

WPLYW SOLI SODOWEJ KWASU HIALURONOWEGO (HA) NA JAKOŚĆ I ZDOLNOŚCI ZAPŁADNIAJĄCE NASIENIA KNURA KONSERWOWANEGO W STANIE PŁYNNYM*

Magdalena Bryła, Monika Trzczińska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa
e-mail: magdalena.bryla@izoo.krakow.pl

Celem proponowanych badań było określenie wpływu dodatku soli sodowej kwasu hialuronowego (HA) do rozcieńczalnika umożliwiającego konserwację nasienia knura w stanie płynnym przez okres sześciu dni. Nasienie pochodzące od 6 knurów (30 ejakulatów) przechowywano w rozcieńczalniku kontrolnym (Biosolwens Plus) oraz w rozcieńczalnikach R1, R2, R3, R4 zawierających odpowiednio 0,25; 0,5; 1,0; 2,0% HA. Jakość przechowywanego nasienia określano za pomocą systemu CASA, oceniając całkowity i postępowy ruch plemników oraz metod fluorescencyjnych określając odsetek plemników żywych YO-PRO-1/PI, AnekynaV-FITC/PI oraz plemników żywych z integralnym akrosomem FITC-PNA/PI. Zdolności zapładniające plemników weryfikowano na podstawie wskaźników rozrodczych (skuteczność inseminacji, wskaźnik wyproszeń, liczebność miotu) uzyskanych po inseminacji loszek przechowywanym nasieniem. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono wyższą jakość plemników podczas sześciodniowej konserwacji nasienia w rozcieńczalniku z dodatkiem 0,5% HA w porównaniu z Biosolwensem Plus. Po inseminacji loszek nasieniem konserwowanym w rozcieńczalniku R2 w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym uzyskano wyższą skuteczność ineminacji oraz średnią liczbę żywych prosiąt w miocie (83,3% oraz 11,2±1,7 vs. 66,7% oraz 10,7±1,6).

Słowa kluczowe: nasienie knura, sól sodowa kwasu hialuronowego, rozcieńczalnik, przechowywanie nasienia, wskaźniki rozrodcze

Stosowanie na coraz większą skalę zabiegów inseminacji swni wpłynęło na rozwój badań w kierunku efektywniejszego wykorzystania nasienia knurów o szczególnie wysokich parametrach w zakresie cech tucznych i rzeźnych. Bardziej ekonomiczne wykorzystanie ejakulatu podczas unasienniania w porównaniu z kryciem naturalnym obniża bowiem koszty utrzymania knurów w stadzie i pozwala na wy-

*Badania wykonano w ramach działalności statutowej Instytutu Zootechniki PIB.

korzystanie nasienia knurów różnych ras i linii bez konieczności ich utrzymywania. Do zabiegów inseminacyjnych najczęściej stosowane jest nasienie bezpośrednio po pobraniu lub po jego przechowywaniu przez okres kilku dni w temperaturze 15–20°C (Johnson i in., 2000). Badania nad rozcieńczalnikiem, w którym przechowywane jest nasienie, zwłaszcza w przypadku reproduktorów intensywnie użytkowanych i selekjonowanych przez hodowców są nadal aktualne. Dobór właściwego rozcieńczalnika pozwala na ograniczenie spadku jakości i zdolności zapładniającej nasienia wraz z upływem czasu od jego pobrania aż do wykonania zabiegu inseminacji. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie wysokiej wydajności produkcji trzody chlewnej i wskaźnika oproszeń na stałym poziomie.

W nasieniu podczas jego konserwacji w temperaturach dodatnich zachodzą zmiany związane m.in. z obniżeniem ruchliwości plemników oraz uszkodzeniem ich błon plazmatycznych. W celu przeciwdziałania spadkowi jakości nasienia podczas jego konserwacji w stanie płynnym stosuje się suplementację rozcieńczalnika komponentami o właściwościach antyoksydacyjnych lub osłaniających błony komórkowe plemników. Zmiany biochemiczne plemników, związane z zaburzeniem integralności błon, powstałe podczas konserwacji nasienia naruszają podstawowe funkcje gamety męskiej w procesie zapłodnienia komórki jajowej (Huo i in., 2002).

Hialuronian jest glikoaminoglikanem (GAG) utworzonym z disacharydowych jednostek zawierających kwas D-glukuronowy i N-acetylo-D-glukozaaminę (Simulescu i in., 2016). Związek ten stosuje się w celu ograniczenia zjawiska polispermii przy zapłodnieniu *in vitro* (IVF) u świń (Suzuki i in., 2000) oraz jako składnik rozcieńczalnika mrożeniowego w konserwacji nasienia tego gatunku (Peña i in., 2004; Bryła i Trzcńska, 2014). Badania przeprowadzone przez Suzuki i in. (2002) wykazały, że dodatek soli sodowej kwasu hialuronowego (HA) pozytywnie wpływa na proces kapacytacji plemników i ich ruchliwość po rozmrożeniu. Z najnowszych badań przeprowadzonych przez Qian i in. (2016) wynika, że HA wpływa pozytywnie również na integralność błony komórkowej plemników oraz aktywność mitochondrialną nasienia knura po rozmrożeniu. Nadal brak jest danych literaturowych na temat zastosowania soli sodowej kwasu hialuronowego w długoterminowej konserwacji nasienia knura w stanie płynnym.

Celem podjętych badań było określenie wpływu dodatku różnych stężeń HA (0,25; 0,5; 1,0; 2,0%) na jakość i zdolności zapładniające nasienia knura konserwowanego w stanie płynnym przez okres sześciu dni.

Material i metody

Doświadczenie przeprowadzono na nasieniu 6 knurów (po 5 ejakulatów) wykorzystywanych do inseminacji w Stacji Eksploatacji Knurów w Kleczy Dolnej. Knury utrzymywano w standardowych warunkach zoohigienicznych i żywiono mieszanką pełnoporcjową, ze stałym dostępem do wody. W doświadczeniu nasienie pobierano (2 razy w tygodniu) od knurów mieszańców międzyrasowych (wielka biała zwisłoucha i wielka biała polska) o wadze ciała 262,1±3,8 i w wieku 18,2±1,1 miesięcy.

Nasienie pobrano metodą manualną i po wstępnej ocenie mikroskopowej do dalszych doświadczeń wykorzystano tylko ejakulatory, w których stwierdzono 80% plemników o prawidłowej morfologii i ruchu postępowym nie mniejszym niż 80%. Następnie nasienie rozcieńczano w rozcieńczalniku kontrolnym *Biosolwens Plus* (BP) (Biochefa, Polska) oraz w rozcieńczalniku BP uzupełnionym odpowiednio 0,25% HA (R1); 0,5% HA (R2); 1,0% HA (R3), 2,0% HA (R4). Rozcieńczalniki przygotowywano w sterylnych warunkach w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Nasienie rozcieńczano w celu uzyskania standardowej dawki inseminacyjnej $2,5 \times 10^9$ plemników w 80 ml rozcieńczalnika, a następnie przechowywano w temp. 15°C w szafie chłodniczej przez okres sześciu dni. Ocena ruchliwości nasienia przeprowadzono przy zastosowaniu systemu CASA (Computer Assisted Semen Analysis Systems), określając ruch całkowity (TM%) oraz postępowy (PM%) plemników. Zmiany w przepuszczalności błony komórkowej plemników określano za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 (Wybrant Apoptosis Assay Kit#4, Molecular Probes, USA) (Trzcńska i in., 2011). Do oceny translokacji fosfatydyloseryny zastosowano zależną od Ca^{2+} aneksynę V sprzężoną z izotiocyjanianem fluoresceiny (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche, Niemcy) (Trzcńska i in., 2011). Wizualizację stanu akrosomów plemników przeprowadzono przy zastosowaniu barwienia lektyną z orzeszków ziemnych sprzężoną z fluoresceiną (FITC-PNA, Sigma, Niemcy) (Memon i in., 2011). Ocena jakości nasienia przeprowadzono bezpośrednio po rozcieńczeniu (dzień 0) oraz w 3. i 6. dniu przechowywania przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse E600 (Tokio, Japonia). Fluorescencyjną ocenę jakości nasienia przeprowadzono na podstawie: odsetka plemników żywych z zachowaną ciągłością błony komórkowej (YO-PRO-1/PI⁻), odsetka plemników żywych bez translokacji fosfatydyloseryny (AneksynaV-FITC/PI⁻) oraz odsetka plemników żywych z integralnym akrosomem (FITC-PNA/PI⁻).

W celu określenia zdolności zapładniającej nasienia przeprowadzono próby biologiczne polegające na inseminacji loszek sześciodniowym nasieniem przechowywanym w rozcieńczalniku kontrolnym i z dodatkiem soli sodowej kwasu hialuronowego o stężeniu 0,5%, w którym stwierdzono najwyższy odsetek plemników ruchliwych (TM%, PM%) oraz najwyższy odsetek plemników ocenianych za pomocą metod fluorescencyjnych (YO-PRO-1/PI⁻, AneksynaV-FITC/PI⁻, FITC-PNA/PI⁻). Do inseminacji przeznaczono 6-miesięczne loszki różnych ras (PxD, PBZ, WBZ) o masie ciała wynoszącej od 90 do 110 kg utrzymywanych w Stacji Badawczej Trzody Chlewnej Żerniki Wielkie. Loszki poddano standardowej synchronizacji przez domięśniową iniekcję 750 j.m. PMSG (Folligon, Intervet, Warszawa) i 500 j.m. HCG (Choluron, Intervet, Warszawa). W dniu wystąpienia rui przeprowadzono dwukrotną inseminację standardową dawką nasienia przechowywanego: w rozcieńczalniku kontrolnym (12 loszek) oraz w rozcieńczalniku R2 (12 loszek). W celu stwierdzenia ciąży po 25 dniach od inseminacji przeprowadzono badanie USG za pomocą ultrasonografu (Sondayer Sal 32B, Toshiba). Przed planowanym terminem porodu ciężarne loszki umieszczano w boksach porodowych, a w dniu porodu przeprowadzano badanie masy ciała prosiąt.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA według wzoru:

$$y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$$

gdzie:

y – oceniana zmienna,

μ – średnia wartość,

a_i – dzień oceny nasienia, rodzaj zastosowanego rozcieńczalnika,

e_{ij} – błąd losowy).

Wykorzystano oprogramowanie komputerowe Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, USA).

Istotność różnic pomiędzy średnimi w grupach szacowano, stosując wielokrotny testu Duncana (Duncan Multiple Range Test). Za istotne statystycznie przyjęto różnice pomiędzy parametrami na poziomie $P < 0,001$. Uzyskane wskaźniki rozrodcze loszek inseminowanych przechowywanym nasieniem oceniano za pomocą testy χ^2 .

Wyniki

Uzyskane wyniki oceny jakości nasienia knurów podczas sześciodniowego przechowywania w rozcieńczalniku kontrolnym oraz w rozcieńczalnikach z różnymi stężeniami soli sodowej kwasu hialuronowego przedstawiono w tabeli 1.

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic ($P \geq 0,001$) w odsetku plemników ruchliwych (TM%, PM%) podczas trzydniowego przechowywania nasienia w badanych rozcieńczalnikach. Natomiast w trzecim dniu przechowywania w rozcieńczalniku R2 zawierającym 0,5% HA stwierdzono statystycznie najwyższy odsetek plemników żywych z integralnym akrosomem ($76,1 \pm 1,2\%$) w porównaniu z kontrolą ($70,6 \pm 1,4\%$). Jednocześnie ocena integralności błony komórkowej przy zastosowaniu YO-PRO-1/PI oraz AneksynyV-FITC/PI wykazała statystycznie istotne różnice w odsetku plemników żywych pomiędzy rozcieńczalnikiem R2 ($75,8 \pm 2,5\%$; $74,0 \pm 1,3\%$) a kontrolą ($69,3 \pm 2,1\%$; $68,1 \pm 1,5\%$).

Porównując wyniki oceny jakości nasienia przechowywanego przez sześć dni w rozcieńczalnikach o różnych stężeniach soli sodowej kwasu hialuronowego, stwierdzono, że najniższy odsetek plemników o ruchu całkowitym ($61,4 \pm 5,4\%$), postępowym ($58,4 \pm 7,8\%$) oraz żywych YO-PRO-1/PI ($56,2 \pm 2,1\%$), AneksynaV-FITC/PI ($54,2 \pm 1,8\%$) oraz żywych z integralnym akrosomem ($53,1 \pm 1,6\%$) uzyskano w rozcieńczalniku R4.

Porównując wyniki oceny jakości nasienia przechowywanego przez sześć dni w rozcieńczalnikach z dodatkiem różnych stężeń soli sodowej kwasu hialuronowego, stwierdzono, że najwyższy odsetek plemników o ruchu całkowitym ($66,7 \pm 3,4\%$), postępowym ($61,9 \pm 6,1\%$) oraz żywych YO-PRO-1/PI ($61,4 \pm 2,8\%$), AneksynaV-FITC/PI ($60,9 \pm 0,9\%$) oraz żywych z integralnym akrosomem ($60,2 \pm 2,3\%$) uzyskano w rozcieńczalniku R2. Dodatek soli sodowej kwasu hialuronowego o stężeniu 0,5% do rozcieńczalnika *Biosolwens Plus* pozwala na uzyskanie najwyższej jakości plemników knura w szóstym dniu przechowywania i na tej podstawie został wybrany do prób biologicznych.

Tabela 1. Wyniki oceny jakości nasienia knura podczas sześciodniowego przechowywania w rozcieńczalniku kontrolnym oraz w rozcieńczalnikach R1, R2, R3, R4 uzupełnionymi odpowiednio 0,25%, 0,5%, 1,0%, 2,0% solą sodową kwasu hialuronowego

Table 1. The results of the quality assessment of boar sperm stored for six days in control extender and extenders R1, R2, R3 and R4, supplemented with 0.25%, 0.5%, 1.0% and 2.0% sodium hyaluronate, respectively

Parametry oceny nasienia Sperm parameters	Dzień przechowywania Day of storage	Rozcieńczalniki Extenders				
		Kontrola Control	R1	R2	R3	R4
Odsetek plemników o ruchu całkowitym (%) Total motility (%)	0	90,4±1,1 A	92,3±1,4 A	91,9±1,8 A	92,4±0,8 A	90,8±1,6 A
	3	83,4±4,5 A	84,4±5,6 A	87,9±4,4 A	86,5±4,1 A	84,5±5,2 A
	6	56,2±3,8 A	64,7±4,7 B	66,7±3,4 B	62,9±4,2 B	61,4±5,4 B
Odsetek plemników o ruchu postępowym (%) Progressive motility (%)	0	88,4±2,1 A	89,8±2,7 A	89,3±2,1 A	90,1±2,2 A	89,2±2,0 A
	3	73,2±3,9 A	76,7±3,4 A	77,8±3,5 A	77,0±3,0 A	76,7±3,4 A
	6	51,9±6,4 A	59,7±5,8 B	61,9±6,1 B	60,2±5,6 B	58,4±7,8 B
Odsetek plemników żywych (YO-PRO-1/ PI) (%) Viable spermatozoa (YO-PRO-1/PI) (%)	0	87,5±3,1 A	90,0±3,7 A	91,7±3,5 A	89,9±3,8 A	88,4±4,0 A
	3	69,3±2,1 A	72,5±3,6 A,B	75,8±2,5 B	73,2±3,9 A,B	71,9±3,3 A,B
	6	50,3±2,6 A	58,9±2,1 B	61,4±2,8 B	59,9±2,6 B	56,2±2,1 B
Odsetek plemników żywych (Aneksyna V-FITC-PI) (%) Viable spermatozoa (Annexin V-FITC-PI) (%)	0	86,1±1,2 A	88,6±2,3 A	89,7±1,9 A	87,9±2,2 A	86,4±1,9 A
	3	68,1±1,5 A	70,4±3,5 A,B	74,0±1,3 B	71,9±3,0 A,B	69,9±3,3 A,B
	6	49,9±1,3 A	55,7±1,2 B	60,9±0,9 B	60,1±1,5 B	54,2±1,8 B
Odsetek plemników żywych z integralnym akrosomem (FITC-PNA-PI) (%) Viable spermatozoa with integral acrosome (FITC-PNA-PI) (%)	0	87,1±1,8 A	88,3±1,2 A	89,0±1,8 A	89,6±1,5 A	87,6±1,4 A
	3	70,6±1,4 A	73,7±1,9 A,B	76,1±1,2 B	74,2±2,3 A,B	72,3±2,2 A,B
	6	46,5±2,2 A	54,4±1,3 B	60,2±2,3 B	58,4±0,7 B	53,1±1,6 B

*Wartości (średnia±S.D) w wierszach różnią się istotnie statystycznie ($P \leq 0,001$) w porównaniu z kontrolą.

*Values (mean±S.D) in rows differ significantly compared with control at $P \leq 0,001$.

Uzyskane wyniki inseminacji 24 loszek nasieniem konserwowanym w rozcieńczalniku kontrolnym i w rozcieńczalniku z dodatkiem 0,5% HA przedstawiono w tabeli 2. Statystycznie istotnie wyższą skuteczność inseminacji oraz wskaźnik oproszeń uzyskano po zastosowaniu nasienia konserwowanego w rozcieńczalniku R2 (83,3% oraz 75,0%) Jednocześnie po inseminacji nasieniem konserwowanym w rozcieńczalniku z dodatkiem 0,5% HA stwierdzono nieistotnie wyższą średnią liczbę prosiąt urodzonych w miocie w porównaniu z kontrolą (11,2±1,7 vs. 10,7±1,6). Nie stwierdzono różnic w zakresie masy ciała prosiąt urodzonych po inseminacji loszek badanymi rozcieńczalnikami.

Tabela 2. Wskaźniki rozrodcze uzyskane po inseminacji loszek sześciodniowym nasieniem konserwowanym w rozcieńczalniku kontrolnym i rozcieńczalniku R2

Table 2. Pregnancy rate obtained after insemination of gilts with semen at 6th day of storage in control and R2 extender

Wskaźniki rozrodcze Reproductive performance	Kontrola Control	R2 R2 extender
Liczba inseminowanych loszek No. of gilts inseminated	12	12
Liczba ciężarnych loszek w 25. dniu po inseminacji – skuteczność inseminacji (%) No. of gilts pregnant at 25 days (%) – insemination effectiveness (%)	8 (66,7) *	10 (83,3) *
Wskaźnik oproszeń (%) No. of gilts farrowing (%)	8 (66,6) *	9 (75,0) *
Liczebność miotu (średnia liczba prosiąt w miocie ± odchylenie standardowe) No. of piglets born per litter (mean ± SD)	86 (10,7±1,6)	101 (11,2±1,7)
Masa ciała prosiąt przy urodzeniu Body weight at birth	1,75±0,2	1,79±0,3

*Wartości w wierszach różnią się istotnie statystycznie ($P \leq 0,01$).

* Values in rows differ significantly at $P \leq 0.01$.

Omówienie wyników

Konserwacja nasienia knura w stanie płynnym przez okres powyżej trzech dni jest możliwa dzięki zastosowaniu rozcieńczalnika, którego składniki pozwolą na zachowanie wysokiej jakości i zdolności zapładniających plemników od momentu pobrania do czasu przeprowadzenia inseminacji. Dlatego w celu optymalizacji konserwacji wprowadza się do składu rozcieńczalnika komponenty o właściwościach osłaniających błony plazmatyczne plemników. W przeprowadzonych badaniach zastosowano kwas hialuronowy w postaci soli sodowej, w której występuje on w organizmach żywych. Badania własne (Bryła i Trzcńska, 2014) przeprowadzone na kriokonserwowanym nasieniu knura wykazały, że dodatek 1% roztworu soli sodowej kwasu hialuronowego do rozcieńczalnika mroźniowego ochrania błony komórkowe plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi. W związku z powyższym wysnuiliśmy hipotezę, że zastosowanie HA jako dodatku do rozcieńczalnika pozwoli na zachowanie

funkcji biologicznych błon komórkowych plemników knura podczas ich konserwacji w stanie płynnym.

Porównując wpływ różnych stężeń (0,25%; 0,5%; 1% i 2%) soli sodowej kwasu hialuronowego podczas trzydniowego przechowywania nasienia knura nie stwierdzono różnic w odsetku plemników o ruchu całkowitym i postępowym pomiędzy badanymi rozcieńczalnikami. Uzyskany przez nas wynik jest porównywalny z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi przez Yeste i in. (2008), w których nie obserwowano wpływu dodatku HA na ruchliwość plemników knura przechowywanych przez okres trzech dni.

Ponadto, z uzyskanych wyników oceny błon plazmatycznych plemników knura za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 oraz AneksynyV-Fluos wynika, że w rozcieńczalniku z dodatkiem 0,5% soli sodowej kwasu hialuronowego w trzecim dniu konserwacji obserwuje się najwyższy statystycznie istotny odsetek plemników żywych w porównaniu z pozostałymi rozcieńczalnikami. Jednocześnie w rozcieńczalnikach R2 w trzecim dniu przechowywania zaobserwowano statystycznie wyższy odsetek plemników żywych z integralnym akrosomem w porównaniu z kontrolą i rozcieńczalnikami R1, R3 oraz R4.

Niezależnie od zastosowanego stężenia soli sodowej kwasu hialuronowego uzyskano statystycznie wyższą jakość plemników podczas sześciodniowej konserwacji nasienia w porównaniu z kontrolnym rozcieńczalnikiem *Biosolwens Plus*. Jednakże spośród badanych stężeń uzyskano najniższe parametry oceny jakości nasienia w rozcieńczalniku uzupełnionym 2% HA. Badania Yeste i in. (2008) wykazały, że takie stężenie soli sodowej kwasu hialuronowego może negatywnie wpływać na proces capacytacji plemników knura przy długoterminowej konserwacji nasienia.

W celu sprawdzenia zdolności zapładniających nasienia konserwowanego w rozcieńczalniku z dodatkiem 0,5% HA przeprowadzono próby biologiczne. Z przeprowadzonych badań wynika, że użycie do inseminacji nasienia konserwowanego w rozcieńczalniku z dodatkiem soli sodowej kwasu hialuronowego pozwala na uzyskanie zarówno wyższej skuteczności inseminacji, jak i liczby żywych prosiąt w miocie w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym.

Podsumowując, można stwierdzić że dodatek 0,5% soli sodowej kwasu hialuronowego do rozcieńczalnika stosowanego w długoterminowej konserwacji nasienia knura pozwala na zachowanie jego wysokiej wartości biologicznej i zdolności zapładniającej przez 6 dni przechowywania.

Piśmiennictwo

- Bryła M., Trzcńska M. (2014). Zastosowanie związków osłaniających w kriokonserwacji nasienia knura. Roczn. Nauk. Zoot., 41: 33–39.
- Huo L.J., Ma X.H., Yang Z.M. (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. Theriogenology, 58: 1349–1360.
- Johnson L., Weitze K., Fiser P., Maxwell W. (2000). Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci., 6: 143–172.

- Memon A.A., Wahid H., Rosnina Y., Goh Y.M., Ebrahimi M., Nadia F.M., Audrey G. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Anim. Reprod. Sci.*, 129: 44–49.
- Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez-Martínez H. (2004). Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*, 61: 63–70.
- Qian L., Yu S., Zhou Y. (2016). Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *Int. J. Biol. Macromol.*, 87: 287–289.
- Simulescu V., Kalina M., Mondek J., Pekař M. (2016). Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydr. Polym.*, 137: 664–668.
- Suzuki K., Eriksson B., Shimizu H., Nagai T., Rodríguez-Martínez H. (2000). Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. *Int. J. Androl.*, 23: 13–21.
- Suzuki K., Asano A., Eriksson B., Niwa K., Nagai T., Rodríguez-Martínez H. (2002). Capacitation status and *in vitro* fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int. J. Androl.*, 25: 84–93.
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2011). Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo*. *Anim. Reprod. Sci.*, 124: 90–97.
- Yeste M., Briz M., Pinart E., Sancho S., García-Gil N., Badia E., Bassols J., Pruneda A., Bussalleu E., Casas I., Bonet S. (2008). Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.*, 109: 236–250.

Zatwierdzono do druku 7 XII 2016

MAGDALENA BRYŁA, MONIKA TRZCIŃSKA

Effect of sodium hyaluronate (HA) on the quality and fertilizing capacity of stored liquid boar semen

SUMMARY

The present study was aimed to determine the effect of sodium hyaluronate (HA) on quality and fertilizing ability of boar semen stored for six days. The semen from 6 boars (30 ejaculates) was diluted in a control extender (*Biosolvens Plus*) and extenders R1, R2, R3 and R4 containing 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0% sodium hyaluronate. Assessment of the quality of stored semen was performed using a CASA system assessing total and progressive sperm motility and fluorescent methods specifying the percentage of viable spermatozoa YO-PRO-1/PI, Annexin V-FITC/PI and percentage of viable spermatozoa with integral acrosome FITC-PNA/PI. The sperm fertilizing ability was verified on the basis of reproductive performance (effectiveness of insemination, number of gilts farrowing, number of piglets born) obtained after insemination of gilts with stored semen. The results revealed statistically higher quality of sperm during six days of storage in extender supplemented with 0.5% HA compared with *Biosolvens Plus* extender. Higher reproductive performance of inseminated gilts with extender R2 (effectiveness of insemination 83.3%; average number of live piglets per litter 11.2 ± 1.7) was observed compared with control extender (effectiveness of insemination 66.7%; average number of live piglets per litter 10.7 ± 1.6).

Key words: boar semen, sodium hyaluronate, extender, liquid preservation, reproductive performance