

Loszki ras matecznych przedstawiają odpowiedni dla stawianych oczekiwań poziom użytkowości tucznej i rzeźnej. Podobnie jak dla knurków, zaobserwowano trend zmniejszenia tempa wzrostu, zapewne na skutek czynników środowiskowych. Mięśność loszek ras matecznych utrzymuje się na poziomie 58,5% dla rasy wbp i 58,1% dla rasy pbz. Średnia grubość słoniny ma wartości wyższe dla loszek ras matecznych niż ojcowskich. Oczywiście loszki rasy puławskiej wykazują wartości cech tucznych i rzeźnych na niższym poziomie od ras nowoczesnych. Użytkowość loszek mieszańcowych była na nieco niższym poziomie niż czystorasowych, mimo to spełniała oczekiwania w tym zakresie. Zwłaszcza nieco grubsza słonina u mieszańców lepiej je predestynowała do roli loch produkcyjnych i intensywnego użytkowania rozplodowego.

Analiza średnich danych daje obraz bardzo dużego podobieństwa wyników użytkowości poszczególnych ras. Jednak bliższe zapoznanie się z wynikami w poszczególnych województwach w większym stopniu daje możliwość oceny zmienności. Dotyczy to wszystkich ras i użytkowości. Daje to podstawy do negatywnej oceny poziomu niektórych stad, ale z drugiej strony jest pozytywne, gdyż zmienność jest podstawą sukcesu w pracy hodowlanej. Należy także pamiętać, że w rasach matecznych bardzo wysoki poziom tempa wzrostu, a zwłaszcza mięsności u loszek, nie zawsze stanowi atut.

Generalnie, oceniając postęp fenotypowy należy zwrócić baczniejszą uwagę na dobór zwierząt do kojarzeń, szczególnie knurów, w kierunku poprawy tempa wzrostu i z dużą ostrożnością podchodzić do poprawy mięsności, zwłaszcza w rasach matecznych.

## Wpływ apoptozy na zdolność zapładniającą plemników knura

**Monika Trzcńska, Magdalena Bryła**

**Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie**

W Polsce obserwuje się znaczny wzrost ilości zabiegów inseminacyjnych loch, co sprawia, że zbliżamy się pod tym względem do krajów o rozwiniętej hodowli. Fakt ten rodzi potrzebę doskonalenia badań nad jakością nasienia knurów. Jak dotąd powszechnie stosowanymi testami w laboratoryjnej ocenie jakości nasienia są: koncentracja nasienia, procent plemników ruchliwych i rodzaj ich ruchu. Ocena dokonywana coraz częściej za pomocą urządzeń komputerowych (Computer Assisted Sperm Analysis), a także określenie czasu przeżywania plemników, pozwalają jedynie na eliminację ejakulatów ewidentnie nieprzydatnych do mrożenia i inseminacji. Ze względu na ograniczenia wymienionych kryteriów oceny nasienia, podejmowane są próby wykorzystania nowych metod, takich jak: ocena błon komórkowych [5], ocena struktury chromatyny [2], czy ocena uszkodzeń oksydacyjnych plemników [6]. Metody te w założeniu mają umożliwić precyzyjne określenie zdolności zapładniającej plemników, a co się z tym wiąże – bardziej prawidłową ich selekcję. Z doniesień literaturowych wynika, że obecność apoptotycznych plemników w nasieniu może być przyczyną obniżonej płodności. W badaniach przeprowadzonych przez Anzara i wsp. [1] wykazano obecność około 17% apoptotycznych plemników w świeżym nasieniu buhajów, natomiast po zamrożeniu i rozmrożeniu nasienia liczba ta wzrosła do poziomu wynoszącego od 31% do 40%. Z doświadczeń własnych przeprowadzonych na nasieniu knura wynika, że wzrost czasu przechowywania nasienia w stanie płynnym indukuje zmiany apoptotyczne w plemnikach [11]. Nie znaleziono natomiast danych literaturowych na temat wpływu procesu apoptozy na zdolności zapładniające plemników.

Celem badań prezentowanych w niniejszym artykule była analiza związku pomiędzy apoptozą w plemnikach knura a apoptozą w zarodkach. Ocena apoptozy w zarodkach uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem o zróżnicowanym stopniu zmian apoptotycznych stanowiła dodatkowe kryterium oceny zdolności zapładniającej plemników. Możliwość przena-

czenia do inseminacji bardziej „płodnego” nasienia może wpłynąć korzystnie na stronę ekonomiczną tej metody.

Do oceny procesu apoptozy w plemnikach zastosowano dwie metody. Za pomocą pierwszej metody identyfikowano mikropory powstające w zewnętrznej warstwie błony przy wykorzystaniu fluorochromu YO-PRO-1 [8]. Fluorochrom ten ma zdolność dyfundowania przez mikropory/mikrokanaty w plazmolemie i łączenia się z DNA komórki, podczas gdy sama błona komórkowa ma jeszcze zachowaną strukturalną integralność. Dodatkowe zastosowanie w tej metodzie jodku propydydy (PI) umożliwia detekcję komórek nekrotycznych. Przeprowadzając analizę zawiesiny komórek w mikroskopie fluorescencyjnym można wyróżnić trzy subpopulacje komórek. Pierwszą z nich stanowią komórki żywe (YO-PRO-1/PI<sup>-</sup>), które nie emitują fluorescencji, drugą komórki apoptotyczne YO-PRO-1-pozytywne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) fluorescujące na zielono, trzecią natomiast grupę stanowią komórki martwe, nekrotyczne emitujące zarówno zieloną, jak i czerwoną fluorescencję (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>).

Druga z zastosowanych metod pozwala na relatywnie wczesną diagnostykę apoptozy dzięki wykrywaniu reszt fosfatydyloloseryny na powierzchni błony cytoplazmatycznej za pomocą aneksyny V sprzężonej z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC, ang. fluorescein isothiocyanate). W czasie apoptozy zachodzi translokacja fosfatydyloloseryny z powierzchni wewnątrzkomórkowej na zewnętrzną. Aneksyna V, w obecności jonów Ca<sup>2+</sup>, łączy się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloloseryna, dzięki czemu stosuje się ją jako marker apoptozy. Oznaczanie na powierzchni błony komórek reszt PS przy użyciu aneksyny V sprzężonej z FITC oraz weryfikacja stopnia przepuszczalności błony plazmatycznej dla PI, barwiącego DNA i RNA komórek o zaburzonej integralności błony, umożliwia odróżnienie komórek żywych, nieapoptotycznych (aneksyna V-FITC/PI<sup>-</sup>) od komórek wczesnoapoptotycznych (aneksyna V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) oraz wczesnonekrotycznych (aneksyna V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), a także od komórek martwych (nekrotycznych) (aneksyna V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>). Wyznakowane aneksyną V-FITC komórki emitujące zieloną, a barwiące się jodkiem propydydy – czerwoną fluorescencję, można analizować w mikroskopie fluorescencyjnym [4, 9].

Do oceny apoptozy w zarodkach wykorzystano zestaw PhiPhiLux G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> (Calbiochem). PhiPhiLux jest substratem białkowym kaspazy-3 o sekwencji GDEVDGI, który został połączony z 2 fluoroforami G<sub>2</sub>D<sub>2</sub> umieszczonymi po obu stronach substratu. W komórkach, w których kaspaza-3 jest aktywna dochodzi do przecięcia substratu GDEVDGI (miejsce cięcia kaspazy podkreślone), co w mikroskopie fluorescencyjnym jest widoczne jako czerwona fluorescencja. Przy braku aktywności kaspazy-3 fluorescencja ulega stłumieniu.

Dawczyniami zarodków były 6-miesięczne loszki (pietrain x duroc, pbz, wbp) o masie ciała wynoszącej od 85 do 90 kg. Samice poddawane były superowulacji przez domięśniową iniekcję 1500 j.m. PMSG (Serogonadotropin, Biowet, Polska). Po 72 godzinach podawano 1000 j.m. HCG (Choluron, Intervet, Holandia) [7, 10]. W dniu wystąpienia rui (24 godziny po podaniu HCG) samice były inseminowane dwa razy, w odstępach 12-godzinnych, standardową dawką nasienia płynnego ( $2,5 \times 10^9$  plemników/ml). Do inseminacji używano nasienie świeże i nasienie przechowywane do czasu, w którym jego ruchliwość osiągała 30%. Ogółem użyto 9 ejakulatów pochodzących od knurów nr 1, 2, 3 (po 3 ejakulaty od każdego knura).

Dawczynie poddawane były ubojowi lub operowane chirurgicznie po 5-6 dniach od inseminacji. Zarodki uzyskiwano poprzez przepłukanie macicy (stadium blastocysty ekspandującej), uzupełnionym albuminą surowicy bydłej (BSA, frakcja V) płynem DPBS (Dulbecco's PBS, Invitrogen, USA) o temp. 38°C. Przepłukiwanie powtarzano 2-krotnie przy użyciu około 500 ml płynu na jeden róg macicy. Wyszukiwanie i ocena morfologiczna zarodków przeprowadzona była przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (pow. 100x) w komorze laminarnej o temp. ok. 30°C. Wyszukane zarodki przenoszono do płynu PBS uzupełnionego 20% surowicą płodów cielęcych (FCS). Następnie zarodki przewożono do laboratorium, w specjalnej komorze utrzymującej stałą temperaturę 38°C. Ocenę zarodków w kierunku wykrycia zmian apoptotycznych przeprowadzono po 5-6 godzinach od uzyskania i przechowywania ich w płynie PBS uzupełnionym 20% FCS.

Nasienie świeże użyte do inseminacji charakteryzowało się obecnością średnio 5,6% plemników apoptotycznych, 13,3% nekrotycznych, 81% żywych, identyfikowanych przy pomocy barwienia fluorochromem YO-PRO-1 i PI. Przy zastosowaniu barwienia aneksyną V-FITC i PI wykazano obecność 4,7% plemników wczesnoapoptotycznych, 9,9% wczesnonekrotycznych, 5% nekrotycznych oraz 80% żywych. Plemniki osiągały ruchliwość 30% średnio po 8,1 dniach przechowywania. Nasienie takie zawierało 9% plemników apoptotycznych, 46,3% nekrotycznych oraz 44,7% żywych, identyfikowanych przy pomocy barwienia fluorochromem YO-PRO-1 i PI. Przy zastosowaniu barwienia aneksyną V-FITC i PI w nasieniu tym wykazano obecność 8,2% plemników wczesnoapoptotycznych, 46,4% wczesnonekrotycznych, 4,8% nekrotycznych oraz 40,6% żywych (dane nie ujęte w tabeli).

Wykazano statystycznie istotne różnice ( $P < 0,001$ ) w odsetku poszczególnych subpopulacji plemników (z wyjątkiem odsetka plemników nekrotycznych ocenianych za pomocą barwienia aneksyną V-FITC) pomiędzy nasieniem świeżym i przechowywanym użytym do inseminacji.

Inseminację dawkami sporządzonymi z nasienia świeżego i przechowywanego wykonano na ogółem 104 loszkach, inseminując zawsze taką samą liczbę loszek (po 5 lub 6 w każdej grupie). Skuteczność inseminacji, mierzona liczbą skutecznie un-

sienionych loszek w stosunku do ogółem unasienionych, wynosiła 90,4 i 78,8%, odpowiednio dla nasienia świeżego i przechowywanego. Do analiz w kierunku aktywności kaspazy-3 przeznaczano od 40 do 60 zarodków prawidłowych morfologicznie. Ogółem przeprowadzono inseminację na 104 loszkach poddanych standardowej superowulacji. W wyniku inseminacji nasieniem świeżym uzyskano 744 zarodki, w tym 94,8% stanowiły zarodki prawidłowe morfologicznie i 5,2% zarodki zdegenerowane. Analizie w kierunku aktywności kaspazy-3 poddano 532 ekspandujące blastocysty. Brak aktywności kaspazy-3 oraz niską i wysoką aktywność stwierdzono u odpowiednio: 461 (86,7%); 49 (9,2%) oraz 22 (4,1%) blastocyst.

W wyniku inseminacji nasieniem przechowywanym o ruchliwości 30% uzyskano 734 zarodki, w tym 73% stanowiły zarodki prawidłowe morfologicznie, a 27% zarodki zdegenerowane. Analizie w kierunku aktywności kaspazy-3 poddano 500 ekspandujących blastocyst. Brak aktywności kaspazy-3 oraz aktywność niską i wysoką stwierdzono u odpowiednio: 390 (78%); 62 (12,4%) oraz 48 (9,6%) blastocyst. Szczegółowe wyniki umieszczono w tabeli.

Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy odsetkiem plemników apoptotycznych i wczesnoapoptotycznych w nasieniu świeżym i przechowywanym do dnia, w którym ruchliwość plemników osiąga 30% a liczbą zarodków uzyskanych od loch inseminowanych ocenianym nasieniem, jak również aktywnością kaspazy-3 w analizowanych zarodkach.

W przeprowadzonych doświadczeniach uzyskano wyższy odsetek zarodków zdegenerowanych od loszek inseminowanych nasieniem przechowywanym, zawierającym wyższy odsetek plemników apoptotycznych w porównaniu do nasienia świeżego. Mimo że nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem zmian apoptotycznych w plemnikach a liczbą zdegenerowanych zarodków, nie można wykluczyć możliwości zapłodnienia komórek jajowych przez plemniki o obniżonej wartości biologicznej, jakimi prawdopodobnie są plemniki apoptotyczne, co może powodować obumieranie zarodków we wczesnych stadiach rozwoju i tłumaczy wyższy odsetek zarodków zdegenerowanych uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem przechowywanym. Jednakże, aby potwierdzić te przypuszczenia, należałoby przeprowadzić doświadczenia na liczniejszej grupie zwierząt.

W niniejszej pracy ocenie w kierunku aktywności kaspazy-3 poddane zostały blastocysty ekspandujące. Z badań przeprowadzonych przez Fabiana i wsp. [3] wynika, że spontaniczna apoptoza w zarodkach osiąga najwyższą wartość właśnie w stadium blastocysty. Oszacowanie zmian apoptotycznych na takim etapie rozwoju zarodka może zatem stanowić wskaźnik jego jakości. W dostępnej literaturze nie znaleziono danych na temat aktywności kaspazy-3 w zarodkach *in vivo* uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem świeżym i przechowywanym, o zróżnicowanym stopniu nasilenia zmian apoptotycznych.

#### Tabela

**Ocena blastocyst świni w kierunku aktywności kaspazy-3 uzyskanych od loch inseminowanych nasieniem świeżym i przechowywanym do dnia, w którym ruchliwość nasienia osiągała 30%**

Rodzaj nasienia	Liczba unasienionych loch	Liczba skutecznie unasienionych loch	Skuteczność inseminacji (%)	Zarodki		Liczba ocenianych blastocyst	Aktywność kaspazy-3 – liczba zarodków / %
				prawidłowe morfologicznie (liczba / %)	zdegenerowane (liczba / %)		
Nasienie świeże	52	47	90,4	705 / 94,8***	39 / 5,2***	532	brak – 461 / 86,7*** niska – 49 / 9,2 wysoka – 22 / 4,1***
Nasienie przechowywane	52	41	78,8	536 / 73,0***	198 / 27,0***	500	brak – 390 / 78,0*** niska – 62 / 12,4 wysoka – 48 / 9,6***

\*\*\*Różnice istotne statystycznie ( $P < 0,001$ )

W badaniach własnych przed dokonaniem oceny blastocyst w kierunku aktywności kaspazy-3 przeprowadzano ich selekcję morfologiczną, a do analiz przeznaczano tylko zarodki prawidłowe morfologicznie. Wykazano istotne różnice pomiędzy brakiem aktywności i wysoką aktywnością kaspazy-3 w blastocystach uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem świeżym i przechowywanym.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wysunąć wniosek, iż wykrywanie zmian apoptotycznych w plemnikach może stanowić dodatkowe kryterium oceny zdolności zapładniającej nasienia knura. Zastosowanie tej metody jest szczególnie uzasadnione w przypadku, kiedy standardowe metody oceny nasienia nie wyjaśniają przyczyn jego obniżonej „płodności”.

**Literatura:** 1. Anzar M., He L., Buhr M.M., Kroetsch T.G., Pauls K.P., 2002 – Biol. Reprod. 66, 354-360. 2. Bochenek M., Smoraż Z., Pilch J., 2001 – Theriogenology 56, 557-567. 3. Fabian D., Koppel J., Maddox-Hyttel P., 2005 – Theriogenology 64, 221-231. 4. Fadok, V.A., Lazlo D.J., Noble P.W., Weinstein L., Riches D.W.H., Henson P.M., 1993 – J. Immunol. 151, 4274-4285. 5. Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland R.P., 1994 – J. Androl. 15, 620-629. 6. Gogol P., Wierchoś-Hilczner A., Cegła M., 2007 – Animal 6, 844-846. 7. Holtz W., Schlieper B., 1991 – Theriogenology 35, 1237-1249. 8. Idziorek T., Estaquier J., De Bels F., Ameisen J.C., 1995. – J. Immunol. Methods 85, 249-258. 9. Martin S.J., Finucane D.M., Amarante-Mendes G.P., O'Brien G.A., Green D.R., 1996 – J. Biol. Chem. 46, 28753-28756. 10. Smoraż Z., Gajda B., Jura J., Skrzyszowska M., Pasięka J., 1999 – Ann. Anim. Sci. 26, 155-161. 11. Trzcińska M., Bryła M., Smoraż Z., 2011 – Anim. Reprod. Sci. 124, 90-97.

### Effect of apoptosis on fertilizing capacity of boar spermatozoa

#### Summary

The aim of the study reported in this article was to determine the relationship between apoptosis in boar spermatozoa and apoptosis in embryos. The evaluation of apoptosis in embryos obtained from gilts inseminated with semen showing different degrees of apoptotic changes was an additional criterion for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. YO-PRO-1 fluorochrome and staining with annexin V conjugated with fluorescein were used to evaluate apoptosis in the spermatozoa, while apoptotic changes in the embryos were evaluated based on caspase-3 activity. The present study showed statistically significant ( $P < 0.001$ ) differences in the percentage of different sperm subpopulations (except the percentage of necrotic sperm evaluated using FITC annexin V staining) between fresh semen and stored semen used for the insemination. At the same time, percentage of apoptotic and early apoptotic spermatozoa in fresh semen and semen stored until the day on which sperm motility reached 30% showed no significant correlations with the number of embryos obtained from sows inseminated with the analysed semen and caspase-3 activity in the analysed embryos

**KEY WORDS:** boars, semen quality, apoptosis

## Przyczyny brakowań i upadków ciężkich indyków Big-6 utrzymywanych w warunkach chowu półintensywnego

Krzysztof Damaziak, Monika Michalczuk,  
Artur Żbikowski

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Dziki indyki są największymi ptakami z rzędu kuraków, ich duża masa ciała (około 6 kg indy i 3 kg indyczki) utrudnia w środowisku naturalnym sprawne latanie, pokonują więc duże odległości chodząc lub biegając. Ułatwia im to specyficzna budowa kończyn, a mianowicie masywne i wytrzymałe kości oraz fiszbiny stanowiące rusztowanie dla mięśni nóg [16]. Gatunek ten od momentu udomowienia był selekcjonowany niemal wyłącznie w kierunku poprawy cech związanych z użytkowaniem mięsnym. Tylko w ostatnim dziesięcioleciu masa ciała indorów z ciężkich linii zwiększyła się o około 13,4%, a indyczek o 11% [6]. Przyczyniło się to do poprawy wyników ekonomicznych chowu i wzrostu produkcji mięsa tego gatunku w kraju [3]. O opłacalności produkcji w znacznym stopniu decyduje również liczba brakowań zdrowotnych i przeżywalność ptaków.

Do najczęstszych przyczyn upadków i brakowań indyków zalicza się: złą jakość piskląt [14], śmierć głodową piskląt oraz zatkanie przewodu pokarmowego [18], choroby zakaźne [1], jak również problemy lokomotoryczne [11] i skutki kanibalizmu [12]. Niektóre z tych przyczyn mają podłoże genetyczne, inne natomiast są bezpośrednią konsekwencją masowej produkcji indyków w warunkach całkowicie różnych od ich naturalnego środowiska, a z takich warunków, czyli chowu intensywnego, pochodzi obecnie niemal 100% produkcji mięsa indyczego w Polsce.

W ostatnich kilku latach obserwuje się jednak zwiększone zainteresowanie chowem „ekologicznym” drobiu. Ze wszystkich gatunków drobiu pisklęta indycze są najbardziej wrażliwe na nieprzyjające warunki środowiska, mają największe trudności w uczeniu się pobierania wody i pokarmu. Alternatywą dla wielkotorwarowej produkcji mięsa indyczego może być połączenie chowu intensywnego z wybiegowym. Polega to na utrzymywaniu ptaków do 5-6 tygodnia życia w zamkniętych budynkach, a następnie umożliwieniu im korzystania z wybiegów. Taki system odchowu młodych indyków rzeźnych można określić jako półintensywny. Wiele uwagi poświęcono ekonomicie tego typu produkcji [7, 8], ale tylko nieliczne prace [2, 19] dotyczą samej intensywności wykorzystywania wybiegów, które uznawane są za podstawę tego systemu utrzymania. Brak jest również informacji na temat śmiertelności i przyczyn ubytków indyków w takich warunkach chowu.

W Ameryce Północnej, ojczyźnie dzikiego indyka, wybiegowy odchów indyków jest szeroko rozpowszechniony. Opiera się on na starych regionalnych rasach, które charakteryzuje powolne tempo wzrostu, niska masa ciała i symetryczna budowa. Fenotypowe podobieństwo do dzikich przodków pozwala na określenie ich jako prymitywne. Zaletą tej grupy genetycznej jest przystosowanie do mniej stabilnych warunków chowu wybiegowego niż te, które panują w systemie intensywnej produkcji [16].