

ZHODNOTENIE VYBRANÝCH REPRODUKČNÝCH UKAZOVATEĽOV BROJLEROVÝCH KRÁLIČÍC PO OVPLYVNEŇÍ INSEMINAČNEJ DÁVKY HEPARÍNOM

REPRODUCTION PERFORMANCE OF RABBIT DOES BY INCUBATED SEMEN WITH HEPARIN

¹Fik, M. - ²Parkanyi, V. - ²Rafay, J. - ²Ondruška, Ľ. - ¹Točka, I.

¹Department of Poultry Science and Small Animal Husbandry, Faculty of Agrobiological and Food resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, e-mail: martin.fik@uniag.sk

²Department of Small Animal Husbandry, Research Institute for Animal Production in Nitra

The aim of the study was to evaluate the effect of incubation semen with heparin (25 000) in insemination dose on fertility rate of inseminated does, period of pregnant and on the weight of live-born young per litter. The does of strain hycole, P91 and M91 were used in experiment. Experimental does were inseminated with ID 0,5 cm³ with the concentrations of spermatozoa from 40 to 50 x 10⁶/cm³. Experimental semen was incubated by heparin (0,06 microliter. per 1 inseminated dose). Control semen was incubated without heparin. In control part of experiment were used the same volume of ID, however without heparin. Incubation of semen dose with and without heparin was up to 1 hour. Rabbit does were inseminated after standard hormonal treatment. The experimental group showed better result in conception rate and had shorter pregnant period. The weight of liveborn pups had no statistical effect. The data were evaluated by statistical method ANOVA in statistic programme Microsoft Excel.

Key words: Rabbit, insemination, conception of rabbit, incubated by heparin, capacitation by heparin.

ÚVOD

Umelá inseminácia sa postupne stáva bežnou praxou v komerčnom chove králikov (Carluccio et al., 2004). Táto metóda ponúka významný pokrok, vrátane genetického výberu, dlhotrvajúcu plodnosť aj v priebehu nepriaznivých období roku. Zabezpečuje cyklickú produkciu, účinnejšie chovné programy zvierat a zlepšenie zdravia (Bergonzoni et al., 1994). Parkányi et al (2005) zaznamenali lepšie výsledky v koncepcionom pomere i v ostatných reprodukčných parametroch pri ovplyvnení kapacitácie spermíí dimethylsulfidom. Ďalej autori poznamenávajú, že ovplyvnením rýchlosti kapacitácie spermíí je možné zvýšiť koncepcioný pomer.

Mnohé štúdie ukazujú, že heparín ako glycosaminoglycans (GAG) má rovnakú úlohu pri kapacitácii ako lysophosphatidylcholín (Handrow et al., 1982, Parrish et al., 1989). Pri inkubácii ejakulátu s GAG prebieha kapacitácia v kratšej časovej perióde než v prítomnosti lysophosphatidylcholínu v podmienkach in vivo (Parrish et al., 1988). Miller et al (1990) a Thérien et al (1995) dokázali, že GAG moduluje kapacitáciu binding proteínov v membráne spermíí. Lane et al (1999) prehodnotili 2 kapacitačné média, a to heparín a vysokú hustotu lipoproteínu (HDL). Umyté býčie spermie boli inkubované heparínom (12 µg/ml⁻¹) a HDL (10 - 160µg/ml⁻¹). Z pokusov zistili, že heparín a HDL sú vhodnými médiami pre kapacitáciu spermíí, avšak s odlišnými mechanizmami. Proteíny býčej seminálnej plazmy podporujú kapacitáciu býčích spermíí v prítomnosti heparínu (Thérien et al., 1995) a vysokej hustoty lipoproteínu (Thérien et al., 1997). Parrish et al. (1988) uvádzajú, že inkubácia spermíí

s heparínom v dávke $10 \mu\text{g}/10 \text{ ml}^{-1}$ zvyšuje % oplodnených oocytov, ale tieto spermie museli byť inkubované najmenej 4 hodiny pred splynutím gamét. Uysal, et al (1990) porovnávali dve kapacitačné média a to heparín a kofeín. Pri svojich štúdiách označili heparín ako viac pohotovosť a lepšie médium ako je kofeín pre kapacitáciu zmrazených králičích spermií.

Chauhan, et al. (1990) ich štúdie demonštrujú, že kapacitácia byvolích spermií pri heparíne vyžaduje 8 hodinové vystavenie spermií heparínu $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ semena pre maximálnu akrozomálnu reakciu. Chauhan, et al, (1990) uvádzajú, že inkubácia spermií s heparínom zvyšuje koncepcnú schopnosť in vitro dospievania oocytov a ich následný rozvoj až do štádia morula/blastocysta. Glycosaminoglycan, ktorý je prítomný v samičom genitálnom trakte (LEE a AX. 1984), spája býčie spermie ako typický ligand receptor interakcie, podporujúci kapacitáciu (AX a LENZ, 1987, Parrish et al 1988). Heparín vyvoláva kapacitáciu a zvyšuje intracelulárnu koncentráciu vápnika prostredníctvom aktivácie prúdu vápnika (Córdoba et al, 1997). Fik, et al. (2008) testovali vplyv implementora heparínu o koncentrácií $0,06 \mu\text{l}/\text{ml}^{-1}$ semena. Skupina samíc, u ktorej bol do inseminačnej dávky pridaný heparín dosiahla koncepcný pomer 70,06 % oproti 55,94 % v kontrolnej skupine. V počte mŕtvo-narodených mláďat zaznamenali autori len minimálne rozdiely. V skupine samíc inseminovanej s prídavkom implementora heparínu zistili priemerný počet živo-narodených mláďat na 1 inseminovanú samicu 6,28 ks oproti 4,89 ks v kontrolnej skupine.

Fik et al. (2008) konštatujú, že použitie heparínu v inseminačnej dávke nezvyšujú počet mŕtvo narodených mláďat, štatisticky preukazne však zvyšuje počet narodených mláďat.

Rafay (1993), Rafay (2002) uvádza, že gravidita u brojlerových králičíc trvá 28 až 31 dní. Pri turnusovej inseminácii kotenie na farmách trvá zvyčajne 3 dni. Po troch dňoch nevykoteným samiciam sa podá oxitocín. Po podaní oxitocínu sa samice okotia zvyčajne do 15 až 30 minút.

Mnohí autori prezentujú práce zvýšenia koncepcného pomeru u hovädzieho dobytku a iných hospodárskych zvierat, avšak podobné práce takmer úplne absentujú u brojlerových králikov.

Cieľom našej práce bolo zhodnotiť vplyv implementora heparínu v inseminačnej dávke na koncepcný pomer, hmotnosť živo-narodených mláďat a dĺžku gravidity brojlerových králičíc.

MATERIÁL A METODIKA

Experimenty boli vykonané na dvoch farmách na zvieratách brojlerových hybridov HYCOLE, M91 a P91. Jednotlivé ukazovatele fariem sú uvedené v tabuľke 1.

Kŕmenie samíc bolo zabezpečované ad libitum granulovanou kŕmnom zmesou s deklarovým zložením jednotlivých živín. Samice boli inseminované po hormonálnom ošetrení látkou na báze PMSG, dávkou $0,5 \text{ ml}$ heteroskopického ejakulátu/1 samicu. Po deponácii inseminačnej dávky do pohlavných orgánov bola samiciam intramuskulárne podaná látka na báze GnRH na vyvolanie ovulácie.

Semeno bolo v koncentrácií spermií $40 - 50$ miliónov $/\text{ml}^{-1}$. Zo semena o danej koncentrácií sme si odobrali potrebné množstvo pre pokusnú skupinu, do ktorého sme pridali $0,06 \mu\text{l}$ heparínu ($25\ 000$)/ $0,5\text{ml}^{-1}$ semena, čo predstavovalo inseminačnú dávku pre 1 samicu. Po pridaní heparínu bolo semeno premiešané a inkubované do 1 hodiny pri teplote 22°C . V rámci hodnotenia výsledkov reprodukčného procesu sme sa zamerali na sledovanie koncepcného pomeru, dĺžku gravidity samíc a úroveň hmotnosti živo-narodených mláďat. Hmotnosť mláďat sme zisťovali vážením celých vrhov na digitálnych váhach s presnosťou na 1 g. Dosiahnuté výsledky boli štatisticky spracované pomocou programu Microsoft Excel.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky jednotlivých sledovaných ukazovateľov sú zobrazené v tabuľke 2.

Pri zhodnotení koncepcného pomeru sme zaznamenali zlepšenie v prospech experimentálnych skupín samíc, kde bol použitý implementor heparín. V experimente 1 sme zaznamenali koncepcný pomer 91% v pokusnej skupine oproti 88,7 % v kontrolnej skupine.

V experimente 2 dosiahol koncepcný pomer hodnotu 71 % v pokusnej skupine s heparínom a 52 % v kontrolnej skupine. Zlepšenie koncepcného pomeru pri použití implementora heparínu uvádzajú aj Fik et al. (2008), Parrish et al. (1988) a Chauhan et al. (1990). Zvýšenie koncepcného pomeru prostredníctvom ovplyvnenia kapacitácie králičích spermí uvádzajú aj Parkányi et al. (2005).

Pri zhodnotení dĺžky gravidity sme zaznamenali v experimente 1 v pokusnej skupine 89 % samíc okotených do 32. dňa po inseminácii oproti 61,7 % samíc okotených do 32. dňa v kontrolnej skupine. V experimente 2 v pokusnej skupine sme zistili 87,5 % samíc okotených do 32. dňa gravidity oproti len 20,8 % samíc okotených do 32. dňa po inseminácii v kontrolnej skupine.

Pri zhodnotení úrovne hmotnosti živo-narodených mláďat sme zaznamenali v pokusnej skupine s heparínom v experimente 1 priemernú hmotnosť mláďat 59,7 g, čo predstavuje nižšiu úroveň ich hmotnosti v porovnaní s kontrolnou skupinou, kde sme zaznamenali hmotnosť 62,4 g. V experimente 2 úroveň ich hmotnosti dosiahla hodnotu 60,4 g v pokusnej skupine a 62,3 g v kontrolnej skupine.

Pri hodnotení rozdielov v úrovni živej hmotnosti sme nezaznamenali štatisticky významné rozdiely medzi pokusnými a kontrolnými skupinami.

ZÁVER

Na základe zhodnotenia jednotlivých ukazovateľov reprodukcie po ovplyvnení inseminačnej dávky implementorom heparínom môžeme konštatovať, že heparín pridaný do inseminačnej dávky v množstve 0,06 μ l /0,5ml inseminačnej dávky/ samicu zvyšuje koncepcný pomer a urýchľuje kotenie sa samíc. Zaznamenali sme aj nižšiu úroveň hmotnosti živo-narodených mláďat v pokusných skupinách samíc, kde bol použitý implementor heparín, avšak tento rozdiel nebol štatisticky významný. Úroveň nižšej živej hmotnosti mláďat po narodení si vysvetľujeme kratším obdobím gravidity.

Práca bola riešená v rámci výskumného projektu VEGA 10074/08.

LITERATÚRA

1. AX RL, LENZ RW .1987. *Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls.* J Dairy Sci, 70: 1470-1486.
2. BERGONZONI, M. L. - ZAMBELLI, D. – SAMOGGIA, G. 1994. Influenza del diluitore, della temperatura e del periodo di conservazione del seme nella F.A. cunicola. In: Coniglicoltura Ricerca, vol . 4, 1994, p. 37- 40.
3. CARLUCCIO, A. - ROBBE, D. - DE AMICIS, I. - CONTRI, A. - TOSI, U.- RUSSO, F. - PEAOLETTI, M. 2004. Artificial insemination in rabbits: Laboratory and field trial with three different semen extenders. In: World Rabbit Sci., vol. 12, 2004, no. 4, p. 65-79.
4. CÓRDOBA M, SANTA COLOMA TA, BEORLEGUI NB, BECONI MT (1997). *Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm.* Biochem Mol Biol Int, 41(4): 725-733.
5. FIK, M. – PARKÁNYI, V. – ONDRUŠKA, L. – TOČKA, I. 2008. Zhodnotenie vybraných reprodukčných parametrov u brojlerových králičíc po ovplyvnení inseminačnej dávky implementorom heparínom. II. Medzinárodné vedecké hydinárske dni. Zborník abstraktov. Slovenská poľnohospodárska Univerzita Nitra. ISBN 978-80-552-0101-6, s 59

6. HANDROW, R. R. - LENZ, R. W. - AX, R.L. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote acrosome reaction in bovine spermatozoa. In: Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, vol. 107, p. 1326-1332.
 7. LEE MA, AX RL (1984). *Concentrations and compositions of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract*. Dairy Sci, 67: 2006-2009.
 8. MILLER, D.J. - WINER, M.A. - AX, R.L. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. In: Biol. Reprod., 1990, vol. 42, p. 899-915.
 9. PARRISH, J. J. - SUSKO-PARRISH, J. L. - WINER, M. A. - FIRST, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. In : Biol. Reprod., 1988, vol. 38, p. 1171 – 1180.
 10. PARRISH, J. J. - SUSKO-PARRISH, J. L. - HANDROW, R.R. - SIMS, M. M. - FIRST, N.L. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. In: Biol. Reprod., 1989, vol. 40, p. 1020-1025.
 11. PARKÁNYI V. – ONDRUŠKA Ľ. – RAFAY J. 2005. Zvýšenie koncepcného pomeru ovplyvnením kapacitácie spermií. Sborník referátů VIII. celostátního semináře: Nové směry v chovu brojlerových králiků. Česká zemědělská univerzita, Praha, VÚŽV Praha-Uhřetěves, 16.11.2005. ISBN 80-86454-63-0, s. 32-37.
 12. RAFAY, J. 1993. Intenzivny chov brojlerových králikov. Animapress. ISBN 80-85567-01-6, s 99-109.
 13. RAFAY, J. 2002. Chov brojlerových králikov. Levice: ZCHBK, 2002, 52 s.
 14. THÉRIEN, I. - BLEAU, G. - MANJUNATH, P. 1995. Phosphatidylcholin-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. In: Biol. Reprod., 1995, vol. 53, p. 1372-1379.
 15. THÉRIEN, I. - SOUBEYRAND, S. - MANJUNATH, P. 1997. Major proteis of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. In: Biol. Reprod., 1997, vol. 57, p. 1080-1088.
 16. UYSAL, O. – DEMIRAL, O. – AKCAY, E. – YILDIZ, S. – (1990) In vitro capacitation of frozen rabbit spermatozoa.
http://www.scopus.com/scopus/record/display.url?view=basic&eid=2-s2.0-0141425819&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=rabbit&st2=heparin+AND+capacitation&sid=vN6eOKh8_NUjL4qk8O7ZRwI%3a60&sot=b&sdt=b&sl=67&s=%28TITLE-ABS-KEY%28rabbit%29+AND+TITLE-ABS-KEY%28heparin+AND+capacitation%29%29&relpos=2
 17. CHAUHAN, M. S. – SINGLA, S. K – MANIK, R. S. – MADAN, M. L. 1990. Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and in vitro fertilization
http://www.scopus.com/scopus/record/display.url?view=basic&eid=2-s2.0-0031243431&origin=reflist&sort=plf-f&src=s&st1=rabbit&st2=heparin+AND+capacitation&sid=vN6eOKh8_NUjL4qk8O7ZRwI%3a60&sot=b&sdt=b&sl=67&s=%28TITLE-ABS-KEY%28rabbit%29+AND+TITLE-ABS-KEY%28heparin+AND+capacitation%29%29
-

Prehľad základných údajov fariem, na ktorých prebiehal výskum

Tabuľka 1

	Lokalita farmy	Zameranie farmy	Počet chovných samíc v ks	Dosahovaný koncepcný pomer v %	Technológia ustajnenia	Fotoperiod. režim	Teplota prostredia v ° C	Vlhkosť v %	Inseminácia v dňoch post partum	Počet samíc v pokusnej skupine	Počet samíc v kontrolnej skupine
Experiment 1	Juhozápadné Slovensko	komerčné	1800	86 - 90	Kaskádovité uspor. kliebok	7 dní pred insemináciou 16:8	18 (17 – 20)	70	19	100	168
Experiment 2	Juhozápadné Slovensko	experimentálne	500	60 - 65	Flat deck	16:8	18 (13 – 20)	70	11	21	55

Prehľad výsledkov sledovaných ukazovateľov

Tabuľka 2

	Skupina samíc	Počet samíc v skupine	Koncepcný pomer v %	Priemerná hmotnosť živo-narodených v g	% samíc okotených do 32. dňa gravidity
Experiment 1	Pokusná s heparínom	100	91	59,7	89
	Kontrolná	168	88,7	62,4	61,7
Experiment 2	Pokusná s heparínom	21	71	60,4	87,5
	Kontrolná	55	52	62,3	20,8