem się chorób, zapewnia zadowalające wyniki w zakresie liczby urodzonych prosiąt i jakości cech użytkowych odchowanego potomstwa. O powodzeniu sztucznego unasieniania decyduje głównie jakość użytego nasienia i sposób jego przechowywania, gdyż nasienie jest idealnym medium dla wzrostu wielu mikroorganizmów, w tym bakterii. Zanieczyszczenia bakteryjne są rutynowo obserwowane podczas pobierania i przechowywania nasienia. Maroto-Martin i wsp. [6] podają, że w 62,5% świeżych ejakulatów i w 79% dawek inseminacyjnych wykazano obecność szczepów bakteryjnych. W nasieniu knurów większość zanieczyszczeń to bakterie Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae* [1], a typowe stężenie bakterii waha się między  $3,5 \times 10^3$  cfu/ml a  $3,5 \times 10^5$  cfu/ml. Jednak badania przeprowadzone przez Maroto-Martin i wsp. [6] wskazują, że użycie do inseminacji nasienia, w którym wykryto obecność  $3,5 \times 10^3$  cfu/ml bakterii *Escherichia coli* powoduje znaczące obniżenie wielkości miotu. Jednocześnie w badaniach przeprowadzonych przez Sepúlveda i wsp. [8] wykazano, że w nasieniu, w którym wykryto wysoką koncentrację bakterii obserwuje się statystycznie istotny spadek żywotności i ruchu postępowego plemników. Zanieczyszczenia bakteryjne są czynnikiem zmniejszającym ruchliwość plemników, skracającym czas przechowywania nasienia, zmniejszającym płodność, co powoduje straty ekonomiczne zarówno dla hodowców, jak i producentów trzody chlewnej [4]. Z tego powodu w praktyce inseminacyjnej powszechnie stosuje się suplementację rozcieńczalników odpowiednimi antybiotykami, które hamują wzrost drobnoustrojów patogennych [3, 7]. Nadal poszukuje się takich antybiotyków, które ograniczą wzrost drobnoustrojów, a nie spowodują obniżenia jakości i wartości biologicznej nasienia podczas jego przechowywania w stanie płynnym.

W Instytucie Zootechniki PIB przeprowadzono badania, których celem była modyfikacja składu rozcieńczalnika pozwalająca na konserwację nasienia knura przez okres 6 dni, bez obniżenia jego wartości biologicznej, z zastosowaniem nowych antybiotyków – florfenikolu i polimiksyny B. Antybiotyki te nie były dotychczas stosowane w konserwacji nasienia knura. Kryterium oceny zdolności zapładniającej plemników knura, konserwowanych w stanie płynnym w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach, była ocena *in vivo* na poziomie zarodków. Ocena jakości uzyskanych zarodków została przeprowadzona na podstawie morfologii, liczby komórek zarodka oraz częstości występowania zmian apoptotycznych na podstawie fragmentacji DNA i aktywności kaspazy-3.

Materiał doświadczalny stanowiło nasienie knurów oraz zarodki świni w stadium ekspandującej blastocysty. Do badań wykorzystano nasienie pochodzące od 5 knurów (4-5 ejakulatów od jednego knura) wykorzystywanych do inseminacji w Stacji Eksploatacji Knurów w Kleczy Dolnej. Knury utrzymy-

wano w standardowych warunkach zoohigienicznych i żywiono mieszanką pełnoporcjową, ze stałym dostępem do wody. Nasienie pobierano metodą manualną od knurów mieszańców międzyrasowych (pbz x wbp) o masie ciała  $265,3 \pm 7,2$  kg i w wieku  $18,4 \pm 0,9$  miesięcy. Do badań wykorzystano ejakulatory, w których stwierdzono 80% plemników o prawidłowej morfologii i ruchu postępowym powyżej 80%. Nasienie konserwowano w stanie płynnym przez okres sześciu dni, w temperaturze  $16^\circ\text{C}$ , w rozcieńczalniku Biosolwens Plus (kontrola – R0) oraz w rozcieńczalnikach R1 lub R2, w których 100 µg gentamycyny zastąpiono odpowiednio 100 µg florfenikolu lub 100 µg polimiksyny B. Oceny ruchliwości plemników oraz oceny zmian apoptotycznych wykonywano na nasieniu świeżym oraz w 3. i 6. dniu konserwacji. Oceny ruchliwości nasienia przeprowadzono przy zastosowaniu systemu CASA (Computer Assisted Semen Analysis Systems), określając ruch całkowity (TM%) oraz postępowy (PM%) plemników. Oceny zmian apoptotycznych przeprowadzono na podstawie zmian w przepuszczalności błony komórkowej plemników za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 (Vybrant Apoptosis Assay Kit#4, Molecular Probes, USA) i pomiaru mitochondrialnego potencjału transbłonowego ( $\Delta\Psi$ ) przy zastosowaniu barwnika JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzi-midazolyl-carbocyanine iodide; Molecular Probes, USA). Obserwację poszczególnych subpopulacji plemników (200 plemników na każdą próbkę) przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse E600 (Tokyo, Japan) przy użyciu odpowiednich filtrów. Fluorescencyjną ocenę jakości nasienia przeprowadzono na podstawie: odsetka plemników wykazujących zmiany apoptotyczne (YO-PRO-1+/PI-), odsetka plemników żywych (YO-PRO-1-/PI-), odsetka plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1+).

Statystyczną ocenę jakości nasienia opracowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, z wykorzystaniem oprogramowania komputerowego Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, USA). Istotność różnic pomiędzy średnimi w grupach szacowano stosując wielokrotny test Duncana (Duncan Multiple Range Test). Za istotne statystycznie przyjęto różnice pomiędzy parametrami na poziomie  $P < 0,01$ .

Uzyskane wyniki jakości konserwowanego nasienia przedstawiono w tabeli 1.

Nasienie w 6. dniu konserwowania przeznaczono do inseminacji loszek. Dawczyniami zarodków były 6-miesięczne loszki różnych ras, o masie ciała od 90 do 110 kg, utrzymywane w Stacji Badawczej Trzody Chlewnej Żerniki Wielkie. Zarodki uzyskiwano poprzez przepłukiwanie macicy uzupełnionym płynem PBS o temperaturze  $38^\circ\text{C}$ . Zarodki w stadium blastocysty ekspandującej oceniano po 3 godzinach od uzyskania, w kierunku zmian apoptotycznych, na podstawie stopnia fragmentacji DNA i aktywności kaspazy-3. Wyniki oceny zmian apoptotycznych przedstawiono w tabeli 2.

Z przeprowadzonych badań wynika, że statystycznie istotne różnice ( $P < 0,01$ ) w odsetku plemników o ruchu całkowitym pomiędzy kontrolą ( $55,2 \pm 4,6$ ), rozcieńczalnikiem R1 ( $64,7 \pm 6,3$ ) oraz rozcieńczalnikiem R2 ( $61,0 \pm 4,1$ ) obserwowano w szóstym dniu konserwowania nasienia. Jednocześnie, porównując odsetek plemników o ruchu postępowym (PM) pomiędzy zastosowanymi modyfikacjami rozcieńczalników, zaobserwowano najwyższą wartość w rozcieńczalniku zawierającym 100 µg polimiksyny B ( $57,3 \pm 6,3$ ).

W badaniach Althouse i wsp. [2] stwierdzono, że zanieczyszczenia bakteryjne mogą prowadzić do wzrostu odsetka plemników wykazujących zmiany apoptotyczne w trakcie przechowywania nasienia. Jednocześnie w badaniach własnych [3, 9] wykazano, że podczas konserwacji nasienia w stanie płynnym następuje wzrost odsetka plemników apoptotycznych wraz z czasem jego przechowywania. W przeprowadzonych badaniach najwyższy odsetek plemników apoptotycznych odnotowano w szóstym dniu konserwacji nasienia

Tabela 1

Ocena nasienia knura konserwowanego w stanie płynnym w rozcieńczalnikach R0, R1 i R2 w dniu pobrania (dzień 0) oraz w trzecim i szóstym dniu przechowywania

Rozcieńczalnik	Dzień	Metody oceny nasienia				
		CASA		JC-1	YO-PRO-1/PI	
		TM%	PM%	JC-1*	YO-PRO-1/PI*	YO-PRO-1/PI*
R0 (kontrola)	0	92,4 ±3,8	89,0 ±4,7	91,2 ±4,6	4,4 ±0,9	91,5 ±3,1
	3.	82,5 ±2,8	63,3 ±5,2	82,7 ±8,2	6,5 ±1,1	74,2 ±8,7
	6.	55,2* ±4,6	50,2* ±3,8	53,3* ±4,9	10,3* ±3,2	47,8* ±5,4
R1	0	98,4 ±1,8	92,7 ±6,3	95,5 ±4,2	4,0 ±0,9	92,3 ±4,8
	3.	81,1 ±3,9	77,5 ±3,3	76,5 ±7,5	5,1 ±1,0	78,8 ±8,9
	6.	64,7* ±6,3	62,5* ±4,5	62,9* ±6,1	6,3* ±3,6	57,48 ±7,1
R2	0	95,4 ±2,1	93,5 ±5,4	96,8 ±2,4	4,4 ±2,2	90,4 ±7,3
	3.	80,3 ±5,6	76,5 ±4,8	75,2 ±7,8	6,3 ±1,4	74,8 ±7,3
	6.	61,0* ±4,1	57,3* ±6,3	61,9* ±9,1	8,2 ±3,6	55,6* ±10,6

\*Istotne różnice (P<0,01) w jakości nasienia konserwowanego w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach w porównaniu do rozcieńczalnika kontrolnego (R0)

w rozcieńczalniku kontrolnym (10,3 ±3,2) w porównaniu z rozcieńczalnikami R1 (6,3 ±3,6) oraz rozcieńczalnikiem R2 (8,2 ±3,6). Jednocześnie w rozcieńczalniku R1 obserwowano najwyższy odsetek plemników żywych (YO-PRO-1/PI<sup>+</sup>) oraz odsetek plemników z wysokim potencjałem transbłonowym (JC-1<sup>+</sup>), wynoszące odpowiednio 57,4 ±7,1 oraz 62,9 ±6,1 (tab. 1). We wszystkich badanych wariantach rozcieńczalników obserwowano wzrost odsetka plemników apoptotycznych wraz ze wzrostem czasu przechowywania nasienia w stanie płynnym. Najniższy wzrost odsetka subpopulacji plemników YO-PRO-1/PI<sup>+</sup> stwierdzono natomiast w rozcieńczalniku zawierającym 100 µg florfenikolu. Równocześnie w rozcieńczalniku R1 zaobserwowano najwyższy odsetek plemników o ruchu całkowitym (TM), żywych (YO-PRO1/PI<sup>+</sup>) i z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC<sup>-</sup>) w szóstym dniu konserwowania (tab. 1).

W celu oceny zdolności zapładniających nasienia konserwowanego przez sześć dni, przeprowadzono ocenę jakości zarodków na podstawie wybranych markerów apoptotycznych. Z badań przeprowadzonych przez Fabiana i wsp. [5] wynika, że spontaniczna apoptoza w zarodkach osiąga najwyższą wartość w stadium blastocysty. Oszacowanie zmian apoptotycznych na takim etapie rozwoju zarodka może stanowić wiarygodny wskaźnik jego jakości. Ocenę zmian apoptotycznych przeprowadzono na podstawie stopnia fragmentacji DNA i aktywności

Tabela 2

Ocena jakości zarodków uzyskanych od loszek inseminowanych 6-dniowym nasieniem konserwowanym w rozcieńczalniku kontrolnym (R0) oraz w rozcieńczalnikach o zmodyfikowanym składzie (R1 i R2)

Rozcieńczalnik	Liczba loszek	Skuteczność inseminacji (%)	Liczba blastocyst	Liczba prawidłowych morfologicznie blastocyst	Metody oceny zarodków	
					TUNEL	aktywność kaspazy-3
					stopień fragmentacji DNA (%)	aktywność kaspazy-3 (%)
R0 (kontrola)	9	84,5	89	88	2,2	brak – 86,2 niska – 6,7 wysoka – 7,1
R1	9	87,5	101	99	2,1	brak – 87,5 niska – 7,5 wysoka – 5,0
R2	9	88,6	98	96	1,9	brak – 85,7 niska – 8,6 wysoka – 5,7

kaspazy-3. W celu uzyskania zarodków przeprowadzono inseminację dawkami soredzonymi z nasienia konserwowanego w różnych rozcieńczalnikach przez sześć dni. Inseminację wykonano na ogółem 27 loszkach, uzyskując 283 zarodki prawidłowe morfologicznie w stadium blastocysty ekspandującej. Szczegółowe wyniki zamieszczono w tabeli 2. Po inseminacji loszek nasieniem konserwowanym w rozcieńczalniku R1 uzyskano najwyższą liczbę prawidłowych morfologicznie blastocyst i najwyższy odsetek blastocyst nie wykazujących aktywności kaspazy-3. Jednocześnie nie zaobserwowano istot-

nych różnic w stopniu fragmentacji DNA oraz aktywności kaspazy-3 w blastocystach uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem konserwowanym we wszystkich badanych rozcieńczalnikach.

Z przeprowadzonych badań wynika, że konserwowanie nasienia przez sześć dni w rozcieńczalniku z dodatkiem 100 µg florfenikolu umożliwia zachowanie jego wysokiej jakości oraz zdolności zapładniającej.

*Badania wykonano w ramach działalności statutowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach.*

**Literatura:** 1. Althouse G.C., Lu K.G., 2005 – Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63, 573-584. 2. Althouse G.C., Kuster C.E., Clark S.G., Weisiger R.M., 2000 – Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53, 1167-1176. 3. Bryła M., Trzcińska M., 2015 – Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. *Anim. Rep. Sci.* 163, 157-163. 4. Bussalleu E., Yeste M., Sepúlveda L., Torner E., Pinart E., Bonet S., 2011 – Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Anim. Rep. Sci.* 127, 176-182. 5. Fabian D., Koppel J., Maddox-Hyttel P., 2005 – Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 64, 221-231. 6. Maroto-Martin L.O., Cruz Muñoz E., DE Cupere F., Van Driessche E., Echemendia-Blanco D., Machado Rodriguez J.M., Beeckmans S., 2010 – Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim. Rep. Sci.* 120, 95-104. 7. Okazaki T., Mihara T., Fujita Y., Yoshida S., Teshima H., Shimada M., 2010 – Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology* 74, 1691-1700. 8. Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S., 2014 – Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Anim. Rep. Sci.* 150, 96-106. 9. Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z., 2011 – Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo*. *Anim. Rep. Sci.* 124, 90-97.

The aim of this study was to prepare a modification of a diluent used for preservation of boar semen using two antibiotics: florfenicol and polymyxin B. The experiment was performed in order to obtain a diluent maintaining high biological value of semen preserved in liquid storage for six days. Semen from five boars (23 ejaculates) was diluted in a control extender (R0) and in extenders R1 and R2, containing florfenicol and polymyxin B, respectively. The quality of the stored semen was verified using the CASA system, evaluating total and progressive motility, and on the basis of apoptotic changes, by determining the percentage of viable spermatozoa (YO-PRO-1/PI<sup>-</sup>), spermatozoa with apoptotic changes (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) and spermatozoa with high mitochondrial activity (JC-1<sup>+</sup>). The fertilizing capacity of the preserved spermatozoa was verified on the basis of the quality of preimplantation embryos. The study showed that the addition of florfenicol to the extender as antibacterial protection ensures the high quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa.

**KEY WORDS:** boar, semen, antibiotics, embryos, apoptosis

## Patogeneza zakażeń *Escherichia coli* u prosiąt

Anna Rząsa, Artur Zyzak, Olga Urbaniak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

*Escherichia coli*, zwana pałeczką okrężnicy, należy do rodzaju *Escherichia* i wchodzi w skład rodziny *Enterobacteriaceae*, która została zaklasyfikowana do rzędu bakterii właściwych *Enterobacteriales*. Bakterie z gatunku *E. coli* zostały po raz pierwszy opisane w 1885 roku przez Theodora Eschericha, który wyizolował je z kału niemowlęcia i nazwał *Bacterium coli commune* [58]. Bakterie te wchodzi w skład fizjologicznej flory bakteryjnej jelita grubego człowieka oraz zwierząt stałocieplnych [25]. Pełniące funkcję symbiontów i komensali *E. coli* odgrywają znaczącą rolę w rozkładzie substancji pokarmowych oraz w syntezie związków egzogennych – aminokwasów i witamin, głównie witaminy C oraz witamin z grupy B i K [6, 41]. Ponadto, dzięki zdolności do wytwarzania bakteriocyn – kolicyn, stanowią konkurencyjną mikroflorę dla mikroorganizmów chorobotwórczych [3, 7]. Przy obniżonej odporności organizmu obecne w jelicie niepatogenne szczepy pałeczki okrężnicy, w momencie przejścia do tkanek poza przewodem pokarmowym, mogą stać się przyczyną wystąpienia wielu poważnych infekcji. Patogenne szczepy *E. coli* powodują zaburzenia allostazy przewodu pokarmowego z powodu wzrostu sekrecji i osłabienia absorpcji jelitowej, co skutkuje rozwojem biegunek, którym towarzyszą objawy kliniczne wynikające z utraty wody, elektrolitów, zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej oraz obniżenia temperatury ciała. Patogenne szczepy *E. coli* mogą też stać się przyczyną krwotocznego niezłytu jelita grubego, infekcji pęcherza moczowego, infekcji nerek, wystąpienia zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS), małopłytkowej plamicy zakrzepowej, zapalenia płuc i opon mózgowych, a także zapalenia woreczka żółciowego i dróg żółciowych oraz posocznicy [10, 28, 34, 39, 40, 63].

U świń kolibakterioza wywołana przez *E. coli* może przebiegać w postaci jelitowej (czyli biegunki), zakażenia ogólnego bądź intoksykacji. W zależności od wieku zwierząt, w jakim ten zespół chorobowy się pojawia, można wyróżnić: kolibakteriozę prosiąt noworodków (do 3. dnia życia), kolibakteriozę adaptacyjną (okres wystąpienia tzw. siodła immunologicznego, tj.

między 2. a 4. tygodniem życia) oraz kolibakteriozę okresu odsadzeniowego (1.-2. tydzień po odsadzeniu od lochy). Straty bezpośrednie i pośrednie generowane przez biegunki stanowią jeden z najpoważniejszych ekonomicznie problemów okresu odchowu prosiąt [35]. Znajomość patogeny, jak i szybkiej identyfikacji drobnoustrojów wywołujących choroby, stwarza szansę znacznego ograniczenia zachorowań, wprowadzenia skutecznej immunoprofilaktyki, a tym samym ograniczenia stosowania chemioterapeutyków.

Etiologicznym czynnikiem inicjującym powstanie biegunki wywołanej przez bakterie *E. coli* jest obecność w przewodzie pokarmowym szczepu bądź szczepów posiadających na powierzchni komórki tak zwane czynniki patogenności, warunkujące stopień zjadliwości. Zależy on od: obecności fimbrii umożliwiających adhezję do komórek gospodarza, obecności otoczki o właściwościach antyfazagocytarnych oraz od zdolności do wytwarzania substancji toksycznych.

Kolibakterioza rozpoczyna się w momencie adhezji patogennych szczepów *E. coli* do charakterystycznych dla nich receptorów zlokalizowanych na powierzchni komórek jelita cienkiego lub grubego, budujących nabłonek błony śluzowej jelita [4]. Kolejny etap rozwoju kolibakteriozy różni się w zależności od charakterystycznych dla określonego szczepu markerów patogenności.

*Escherichia coli* jest Gram-ujemną, względnie beztlenową, nieprzetrawiającą, zdolną do ruchu pałeczką o przeciętnej długości 1,5 µm oraz średnicy 0,5 µm, z ułożonymi perytrychalnie wiciami, warunkowo wytwarzającą otoczkę i wykazującą obecność fimbrii [29, 57]. Ze względu na optymalną temperaturę wzrostu (37°C) pałeczki te są klasyfikowane jako mezofile. Charakteryzują się prawidłowym rozwojem w zakresie temperatur od 21°C do nawet 48,5°C, giną już po 20 minutach ogrzewania w temperaturze 60°C, ale np. w kale mogą przeżyć nawet do roku w temperaturze bliskiej 0°C [51]. Ponadto są prototrofami, tolerującymi środowisko o pH w granicach 4,5-9,0 (optymalnie 6,0-8,0).

W obrębie gatunku *E. coli*, w zależności od typu oddziaływania na organizm gospodarza, wyróżnia się cztery podstawowe grupy tych bakterii: 1) komensale i bakterie symbiotyczne naturalnej mikroflory jelitowej; 2) szczepy będące fakultatywnymi symbiontami; 3) niepatogenne szczepy potencjalnie chorobotwórcze oraz 4) szczepy patogenne wywołujące infekcje i zatrucia pokarmowe [25].

Chorobotwórcze szczepy *E. coli* dzieli się ze względu na strukturę antygenową (serotypy) oraz syntetyzowane czynniki wirulencji, zwane też czynnikami patogenności (patotypy).