

# PREPARĀTA MILDRONĀTA IEDARBĪBA UZ VAISLAS KUIĻU DZIMUMAKTIVITĀTI UN SPERMAS KVALITĀTI

## INFLUENCE OF PREPARATION MILDRONAT ON SEXUAL BEHAVIOR AND SEMEN QUALITY OF BOARS

**Vita Antāne<sup>1</sup>, Ilmārs Stonāns<sup>2</sup>, Jāzevs Rimeicāns<sup>1</sup>, Māra Mangale<sup>1</sup>, Zigmunds Brūveris<sup>1</sup>, Alberts Auzāns<sup>1</sup>, Aleksandrs Mednis<sup>1</sup>, Ivars Lūsis<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

<sup>2</sup>AS Grindeks

### ABSTRACT

In 1984, the Institute of Organic Synthesis of Latvian Academy of Sciences developed a medical drug Mildronate that is widely used in medicine as anti-ischemic and stress-protective drug in treating various cardiovascular diseases, and in farm animals as growing and metabolic process stimulator. It is known, that Mildronate (Quaterin, Meldonium) interferes with carnitine biosynthesis, controlling carnitine and gamma-butyrobetaine (GBB) concentration ratio. L-carnitine is implicate in reproductive biology and could be associated with the maturation process of spermatogenesis. In its turn, GBB normalizes and stimulates the sexual activity and potency in mammals.

The aim of our study was to estimate the influence of preparation Mildronate on spermatogenesis, *libido* and semen quality of boars. Two groups (control and experimental) of boars were used to achieve the task of the research. Each group consisted of six animals, were kept and fed at the same circumstances. Experimental period started two months later when the boars had reached the breeding preparedness. The boars of experimental group got orally 2 g of Mildronate daily for 60 days. Animals both control and experimental groups on a regular basis were tested for health status as well as the blood samples were taken. The semen was collected manually once every 10 days. The semen quality parameters were assessed before the administration of Mildronate and further once in 39 days that corresponds to the length of spermatogenesis cycle in boars. The sexual behavior was detected for each boar. The results of the study indicate that the administration of Mildronate in boars improves their sexual activity and the semen quality: time from approaching the „dummy” to the start of ejaculation is significantly ( $p < 0.05$ ) reduced and the progressive motility of spermatozoa is significantly increased ( $p < 0.001$ ). In animals that were administered Mildronate the dynamic changes of spermatozoa activity are more even and smoother with every semen collection.

**KEY WORDS:** mildronate, boars, sexual activity, semen quality indices.

### IEVADS

Vaislinieku selekcija, izaudzēšana, to apmācība spermas atdošanai ir liels laika, ieguldītā darba un finansu ietilpīgs process (5). Apgaļošanas procesā ļoti būtiski ir vaislinieku spermas kvalitātes rādītāji, tāpēc pētījumi par atsevišķu preparātu iespējamo pozitīvo iedarbību uz spermatogēnēzi ir zināms ieguldījums šīs problēmas risināšanā. E.Jacyno, A.Kolodziej, M.Kamyczek et al., (2007) apraksta par L-Carnitīna pozitīvo ietekmi uz kuiļu spermatogēnēzi (3) Savukārt Mildronāts, kurš sintezēts Latvijas Organiskās Ķīmijas institūtā, un atļauts lietot humānajā medicīnā sākot ar 1984 gadu,

būtiski samazina L-karnitīna, bet paaugstina  $\gamma$  – butirobetaīna (GBB) koncentrāciju asins plazmā un sēkliniekos. GBB var pielietot seksuālās aktivitātes un potences stimulēšanai(4). Mūsu pētījuma mērķis bija pārbaudīt preparāta Mildronāta ietekmi uz kuiļu spermatoģenēzi un spermas kvalitāti, jo iepriekšējie pētījumi parādīja (1) ka izbarojot Mildronātu 60 dienas pa 2,0 g vaislas gatavību sasniegušiem kuiļiem palielinās spermatoģenēzē epitēlija slāņa biezums, testosterona koncentrācija asins serumā, un labāk attīstās sēklinieku interstīcijs un palielinās glandulocītu (Leidīga šūnu) skaits.

## **MATERIĀLS UN METODIKA**

Pētījuma veikšanai no nosacīti analogiem kuiļiem tika komplektēta eksperimentālā un kontroles grupa. Pētījums sastāvēja no diviem periodiem: sagatavošanas un eksperimentālā. Sagatavošanas periodā tika apmācīti 8-9 mēnešus veci kuiļi, kuri sasnieguši vaislas gatavību, atdot spermu uz fantoma. Eksperimentālais periods ilga trīs mēnešus. Šajā laikā kuiļi katru dienu individuāli kopā ar barību saņēma 2 gramus Mildronātu atšķaidītu ar 2-3ml ūdens. Spermas noņemšana veikta manuāli ik pēc 10 dienām. Katram kuilim noteicām dzimumrefleksu (no kuiļa tuvošanās fantomam līdz ejakulācijas sākumam un ejakulācijas ilgumu) izteiktību laika periodā - sekundēs. Pirms Mildronāta saņemšanas un tālāk ik pēc 39 dienām, kas atbilst kuiļu viena spermatoģenēzes cikla garumam, noteicām kuiļiem spermas kvalitātes rādītājus (ejakulāta masu, spermiju koncentrāciju, spermatozoīdu aktivitāti un morfoloģiju). Spermas izmeklējumi tika veikti tūlīt pēc spermas noņemšanas uz vietas fermā. Spermatozoīdu morfoloģijas noteikšanai pagatavotās iztriepes nokrāsotas un izvērtētas Klīniskā institūta Dzīvnieku reprodukcijas laboratorijā.

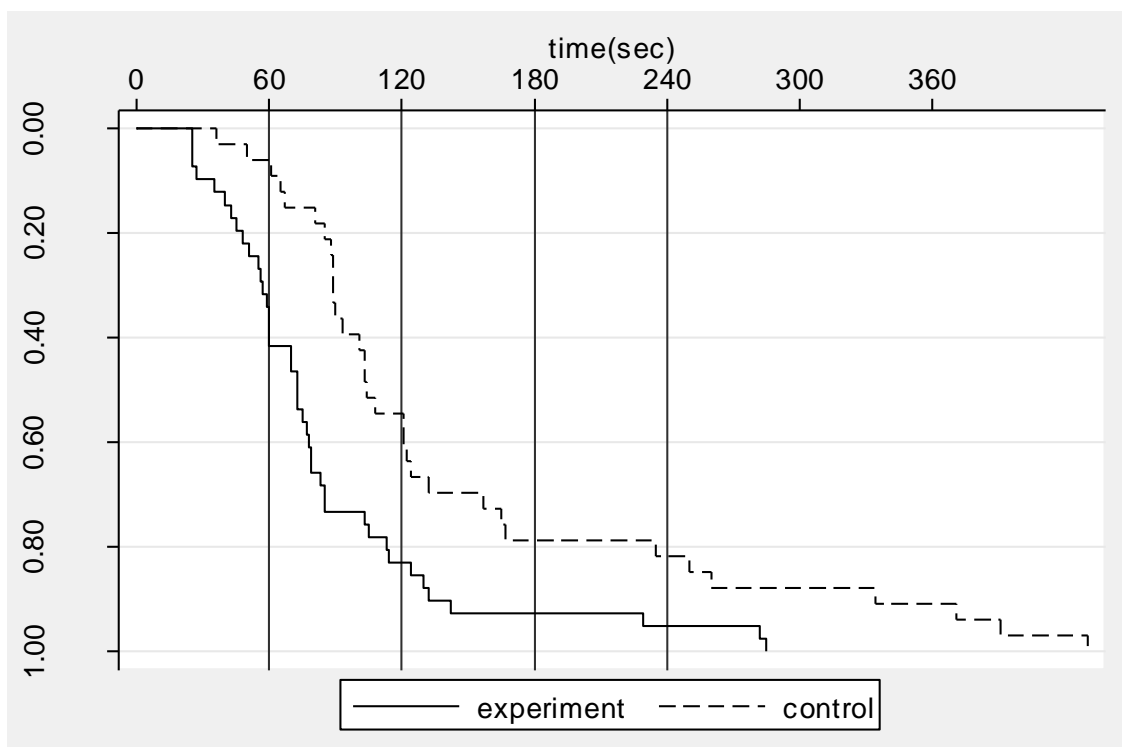
Iegūto datu apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm, iegūtajiem rezultātiem aprēķināti vidējie aritmētiskie lielumi, dispersijas, standartnovirzes, izmantojot datoru ar Stata-9 un Microsoft Excel standartprogrammu paketi.

## **REZULTĀTI UN DISKUSIJA**

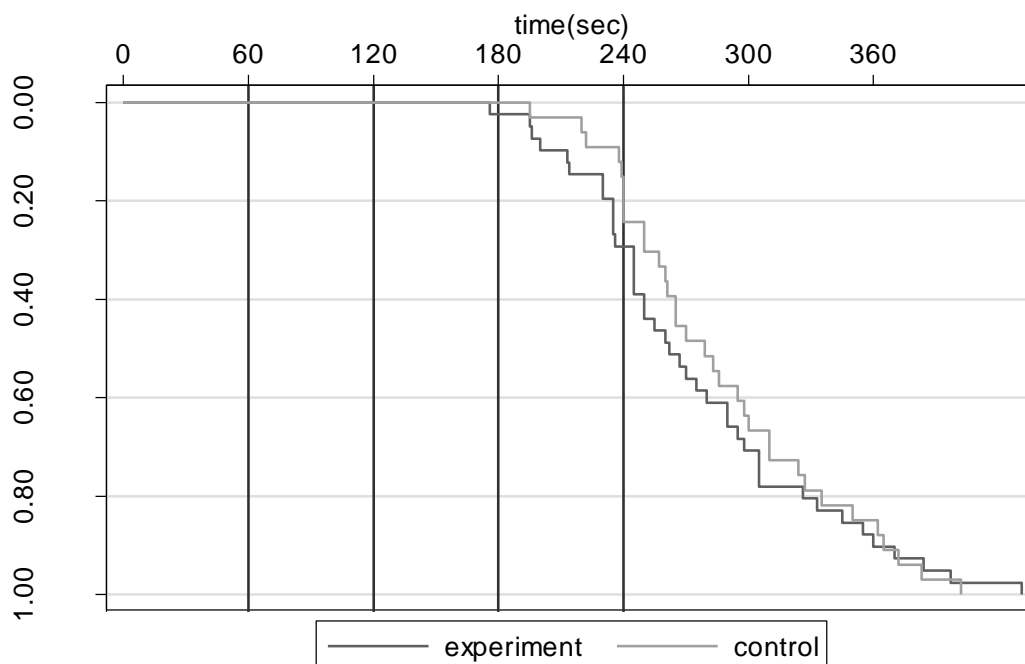
Dzimumrefleksu, no kuiļa tuvošanās fantomam līdz ejakulācijai, izteiktība un ejakulācijas ilgums laika vienībā ik pēc 60 s grafiski attēloti izmantojot Kaplan-Meier (6) metodi (1 un 2 attēls). Aprēķini parādīja, ka pēc pirmajām 60 sekundēm 42% no eksperimenta dzīvniekiem (E), kuri saņēma Mildronātu, iestājās ejakulācija. Tajā pat laikā kontroles grupas kuiļiem (K), kuri preparātu nesaņēma, ejakulācija iestājusies tikai 6% gadījumos. Pēc 120 s šie rādītāji ir attiecīgi 83% un 55%, pēc 180 s - 93% un 79%. Atšķirības starp grupām pēc Wilcoxon (Breslow) testa ir būtiskas -  $Pr > \chi^2 = 0,0001$ . Turpretīm ejakulācijas ilgums (2 zīm.) eksperimenta grupas kuiļiem būtiski neatšķīrās no kontroles grupas dzīvniekiem un tā vidējie rādītāji bija attiecīgi  $276 \pm 59$  un  $288 \pm 52$  s. Pētījumos ar žurkām (2) pierādījās, ka Mildronāts samazināja brīvā karnitīna koncentrāciju žurku sēkliniekos un tas savukārt nepazemināja žurku seksuālo aktivitāti un spermas kvalitāti.

Kuiļu ejakulātu masas rādītāji attēloti 1. tabulā. Pirms Mildronāta pielietošanas eksperimenta un kontroles grupas kuiļu ejakulāta masas rādītāju atšķirības nav būtiskas ( $p > 0,05$ ). Pirmo 39 dienu laikā eksperimentālās grupas kuiļiem pēc Mildronāta pielietošanas palielinās ejakulāta masa no  $120,8 \pm 13,5$  ml līdz  $194,4 \pm 16,1$  (62%). Tai pat laikā kuiļiem, kuri preparātu nesaņēma (kontroles grupa) ejakulāta masas palielinājums nenozīmīgs un tas ir no  $145,8 \pm 24,9$  uz  $157,5 \pm 18,2$  (9%) Rādītāju atšķirības starp grupām ir ar varbūtību  $p < 0,10$ . Vienu spermatoģenēzes ciklu vēlāk (40 ... 79. diena) ejakulāta masas palielinājumu par 41% novēro kontroles grupas kuiļiem un šajā laikā tas līdzinās E grupas kuiļu ejakulāta masai. Arī turpmākajās spermas noņemšanas reizēs

(80...99 diena) ejakulāta masas rādītāji starp E un K grupas kuļiem ir līdzīgi. Mildronāts strukturāli ir radniecīgs karnitīnam (2) un tā L-karnitīna izbarošana kuļiem pozitīvi ietekmēja spermas kvalitāti, jo par 11% palielinājās ejakulāta masa un kopējais spermiju daudzums tajā (3).



1. attēls. **Laiks (s) no kuļa tuvošanās fantomam līdz ejakulācijai**  
 Figure 1. **Time (sec) from approaching the “dummy” to the start of ejaculation**



2. attēls. **Ejakulācijas ilgums (s)**  
 Figure 2. **The length of ejaculation (sec)**

1. tabula/Table 1

**Ejakulāta masa pētījuma sākumā un vidēji pa 40 dienu periodiem eksperimenta (E) un kontroles (K) grupas kuļiem, g**  
**The total wight of the ejaculate at the beginning of experiment and an average in 40 days period in experimental (E) and control (K) group boars**

aritmētiskais vidējais/arithm. mean, standartklūda/standart deviation, t-tests  
 $p < 0.10^*$ ;  $p < 0.05^{**}$ ;  $p < 0.01^{***}$

Pētījuma diena/Study days	Mērījumu skaits/Number of measurements		Ejakulāta masa/Total volume of ejaculate (g)		Atšķirību nozīmīgums/significance	
	E	K	E	K	p-vērtība	Būtiska atšķirība
0	6	5	120.8 ± 13.5	145.8 ± 24.9	0.19	
1...39	19	13	194.4 ± 16.1	157.5 ± 18.2	0.073	*
40...79	23	16	198.7 ± 13.9	204.0 ± 23.1	0.42	
80...99	11	6	208.9 ± 15.4	199.5 ± 20.3	0.36	

Spermiju koncentrācijas dinamika kuļū ejakulātā vairāku spermatoģenēzes ciklu ietvaros attēlota 2. tabulā. Pirms Mildronāta pielietošanas spermiju koncentrācijas rādītāju atšķirības starp E un K grupas dzīvniekiem nav būtiskas ( $P > 0,05$ ). Turpinot spermas noņemšanu kuļiem, spermiju koncentrācija ejakulātā palielinās gan eksperimenta, gan kontroles grupas dzīvniekiem, bet atšķirības starp grupām nav būtiskas ( $P > 0,05$ ).

2. tabula/Table 2

**Spermiju koncentrācija pētījuma sākumā un vidēji pa 40 dienu periodiem eksperimenta (E) un kontroles (K) grupas kuļiem, milj./ml**  
**The spermatozoa concentration at the beginning of experiment and an average in 40 days period in experimental (E) and control (K) group boars, milj./ml**

aritmētiskais vidējais/arithm. mean, standartklūda/standart deviation, t-tests  
 $p < 0.10^*$ ;  $p < 0.05^{**}$ ;  $p < 0.01^{***}$

Pētījuma diena/Study days	Mērījumu skaits/Number of measurements		Spermiju koncentrācija/spermatozoa concentration, milj./ml		Atšķirību nozīmīgums/significance	
	E	K	E	K	p-vērtība	Būtiska atšķirība
0	6	5	378.3 ± 25.6	337.2 ± 19.0	0.12	-
1...39	19	13	409.2 ± 14.2	395.3 ± 26.7	0.31	-
40...79	23	16	407.7 ± 12.5	416.3 ± 27.0	0.38	-
80...99	11	6	471.0 ± 18.6	441.3 ± 41.4	0.24	-

Spermatozoīdu aktivitātes rādītāji salīdzināti pa spermatoģenēzes periodiem, līdzīgi kā to veicām izvērtējot ejakulāta masas un spermiju koncentrācijas rādītājus. Pirms Mildronāta pielietošanas eksperimenta un kontroles grupas kuļū spermatozoīdu aktivitāte bija zema, attiecīgi  $5,0 \pm 0,9$  un  $4,3 \pm 0,6$  balles (3. tabula). Eksperimenta laikā ar katru nākošo spermatoģenēzes ciklu kuļiem novēro spermatozoīdu aktivitātes palielināšanos. Salīdzinot savā starpā E un K grupas dzīvniekus redzam, ka E grupas kuļiem, kuri saņēma Mildronātu spermatozoīdu aktivitāte jau pēc pirmā spermatoģenēzes cikla sasniedz 7 balles, kas atbilst kuļū spermas atšķaidīšanas un cūku

mākslīgās apsēklošanas standartam un tāda paliek visu eksperimenta laiku. Tai pat laikā kontroles grupas kuļļu vidējā spermatozoīdu aktivitāte ejakulātā nesasniedz 7 balles un ir būtiski zemāka ( $p < 0,01$ ) kā eksperimenta grupas dzīvniekiem. Jāatzīmē, ka no eksperimenta 6 kuļļiem sākot ar 40 dienu pēc Mildronāta pielietošanas iegūti 34 ejakulāti, no kuriem 25 (73%) novērtēti ar 7 un vairāk ballēm un tie ir izmantojami spermas atšķaidīšanai un cūku mākslīgai apsēklošanai. Attiecīgi no kontroles grupas 4 kuļļiem iegūti 22 ejakulāti, no kuriem tikai 8 (36%) izmantojami cūku mākslīgajā apsēklošanā.

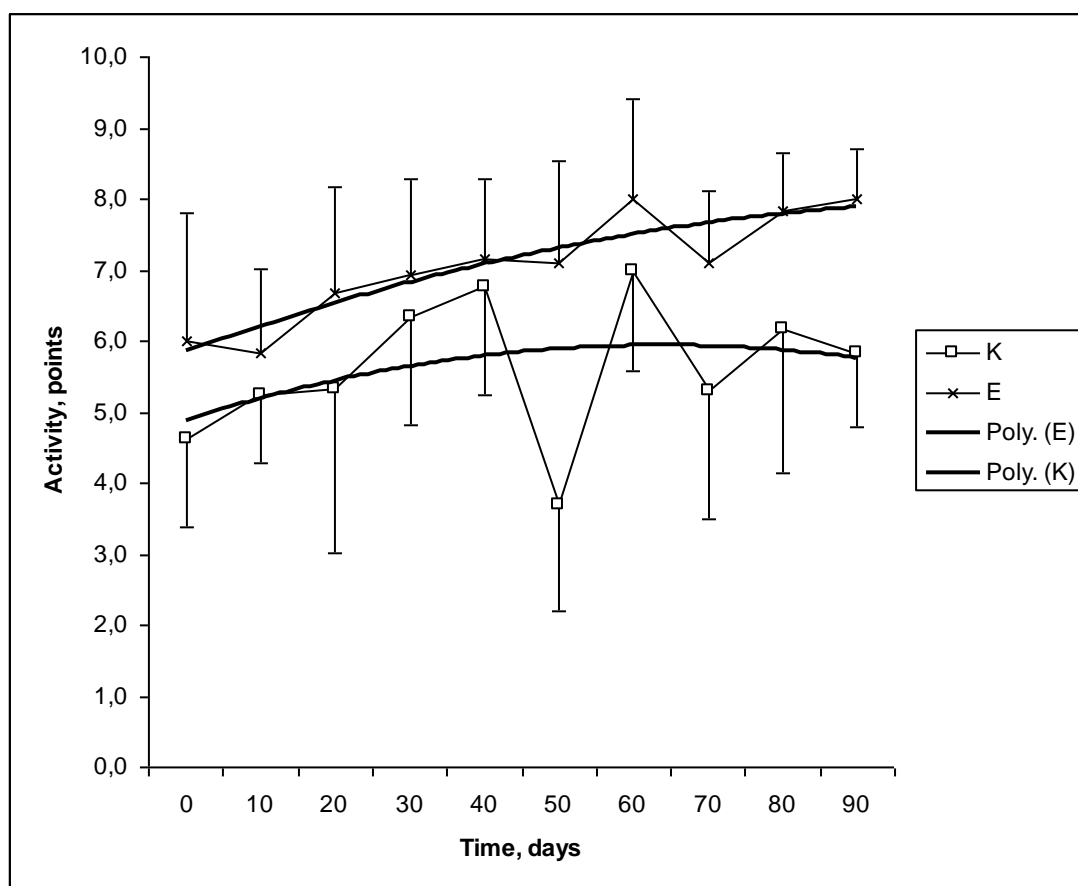
3. tabula/Table 3

**Spermatozoīdu aktivitāte pētījuma sākumā un vidēji pa 40 dienu periodiem eksperimenta (E) un kontroles (K) grupas kuļļiem/**

**Progressive motility of the spermatozoa at the beginning of experiment and an average in 40 days period in experimental (E) and control (K) group boars**

aritmētiskais vidējais/arithm. mean, standartkļūda/standard deviation, t-tests  
 $p < 0.10^*$ ;  $p < 0.05^{**}$ ;  $p < 0.01^{***}$

Pētījuma diena/Study days	Mērījumu skaits/Number of measurements		Aktivitāte, balles / motility, points		Atšķirību nozīmīgums/significance	
	E	K	E	K	p-vērtība	Būtiska atšķirība/significance
0	6	5	$5.0 \pm 0.9$	$4.3 \pm 0.6$	0.27	-
1...39	19	13	$6.6 \pm 0.3$	$5.4 \pm 0.5$	0.019	**
40...79	23	16	$7.3 \pm 0.3$	$5.6 \pm 0.5$	0.0017	***
80...99	11	6	$7.9 \pm 0.2$	$6.0 \pm 0.6$	0.0012	***



3. attēls. **Spermatozoīdu vidējā aktivitāte kuļiem, kuri saņēma Mildronātu un kontroles grupas kuļiem, kuri Mildronātu nesaņēma**

Figure 3. **The average spermatozoa motility in boars which were administrated Mildronate and control group**

Izvērtējot eksperimenta un kontroles grupas kuļļu spermiju aktivitātes vidējo rādītāju dinamiku pa atsevišķām spermatozoju noņemšanas reizēm (3 attēls) redzam, ka spermatozoju aktivitātes svārstības ir vērojamas vienlaicīgi gan eksperimenta, gan kontroles grupas kuļļiem. Tomēr jāatzīmē, ka dzīvnieki, kuri saņēma Mildronātu spermatozoju aktivitātes dinamiskās izmaiņas pa spermatozoju noņemšanas reizēm ir vienmērīgākas un izlīdzinātākas. Līdzšinējie pētījumi (7,9,10) liecina, ka Mildronāts (kvaterīns) pozitīvi ietekmē teļiem un sivēniem barības vielu uzsūkšanos zarnu traktā, uzlabo aminoskābju vielmaiņu un darbojas kā adaptogēns, mazinot sivēnu atšķiršanas stresu. Pētījumi ar cāļiem (8) parādīja, ka kvaterīns ir dzīvo šūnu augšanas stimulators un nedarbojas citotoksiski. Minēto pētījumu rezultātus var saistīt ar Mildronāta pozitīvo ietekmi uz kuļļu noturību pret stresu un aminoskābju vielu maiņu, kas ne tikai uzlaboja spermatozoju aktivitāti, bet mazināja tās svārstības starp atsevišķām spermatozoju noņemšanas reizēm.

## SECINĀJUMI

1. Preparāta Mildronāta pielietošana vaislas kuļļiem pozitīvi uzlabo dzimumrefleksu aktivitāti un spermatozoju kvalitāti: būtiski samazinās laiks no kuļļu tuvošanās fantomam līdz ejakulācijas sākumam ( $p < 0.05$ ) un būtiski paaugstinās spermatozoju aktivitāte ( $p < 0.001$ ).

2. Dzīvniekiem, kuri saņēma Mildronātu spermatozoīdu aktivitātes dinamiskās izmaiņas katrā spermas noņemšanas reizē ir vienmērīgākas un izlīdzinātākas.

#### LITERATŪRA

1. Auzāns, A., Brūveris, Z., Rimeicāns, V. Antāne, M. Mangale, J., Mednis, I. Lūsis, I. Stonāns (2010) Mildronāta iedarbība uz kuiļu sēklinieku morfoloģiju pēc saimnieciskās vaislas gatavības sasniegšanas // Veterinārmedicīnas raksti. 2010.
2. Dambrova, M., Cīrule, H., Svalbe, B., Zvejniece, L., Pugovichs, O., Zorenko, T., Kalviņš, I., Liepiņš, E., Belozeroва I. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance // Physiology & Behavior 2008; 95, 341-347.
3. Jacino, E. et al Effect of L-Carnitine Supplementation on Boar Semen Quality // Acta.vet.Brno, .2007; 76:595-600.
4. Kalvinsh, I., Veveris, M., Birmans, A. Pharmaceutial composition comprising gammabutirobetaine for stimulating the sexual activity and potency;,.WO/2003/022263[WO/2003/022263]. Ref. Type: Patent.
5. Stira, A., Nudiens, J., Veide, Dz., Konošonoka, I.-H. Cūku reprodukcijas procesu pētījumi un to optimizācijas iespējas // Starptautiskā zinātniskā konference „Dzīvnieki.Veselība. Pārtikas higiēna.”, 2002; Jelgava: 266-271
6. Veterinary epidemiologic research 2nd Edition Jan Dohoo, Wayne Martin, Henrich Stryhn /Published by VER Inc. Charlottetown · Prince Edward Island · Canada. Second printing January 2010; 475 – 476.
7. Клинская, М. М., Романов, В. Н. Влияние кватерина на пищеварение у телят // В кн.: Комбикорма, премиксы и добавки. Дубровники: 1985; 60-63.
8. Курашвили, Б. Е., Калвиньш, Я. И., Квинихадзе, С. Г., Кобахидзе, Л. Т., Минкеладзе, Л. Г., Чумбуридзе, С. Р. Результаты пищеварительных испытаний на цыплят стимулятора «кватерина» // Известия академии наук СССР, серия «Биология», 1983;. 9. : 4:142-149.
9. Романов, В. И. Процессы пищеварения и продуктивность телят при использовании кватерина в рационах // Авиореферат дисс...канд. вет. наук, Дубровники: 1987; 1 – 23
10. Тауритис, А. К., Андерсон, П. П., Бузлама, В. С., Калвиньш, И. Я. Применение кватерина для направленного изменения реакций поведения поросят при отъёмном стрессе // Тезисы докладов научной конференции, Елгава: 1984; 22 – 24