

SÜGAVKÜLMUTATUD/SULATATUD SPERMIDE KVALITEEDINÄITAJATE SEOS SESOONSUSE JA SUGUPULLI VANUSE NING EMASLOOMADE TIINESTUMISEGA

Peeter Padrik^{a,b*}, Triin Hallap^b, Tanel Bulitko^a, Ülle Jaakma^b

^a Eesti Tõuloomakasvatavate Ühistu, 79005 Keava, Eesti

^b Sigimisbioloogia osakond, Veterinaarmeditsiini ja Loomakasvatuse Instituut, Eesti Maailikool, Kreutzwaldi 62, 51014 Tartu, Eesti

*tel. +3727313466; fax +3727313706; e-mail: peeter.padrik@mail.ee

ABSTRACT. Influence of bull age and season to frozen-thawed semen quality and fertility. The aim of the current study was to investigate the influence of season and bull age to sperm motility, membrane integrity, membrane lipid architecture status and mitochondrial membrane potential characteristics in frozen-thawed (FT) semen, collected from Estonian Holstein (EHF) bulls. Forty five ejaculates from 15 (1–7 years) EHF bulls were examined for motility (objectively using a computer assisted motility analyzer (CMA)), hypo-osmotic swelling (HOS), membrane lipid architecture status (Merocyanine 540 staining) and mitochondrial membrane potential (MitoTracker Deep Red 633 staining). Stained spermatozoa were assessed by FCM (flow cytometry). The results of the study showed that the increase in bulls' age from 1–2 years to 5–7 years was accompanied by the increase in general motility (GMot), membrane stability (LSM) and mitochondrial activity (MTDR-H) ($P < 0.05$), curve line velocity (VCL; $P < 0.01$), linearity (LIN) and amplitude of lateral head displacement (ALH; $P < 0.001$) on batch level. The quality of spermatozoa in FT samples varied between the seasons. The mean values for VCL, ALH and MTDR-H were higher in winter and autumn on both batch and bull level ($P < 0.05$). In relationship with NRR (non-return rate 60-day), strongest correlation was obtained for the ALH results on bull level ($P < 0.001$). We conclude that the bulls' age and season of semen collection have an effect on sperm quality parameters. Frozen/thawed sperm motility parameters, LSM and MTDR-H are related to NRR of cows and heifers and could be used for the prediction of bull's fertility.

Key words: Bull, Sperm quality, Age, Season, Fertility

Sissejuhatus

Piimatootmise efektiivsus ei sõltu ainult väärtusliku geneetilise materjali olemasolust, vaid ka paljudest teisest faktoritest, mille hulgas on tähtsal kohal lehmade optimaalne poegimisvahemik. Lehmade edukat tiinestamist pärast poegimist mõjutab oluliselt sügavkülmutatud pullisperma kvaliteet. Sügavkülmutatud pullisperma kvaliteeti mõjutavad omakorda mitmed tegurid nagu aastaaeg, millal sperma varuti (Mandal *et al.*, 2003; Padrik, Jaakma 2004; Koivisto *et al.*, 2009), sugupulli vanus (Pant *et al.*, 2003; Hallap *et al.*, 2004; Helbig *et al.*, 2007) jt. Samuti on selgunud et, mida rohkem on kvaliteedinäitajaid sügavkülmutatud/sulatatud spermide

kohta, seda täpsemalt võib nende põhjal prognoosida spermide viljastamisvõimet (Rodriguez-Martinez, 2006; Rodriguez-Martinez and Barth, 2007). Kuigi paljud seemendusjaamade laborid on juba varustatud uuemate spermide funktsionaalsete omaduste hindamise tehnoloogiatega nagu liikuvuse kompuuteranalüüs (CASA), mis muudab labori töö oluliselt efektiivsemaks ja objektiivsemaks, jääb ainult selle kasutamine siiski ühekülgses, sest põhineb vaid spermide liikumisomadustel, samuti on hinnatavate spermide arv väike (ca 500 rakku). Uute, suurema jõudlusega meetodite juurutamine nõuab aga kõigepealt seniste, juba kasutusel olevate meetodite võrdlust uutega. Vajalik on testida uute meetodite sobivust nii seemendusjaama igapäevatoösse kui ka nende perspektiivikust emasloomade tiinestumise prognoosimisel.

Paljud autorid on oma uuringutes näidanud voolutsütomeetria efektiivsust ja täpsust spermide kvaliteedi hindamisel (Hallap *et al.*, 2006; Kasimanickam *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2007). Selle tehnoloogia puhul hinnatakse ühe analüüsiga keskmiselt 10000 rakku kiirusega 200 rakku/s. Kui spermide liikuvuse hindamine CASA abil annab objektiivse ülevaate nii värske kui ka sügavkülmutatud/sulatatud sperma kvaliteedist (Muiño *et al.*, 2008) ning selle tulemused korreleeruvad hästi emasloomade tiinestumisega (Januskauskas *et al.*, 2003), siis voolutsütomeetriliseks analoog-testiksi spermide funktsionaalsuse hindamiseks oleks spermis keskosas asuvate mitokondrite membraanipotentsiaali (MMP) määramine. Kõrge MMP viitab intensiivsele energia tootmisele, mida spermatoosoid vajab edasilikumiseks teel viljastuspaika (Vishwanath *et al.*, 1986; Hua *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Hallap *et al.* (2005) täheldas oma uurimistöös, et spermide mitokondriaalse aktiivsuse määramine MitoTracker Deep Red 633 ja voolutsütomeetri abil oli igati sobilik spermide liikumisvõime kaudselt hindamiseks kuna korreleerus hästi CASA tulemustega.

Spermimembraani funktsionaalse terviklikkuse hindamiseks on mitmeid võimalusi: traditsiooniline hypo-osmootne test (Jeyendran *et al.*, 1984), selle modifikatsioonid (Padrik, 1999; Petrunkina *et al.*, 2001; Amorim *et al.*, 2009), spermide värvimine fluorestseeruvate kemikaalidega (Brito *et al.*, 2003) jne. Sügavkülmutatud/sulatatud spermide membraanide terviklikkuse kõrval on membraani stabiilsus oluliseks kvaliteedinäitajaks spermide funktsionaalsuse hindamisel (Hallap *et al.*, 2005). Selle määramise üheks võimaluseks on kasutada Merocyanine 540 (M540) värvingut ja voolutsütomeetriat, mis võimaldab kindlaks teha, kui suurel määral on toimunud fosfolipiidide ümberpaigutamine

spermimembraani siseselt. Merocyanine 540 värvimisel suureneb fluorestsents vastavalt sellele, mida rohkem on membraanis ümberpaigutunud fosfolipiide (Harrison *et al.*, 1996).

Kui eelnevates uuringutes (Padrik *et al.*, 2000; Padrik, 2001; Padrik, Jaakma 2002; 2004) oleme välja selgitanud pulli vanuse ja aastaaja mõju spermide morfoloogilisele kvaliteedile ning liikuvusparameetritele, siis käesoleva uuringu põhirõhk on suunatud uutele, suurema jõudlusega sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteeti hindavatele meetoditele ning spermi teiste funktsionaalsusparameetritele nagu membraani stabiilsus ja mitokondriaalne aktiivsus.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada pulli vanuse ja sperma kogumise aastaaja mõju eesti holsteini tõugu pullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide membraani terviklikkusele, liikumiskarakteristikutele, spermimembraani stabiilsusele ja mitokondriaalsele aktiivsusele ning nende näitajate seost emasloomade tiinestumisega

Materjal ja meetodika

Pullid, varutud ejakulaadid ja sperma töötlemine

Selgitamiseks sugupulli vanuse mõju sügavkülmutatud/sulatatud sperma kvaliteediparameetritele uuriti 15 sugupulli 45 ejakulaati. Pullid jaotati kolme gruppi: 1–2 aastased (7 pulli), 3–4 aastased (6 pulli) ja 5–7 aastased (2 pulli).

Sperma kogumise aastaaja mõju kindlakstegemiseks uuriti 15 pulli 45 ejakulaati. Sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedinäitajaid määrati talvel (detsember, jaanuar, veebruar), kevadel (märts, aprill, mai), suvel (juuni, juuli, august) ja sügisel (september, oktoober, november).

Spermide liikumiskarakteristikute, osmoresistentuse, spermimembraani stabiilsuse, mitokondrite aktiivsuse ja tiinestumise vaheliste seoste kindlakstegemiseks uuriti 13 sugupulli 36 ejakulaati. Nendest ejakulaatidest valmistatud spermadoosidega tehti 2828 katseseemendust (keskmiselt 218 seemendust pulli kohta ja 79 seemendust ejakulaadi kohta) 4 erinevas karjas 4 erineva seemendustehniku poolt ühe kalendriaasta jooksul (1999 ja 2001 aastal). Tiineks loeti emasloomad, kes ei innelnud uuesti 60 päeva jooksul pärast seemendamist (NRR-60). Tiinestusandmeid ei korrigeeritud olenevalt aastaajast, piirkonnast ja karjast. Erinevate ejakulaatide NRR-60 varieerus 22.8 kuni 80.0%-ni.

Sperma lahjendamiseks kasutati Triladyl'i (*Minitüb GmbH&CO, Germany*) ja munarebu (Kehtna Mõis OÜ, Eesti) lahjendit. Värske sperma lahjendati pärast viieminutilist temperatuuride ühtlustamist lahjendi ja sperma vahel (+35°C vesivannis) vahekorras 1:1. Teine lahjendamine toimus 15 minutit hiljem toatemperatuuril (+20°C). Lahjendit lisati niipalju, et ühte seemendusdoosi jääks ~30×10⁶ spermi. Seejärel asetati lahjendatud sperma külmikusse (+4°C). Kahetunnilise jahutamise järel pakendati sperma 0.25 ml spermakõrrekestesse (*Minitüb GmbH&CO, Germany*). Pärast kahetunnilist

ekvilibreerumist spermakõrrekesed sügavkülmutati ning säilitati vedelas lammastikus –196°C juures.

Spermide membraani terviklikkuse määramine

Funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermide osakaalu määramiseks kasutati traditsioonilist hüpoosmootset testi HOT (Jeyendran *et al.*, 1984). Kaks spermakõrrekest sulatati +35°C juures vesivannis 20 sekundi jooksul ja tühjendati katseklaasi 1 ml HOT lahusesse (0.735 g naatriumsitraati (*Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany*), 1.351 g fruktoosi (*Merck KGaA, Germany*), 100 ml destilleeritud vett; lahuste osmootne rõhk 150mOsm, kg⁻¹). Pärast hoolikat segamist vorteksi loksutis (*VORTEX, Europe*) asetati katseklaas termostaati (*Memmert GmbH, Germany*) ning inkubeeriti 60 minutit +37°C juures. Seejärel lisati katseklaasi 0.3 ml eosini (0.99%, *Pioneer Research Chemicals, Ltd. England*), valmistati märgpreparaat ja loendati pundunud sabaga spermid 1000–kordsel suurendusel faaskontrastmikroskoobis (*Olympus BX40, Japan*). Igast preparaadist loendati 100 spermi ning pundunud spermide osakaal avaldati protsentides kahe preparaadi keskmisena.

Spermide liikumiskarakteristikute määramine

CASA abil

Spermide liikumiskarakteristikud sügavkülmutatud/sulatatud pullispermis määrati kompuuteranalüüsi (*Computer Assisted Cell Motion Analyser, Sperm Vision, Minitüb GmbH&CO, Germany*) abil. Spermakõrreke sulatati +35°C juures 20 sekundi jooksul ja uuriti Makleri kambris (*Makler Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel*) 400× suurendusel iga proovi 4–5 erinevalt väljalt kokku ~400 spermi. Määrati järgmised näitajad: liikuvate spermide (LS) % / *Motility (GMot %)*; otseliikuvate spermide % (OLS); %/*Progressive Motility (PMot %)*; spermide kiirus liikumistekonnal (SKL, µm/s) /*Velocity Curve Line (VCL, µm/s)*; spermide otseliikuvus (SOL, SKS/SKL) /*Linearity LIN (VSL/VCL)*; spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist (SKA, µm) /*Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH, µm)*.

Spermimembraani stabiilsuse määramine

Spermimembraani stabiilsuse (ESM) määramiseks valmistati 1mM *Merocyanine 540 (M-540; Molecular Probes, M24571, Leiden, Holland)* ja 25 µM *Yo-PRO 1 (Molecular Probes, Y3603 Leiden, The Netherlands)* põhilahused dimetüülsulfoksiidis (*DMSO; Applichem, Germany*). Pestud spermidele lisati 25 nM *Yo-PRO 1* ja inkubeeriti 38°C juures pimedas 9 min (Harrison *et al.*, 1996). Seejärel lisati 10 µL 40 µM *M-540* lahust *SP-TALP*-is, et saada lõplik *M-540* kontsentratsioon 2.7 µM ja segati 10 s. enne voolutsütomeetris (*FacsCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA*) analüüsimist. Andmete kogumist alustati 60 sekundit pärast *M-540* lisamist. Mõõtmised tehti voolutsütomeetriga, mis oli varustatud standardsete optiliste laseritega. *Merocyanine-540* ja *Yo-PRO 1* ergastati argoonioon 488 laseriga 15 mW juures. Otse- ja kõrvalhajuvuse väärtused toodi lineaarskaalale ja

fluorestseeruvad väärtused logaritmiskaalale. Maksimaalse tundlikkuse jaoks sätestati neeldunud kiirguse ala, et saavutada L-kujuline otsevalgus (hajuv/külgsuunaline valgus hajutab spermide jaotumise). *Yo-PRO 1* fluorestsents määrati detektoris *FL 1* (530/28nm BP), samal ajal kui *M-540* fluorestsents määrati detektoris *FL 2* (585/2 nm BP). Igast spermaproovist tehti 10000 mõõtmist, voolukiirusega ca 200 rakku/s. Kasutati *CellQuest Pro* tarkvara (*Becton Dickinson, San Jose, USA*). Punkt-diagrammid autonoomseteks analüüsideks tehti *WinMDI 2.8* abil (free software by J. Trotter, available at <http://facs.scripps.edu/software.html>). Detektorite *FL 1/FL 2* (*Yo-PRO 1/M-540*) kohta koostati punktdiagrammide ala, et diferentseerida elusad stabiilse plasmamembraaniga ESM (*Yo-PRO 1* negatiivne ja *M-540* negatiivne); elusad ebastabiilse plasmamembraaniga EVM (*Yo-PRO 1* negatiivne ja *M-540* positiivne) ja surnud spermid (*Yo-PRO 1* positiivne).

Spermide mitokondriaalse aktiivsuse määramine

Spermide mitokondriaalse aktiivsuse (KMA) määramiseks kasutati Hallap *et al.* (2005) poolt kirjeldatud meetodikat. Mõõdistamised tehti *FacsCalibur* voolutsütomeetris (*Becton Dickinson, San Jose, USA*). *SYBR-14* (*Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA*) värvain ergastati 15 mW argooniooni 488 nm laseriga, samal ajal kui *MitoTracker Deep Red* ergastati 17 mW *HeNe* 633 nm laseriga. *SYBR-14* fluorestsents (tervikliku plasmamembraaniga rakud) määrati kindlaks detektoris *FL 1* (530/28 nm) ja *MitoTracker Deep Red* fluorestsents (kõrge mitokondriaalne aktiivsus) määrati kindlaks detektoris *FL 3* (670 LP). Otse- ja kõrvalhajuvuse väärtused loodi lineaarskaalal ja fluorestseeruvad väärtused logaritmiskaalal. Tasakaalustamine tehti vastavalt Roedererile (2000). Kasutati *CellQuest Pro* tarkvara (*Becton Dickinson, San Jose, USA*). Voolutsütomeetrit kasutati madalal voolukiirusel (6–24 $\mu\text{L}/\text{min}$). Tehti ~10000 *SYBR-14*-positiivset mõõtmist ja andmed salvestati tulevasteks analüüsideks. Punktogramm FL1/FL2 eristati spermid muudest partiklitest *SYBR-14* fluorestsentsi (DNA sisaldus) alusel. Punktogramm FL1/FL3 määrati kindlaks madala (MMA) ja kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid (KMA).

Statistiline analüüs

Uuringute tulemuste statistilises analüüsis kasutati erinevuste olulisuse hindamiseks *t*-testi ja dispersioonanalüüsi. Tunnustevahelised erinevused loeti tõenäoseks, kui $P < 0.05$ (* kui $P < 0.05$; ** kui $P < 0.01$; *** kui $P < 0.001$). Tunnustevaheliste seoste hindamiseks kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat. Tunnustevahelist seost loeti järgnevalt: nõrk seos, kui $|r| \leq 0.3$; keskmine seos, kui $0.3 < |r| < 0.7$; tugev seos, kui $|r| \geq 0.7$.

Tulemused

Pulli vanuse mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele

Erinevas vanuses sugupullidelt kogutud sperma analüüs näitas, et vanuse suurenedes paranesid oluliselt mitmed spermide liikumisparameetrid (tabel 1). Nii oli liikuvate spermide osakaal ejakulaatide lõikes 5–7 ja 3–4 aastastel pullidel oluliselt suurem võrreldes 1–2 aastaste pullidega ($P < 0.05$). Spermide kvaliteedinäitajad SKL, SOL ja SKA olid samuti kõrgemad 3–4 ja 5–7-aastaste pullide vanusegrupis, erinedes oluliselt (vastavalt; $P < 0.01$; $P < 0.001$; $P < 0.001$) 1–2-aastaste pullide sügavkülmutatud/sulatatud sperma samadest näitajatest. Samuti selgus, et ka sperma plasmamembraani stabiilsus ja mitokondrite aktiivsus olid ejakulaatide lõikes oluliselt kõrgemad 5–7 aastastel pullidel erinedes 1–2 aastaste pullide samadest näitajatest ($P < 0.05$) ning 3–4 aastaste pullide tulemustest ESM osas ($P < 0.05$).

Funktsionaalselt teravikliku membraaniga spermide osas ei leitud vanusegruppide vahel statistilist erinevust, kuigi näitaja oli parem 1–2 aastastel pullidel. Uurimistulemustest selgus, et pullide lõikes olid vanusegruppide vahelised erinevused statistiliselt nõrgemini väljendunud, kuid järgisid üldjoontes samu trende kui ejakulaatide vahelises võrdluses. Oluliselt kõrgemad olid SKL ja SKA väärtused 3–4 ja 5–7-aastaste pullide vanusegrupis võrreldes 1–2-aastaste pullidega kusjuures statistiline erinevuste tõenäosus oli vastavalt $P < 0.05$ ja $P < 0.01$. Samas oli spermide SOL oluliselt suurem 1–2 aastaste pullidel võrreldes 3–4 aastastega ($P < 0.01$) ja 5–7-aastastega ($P < 0.05$).

Tabel 1. Pulli vanuse mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedile ejakulaatide lõikes
Table 1. Influence of bulls' age on frozen/thawed sperm quality characteristics; batch level (means±S.D.)

Spermide kvaliteedinäitajad <i>Sperm quality characteristics</i>	Pulli vanus aastates/ <i>Age of bulls (year)</i>		
	1–2	3–4	5–7
Ejakulaate/ <i>No of ejaculates</i>	<i>n</i> =19	<i>n</i> =17	<i>n</i> =9
HOT(%) / <i>HOS</i> (%)	36.4 ± 9.3	31.2 ± 10.0	33.9 ± 9.8
LS(%) / <i>GMot</i> (%)	71.5 ± 12.3 ^b	78.9 ± 7.6 ^a	78.4 ± 9.2 ^a
OLS(%) / <i>PMot</i> (%)	55.1 ± 15.2	62.7 ± 7.7	61.7 ± 9.3
SKL (µm/sek) / <i>VCL</i> (µm/sec)	88.3 ± 7.9 ^c	100.7 ± 10.2 ^d	93.3 ± 3.9 ^d
SOL/ <i>LIN</i>	0.51 ± 0.04 ^f	0.45 ± 0.03 ^e	0.45 ± 0.03 ^e
SKA(µm) / <i>ALH</i> (µm)	2.7 ± 0.3 ^{c,f}	3.1 ± 0.3 ^e	3.0 ± 0.5 ^d
ESM(%) / <i>LSM</i> (%)	51.3 ± 20.8 ^a	55.6 ± 7.6 ^a	65.1 ± 11.8 ^b
KMA(%) / <i>MTDR-H</i> (%)	66.9 ± 23.7 ^a	78.4 ± 12.9	82.6 ± 7.6 ^b

HOT–funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermid LS–liikuvad spermid; OLS–otseliikuvad spermid; SKL–spermide kiirus liikumisteekon-
 nal; SOL–spermide otseliikuvus, SKA–spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist; ESM–elusad stabiilse membraaniga spermid;
 KMA–kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid;

HOS –intact plasma membranes; *Gmot*–general motile; *PMot*–progressively motile; *VCL*–curve line velocity; *LIN*–linearity; *ALH*–amplitude of
 lateral head displacement; *LSM*–live stable membrane; *MTDR-H*–high mitochondrial activity;

^{a, b, c, d, e, f} Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad/Values with different superscripts in a row are significantly
 different (^{a, b} –*P*<0.05; ^{c, d} –*P*<0.01; ^{e, f} –*P*<0.001).

Aastaaegade mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikutele.

Spermide liikumiskiirused SKL ja SKA olid ejakulaatide lõikes suve-, sügise- ja talvekuudel (*P*<0.05) oluliselt kõrgemad võrreldes kevadega, mitokondrite aktiivsus oli kõrgem sügis-talvisel perioodil võrreldes kevad-suvise perioodiga (*P*<0.05–*P*<0.001). Samuti näitasid sarnast tendentsi liikuvate ja otseliikuvate spermide mõõtmistulemused.

Pullide lõikes ilmnes taas, et enamus mõõdetud kvaliteediparameetritest olid sügis-talvisel perioodil kõrgemad võrreldes kevad-suvise perioodiga. Statistiliselt oluline erinevus ilmnes ainult sügisel varutud sperma kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermide osakaalu puhul võrreldes kevadel varutud spermide sama näitajaga (*P*<0.001).

Tabel 2 Aastaaegade mõju sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedile ejakulaatide lõikes
Table 2. Seasonal variation in frozen/thawed sperm motility characteristics on batches level (means±S.D.)

Spermide kvaliteedinäitajad / <i>Sperm quality characteristics</i>	Aastaaeg/ <i>Season</i>			
	<i>Kevad</i> <i>Spring</i> <i>n</i> =26	<i>Suvi</i> <i>Summer</i> <i>n</i> =7	<i>Sügis</i> <i>Autumn</i> <i>n</i> =3	<i>Talv</i> <i>Winter</i> <i>n</i> =9
HOT(%) / <i>HOS</i> (%)	34.8 ± 8.9	33.5 ± 11.5	30.0 ± 0	31.1 ± 11.6
LS(%) / <i>GMot</i> (%)	74.8 ± 10.9	71.4 ± 14.5	83.0 ± 6.3	79.3 ± 7.0
OLS(%) / <i>PMot</i> (%)	58.3 ± 12.5	55.1 ± 15.1	65.0 ± 7.5	63.4 ± 8.6
SKL (µm/sek) / <i>VCL</i> (µm/sec)	91.7 ± 10.0 ^b	98.03 ± 10.8 ^a	97.2 ± 4.4 ^a	100.0 ± 8.7 ^a
SOL/ <i>LIN</i>	0.49 ± 0.04	0.48 ± 0.07	0.44 ± 0.01	0.47 ± 0.03
SKA(µm) / <i>ALH</i> (µm)	2.8 ± 0.3 ^b	3.0 ± 0.4 ^a	3.0 ± 0.2 ^a	3.1 ± 0.3 ^a
ESM(%) / <i>LSM</i> (%)	56.1 ± 19.3	48.7 ± 20.6	67.5 ± 7.6	56.9 ± 10.9
KMA(%) / <i>MTDR-H</i> (%)	72.5 ± 18.8 ^{b,c}	63.9 ± 18.2 ^b	89.5 ± 1.5 ^{a,f}	82.9 ± 7.1 ^a

HOT–funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermid LS–liikuvad spermid; OLS–otseliikuvad spermid; SKL–spermide kiirus liikumisteekon-
 nal; SOL–spermide otseliikuvus, SKA–spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist; ESM–elusad stabiilse membraaniga spermid;
 KMA–kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid;

HOS –intact plasma membranes; *Gmot*–general motile; *PMot*–progressively motile; *VCL*–curve line velocity; *LIN*–linearity; *ALH*–amplitude of
 lateral head displacement; *LSM*–live stable membrane; *MTDR-H*–high mitochondrial activity;

^{a, b, c, d, e, f} Erinevate ülaindeksitega väärtused samas reas on statistiliselt erinevad/Values with different superscripts in a row are significantly
 different (^{a, b} –*P*<0.05; ^{c, d} –*P*<0.01; ^{e, f} –*P*<0.001).

Emasloomade tiinestumise ja sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedikarakteristikute vaheline seos

Sügavkülmutatud/sulatatud spermas määratud liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaalu ja emasloomade tiinestumise vahel oli keskmise tugevusega positiivne korrelatsioon nii pullide kui ka ejakulaatide lõikes (tabel 3). Spermide spetsiifiliste liikumiskarakteristikute osas

leiti keskmise tugevusega korrelatsioon SKA ja SKL ning emasloomade tiinestumise vahel. Kõige tugevam oli see näitaja SKA ja emasloomade tiinestumise vahel pullide lõikes *r*=0.77 (*P*<0.001). Uurimusest selgus, et ESM ning KMA ja emasloomade tiinestumise vahel ilmnes samuti oluline positiivne korrelatsioon (*P*<0.05; tabel 3) ejakulaatide lõikes.

Tabel 3. Emasloomade tiinestumise ja sügavkülmutatud/sulatatud spermide kvaliteedinäitajate vaheline seos
Table 3. Correlations between sperm quality characteristics in frozen/thawed semen and 60-days NRR

Spermide kvaliteedinäitajad/ Sperm quality characteristics	Tiinestumise %/60-days non-return rate (NRR)%	
	Ejakulaatide lõikes/ Batch level	Pullide lõikes/ Bull level
	n=36	n=13
	r	r
HOT(%)/ HOS(%)	0.10	0.01
LS(%)/ GMot(%)	0.70 ***	0.73 **
OLS(%)/ PMot(%)	0.64 ***	0.64 *
SKL(µm/sek)/ VCL (µm/sec)	0.67 ***	0.75 **
SOL/LIN	-0.49	-0.66
SKA(µm)/ ALH(µm)	0.63 ***	0.77 ***
ESM(%)/ LSM(%)	0.45 **	0.32
KMA(%)/ MTDR-H(%)	0.49 **	0.51

HOT–funktsionaalselt tervikliku membraaniga spermid; LS–liikuvad spermid; OLS–otseliikuvad spermid; SKL–spermide kiirus liikumistekonnal; SOL–spermide otseliikuvus; SKA–spermide kõrvalekaldeamplituud liikumistrajektorist; ESM–elusad stabiilse membraaniga spermid; KMA–kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermid; HOS–intact plasma membranes; GMot–general motile; PMot–progressively motile; VCL–curve line velocity; LIN–linearity; ALH–amplitude of lateral head displacement; LSM–live stable membrane; MTDR-H–high mitochondrial activity
 *($P<0.05$), **($P<0.01$), ***($P<0.001$).

Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada pulli vanuse ja sperma kogumise aastaaja mõju eesti holsteini tõugu pullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide membraani terviklikkusele, liikumiskarakteristikutele, spermimembraani stabiilsusele ja mitokondrite aktiivsusele ning määrata nende näitajate seos emasloomade tiinestumisega.

Meie uuringud näitasid, et kõige enam oli liikuvaid ja otseliikuvaid sperme sügavkülmutatud/sulatatud spermas 3–4- ja 5–7-aastaste pullide vanuserühmas võrreldes 1–2-aastaste pullidega, kuigi statistiline erinevus ilmnes ainult liikuvate spermide osas ejakulaatide lõikes ($P<0.05$). Mitmed autorid on ka varem täheldanud sugupulli vanuse ja spermide liikuvuse vahelist seost (Hallap *et al.*, 2004; Devkota *et al.*, 2008). Meie uuringust selgus, et ka spermide spetsiifilised liikuvusparameetrid SKL, SOL ja SKA kasvasid pulli vanuse suurenedes 1-aastast kuni 3–4-aastani ja sealt edasi kuni 5–7-aastani. Väikest langustendentsi 5–7-aastastel pullidel võrreldes 3–4-aastastega näitas SKL. Uuringust selgus samuti, et stabiilse membraaniga ja kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermide osakaal oli kõige suurem 5–7-aastaste pullide vanusegrupis. Ka Hallap *et al.* (2005) leidis oma uuringus, et pullide vanus mõjutab spermide mitokondriaalset aktiivsust, kuid ESM puhul ei olnud pullide vanusegruppide vahelist erinevust (Hallap *et al.*, 2006). Liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaalu suurenemine pulli vanuse suurenedes võib olla tingitud sugupulli jätkuvast kasvust ja arengust, millega kaasneb ka munandite kasv ja übermõõdu suurenemine. Devkota *et al.* (2008) ja Lozano *et al.* (2008) leidsid oma uuringutes, et munandite übermõõdu on tugevalt seotud sugupulli kehahassiga ja vanusega. Forsberg

(1996) ja Andrade *et al.* (2008) märkisid, et munandi übermõõdu suurenedes tõuseb ka testosterooni tase vereplasmas. Munandi übermõõdu suurenemine sugupulli kasvades ja vereplasma testosteroonisaldus mõjutab omakorda nii spermide morfoloogilist kvaliteeti kui ka spermide liikuvust (Pinho *et al.*, 2008; Devkota *et al.*, 2008). Üksikute sperma liikuvuskarakteristikute langustendents 5–7-aastaste sugupullide grupis võrrelduna 3–4-aastaste pullidega võib olla tingitud spermatogeneesi reguleerivate hormoonide – folliikuleid stimuleeriva hormooni, luteiniseeriva hormooni ja testosterooni (Hafez and Hafez, 2000) taseme langusest või kõikumisest (Forsberg, 1996) sugupulli vananedes.

Sperma kvaliteedi sõltuvust aastaegadest iseloomustasid spetsiifiliste liikuvusparameetrite suuremad väärtused sügis-talvisel perioodil võrreldes kevad-suvise perioodiga ($P<0.05$). Samas selgus, et kõige rohkem kõrge mitokondriaalse aktiivsusega sperme esines sügisel kogutud sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas, erinedes kõige enam kevadel varutud ejakulaatidest (16.0% võrra; $P<0.001$). Aastaaegade mõju spermide kvaliteedile on märkinud paljud autorid (Mandal *et al.*, 2003; Janett *et al.*, 2003a,b; Koonjaenak *et al.*, 2007a,b; Koivisto *et al.*, 2009). Janett *et al.* (2003a,b) leidis oma uuringus, et suvel oli liikuvaid ja morfoloogiliselt normaalseid sperme täkuspermas vähem kui teistel aastaegadel ($P<0.05$). Koonjaenak *et al.* (2007b), uurides vesipühvlite spermat, leidis, et spermide liikumiskiirus SKL oli juulis-oktoobris (vihmaperioodil) suurem kui suvisel perioodil (märts-juuni; $P<0.05$ – 0.001). Samast uurimisest selgus statistiline erinevus ka spermimembraani terviklikkuse ja stabiilsuse osas, mis oli talvisel perioodil (november-veebruar) parem võrreldes nii suvisel kui ka vihmaperioodiga. Mandal *et al.* (2003) märkis oma uurimuses, et pühvlite spermas oli liikuvate spermide osakaal talvisel perioodil (november-märts) suurem kui teistel aastaegadel. Muutused spermide kvaliteedinäitajate osas olenevalt aastaajast võivad olla tingitud asjaolust, et kevad-suvine temperatuuri tõus võib põhjustada mitmete hormoonide taseme kõikumist. Shubbur *et al.* (1989) leidsid oma uuringus, et testosterooni tase sugupulli vereplasmas oli kõige kõrgem detsembris. Park Yi, (2002), uurides kultide sperma kvaliteeti täheldas, et testosterooni tase oli kõige kõrgem kevadel ($P<0.05$) ning leidis samas, et ka spermide morfoloogia, liikuvus ja kontsentratsioon oli samuti kõrgeimad kevadel. Ax *et al.* (1987) andmeil põhjustab suvine kõrge temperatuur patoloogiliste spermide esinemissageduse suurenemist ja spermide liikuvuse vähenemist. Ka Godfrey *et al.* (1990) leidis, et testosterooni taseme kõikumine sugupulli vereplasmas sõltub aastaajast, kuid Koivisto *et al.* (2009) ei leidnud aastaegade mõju testosterooni taseme kõikumisele.

Meie uurimisest selgus, et sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas määratud liikuvate spermide osakaalu ja emasloomade tiinestumise vahel esines tugev korrelatsioon, seda nii ejakulaatide kui ka pullide lõikes (vastavalt $r=0.70$ ja $r=0.73$; $P<0.001$). Teiste hinnatud kvaliteedinäitajate (otseliikuvate spermide osakaal, SKL, SKA, ESM ja KMA) ja emasloomade tiinestumise vahel esines keskmine positiivne korrelatsioon. Ka

Correa *et al.* (1997) ja Januskauskase *et al.* (2003) poolt läbiviidud uurimustest selgus, et liikuvate spermide osakaal sügavkülmutatud/sulatatud spermas ja emasloomade tiinestumine on omavahel seotud (vastavalt $r=0.53$ ja $r=0.61$). Meie uuringust selgus, et nii spermimembraani stabiilsuse kui ka mitokondriaalse aktiivsuse ja emasloomade tiinestumise vahel ilmnes statistiliselt oluline positiivne korrelatsioon. Sarnaselt meie uuringule, leidis ka Kasai *et al.* (2002), uurides inimeste spermide *in vitro* viljastamisvõimet, et kõrge mitokondriaalse aktiivsusega spermidel on parem viljastamisvõime. Erinevalt meie uuringust selgunule ei leidnud Hallap *et al.* (2005, 2006) statistiliselt olulist korrelatsioon ESM ja KMA spermide ja emasloomade tiinestumise vahel. Seega on teadusandmed tihti vastuolulised ja tulemused sõltuvad uuritud populatsioonist, loomade ja spermipartiide arvust ning variatsioonist. Sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas olevate tervikliku membraaniga spermide osakaalu ja emasloomade tiinestumise vahel oli meie uuringus nõrk positiivne korrelatsioon. Tervikliku membraaniga spermide osatähtsust sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas tuleb siiski lugeda oluliseks, kuna see annab hea ülevaate spermimembraanide võimest oma funktsiooni täita (Pommer *et al.*, 2002) korreleerudes hästi teiste kvaliteedinäitajatega (Moskovtsev *et al.*, 2005; Zuge *et al.*, 2008) ja ka emasloomade tiinestumisega (Revell, Mrode, 1994; Correa *et al.*, 1997; Lagares *et al.*, 2000; Perez-Llano *et al.*, 2001) ning lihtsa meetodika tõttu sobib hästi sperma viljastamisvõime prognoosimiseks seemendusjaamades (Brito *et al.*, 2003; Tartaglione, Ritta, 2004).

Kokkuvõte

Sugupulli vanus mõjutab oluliselt liikuvate spermide osakaalu ja spetsiifiliste liikumiskarakteristikute SKL, SOL, SKA, väärtusi sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas. Nimetatud parameetrite keskmised väärtused on kõrgeimad 3–4-aastastel pullidel. ESM ning KMA näitajad on aga kõige suuremad 5–7-aastastel pullidel.

Liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaal, spetsiifiliste liikumiskarakteristikute näitajad (SKL, SOL, SKA) ja ESM ning KMA sügavkülmutatud/sulatatud pullispermas sõltuvad sperma kogumise aastaajast.

Sügavkülmutatud/sulatatud spermas määratud liikuvate ja otseliikuvate spermide osakaalu SKL, SOL, SKA, ESM ning KMA ja emasloomade tiinestumise vahel olid keskmise tugevusega positiivne korrelatsioon ejakulaatide lõikes.

Sugupulli vanus ning aastaage, millal sperma varuti, mõjutab oluliselt spermide kvaliteeti sügavkülmutatud/sulatatud spermas. Optimaalne oleks deponeerimiseks suunatav sügavkülmutatud pullisperma varuda 3–7-aastatelt pullidelt ning sügis-talvisel perioodil. Sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumisparameetrite, mitokondriaalse aktiivsuse ning membraani stabiilsuse ja emasloomade tiinestumise vahel oli positiivne seos, seepärast sobivad need parameetrid emasloomade tiinestumise prognoosimiseks

Tänuavaldused

Uurimistööd toetasid Eesti Teadusfond (grant 6089, grant 7814), ja SF 1080045s07. Täname Eesti Tõuloomakasvatajate Ühistut ja Niina Haasmaad tehnilise abi ja keelelise korrektuuri eest.

Kasutatud kirjandus

- Amorim, E.A., Torres, C.A., Graham, J.K., Amorim, L.S., Santos, L.V. 2009. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. – *Animal Reproduction Science*, 111 (2–4), p. 338–343.
- Andrade, V.J., Dias, J.C., Martins, J.A.M., Emerick, L.L., Ivo, J.C., Vale Filho, V.R., Silva, M.A., Souza, F.A. 2008. Seric testosterone concentration (STC) in young Guzerat bulls (*Bos taurus indicus*) and its association with reproductive traits. – *Proceedings of 16th International Congress on Animal Reproduction July 13–17 2008. Budapest*, 3, p. 160 (abstract).
- Ax, R.L., Dickson, K., Lenz, R.W. 1984. Induction of acrosome reaction in response to chondroitin sulfates *in vitro* corresponds to non-return rates of dairy bulls. – *Journal of Dairy Science*, 68 (2), p. 387–390.
- Brito, L.F.C., Barth, A.D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P.L., Kastelic, J.P. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. – *Theriogenology*, 60 (8), p. 1539–1551.
- Correa, J.R., Heerche, G. Jr., Zavos, P.M., 1997. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. – *Theriogenology*, 4 (3), p. 715–721.
- Devkota, B., Koseki, T., Matsui, M., Sasaki, M., Kaneko, E., Miyamoto, A., Amaya Montoya, C., Miyake, Y. 2008. Relationships among age, body weight, scrotal circumference, semen quality and peripheral testosterone and estradiol concentrations in pubertal and postpubertal Holstein bulls. – *The Japanese Society Of Veterinary Science*. 70 (1), p. 119–121.
- Godfrey, R.W., Lunstra, D.D., Jenkins T.G., Berardinelli, J.G., Guthrie, M.J., Neuendorff D.A., Long, C.R., Randel, R.D. 1990. Effect of season and location on semen quality and serum concentration of luteinizing hormone and testosterone in Brahman and Hereford bulls. – *Journal of Animal Science*, 68 (3), p. 734–749.
- Forsberg, M. 1996. Hormonal Control of Male Reproductive Function. – *Nordic Research Course in Diagnostic and Experimental Animal Andrology, Uppsala, May, 1996*.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Kiawah Island, South Carolina, USA. p. 495.
- Hallap, T., Nagy, S., Häärd, M., Jaakma, Ü., Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H. 2004. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White sires at 1 and 4 years of age. – *Journal of Andrology*, 27 (3), p. 166–171.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. – *Theriogenology*, 63 (8), p. 2311–2322.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2006. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in

- assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. – *Theriogenology*, 65 (6), p. 1122–1136.
- Janison, R.A.P., Ashworth, P.J.C., Miller, N.G.A. 1996. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. – *Molecular Reproduction and Development*, 45, p. 378–391.
- Helbig, L., Woodbury, M.R., Haig, J.C., Barth, A.D. 2007. The onset of puberty in North American bison (*Bison bison*) bulls. – *Animal Reproduction Science*, 97 (1–2), p. 12–24.
- Hua, Y., Qian, X.M., Chen, B.G., Yang, J.H., Wu, X.Y., Ma, L., Chen, C.L. 2006. Application of flow cytometry to the evaluation of semen quality. – *National Journal Of Andrology*, 12 (7), p. 608–611.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriques-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. – *Theriogenology*, 60 (4), p. 743–58.
- Janett, F., Thun, R., Niederer, K., Burger, D., Hassig, M. 2003a. Season changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. – *Theriogenology*, 60 (3), p. 453–461.
- Janett, F., Thun, R., Bettschen, D., Burger, D., Hassig, M. 2003b. Season changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallion. – *Animal Reproduction Science*, 77 (3–4), p. 213–221.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. – *Journal of Reproduction and Fertility*, 70 (1), p. 219–225.
- Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S. 2002. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. – *Asian Journal of Andrology*, 4 (2), p. 97–103.
- Kasimanickam, R., Nebel, R.L., Peeler, I.D., Silvia W.L., Wolf, K.T., McAlliste, A.J., Cassell, B.G. 2006. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. – *Theriogenology*, 66 (5), p. 1307–1315.
- Koivisto, M.B., Costa M.T., Perri, S.H., Vicente, W.R. 2009. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern of Brazil. – *Reproduction In Domestic Animal*, 44 (4), p. 587–592.
- Koonjaenak, S., Johannisson, A., Pongpeng, P., Wirojwuthikul, S., Kunavongkrit, A., Rodriguez-Martinez, H. 2007a. Seasonal variation in nuclear DNA integrity of frozen-thawed spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). – *Journal Of Veterinary Medicine*, 54 (7), p. 377–383.
- Koonjaenak, S., Pongpeng, P., Wirojwuthikul, S., Johannisson, A., Kunavongkrit, A., Rodriguez-Martinez, H. 2007b. Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). – *Theriogenology*, 67 (9), p. 1424–1435.
- Lagares, M.A., Petzoldt, R., Sieme, H., Klug, E., 2000. Application of hypo-osmotic swelling test for prediction of equine semen fertilizing capacity. – *14th International Congress on Animal Reproduction 2000*, 2, 30 (abstract).
- Lozano, H., Jimenez, C. 2008. Pursuit of scrotal circumference, evaluation of semen quality and testicular ultrasonography in Brahman bulls within 18 to 21 and 21 to 24 months of age. – *Proceedings of 16th International Congress on Animal Reproduction July 13–17 2008. Budapest*, 3, p. 166 (abstract).
- Perez-Liano, B., Lorenzo, J.L., Yenes, P., Trejo, A., Garcia-Casado, P. 2001. A short hypoosmotic swelling test the prediction of boar sperm fertility. – *Theriogenology*, 56 (3), p. 387–398.
- Mandal D.K., Nagpaul P.K., Gupta A.K., 2003. Motion characteristics of murrah buffalo bull spermatozoa in various seasons and its relationship with functional integrity of the plasmalemma. – *Theriogenology*, 60 (2), p. 349–358.
- Moskovtsev, S.I., Wilis, J., Azad, A., Mullen, J.B.M. 2005. Sperm DNA integrity: correlation with sperm plasma membrane integrity in semen evaluated for male infertility. – *Archives of Andrology*, 51, p. 33–40.
- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Pena, A.I. 2008. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. – *Animal Reproduction Science*, 109 (1–4), p. 27–39.
- Padrik, P. 1999. Modified hypoosmotic swelling (HOS) test as a method for prediction of bull sperm fertilising ability. – *Dairy Production in Estonia Today and Tomorrow. Proceedings from a symposium at the Estonian Agricultural University. Tartu*, p. 75–76.
- Padrik, P., Jaakma, Ü., Mürsepp, I. 2000. Eesti holsteini tõugu seemenduspullide värske sperma kvaliteet. – *Agraarteadus*, XI, 1, 71–80.
- Padrik, P. 2001. Sperm morphology in Estonian Holstein bulls of various Age and Grade of Holstein genes. – *Proceedings of the 7th Baltic Animal Breeding Conference, 17–18 April, Tartu*, p. 71–75.
- Padrik, P., Jaakma, Ü. 2002. Eesti Holsteini tõugu sugupullide spermide morfoloogia, seda mõjutavad tegurid ja seos emasloomade tiinestumisega. – *Agraarteadus*, XIII, 4, 243–256.
- Padrik, P., Jaakma, Ü. 2004. Eesti holsteini tõugu sugupullide sügavkülmutatud/sulatatud spermide liikumiskarakteristikud ja nende seos emasloomade tiinestumisega. – *Agraarteadus*, XV 4, 225–233.
- Pant, H.C., Sharma, R.K., Patel, S.H., Shukla, H.R., Mittal, A.K., Kasiraj, R., Misra, A.K., Prabhakar, J.H. 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. – *Theriogenology*, 60 (1), p. 27–34.
- Park, C.S., Yi, Y. J. 2002. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. – *Animal Reproduction Science*, 73 (1–2), p. 56–61.
- Peña F.J., Saravia F., Johannisson A., Wallgren M., Rodriguez-Martinez H., 2007. Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. – *Animal Reproduction Science*, 97 (1–2), p. 74–83.
- Petrunkina, A.M., Petzoldt, R., Sthalberg, S., Pfeilsticke, J., Beyerbach, M., Bader, H., Töpfer-Petersen, E. 2001. Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate. – *Andrologia*, 33 (6), p. 360–367.
- Pinho, T., Fragua, J.D., Salamanca, E., Rincon, O.M., Emerick, L.L., Dias, J.C., Andrade, V.J., Vale Filho, V.R., 2008. Andrologic characteristics of 2 to 6 years old Nelonen bulls raised under pasture condition in Minas

- Gerais State, Brazil. –*Proceedings of 16th International Congress on Animal Reproduction, July 13–17 2008. Budapest 3*, p. 169 (abstract).
- Pommer, A.C., Rutllant, J., Meyers, S.M. 2002 The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. – *Theriogenology*, 58 (7), p. 1373–1384.
- Revell, S.G., Mrode, R. A., 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. – *Animal Reproduction. Science*, 36, p. 77–86.
- Rodriguez-Martinez, H., Barth A.D. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. – *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 64, p.39–45.
- Rodriguez-Martinez, H. 2006. Can We Increase The Estimative Value of Semen Assessment. – *Reproduction In Domestic Animals*, 41 (2), p. 2–10.
- Roederer, M., 2000. Compensation (an informal perspective). 2000; <http://www.drmr.com/compensation>, 24 May.
- Shubbur, A., Goffaux, M., Thibier, M. 1989. Seasonal evolution of blood levels of thyroxine and triiodothyronine in the post-pubertal bull in France and Iraq. Concomitant variations of LH and testosterone. – *Reproduction Nutrition and Development*, 29 (3), p. 309–315.
- Tartaglione, C.M., Ritta, M.N. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. – *Theriogenology*, 62 (7), p. 1245–1252.
- Vishwanath, R., Swan, M.A., White, I.G. 1986. Effect of triton X-100 on ultrastructure, reactivation, and motility characteristics of ram spermatozoa. *Gamete Research*, 15 (4), p. 361–371.
- Wu, Y.M., Xia, X.Y., Pan, L.J., Shao, Y., Jin, B.F., Huang, Y.E., Wang, X.L., 2006. Evaluation of sperm mitochondrial function using Rh123/PI dual fluorescent staining. – *National Journal of Andrology*. 12 (9), p. 803–806.
- Zuge, R.M., Bertolla, R.P., Nichi, T.B.S., Cortada, C.N.M., Bols, P.E.J., Barnabe, V.H. 2008. Correlation between bovine sperm membrane integrity and mitochondrial activity in *Bos taurus* bulls. –*Proceedings of 16th International Congress on Animal Reproduction, July 13–17 2008. Budapest, 3*, p. 172 (abstract).

Influence of bull age and season to frozen-thawed semen quality and fertility

P. Padrik, T. Hallap, T. Bulitko and Ü. Jaakma

Summary

The aim of the current study was to determine the effects of bulls' age and season of semen collection on frozen/thawed sperm motility, membrane integrity, membrane lipid architecture status and mitochondrial membrane potential characteristics in frozen-thawed (FT) semen of Estonian Holstein bulls and estimate the relations between sperm quality characteristics and bulls' in vivo fertility expressed as 60-days non-return rate (NRR) of the dairy cows and heifers.

Semen was collected from 13 Estonian Holstein (EHF) bulls (1–7years) using an artificial vagina. Two consecutive ejaculates were pooled (hereafter referred to as a “batch”), extended with a commercial extender (Triladyl[®], Minitüb, Germany), packed in 0.25 ml plastic straws, each containing ~30–40x10⁶ spermatozoa, and frozen using biological freezer. Semen evaluation was performed immediately after thawing. The semen from two straws of the same batch was thawed by

immersion in water +35°C 20 seconds then pooled and used for testing. Following preservation, a post-thaw motility ≥50% was set up as threshold. Forty five ejaculates were used for the test inseminations. Altogether, 2828 cows and heifers (average 79 inseminations per ejaculate and 218 inseminations per bull) were inseminated by 4 AI technicians in 4 different herds according to the breeding program. Inseminations were performed routinely within 1 year of freezing on heifers and cows of different parity during all seasons of the year. Non-return rates (NRRs) 60 days after AI were recorded for each batch but not corrected for season, area, and parity. Fertility values NRR-60 days ranged from 22.8 to 80,0%.

Traditional hypo-osmotic test (Jeyendran, 1984), labelled as HOS, was performed by incubating a contents of 2 frozen/thawed semen straws together with 1 ml of a 150mOsm kg⁻¹ hypoosmotic solution at 37°C for 60 min. After incubation, 0.3 ml of eosin was added into the test tube. Wet preparation was evaluated under the phase contrast microscope (×1000) and the ratio of spermatozoa with swollen tails was expressed in % as an average of two replicates. One hundred spermatozoa were assessed in each replicate.

Sperm motility characteristics were determined with a computer assisted motility analyzer (Computer Assisted Cell Motion Analyzer (CMA), Sperm Vision, Minitüb GmbH&Co, Germany). Samples of 5µl were placed in Makler chamber where ~400 post-thaw spermatozoa were tracked and assessed (x 400) at +37°C. The following parameters were determined: the percentage of general motile (GMot) and progressively motile (PMot) spermatozoa, curve line velocity (VCL, µm/sec), linearity LIN(VSL/VCL) and amplitude of lateral head displacement (ALH, µm).

Sperm plasma membrane stability. The following working solutions were prepared: Merocyanine 540 (M-540; Molecular Probes, M24571, Leiden, The Netherlands) 1mM in dimethyl sulfoxide (DMSO) and Yo-PRO 1 (molecular Probes, Y3603) 25 µM in DMSO. Washed spermatozoa were stained with 25 nM Yo-PRO 1 and incubated at 38°C for 9 min in the dark as previously described (Harrison et al.1996). Thereafter 10 µL of a 40 µM solution of M-540 in SP-TALP was added to give a final M-540 concentration of 2.7 µM and vortexed for 10 s before analysis on a flow cytometer (FacsCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA). Data collection was started at 60 s after M-540 addition. Measurements were made with a flow cytometer, equipped with standard optical lasers as excitation sources. The M-540 and Yo-PRO 1 dyes were excited by an Argon ion 488 nm laser running at 15 mW. Forward and side scatter values were recorded on a linear scale; while florescent values were recorded on a logarithmic scale.

Obscuration bars were set for maximum sensitivity in order to obtain L-shaped forward light – scatter/sideways light scatter distribution of sperm cells. Fluorescence of Yo-PRO 1 was detected on detector FL 1 (530/28nm BP), while M-540 fluorescence was detected on detector FL 2 (585/2 nm BP). From each sample, a total of 10,000 events were measured with flow rate of approx. 200 cells/s. Acquisitions were made using CellQuest Pro software (Becton Dickinson, San Jose, USA). Dot plots for offline analyses were drawn by WinMDI, version 2.8. Events accumulated in the lower left corner correspond to sample debris and were excluded from the analysis by gating. On FL 1/FL 2 (Yo-PRO 1/M-540) dot plots regions were set to differentiate viable, stable plasma membrane LSM (Yo-PRO 1 negative and M-540 negative); viable, scrambled plasma membrane (Yo-PRO 1 negative and M-540 positive); and dead (Yo-PRO 1 positive) events.

Sperm mitochondrial activity. The staining protocol was identical to that described by Hallap et al. (2005). The measurements were made using a FacsCalibur flow cytometer

(Becton Dickinson, San Jose, USA). The SYBR-14 dye was excited by a 15 mW Ar ion 488 nm laser while MitoTracker Deep Red was excited by a 17 mW HeNe 633 nm laser. The SYBR-14 fluorescence (cells with intact plasma membrane) was detected on detector FL 1 (530/28 nm) while MitoTracker Deep Red fluorescence was detected by a detector FL 3 (670 LP). Forward and side scatter (FSC and SSC) values were recorded on a linear scale while fluorescent values were recorded on a logarithmic scale. Compensations were set according to Roederer (2000). Acquisitions were made using the CellQuest Pro software (BD). Non-sperm events were gated out based on SYBR-14 fluorescence (DNA content). The FC was used at a low flow rate (6–24 $\mu\text{L}/\text{min}$). Acquisitions were stopped after recording 10 000 SYBR-14-positive events and the data stored in list mode for further analysis. On SYBR-14 (FL 1/FL 2) dot plots, regions were drawn around the SYBR-14-positive cluster, and these events were classified as spermatozoa. In SYBR-14/ MitoTracker Deep Red dot plots sperm cells with low MTDR-L) and high (MTDR-H) Deep Red fluorescence were specified.

Results. The results of the study showed that the increase in bulls' age from 1–2 years to 5–7 years was accompanied by

the increase in the proportions of motile sperm (GMot), sperm with stable membrane (LSM) and high mitochondrial activity (MTDR-H) (Table 1; $P<0.05$), curve line velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH) ($P<0.01$) and linearity (LIN) ($P<0.001$) on batch level. Season of semen collection had significant influence on frozen/thawed sperm motility characteristics (Table 2). The overall sperm motility was significantly higher in ejaculates collected in autumn and winter. The means of VCL, ALH and MTDR-H were higher in winter and autumn on batch and bull level ($P<0.05$). Medium correlations were observed between the GMot, PMot, VCL, ALH, LSM, MTDR-H and NRR. ($r=0.49\text{--}0.70$; $P<0.01$ Table 3) on batches level and ($r=0.64\text{--}0.77$; $P<0.01$) on bull level. Strongest correlation was obtained between the ALH results and NRR on bull level ($r=0.77$; $P<0.001$).

Conclusion. We conclude that the bulls' age and season of semen collection have an effect on sperm quality parameters. Frozen/thawed sperm motility, progressive motility, VCL ALH, LSM and MTDR-H are related to NRR of cows and heifers and could be used for the prediction of bull's fertility.