

## Zastosowanie nowych antybiotyków w konserwacji nasienia knura w stanie płynnym\*

Magdalena Bryła, Monika Trzcńska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,  
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa

Celem pracy było przygotowanie modyfikacji rozcieńczalnika, stosowanego do przechowywania nasienia knura, zawierającego antybiotyki: polimyksynę B, florfenikol i daptomycynę. Badania prowadzono w celu uzyskania rozcieńczalnika umożliwiającego utrzymanie wysokiej wartości biologicznej nasienia konserwowanego w stanie płynnym przez okres sześciu dni. Nasienie pochodzące od 5 knurów (30 ejakulatów) rozcieńczano w rozcieńczalniku kontrolnym (Biosolwens Plus) oraz w rozcieńczalnikach R1, R2 i R3, zawierających odpowiednio: polimyksynę B, florfenikol i daptomycynę. Ocenę jakości przechowywanego nasienia przeprowadzono za pomocą systemu CASA, oceniając całkowity i postępowy ruch plemników. Na podstawie zmian apoptotycznych określono odsetek plemników żywych (YO-PRO-1/PI), wykazujących zmiany apoptotyczne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI), z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1<sup>+</sup>) i wykazujących fragmentację DNA (TUNEL<sup>+</sup>). Wykazano, że rozcieńczalnik uzupełniony 200 µg florfenikolu zapewnia najwyższą jakość nasienia knura podczas 6-dniowego przechowywania.

**SŁOWA KLUCZOWE:** knur / nasienie / antybiotyki / YO-PRO-1 / JC-1 / TUNEL

Sztuczne unasienianie to metoda coraz szerzej stosowana w hodowli trzody chlewnej, pozwala bowiem na intensyfikację produkcji i maksymalne wykorzystanie wartościowych reproduktorów. Do inseminacji używane jest głównie nasienie konserwowane w stanie płynnym, które w zależności od rodzaju zastosowanego rozcieńczalnika, stopnia rozrzedzenia i warunków przechowywania zachowuje przydatność przez okres kilku dni. Jednak w dalszym ciągu problemem jest zbyt szybki spadek wartości zapładniającej nasienia wraz z upływem czasu od jego rozrzedzenia, a także obniżenie jakości nasienia u reproduktorów maksymalnie użytkowanych i selekcyjonowanych w kierunku pożądanych cech. Podczas przechowywania zachodzi szereg zmian w ejakulacie, w tym obniżenie ruchliwości, zmiany w przepuszczalności błony komórkowej, spadek transbłonowego potencjału mitochondrialnego, czy wzrost fragmentacji DNA plemników [3, 10, 11]. Z naszych wcześniejszych

---

\*Badania wykonano w ramach działalności statutowej Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach z podzadania 02-5.07.1

badania wynika, że z czasem przechowywania nasienia wzrasta odsetek plemników z niskim potencjałem transbłonowym oraz populacja plemników apoptotycznych o zaburzonej integracji błon komórkowych [10, 11]. Obniżenie zdolności zapładniających nasienia podczas przechowywania może być również związane z występowaniem infekcji bakteryjnych. Zanieczyszczenia bakteryjne są rutynowo obserwowane podczas pobierania i przechowywania nasienia. Maroto Martin i wsp. [8] podają, że w 62,5% świeżych ejakulatów i w 79% dawek inseminacyjnych wykazano obecność szczepów bakteryjnych. Wysoki poziom zanieczyszczeń bakteryjnych w nasieniu związany jest ze wzrostem aglutynacji, uszkodzeniem akrosomu i spadkiem ruchliwości plemników oraz skróceniem czasu przechowywania takiego nasienia [2]. Dlatego powszechnie w praktyce inseminacyjnej stosuje się suplementację rozcieńczalników antybiotykami. Jednak antybiotyki, hamując wzrost drobnoustrojów patogennych, nie pozostają bez wpływu na jakość nasienia [9]. Wykazano bowiem, że obecność antybiotyków może negatywnie oddziaływać na ruchliwość i żywotność plemników oraz niekorzystnie wpływać na strukturę błon komórkowych [1]. W związku z tym poszukuje się takich antybiotyków, które eliminując drobnoustroje nie powodują znacznego obniżenia wartości biologicznej przechowywanego nasienia.

Jednocześnie w badaniach nad doskonaleniem technik konserwacji nasienia knura w stanie płynnym dąży się do precyzyjnego diagnozowania parametrów jakości nasienia, co pozwoli na weryfikację stosowanych rozcieńczalników. Dostępne obecnie metody analizy jakości nasienia coraz częściej opierają się na charakterystycznych zmianach morfologicznych i biochemicznych, będących oznaką zmian apoptotycznych w plemniku.

Celem podjętych badań była modyfikacja składu rozcieńczalnika, polegająca na zastosowaniu nowych antybiotyków, pozwalająca na konserwację nasienia knura przez okres sześciu dni bez obniżenia jego wartości biologicznej.

### **Material i metody**

Przetestowano antybiotyki, które nie były dotychczas stosowane w konserwacji nasienia knura, tj. polimyksynę B, florfenikol i daptomycynę. Jednocześnie, oprócz podstawowych parametrów jakości nasienia, zastosowano nowe metody oceny, które pozwolą określić wpływ ww. antybiotyków na wartość biologiczną przechowywanego nasienia. Zastosowane metody opierają się na analizie zmian apoptotycznych z zastosowaniem fluorochromu YO-PRO-1, pomiarze mitochondrialnego potencjału transbłonowego ( $\Delta\Psi$ ) przy zastosowaniu barwnika JC-1 oraz ocenie stopnia fragmentacji DNA przy użyciu metody TUNEL.

W badaniach wykorzystano nasienie pobrane od 5 knurów (po 6 ejakulatów od każdego knura) standardowo 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. Nasienie pobierano (2 razy w tygodniu w okresie od października do listopada) od knurów mieszańców międzyrasowych (polska biała zwisłoucha i wielka biała polska) o masie ciała  $254,3 \pm 4,2$  kg i w wieku  $17,9 \pm 0,8$  miesięcy. Nasienie pobierano metodą manualną. Po wstępnej ocenie mikroskopowej do dalszych doświadczeń wykorzystano tylko te ejakulatory, w których stwierdzono 80% plemników o prawidłowej morfologii i ruchu postępowym powyżej 80%.

Nasienie rozcieńczano w rozcieńczalniku kontrolnym Biosolwens Plus (Biocheffa, Polska) oraz w rozcieńczalnikach R1, R2 i R3, w których 200 µg gentamycyny zastąpiono odpowiednio antybiotykami: polimyksyną B (200 µg), florfenikolem (200 µg), daptomycyną (200 µg). 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 nasienie przechowywano w temp. 15°C w szafie chłodniczej przez okres sześciu dni. Ocena ruchliwości plemników oraz zmian apoptotycznych wykonywano bezpośrednio po rozcieńczeniu (dzień 0) oraz w 3. i 6. dniu przechowywania. Ocena ruchliwości nasienia przeprowadzano przy zastosowaniu systemu CASA (Computer Assisted Semen Analysis Systems), określając ruch całkowity (TM, %) oraz ruch postępowy (PM, %) plemników. Ocena zmian apoptotycznych przeprowadzono na podstawie zmian w przepuszczalności błony komórkowej plemników za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 (Vybrant Apoptosis Assay Kit#4, Molecular Probes, USA). W tym celu próbki zawierające  $1 \times 10^6$  plemników przepłukiwano w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) i odwirowywano przez 10 minut. Po odciążeniu supernatantu plemniki umieszczano w roztworze PBS, zawierającym 2 µl YO-PRO-1 i 1 µl jodku propydydy (PI). Inkubację przeprowadzono w ciemności, w temperaturze pokojowej, przez 20-30 minut. Pomiar mitochondrialnego potencjału transbłonowego ( $\Delta\Psi_m$ ) przeprowadzono przy zastosowaniu barwnika JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide) (Molecular Probes, USA). Nasienie ( $1 \times 10^6$  plemników) zawieszono w roztworze PBS bez jonów wapnia i magnezu, a następnie wirowano przez 10 minut. Po usunięciu supernatantu plemniki ponownie umieszczono w roztworze PBS, zawierającym 1 µl JC-1. Inkubację przeprowadzono przez 10 minut w łaźni wodnej, w temperaturze 37°C. Do identyfikacji stopnia fragmentacji DNA plemnikowego zastosowano zestaw In Situ Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Germany). Nasienie ( $1 \times 10^6$  plemników) zawieszono w roztworze PBS, wirowano przez 10 minut, a po usunięciu supernatantu utrwalano w 200 µl 1% paraformaldehydu przez 10 minut, w temperaturze pokojowej, a następnie permabilizowano przez 15 minut, stosując 0,1% Triton X-100. Po 3-krotnym przepłukaniu próbki inkubowano w 50 µl mieszaniny reakcyjnej przez 60 minut. W celu usunięcia niezwiązanych nukleotydów próbki przepłukiwano 2-krotnie roztworem PBS i przenoszono do roztworu VectaShield z DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Obserwacje poszczególnych subpopulacji plemników (200 plemników na każdą próbkę) przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse E600 (Tokyo, Japan) przy użyciu odpowiednich filtrów. Fluorescencyjną ocenę jakości nasienia przeprowadzono na podstawie: odsetka plemników wykazujących zmiany apoptotyczne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), odsetka plemników żywych (YO-PRO-1<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), odsetka plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1<sup>+</sup>) oraz odsetka plemników wykazujących fragmentację DNA (TUNEL<sup>+</sup>).

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (według wzoru:  $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ ; gdzie:  $y$  – oceniana zmienna,  $\mu$  – średnia wartość,  $a_i$  – dzień oceny nasienia, rodzaj zastosowanego rozcieńczalnika,  $e_{ij}$  – błąd losowy) z wykorzystaniem oprogramowania komputerowego Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, USA). Istotność różnic pomiędzy średnimi w grupach szacowano stosując wielokrotny test

Duncana (Duncan Multiple Range Test). Za istotne statystycznie przyjęto różnice pomiędzy parametrami na poziomie  $P < 0,01$ .

### Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki oceny jakości nasienia przechowywanego w badanych rozcieńczalnikach przez 6 dni przedstawiono w tabeli.

Z przeprowadzonych badań wynika, że przechowywanie nasienia przez okres trzech dni nie powoduje różnic w odsetku plemników ruchliwych, zarówno o ruchu całkowitym (TM), jak i ruchu postępowym (PM), pomiędzy badanymi rozcieńczalnikami. Uzyskane wyniki różnią się od podawanych przez Kommisrud i wsp. [7] oraz De Ambrogi i wsp. [4], którzy już po około 48 godzinach oraz po 102 godzinach przechowywania obserwowali znaczący spadek ruchliwości plemników. W niniejszej pracy dopiero w szóstym dniu przechowywania stwierdzono statystycznie istotne różnice ( $P < 0,01$ ) w odsetku plemników o ruchu całkowitym pomiędzy kontrolą ( $51,2 \pm 5,4$ ), rozcieńczalnikiem R1 ( $55,5 \pm 4,7$ ) a rozcieńczalnikami R2 ( $64,9 \pm 3,7$ ) i R3 ( $62,9 \pm 4,6$ ). Porównując odsetek plemników o ruchu postępowym (PM) pomiędzy rozcieńczalnikami można zaobserwować, że najwyższą wartość, istotnie statystycznie różniącą się od pozostałych, obserwuje się w rozcieńczalniku zawierającym daptomycynę ( $61,5 \pm 4,6$ ).

Z badań przeprowadzonych przez Althouse i Lu [2] wynika, że obecność bakterii w rozcieńczalniku indukuje zmiany apoptotyczne nasienia, co prowadzi do obniżenia jego wartości biologicznej. Dlatego ocena tych zmian wydaje się koniecznym kryterium oceny przydatności rozcieńczalników do długiego przechowywania nasienia. W prezentowanych badaniach zmiany apoptotyczne oceniano za pomocą fluorochromu YO-PRO-1/PI, identyfikującego obecność charakterystycznych mikroporów w zewnętrznej błonie komórkowej plemników. Uzyskane wyniki pokazują, że statystycznie istotne różnice pomiędzy rozcieńczalnikami obserwuje się dopiero w 6. dniu przechowywania, a indukcja zmian apoptotycznych uwarunkowana jest użytym antybiotykiem. Wysocki i wsp. [12] również wykazali zależność pomiędzy rodzajem zastosowanego rozcieńczalnika a stopniem nasilenia zmian apoptotycznych podczas przechowania nasienia knura w temperaturach dodatnich. W naszych badaniach najniższy odsetek plemników wykazujących zmiany apoptotyczne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI) i najwyższy odsetek plemników żywych (YO-PRO-1<sup>-</sup>/PI) obserwowano w nasieniu konserwowanym rozcieńczalnikiem zawierającym florfenikol (R2). Jednocześnie najwyższy poziom zmian apoptotycznych plemników ( $16,4 \pm 3,2$ ) zaobserwowano w rozcieńczalniku uzupełnionym 200  $\mu\text{g}$  daptomycyny.

Do pomiaru zmian mitochondrialnego potencjału transbłonowego został użyty barwnik JC-1, który w żywych plemnikach gromadzi się w mitochondriach w postaci agregatów, widocznych w mikroskopie fluorescencyjnym w postaci czerwono-pomarańczowej fluorescencji. Odsetek plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1<sup>+</sup>) w porównywanych rozcieńczalnikach zamieszczono w tabeli. W 6. dniu przechowywania najwyższy odsetek plemników z wysokim  $\Delta\Psi\text{m}$  odnotowano w rozcieńczalnikach uzupełnionych florfenikolem ( $63,4 \pm 5,6$ ) i daptomycyną ( $62,9 \pm 4,8$ ) ( $P < 0,01$ ). Z uzyskanych danych wynika, że wraz ze wzrostem czasu przechowywania nasienia obniża się procent plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym. Taką zależność obserwowano we

**Tabela – Table**

Wyniki oceny jakości nasienia podczas przechowywania

Results of assessment of sperm quality during liquid storage

Parametry oceny nasienia Sperm parameters	Dzień przechowywania Day of storage	Rozcieńczalniki – Extenders			
		kontrola control	R 1 extender 1	R 2 extender 2	R3 extender 3
Odsetek plemników o ruchu całkowitym (%) Total motility (%)	0	91,3 ±5,3	95,4 ±7,1	91,8 ±6,5	94,3 ±5,2
	3	84,2 ±4,9	84,4 ±6,2	87,9 ±6,4	86,5 ±6,1
	6	51,2 ±5,4 <sup>A</sup>	55,5 ±4,7 <sup>A</sup>	64,9 ±3,7 <sup>B</sup>	62,9 ±4,6 <sup>B</sup>
Odsetek plemników o ruchu postępowym (%) Progressive motility (%)	0	88,6 ±3,3	91,3 ±6,4	89,3 ±7,1	90,1 ±7,4
	3	74,5 ±5,6	76,7 ±5,4	75,4 ±9,5	77,0 ±4,3
	6	53,9 ±5,1 <sup>A</sup>	54,3 ±5,9 <sup>A</sup>	55,9 ±3,7 <sup>A</sup>	61,5 ±4,6 <sup>B</sup>
Odsetek plemników żywych (YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI) (%) Viable spermatozoa (YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI) (%)	0	89,4 ±6,1	90,3 ±7,2	91,3 ±8,1	91,6 ±4,5
	3	74,2 ±3,7	76,4 ±6,1	75,4 ±7,2	76,2 ±7,3
	6	45,3 ±6,8 <sup>A</sup>	43,4 ±8,6 <sup>A</sup>	57,2 ±6,3 <sup>B</sup>	49,7 ±4,3 <sup>A</sup>
Odsetek plemników wykazujących zmiany apoptotyczne (YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI) (%) Viable spermatozoa with apoptotic- like changes (YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI) (%)	0	4,5 ±1,1	4,0 ±0,9	3,8 ±0,5	4,0 ±1,3
	3	6,4 ±2,5	7,3 ±0,6	5,9 ±2,4	8,4 ±2,0
	6	11,3 ±3,6 <sup>A</sup>	11,9 ±4,1 <sup>A</sup>	6,1 ±1,8 <sup>B</sup>	16,4 ±3,2 <sup>C</sup>
Odsetek plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1 <sup>+</sup> ) (%) Mitochondria with high ΔΨm (JC-1 <sup>+</sup> ) (%)	0	92,5 ±6,7	94,4 ±5,3	94,8 ±3,3	93,9 ±2,7
	3	79,1 ±5,3	83,4 ±6,9	84,0 ±5,1	84,9 ±4,0
	6	52,5 ±3,2 <sup>A</sup>	53,6 ±6,1 <sup>A</sup>	63,4 ±5,6 <sup>B</sup>	62,9 ±4,8 <sup>B</sup>
Odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA (%) TUNEL <sup>+</sup> (%)	0	1,9 ±0,1	1,8 ±0,1	1,9 ±0,3	2,0 ±0,2
	3	2,1 ±0,4	1,9 ±0,7	2,2 ±0,1	2,1 ±0,4
	6	2,2 ±0,2	2,2 ±0,2	2,2 ±0,3	2,4 ±0,3

A, B, C – wartości w postaci średnich arytmetycznych ±odchylenie standardowe z różnymi literami w wierszach różnią się istotnie statystycznie (P<0,01)

A, B, C – values expressed as mean ±SD with different superscript letters in rows differ significantly (P<0.01)

wcześniejszych badaniach [10], jak również potwierdzają ją wyniki uzyskane przez Dziekońską i wsp. [5].

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono wzrostu fragmentacji DNA w nasieniu przechowywanym przez okres 6 dni. Uzyskany wynik różni się od podanego przez

Boe-Hansen i wsp. [3], którzy obserwowali wzrost fragmentacji DNA po 72 godzinach przechowywania nasienia w temperaturze 18°C. Badania przeprowadzone przez Frase-ra i Strzeżka [6] wskazują na zmiany integracji DNA podczas przechowywania nasie-nia. Rozbieżności w uzyskanych wynikach mogą wynikać z różnych metod oceny stopnia fragmentacji DNA, jak również z różnej temperatury przechowywania nasienia i rodzaju rozcieńczalnika zastosowanego do przechowywania.

Podsumowując można stwierdzić, że przechowywanie nasienia przez okres 3 dni w rozcieńczalnikach uzupełnionych gentamycyną, polimyksyną B, florfenikolem czy daptomy-cyną nie powoduje obniżenia jego jakości w odniesieniu do wszystkich badanych pa-rametrow. Statystycznie istotne różnice pomiędzy rozcieńczalnikami zostały odnotowane dopiero w 6. dniu przechowywania nasienia. Rozcieńczalnik uzupełniony daptomycyną zapewnił najwyższy odsetek plemników o ruchu postępowym (PM). Jednocześnie w roz-cieńczalniku tym stwierdzono najwyższy poziom zmian apototycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>). Podczas 6-dniowego przechowywania nasienia najwyższy odsetek plemników o ruchu całkowitym (TM), plemników żywych (YO-PRO-1<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) i z wysokim potencjałem mi-tochondrialnym (JC<sup>-</sup>) oraz najniższy odsetek plemników wykazujących zmiany apopto-tyczne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) zaobserwowano w rozcieńczalniku uzupełnionym florfenikolem. Uzyskane rezultaty badań wskazują, że przechowywanie nasienia przez okres sześciu dni w rozcieńczalniku z dodatkiem florfenikolu umożliwia zachowanie jego pełnej wartości biologicznej.

#### PIŚMIENNICTWO

1. ALAVI-SHOUSHTARI S.,M., AHMADI M., SHAHVARPOUR S., KOLAHIAN S., 2007 – Effects of tiamulin, neomycin, tetracycline, fluorophenicol, penicillin G, Linco-Spectin, erythromycin and oxytetracycline on controlling bacterial contaminations of the river buffalo (*Buballus bubalis*) semen. *Pakistan Journal of Biological Science* 10, 3200-3204.
2. ALTHOUSE G.C., LU K.G., 2005 – Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63, 573-584.
3. BOE-HANSEN G.B., ERSBØLL A.K., GREVE T., CHRISTENSEN P., 2005 – Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 63, 2006-2019.
4. DE AMBROGI M., BALLESTER J., SARAVIA F., CABALLERO I., JOHANNISSON A., WALLGREN M., ANDERSSON M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., 2006 – Effect of storage in short-and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology* 29, 543-552
5. DZIEKOŃSKA A., FRASER L., MAJEWSKA A., LECEWICZ M., ZASIADCZYK Ł., KORDAN W., 2013 – Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17°C. *Polish Journal of Veterinary Science* 16, 517-525.
6. FRASER L., STRZEŻEK I., 2004 – The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 42, 49-55.

7. KOMMISRUUD E., PAULENZ H., SEHESTED E., GREVLE I.S., 2002 – Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43, 49-55.
8. MAROTO MARTÍN L.O., CRUZ MUÑOZ E., DE CUPERE F., VAN DRIESSCHE E., ECHEMENDIA-BLANCO D., MACHADO RODRÍGUEZ J.M., BEECKMANS S., 2010 – Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science* 120, 95-104.
9. OKAZAKI T., MIHARA T., FUJITA Y., YOSHIDA S., TESHIMA H., SHIMADA M., 2010 – Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology* 74, 1691-1700.
10. TRZCIŃSKA M., BRYŁA M., SMORAĞ Z., 2008 – Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *Journal of Animal and Feed Sciences* 17, 372-380.
11. TRZCIŃSKA M., BRYŁA M., SMORAĞ Z., 2011 – Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo*. *Animal Reproduction Science* 124, 90-97.
12. WYSOCKI P., ŁYJAK A., KORDAN W., 2013 – Analysis of proapoptotic changes in boar spermatozoa stored at 16°C in different short-term semen extenders. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy* 57, 425-428.

Magdalena Bryła, Monika Trzcińska

## The use of new antibiotics for preservation of boar semen in liquid form

### Summary

The aim of this study was to prepare a modification of the diluent used for liquid storage of boar semen, containing the antibiotics polymyxin B, florfenicol or daptomycin. The study was conducted in order to obtain a diluent enabling semen preserved in liquid form for six days to retain its high biological value. Semen from six boars (30 ejaculates) was diluted in a control extender (Biosolwens Plus) and extenders R1, R2 and R3 containing polymyxin B, florfenicol and daptomycin, respectively. The quality of the stored semen was evaluated on the basis of sperm motility, using a CASA system (TM: total motility; PM: progressive motility) and on the percentage of viable sperm (YO-PRO-1/PI<sup>+</sup>), sperm with apoptotic-like changes (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), sperm with mitochondrial activity (JC-1<sup>+</sup>) and sperm with DNA fragmentation (TUNEL<sup>+</sup>). Our research showed that supplementation with 200 µg florfenicol ensures the highest quality of boar semen during 6-day storage.

**KEY WORDS:** boar / semen / antibiotics / YO-PRO-1 / JC-1 / TUNEL