

Zaawansowana kontrola parametrów biologicznych nasienia buhajów w kontekście kształtowania się wyróżniających standardów jakościowych oferowanych na rynku dawek inseminacyjnych przez Małopolskie Centrum Biotechniki w Krasnem



Fot. 1. Mikroskopowa ocena ejakulatu w Małopolskim Centrum Biotechniki w Krasnem

Alicja Kowalczyk^{1,2}, Jarosław Jędraszczyk¹,
Anna Szul¹

¹Laboratorium Andrologiczne, Małopolskie Centrum Biotechniki w Krasnem

²Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wprowadzenie

Do niedawna, kwestia jakości nasienia buhajów w centrum produkcji, regulowana była odpowiednimi zapisami w aktach prawnych (rozporządzeniach), które szczegółowo określały jego minimalne parametry. Obecnie te regulacje już nie obowiązują, wobec czego producenci dawek inseminacyjnych ustalają własne kryteria, monitorując skuteczność poszczególnych ejakulatów, poprzez informacje uzyskiwane z terenu [8]. Najczęściej jest to rezultat pierwszych unasięnień, indeks inseminacyjny lub stosowany obecnie wskaźnik niepowtarzalności rui [3, 5, 6].

Podstawowa ocena nasienia świeżego i mrożonego w warunkach komercyjnych była doskonała przez ponad pół wieku, co pozwoliło na jej ujednolicenie we wszystkich stacjach produkcji nasienia na

świecie. Obejmuje ona ocenę makroskopową (objętość, zabarwienie, konsystencję, pH ejakulatu) i mikroskopową (ruch masy, ruch postępowy, morfologię plemników oraz obecność zanieczyszczeń) [6, 12]. Wraz z rozwojem technologii, poszczególne laboratoria rywalizowały, wykorzystując nowoczesne mikroskopy, ich spektrum badawcze oraz stosując nowatorskie linie technologiczne służące jednocześnie do oceny, jak i konfekcjonowania nasienia.

Różnice pomiędzy klasycznym spermogramem a zaawansowanym technologicznie

Rutynowa ocena spermogramu jest nieodłącznym elementem produkcji nasienia w Małopolskim Centrum Biotechniki w Krasnem i służy do identyfikacji samców o obniżonej, ale także wybitnie wysokiej wydajności reprodukcyjnej. Spermogram zwykle obejmuje analizę żywotności plemników metodą barwienia podstawowego, ocenę morfologii oraz ruchliwości komórek w ejakulacie, ale nie jest w stanie ocenić poziomu płodności nasienia danego buhaja z powodu wielu ograniczeń analitycznych i metodycznych [4, 12].

Powód jest dość oczywisty: tak wykonany spermio-gram ocenia wyłącznie podstawowe zmienne dotyczące „wyglądu” (morfologii) i żywotności plemników, ale nie identyfikuje ukrytych wewnątrz plemnika zmian strukturalnych, szczególnie związanych ze zmianami biochemicznymi i metabolicznymi, co ostatecznie nie daje odpowiedzi na pytanie, jaka jest zdolność plemników do interakcji ze środowiskiem układu rozrodczego krowy. Konwencjonalny spermio-gram nie jest w stanie zmierzyć, czy informacja genomowa, którą plemniki dostarczają odpowiednikowi gamet podczas zapłodnienia, jest wystarczająco nienaruszona, aby zapewnić wczesny rozwój zarodka (stąd znaczna ich liczba ulega resorpcji we wczesnym stadium) [7]. Co ważne, większość konwencjonalnych technik oceny nasienia obejmuje małe populacje plemników, zwykle 200-300 komórek w ejakulacie. Podczas gdy cytometria przepływowa wykorzystuje do analizy co najmniej kilka tysięcy [1, 5]. Oznacza to, że otrzymane metodą konwencjonalną wyniki mają wrodzoną dużą zmienność, co czyni całą analizę mało obiektywną.

Zasada działania cytometru przepływowego

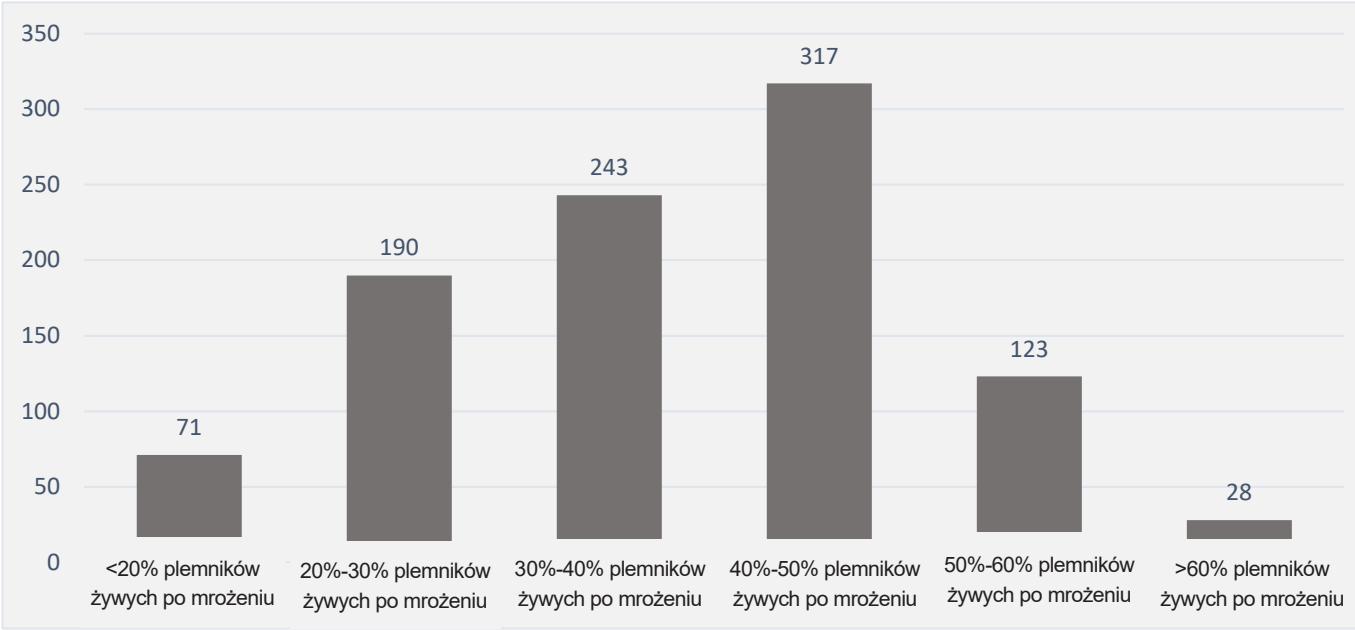
Płyn poruszający się w przepływie laminarnym określa ruch i prędkości komórek podczas przechodzenia przez detektor. Podczas tego transportu można wykryć właściwości komórek, takie jak fluorescencja, absorbancja i rozpraszanie światła, wykorzystując jedno lub kilka źródeł oświetlenia, które mogą w różny sposób wzbudzać przesłane markery. W ten sposób cytometr wykrywa znakowanie przez wiele fluorochromów związanych z poszczególnymi plemnikami, dzięki czemu więcej niż jeden atrybut plemnika

może być oceniany jednocześnie, co zwiększa naszą zdolność do skorelowania tych atrybutów na przykład z potencjalną zdolnością do zapłodnienia. Ponadto umożliwia pozyskiwanie danych z różnych subpopulacji w obrębie próby, a tym samym ocenę heterogenicznych populacji w różnych stanach aktywacji. W ten sposób analiza staje się wiarygodna, powtarzalna i obiektywna [2, 12].

Era cytometryczna w Laboratorium Andrologicznym Małopolskiego Centrum Biotechniki w Krasnem

Biorąc pod uwagę powyższe, Małopolskie Centrum Biotechniki w Krasnem w 2017 roku postanowiło włączyć do rutynowej oceny nasienia analizę wykonywaną przez cytometr przepływowy. Rok 2017 był rokiem wdrożeniowym, w którym początkowo analizowano tylko nasienie po mrożeniu/rozrożeniu, natomiast kwalifikacja ejakulatów do dalszej produkcji (ocena wstępna) odbywała się w dalszym ciągu na podstawie subiektywnej oceny mikroskopowej. Zaskoczeniem dla Zespołu pracującego w Laboratorium Andrologicznym był fakt, że ponad 40% poddanych ocenie prób zamrożonego nasienia, które zostało na podstawie oceny mikroskopowej zakwalifikowane do dalszych procedur (jako „dobre”), nie osiągnęło poziomu 40% plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową (rys. 1). Doświadczenie laboranta w zakresie oceny wstępnej nasienia okazało się mieć kluczowe znaczenie dla wyników produkcyjnych, a cała analiza oparta na umiejętnościach takiej technika stała się nieobiektywna.

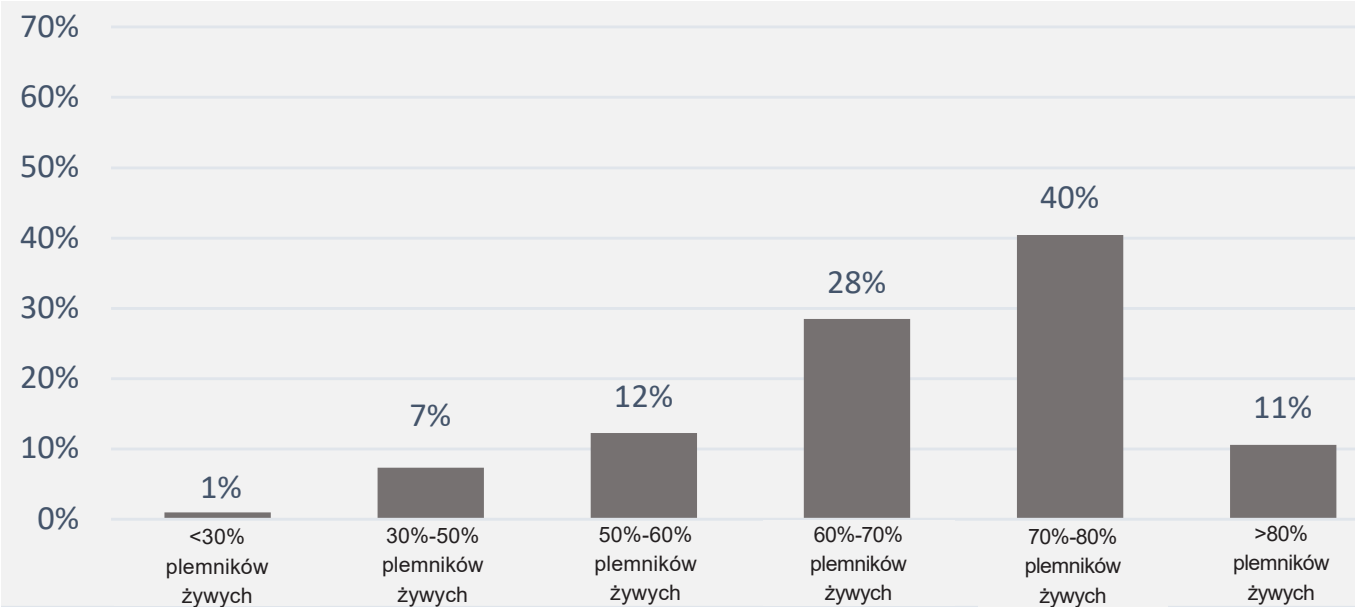
W 2018 roku wdrożono już dwustopniową kwalifikację ejakulatów, czyli ocenę cytometryczną nasienia zarów-



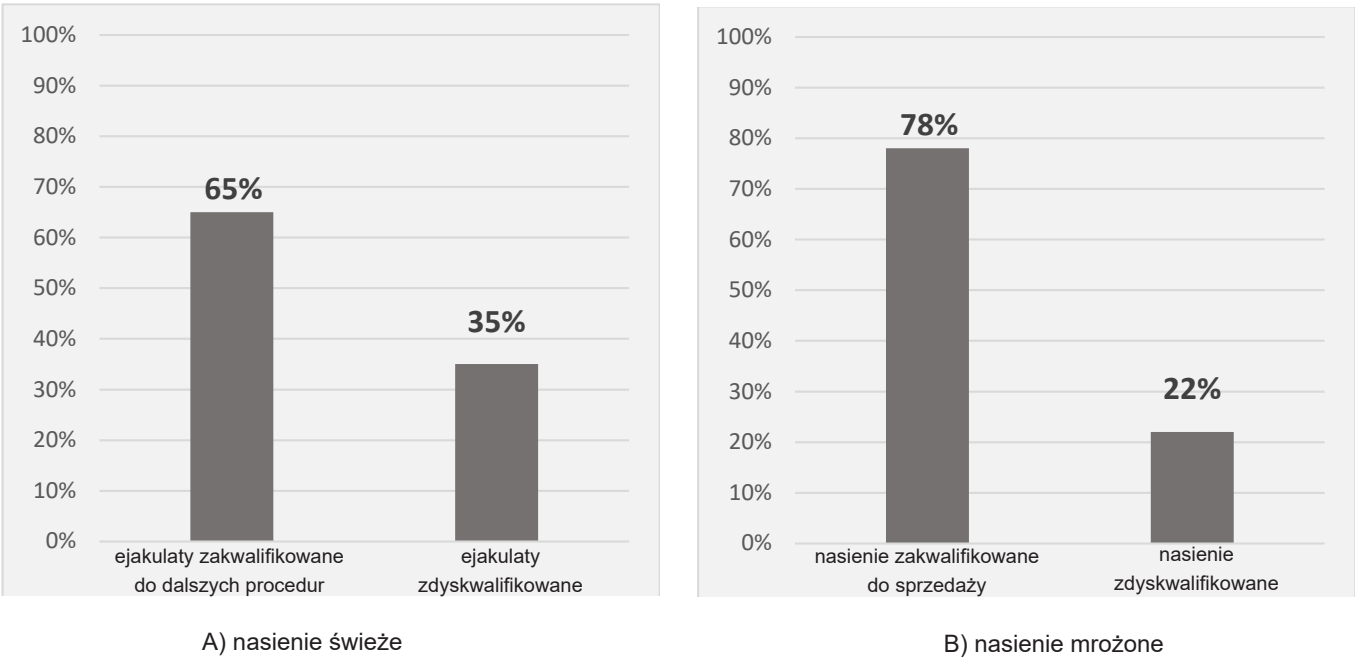
Rys. 1. Liczba prób nasienia po mrożeniu analizowana na cytometrze przepływowym, wcześniej uznana za nasienie dobrej jakości na podstawie oceny mikroskopowej i zakwalifikowana do unasienniania w 2017 roku

no świeżego (kwalifikacja ejakulatów do dalszych procedur), jak i rozmrożonego (kwalifikacja dawek do unasienniania). Ustalono wówczas, że podstawowym kryterium kwalifikacji ejakulatów będzie obiektywna analiza plemników wykonana przez cytometr przepływowy, natomiast makro- i mikroskopowa analiza będzie oceną uzupełniającą. Określono również pierwsze minimalne progi kwalifikacji ejakulatów do dalszych procedur dla nasienia świeżego (60% plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową) i mrożonego (35% plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową).

Na podstawie zebranych danych (przedstawionych na rys. 2 i 3) wywnioskowano, że im więcej plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową w nasieniu świeżym, tym większe szanse na pozytywne przejście całego procesu technologicznego (mrożenia/rozmrożenia). Ponadto, dane z analizy cytometrycznej nasienia każdego badanego buhaja mogą posłużyć jako informacja do optymalizacji przyszłych protokołów technologicznych, np., jaki minimalny odsetek plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową (żywych) musi zawierać nasienie konkretnego buhaja, aby zostać skutecznie zamrożone.



Rys. 2. Odsetek wszystkich ejakulatów (nasienie świeże) w zależności od liczby plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową [%] w 2018 roku

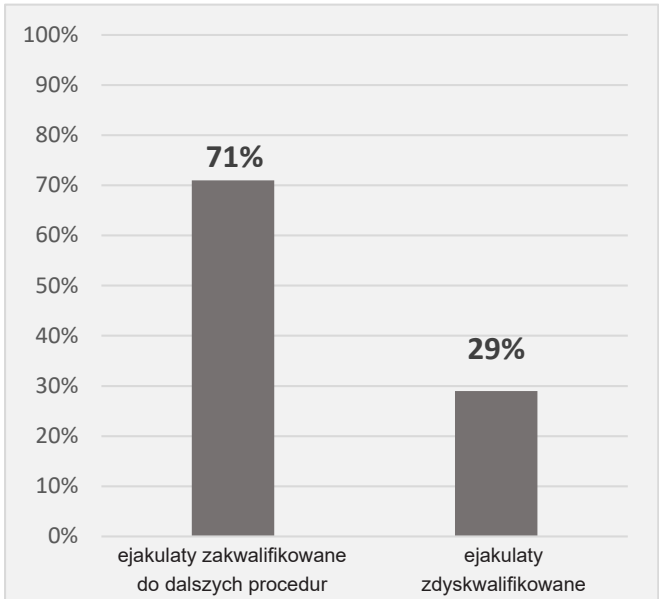


Rys. 3 Odsetek ejakulatów zdyskwalifikowanych na podstawie analizy cytometrycznej nasienia świeżego (A) i mrożonego (B) [%] w 2018 roku

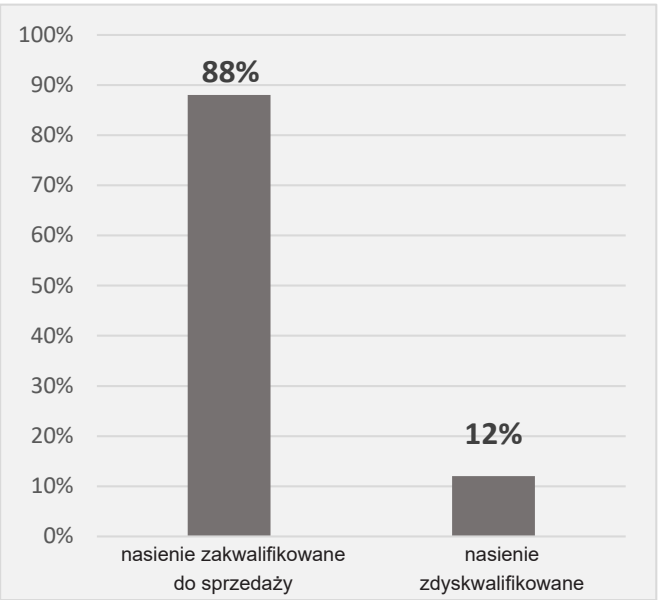
W 2019 roku polityka jakościowa produktu (dawki inseminacyjnej) w Małopolskim Centrum Biotechniki zaczęła się dynamicznie zmieniać. Podniesiono wówczas minimalny próg plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową, jaki musi osiągnąć dany ejakulat, aby został zakwalifikowany do dalszych procedur technologicznych. I tak w nasieniu świeżym ten próg ustalono na 70% plemników żywych, a w rozmrożonym 40%. Wpłynęło to wówczas na odsetek ejakulatów

dyskwalifikowanych na wstępnym etapie oceny jakości (rys. 4).

Podniesienie wymagań jakościowych szczególnie w stosunku do nasienia świeżego spowodowało zmniejszenie liczby dyskwalifikowanych dawek inseminacyjnych po całym procesie produkcyjnym (rys. 5), co ostatecznie przekłada się na wynik ekonomiczny ich produkcji (mniejsze zużycie rozrzedzalników do nasienia, słomek do konfekcjonowania, energii etc.).

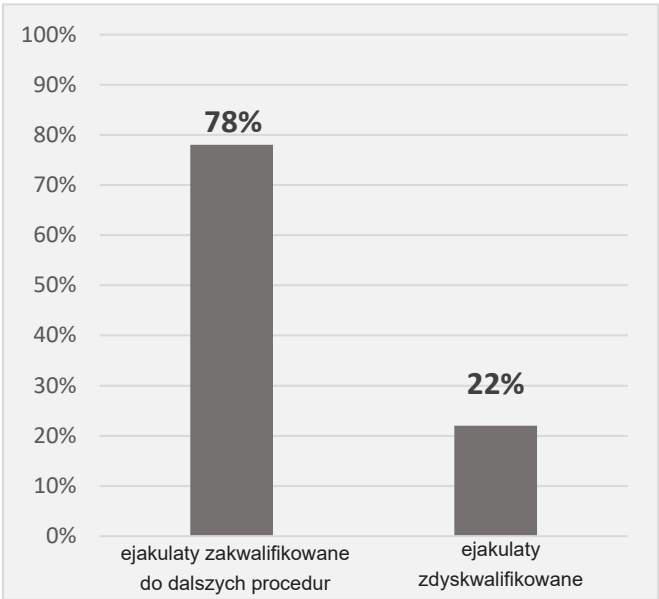


A) nasienie świeże

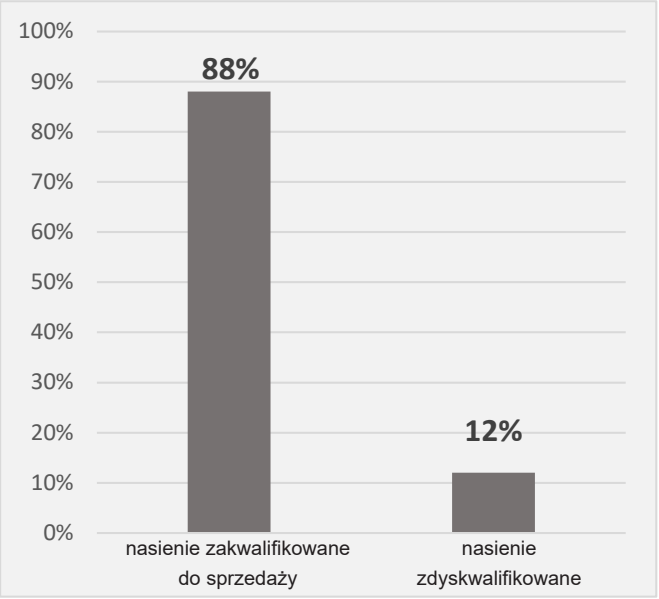


B) nasienie mrożone

Rys. 4. Odsetek ejakulatów zdyskwalifikowanych i zakwalifikowanych do dalszych procedur po podniesieniu minimalnych standardów kwalifikacji nasienia w 2019 roku



A) nasienie świeże



B) nasienie mrożone

Rys. 5 Odsetek zdyskwalifikowanych dawek nasienia świeżego (A) i mrożonego (B) po podniesieniu minimalnych standardów kwalifikacji nasienia w 2019 roku [%]



Fot. 2. Buhaje w oborze w Małopolskim Centrum Biotechniki w Krasnem

Lata 2020-2022 to przede wszystkim utrzymanie kryteriów minimalnej jakości nasienia świeżego przy kwalifikacji do dalszych procedur (70% plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową), niemniej jednak dążąc do jak najlepszych parametrów dawek inseminacyjnych trafiających na rynek, zdecydowano również o zwiększeniu dolnej granicy kwalifikacji nasienia do unasienniania po procesie mrożenia (45% plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową).

Utrzymanie tak wysokich standardów nie jest łatwe i wymaga wiele pracy na różnych płaszczyznach. Kilka lat trwało opracowanie w Laboratorium w Krasnem nowych norm oceny nasienia buhajów. Przy ich określaniu, brano pod uwagę nie tylko tradycyjne parametry analizy ejakulatów (przede wszystkim te na poziomie komórkowym), ale i fizjologię tak specyficznej komórki, jaką jest plemnik. Równolegle trwały prace nad modyfikacją środowiska przechowywania plemników, czyli nad składem stosowanych rozrzedzalników [9, 10, 11]. O ile etap ten zakończony został wprowadzeniem nowego standardu oceny i produkcji nasienia pod nazwą CytoFLOW 2022®, to jednak badania trwają, dzięki czemu produkcja nasienia w Krasnem jest procesem innowacyjnym, rozwojowym, zawierającym w sobie warsztat naukowo-badawczy, w której już pojawiły się nowe wyzwania i cele. Zespół ds. produkcji nasienia odbył wiele szkoleń krajowych i zagranicznych, wyprzedzając w tym zakresie wiele stacji nie tylko w Europie, ale także na świecie. Również współpraca z czołowymi jednostkami naukowymi w Eu-

ropie przyczyniła się do uzyskania najwyższych standardów jakościowych, które są już dostępne dla hodowców.

Podsumowanie

Gwarantowana, bo precyzyjnie określona, wysoka jakość plemników w dawce zwiększa skuteczność użytego nasienia w stadzie. Wykorzystanie technologii zawartej w dawce **CytoFLOW 2022®** minimalizuje ryzyko utraty zarodków w ich wczesnym stadium rozwojowym. Ostatecznie większa zdolność do zapłodnienia wyselekcjonowanych cytometrycznie ejakulatów zmniejsza liczbę dawek nasienia wykorzystanych na jeden zabieg inseminacji, co znacznie obniża koszty zarówno samej usługi, jak i materiału biologicznego (słomek).

Należy podkreślić, że produkt opuszczający laboratorium Małopolskiego Centrum Biotechniki jest produktem powtarzalnym dla wszystkich parametrów, co oznacza, że niezależnie od rasy i cech indywidualnych buhaja każda słomka jest identyczna pod względem jakości biologicznej. Spełnienie założonych norm wiąże się z eliminacją dużej liczby ejakulatów, dlatego do dalszych procedur technologicznych i ostatecznie sprzedaży trafiają tylko te, które dają gwarancję wyższej skuteczności. Pierwsze rezultaty wykorzystania nasienia pod marką **CytoFLOW 2022®** są bardzo obiecujące w stadach krów o wysokiej produkcji, ale również w stadach krów problemowych.



Animals. 34: 503-507.
7. Hansen P.J., Dobbs K.B., Denicol A.C., Si-queira L.G., 2016 – Sex and the preimplantation embryo: implications of sexual dimorphism in the preimplantation period for maternal programming of embryonic

Literatura: **1. Binsila B., Selvaraju S., Somashekar L.**, 2018 – Molecular advances in semen quality assessment and improving fertility in bulls – a review. *Indian Journal of Animal Reproduction* 39, 1-10. **2. Brazil C., Swan S.H., Drobnis E.Z., Liu F., Wang C., Redmon J.B., Overstreet J.W.**, 2004 – Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology* 25, 635-644. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02835.x. **3. Cardoso Consentini C.E., Wiltbank M.C., Sartori R.** 2021 – Factors That Optimize Reproductive Efficiency in Dairy Herds with an Emphasis on Timed Artificial Insemination Programs. *Animals*. 11(2) 301. <https://doi.org/10.3390/ani11020301> **4. Chenoweth P.J., McPherson F.J.**, 2016 – Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Animal Reproduction Science*, 169: 32-6. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.03.001. **5. Christensen P., Boelling D., Pedersen K.M., Korsgaard I.R., Jensen J.**, 2005 – Relationship Between Sperm Viability as Determined by Flow Cytometry and Nonreturn Rate of Dairy Bulls. *Journal of Andrology*, 26: 98-106. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2005.tb02878.x> **6. Christensen P., Brockhoff P.B., Lehn-Jensen H.**, 1999 – The relationship between semen quality and the non-return rate of bulls. *Reproduction in Domestic*

development. Cell Tissue Res. 363, pp. 237-247 **8. Karoui S., Díaz C., Serrano M., Cue R., Celorrio I., Carabaño M.J.** 2011 – Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Animal Reproduction Science*, 124:28-38. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.02.008. **9. Kowalczyk A., Czerniawska-Piątkowska E.**, 2021 – Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process. *Andrology*, 9, 4, 1275-1281. DOI:10.1111/andr.12996. **10. Kowalczyk A., Gałęska E., Szul A., Łacka K., Bubel A., Araujo J.P., Ullah R., Wrzecińska M.**, 2022 – Fertility rate and assessment of the cytoprotective capacity of various types of Holothuroidea extracts on spermatozoa. *Veterinary Sciences*, 9(4), 189-202. **11. Mizera A., Kuczaj M., Szul A.**, 2019 – Impact of the Spirulina Maxima Extract addition to semen extender on bovine sperm quality. *Italian Journal of Animal Science* 18(1), 601-607. **12. Tanga B.M., Qamar A.Y., Raza S., Bang S., Fang X., Yoon K., Cho J.**, 2021 – Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment – A review. *Animal Biosciences Aug*; 34(8):1253-1270. doi: 10.5713/ab.21.0072. Epub 2021 Apr 23. PMID: 33902175; PMCID: PMC8255896.

Advanced control of bulls' semen biological parameters in the context of shaping outstanding quality standards offered on the market of insemination doses by the Malopolska Biotechnic Center in Krasne

Summary

Precisely defined and thus guaranteed high sperm quality in insemination doses increases the effectiveness of semen used in a herd. The technology behind the CytoFLOW 2022 dose minimizes the risk of losing embryos in the early development stage. Ultimately, the greater fertilizing capacity of cytometrically selected ejaculates reduces the number of semen doses needed for insemination, which significantly reduces the costs of both the service itself and the biological material (straws). It should be emphasized that the product which leaves the laboratory of the Malopolska Biotechnology Centre is reproducible for all parameters, and thus irrespective of the breed and individual characteristics of the bull, each straw is identical in terms of biological quality. Meeting quality standards entails eliminating a large number of ejaculates, so that only those that guarantee high effectiveness are used in further technological procedures and ultimately placed on the market. The first results of the use of CytoFLOW semen are very promising in high-production cow herds as well as in problematic cow herds.

KEY WORDS: : bull, semen, insemination, flow-cytometry, quality standards