

Acta fytotechnica et zootechnica 4  
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2011, s. 108–112

## VPLYV GNRH (LECIRELÍNU) NA VYBRANÉ KVALITATÍVNE UKAZOVATELE SEMENA KRÁLIKOV EFFECT OF GNRH (LECIRELINUM) ON SELECTED QUALITY PARAMETERS OF RABBIT EJACULATE

Martin FIK,<sup>1</sup> Vladimír PARKÁNYI,<sup>2</sup> Ľubomír ONDRUŠKA,<sup>2</sup> Norbert LUKÁČ,<sup>1</sup> Róbert CHLEBO<sup>1</sup>

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Slovenská republika<sup>1</sup>  
Centrum výskumu živočíšnej výroby Nitra, Lužianky, Slovenská republika<sup>2</sup>

The aim of this study was to evaluate the effect of two concentrations of GnRH in insemination doses on selected quality parameters of rabbits ejaculate *in vitro*. Insemination doses (ID) were diluted to a concentration of  $50 \times 10^6$  spermatozoa in ID (0.5 ml). Subsequently, ID were divided into 3 samples (control – C, experiment 1, experiment 2). Implementor GnRH (Lecirelinum – commercial product Supergestran, Ferring Pharmaceuticals, the Czech Republic) was added to experimental insemination dose samples at concentrations as follows: experiment 1 to 0.2 ml (5 mg) GnRH / ID and experiment 2 to 0.3 ml (7.5 mg) GnRH / ID. The experimental samples were compared with the control sample. For the assessment of sperm motility, CASA apparatus was used (Computer-Assistend Sperm Analysis) – system SpermVision (MiniTüb, Tiefenbach, FRG) with a microscope Olympus BX 51 (Olympus, Japan). The monitored sperm parameters were as follows: motility (%), progressive motility (%), velocity ( $\mu\text{m} / \text{s}$ ), curvilinear velocity of movement ( $\mu\text{m} / \text{s}$ ) and beat/cross frequency. In the experimental samples (experiment 1, 2) increase in the level of sperm motility values was detected in time periods of 1 and 3 hours (1 hour – C  $47.30 \pm 7.99\%$ , experiment 1  $86.39 \pm 5.60\%$ , experiment 2  $72.48 \pm 3.80\%$ , 3 hours – C  $57.09 \pm 23.36\%$ , experiment 1  $89.42 \pm 2.41\%$ , experiment 2  $63.92 \pm 12.65\%$ ) and decrease over a period of 6 hours (C  $64.65 \pm 8.60\%$ , experiment 1  $35.26 \pm 5.22\%$ , experiment 2  $50.08 \pm 8.27\%$ ). Progressive sperm motility within time periods of 1 and 3 hours showed similar trend as sperm motility (1 hour – C  $30.50 \pm 7.35\%$ , experiment 1  $79.18 \pm 6.58\%$ , experiment 2  $59.85 \pm 6.03\%$ ; 3 hours – C  $42.06 \pm 22.69\%$ , experiment 1 to  $82.31 \pm 3.64\%$ , experiment 2 to  $44.45 \pm 12.01\%$ ) and decreased over a period of 6 hours (C  $56.34 \pm 8.88\%$ , experiment 1  $23.36 \pm 5.95\%$ , experiment 2  $39.07 \pm 11.17\%$ ). Sperm velocity in experiment 1 reached after 1 hour  $82.26 \mu\text{m} / \text{s}$ , after 3 hours  $68.40 \pm 3.20 \mu\text{m} / \text{s}$ , after 6 hours  $58.21 \pm 3.89 \mu\text{m} / \text{s}$ ; in experiment 2 was after 1 hour  $62.00 \pm 4.33 \mu\text{m} / \text{s}$ , after 3 hours  $44.37 \pm 9.19 \mu\text{m} / \text{s}$  and after 6 hours  $52.73 \pm 9.10 \mu\text{m} / \text{s}$ , in control group after 1 hour  $71.86 \pm 8.19 \mu\text{m} / \text{s}$ , after 3 hours  $62.35 \pm 7.89 \mu\text{m} / \text{s}$  and after 6 hours  $73.93 \pm 8.18 \mu\text{m} / \text{s}$ . The effect of GnRH under *in vitro* conditions may very significantly compared with results obtained *in vivo*.

**Key words:** lecirelinum, sperm motility, sperm velocity, rabbit, CASA

Implementory (extendery) sú charakterizované ako látky pridávané do inseminačnej dávky za cieľom zvýšenia jej plodnovej schopnosti alebo predĺženia životaschopnosti spermií. V staršej literatúre sú tieto látky popisované aj ako aditíva inseminačných dávok. Anchordogery et al. (1987) popisovali, že určité aditíva pridané do semena majú schopnosť ochraňovať jeho jednotlivé zložky a vplyvajú na prežiteľnosť spermií. Pozitívny vplyv implementorov na kvalitatívne ukazovatele semena rôznych druhov hospodárskych zvierat popísali autori (IGF-I-inzulínový rastový faktor – Vickers et al., 1999; Champion et al., 1997; kofeín – Tathan et al. 2003; Matejašáková et al. 2005; Riha et al. 2006; heparín a hyalurónan – Januskauskas et al. 2001; heparín – Lapointe et al. 1996; Parrish et al. 1993; Fik et al. 2008; Fik 2009). Tathan et al. (2003) uvádzajú, že implementori (kofeín a IGF – I) zvyšujú pohyblivosť spermií, čo sa rezultuje do vyššieho fertilizačného stupňa oocytov. Hodnotenie pohyblivosti spermií počítačovou technikou popisujú Massányi et al. (2002).

Zvýšenie koncepcného pomeru prostredníctvom ovplyvnenia inseminačnej dávky jednotlivými implementormi uvádzajú viacerí autori (Marks a Ax, 1985; Parrish et al., 1988; Lapoite et al., 1996; Whitfield a Parkinson, 1992; Fik et al. 2008; Fik, 2009).

GnRH (lecirelín) (6-(3-methyl-d-valine)-9-(N-ethyl-L-prolynamide)-10-deglycinamide) je to syntetický hypotalamický gonádotropín, faktor vyvolávajúci uvoľňovanie luteinizačného hormónu (LH). Lecirelin je nonapeptid, ktorý prirodzene pozostáva z dekapeptidov; navyše aminokyselina glycín v 6. pozícii je ako pri leucíne.

Pri inseminácii králikov sa intramuskulárna administrácia využíva pri vyvolaní ovulácie pri umelej inseminácii.

Efekt GnRH na akrozomálnu reakciu spermií prehodnotil Morales (1998).

Ondruška et al. (2008) sledovali vplyv GnRH v ID (inseminačnej dávke) ako implementora na efektívnosť inseminácie králikov. Podanie GnRH v ID zároveň nahrádzalo intramuskulárne podanie pre vyvolanie ovulácie. Najlepšie výsledky koncepcného pomeru a počtu narodených mláďat autori zaznamenali pri použitej koncentrácii  $7,5 \mu\text{g} / \text{ID}$ . Morales et al. (1998) vyhodnotil počet naviazaných spermií na *zonu pellucidu* v závislosti od použitého peptidu s analogickou štruktúrou s GnRH alebo jeho fragmentu, s ktorými boli vzorky ID koinkubované. Spermie, ktoré boli ošetrené GnRH sa viazali vo vyššom počte na *zonu pellucidu* ako kontrolné spermie, ktoré neboli ošetrené GnRH (štatisticky vyhodnotené na hladine významnosti  $P < 0,005$ ). Fragментy GnRH, antagonisti GnRH a podobné peptidy nevykazovali žiadny účinok na interakciu spermie s vajíčkom. Antagonisti GnRH však úplne zablokovali stimulačný účinok GnRH. GnRH pritom neovplyvnil percentuálny podiel spermií, ktoré podstúpili akrozomovú reakciu, pohybové schémy spermií alebo to, ako často došlo ku kolízii spermie a *zony pellucidy*. Zvýšená schopnosť spermií viazať sa na *zonu pellucidu* môže byť kvôli zmene afinity receptorov *zony pellucidy* voči plazmatickej membráne spermie alebo ich lepšej expozícii voči plazmatickej membráne spermie.

Morales et al. (2000) uvádzajú, že ošetrenie spermií s GnRH zvýšilo počet naviazaných spermií na *zonu pellucidu*

o 300% oproti kontrole, avšak len v prípade, že boli prítomné ióny  $Ca^{2+}$  v médiu, s ktorým boli spermie koinkubované. GnRH zvýšil koncentráciu  $Ca^{2+}$  v spermách v závislosti od koncentrácie tohto hormónu.

Pozitívny vplyv intravaginálnej aplikácie GnRH v ID na reprodukčné ukazovatele králikov uvádza Quintela et al. (2004), Ondruška et al. (2008), Slamečka (2009) a Fik (2009), ktorí popisujú výhody GnRH najmä v tom, že zvyšuje jednotlivé reprodukčné ukazovatele a intravaginálna aplikácia úplne nahrádza intramuskulárnu aplikáciu.

Quintela et al. (2004) sledovali analóg GnRH – buserelín, ktorý bol použitý na indukciu ovulácie králičíc zaradených do umelej inseminácie, intravaginálnou aplikáciou analógu do ID. V dvoch pokusoch použili ako kontrolnú skupinu samice s intramuskulárnou aplikáciou buserelínu v množstve 0,8  $\mu$ g/samicu. V experimentálnych skupinách králičíc použili 8  $\mu$ g/na 1 samicu, 12  $\mu$ g/na 1 samicu a 16  $\mu$ g/na 1 samicu buserelínu pridaného do ID. Koncepčný pomer medzi skupinami samíc nebol štatisticky významne odlišný, no plodnosť samíc bola najvyššia po aplikácii maximálnej dávky buserelínu (11,7 ks oproti 9,4 ks mláďat v kontrolnej skupine). Ondruška et al. (2008) uvádzajú, že intravaginálna aplikácia superanalógu GnRH – lecirelínu (v dávke 7,5  $\mu$ g/samicu intravaginálne) prostredníctvom insemináčnej dávky pozitívne indukuje ovuláciu králičíc, s následným benefitom (+9,35%) na koncepčný pomer (72,09% $\pm$ 2,96), bez štatisticky významného rozdielu voči kontrolnej skupine samíc, ktorej bol GnRH podaný intramuskulárne (62,74% $\pm$ 13,70).

Slamečka (2009) uvádza, že prídavok GnRH do insemináčnej dávky, teda intravaginálne, namiesto intramuskulárnej aplikácie počas umelej inseminácie sa neprejavil negatívne voči interakcii spermie s vajíčkom, ktorú vyhodnotil mikroskopicky na počte vyplavených zygot, neoplodených oocytov alebo embrií vyplavených z pohlavného traktu králičíc. Rozdiel oplodnenia oocytov spermiami medzi skupinami samíc bol štatisticky nepreukazný, no podľa autora naznačil určité zlepšenie.

Významné rozdiely autor zistil pri analýze pohyblivosti spermíí ID s prídavkom GnRH, ktorá bola potom následne použitá pri umelej inseminácii samíc pre jeden z experimentov mikroskopického vyhodnocovania vyplavených štruktúr z pohlavných traktov samíc. Pre motilitu a progresívnu pohyblivosť spermíí zistili, že experimentálne vzorky mali tendenciu stúpať v prítomnosti GnRH oproti kontrolným vzorkám a to štatisticky preukazne.

Fik (2009) uvádza, že intravaginálna aplikácia GnRH umožňuje:

- zefektívnenie rentability inseminácie ušetrením jednej pracovnej operácie,
- zjednodušenie technológie inseminácie – intramuskulárna aplikácia GnRH nie je potrebná,
- zabezpečenie požiadaviek zooveterinárnej prevencie – vylúčením injekčnej aplikácie GnRH sa zamedzí potenciálnemu prenosu patogénov v chove.

Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv dvoch koncentrácií GnRH v insemináčnej dávke králikov na vybrané kvalitatívne ukazovatele semena v podmienkach *in vitro*.

## Materiál a metódy

Semeno králikov bolo získané odberom do umelej vagíny ohriatej vo vodnom kúpeli na teplotu 50 °C od samcov paternálnej brojlerovej línie P 91 chovanej v Centre výskumu živočíšnej výroby v Nitre. Semeno bolo získané od 19 samcov (objem 12 ml), po odbere bolo zmiešané (polyspermia). Následne bolo vyšetrené, a na základe vyšetrenia riedené v pomere 1 : 5 komerčným riedidlom firmy MiniTüb na požadovanú koncentráciu spermíí 50  $\times$  10<sup>6</sup> na ID (0,5 ml). Následne po nariadení bola ID rozdelená na 3 vzorky (kontrolná – K, experiment 1, experiment 2). Implementor GnRH (Iecirelín – použitý prípravok Supergestran, Ferring-Léčiva, Česká republika) bol pridaný do experimentálnych vzoriek insemináčnych dávok v dvoch sledovaných koncentráciách (tabuľka 1). Výsledky vzoriek experiment 1 a experiment 2 boli porovnávané so vzorkou insemináčnej dávky kontrolnou bez ovplyvnenia implementorom GnRH.

Po pridaní GnRH sa vzorky insemináčnych dávok miešali minimálne 5 minút pre dosiahnutie homogenity. Inkubácia insemináčnej dávky počas experimentu prebiehala pri laboratórnej teplote. Na hodnotenie pohyblivosti spermíí bol využitý prístroj CASA (analýza pohyblivosti spermíí počítačovou technikou – Computer-Assistend Sperm Analysis) systém SpermVision (MiniTüb, Tiefenbach, SRN) s mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus, Japonsko). Každá vzorka bola umiestnená do počítacej komôrky Makler Counting Chamber s hĺbkou 10  $\mu$ m (Sefi-Medical Instruments, SRN) a následne umiestnená do zorného poľa. Pri samotnej analýze boli vykonané 3 merania každej vzorky, a to v čase 1 hodina, 3 a 6 hodín po nariadení. Systém CASA následne vyhodnotil parametre pohyblivosti z ôsmich rôznych polí komôrky Makler Counting Chamber vždy v rámci každého merania.

Sledované ukazovatele: motilita spermíí (%), progresívna pohyblivosť spermíí (%), priemerná rýchlosť pohybu spermíí ( $\mu$ m/s), rýchlosť krivočiareho pohybu spermíí ( $\mu$ m/s), lineárnosť pohybu spermíí, frekvencia úderov bičička.

## Výsledky a diskusia

Porovnaním motility po využití GnRH ako implementora insemináčnej dávky brojlerových králikov v dvoch koncentráciách, s kontrolnou vzorkou, sme zaznamenali pomerne vysokú motilitu v perióde 1 a 3 hodiny po nariadení, ktorá v 6. hodine poklesla pod úroveň kontrolnej vzorky. V experimente 1 sme

**Tabuľka 1** Koncentrácia GnRH v insemináčnych dávkach

Označenie vzoriek (1)	Objem ID v ml (2)	Koncentrácia GnRH v ID/0,5 ml (3)		Koncentrácia spermíí v ID (4)
		v ml (5)	v $\mu$ g (6)	
Experiment 1 (7)	4	0,2	5	50 $\times$ 10 <sup>6</sup>
Experiment 2	4	0,3	7,5	50 $\times$ 10 <sup>6</sup>
K (9)	4	–	–	50 $\times$ 10 <sup>6</sup>

**Table 1** Concentration of GnRH in insemination doses

(1) sample labeling, (2) volume of ID in ml (3) concentration of GnRH per insemination dose/0.5 ml, (4) concentration of spermatozoa per insemination dose, (5) in ml, (6) in  $\mu$ g, (7) experiment 1, (8) experiment 2, (9) control

**Tabuľka 2** Porovnanie kvalitatívnych ukazovateľov inseminačných dávok kráľíkov po ovplyvnení implementorom GnRH

Sledovaný ukazovateľ (1)	Doba inkubácie v h (2)	Sledovaná vzorka (3)		
		K (4)	experiment 1 (5)	experiment 2 (6)
Motilita spermíí v % (7)	1	47,30±7,99	86,39±5,60	72,48±3,80
	3	57,09±23,36	89,42±2,91	63,92±12,65
	6	64,65±8,60	35,26±5,22	50,08±8,27
Progresívna pohyblivosť spermíí v % (8)	1	30,50±7,35	79,18±6,58	59,85±6,03
	3	42,06±22,69	82,31±3,64	44,45±12,01
	6	56,34±8,88	23,36±5,95	39,07±11,17
Rýchlosť pohybu spermíí v $\mu$ m/s (9)	1	71,86±8,19	82,26±4,47	62,00±4,33
	3	62,35±7,89	68,40±3,20	44,37±9,19
	6	73,93±8,18	58,21±3,89	52,73±9,10
Lineárnosť pohybu spermíí (10)	1	0,43±0,03	0,28±0,02	0,25±0,02
	3	0,42±0,001	0,29±0,01	0,25±0,02
	6	0,32±0,001	0,20±0,04	0,27±0,14
Rýchlosť krivočiareho pohybu spermíí v $\mu$ m/s (11)	1	136,83±14,28	187,66±6,86	147,53±11,71
	3	120,69±16,36	158,44±9,89	97,62±38,27
	6	172,72±20,04	152,35±19,04	154,45±10,27
Frekvencia úderov bičička spermíí v (12)	1	33,95±3,24	27,1±0,89	21,73±1,14
	3	31,94±2,46	26,66±0,83	23,8±2,01
	6	29,28±1,39	20,5±1,71	19,56±2,84

**Table 2** Comparison of qualitative parameters of insemination doses affected with GnRH implementer (1) monitored indicators, (2) incubation time in hours, (3) sample labeling, (4) control, (5) experiment 1, (6) experiment 2, (7) sperm motility in %, (8) progressive sperm motility in %, (9) sperm velocity in  $\mu$ m/s, (10) sperm motion linearity, (11) curvilinear velocity of sperm movement in  $\mu$ m/s, (12) beat/cross frequency

zaznamenali vyšší aktivačný účinok na motilitu spermíí ako v experimente 2.

Fik (2009) v experimentoch s inkubáciou inseminačnej dávky kráľíkov s implementorom heparínom s koncentráciou 0,12  $\mu$ l/ 0,5 ml ID uvádza pokles motility 3 hodiny po aplikácii implementora na úroveň 33,69 % a následné zvýšenie motility po 6. hodine až na úroveň 69,39 %, čo predstavovalo vyššiu úroveň ako bola zaznamenaná v kontrolnej skupine.

Podobnú tendenciu autor uvádza i pri progresívnej pohyblivosti spermíí pri implementore heparínu. V experimente s dvomi koncentraciami implementora GnRh sme zaznamenali opačný charakter zmien motility a progresívnej pohyblivosti ako uvádza Fik (2009) pri inkubácii spermíí kráľíkov s implementorom heparínom. Výsledky nášho sledovania motility a progresívnej pohyblivosti spermíí v experimentálnych vzorkách v porovnaní s kontrolnou vzorkou poukazujú na určité aktivačné účinky sledovaného implementora na samotný proces kapacitácie spermíí.

Parrish et al. (1988) uvádzajú podobnú tendenciu pri inkubácii spermíí s heparínom, kedy prebiehala kapacitácia v kratšej časovej perióde než v prítomnosti lyzofosfatidylcholínu v podmienkach *in vivo*.

Pri využití GnRH vo forme implementora inseminačnej dávky sme zaznamenali výskyt nefyziologických pohybov (cirkulárne pohyby spermíí) a taktiež sme zaznamenali výraznú aglutináciu spermíí (experiment 1 aj experiment 2). Tieto negatívne prejavy boli zaznamenané už 1. hodinu po nariedení ale počítačová technika (CASA) nedokázala tieto nefyziologické pohyby spermíí vyhodnotiť. Výskyt cirkulárnych pohybov a aglutináciu spermíí po ovplyvnení inseminačnej dávky prostredníctvom GnRH uvádza aj Fik (2009). Morales et al. (1998) uvádza, že po ovplyvnení spermíí s GnRH neboli narušené pohybové schémy spermíí.

Zaznamenali sme zvýšenie rýchlosti pohybu spermíí oproti kontrolnej vzorke v experimente 1 v časovej perióde 1 a 3 hodiny po aplikácii sledovaného implementora. Rýchlosť pohybu spermíí 6 hodín po nariedení už nedosahovala úroveň kontrolnej vzorky v rovnakom čase. V experimente 2 rýchlosť pohybu spermíí v priebehu celej sledovanej periódy nedosahovala úroveň kontrolnej vzorky.

Vašíček (2009) zaznamenal pri inkubácii kráľíčích spermíí s implementorom heparínom na CASA prístroji výrazné zvýšenie ukazovateľov rýchlosti pohybu spermíí oproti kontrolnej vzorke semena. Věžník (1973) uvádza, že znalosť rýchlosti pohybu spermíí je ukazovateľ, ktorý určuje omnoho výraznejšie kvalitu ejakulátu, ako napríklad pokles percenta živých spermíí.

Rýchlosť krivočiareho pohybu v kontrolnej vzorke a experimente 2 sa prejavila poklesom v perióde 3 hodiny po aplikácii a následným zvýšením úrovne hodnôt 6 hodín po aplikácii sledovaného implementora. V experimente 1 sme zaznamenali klesajúcu tendenciu rýchlosti krivočiareho pohybu spermíí.

Fik (2009) zaznamenal pri intravaginálnej aplikácii (0,3 ml GnRH / ID = 7,5  $\mu$ g) počas inseminácie určitý benefit v počte živenarodených mláďat (zvýšenie o 1,0 mláďa na vrh) vo vrhu pri nullipárných samičkách, ktorý bol štatisticky nepreukazný. Pri experimentoch s rovnakou koncentráciou GnRH realizovaných na multipárných samiciach Fik (2009) uvádza zníženie počtu živenarodených mláďat vo vrhu o 0,31 ks a taktisto aj zníženie pôrodnej hmotnosti o 1,19 g. Zistené diferencie však neboli štatisticky preukazné. Quintela et al. (2004) zaznamenal najvyššiu plodnosť po intravaginálnej aplikácii GnRH (buserelínu) pri koncentracii 16  $\mu$ g / ID. Ondruška et al. (2008) uvádzajú, že pri intravaginálnej aplikácii superanalógu GnRH – Iecirelínu (v dávke 7,5  $\mu$ g/samicu intravaginálne) prostredníctvom ID zaznamenali benefit (+9,35%) na koncepcný pomer (72,09%±2,96), bez štatisticky významného rozdielu voči kon-

trojnej skupine samíc, ktorej bol GnRH podaný intramuskulárne (62,74%±13,70).

Ondruška et al. (2008), Slamečka (2009) a Fik (2009) uvádzajú, že pri použití GnRH vo forme implementora inseminačných dávok nebol zaznamenaný negatívny vplyv na počet živonarodených mláďat.

Slamečka (2009) uvádza, že prídavok GnRH (0,3 ml GnRH / ID) do inseminačnej dávky králikov, teda intravaginálne, namiesto intramuskulárnej aplikácie počas umelej inseminácie, sa neprejavil negatívne voči interakcii spermie s vajíčkom, ktorú vyhodnotil mikroskopicky na počte vyplavených zygot, neoplođených oocytov alebo embryí z pohlavného traktu králičíc.

Výsledky jednotlivých sledovaných ukazovateľov sú uvedené v tabuľke 2.

### Záver

Na základe výsledkov sledovania vplyvu GnRH na vybrané kvalitatívne ukazovatele inseminačnej dávky králikov môžeme konštatovať, že nižšia koncentrácia sledovaného implementora (experiment 1 – 0,2 ml GnRH / ID) zvýšila úroveň hodnôt motility (1 h + 39,09 %; 3 h + 32,33 %), progresívnej pohyblivosti (1 h + 48,68 %; 3 h + 40,25 %), rýchlosti pohybu (1 h + 10,4 μm/s; 3 h + 6,05 μm/s) a rýchlosti krivočiareho pohybu (1 h + 50,83 μm/s; 3 h + 37,75 μm/s) v sledovanej časovej perióde 1 a 3 hodiny po aplikácii implementora GnRH v porovnaní s kontrolnou vzorkou. V perióde 6 hodín po aplikácii už v rámci tejto sledovanej vzorky boli zaznamenané len nižšie hodnoty sledovaných parametrov v porovnaní s kontrolnou vzorkou (motilita – 29,39 %; progresívna pohyblivosť – 32,98 %; rýchlosť pohybu – 15,72 μm/s; rýchlosť krivočiareho pohybu – 20,37 μm/s). Ostatné sledované parametre frekvencia úderov bičika a lineárnosť pohybu spermii pri nižšej koncentrácii implementora (experiment 1) dosahovali nižšiu úroveň hodnôt v rámci celej sledovanej časovej periódy.

Vyššia koncentrácia GnRH (experiment 2 – 0,3 ml GnRH / ID) sa prejavila nižším stupňom aktivity v časovej perióde 1 a 3 h, no takisto aj miernejším poklesom sledovaných parametrov v časovej perióde 6 h.

Samotný vplyv GnRH v *in vitro* podmienkach však môže byť značne rozdielny v porovnaní s podmienkami *in vivo*.

### Súhrn

Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv dvoch koncentrácií GnRH v inseminačnej dávke králikov na vybrané kvalitatívne ukazovatele semena králikov v podmienkach *in vitro*. Inseminačné dávky (ID) boli zriadené na koncentráciu spermii 50 x 106 na ID (0,5 ml). Následne po nariadení bola ID rozdelená na 3 vzorky (kontrolná – K, experiment 1, experiment 2). Implementor GnRH (Icirelín – použitý prípravok Supergestran, Ferring-Léčiva, Česká republika) bol pridaný do experimentálnych vzoriek inseminačných dávok v dvoch sledovaných koncentráciách. Experiment 1 – 0,2 ml (5 μg) GnRH / ID a experiment 2 – 0,3 ml (7,5 μg) GnRH / ID. Experimentálne vzorky boli porovnávané s kontrolnou vzorkou kontrolnou (K). Na hodnotenie pohyblivosti spermii bol využitý prístroj CASA (analýza pohyblivosti spermii počítačovou technikou – Computer-Assistend Sperm Analysis) systém SpermVision (MiniTüb, Tiefenbach, SRN) s mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus, Japonsko). Sledovali sme motilitu (%), progresívnu pohyblivosť (%), rýchlosť pohybu (μm/s), rýchlosť krivočiareho pohybu (μm/s), lineárnosť pohybu a frekvenciu úderov bičika

spermii. V experimentálnych vzorkách (experiment 1; 2) sme zaznamenali zvýšenie úrovne hodnôt motility spermii (1 h K – 47,30 ± 7,99 %, experiment 1 – 86,39 ± 5,60 %, experiment 2 – 72,48 ± 3,80 %; 3 h K – 57,09 ± 23,36 %, experiment 1 – 89,42 ± 2,41 %, experiment 2 – 63,92 ± 12,65 %) v časovej perióde 1 a 3 h a pokles v perióde 6 h (K – 64,65 ± 8,60 %, experiment 1 – 35,26 ± 5,22 %, experiment 2 – 50,08 ± 8,27 %). Progresívna pohyblivosť spermii v časovej perióde 1 a 3 h vykazovala podobnú tendenciu ako motilita spermii (1 h K – 30,50 ± 7,35 %, experiment 1 – 79,18 ± 6,58 %, experiment 2 – 59,85 ± 6,03 %; 3 h K – 42,06 ± 22,69 %, experiment 1 – 82,31 ± 3,64 %, experiment 2 – 44,45 ± 12,01 %) a pokles v perióde 6 h (K – 56,34 ± 8,88 %; experiment 1 – 23,36 ± 5,95 %, experiment 2 – 39,07 ± 11,17 %). Rýchlosť pohybu spermii vzorky experiment 1 bola 1 h 82,26 ± 4,47 μm/s, 3 h 68,40 ± 3,20 μm/s, 6 h 58,21 ± 3,89 μm/s; experiment 2 bola 1 h 62,00 ± 4,33 μm/s, 3 h 44,37 ± 9,19 μm/s a 6 h 52,73 ± 9,10 μm/s; K bola 1 h 71,86 ± 8,19 μm/s, 3 h 62,35 ± 7,89 μm/s a 6 h 73,93 ± 8,18 μm/s. Samotný vplyv GnRH v *in vitro* podmienkach však môže byť značne rozdielny v porovnaní s podmienkami *in vivo*.

**Kľúčové slová:** Icirelín, motilita spermii, rýchlosť pohybu spermii, králik, CASA

Práca sa realizovala za podpory projektu VEGA č. 1/1101/11

### Literatúra

- ANCHORNDGERRY, J.J. – RUDOLPH, A.S. – CARPENTER, J.F. – CROWE, J.H. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. In: *Cryobiol.*, vol. 34, 1987, p. 324 – 331.
- CHAMPION, Z.J. – VICKERS, M.H. – GRAVANCE, C.G. – BREIER, B.H. – CASAY, P.J. 1997. Growth hormone or insulin-like growth factor – I extends of longevity equine spermatozoa *in vitro*. In: *Theriogenology*, vol. 7, 1997, p. 1793 – 1800.
- CHANG, M.C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. In: *Nature*, vol. 168, 1951, p. 697 – 698.
- FIK, M. 2009. Možnosti ovplyvnenia kapacitácie spermii králik. Nitra : SPU. Dizertačná práca. 2009, s. 77 – 104.
- FIK, M. – PARKÁNYI, V. – ONDRUŠKA, L. – TOČKA, I. 2008b. Zhodnotenie vybraných reprodukčných parametrov u samíc brojlerových králikov po ovplyvnení inseminačnej dávky implementorom heparínom. XXIV. konferencia Aktuálne smery v chove brojlerových králikov. Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Výskumný ústav živočíšnej výroby, OMHZ, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Zborník, CD ROM. ISBN 978-80-88872-81-8. Nečíslované, p.s. 6.
- GRAHAM, J.K. – HAMMERSTEDT, R.H. 1992. Differential effects of butylated hydroxytoluene analogs on bull sperm subjected to cold-induced membrane stress. In: *Cryobiol.*, vol. 29, 1992, p. 106 – 117.
- JANUSKAUSKAS, A. – GIL, J. – SÖDERQUIST, L. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2001. Relationship between Sperm Response to Glycosaminoglycans *in vitro* and Non-return Rates of Swedish Dairy AI Bulls On-line: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119045594/HTMLSTART>
- LAPOINTE, S. – AHMAD, I. – BUHR, M.M. – LAMBERT, R.D. SIRARD, M.A. 1996. Modulation of post-thaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by female genital products. In: *J. Dairy Sci.* 79, 2155 2162.
- MARKS, J.L. – AX, R.L. 1985. Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. In: *J Dairy Sci.*, vol. 68, 1985, p. 2078 – 2082.
- MASSÁNYI, P. TRANDŽÍK, J. – LUKÁČ, N. – TOMAN, R. – HALO, M. – STRAPÁK, P. 2002. Evaluation of spermatozoa motility using computer technique. In: Nitra, Slovak Agricultural University, 2002, 70 p. ISBN 80-8069-117-7

- MATEJAŠÁKOVÁ, E. – PIVKO, J. – RIHA, L. – MAKAREVICH, A.V. – SIROTKIN, A. V. 2005. Vplyv vybraných rastových faktorov na aktivitu semena baranov. Košice. 2005.
- MORALES, P. – PIZARRO, E. – KONG, M. – KERR, B. – CERIC, F. – VIGIL, P. 2000. Gonadotropin-Releasing Hormone-Stimulated Sperm Binding to the Human Zona Is Mediated by a Calcium Influx. In: *Biology of Reproduction*, 2000, 63, p. 635 – 642.
- MORALES, P. 1998. Gonadotropin-Releasing Hormone Increases Ability of the Spermatozoa to Bind to the Human Pellucida. In: *Biology of Reproduction*, vol. 59, p. 426 – 430.
- ONDRUŠKA, L. – Parkányi, V. – Rafay, J. – Chlebec, I. 2008. Effect of LHRH analogue included in seminal dose on kindling rate a prolificacy of rabbits artificially inseminated. In: 9th WRSA. Verona.
- Parrish, J.J. – Susko-Parrish, J.L. – Winer, M.A. – First, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. In: *Biol. Reprod.*, vol. 38, 1988, p. 1171–1180.
- Parrish, J.J. – Vrendenburgh, W.L. – Lavin, C.A. 1993 Increases in bovine sperm intracellular calcium (Cai) and pH (pHi) during capacitation. In: *Biol. Reprod.*, vol. 48, 1993, no. 1, p. 106.
- QUINTELA, L.A.1. – PEÑA, A.I.1. – VEGA, M.D.1. – GULLÓN, J. – PRIETO, C. – BARRIO, M. – BECERRA, J.J. – HERRADÓN, P.G. 2004. Ovulation induction in rabbit does by intravaginal administration of the GnRH analogue [des-Gly10, D-Ala6] – LHRH ethylamide: field trial. 9th World Rabbit Congress – June 10-13, 2008 – Verona – Italy on-line: <http://docs.google.com/gview?a=v&q=cach%3AYts9eWBtloYJ%3Aworld-rabbit-science.com%2FWRSA-Proceedings%2FCongress-2008-Verona%2FPapers%2FR-Quintela.pdf+quintela+et+al.+2004&hl=sk&gl=sk&pli=1>
- RIHA, L. – APOLEN, D. – PIVKO, J. – GRAFENAU, P. – KUBOVIČOVÁ, E. 2006. Vplyv implementorov na oplodnenosť oviec v mimosezónnom období. Slovak Agricultural Research Centre, Nitra, Slovak Republic on-line: [http://www.scpv.sk/slju/06\\_4/Riha.pdf](http://www.scpv.sk/slju/06_4/Riha.pdf)
- SLAMEČKA, J. 2009. Vplyv LHRH na interakciu gamét kráľika. In: Slovenská poľnohospodárska univerzita. Diplomová práca. 2009, s. 43 – 74
- TATHAM, B.G. – FEEHAN, T. – PASHEN, R. 2003. Buffalo and cattle hybrid embryo development is decreased by caffeine treatment during *in vitro* fertilization. In: *Theriogenology*, vol. 59, 2003, p. 709 – 717.
- VÁŠÍČEK, J. 2009. Vplyv intravaginálnej aplikácie glykózaminoglykánu v inseminačnej dávke kráľika na interakciu spermia – vajíčko. In: Slovenská poľnohospodárska univerzita. Diplomová práca. 2009, s. 58 – 69.
- VEŽNÍK, Z. 1973. Diagnosticky význam stanovení rychlosti pohybu spermií býku fotogrammetricky a testem propulsivity. In: *Veter., Med. (Praha)*, roč. 18, 1973, s. 291 – 302.
- VICKERS, M.H. – CASEY, P.J. – CHAMPION, Z.J. – GRAVANCE, C.G. – BREIER, B. H. 1999. IGF – I treatment increases mobility and improves morphology of immature spermatozoa in the GH – deficient dwarf (dw / dew) rat. *Growth ... and IGF research* 9, 1999, p. 236 – 240.
- WHITFIELD, CH. – PARKINSON, T.J. 1992. Relationship between fertility of bovine semen and *in vitro* induction of acrosome reactions by heparin. In: *Theriogenology* 38, p. 11 – 20.

## Kontaktná adresa:

Ing. Martin Fik, PhD. SPU v Nitre, Katedra hydinarstva a malých hospodárskych zvierat, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Tel.: 037/641 47 17, e-mail: martin.fik@gmail.com

## Obsah

<b>Nina MORAVČÍKOVÁ, Anna TRAKOVICKÁ</b>	
Analýza polymorfizmu <i>CSN3</i> génu v populácii krížencov slovenského strakatého a holštajnského plemena . . . . .	85
<b>Žaneta PAUKOVÁ, Daniela ONUFEROVÁ</b>	
Vplyv nelegálnych skládok odpadov na fytoodiverzitu v ich bezprostrednom okolí . . . . .	88
<b>Marek RENČO</b>	
Aplikácia kompostu – účinný nástroj na reguláciu parazitických nematód rastlín v pôde . . . . .	93
<b>Monika SOVIŠOVÁ, Peter ONDRIŠÍK</b>	
Vplyv bio-organických hnojív na sezónne zmeny anorganických foriem dusíka v pôde pod pšenicou letnou f. ozimnou . . . . .	98
<b>Hasan A. MOHAMMED, Erika HORNIÁKOVÁ</b>	
Dopad využívania využívania rôznych druhov tukov vo výžive brojlerových kurčiat na ich výkonnostné parametre . . . . .	102
<b>Martin FIK, Vladimír PARKÁNYI, Lubomír ONDRUŠKA, Norbert LUKÁČ, Róbert CHLEBO</b>	
Vplyv GnRH (Lecirelinu) na vybrané kvalitatívne ukazovatele semena králikov . . . . .	108

## Content

<b>Nina MORAVČÍKOVÁ, Anna TRAKOVICKÁ</b>	
Analysis of Polymorphism of the <i>CSN3</i> Gene in Population of Slovak Spotted and Holstein Crossbreeds . . . . .	85
<b>Žaneta PAUKOVÁ, Daniela ONUFEROVÁ</b>	
The Impact of Illegal Landfills on the Phytodiversity in their Immediate Neighbourhood . . . . .	88
<b>Marek RENČO</b>	
Effective Control of Plant Parasitic Nematodes in the Soil with Compost Amendments . . . . .	93
<b>Monika SOVIŠOVÁ, Peter ONDRIŠÍK</b>	
Effect of Bio-Organic Fertilizers on Seasonal Changes of Inorganic Nitrogen forms in the Soil under Winter Wheat . . . . .	98
<b>Hasan A. MOHAMMED, Erika HORNIÁKOVÁ</b>	
The Effect of Different Type of Fats Utilization in Broiler (308) Feeding on the Performance Parameters . . . . .	102
<b>Martin FIK, Vladimír PARKÁNYI, Lubomír ONDRUŠKA, Norbert LUKÁČ, Róbert CHLEBO</b>	
Effect of GnRH (Lecirelinum) on Selected Quality Parameters of Rabbit Ejaculate . . . . .	108