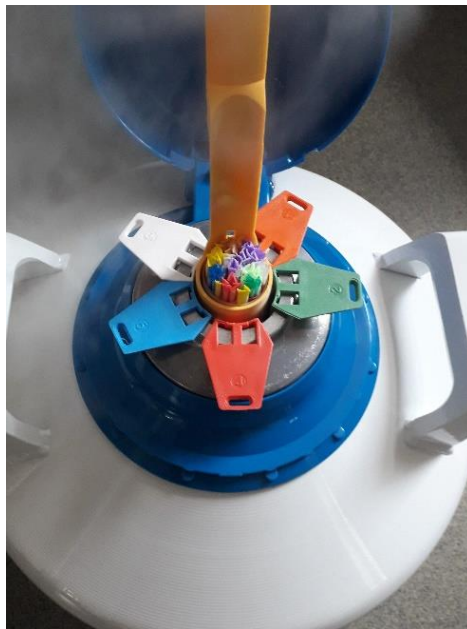




**Monika Trzcńska  
Magdalena Bryła**

# **Kierunki i możliwości modyfikacji metod kriokonserwacji oraz oceny jakości nasienia knura**

**MONOGRAFIA**



**Kraków 2020**

**INSTYTUT ZOOTECHNIKI  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

32-083 Balice, ul. Krakowska 1    tel. 12 3572500    fax 12 2856733  
*e-mail:* izooinfo@izoo.krakow.pl    *internet:* <http://www.izoo.krakow.pl>

---

**DYREKTOR INSTYTUTU ZOOTECHNIKI PIB**  
dr Krzysztof Duda

**Monografia pod redakcją:**  
*dr Moniki Trzczińskiej*

**Afiliacja:**  
Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji  
32-083 Balice, ul. Krakowska 1

**Recenzenci:**  
*prof. dr hab. Jan Udała*  
*prof. dr hab. Wojciech Nizański*

**Opracowanie redakcyjne:**  
*mgr Danuta Dobrowolska*

**Opracowanie graficzne, projekt okładki  
i skład tekstu:**  
*mgr Bogusława Krawiec*

**ISBN 978-83-7607-337-8**

© Copyright by Instytut Zootechniki PIB

Ark. wyd. 4,7.    Ark. druk. 4,9.

Druk: Zespół Wydawnictw i Poligrafii IZ PIB

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	5
1. Wprowadzenie .....	9
1.1. Kriogenika .....	9
1.2. Wykorzystanie kriogeniki w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt ...	10
1.3. Kriokonserwacja materiału biologicznego .....	13
1.3.1. Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni .....	14
1.3.2. Kriokonserwacja nasienia knura .....	17
1.4. Technologia kriokonserwacji nasienia knura .....	18
1.4.1. Podstawowy skład rozcieńczalnika mrożeniowego nasienia knura .....	20
1.5. Ocena podstawowych parametrów jakości nasienia .....	21
1.6. Proces apoptozy .....	24
1.6.1. Zmiany apoptotyczne w gonadach i gametach męskich oraz wybrane metody oceny .....	28
1.7. System antyoksydacyjny w nasieniu .....	32
1.8. Związki antyoksydacyjne i osłaniające oraz nowe rozwiązania technologiczne w kriokonserwacji nasienia knura .....	33
2. Cel badań .....	36
3. Materiał i metody .....	37
3.1. Doświadczenie 1: Opracowanie składu rozcieńczalnika mrożeniowego w oparciu o dodatek wybranych antyoksydantów i związków osłaniających	37
3.1.1. Przygotowanie rozcieńczalników .....	38
3.1.2. Ocena jakości nasienia .....	45
3.1.2.1. Komputerowo wspomagana analiza nasienia (CASA) z wykorzystaniem analizatora .....	45
3.1.2.2. Ocena morfologii plemników .....	46
3.1.2.3. Ocena integralności akrosomu .....	46
3.1.2.4. Ocena zmian w przepuszczalności błony komórkowej plemników przy zastosowaniu fluorochromu YO-PRO-1 i jodku propydyiny .....	47
3.1.2.5. Identyfikacja reszt fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej plemników przy zastosowaniu aneksyny V-FITC i jodku propydyiny .....	47

3.1.2.6. Ocena fragmentacji DNA plemników przy pomocy metody TUNEL .....	47
3.1.2.7. Ocena mitochondrialnego potencjału transbłonowego plemników .....	48
3.2. Doświadczenie 2: Ocena <i>in vivo</i> zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia knura .....	48
3.2.1. Synchronizacja cyklu płciowego loszek .....	49
3.2.2. Przygotowanie loszek do zabiegu domacicznej inseminacji .....	49
4. Analiza statystyczna .....	53
5. Wyniki .....	53
5.1. Doświadczenie 1: Opracowanie składu rozcieńczalnika mrożeniowego w oparciu o dodatek wybranych antyoksydantów i związków osłaniających .....	53
5.1.1. Ocena jakości nasienia świeżego .....	53
5.1.2. Ocena jakości nasienia kriokonserwowanego z dodatkiem wybranych antyoksydantów oraz substancji osłaniających błony komórkowe plemników .....	55
5.2. Ocena <i>in vivo</i> zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia knura .....	60
5.2.1. Selekcja rozcieńczalników mrożeniowych .....	60
5.2.2. Ocena kriokonserwowanego nasienia użytego do inseminacji loszek .....	61
5.2.3. Skuteczność unasienniania loszek nasieniem kriokonserwowanym w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach .....	61
6. Omówienie wyników .....	64
7. Wnioski .....	67

## Wykaz skrótów

- AIF** (ang. apoptosis inducing factor) – czynnik indukujący apoptozę
- AnnexinV-Fluos/PI kit** – zestaw do oceny reszt fosfatydyloseryny na powierzchni błon komórkowych
- AnV/PI<sup>-</sup>** – subpopulacja komórek żywych barwionych za pomocą AnnexinV-Fluos/PI kit
- AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>** – subpopulacja komórek wczesnoapoptotycznych barwionych za pomocą AnnexinV-Fluos/PI kit
- AnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>** – subpopulacja komórek późnoapoptotycznych/wczesnonekrotycznych barwionych za pomocą AnnexinV-Fluos/PI kit
- AnV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>** – subpopulacja komórek martwych (nekrotycznych) barwionych za pomocą AnnexinV-Fluos/PI kit
- Apaf-1** (ang. apoptotic protease activating factor 1) – czynnik indukujący apoptozę
- Bcl-2** (ang. B-cell lymphoma-2) – białko antyapoptotyczne, produkt ekspresji protoonkogenu bcl-2, pierwotnie wykryte w białaczkach wywodzących się z limfocytów B; skrót stosowany do białek regulatorowych procesu apoptozy z tzw. rodziny Bcl-2. Na rodzinę białek Bcl-2 składają się zarówno białka stymulujące apoptozę (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bok/Mtd), jak i hamujące ten proces (Bcl-2, Bcl-X<sub>l</sub>, Bcl-W, Mcl-1, NR-13)
- BHT** (ang. butylated hydroxytoluene) – butylowany hydroksytoluen
- BP** – rozcieńczalnik *Biosolvens Plus*
- CASA** (ang. Computer Assisted Sperm Analysis) – komputerowo wspomaganą analizę nasienia
- Ca<sup>2+</sup>** – jony wapnia
- DAPI** (4',6-diamidino-2-fenylindole) – barwnik fluorescencyjny
- DNA** (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas dezoksyrybonukleinowy
- dUTP** (ang. uridine triphosphate) – znakowany nukleotyd urydynotrójfosforan
- FCS** (ang. fetal calf serum) – płodowa surowica bydlęca
- FITC** (ang. fluorescein isothiocyanate) – izotiocyjanian fluoresceiny
- FITC-PNA/PI** – zestaw znakowanej fluorochromem lektyny do oceny stanu akrosomu plemnika
- GAG** – glikozaminoglikany
- GLU** – L-glutation
- GPx** – peroksydaza glutationowa
- GR** – reduktaza glutationowa
- GSH** – peroksydaza glutationowa
- HA** – sól sodowa kwasu hialuronowego
- hCG** (ang. human chorionic gonadotropin) – ludzka gonadotropina kosmówkowa
- HEPES** (ang. N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) – kwas N-2- hydroksylopierrazyno-N'-2-etanosulfonowy

**HHP** (ang. high hydrostatic pressure) – wysokie ciśnienie hydrostatyczne  
**JC-1** (ang. 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' - etraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) – barwnik fluorescencyjny  
**JC-1<sup>+</sup>** – subpopulacja plemników z wysokim mitochondrialnym potencjałem transbłonowym  
**JC-1<sup>-</sup>** – subpopulacja plemników z niskim mitochondrialnym potencjałem transbłonowym  
**K3** – rozcieńczalnik Kortowo-3  
**KAT** – katalaza  
**LDL** (ang. low-density lipoprotein) – lipoproteiny o niskiej gęstości  
**LEY** – rozcieńczalnik żółtkowo-laktozowy  
**LEYG** – rozcieńczalnik żółtkowo-laktozowo-glicerolowy  
**LPFo** – lipoproteiny ekstrahowane z żółtka jaja strusia afrykańskiego  
**PBS** (ang. Phosphate Buffered Saline) – sól fizjologiczna  
**PE** (ang. phycoerythrin) – fikoerytryna  
**PI** (ang. propidium iodide) – jodek propydydy  
**PM** (ang. progressive motility) – ruch postępowy plemników  
**PMSG** (ang. Pregnant Mare Serum Gonadotropin) – gonadotropina kosmówkowa wyekstrahowana z surowicy krwi źrebnych kłaczy  
**PNA** (ang. Peanut Agglutinin) – lektyna roślinna pochodząca z orzeszków ziemnych  
**PNA<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>** – subpopulacja plemników żywych z integralną błoną akrosomalną  
**PNA<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>** – subpopulacja plemników żywych z zaburzoną ciągłością błony akrosomalnej  
**PNA<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>** – plemniki martwe z uszkodzonym akrosomem  
**Pp** – mieszanina białek roślinnych i lecytyny sojowej  
**PS** (ang. phosphatidylserine) – fosfatydyloseryna  
**PSA** (ang. *pisum sativum* agglutinin) – lektyna roślinna pochodząca z grochu zwyczajnego  
**R0** – rozcieńczalnik kontrolny żółtkowo-laktozowo-glicerolowy  
**R1** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 0,5 Mm butylowanego hydroksytoluenu  
**R2** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 1,0 Mm butylowanego hydroksytoluenu  
**R3** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 2,0 Mm butylowanego hydroksytoluenu  
**R4** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 2,5 Mm L-glutationu  
**R5** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 5,0 Mm L-glutationu  
**R6** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 150 IU dysmutazy ponadtlenkowej  
**R7** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 300 IU dysmutazy ponadtlenkowej  
**R8** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 200 IU katalazy

**R9** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 400 IU katalazy  
**R10** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 150 IU dysmutazy ponadtlenkowej i 200 IU katalazy  
**R11** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 300 IU dysmutazy ponadtlenkowej i 400 IU katalazy  
**R12** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 0,0005 g mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej  
**R13** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 0,001 g mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej  
**R14** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 0,5% soli sodowej kwasu hialuronowego  
**R15** – rozcieńczalnik mrożeniowy z dodatkiem 1,0 % soli sodowej kwasu hialuronowego  
**RFT** – reaktywne formy tlenu  
**RNA** (ang. ribonucleic acid) – kwasy rybonukleinowe  
**ROS** (Reactive Oxygen Species) – reaktywne formy tlenu, wolne rodniki tlenowe  
**SDS** – syntetyczny detergent dodecylsiarczan sodu  
**SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa  
**TdT** – terminalna deoksynukleotydylotransferaza  
**TEM** – transmisyjny mikroskop elektronowy  
**TM** (ang. total motility) – ruch całkowity plemników  
**TNF** (ang. tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworu  
**TUNEL** (Terminal deoxynucleotydyle transferase mediated d-UTP Nick End-Labeling) – metoda do oceny stopnia fragmentacji DNA  
**TUNEL<sup>-</sup>** – plemniki nie wykazujące fragmentację DNA  
**TUNEL<sup>+</sup>** – plemniki wykazujące fragmentację DNA  
**YO-PRO-1/PI kit** – zestaw do oceny zmian w przepuszczalności błon komórkowych  
**YO-PRO-1<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>** – plemniki żywe z zachowaną ciągłością błony komórkowej  
**YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>** – plemniki apoptotyczne  
**YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>** – plemniki nekrotyczne z przerwana ciągłością błony komórkowej





## 1. Wprowadzenie

### 1.1. Kriogenika

Pojęcie kriogenika zostało wprowadzone przez Heike Kamerlingh-Onnesa i pochodzi od greckich słów „kryos” oznaczającego zimno oraz „genos” – tworzenie lub pochodzenie. Kriogenika to dziedzina badająca i rozwijająca metody uzyskiwania i wykorzystywania temperatur niższych od 120 K (-153, 15°C).

Początki kriogeniki przypadają na XIX i XX wiek. W 1877 r. w Szwajcarii Louis-Paul Cailletet i Raoul-Pierre Pictet uzyskali przez kilka sekund temperaturę równą wartości 90 K. Udało im się również zaobserwować pary tlenu w postaci mgły. Pierwszy z badawczy zastosował rozprężanie gazu w rozprężarce tłokowej, drugi natomiast dławił tlen wykorzystując efekt Joule-Thomsona, polegający na przepływie gazu przez zwężenie połączone ze spadkiem ciśnienia. W obu przypadkach tlen sprężony do 20 MPa został wstępnie oziębiony do około 173 K. Cailletetowi ani Pictetowi nie udało się w pełni wyodrębnić fazy ciekłej, wypełniającej naczynie i charakteryzującej się meniskiem, co było ustanowionym przez Akademię Francuską kryterium skroplenia gazu.

Pełnego skroplenia powietrza i jego składników dokonali 5 kwietnia 1883 r. polscy uczeni: Karol Olszewski i Zygmunt Wróblewski. Użyli do tego celu kaskadowej metody skraplania gazów pod zmniejszonym ciśnieniem, w której kolejne skroplone i wrzące gazy obniżały temperaturę dla kolejnych skropleń w niższych temperaturach. Olszewski i Wróblewski zastosowali wrzący pod obniżonym ciśnieniem etylen do przechłodzenia sprężonego powietrza, uzyskując w ten sposób skroplone powietrze (78,8 K). W kolejnych doświadczeniach, stosując tę metodę uzyskali skroplony tlen (90,2 K) i azot (77,4 K). W ten sposób po raz pierwszy polscy naukowcy uzyskali ciecze kriogeniczne w ilości pozwalającej na wyznaczenie podstawowych stałych fizycznych skroplonych gazów.

Dzisiaj, dzięki odkryciu polskich naukowców z Uniwersytetu Jagiellońskiego, dokonany pod koniec XIX w., zastosowanie ciekłego azotu w nauce i praktyce gwałtownie rośnie, szczególnie w ostatnich dekadach. Ciekły azot jest substancją bezbarwną, pozbawioną smaku oraz zapachu. Nie wchodzi w reakcje z innymi substancjami, a także nie ulega spalaniu. W przypadku tego skroplonego pierwiastka temperatura wrzenia wynosi 77,2 K (-195,8°C), krzepnięcia natomiast 63,2 K (-210°C). Dzisiaj, ciekły azot znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, krioterapii, konserwacji i przechowywaniu komórek zwierzęcych lub macierzystych.

W 1892 r. James Dewar skonstruował pojemnik izotermiczny, zwany naczyniem dewara do badania niskotemperaturowych zjawisk w gazach oraz transportu skroplonych gazów (Beeler, 1981). Mimo zaawansowanych obecnie technologii kriotechnicznych, budowa i działanie tego naczynia przypo-

mina popularny termos. Dewar jest bowiem naczyniem zbudowanym z podwójnych, oddzielonych od siebie ścianek. Pomiędzy nimi znajduje się próżnia techniczna, która charakteryzuje się wysokiej jakości właściwościami izolacyjnymi. W rezultacie, ekstremalnie niska temperatura panująca wewnątrz naczynia z azotem nie wpływa na temperaturę jego zewnętrznej powłoki i otoczenia, co ma m.in. duże znaczenie dla bezpieczeństwa pracy z ciekłym azotem. Współczesne naczynia wyposażone są w dodatkowe, zaawansowane technologicznie systemy. W zależności od pojemności i przeznaczenia mogą one posiadać chociażby zawory bezpieczeństwa (naczynia ciśnieniowe) lub systemy alarmujące o niskim poziomie cieczy w naczyniach, w których przechowuje się zamrożone cenne próbki, np. w tzw. bankach materiałów biologicznych.



Ryc. 1. Naczynie Dewara

## 1.2. Wykorzystanie kriogeniki w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt

Według World Conservation Union (IUCN), 30 000 gatunków zwierząt i roślin jest zagrożonych wyginięciem, co stanowi 27% wszystkich gatunków na Ziemi (<https://www.iucnredlist.org/>), a ich wyginięcie może w konsekwencji doprowadzić do nieodwracalnej w skutkach utraty bioróżnorodności. Termin bioróżnorodność (ang. *biodiversity*) został po raz pierwszy użyty przez Reymonda Dalesmana w 1968 r. (Dalesman, 1968). Istnieje wiele definicji tego terminu, a ostatnio sformułowana została zamieszczona w 2005 r. w Millennium Ecosystem Assessment i brzmi: „Bioróżnorodność jest zmiennością żywych organizmów wszystkich środowisk występujących na Ziemi, włączając w to siedliska lądowe, morskie, inne ekosystemy wodne oraz ekologiczne kompleksy złożone z tych siedlisk; obejmuje ona zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe, między gatunkami i zróżnicowanie ekosystemów”. Głównymi zagrożeniami wpływającymi na zmniejszenie bioróżnorodności zwierząt są zmiany środowiska związane z negatywnym powiększaniem obszarów pod uprawę oraz budowę dróg kosztem naturalnych obszarów bytowania zwierząt, jak również wprowadzanie do środowiska gatunków preferowanych przez człowieka.

Programy ochrony zwierząt opierają się na zachowaniu ich naturalnego środowiska, z ograniczonym wykorzystaniem metod hodowlanych i zabezpieczeniem liczebności zwierząt na poziomie zapewniającym minimalną zmienność genetyczną populacji i możliwość adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Ochrona w ten sposób prowadzona to działanie *in situ*.

Polska jako jedno z pierwszych państw podjęła działania mające na celu ochronę ginących ras zwierząt. Program rozpoczęła ochrona żubra w latach 20. XX wieku. Następnie wprowadzono program hodowli zachowawczej konika polskiego w rezerwacie leśnym. W okresie powojennym potrzebne było wprowadzenie programów restytucji zwierząt hodowlanych, m.in.: konika polskiego, owiec wrzosówek i świniarek. Od lat 80. rozpoczęto ochronę *in situ* poprzez wsparcie finansowe istniejących populacji ras rodzimych występujących w swoich naturalnych środowiskach. Obecnie głównymi czynnikami zagrażającymi bioróżnorodności populacji zwierząt hodowlanych w Polsce i na świecie są:

- wymieranie ras rodzimych,
- utrata zmienności genetycznej na skutek intensywnej selekcji wysoko wydajnych ras,
- erozja populacji,
- epidemie i pandemie chorób zwierzęcych.

Ochrona ras zagrożonych pozwala na zachowanie unikatowych genotypów w hodowli oraz zabezpieczenie ich przed wyginieniem. Obecnie zadania związane z ochroną zasobów genetycznych poszczególnych gatunków i ras są rozszerzane o ochronę *ex situ*. Polega ona na gromadzeniu w bankach materiału biologicznego w postaci m.in.: gamet, zarodków, komórek somatycznych oraz tkanek. Przechowywany materiał może zostać użyty w technikach wspomaganego rozrodu lub w zaawansowanych procedurach, np. do klonowania. Ochrona *ex situ* materiału biologicznego pozwala na zachowanie zmienności genetycznej na poziomie dużo wyższym niż pozwalają na to metody *in situ*. Ponadto, jest to jedyna metoda pozwalająca na zgromadzenie unikatowego materiału genetycznego i wykorzystanie go po śmierci dawcy/dawcy.

Zasoby genetyczne zwierząt gospodarskich są chronione według Światowego Planu Działań na rzecz ochrony zasobów genetycznych zwierząt (Global Plan of Actions for Animal Genetic Resources, GPA) przyjętym w 2007 r. w Interlaken. W Planie priorytetowe zadania to: „Opracowanie lub wzmocnienie programów ochrony *ex situ*” (priorytet 9) oraz „Opracowanie i wdrożenie regionalnych i globalnych długookresowych strategii ochrony” (priorytet 10). Zwiększenie zakresu ochrony *ex situ* zakłada również opracowana na potrzeby realizacji założeń GPA Krajowa Strategia zrównoważonego

użytkowania i ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich, przygotowana w 2013 r.

W Polsce, podmiotem upoważnionym przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi do koordynacji działań związanych z ochroną *ex situ* zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich jest, na mocy rozporządzenia MRiRW z dnia 6 czerwca 2008 r. (Dz. U. Nr 108, poz. 691) Instytut Zootechniki PIB w Krakowie.

Początki prowadzenia w Instytucie Zootechniki ochrony *ex situ* zasobów genetycznych sięgają lat 60. XX w. Ministerstwo Rolnictwa w 1968 r. powołało w IZ Centralny Bank Nasienia (CBN) (obecna nazwa Bank Materiałów Biologicznych). Głównym zadaniem CBN było przechowywanie nasienia od młodych buhajów, które początkowo dostarczano do CBN ze wszystkich zakładów unasienniania w Polsce. Ponadto, z uwagi na rozwijający się import nasienia, Ministerstwo Rolnictwa zleciło CBN prowadzenie oceny i kwalifikacji tego nasienia do inseminacji w kraju. Pierwszy materiał biologiczny w postaci nasienia pochodził od buhaja rasy polskiej czerwonej i został zdeponowany w CBN w 1968 r. W ciągu kolejnych 50 lat funkcjonowania Banku jego zasoby były stale powiększane o nasienie buhajów ras: polskiej czerwonej, polskiej czerwono-białej, polskiej czarno-białej oraz białogrzebtej. Dzięki temu powstała unikatowa kolekcja materiału biologicznego, oryginalna zarówno pod względem genotypu jak i ilości zgromadzonego materiału. Obecnie kolekcja Banku Materiałów Biologicznych składa się z ponad 58 000 porcji nasienia buhajów ras rodzimych. Większość materiału stanowi nasienie pozyskane przed wdrożeniem prac hodowlanych, a więc materiał pochodzący od zwierząt nie poddanych wypierającemu krzyżowaniu z wysoko wydajnymi rasami bydła mlecznego. Zgromadzona kolekcja materiału biologicznego ras rodzimych jest wykorzystywana jako element działań w programach hodowlanych w zakresie ochrony *in situ* zasobów genetycznych bydła w Polsce.

W 2014 r. powstał w Instytucie Zootechniki PIB Krajowy Bank Materiałów Biologicznych (KBMB) w celu gromadzenia materiału biologicznego od: świń, koni, owiec i kóz oraz bydła. W banku może być przechowywany materiał biologiczny w postaci nasienia, zarodków i oocytów. Do tej pory w KBMB zostało zgromadzone 37 400 słomek nasienia buhajów oraz 143 zarodki świń rasy puławskiej i 34 złotnickiej pstrej.

Ponadto, w Polsce zasoby genetyczne w postaci wyizolowanego DNA pochodzącego od zwierząt udomowionych i wolno żyjących jest kolekcjonowane w Instytucie Zoologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie w Krajowym Banku DNA Roślin, Grzybów i Zwierząt. Celem banku jest gromadzenie i powiększanie wiedzy o roślinach, grzybach i zwierzętach przy wykorzystaniu najnowszych standardów w badaniach DNA. W 2016 r. powstał bank w Muzeum Górnośląskim w Bytomiu, w którym są gromadzone tkanki pochodzące od kilku gatunków wołów piżmowych, antylop oraz niedźwiedzi. Na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu zgromadzono oocyty,

plemniki i fibroblasty pochodzące ze skóry zarówno kotów domowych, jak i 20 gatunków dzikich kotowatych oraz 579 słomek zawierających plemniki 24 osobników żubra. Z kolei, zamrożone gamety i zarodki różnych gatunków zwierząt jeleniowatych są zgromadzone w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu (Max, 2017).

### 1.3. Kriokonserwacja materiału biologicznego

Zastosowanie niskich temperatur do zamrażania i przechowywania materiału biologicznego jest stosowane od wieków. Jednak, aby proces zatrzymania procesów biologicznych w komórce był efektywny, nie może wywierać negatywnego wpływu na jakość tego materiału po rozmrożeniu. W zależności od gatunku zwierzęcia i ulokowania komórek, spektrum tolerancji obejmuje temperatury w zakresie  $-34^{\circ}\text{C}$  a  $-42^{\circ}\text{C}$ . Krótka ekspozycja na niskie temperatury nie jest groźna, jednakże długotrwałe poddawanie komórek wpływowi takich temperatur powoduje ich śmierć (Niwińska, 2016). Substancją umożliwiającą zamrażanie materiału biologicznego jest azot, który w stanie ciekłym ( $\text{LN}_2$ ) zachowuje temperaturę poniżej  $-196^{\circ}\text{C}$ . W momencie kontaktu komórki zwierzęcej z ciekłym azotem różnica temperatur wynosi około  $232^{\circ}\text{C}$ . Procesowi zamarzania towarzyszy proces krystalizacji wody w lód, co prowadzi do zahamowania dyfuzji i zatrzymania procesów metabolicznych w komórce. Tworzenie wewnątrzkomórkowych i pozakomórkowych kryształów lodu wywołuje nieodwracalne uszkodzenia materiału biologicznego, polegające na niszczeniu ciągłości błon i organelli komórkowych, uszkodzeniach mechanicznych, zachwianiu równowagi osmotycznej wewnątrz komórki i denaturacji białek. Konsekwencją zachodzących procesów jest śmierć komórki.

Jednym ze sposobów ochrony przechowywanego materiału jest określenie optymalnego tempa jego zamrażania/rozmarzania, co umożliwi kontrolę zarówno transportu wody przez błony komórkowe, jak i procesów wewnątrzkomórkowego zamarzania wody (Mazur, 1963; Day i Stacey, 2007). Szybkość zmian temperatury wpływa na tempo, w jakim woda jest przenoszona przez błonę komórkową. Szybkie tempo opuszczania wody przez komórkę pozwala na zachowanie równowagi termodynamicznej, cytoplazma nie osiąga temperatury poniżej punktu zamarzania, a kryształki lodu powstają w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Krystalizacja zewnątrzkomórkowa powoduje podwyższenie stężenia roztworów, które może osiągnąć poziom toksyczny (Mazur, 1963). W sytuacji zbyt szybkiego tempa schładzania może dojść do uszkodzenia komórki spowodowanego przejściem cytoplazmy w stan przechłodzenia i pojawieniem się kryształów lodu wewnątrz komórki (Pegg, 1972).

Innym sposobem zabezpieczania komórki przed uszkodzeniami kriogenicznymi jest zastosowanie odpowiednich krioprotektantów: przenikających przez błony oraz pozostających poza komórką. Do pierwszej grupy zali-

czamy substancje niskocząsteczkowe o dużej lepkości, m.in.: glicerol, dime-tylosulfotlenek (DMSO). Dzięki tym substancjom w komórce dochodzi do procesu nitryfikacji, czyli przekształcania się płynu komórkowego w postać szklistą bez wytwarzania kryształków. Substancje należące do tej grupy charakteryzują się wysoką rozpuszczalnością w wodzie niezależnie od temperatury, dobrą przepuszczalnością przez materiał biologiczny oraz niską toksycznością (Gajda i Smorąg 2003).

Do drugiej grupy zaliczamy substancje nieprzenikające przez błony komórkowe, najczęściej są to cukry, np.: glukoza, sacharoza czy sorbitol. Dzięki tym substancjom dochodzi do dehydratacji komórki, czyli wypływania wody z komórki na zewnątrz. W kriokonserwacji materiału biologicznego najczęściej stosuje się mieszaninę obu grup krioprotektantów w zależności od rodzaju materiału biologicznego. W przypadku zastosowania wysokich stężeń krioprotektantów istnieje ryzyko ich działania toksycznego na zamrażany materiał biologiczny (Niwńska, 2016).

Substancją umożliwiającą zamrażanie materiału biologicznego jest azot, który w stanie ciekłym (LN<sub>2</sub>) zachowuje temperaturę poniżej -196°C.

### **1.3.1. Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni**

Pierwsze próby kriokonserwacji zarodków ssaków zostały zapoczątkowane w latach 70. XX w. W 1972 r. uzyskano pierwszy zamrożony zarodek pochodzący od myszy (Whittingham, 1972). Dotychczas opracowano technologię kriokonserwacji zarodków dla wielu gatunków zwierząt (Leibo i Songsasen, 2002; Dobrinsky, 2002). Są one szeroko stosowane w biotechnologii rozrodu (Vajta, 2000; Dobrinsky, 2002), umożliwiają również tworzenie banków służących do przechowywania materiału genetycznego zwierząt hodowlanych i dziko żyjących zagrożonych wyginięciem (Vajta, 2000; Silber i in., 2013).

Zarodki i oocyty ssaków oceniane pod kątem podatności na zamrażanie posiadają własną gatunkową specyfikę, co wymusza konieczność opracowania odrębnych metod kriokonserwacji dla poszczególnych zwierząt. Obecnie kriokonserwację zarodków i oocytów można przeprowadzać metodą powolnego mrożenia (slow) lub szybkiego mrożenia (rapid), nazywanego też witrifikacją. Zarodki i oocyty zamraża się w urządzeniach (fryzerach) umożliwiających uzyskanie kontrolowanego spadku temperatury i optymalizację procesu.

W procesie mrożenia zarodków najbardziej szkodliwym czynnikiem są tworzące się wewnątrz komórek kryształki lodu. Mogą one uszkodzić delikatne struktury we wnętrzu komórek i tym samym zaburzyć a nawet uniemożliwić dalszy rozwój zarodka. Formujące się kryształki lodu prowadzą do uszkodzenia błon plazmatycznych, denaturacji organelli i uszkodzenia cytoskieletu komórek. Zamrażanie komórki obejmuje procesy fizykochemiczne polegające na wymianie ciepła i transportu wody między komórką a otoczeniem.

Na początku procesu oziębiania komórka pozostaje w stanie płynnym na skutek tzw. zjawiska supercooling (związanego z uwalnianiem się utajonego ciepła krystalizacji) i obniżania punktu zamarzania. Następnie, oziębiona woda posiadająca wyższy potencjał chemiczny niż otoczenie opuszcza komórkę i zamarza na zewnątrz w postaci kryształków lodu. Kolejne zjawiska są uzależnione od tempa kriokonserwacji. W sytuacji, gdy proces przebiega powoli, komórka szybko traci wodę na drodze egzoosmozy i nie ulega wewnątrzkomórkowemu zamarznięciu. Przy gwałtownym ochładzaniu komórka nie jest w stanie skutecznie zachować wewnątrzkomórkowej równowagi poziomu wody i staje się coraz bardziej przechłodzona, co prowadzi do formowania kryształków lodu. Dlatego, aby zoptymalizować proces schładzania komórek przyjmuje się, że powinien on przebiegać na tyle wolno, aby nie dochodziło do powstawania wewnątrzkomórkowych kryształków lodu, a jednocześnie wystarczająco szybko, aby ograniczyć wzrost stężenia elektrolitów w komórce.

W celu ograniczania tworzenia się wewnątrzkomórkowych kryształków lodu stosuje się różne procedury z wykorzystaniem właściwych krioprotektantów. Ich zadaniem jest ochrona komórek poprzez wypieranie wody wewnątrzkomórkowej, z której tworzą się kryształki lodu. Ich obecność powoduje czasowe obkurczenie zarodka do momentu aż wypływ wody zostanie zrównoważony przez wnikający do środka związek osłaniający i stopniowe zwiększanie jego objętości. Do substancji przeciwdziałających śmierci komórek w temperaturze poniżej  $-20^{\circ}\text{C}$  stosowane są dwa rodzaje krioprotektorów: nieprzenikające, np. poliwinylpirolidyna (PVP), sacharoza lub surowica oraz przenikające, np. dimetylosulfotlenek (DMSO), glicerol, glikol etylenowy, etanol. Rodzaj i poziom zastosowanego krioprotektanta zależą od gatunku, sposobu mrożenia oraz stadium rozwojowego zarodka. Zastosowanie różnych rodzajów związków osłaniających o niższym stężeniu pozwala zminimalizować toksyczny wpływ wysokiej koncentracji pojedynczego krioprotektora.

Zarówno oocyty, jak i zarodki świni są bardziej podatne na uszkodzenia kriogeniczne powstałe podczas zamrażania niż należące do innych gatunków zwierząt. Spośród komórek embrionalnych to w oocytach dochodzi do formowania się kryształków lodu wewnątrz komórki. Uznaje się, że specyficzna budowa błon komórkowych oocytu wykazuje większą przepuszczalność dla krioprotektantów, przy jednoczesnej wyższej podatności na dezintegrację w trakcie powolnego ochładzania. Jednocześnie wykazano, że kriokonserwacja wpływa na zmiany lipidów obecnych w cytoplazmie oocytów, co w konsekwencji zaburza strukturę cytoszkieletu (Liebermann i in., 2002). Badania przeprowadzone na oocytach w różnym stadium rozwoju wykazały, że większą podatność na zamrażanie wykazują oocyty dojrzałe w stadium metafazy II niż niedojrzałe (Rojas i in., 2004).

Nie opracowano do tej pory efektywnej metody kriokonserwacji oocytów świni. Jedynie zastosowanie techniki nitryfikacyjnej, omijającej krytyczne wartości temperatury i szybkie zamrażanie dają pozytywne efekty w kriokonserwacji oocytów i w rezultacie metoda ta została uznana za najbardziej odpowiednią dla tego typu komórek.

Kriokonserwacja zarodków wielu gatunków zwierząt jest metodą szeroko stosowaną w biotechnologii rozrodu (Vajta, 2000; Dobrinsky, 2002). Zarodki ssaków oceniane pod kątem podatności na zamrażanie posiadają własną gatunkową specyfikę, co wymusza konieczność opracowania odrębnych metod kriokonserwacji dla poszczególnych gatunków. Pomimo zadowalających efektów modyfikacji w odniesieniu do zarodków wielu gatunków zwierząt gospodarskich nadal niezadowalające wyniki uzyskuje się w przypadku zarodków świni. Wynika to ze szczególnej wrażliwości zarodków tego gatunku zwierząt na schładzanie w zakresie temperatur dodatnich od +15 do +10°C (Polge i in., 1974), rodzaju użytych związków osłaniających, metody kriokonserwacji i dużej zawartości lipidów. Ważnym czynnikiem wpływającym na efektywność kriokonserwacji jest rodzaj zastosowanego związku osłaniającego. Najczęściej stosuje się sam glicerol (Hayashi i in., 1989) lub z dodatkiem lecytyny (Kameyama i in., 1990), trehalozy (Cameron i in., 1992) lub żółtka jaja kurzego (Fujino i in., 1993). Duże znaczenie w przypadku zarodków świni ma również ich stadium rozwoju (Gajda i Smorąg, 2003), bowiem wczesne stadia (od zygoty do wczesnej blastocysty) są bardziej wrażliwe na uszkodzenia kriogeniczne powstałe podczas kriokonserwacji. Pozytywne rezultaty, jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni, dotyczyły zarodków znajdujących się w stadiach od ekspandującej do wylęgłej blastocysty (Graham i in., 1971; Gajda i Smorąg, 2000). Podatność zarodków na kriokonserwację wynika również z metody ich pozyskiwania *in vitro* czy *in vivo* (Gajda i Smorąg, 2003; Nagashima i in., 1988). Z badań Nagashima i in. (1988) wynika bowiem, że blastocysty wylęgłe w hodowli *in vitro* są mniej podatne na uszkodzenia w obniżonych temperaturach dodatnich niż blastocysty wylęgłe *in vivo*. Ponadto, w bardziej zaawansowanym stadium rozwoju zarodków koncentracja lipidów maleje, co ułatwia ich przeżywalność po procedurze kriokonserwacji (Niimura i Ishida, 1980).

W ostatnich latach badania z zakresu kriokonserwacji zarodków świni koncentrują się głównie na ich witrifikacji. W metodzie tej zestalenie płynów odbywa się na drodze krystalizacji poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania. Metoda ta stanowi duże uproszczenie w stosunku do konwencjonalnych sposobów zamrażania i pozwala uzyskać znaczną efektywność, zwłaszcza w odniesieniu do zarodków mysich, szurzych, króliczych, owczych, kozich, końskich i bydłych. W przypadku zarodków świni domowej witrifikacja pozostaje jednak nadal na etapie badań. Znaczący postęp w witrifikacji zarodków świni został osiągnięty dzięki metodzie OPS (ang.



*open pull straw*), polegającej na zastosowaniu minimalnej objętości płynu zawierającego witrifikowany zarodek (Vajta i in., 1997). Zastosowanie tej metody w odniesieniu do zarodków świni dało stosunkowo dużą przeżywalność *in vitro* (morula: od 14 do 70%, blastocysta: od 67 do 73%; Vajta i in., 1997; Berthelot i in., 2000), jak też *in vivo* (morula: 13%, blastocysta: 55%; Berthelot i in., 2000, 2002). Proces witrifikacji zarodków świni powoduje wystąpienie osmotycznych uszkodzeń charakteryzujących się przerwaniem ciągłości błon komórkowych, pęcznieniem komórki i wewnątrzkomórkowymi uszkodzeniami (Fabian i in., 2005 a,b), co potwierdzają również obserwacje na witrifikowanych zarodkach bydłych (Fair i in., 2001) i owczych (Cocero i in., 2002). Wystąpienie zmian ultrastrukturalnych i biochemicznych jest wynikiem zarówno samego procesu witrifikacji, jak też wrażliwości zarodków świni na mieszaninę witrifikacyjną i zastosowane związki osłaniające oraz nasilenia procesu apoptozy w tych zarodkach. Badania nad zjawiskiem procesu apoptozy w kriokonserwanych zarodkach zwierząt są bardzo nieliczne (Ochota i Niżański, 2018; Ryu i in., 2012). Z dotychczasowych doniesień wynika jednak, że obniżona efektywność kriokonserwacji oocytów i zarodków jest rezultatem zachodzących w nich zmian apoptotycznych, prowadzących do eliminacji uszkodzonych komórek.

### **1.3.2. Kriokonserwacja nasienia knura**

Kriokonserwacja nasienia knura odgrywa ważną rolę w zachowaniu zasobów genetycznych osobników, zwłaszcza o szczególnej wartości hodowlanej. Metoda ta stwarza ponadto możliwość zachowania różnorodności biologicznej poprzez kolekcjonowanie i przechowywanie materiału o unikalnych cechach użytkowych i adaptacyjnych. Dotyczy to zwłaszcza ras rodzimych, jak i wysoko wydajnych ras użytkowych, którym w wyniku intensywnej selekcji czy epidemii chorób zwierzęcych zagraża utrata zmienności genetycznej.

Pomimo prowadzenia intensywnych badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji, użycie mrożonego nasienia knura w praktyce jest ograniczone. Po inseminacji loch nasieniem mrożonym uzyskuje się bowiem o 20% niższe wskaźniki rozrodcze oraz o 1–2 sztuki prosiąt mniej w miocie w porównaniu z inseminacją nasieniem świeżym lub konserwowanym w stanie płynnym.

Procedura kriokonserwacji prowadzi do zaburzenia systemu endogennych antyoksydantów oraz zmian w stabilności plazmolemy plemników. Ponad 65% zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach błon komórkowych plemników knura zwiększa ich podatność na zmiany peroksydacyjne. Brak możliwości kompensacyjnych układu antyoksydacyjnego w nasieniu, nadmiar reaktywnych form tlenu (RFT) oraz długotrwała ekspozycja plemników na RFT prowadzą do zmian peroksydacyjnych w lipidach

blon komórkowych plemników, obniżając ich zdolności zapładniające po rozmrożeniu.

Pierwsze próby mrożenia nasienia ssaków były podejmowane w XVIII i XIX wieku, ale dopiero w XX w. opracowano skuteczne metody kriokonserwacji nasienia buhaja (Polge, 1957). Jednocześnie, w tym samym roku zespół Hessa po raz pierwszy uzyskał prosięta urodzone po inseminacji loch rozmrożonym nasieniem knura (Hess i in., 1957). Prowadzone przez kolejne lata intensywne badania nad skuteczną i powtarzalną metodą kriokonserwacji nasienia knura doprowadziły do opracowania dwóch metod: amerykańskiej (Pursel i Johnson, 1975) oraz niemieckiej (Westendorf i in., 1975). W Polsce pierwsze badania nad opracowaniem metody kriokonserwacji nasienia knura były prowadzone w ośrodkach poznańskim i olsztyńskim. W 1985 r. przedstawiono kompleksową metodę kriokonserwacji nasienia knura nazywaną „Kortowską metodą zamrażania nasienia knura” (Strzeżek i in., 1985).

W Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB od kilku lat są prowadzone badania nad modyfikacją składu rozcieńczalnika mrożeniowego, sposobem postępowania z nasieniem knura podczas mrożenia oraz opracowaniem kompleksowych i wiarygodnych metod jego oceny przed i po procedurze mrożenia.

Celem podjętych badań było opracowanie składu rozcieńczalnika mrożeniowego w oparciu o dodatek substancji przeciwdziałających procesom oksydacyjnym lub substancji o właściwościach osłaniających wrażliwe na uszkodzenia kriogeniczne błony plazmatyczne plemników. Jednocześnie, w badaniach zastosowano markery apoptotyczne do określenia nowych kryteriów selekcji ejakulatów przeznaczonych do kriokonserwacji oraz do oceny jakości plemników zamrożonych-rozmrożonych.

Doświadczenia realizowano w ramach: projektu badawczego NCN nr N311 524840 pt. Antyoksydanty i nowe związki osłaniające w kriokonserwacji nasienia knura ocenianego przy zastosowaniu markerów apoptotycznych w latach: 2011–2014 oraz bieżącej działalności statutowej Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego.

#### **1.4. Technologia kriokonserwacji nasienia knura**

Technika kriokonserwacji składa się z następujących etapów postępowania z nasieniem: pobieranie, schładzanie, zagęszczanie, ekwilibracja, glicerolizacja, zamrażanie i rozmrażanie.

Do kriokonserwacji wykorzystuje się frakcję gęstą ejakulatu, a kryterium jego kwalifikacji do mrożenia to występowanie minimum 70% plemników ruchliwych i 80% prawidłowych morfologicznie. Saravia i in. (2010) wykazali, że wykorzystanie pierwszych 10 ml frakcji gęstej do mrożenia powoduje wzrost efektywności tego procesu. Jednocześnie, Barranco i in. (2013) zaobserwowali, że ejakulatory pobierane od knurów w okresie zimowym i wiosennym wykazywały wysoką jakość po zamrożeniu-rozmrożeniu. Ponadto,

duże znaczenie ma właściwa temperatura przechowywania pobranego nasienia do momentu rozpoczęcia procedury kriokonserwacji i powinna ona wynosić 15–17°C (Yeste, 2015). Natomiast czas przechowywania plemników, jak wykazali Casas i Althouse (2013), może dodatkowo stabilizować lipidy w błonie komórkowej plemników knura.

Poszczególne etapy postępowania technologicznego podczas kriokonserwacji naruszają stabilność i funkcję ultrastruktur plemnikowych, w szczególności błony komórkowej. Zastosowanie dializ nasienia jako etapu kriokonserwacji pozwala wyeliminować niekorzystne dla plemników substancje peptydowe oraz wolne jony nieorganiczne, co wpływa pozytywnie na jakość plemników po rozmrożeniu (Fraser i in., 2007).

Ważnym etapem procesu kriokonserwacji jest właściwy wybór sposobu konfekcjonowania nasienia. Mogą to być duże słomki okrągłe – makro- i mikro-tuby, płaskie słomki, kulki lub plastikowe torebki. Obecnie stosuje się słomki o mniejszej pojemności (0,5 ml), które zmniejszają różnice przepływu szybkości temperatur zamrażania i rozmrażania w obrębie słomki poprzez zwiększenie stosunku powierzchni do objętości (Didion i in., 2013). Użycie takich słomek zwiększa przeżywalność plemników po rozmrożeniu w porównaniu z zamrożonymi w słomkach o pojemności 5–6 ml.

W przypadku kriokonserwowanego nasienia, jedynie domaciczna inseminacja ma szanse powodzenia ze względu na krótką przeżywalność plemników po rozmrożeniu. Techniki inseminacji domacicznej można podzielić na dwie grupy: niechirurgiczne i chirurgiczne (Krueger i Rath, 2000; Rath, 2002). Techniki niechirurgiczne polegają na umieszczeniu nasienia w szyjce macicy przy pomocy katetera lub endoskopu. Zabieg taki nie wymaga znieczulenia, niezbędne jednak jest użycie większej dawki nasienia i najczęściej reinseminacji. Technika chirurgiczna jest nieskomplikowaną metodą, polegającą na nacięciu ściany brzucha w pełnej narkozie operacyjnej, wydobyciu macicy, nakłuciu i wprowadzeniu przy pomocy strzykawki nasienia do jej rogów. Zastosowanie domacicznej inseminacji pozwala na wprowadzenie do dróg rodnych samicy niewielkich dawek nasienia. Do takiego zabiegu stosuje się małe dawki nasienia świeżego (0,5 ml) zawierające  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$  oraz  $1 \times 10^6$  plemników. Najwyższy wskaźnik wyproszień (88,9%) oraz najwyższą średnią liczbę prosiąt urodzonych żywych w miocie ( $7,8 \pm 3,6$ ) zanotowano w przypadku zastosowania  $1 \times 10^7$  plemników (Krueger i in., 1999). W przypadku użycia do domacicznej inseminacji nasienia kriokonserwowanego najlepsze wyniki płodności uzyskano stosując dawkę  $1 \times 10^9$  plemników (Roca i in., 2004). Jednocześnie, na wyniki zapłodnień i liczebność płodów w miocie ma istotny wpływ czas inseminacji w stosunku do momentu owulacji. Optymalne wyniki uzyskuje się przeprowadzając inseminację nasieniem mrożonym 4–6 godzin przed owulacją (Yeste, 2015).

#### **1.4.1. Podstawowy skład rozcieńczalnika mrożeniowego nasienia knura**

Podstawowy rozcieńczalnik stosowany do mrożenia nasienia knura zawiera cukry, substancje kriochronne, żółtko jaja ptaków oraz syntetyczny detergent – dodecylsulfian sodu (SDS) (Equex STM lub Orvus ES Paste). Do powszechnie używanych rozcieńczalników należy zaliczyć: TES-NaK (Crabo i Einarsson, 1971), TEST (Graham i in., 1971), Belstville F3 (BF3) (Pursel i Johnson, 1971), Belstville F5 (BF5) (Pursel i Johnson, 1975), Hulsenberg (Westendorf i in., 1975), TRIS-Fruktoza-EDTA (Visser i Salamon, 1974), żółtkowo-glukozowy (Polge i in., 1970) oraz laktozowo-żółtkowy-LEY (Pursel i Park, 1988).

Najczęściej w skład rozcieńczalnika mrożeniowego wchodzi cukry proste, takie jak: glukoza, galaktoza, fruktoza czy sorbitol lub dwucukry: laktoza, laktuloza, trehaloza, melibioza. Są one nie tylko źródłem energii, ale również wywierają pozytywny wpływ na plemniki ochraniając je przed dehydratacją i formowaniem kryształków lodu. Z badań przeprowadzonych przez Gomez-Fernandez i in. (2012) wynika, że zastosowanie dwucukrów, a w szczególności trehalozy zapewnia wysoką skuteczność kriokonserwacji. Z kolei, badania Malo i in. (2010) wykazały, że użycie do zapłodnienia *in vitro* plemników kriokonserwowanych w rozcieńczalniku zawierającym trehalozę zapewnia uzyskanie wyższego wskaźnika zapłodnialności w porównaniu z rozcieńczalnikiem z dodatkiem laktozy lub glukozy.

W celu ochrony błon plazmatycznych plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi stosuje się związki o działaniu osłaniającym, m.in.: dimetyloformamid, dimetyloacetamid, dimetylosulfotlenek oraz glicerol. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez Zeng i in. (2014), optymalną ochronę błon komórkowych plemników przed zmianami kriogenicznymi zapewnia glicerol w stężeniu od 2 do 3%. Potwierdzają to również wcześniejsze badania Holta (2000), w których za wystarczające uznano 3% stężenie glicerolu dodawanego bezpośrednio przed etapem zamrażania. Z kolei, badania Buhr i in. (2001) wykazały, że koncentracja glicerolu powyżej 4% wpływa negatywnie na zmiany w strukturze lipidów plazmolemy plemnika, co obniża skuteczność kriokonserwacji.

W celu utrzymania odpowiedniego ciśnienia osmotycznego oraz ograniczenia uszkodzeń błonowych plemników spowodowanych przez wolne rodniki tlenowe (ROS) do rozcieńczalnika mrożeniowego dodaje się lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), których źródłem jest żółtko jaja ptaków służące do ochrony plemników przed szokiem chłodowym. Jednakże, doświadczenia przeprowadzone przez Frasera i in. (2010) wykazały, że LDL ekstrahowane z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) w większym stopniu niż LDL żółtka jaja kurzego ograniczają negatywne skutki szoku chłodowego plemników knura. Użycie LPFo jako składnika rozcieńczalnika mrożeniowego zapewnia wysoką jakość nasienia po rozmrożeniu oraz wysokie wskaźniki płodności. Badania przeprowadzone przez Wang i in. (2014), dotyczące wpływu frakcji

LDL wyekstrahowanej z żółtka jaja różnych gatunków ptaków (kura, struś, kaczka, przepiórka, gołąb) wykazały natomiast, że lipoproteiny żółtka jaja gołębia posiadają najwyższe właściwości kriochronne plemników. Niezależnie od zastosowanego źródła lipoprotein podczas procesu kriokonserwacji dochodzi do tworzenia agregatów lipoproteinowych, powstających po zmieszaniu żółtka jaja ptasiego z białkami plazmy nasienia (Holt, 2000). Dlatego, w celu ograniczenia tego zjawiska do składu rozcieńczalnika mrozeniowego stosuje się dodatek syntetycznego detergentu dodecylosiarczanu sodu (SDS) (Equex STM lub Orvus ES Paste) (Shimazaki i in., 2015). Jednocześnie prowadzone są badania mające na celu zastąpienie tego składnika rozcieńczalnika mrozeniowego substytutami w postaci białek roślinnych (Masoudi i in., 2016).

### **1.5. Ocena podstawowych parametrów jakości nasienia**

Knury poszczególnych ras lub ich mieszańce mogą wykazywać różnice w zakresie objętości ejakulatu oraz koncentracji i ruchliwości plemników (Wysokińska i in., 2005). Wskaźniki te najmniej korzystnie kształtują się w okresie letnim, w którym zwiększona temperatura otoczenia w połączeniu z ograniczonymi zdolnościami termoregulacyjnymi trzody chlewnej osłabia funkcje rozrodcze samców, powodując obniżenie popędu płciowego oraz wskaźników ilościowych i jakościowych ejakulatu (Pokrywka i in., 2001; Wilczyńska i in., 2013).

Diagnostyka laboratoryjna nasienia obejmuje ocenę makroskopową (objętość ejakulatu, zapach i barwa) oraz ocenę mikroskopową (morfologia, koncentracja oraz ruchliwość plemników). Objętość ejakulatu knura waha się w granicach od 80 do 900 ml. Większość dorosłych knurów oddaje powyżej 100 ml nasienia, z wyjątkiem rasy Duroc, u której minimalna objętość ejakulatu może wynosić 80 ml. W przypadku knurów rasy wbp objętość ejakulatu pozyskiwanych po 3-dniowej przerwie, a w przypadku knurów rasy pbz po 4–5-dniowej przerwie była większa niż pobieranych w krótszych odstępach czasu (Bajena i in., 2013).

Zapach nasienia knura przypomina zapach białka jaja kurzego lub jest słabo specyficzny, bliski zapachowi knura. Ejakulatory o wyraźnym ostrym zapachu, zwykle zanieczyszczone moczem lub wydzieliną uchyłka napletkowego oraz o zapachu gnilnym, świadczącym najczęściej o stanie chorobowym w obrębie układu płciowego, są dyskwalifikowane. Barwa ejakulatu przypomina silnie rozcieńczone mleko, a widoczne zmętnienie jest związane z koncentracją plemników. Poszczególne frakcje ejakulatu charakteryzuje inna barwa: frakcja przedplemnikowa jest przezroczysta, frakcja plemnikowa – biała, frakcja poplemnikowa ma barwę szarą.

Następnym etapem w ocenie ejakulatu jest analiza mikroskopowa. Jednym z podstawowych kryteriów oceny mikroskopowej jest badanie morfologiczne plemników wykonywane w preparatach barwionych przy użyciu mikroskopu świetlnego. Do najbardziej popularnych metod barwienia należą:

różnicujący barwnik nigrozynowo-eozynowy, barwnik giemzy (Coetzee i in., 2001), Spermac® (Chong i in., 1983) oraz Diff-Quick (Coetzee i in., 2001). Jako kryterium stosuje się klasyfikację przedstawioną przez Blom (1981), dzielącą wszystkie anomalie plemników na wady główne i podrzędne. Do wad głównych plemników zalicza się m.in.: formy niedojrzałe, plemniki podwójne, „bezglówce”, gruszkowate, z kroplą protoplazmy w położeniu bliższym, czy zwinięte w pętle lub witki. Mianem wad podrzędnych określa się natomiast inne odchylenia w formach plemników, m.in.: małe lub olbrzymie główki, pojedyncze pętle lub zagięcia na witce, obecność kropli protoplazmatycznej w położeniu dalszym.

Ocena morfologii plemników umożliwia wykrycie zmian w podstawowej budowie plemnika lub jego strukturze wewnętrznej (wady główne) oraz wad zlokalizowanych w aparacie ruchu plemnika lub błonach powierzchniowych (wady podrzędne).

Do konserwacji w stanie płynnym i mrożonym kwalifikowane są tylko te ejakulatory, w których odsetek plemników prawidłowych morfologicznie wynosi nie mniej niż 80%, a odsetek wad głównych i podrzędnych nie przekracza odpowiednio: 5 i 10%. Z badań przeprowadzonych przez Ron-El i in. (1991) wynika, że obecność wad morfologicznych plemników obniża współczynnik zapłodnialności. Bonde i in. (1998) potwierdzili istotny wpływ odsetka plemników z wadami morfologicznymi na wynik unasieniania.

Koncentracja plemników w jednostce objętości jest określana przy pomocy urządzeń komputerowych: cytometrów przepływowych, spektrofotometrów lub komór hemocytometrycznych (Klimowicz i in., 2005; Nizański, 2006). Liczba plemników w 1 cm<sup>3</sup> ejakulatu waha się średnio od 150 x 10<sup>6</sup> do 600 x 10<sup>6</sup>. W gęstej frakcji ejakulatu koncentracja plemników waha się od 500 do 800 x 10<sup>6</sup>/ml. Ejakulatory pobierane co trzy dni charakteryzują się trzykrotnie większą liczbą plemników niż ejakulatory pozyskiwane z jednodniową przerwą (Bajena i in., 2013).

Ruchliwość plemników jest jedną z podstawowych właściwości, która bezpośrednio określa ich funkcję. To właśnie dzięki zdolności ruchu plemniki mogą przemieszczać się przez drogi rodne samicy oraz penetrować osłonkę przejrzystą komórki jajowej (Aitken i in., 1985). Coraz częściej oprócz subiektywnej mikroskopowej oceny ruchliwości plemników stosuje się specjalne urządzenia komputerowe – *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), które umożliwiają szybką i obiektywną analizę dużej liczby gamet. Dzięki systemowi CASA możliwa jest precyzyjna ocena odsetka plemników ruchliwych, odsetka plemników o ruchu postępowym oraz dokładne określenie właściwości ruchu (ruch szybki, umiarkowany, wolny). Ponadto, CASA umożliwia wizualizację toru ruchu indywidualnych plemników, co pozwala na opis parametrów związanych z prędkością i rodzajem ruchu. Jednocześnie, komputerowa analiza nasienia pozwala na ocenę morfologiczną i morfometryczną

plemników. Po raz pierwszy zależność pomiędzy ruchem plemników ocenianych systemem CASA a płodnością została wykazana w badaniach Aitkena i in. (1982) na nasieniu ludzkim.



Ryc. 2. Urządzenie komputerowe – Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

Akrosom odgrywa istotną rolę w procesie zapłodnienia podczas penetracji przez plemnik osłonki przejrzystej komórki jajowej. W reakcji akrosomowej zewnętrzna błona akrosomu pozostaje nienaruszona aż do momentu zetknięcia się plemnika z osłonką przejrzystą. Wszelkie zaburzenia integralności lub uszkodzenia błony akrosomu plemnika mogą obniżać skuteczność zapłodnienia. Ocena odsetka plemników z integralnym akrosomem jest ważnym parametrem jakości nasienia (Pursel in., 1972). Integralność akrosomu oceniana jest z wykorzystaniem lektyn roślinnych, m.in. pochodzących z orzeszków ziemnych (PNA), grochu zwyczajnego (PSA) lub czarnej fasoli (ConA). Najczęściej stosuje się lektynę PNA, która łączy się z resztami  $\beta$ -galaktozowymi zewnętrznej błony akrosomalnej (Silva i Gadella, 2006). Z lektyną mogą być skoniugowane różne barwniki fluorescencyjne, m.in: izotiocyjanian fluoresceiny (FITC) (Maxwell i Johnson, 1997), AlexaFluor® (Silva i Gadella, 2006), czy fikoerytryna (PE) (Partyka i in., 2010). Zastosowanie dodatkowo jodku propydy (PI) przy ocenie stanu akrosomu umożliwia oznaczenie subpopulacji plemników martwych z uszkodzonym akrosomem (Partyka i in., 2010). Obniżenie temperatur podczas mrożenia powoduje wzrost stężenia jonów wapnia, wpływ innych jonów oraz egzocytozę zawartości akrosomu (Ozkavukcu i in., 2008). Przeprowadzając analizę stanu akrosomów plemników przy zastosowaniu transmisyjnego mikroskopu elektrono-

wego (TEM) stwierdzono powstawanie przestrzeni między błoną plazmatyczną plemnika a zewnętrzną błoną akrosomalną, co świadczy o utracie ciągłości akrosomu podczas procesu kriokonserwacji (Rodriquez-Martinez i in., 1993).

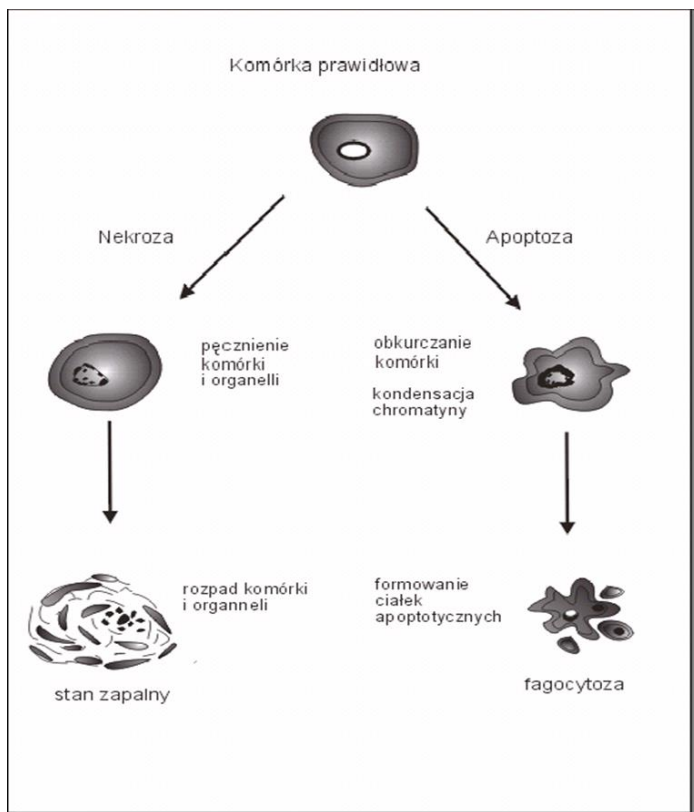
### 1.6. Proces apoptozy

Pojęcie „apoptoza” zostało wprowadzone przez Kerr'a i in. w 1972 r. w celu odróżnienia od nekrozy (martwicy). Termin „apoptoza” jest używany do określenia rodzaju śmierci komórki, w tym również śmierci programowanej, wspólnego dla wielu typów komórek, często związanego z czynnikami stymulującymi i prowadzącymi do określonych zmian morfologicznych komórki. Komórki ulegające apoptozie przechodzą charakterystyczny ciąg przemian. Komórka, u której zostaje uruchomiony program śmierci, oddziela się od pozostałych komórek i obkurcza się. Na jej powierzchni tworzą się liczne drobne, pęcherzykowate uwypuklenia (ang. *blebbing*) (Halicka i in., 2000; Nagata, 2000). Przynajmniej w początkowych fazach procesu komórka zachowuje integralność strukturalną i większość funkcji (Bartosz, 1998; Pollack i Leeuwenburgh, 2001). Mimo znacznego spadku potencjału mitochondrialnego organelle komórkowe pozostają nieuszkodzone (Thornberry i Lazebnik, 1998). W przypadku śmierci apoptotycznej dominują zmiany w obrębie jądra komórkowego. Początkowo chromatyna jądrowa ulega zagęszczeniu w pobliżu błony jądrowej, po czym zaczyna wypełniać całe jądro, które staje się pyknotyczne. Następuje fragmentacja DNA, w trawieniu którego biorą udział własne endonukleazy komórki, a w dalszym etapie destrukcji powstają tzw. „ciałka apoptotyczne”, które składają się z fragmentów komórki otoczonych błoną komórkową i są rozpoznawalne za pomocą wielu typów receptorów (np. CR3, CD14, fosfatydyloserynowych, witronektynowych) przez makrofagi oraz inne komórki, a następnie są fagocytowane i degradowane. Apoptoza jest procesem, w którym umierająca komórka aktywnie uczestniczy w „samodestrukcji”, uwalniając kaskadę charakterystycznych mechanizmów metabolicznych, kończących się fizyczną dezintegracją komórki.

W procesie apoptozy można wyróżnić trzy fazy: inicjacyjną, wykonawczą (efektorową) i zniszczenia (degradacyjną) (Bartosz, 1998). O przebiegu apoptozy decyduje stan fizjologiczny komórki oraz aktywacja procesów biochemicznych zależnych od czynników inicjujących. Zdolność reakcji komórki na rozmaite czynniki jest procesem wieloetapowym. Biorąc pod uwagę mnogość czynników endogennych i środowiskowych mogących prowadzić do apoptozy różnych typów komórek (np. wiązanie receptorów powierzchniowych, uszkodzenie DNA w wyniku przyjmowania leków lub promieniowania jonizującego, infekcje bakteryjne i wirusowe), uważa się, że apoptoza może zachodzić na dwóch centralnych szlakach: zewnętrznym, związanym z istnieniem błonowych receptorów śmierci oraz wewnętrznym, zwanym również mitochondrialnym. Niezależnie od źródła sygnału inicjującego, proces apoptozy



jest szczegółowo regulowany i wymaga współdziałania szeregu elementów prowadzących do powstania swoistej kaskady reakcji biochemicznych. W rezultacie dochodzi do aktywacji kaspaz i proteolitycznej degradacji komórki. Wśród czynników inicjujących apoptozę najczęściej wymienia się reakcję rozpoznawania i wiązania ligandów z odpowiednimi receptorami śmierci na powierzchni komórek, ich aktywację, a także aktywację kaspaz inicjujących.



Ryc. 3. Porównanie procesu apoptozy i nekrozy

Kaspazy (ang. *caspases-cysteine-dependent aspartate specific proteases*) są odpowiedzialne za proteolityczny rozpad niektórych składników cytoszkieletu (Thornberry i Lazebnik, 1998). Sygnał apoptotyczny powoduje przeniesienie fosfatydyloseryny (PS) na powierzchnię błony komórkowej, co umożliwia wczesną diagnostykę apoptozy. Ten glicerofosfolipid wraz z innymi lipidami – fosfatydyloetanolaminą i sfingomieliną – są składnikami błony komórkowej. Proporcje lipidów błonowych różnią się w zależności od typu komórki. Utrzymanie składu lipidów w błonie komórkowej jest ważne dla struktury i funkcji komórki. W warstwie wewnętrznej błony występuje

podwyższona zawartość fosfatydyloseryny niosącej ładunek ujemny. Dzięki temu wewnętrzna warstwa błony jest bardziej ujemna niż jej warstwa zewnętrzna. Asymetryczna lokalizacja aminofosfolipidów jest utrzymywana dzięki aktywności ATP-zależnej translokazy zwanej flipazą, która wpompowuje je do wewnętrznej warstwy błony, a inne lipidy do zewnętrznej. Aktywacja kaspaz doprowadza do zakłócenia tego stanu, powodując zablokowanie funkcji flipazy i aktywację skramblazy, która sprawia, że następuje wyrównanie lipidów wewnętrznej i zewnętrznej warstwy błony i pojawienie się PS na powierzchni błony komórek apoptotycznych (Martin i in., 2004; Blankenberg i in., 2000). Badania Deneckera i in. (2001) wykazały, że przemieszczenie PS na powierzchnię komórki stanowi jeden z wcześniejszych etapów apoptozy. Zachodzi on przed spadkiem potencjału transbłonowego mitochondriów oraz uwalnianiem cytochromu c z ich przestrzeni międzybłonowych. Do wykrywania fosfatydyloseryny wykorzystywana jest zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  aneksyna V połączona z fluoresceiną (Martin i in., 2004). Przemieszczenie PS oraz aktywacja kaspaz są sygnałem do rozpoczęcia fazy wykonawczej apoptozy (Blankenberg i in., 2000). Kaspazy są syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy (zymogeny), składające się z dwóch podjednostek (~20 kDa i ~10 kDa) połączonych krótkim „łącznikiem” oraz tzw. prodomeny, polipeptydu o różnej długości. Prodomena uczestniczy w dimeryzacji cząsteczek prokaspaz, zostaje następnie odszczepiona podczas aktywacji (Bedner i in., 2000). Obecnie przyjmuje się podział kaspaz na 3 grupy: 1) aktywatory cytokin: kaspazy 1, -4, -5, -11, -12, -13, -14; 2) inicjujące szlak apoptotyczny: kaspazy 8, -9, -10; 3) odpowiedzialne za fazę wykonawczą apoptozy: kaspazy -3, -6, -7 (Chang i Yang, 2000). Wszystkie poznane kaspazy charakteryzują się tym, że przecinają łańcuch białkowy substratu w miejscu obecności w nim kwasu asparginowego oraz że same dla siebie są enzymami aktywującymi. W związku z tym, aktywacja jednej z kaspaz może wywołać kaskadową reakcję, podczas której uwalnia się z zymogenów wiele aktywnych kaspaz. Centralnym punktem skupiającym różne sygnały apoptotyczne są kaspazy wykonawcze. Ich aktywacja przez kaspazy inicjujące czy inne białka (np. proteaza serynowa GrB) stanowi „punkt kontrolny”, od którego nie ma już odwrotu w apoptozie (ang. *point of no return*) i podlega precyzyjnej regulacji przez białka rodziny Bcl2 (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*) oraz IAP (ang. *inhibitor apoptosis proteins*). Aktywowane kaspazy wykonawcze, bezpośrednio albo w kaskadzie kaspaz dokonują proteolizy białek enzymatycznych i strukturalnych komórki. W większości komórek podczas apoptozy ulegają proteolizie takie białka, jak: laminy jądrowe, histony, polimeraza poli-ADP-rybozy (PARP), białka decydujące o prawidłowym przebiegu cyklu komórkowego. Na rodzinę białek Bcl-2 składają się zarówno białka stymulujące apoptozę (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bok/Mtd), jak i hamujące ten proces (Bcl-2, Bcl-X<sub>i</sub>, Bcl-W, Mcl-1, NR-13) (Gross i in., 1999). Występują one w błonach siateczki śródplazmatycznej, okołojądrowej oraz mitochondrialnej. Białko Bcl-2 hamuje apoptozę wywołaną różnymi

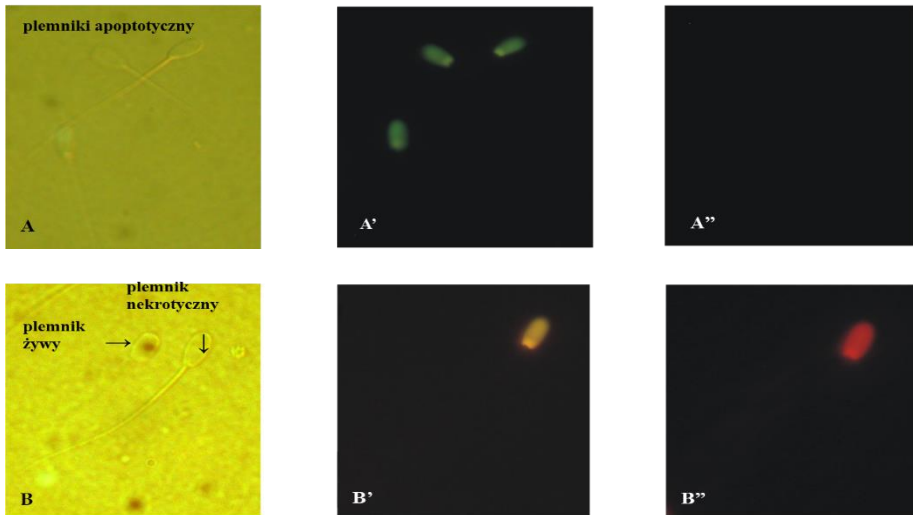
czynnikami, a jego obecność stwierdzono również w komórkach rozrodczych ssaków (Gączarzewicz i in., 2000). Białka te regulują przepuszczalność błon mitochondrialnych. Produkt białkowy genu Bcl-2 blokuje jeden z krytycznych stopni w przekazywaniu sygnału apoptozy, a mianowicie wypływ jonów  $Ca^{2+}$  z mobilnej puli zlokalizowanej w siateczce śródplazmatycznej. Uwalniany z siateczki  $Ca^{2+}$  uczestniczy w aktywacji dwóch enzymów biorących udział w procesach dezintegracyjnych: endonukleazy DNA oraz transglutaminazy uczestniczącej w tworzeniu ciałek apoptotycznych (Nakamura i in., 2000). Nadmiar białek proapoptotycznych jest sygnałem do uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium do cytozolu czynników apoptotycznych, takich jak: cytochrom c, białko Smac/Diablo, czynnik AIF i endonukleazy G (Verhoven i in., 1995; Yang i in., 1997). W przypadku przewagi białek proapoptotycznych dochodzi do obniżenia potencjału błonowego mitochondrium, zwiększenia przepuszczalności tej błony oraz wypływu wspomnianych czynników apoptotycznych. Działanie cytochromu c prowadzące do apoptozy komórek polega na aktywacji kaspazy-3 za pośrednictwem kaspazy-9. W tym szlaku apoptotycznym istotną rolę odgrywa białko adaptorowe Apaf-1 (ang. *apoptotic protease activating factor-1*). Cytochrom c wiąże się z monomeryczną formą Apaf-1, który następnie zmienia konformację, ulega oligomeryzacji i przyłącza prokaspazę-9, tworząc wielobiałkowy kompleks zwany apoptosomem. Poprzez dimeryzację prokaspaza-9 ulega aktywacji i inicjuje kaskadę kaspaz efektorowych (kaspaza- 3,6,7), prowadząc do śmierci komórki. Kaspazy mogą być również aktywowane w szlaku receptorowym (zewnętrzny), w którym w wyniku pobudzenia receptorów śmierci należących do rodziny TNF (ang. *tumor necrosis factor*) obserwuje się tworzenie tzw. receptosomu. Aktywna forma receptosomu aktywuje kaspazę-3 za pośrednictwem kaspazy-8 (Borner, 2003). W komórkach o niskiej aktywności inicjatorowej kaspazy-8 enzym ten nie aktywuje bezpośrednio efektorowej prokaspazy-3, ale oddziałuje z proapoptotycznym białkiem Bid, dokonując jego proteolitycznego cięcia do formy skróconego polipeptydu tBid (ang. *truncated Bid*). Polipeptyd tBid przenosi się do mitochondriów, gdzie doprowadza do uwolnienia cytochromu c i innych białek apoptogennych, uruchamiając „szlak wewnętrzny”. Aktywowane kaspazy wykonawcze rozszczepiają wiele białek cytoplazmatycznych i jądrowych. Dochodzi do aktywacji endonukleaz komórkowych i w konsekwencji do degradacji własnego DNA. Degradacja DNA przebiega w dwóch etapach, najpierw są to pęknięcia DNA na duże fragmenty (30 000–50 000 par zasad), a następnie na oligonukleosomy o długości około 180–200 par zasad. Pęknięcia łańcucha DNA można wykrywać stosując metodę TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotydyl transferase mediated d-UTP nick end-labeling*), przez wbudowywanie dUTP sprzężonego z fluoresceiną czy digoksygeniną w łańcuch DNA w miejscach pęknięć, przy zastosowaniu terminalnej transferazy lub polimerazy DNA (Fadeel i in., 1999).

### **1.6.1. Zmiany apoptotyczne w gonadach i gametach męskich oraz wybrane metody oceny**

Apoptoza komórek plemnikotwórczych jest podstawowym mechanizmem prawidłowej spermatogenezy i dotyczy komórek rozrodczych już w okresie życia płodowego (Print i Loveland, 2000). W kanalikach krętych jąder ssaków proces ten jest regulowany głównie przez komórki Sertoliego w nabłonku plemnikotwórczym, komórki Leydiga w tkance śródmiąższowej oraz przez interakcje pomiędzy komórkami gametogenicznymi. Apoptoza w spermatogenezie pojawia się spontanicznie, np. w jądrach dorosłych szczurów obserwowana jest w każdym stadium cyklu spermatogenicznego (Gączarzewicz i in., 2000). Apoptoza jest jednym z mechanizmów eliminacji komórek nieprawidłowych, a za regulację tego procesu w gonadzie męskiej jest odpowiedzialne białko receptorowe Fas, którego ekspresję stwierdzono na powierzchni komórek gametogenicznych oraz białko FasL, pełniące rolę liganda receptora Fas, występujące na powierzchni komórek Sertoliego (Lee i in., 1997). Niektóre badania potwierdzają udział systemu Fas/FasL w regulacji apoptozy w gonadzie męskiej tylko w stanach patologicznych, w szczególności w czasie stresu (Boekelheide i in., 2000). Zaburzenie procesu apoptozy w spermatogenezie oraz występowanie wysokiego odsetka apoptotycznych komórek rozrodczych może prowadzić do niepłodności męskiej (Rodriguez i in., 1997). U mężczyzn z azospermią i oligozoospermią obserwowano wzrost częstotliwości procesu apoptozy komórek plemnikotwórczych w tkance jądrowej w porównaniu z mężczyznami z prawidłową spermatogenezą (Lin i in., 1997).

Wiele badań poświęcono apoptozie w procesie spermatogenezy, znacznie mniej prac dotyczy ejakulowanych plemników. W przypadku plemników podstawowy problem stanowi odpowiedni dobór metod do identyfikacji zmian apoptotycznych. Ze względu na specyficzną budowę plemnika nie można opierać się wyłącznie na zmianach morfologicznych, charakterystycznych dla komórek somatycznych, lecz należy skoncentrować się na zmianach biochemicznych. Badanie apoptozy w plemnikach jest najczęściej oparte na ocenie stopnia przepuszczalności błony komórkowej, błonowej translokacji fosfatydyloseryny, wykrywaniu aktywnej formy kapazy-3, poziomu transbłonowego potencjału mitochondrialnego, fragmentacji DNA czy obecności białek pro- i antyapoptotycznych. Istotne znaczenie z punktu widzenia diagnostyki andrologicznej ma wykrywanie wczesnych etapów śmierci apoptotycznej. Cechą charakterystyczną początkowych stadiów apoptozy jest niewielka zmiana w przepuszczalności błony komórkowej. Mikropory powstające w zewnętrznej warstwie błony można identyfikować przy wykorzystaniu fluorochromu YO-PRO-1 (Idziorek i in., 1995). Barwnik ten dyfunduje przez mikropory i/lub mikrokanaly w plazmolemie i łączy się z DNA komórki. Dodatkowe zastosowanie w tej metodzie jodu propydydy (PI) umożliwia detekcję komórek nekrotycznych.

Analiza przeprowadzona w mikroskopie fluorescencyjnym pozwala wyróżnić trzy subpopulacje komórek. Pierwszą z nich stanowią komórki żywe (YO-PRO-1-/PI<sup>-</sup>), które nie emitują fluorescencji, drugą komórki apoptotyczne YO-PRO-1-pozytywne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) fluoryzujące na zielono, a trzecią komórki martwe, nekrotyczne, emitujące zarówno zieloną jak i czerwoną fluorescencję (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). W badaniach własnych, prowadzonych na świeżym nasieniu knura stwierdzono obecność od 2 do 13% plemników apoptotycznych (Trzcńska i in., 2007).



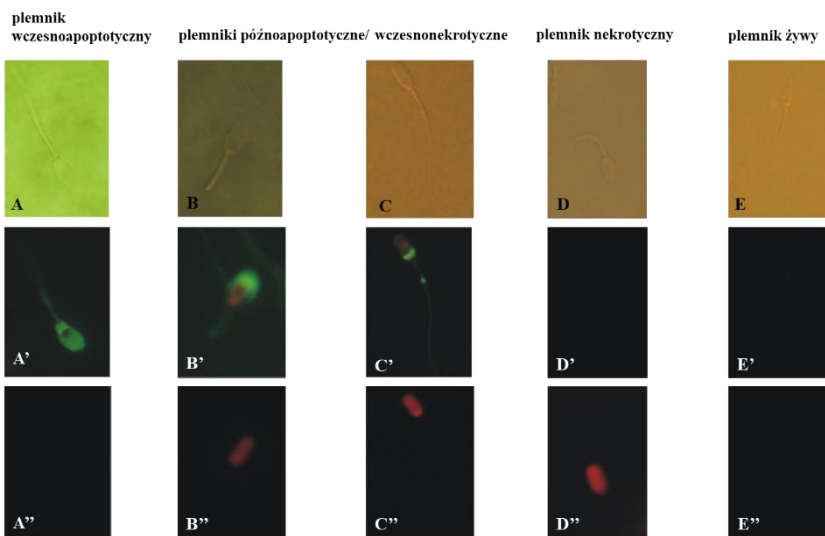
A, A', A'' – plemniki apoptotyczne: A – w świetle widzialnym, A' – emitujące zieloną fluorescencję, A'' – nie emitujące czerwonej fluorescencji.  
 B, B', B'' – plemnik żywy i nekrotyczny: B – w świetle widzialnym, B' – emitujący zieloną fluorescencję, B'' – emitujący czerwoną fluorescencję.

Ryc. 4. Subpopulacje plemników widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym po zastosowaniu barwienia YO-PRO-1/PI

Metodą pozwalającą na wczesną diagnostykę apoptozy jest wykrywanie reszt fosfatydyloseryny (PS) na powierzchni błony cytoplazmatycznej za pomocą aneksyny V sprzężonej z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC, ang. *fluorescein isothiocyanate*). Aneksyna V w obecności jonów  $Ca^{2+}$  łączy się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloseryna, dzięki czemu stosuje się ją jako marker apoptozy. Oznaczanie na powierzchni błony komórek reszt PS przy użyciu aneksyny V sprzężonej z FITC oraz weryfikacja stopnia przepuszczalności

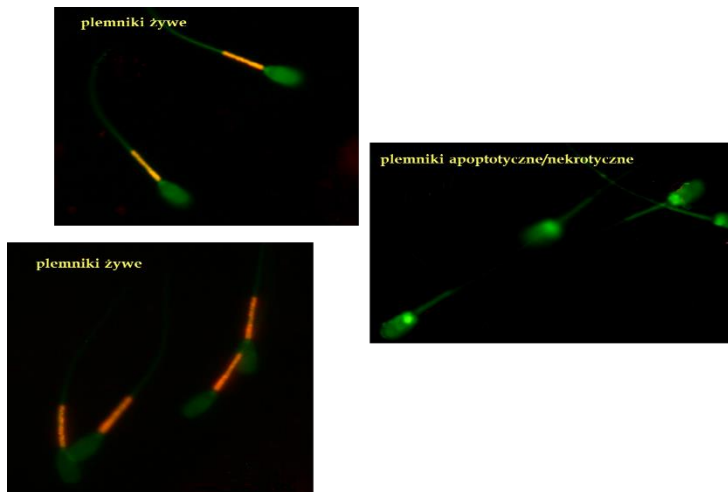
błony plazmatycznej dla PI, barwiącego DNA i RNA komórek o zaburzonej integralności błony, umożliwia odróżnienie komórek żywych, nieapoptotycznych (AnV-/PI-) od komórek wczesnoapoptotycznych (AnV+/PI-) oraz wczesnonekrotycznych (AnV+/PI+), a także od komórek martwych (nekrotycznych) (AnV-/PI+). Wyznakowane aneksyną V-FITC komórki emitujące zieloną, a wybarwione jodkiem propydydy czerwoną fluorescencją można analizować w mikroskopie fluorescencyjnym (Trzcńska i in., 2007; Trzcńska i Bryła, 2015). W świeżym i konserwowanym w stanie płynnym nasieniu knura stwierdzono obecność plemników z powierzchniową translokacją fosfatydyloseryny (Trzcńska i in., 2007). W doświadczeniu wykonanym przez Peña i in. (2005) na nasieniu knura zaobserwowano, że po rozmrożeniu w nasieniu drastycznie wzrasta – nawet do 80% – odsetek komórek apoptotycznych w porównaniu z nasieniem świeżym. W nasieniu męczyzn wykazano negatywną korelację pomiędzy ruchliwością i koncentracją a odsetkiem plemników z translokacją fosfatydyloseryny (Oosterhuis i in., 2000). W świeżym nasieniu buhajów zaobserwowano około 17% apoptotycznych plemników, natomiast po zamrożeniu i rozmrożeniu nasienia liczba ta wzrosła do 40%. Wysłunięto więc przypuszczenie, że obecność apoptotycznych plemników w świeżym nasieniu może być przyczyną obniżonej płodności buhajów hodowlanych (Anzar i in., 2002).

W czasie procesu apoptozy dochodzi do otwarcia megakanałów mitochondrialnych i spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego. Dzięki zdolności do produkcji energii mitochondria plemnika umożliwiają jego ruch postępowy, stając się strukturami określającymi zdolność plemników do zapłodnienia komórki jajowej. Do pomiaru zmian potencjału mitochondrialnego może służyć barwnik JC-1, który w żywych plemnikach gromadzi się w mitochondriach w postaci agregatów widocznych w mikroskopie fluorescencyjnym w postaci czerwono-pomarańczowej fluorescencji, natomiast w plemnikach apoptotycznych i nekrotycznych o zdepolaryzowanej błonie mitochondrialnej gromadzi się w formie monomerycznej, widocznej w postaci zielonej fluorescencji (Trzcńska i in., 2008).



A, B, C, D, E – plemniki w świetle widzialnym; A', B', C', D', E' – plemniki emitujące zieloną fluorescencję; A'', B'', C'', D'', E'' – plemniki emitujące czerwoną fluorescencję.

Ryc. 5. Subpopulacje plemników widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym po zastosowaniu barwienia Aneksyna V-FITC/PI



Plemniki żywe – w mitochondriach widoczne agregaty barwnika w postaci czerwono-pomarańczowej fluorescencji.

plemniki apoptotyczne/nekrotyczne – w mitochondriach widoczne agregaty barwnika w postaci zielonej fluorescencji.

Ryc. 6. Subpopulacje plemników obserwowane w mikroskopie fluorescencyjnym po zastosowaniu barwienia z użyciem JC-1

Marchetti i in. (2004) nie stwierdzili obecności kaspazy w plemnikach myszy, podczas gdy aktywność enzymatyczną kaspazy-3 i -7 wykryto w plemnikach męskich o niskiej ruchliwości (Said i in., 2004). Z kolei, wielu autorów identyfikowało w nasieniu plemniki z pęknięciami DNA, które można odnieść do końcowego procesu apoptozy. Do oznaczenia stopnia fragmentacji DNA plemników można stosować metodę TUNEL, określając odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA (TUNEL+) (Trzcńska i Bryła, 2016). Gorczyca i in. (1993) jako pierwsi zaobserwowali, że fragmentacja DNA ejakulowanych plemników jest analogiczna do apoptozy komórek somatycznych. Badania Martina i in. (2004, 2007) wykazały natomiast, że kriokonserwacja nie indukuje fragmentacji DNA w plemnikach buhaja. Co więcej, zarówno w nasieniu świeżym jak i po kriokonserwacji nie wykryto obecności białka Bcl-2 oraz kaspazy -3 i -8; stwierdzono natomiast obecność cytochromu c, białka AIF oraz kaspazy -9. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że przynajmniej w plemnikach buhaja apoptoza przebiega z udziałem szlaku mitochondrialnego.

### **1.7. System antyoksydacyjny w nasieniu**

W warunkach fizjologicznych niewielkie ilości reaktywnych form tlenu w plemnikach knura powstają jako naturalne produkty metabolizmu komórkowego i odgrywają znaczącą rolę, m.in.: w procesach kapacytacji, hiperaktywacji czy reakcji akrosomalnej (Agarwal i in., 2004). Proces kriokonserwacji prowadzi do powstania nadmiaru RFT, co z kolei wywołuje zmiany peroksydacyjne w lipidach błon komórkowych plemników. Peroksydacja lipidów jest procesem utleniania, przede wszystkim wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład fosfolipidów, będących podstawowym składnikiem budulcowym błon biologicznych (głównie fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydylocholino). W przypadku plemników knura zarówno wysoki udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w składzie lipidów błon komórkowych, jak i większa niż w innych komórkach liczba mitochondriów powodują zwiększoną produkcję RFT w procesach utleniania komórkowego.

Zarówno w plazmie nasienia, jak i wewnątrz plemników działa ochronny system antyoksydacyjny, który pozwala na utrzymanie równowagi oksydacyjnej poprzez neutralizację i usuwanie nadmiaru reaktywnych form tlenu. Do głównych reaktywnych form tlenu zalicza się: anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH^{\cdot}$ ) oraz tlen singletowy ( $^1O_2$ ). Pierwotną formą RFT w żywej komórce jest anionorodnik ponadtlenkowy, z którego powstają kolejne formy o zwiększonej reaktywności i toksyczności. Dalsza redukcja  $O_2^{\cdot-}$  w procesie katalizowanym przez dysmutazę ponadtlenkową prowadzi do powstania nadtlenku wodoru, który dyfunduje przez błony komórkowe i w obecności metali przejściowych (jony żelaza i miedzi) może ulec przemianie do rodnika hydroksylowego. Rodnik ten jest bardzo toksyczny i natychmiast po powstaniu reaguje z sąsiadującymi



cząsteczkami organicznymi. Do RFT należy również tlen singletowy, który oddziałuje z innymi cząsteczkami przechodząc w stan tripletowy, przekazując energię wzbudzenia lub wchodzi z cząsteczkami w reakcję chemiczną. Może reagować z resztami aminokwasów białek oraz z kwasami nukleinowymi. Ochronny system antyoksydacyjny nasienia ssaków, umiejscowiony zarówno w plazmie nasienia, jak i wewnątrz plemników pozwala na wytworzenie fizjologicznej ilości RFT i utrzymanie równowagi oksydacyjnej poprzez neutralizację i usuwanie nadmiaru reaktywnych form tlenu. System ten składa się z czynników enzymatycznych i nieenzymatycznych, które współdziałają ze sobą w celu zapewnienia optymalnej ochrony przed RFT. Podstawowy system enzymatyczny w nasieniu składa się z dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (KAT), peroksydazy glutationowej (GPX) oraz reduktazy glutationowej (GR). W warunkach fizjologicznych enzymy te współdziałają ze sobą a inaktywacja jakiegokolwiek z nich powoduje osłabienie ochronnego systemu antyoksydacyjnego (Frączek i Kurpisz, 2005). Dysmutaza ponadtlenkowa jest metaloenzymem, który katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru. Katalaza jest selenoproteiną katalizującą reakcję dysproporcjonowania nadtlenku wodoru, co prowadzi do powstania tlenu cząsteczkowego i wody. W obronie przed RFT bierze udział układ przeciwutleniający związany z glutationem, który powoduje redukcję nadtlenku wodoru. W skład tego układu wchodzi peroksydaza i reduktaza glutationowa. Oprócz enzymów neutralizujących nadprodukcję RFT istotną rolę w antyoksydacyjnym systemie ochronnym odgrywają tzw. niskocząsteczkowe, nieenzymatyczne antyoksydanty wspomagające aktywność enzymów. Należą do nich m.in.: glutation, kwas pantotenowy, witaminy A, E, C i z grupy B oraz mikroelementy, tj. cynk, selen i miedź (Agarwal i in., 2004).

### **1.8. Związki antyoksydacyjne i osłaniające oraz nowe rozwiązania technologiczne w kriokonserwacji nasienia knura**

W ostatnich latach wiele prac poświęcono modyfikacji składu rozcieńczalnika mrozeniowego w oparciu o dodatek substancji o działaniu antyoksydacyjnym i osłaniającym błony plazmatyczne plemników. Dodatek związków o działaniu antyoksydacyjnym ogranicza negatywne skutki wywołane przez reaktywne formy tlenu (RFT) oraz przyczynia się do wzrostu efektywności kriokonserwacji. Do najczęściej stosowanych antyoksydantów, poprawiających jakość nasienia knura po rozmrożeniu zalicza się m.in.: glutation (Zhang i in., 2012), butylowany hydroksytoluen (Roca i in., 2004),  $\alpha$ -tokoferol (Satorre i in., 2012); dysmutazę ponadtlenkową i/lub katalazę (Roca i in., 2005), L-cysteinę (Malo i in., 2010), kwas askorbinowy w połączeniu z glutationem (Giaretta i in., 2015), witaminę E (Peña i in., 2003). Zestawienie wyników badań nad zastosowaniem wybranych związków w kriokonserwacji nasienia różnych gatunków ssaków przedstawiono w tabeli 1.

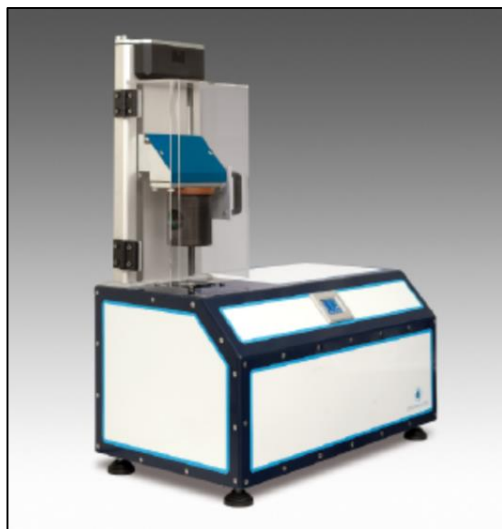
Tabela 1. Zestawienie wybranych związków antyoksydacyjnych stosowanych w kriokonserwacji nasienia różnych gatunków ssaków

Antyoksydant	Zastosowanie	Gatunek	Uzyskany wynik po rozmrożeniu
Witamina C	rozcieńczalnik mrozeniowy	mężczyzna	Brak wpływu na ruchliwość plemników (Askar i in., 1994)
		ogier	Brak wpływu na jakość nasienia ocenianego na podstawie ruchliwości, żywotności, fragmentacji DNA i integralności błony akrosomowej (Dukelow i Graham, 1962)
		buhaj	Poprawa ruchliwości i żywotności plemników (Patel i in., 2016)
Witamina E, Trolox	rozcieńczalnik do rozmrażania	mężczyzna	Brak wpływu na ruchliwość, nieznaczne ograniczenie peroksydacji lipidów (Yoshida, 2000)
		knur	Poprawa ruchliwości i aktywności mitochondrialnej (Saravia i in., 2010)
		mężczyzna	Poprawa żywotności plemników (Nekoonam i in., 2016)
		królik	Poprawa ruchliwości i integralności błon komórkowych plemników (Zhu i in., 2015)
Katalaza	rozcieńczalnik mrozeniowy	ogier	Brak wpływu na ruchliwość, integralność błony akrosomowej plemników i aktywność mitochondrialną plemników (Bustamante-Filhoa i in., 2006)
		knur	Poprawa ruchliwości i czasu przeżywania, brak wpływu na morfologię plemników (Roca i in., 2005)
		tryk	Poprawa ruchliwości, integralności błon komórkowych plemników (Shafiei i in., 2015)
L-cysteina	rozcieńczalnik mrozeniowy	knur	Poprawa ruchliwości, integralności błon komórkowych i integralności błony akrosomowej (Chanapiwat i in., 2010)
Luteina	rozcieńczalnik mrozeniowy	knur	Poprawa ruchliwości plemników i integralności błony akrosomowej (VaroGhiuru i in., 2015)

Osobną kwestię w modyfikacji składu rozcieńczalników mrozeniowych stanowi wprowadzanie do ich składu komponentów o właściwościach osłaniających błony plazmatyczne plemników przed uszkodzeniami krioge-

nicznymi, m.in. glikozaminoglikany (GAG). Jednym z najbardziej rozpoznawalnych związków należących do tej grupy jest hialuronian, który odgrywa istotną rolę w procesie zapłodnienia czy kapacytacji plemników. Badania przeprowadzone przez Peña i in. (2003) oraz Bryła i in. (2017) wykazały, że dodatek hialuronianu do rozcieńczalnika mroźniowego nasienia knura poprawia parametry ruchliwości plemników ocenianych za pomocą systemu komputerowego CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*).

Inną możliwością zachowania zdolności zapładniającej przechowywanych plemników jest poddanie ich działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP – ang. *high hydrostatic pressure*), które zwiększa wartość biologiczną nasienia przez zminimalizowanie stresu komórkowego związanego z jego konserwacją. Z doświadczeń przeprowadzonych na nasieniu knura i buhaja wynika, że przechowywanie nasienia w komorze z wysokim ciśnieniem hydrostatycznym przed zastosowaniem standardowej procedury kriokonserwacji w istotny sposób zwiększa ruchliwość plemników po procedurze zamrażania/rozmarzania (Pribenszky i in., 2006). Jednocześnie, próby biologiczne z zastosowaniem do inseminacji loszek nasienia poddanego działaniu HHP umożliwiły uzyskanie wyższej liczby prosiąt w miocie. Badania wykazały, że zastosowanie ciśnienia o wartości 350 Bar przed procedurą kriokonserwacji chroni plemniki przed uszkodzeniami kriogenicznymi (Bryła i Trzcicka, 2018).



Ryc. 7. Komora z wysokim ciśnieniem hydrostatycznym – Model GBOX 2140 przeznaczona do nasienia knura (Applied Cell Technology Ltd, Węgry)

Duże znaczenie w doskonaleniu techniki kriokonserwacji ma zastosowanie dializy pełnego ejakulatu knura przed procedurą mrożenia. Wykazano, że efektem tego procesu były zmiany właściwości fizykochemicznych białek plazmy nasienia wywołane usunięciem niskocząsteczkowych substancji, takich jak: peptydy, jony cynkowe i endonadtlenki (Fraser i in., 2007). Zastosowanie dializy jako jednego z etapów kriokonserwacji powodowało poprawę ruchliwości plemników oraz zwiększenie integralności plazmolemy w regionie główki i wstawki plemnika, co zwiększyło efektywność mrożenia.

W ostatnich latach podejmuje się próby zamiany składników pochodzenia zwierzęcego w rozcieńczalnikach mrożeniowych na ich substytuty w postaci białek roślinnych. Białko roślinne jest znacznie bezpieczniejszym suplementem pod względem sanitarnym niż komponenty pochodzenia zwierzęcego. Zastosowanie białka roślinnego eliminuje bowiem możliwość przenoszenia chorób zakaźnych pochodzenia zwierzęcego oraz zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Jednocześnie, w porównaniu do surowicy zwierzęcej białka te nie wykazują zmienności pomiędzy wyprodukowanymi seriami, co umożliwi standaryzację warunków doświadczenia. Z badań przeprowadzonych przez Beccaglia i in. (2009) na nasieniu psa domowego wynika, że dodatek lecytyny sojowej do rozcieńczalnika mrożeniowego działa ochronnie na błonę plazmatyczną plemników. Z kolei, badania przeprowadzone przez Aires i in. (2003) wykazały, że rozcieńczalnik mrożeniowy zawierający lecytynę sojową wpływa korzystnie na ruchliwość plemników buhaja po rozmrożeniu i wzrost odsetka zacielonych jałówek. Korzystny efekt stabilizacji plazmolemy plemników knura można uzyskać poprzez fuzję plemników z liposomami (patent USA 6395305). Wykorzystanie odpowiednich klas fosfolipidów i liposomów pozwala na uzyskanie wyższego odsetka plemników żywych oraz plemników ruchliwych po procedurze zamrażania-rozmrażania.

## **2. Cel badań**

Celem podjętych przez nas badań było opracowanie składu rozcieńczalnika do mrożenia nasienia knura poprzez dodatek substancji przeciwdziałających procesom oksydacyjnym: butylowanego hydroksytoluenu (BHT), L-glutationu (GLU), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i/lub katalazy (KAT) oraz soli sodowej kwasu hialuronowego (HA), mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) jako substancji o właściwościach osłaniających wrażliwe na uszkodzenia kriogeniczne błony plazmatyczne plemników.

Do oceny jakości nasienia przed i po procedurze zamrażania zastosowano standardowe metody oraz wybrane markery apoptotyczne, które pozwoliły na opracowanie kryteriów selekcji ejakulatów przeznaczonych do kriokonserwacji.

W celu określenia zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia przeprowadzono ocenę skuteczności unasiwienia i użytkowości rozplodowej loszek na podstawie wskaźnika zapładnialności, wskaźnika oproszeń i ogólnej liczby prosiąt urodzonych w miocie.

Uzyskane wyniki badań pozwolą na szersze zastosowanie kriokonserwowanego nasienia tego gatunku w praktyce inseminacyjnej. Adresatem opracowanej metody kriokonserwacji będą producenci nasienia knurów oraz banki materiału biologicznego.

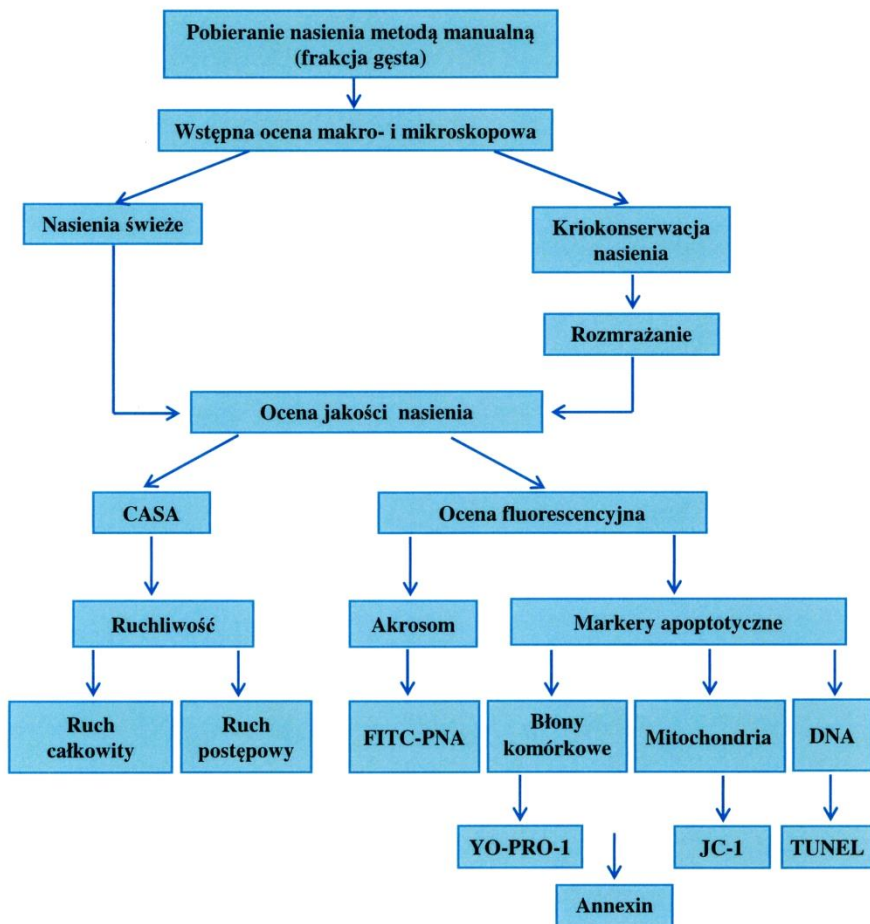
### **3. Materiał i metody**

Materiał doświadczalny stanowiło nasienie knurów różnych ras: Duroc x Pietrain, Pietrain x Duroc, Pietrain, Duroc, wielka biała polska (WBP), WBPxPBZ, Maxter w wieku od 2 do 3 lat, wykorzystywanych do inseminacji w Stacjach Eksploatacji Knurów w Kleczy Dolnej oraz Czerminie. Knury utrzymywano w standardowych warunkach zoohigienicznych i żywiono mieszanką pełnoporcjową, ze stałym dostępem do wody. Do badań przeznaczono nasienie pochodzące od 15 knurów (4–6 ejakulatów).

Do inseminacji nasieniem mrożonym przeznaczono 54 sześciomiesięczne loszki różnych ras (PxD, PBZ, WBZ) o masie ciała wynoszącej od 85 do 90 kg, utrzymywane w standardowych warunkach zootechnicznych w Stacji Doświadczalnej IZ PIB Żerniki Wielkie. Wszystkie procedury dotyczące zwierząt zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie.

#### **3.1. Doświadczenie 1: Opracowanie składu rozcieńczalnika mrożeniowego w oparciu o dodatek wybranych antyoksydantów i związków osłaniających.**

Schemat doświadczenia przedstawiono na rycinie 8.



Ryc. 8. Schemat doświadczenia „Opracowanie składu rozcieńczalnika mrozeniowego w oparciu o dodatek wybranych antyoksydantów i związków osłaniających”

### 3.1.1. Przygotowanie rozcieńczalników

Odczynniki potrzebne do przygotowania rozcieńczalników mrozeniowych pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Niemcy), z wyjątkiem mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej zakupionych w Animal Pharma BV (Holandia), roztworu soli sodowej kwasu hialuronowego z Croma Pharma GmbH (Austria), rozcieńczalnika *Biosolwens Plus* (BP) (Biocheffa, Polska) oraz Equex- STM® (Minitübe, Niemcy).



Ryc. 9. Rozcieńczalnik *Biosolwens Plus*

Do sporządzenia rozcieńczalników wykorzystano wodę 3-krotnie destylowaną, dejonizowaną i filtrowaną.

1. Rozcieńczalnik podstawowy: *Biosolwens Plus* sporządzono zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta w kolbie miarowej na 1 L.
2. Rozcieńczalnik A: żółtkowo-laktozowy (LEY) sporządzono poprzez rozpuszczenie 11 g laktozy w 100 mL wody destylowanej, a następnie 80 mL uzyskanego roztworu dopełniano 20 mL żółtka jaja kurzego.
3. Rozcieńczalnik B: żółtkowo-laktozowy z dodatkiem glicerolu (LEYG) uzyskano z 89,5% rozcieńczalnika żółtkowo-laktozowego uzupełnionego 6% glicerolem i 1,5% Equex- STM®.

Ryc. 10. Składniki rozcieńczalnika A





Ryc. 11. Skład rozcieńczalnika B

Procedurę mrożenia nasienia knura przeprowadzono według metody własnej (Trzcińska i in., 2013). Nasienie (frakcja gęsta) pobierano metodą manualną na fantomie i rozrzedzano w rozcieńczalniku *Biosolvens Plus* w stosunku 1:1. Ocenę ruchliwości oraz koncentracji plemników przeprowadzono przy zastosowaniu systemu CASA. Ocenę morfologii przeprowadzono pod mikroskopem fazowo-kontrastowym stosując klasyfikację Bloma (Blom, 1981). Do kriokonserwacji kwalifikowano ejakulatory zawierające co najmniej 70% plemników ruchliwych oraz 80% plemników morfologicznie prawidłowych.

Rozrzedzone nasienie schładzano do temperatury 15°C i ekwilibrowano przez 60 minut. W celu oddzielenia plemników od osocza i rozcieńczalnika wirowano nasienie w wirówce w temperaturze 15°C przy 800 g przez 25 minut. Zawiesinę plemników z każdego ejakulatu dzielono na 16 wariantów: rozcieńczalnik kontrolny (R0) oraz 15 modyfikacji rozcieńczalnika mroźniowego (R1-R15). Każdą próbkę rozrzedzono w rozcieńczalniku A (o temperaturze 15°C) i rozcieńczalniku B (o temperaturze 5°C), tak aby uzyskać koncentrację  $1 \times 10^9$  plemników/ml i końcową koncentrację glicerolu 3%. Zastosowane modyfikacje rozcieńczalnika mroźniowego przedstawiono w tabeli 2.



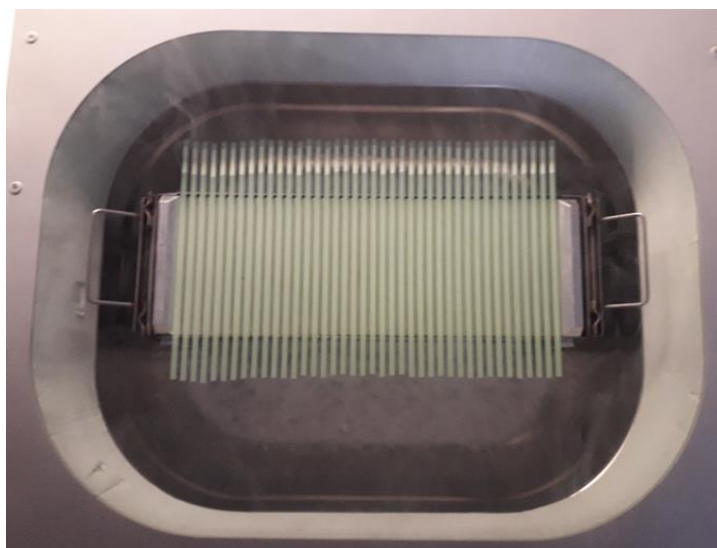
Tabela 2. Zastosowane modyfikacje rozcieńczalnika mrożeniowego nasienia knura

Rodzaj modyfikacji	Stężenie	Nazwa rozcieńczalnika
Butylowany hydroksytoluen BHT	0,5mM	R1
	1,0mM	R2
	2,0mM	R3
L-glutation GLU	2,5mM	R4
	5,0mM	R5
Dysmutaza ponadtlenkowa SOD	150 IU	R6
	300 IU	R7
Katalaza KAT	200IU	R8
	400 IU	R9
Dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza SOD+KAT	150 IU SOD+200 IU KAT	R10
	300 IU SOD+ 400 IU KAT	R11
Mieszanka białek roślinnych i lecy- tyny sojowej Pp	0,0005 g	R12
	0,001 g	R13
Sól sodowa kwasu hialuronowego HA	0,5%	R14
	1,0%	R15

Nasieniem napełniano słomki o objętości 0,5 ml i umieszczano je na stoleżu w parach ciekłego azotu o temperaturze około -120°C przez 15 minut w pojemniku z twardego styropianu. Zamrożone słomki umieszczono w gobletach i przechowywano w kontenerze z ciekłym azotem (-196°C).



Ryc. 12. Słomki IMV 0,5 ml do konfekcjonowania nasienia knura



Ryc. 13. Słomki na stelażu umieszczone w parach ciekłego azotu



Ryc. 14. Pojemniki na słomki (goblety)



Ryc. 15. Kontenery do przechowywania materiału biologicznego



Ryc. 16. Kontener ze słómkami w ciekłym azocie

Rozmrażanie słómek przeprowadzono w łaźni wodnej w temperaturze 38°C przez 40 sekund. Po rozmrożeniu, zawartość słómek przenoszono do rozcieńczalnika *Biosolwens Plus* o temperaturze 38°C. Ocenę jakości kriokonserwowanego nasienia przeprowadzono po 10–15 minutach inkubacji w temperaturze 38°C.



Ryc. 17. Łaźnia wodna

### 3.1.2. Ocena jakości nasienia

Nasienie przed i po procedurze kriokonserwacji analizowano przy zastosowaniu standardowych parametrów jego jakości, stanu integralności akrosomu oraz wybranych markerów apoptotycznych. Przed każdą analizą zarówno nasienie świeże, jak i kriokonserwowane rozcieńczano w rozcieńczalniku podstawowym BP. Dodatkowo, przed wykonaniem oceny stanu integralności akrosomu oraz oceny zmian apoptotycznych w plemnikach nasienie rozmrożone odwirowywano (300xg, 10 min) w celu usunięcia rozcieńczalnika mrozeniowego.

#### 3.1.2.1. Komputerowo wspomaganą analizę nasienia (CASA) z wykorzystaniem analizatora (S.C.A V5.1, Microptic, Hiszpania)

Nasienie po rozmrożeniu rozcieńczano w stosunku 1:20 w rozcieńczalniku podstawowym *Biosolwens Plus* do uzyskania koncentracji 50–60 x 10<sup>6</sup> plemników/ml i inkubowano w temperaturze 38°C przez 20 minut. Następnie nasienie o objętości 2 µl nakrapiano do komory Leja8 (Leja, Holandia) o grubości 20 µm i oceniano analizatorem S.C.A V5.1. Każdorazowo określano ruch całkowity (TM%) oraz postępowy (PM%) plemników.



Ryc. 18. Szkiełka Leya 8-komorowe

Zastosowane ustawienia techniczne systemu CASA przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Ustawienia techniczne systemu CASA/ S.C.A V5.1 stosowane przy ocenie ruchliwości nasienia knura

Parametry techniczne	
<b>Częstotliwość odświeżania obrazu (Hz)</b>	60
<b>Liczba rejestrowanych obrazów</b>	25
<b>Minimalna wielkość komórek poddanych analizie (pixel)</b>	7
<b>Minimalna intensywność analizowanych obiektów</b>	50
<b>Minimalna szybkość VAP plemników o ruchu postępowym (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	45
<b>Wartość graniczna plemników o ruchu wolnym VAP cut-off (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	20
<b>Minimalna ilość analizowanych obiektów</b>	8000

### 3.1.2.2. Ocena morfologii plemników

Preparaty do oceny morfologicznej sporządzono z nasienia świeżego po rozcieńczeniu. Preparaty do badania morfologicznego przygotowano wykonując rozmaz nasienia na szkiełku podstawowym, który po wysuszeniu w temperaturze pokojowej był wybarwiany metodą Giemzy (Sigma-Aldrich, Niemcy). Przygotowane preparaty oceniano pod mikroskopem fazowo-kontrastowym o powiększeniu 1000x. W każdym preparacie obliczano 200 plemników stosując klasyfikację Bloma (Blom, 1981).

### 3.1.2.3. Ocena integralności akrosomu

Wizualizację stanu akrosomów plemników knura przeprowadzono przy zastosowaniu barwienia lektyną z orzeszków ziemnych sprzężoną z fluoresceiną (FITC-PNA) oraz jodkiem propydydy (PI) (Sigma-Aldrich, Niemcy). Plemniki o koncentracji  $20\text{--}30 \times 10^6$  zawieszono w roztworze soli fizjologicznej (bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Sigma-Aldrich, Niemcy) zawierającym 10  $\mu\text{l}$  FITC-PNA oraz 5  $\mu\text{l}$  PI. Zawiesinę plemników inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Ocenę integralności błony akrosomalnej przeprowadzono na 200 plemnikach z każdej próbki ocenianych w mikroskopie epifluorescencyjnym Nikon Eclipse E600 (Japonia) przy użyciu odpowiednich filtrów. Zastosowane barwienie pozwoliło wyróżnić trzy subpopulacje plemników: plemniki żywe z integralną błoną akrosomalną ( $\text{PNA}^-/\text{PI}$ ), plemnik żywe z zaburzoną ciągłością błony akrosomalnej ( $\text{PNA}^+/\text{PI}$ ), plemniki martwe z uszkodzonym akrosomem ( $\text{PNA}^+/\text{PI}^+$ ) (Trzcńska i Bryła, 2015).

#### 3.1.2.4. Ocena zmian w przepuszczalności błony komórkowej plemników przy zastosowaniu fluorochromu YO-PRO-1 i jodku propydyny

Zmiany w przepuszczalności błony komórkowej plemników identyfikowano na podstawie charakterystycznych dla apoptozy mikroporów w zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 (Vybrant Apoptosis Assay Kit#4, Molecular Probes Inc., Eugene, USA).

Plemniki o koncentracji  $2 \times 10^6$  zawieszano w 0,5 ml roztworu soli fizjologicznej (Sigma-Aldrich, Niemcy). Następnie dodawano 2  $\mu$ l YO-PRO-1 i inkubowano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 20 minut. Przed analizą mikroskopową do mieszaniny reakcyjnej dodawano 1  $\mu$ l PI. Analizę przeprowadzano w mikroskopie epifluorescencyjnym przy użyciu odpowiednich filtrów. Zastosowanie podwójnego barwienia pozwoliło na wyodrębnienie trzech subpopulacji plemników: plemniki żywe z zachowaną ciągłością błony komórkowej (YO-PRO-1<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), plemniki apoptotyczne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) oraz plemniki nekrotyczne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) z przerwana ciągłością błony komórkowej. Ocenę przeprowadzono na 200 plemnikach z każdej próbki, które stanowiły 100% ocenianych komórek, na podstawie których wyznaczono odpowiedni odsetek poszczególnych subpopulacji (Bryła i in., 2017).

#### 3.1.2.5. Identyfikacja reszt fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej plemników przy zastosowaniu aneksyny V-FITC i jodku propydyny

Próbki zawierające  $2 \times 10^6$  plemników umieszczano w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 4  $\mu$ l aneksyny-V znakowanej fluoresceiną oraz 2  $\mu$ l PI (Annexin V-Fluos Staining Kit, Roche, Mannheim, Niemcy). Inkubację przeprowadzano w ciemności przez 10–15 minut w temperaturze pokojowej. Plemniki po inkubacji umieszczano na szkiełku podstawowym i analizowano pod mikroskopem epifluorescencyjnym przy użyciu odpowiednich filtrów. Analizę przeprowadzano na 200 plemnikach z każdej próbki. Wyróżniono następujące subpopulacje plemników: żywe (AnV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), wczesnoapoptotyczne (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), późnoapoptotyczne/wczesnonekrotyczne (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) oraz plemniki martwe (AnV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) (Trzcńska i in., 2008).

#### 3.1.2.6. Ocena fragmentacji DNA plemników przy pomocy metody TUNEL

Pęknięcia łańcucha DNA obserwowane w fazie wykonawczej apoptozy analizowano metodą TUNEL przy użyciu zestawu In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Niemcy) według metodyki opisanej przez producenta z niewielkimi modyfikacjami. Plemniki o koncentracji  $10 \times 10^6$  utrwalano w 1% paraformaldehydzie przez 10 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Następnie, po przepłukaniu w płynie PBS plemniki permeabilizowano w 0,1% Triton X-100 przez kolejne 10 minut w temperaturze pokojowej. Po przepłu-

kaniu i odwirowaniu plemniki zawieszano w mieszaninie reakcyjnej zawierającej znakowane nukleotydy dUTP sprzężone z fluoresceiną oraz enzym – terminalną transferazę deoksynukleotydylową (TdT). Reakcję przeprowadzono w ciemności w temperaturze 37°C przez 60 minut. Po zakończeniu reakcji plemniki przepłukiwano w płynie PBS, umieszczano na szkiełku podstawowym w kropli zawierającej barwnik DAPI (4',6-diaminoino-2-fenylinol) (Vector Laboratories, USA) i analizowano w mikroskopie epifluorescencyjnym. Ocenę przeprowadzono na 200 plemnikach z każdej próbki, na podstawie których wyznaczono odpowiedni odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA (TUNEL<sup>+</sup>). Jednocześnie sporządzono kontrolę pozytywną poprzez inkubowanie plemników z DNAzą wolną od RNA (50U/mL) w 37°C przez godzinę w ciemności, jak również kontrolę negatywną poprzez inkubację plemników w mieszaninie reakcyjnej bez dodania enzymu terminalnej transferazy (Trzcińska i Bryła, 2015).

### 3.1.2.7. Ocena mitochondrialnego potencjału transbłonowego plemników

Do oceny mitochondrialnego potencjału transbłonowego plemników ( $\Delta Y_m$ ) zastosowano barwnik JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide/chloride) (Molecular Probes, USA). Próbkę zawierającą  $1 \times 10^6$  plemników zawieszano w 1 ml płynu PBS bez jonów  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ , a następnie inkubowano z 5  $\mu g$  JC-1 w temperaturze 37°C w ciemności. Analizę przeprowadzono na 200 plemnikach z każdej próbki. Identyfikowano dwie subpopulacje plemników: żywe (nieapoptotyczne), w których JC-1 gromadził się w mitochondriach w postaci agregatów, co w mikroskopie epifluorescencyjnym widoczne było w postaci czerwono-pomarańczowej fluorescencji oraz plemniki apoptotyczne/nekrotyczne, w których nastąpiła depolaryzacja błony mitochondrialnej i spadek  $\Delta Y_m$ , a barwnik JC-1 gromadził się w formie monomerycznej i wybarwiał w obszarze mitochondriów plemniki na zielono (Trzcińska i in., 2008).

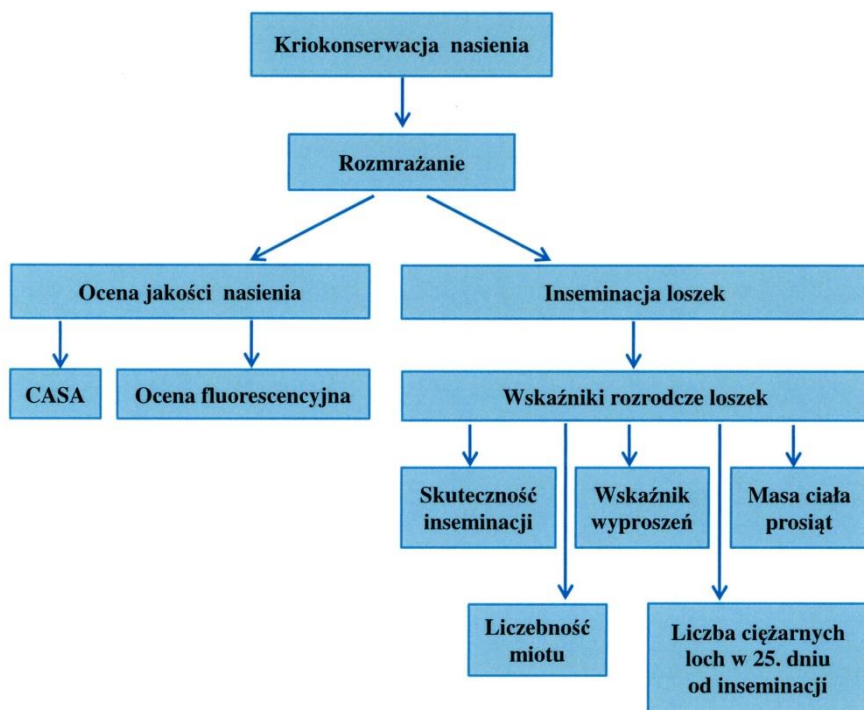
## 3.2. Doświadczenie 2: Ocena *in vivo* zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia knura

Schemat doświadczenia przedstawiono na rycinie 19.

W celu określenia zdolności zapładniającej nasienia przeprowadzono próby biologiczne polegające na inseminacji loszek nasieniem pochodzącym od 2 knurów (3 ejakulaty/knura):

- mrożonym z użyciem standardowego rozcieńczalnika LEYG (kontrola-R0),
- mrożonym z użyciem standardowego rozcieńczalnika z dodatkiem wybranych komponentów.





Ryc. 19. Schemat doświadczenia „Ocena *in vivo* zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia knura”

### 3.2.1. Synchronizacja cyklu płciowego loszek

Loszki poddawano standardowej synchronizacji przez domięśniową iniekcję 750 j.m PMSG (Folligon, Intervet B.V.). Po 72 godzinach podawano 500 j.m HCG (Chorulon, Intervet International B.V.). W dniu wystąpienia rui (24 godziny po podaniu HCG) loszki przygotowywano do zabiegu domacicznej inseminacji.

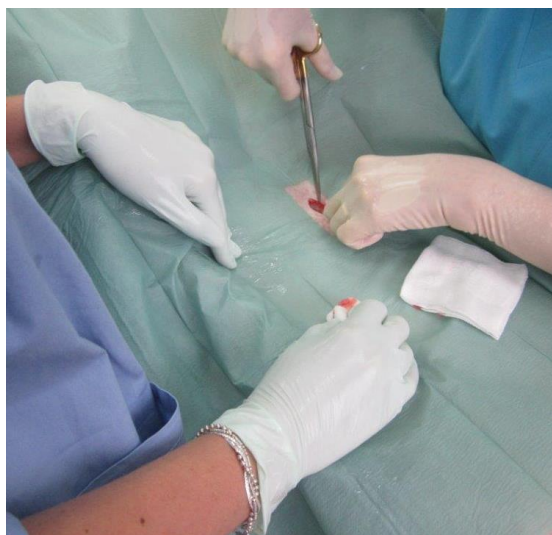
### 3.2.2. Przygotowanie loszek do zabiegu domacicznej inseminacji

Loszki poddano ogólnemu znieczuleniu infuzyjnemu z zastosowaniem preparatów krótko działających po uprzedniej premedykacji. Wykaz używanych środków znieczulających i usypiających przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Wykaz używanych środków znieczulających i sedacyjnych

Środek	Sposób podania	Dawka
Atropina <b>(Atropinum sulphuricum, Polfa, Warszawa)</b>	domięśniowo	0,06 mg/kg m.c.
Azaperon <b>(Stresnil, Jansen Animal Health BVBA)</b>	domięśniowo	3–6 mg/kg m.c.
Sól sodowa thiopentalu <b>(Thiopental 1,0 g, Biochemie GmbH)</b>	dożylnie	5–15 mg/kg m.c.
Chlorowodorek ksylazyny <b>(Sedazin, Biowet, Puławy)</b>	dożylnie	0,08–0,5 ml/100 kg m.c.
Chlorowodorek ketaminy <b>(Ketamina, Biowet, Puławy)</b>	dożylnie	5–15 mg/kg m.c.

Po ułożeniu zwierzęcia w pozycji grzbietowej pomiędzy przedostatnią parą sutek wykonano laparotomię w linii białej.



Ryc. 20. Zabieg laparotomii

Po przecięciu skóry rozdzielono tkankę podskórną, przecięto w linii białej powłoki brzuszne oraz otrzewną. Macicę, jajowody i jajniki wydobyto z jamy brzusznej.

W momencie wykonywania laparotomii u loszek przeprowadzono procedurę rozmrażania słomek w specjalnym urządzeniu w temperaturze 38°C.



Ryc. 21. Rozmrażacz do słomek

Po rozmrożeniu zawartość słomek przenoszono do naczynia z rozcieńczalnikiem o temperaturze 38°C.



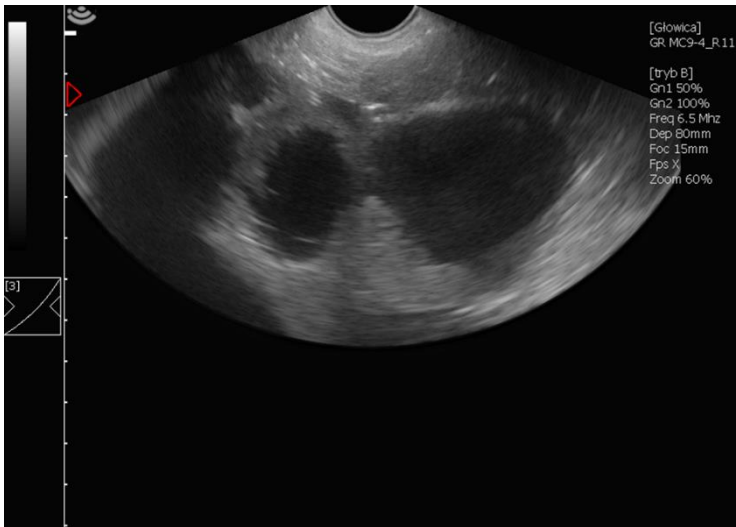
Ryc. 22. Przeniesienie zawartości rozmrożonych słomek do naczynka z rozcieńczalnikiem

Do każdego rogu macicy (w pobliżu połączenia jajowodowo-macicznego) wprowadzono igłę tępokościwą z podłączoną strzykawką z rozmrożonym nasieniem ( $1 \times 10^9$  plemników w 3 ml rozcieńczalnika podstawowego *Bio-solvens Plus*). Po zabiegu loszkom podano odpowiednie środki przeciwbólowe.



Ryc. 23. Wprowadzenie nasienia za pomocą strzykawki do jednego rogu macicy

Loszki odizolowano od reszty zwierząt i po 25 dniach przeprowadzono badanie USG w celu stwierdzenia ciąży.



Ryc. 24. Zdjęcie USG potwierdzające ciążę wykonane w 25. dniu od zabiegu domacicznej inseminacji

Przed planowanym terminem porodu ciężarne loszki umieszczano w boksach porodowych. Przeprowadzono indywidualne badanie wagi prosiąt w dniu urodzenia i w dniu odsadzenia.



Ryc. 25. Urodzone prosięta po inseminacji kriokonserwowanym nasieniem

#### 4. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (według wzoru:  $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ ;  $y$  – 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 wskaźników rozrodczych uzyskanych po inseminacji loszek kriokonserwowanym nasieniem knura opracowano statystycznie przy użyciu testu  $\chi^2$ , a za istotne statystycznie przyjęto różnice na poziomie  $P < 0,05$ .

#### 5. Wyniki

##### 5.1. Doświadczenie 1: Opracowanie składu rozcieńczalnika mrożeniowego w oparciu o dodatek wybranych antyoksydantów i związków osłaniających

###### 5.1.1. Ocena jakości nasienia świeżego

W doświadczeniu wykorzystano frakcję gęstą nasienia pochodzącego od 15 knurów (84 ejakulaty). Do dalszej części doświadczenia przeznaczono tylko te ejakulaty, w których najniższy odsetek plemników o ruchu postępowym wynosił 70% a odsetek plemników prawidłowych morfologicznie nie był

niższy niż 80%. Po przeprowadzeniu wstępnej oceny, polegającej na określe-  
niu objętości, koncentracji oraz morfologii plemników, do dalszych analiz za-  
kwalifikowano 75 ejakulatów. Uzyskano następujące średnie wyniki: objętość  
frakcji gęstej ( $62,8 \pm 4,8$  ml), koncentracja ( $487,8 \pm 101,5 \times 10^6$  plemników/ml)  
oraz odsetek plemników prawidłowych morfologicznie ( $85,6 \pm 4,2\%$ ). Po oce-  
nie standardowych parametrów jakościowych nasienia przeprowadzono ana-  
lizę stanu integralności akrosomów plemników oraz ocenę zmian apoptotycz-  
nych. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Wyniki oceny jakości nasienia świeżego

Metody oceny	Parametry nasienia (%)	Nasienie świeże
CASA	Ruch całkowity (TM%)	95,1 $\pm$ 2,7
	Ruch postępowy (PM%)	86,6 $\pm$ 6,2
FITC-PNA/PI	Plemniki żywe z integralną błoną akrosomalną (FITC-PNA <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	80,4 $\pm$ 4,9
	Plemniki żywe z uszkodzoną błoną akrosomalną (FITC-PNA <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	8,4 $\pm$ 0,8
	Plemniki martwe z uszkodzoną błoną akrosomalną (FITC-PNA <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )(%)	11,2 $\pm$ 2,1
YO-PRO-1/PI	Plemniki żywe (YO-PRO-1 <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	81,5 $\pm$ 6,3
	Plemniki apoptotyczne (YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	4,1 $\pm$ 1,2
	Plemniki nekrotyczne (YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )(%)	14,4 $\pm$ 3,2
Annexin V-Fluos /PI	Plemnik żywe (AnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	79,2 $\pm$ 4,1
	Plemniki wczesnoapoptotyczne (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	3,6 $\pm$ 1,2
	Plemniki późnoapoptotyczne/wczesnonekro- tyczne (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )(%)	12,6 $\pm$ 3,7
	Plemniki nekrotyczne (AnV <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> )(%)	4,6 $\pm$ 1,4
TUNEL	Plemniki z fragmentacją DNA (TUNEL <sup>+</sup> )(%)	1,7 $\pm$ 0,9
JC-1	Plemniki z wysokim $\Delta Y_m$ (JC-1 <sup>+</sup> )(%)	87,8 $\pm$ 4,2
	Plemniki z niskim $\Delta Y_m$ (JC-1 <sup>-</sup> )(%)	12,2 $\pm$ 4,2

**5.1.2. Ocena jakości nasienia kriokonserwowanego z dodatkiem wybranych antyoksydantów oraz substancji osłaniających błony komórkowe plemników (tab. 6–12)**

Wyniki oceny ruchliwości przy pomocy systemu CASA nasienia mrożonego w rozcieńczalnikach z dodatkiem substancji osłaniających błony komórkowe plemników wykazały, że najwyższy odsetek plemników o ruchu postępowym odnotowano w rozcieńczalniku z dodatkiem 1 mM i 2 mM butylowanego hydroksytoluenu (R2 i R3) (tab. 6) oraz w rozcieńczalniku z dodatkiem mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej niezależnie od zastosowanego stężenia (R12, R13) (tab. 7). Najniższy odsetek plemników wykazujących ruch całkowity i postępowy odnotowano natomiast w rozcieńczalniku kontrolnym (R0).

Najwyższy odsetek plemników żywych z integralną błoną akrosomalną wykazano w rozcieńczalniku z dodatkiem 2,0 mM butylowanego hydroksytoluenu (R3) (tab. 8). Statystycznie najniższy odsetek plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI) stwierdzono w rozcieńczalnikach z dodatkiem: butylowanego hydroksytoluenu niezależnie od zastosowanego stężenia (R1, R2, R3); 5,0 mM glutationu (R5); dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy (R10, R11); mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (R12, R13) oraz 1% soli sodowej kwasu hialuronowego (R15) w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym (R0) (tab. 9). Najniższy istotnie statystyczny odsetek plemników wczesnoapoptotycznych (AnV<sup>+</sup>/PI) wykazano w rozcieńczalniku z dodatkiem 0,0005 g mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (R12) oraz w rozcieńczalniku R2 z dodatkiem 1,0 mM butylowanego hydroksytoluenu, a najwyższy w rozcieńczalniku z dodatkiem 300 IU dysmutazy ponadtlenkowej oraz 400 IU katalazy (R11) w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym (R0) (tab. 10). Poziom fragmentacji DNA plemnikowego wahał się w przedziale od 1,8±0,5% do 2,4±0,7% a uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 11. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w stopniu fragmentacji DNA plemników pomiędzy rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktosowo-glicerolowym a badanymi wariantami rozcieńczalników mrożeniowych. Ocena plemników z zastosowaniem fluorochromu JC-1 nie wykazała statystycznie istotnych różnic w odsetku plemników z wysokim mitochondrialnym potencjałem transbłonowym w rozcieńczalnikach mrożeniowych z dodatkiem 2,5 mM glutationu (R4), dysmutazy ponadtlenkowej (R6,R7) oraz 200 IU katalazy (R8) w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym żółtkowo-laktosowo-glicerolowym (R0) (tab. 12).

Tabela 6. Wyniki oceny ruchliwości plemników kriokonserwowanych w rozcieńczalnikach z dodatkiem wybranych antyoksydantów

Rodzaj rozcieńczalnika	Ruchliwość	
	Ruch całkowity TM (%)	Ruch postępowy PM (%)
R0	42,8±7,4	37,4±3,2
R1	74,8±6,7*	70,7±6,2*
R2	80,4±5,7*	73,1±4,4*
R3	78,6±6,5*	71,8±4,3*
R4	47,3±8,3	38,2±8,1
R5	70,8±8,4*	65,1±9,8*
R6	44,5±7,8	39,3±4,6
R7	46,1±7,3	40,2±5,1
R8	48,7±7,6	35,2±9,8
R9	63,4±7,3*	58,9±8,1*
R10	68,7±5,9*	63,6±5,2*
R11	64,7±9,3*	59,8±7,5*

\*P<0,01 – istotne statystycznie różnice w porównaniu z rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktowo-glicerolowym (R0).

Tabela 7. Ruchliwość nasienia kriokonserwowanego z dodatkiem substancji osłaniających błony komórkowe plemników

Rodzaj rozcieńczalnika	Ruchliwość	
	Ruch całkowity TM (%)	Ruch postępowy PM (%)
R0	42,8±7,4	37,4±3,2
R12	77,8±6,4*	72,1±6,3*
R13	75,8±6,9*	71,4±5,2*
R14	53,8±6,7	45,3±4,1
R15	72,6±9,8*	68,3±4,7*

\*P<0,01 – istotne statystycznie różnice w porównaniu z rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktowo-glicerolowym (R0).



Tabela 8. Wyniki oceny integralności błony akrosomalnej plemników poddanych procesowi kriokonserwacji

Rodzaj rozcieńczalnika	FITC-PNA/PI		
	plemniki żywe z integralną błoną akrosomalną (PNA <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	plemniki żywe z uszkodzoną błoną akrosomalną (PNA <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	plemniki martwe z uszkodzoną błoną akrosomalną (PNA <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )(%)
R0	39,6±5,2	11,8±4,3	48,6±6,7
R1	72,4±6,2*	10,5±2,1	17,1±4,6*
R2	71,3±3,7*	9,7±2,4	19,0±3,3*
R3	73,1±5,6*	10,2±3,3	16,7±6,8*
R4	38,5±4,7	12,4±4,5	49,1±6,1
R5	54,8±7,2*	14,8±2,8	30,4±2,7*
R6	37,3±5,0	17,2±3,8	45,5±9,2
R7	42,5±7,8	16,4±3,7	41,1±7,3
R8	45,9±8,3	15,3±4,6	38,8±5,2*
R9	61,3±4,9*	12,7±3,3	26,0±5,9*
R10	59,8±6,4*	13,1±3,1	27,1±5,1*
R11	49,6±5,4*	12,7±5,1	37,7±3,5*
R12	71,4±3,7*	9,2±1,9	19,4±3,1*
R13	57,1±8,4*	11,1±1,5	31,8±6,0*
R14	55,4±8,2*	12,3±2,3	32,3±7,8*
R15	69,8±8,7*	8,7±0,7	21,5±2,7*

\*P<0,01 – istotne statystycznie różnice w porównaniu z rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktowo-glicerolowym (R0).

Tabela 9. Wyniki oceny zmian apoptotycznych w plemnikach poddanych procedurze kriokonserwacji

Rodzaj rozcieńczalnika	YO-PRO-1/PI		
	plemniki żywe YO-PRO-1 <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> (%)	plemniki apoptotyczne YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> (%)	plemniki nekrotyczne YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> (%)
R0	36,7±5,1	22,4±6,2	40,9±4,7
R1	62,9±6,4*	8,9±2,7*	28,2±8,3*
R2	64,5±6,5*	8,0±3,4*	27,5±4,9*
R3	64,7±6,3*	8,1±2,4*	27,2±7,2*
R4	36,7±3,4	19,2±4,3	44,1±9,4
R5	63,1±8,4*	10,8±7,3*	26,1±8,2*
R6	33,9±5,4	22,5±5,2	43,6±6,4
R7	39,5±4,9	21,7±5,8	38,8±6,2

R8	45,2±9,3	16,6±7,1	38,2±5,7
R9	56,2±9,2*	14,4±7,8	29,4±8,0*
R10	61,9±6,4*	11,4±3,8*	26,7±9,4*
R11	57,2±6,4*	11,9±5,1*	30,9±8,6
R12	63,2±8,3*	6,6±2,1*	30,2±8,7
R13	54,3±8-5,7*	8,4±2,5*	37,3±7,4
R14	52,9±7,4*	14,3±8,1	32,8±7,7
R15	61,2±4,2*	9,1±3,1*	29,7±6,8*

\*P<0,01 – istotne statystycznie różnice w porównaniu z rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktowo-glicerolowym (R0).

Tabela 10. Wyniki oceny kriokonserwowanego nasienia przy pomocy Annexin V Fluos Staining/PI

Rodzaj rozcieńczalnika	Annexin V Fluos Staining/PI			
	plemniki żywe (AnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	plemniki wczesno-apoptotyczne (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )(%)	plemniki późnoapoptotyczne/wczesnonekrotyczne (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )(%)	plemniki nekrotyczne (AnV <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> )(%)
R0	35,2±3,6	20,5±4,8	33,7±6,4	10,6±5,2
R1	60,4±9,3*	7,6±3,2*	25,2±5,2	6,8±1,7
R2	61,9±8,4*	6,9±2,1*	24,6±4,6	5,9±2,1
R3	62,4±5,1*	7,2±2,1*	24,5±3,7	6,6±1,6
R4	34,6±4,6	17,8±3,9	39,4±4,9	8,2±1,9
R5	60,2±8,6*	10,3±2,8*	19,1±7,5*	10,4±3,4
R6	32,3±7,3	19,5±6,8	39,1±4,7	9,1±5,9
R7	37,2±6,3	19,2±5,7	34,7±8,3	8,9±1,5
R8	41,7±9,7	15,9±2,3	34,5±8,3	7,9±1,8
R9	55,8±8,4*	13,6±5,7	20,3±7,5	10,3±4,6
R10	59,2±8,2*	10,8±5,4*	20,0±5,8	10,0±2,2
R11	56,8±8,3*	10,9±3,4*	22,5±6,4	9,8±2,1
R12	61,7±8,7*	5,9±2,2*	23,8±5,2	8,6±1,2
R13	50,9±9,1*	7,3±1,9*	32,4±5,4	9,4±2,6
R14	50,7±8,3*	12,9±3,4	25,2±5,2	11,2±3,7
R15	58,9±7,2*	8,5±1,9*	25,0±6,8	7,6±1,1

\*P<0,01 – istotne statystycznie różnice w porównaniu z rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktowo-glicerolowym (R0).

Tabela 11. Wyniki oceny kriokonserwowanego nasienia przy pomocy metody TUNEL

Rodzaj rozcieńczalnika	Fragmentacja DNA
	TUNEL <sup>+</sup> (%)
R0	2,3±1,1
R1	1,9±0,4
R2	2,1±0,8
R3	1,9±0,7
R4	2,2±0,4
R5	2,4±0,7
R6	1,8±0,5
R7	2,1±0,3
R8	2,3±0,6
R9	1,9±0,1
R10	2,0±0,3
R11	2,2±0,5
R12	1,9±0,1
R13	1,8±0,6
R14	2,4±0,3
R15	2,2±0,7

Tabela 12. Wyniki oceny kriokonserwowanego nasienia przy pomocy fluorochromu JC-1

Rodzaj rozcieńczalnika	JC-1	
	plemniki z wysokim $\Delta Y_m$	plemniki z niskim $\Delta Y_m$
	JC1 <sup>+</sup> (%)	JC-1 <sup>-</sup> (%)
R0	40,6±7,4	59,4±7,4
R1	68,9±5,6*	31,1±5,6*
R2	71,6±8,7*	28,4±8,7*
R3	69,4±6,0*	30,6±6,0*
R4	40,5±6,9	59,5±6,9
R5	63,7±8,8*	36,3±8,8*
R6	40,4±8,5	59,6±8,5
R7	42,7±7,3	57,3±7,3
R8	42,3±6,9	57,7±6,9
R9	61,1±3,9*	38,9±3,9*
R10	64,2±9,4*	35,8±9,4*
R11	60,8±5,3*	39,2±5,3*
R12	74,4±7,1*	25,6±7,1*
R13	71,9±8,7*	28,1±8,7*
R14	51,7±7,6*	48,3±7,6*
R15	70,3±6,2*	29,7±6,2*

\*P<0,01 – istotne statystycznie różnice w porównaniu z rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktowo-glicerolowym (R0).

## 5.2. Ocena *in vivo* zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia knura

### 5. 2. 1. Selekcja rozcieńczalników mrożeniowych

Uzyskane wyniki oceny jakości nasienia kriokonserwowanego w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach pozwoliły na wybór rozcieńczalników, w których stwierdzono najwyższy odsetek plemników ruchliwych (TM%) i plemników z wysokim mitochondrialnym potencjałem transbłonowym (JC-1<sup>+</sup>%) oraz najniższym odsetkiem plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>%), plemników wczesnoapoptotycznych (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>%) oraz plemników żywych z uszkodzonym akrosomem (PNA<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>%). Wykaz rozcieńczalników przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Wykaz wybranych rozcieńczalników mrożeniowych

Rodzaj rozcieńczalnika	Parametry oceny plemników kriokonserwowanych w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach				
	TM (%)	YO-PRO-1 <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> (%)	AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> (%)	PNA <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> (%)	JC-1 <sup>+</sup> (%)
R1	74,8±6,7	8,9±2,7	7,6±3,2	10,5±2,1	68,9±5,6
R2	80,4±5,7	8,0±3,4	6,9±2,1	9,7±2,4	71,6±8,7
R3	78,6±6,5	8,1±2,4	7,2±2,1	10,2±3,3	69,4±6,0
R5	70,8±8,4	10,8±7,3	9,8±2,8	14,8±2,8	63,7±8,8
R9	63,4±7,3	14,4±7,8	13,6±5,7	12,7±3,3	61,1±3,9
R10	68,7±5,9	11,4±3,8	10,8±5,4	13,1±3,1	64,2±9,4
R11	64,7±9,3	11,9±5,1	10,9±3,4	12,7±5,1	60,8±5,3
R12	77,8±6,4	6,6±2,1	5,9±2,2	9,2±1,9	74,4±7,1
R13	75,8±6,7	8,4±2,5	7,3±1,9	11,1±1,5	71,9±8,7
R15	72,6±9,8	9,1±3,1	8,5±1,9	8,7±0,7	70,3±6,2

Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 13 dokonano ponownej selekcji ww. rozcieńczalników mrożeniowych, które przeznaczono do drugiej części doświadczenia. Wybrano tylko te modyfikacje rozcieńczalników mrożeniowych, które spełniają wszystkie następujące kryteria:

- 1) minimum 70% kriooporności ejakulatu obliczanej na podstawie wzoru: całkowita ruchliwość plemników po rozmrożeniu/całkowita ruchliwość plemników w nasieniu świeżym x 100%;
- 2) średni odsetek plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI) oraz wczesnoapoptotycznych (AnV<sup>+</sup>/PI) wynoszący ≤10%;
- 3) średni odsetek plemników żywych z uszkodzoną błoną akrosomalną (PNA<sup>+</sup>/PI) wynoszący ≤10%;
- 4) średni odsetek plemników z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym wynoszący ≥70%.

Do domacicznej inseminacji loszek wybrano nasienie kriokonserwowane w rozcieńczalnikach z dodatkiem: 1,0 mM butylowanego hydroksytoluenu (R2), 0,0005 g mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (R12) oraz 1% roztworu soli sodowej kwasu hialuronowego (R15).

#### **5.2.2. Ocena kriokonserwowanego nasienia użytego do inseminacji loszek**

Nasienie pochodzące od 2 knurów (3 ejakulaty/knura) po procedurze zamrażania i przechowywania w ciekłym azocie przeznaczono do inseminacji 54 loszek. Wyniki oceny jakości nasienia przedstawiono w tabeli 14.

#### **5.2.3. Skuteczność unasienniania loszek nasieniem kriokonserwowanym w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach**

Dane dotyczące skuteczności inseminacji przedstawiono w tabeli 15. Użycie nasienia kriokonserwowanego w rozcieńczalniku z dodatkiem butylowanego hydroksytoluenu o stężeniu 1 mM (R2) oraz soli sodowej kwasu hialuronowego o stężeniu 1% (R15) pozwoliło na uzyskanie skuteczności inseminacji na poziomie 92,8%. Inseminacja nasieniem mrożonym w tych dwóch rozcieńczalnikach o zmodyfikowanym składzie zapewniła uzyskanie wskaźnika wyproszzeń na poziomie 85,7%. Najwyższą liczbę żywych prosiąt w miocie (10,8 prosiąt/loszkę) uzyskano po inseminacji nasieniem kriokonserwowanym w rozcieńczalniku z dodatkiem 1 mM BHT (R2). Średnia masa prosiąt po urodzeniu wynosiła od 1,56 do 1,63 kg i nie stwierdzono różnic pomiędzy rodzajem rozcieńczalnika mrożeniowego użytego do inseminacji loszek.

Tabela 14. Ocena jakości nasienia użytego do inseminacji loszek

Rodzaj rozcień- czalnika	Ruchliwość (%)		YO-PRO-1/PI (%)				AnnV/PI (%)				FITC-PNA/PI (%)				JC-1 (%)		TUNEL (%)	
	TM	PM	YO-PRO-1 <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup>	YO-PRO1 <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	YO-PRO1 <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	AnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup>	AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	AnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup>	PNA <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup>	PNA <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	PNA <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup>	PNA <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup>	JC-1 <sup>+</sup>	JC-1 <sup>-</sup>	TUNEL <sup>-</sup>	TUNEL <sup>+</sup>	
<b>R0</b>	43,1±	36,5±	37,2±	21,5±	41,3±	34,5±	19,8±	32,5±	13,2±	40,3±	10,9±	48,8±	41,2±	58,8±	2,1±	0,9		
	3,8	4,1	3,2	4,1	2,7	1,2	3,4	4,6	2,2	5,1	2,5	5,8	5,7	5,7				
<b>R2</b>	81,2±	77,5±	72,9±	8,1±	19,0±	60,8±	6,3±	22,8±	10,1±	75,3±	9,1±	15,6±	73,8±	26,2±	1,9±	0,3		
	3,2	3,6	5,4	0,9	3,3	3,3	1,9	2,4	2,8	6,9	2,1	3,6	6,9	6,9				
<b>R12</b>	76,1±	71,8±	69,8±	6,1±	24,1±	61,0±	5,3±	22,1±	11,6±	71,2±	9,0±	20,8±	70,1±	29,9±	1,8±	0,3		
	4,7	2,2	1,3	1,4	2,2	5,8	1,9	2,8	3,2	5,3	1,4	3,3	5,8	5,8				
<b>R15</b>	73,1±	67,9±	68,5±	8,9±	22,6±	65,3±	8,2±	17,5±	9,0±	67,4±	8,5±	24,1±	69,3±	30,7±	2,2±	0,3		
	2,1	3,8	3,5	0,6	2,9	5,1	1,5	3,2	1,2	5,4	1,1	2,7	4,8	4,8				

Tabela 15. Wskaźniki rozrodcze loszek inseminowanych nasieniem kriokonserwowanym

Wskaźniki rozrodcze	Rodzaj rozcieńczalnika mrożeniowego			
	RO	R2	R12	R15
Liczba inseminowanych loszek	12	14	14	14
Liczba ciężarnych loch w 25. dniu po inseminacji – skuteczność inseminacji (%)	7/12(58,3)	13/14 (92,8)*	12/14 (85,7)*	13/14 (92,8)*
Liczba poronień (%)	1/7 (14,2)	1/13 (7,6)	1/12 (8,3)	1/13 (7,6)
Wskaźnik wyproszień (%)	6/12 (50)	12/14 (85,7)*	11/14 (78,6)*	12/14 (85,7)*
Liczba żywych prosiąt w miocie (średnia ± SD)	45 (7,5±0,8)	130 (10,8±1,0)*	113 (10,3±1,4)*	111(9,2±1,5)
Średnia masa prosiąt przy urodzeniu (kg ± SD)	1,62±0,5	1,63±0,3	1,56±0,6	1,61±0,5

## 6. Omówienie wyników

Procedura kriokonserwacji nasienia knura w dużo większym stopniu niż u innych gatunków zwierząt narusza działanie systemu endogennych antyoksydantów i stabilność plazmolemy plemników. W badaniach nad doskonaleniem techniki kriokonserwacji nasienia knura dąży się z jednej strony do poprawy jakości nasienia po procedurze zamrażania-rozmrażania poprzez modyfikację składu rozcieńczalnika mroźniowego, z drugiej strony do wyznaczenia kryteriów selekcji nasienia knurów przeznaczonych do kriokonserwacji. Modyfikację rozcieńczalnika mroźniowego przeprowadzono poprzez wprowadzenie do jego składu komponentów o działaniu antyoksydacyjnym oraz osłaniającym błony plazmatyczne plemników.

Podstawowym parametrem ulegającym zmianom podczas procesu kriokonserwacji jest ruchliwość plemników. Wyniki komputerowej oceny ruchliwości plemników po procedurze zamrażania-rozmrażania wykazały, że zastosowane dodatki do rozcieńczalnika mroźniowego poprawiają ruch całkowity i postępowy plemników w porównaniu ze standardowym rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktozowo-glicerolowym. Analiza wyników ruchliwości plemników kriokonserwowanych w rozcieńczalnikach z dodatkiem wybranych antyoksydantów wykazała statystycznie istotnie wyższy odsetek plemników o ruchu postępowym w rozcieńczalnikach mroźniowych z dodatkiem: butylowanego hydroksytoluenu niezależnie od zastosowanego stężenia; glutationu o stężeniu 5 mM; katalazy o stężeniu 400 IU oraz dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w zastosowanych stężeniach. Wcześniejsze badania przeprowadzone przez Bamba i Cran (1992) oraz Roca i in. (2004) wykazały, że dodatek BHT do rozcieńczalnika mroźniowego w istotny sposób poprawia ruchliwość plemników knura po zamrożeniu-rozmrożeniu. Uzyskane wyniki badań nad wpływem równoczesnej suplementacji rozcieńczalnika mroźniowego dysmutazą ponadtlenkową i katalazą są porównywalne z uzyskanymi przez Roca i in. (2005). W doświadczeniu przeprowadzonym przez Gadea i in. (2005) obserwowano pozytywny wpływ dodatku 1 mM glutationu na ruchliwość plemników po rozmrożeniu, podczas gdy w badaniach własnych efekt taki stwierdzono po uzupełnieniu rozcieńczalnika stężeniem 5 mM. Na podstawie porównania wyników ruchliwości plemników kriokonserwowanych z dodatkiem substancji osłaniających zaobserwowano statystycznie wyższy odsetek plemników o ruchu całkowitym i postępowym w rozcieńczalniku z dodatkiem mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej niezależnie od stężenia oraz 1% soli sodowej kwasu hialuronowego. Badania Peña i in. (2005) również wykazały pozytywny wpływ dodatku 1% HA na ruchliwość plemników knura po rozmrożeniu. Jednak, w badaniach na materiale ludzkim nie stwierdzono związku między dodatkiem HA do rozcieńczalnika mroźniowego a ruchliwością plemników po rozmrożeniu (Sbracia i in., 1997). Uży-



skany w badaniach pozytywny wpływ dodatku związków pochodzenia roślinnego na ruchliwość kriokonserwowanych plemników knura potwierdzają badania Aires i in. (2003) prowadzone na nasieniu buhajów. Autorzy ci stwierdzili jednocześnie wzrost odsetka zacielonych jałówek inseminowanych nasieniem mrożonym w rozcieńczalniku z dodatkiem lecytyny sojowej.

Jedną z przyczyn negatywnego wpływu mrożenia na jakość gamet jest występowanie szoku chładowego, którego konsekwencją są nie tylko obniżenie ruchliwości plemników, ale również zmiany zachodzące w strukturze błon komórkowych. Obniżenie temperatury podczas kriokonserwacji prowadzi do zmian w układzie lipidów białek błonowych a w konsekwencji do destabilizacji błon komórkowych. Dlatego, istotnym elementem badań nad kriokonserwacją nasienia jest opracowanie wiarygodnych metod oceny jakości plemników po rozmrożeniu. Określenie ruchliwości nie stanowi jedynego wyznacznika właściwości biologicznych nasienia. Utrata zdolności zapładniającej przez plemniki nie zawsze musi być związana z dysfunkcją aparatu ruchu. Obniżenie temperatury podczas mrożenia nasienia powoduje formowanie kryształków lodu, wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , co prowadzi do zmian w strukturze akrosomu i egzocytozy jego zawartości (Ozkavukcu i in., 2008).

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 7, dodatek do rozcieńczalnika mrożeniowego substancji osłaniających oraz BHT we wszystkich stężeniach, 5 mM GLU; 400 IU KAT; SOD i KAT niezależnie od zastosowanego stężenia powodował występowanie statystycznie wyższego odsetka plemników z nieuszkodzoną błoną akrosomalną. Wcześniejsze badania przeprowadzone przez Zhang i in. (2009) wykazały pozytywny wpływ lecytyny sojowej na integralność błon akrosomowych kriokonserwowanych plemników knura. Jednocześnie z najnowszych doniesień literaturowych wynika, że dodatek HA do rozcieńczalnika mrożeniowego skutecznie ochronia błony akrosomalne plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi (Qian i in., 2016).

Pomimo intensywnych badań nad apoptozą w ejakulowanych plemnikach nadal istnieje szereg niewyjaśnionych dotąd zagadnień, związanych zwłaszcza z indukcją tego zjawiska na różnych etapach postępowania technologicznego a wartością materiału biologicznego używanego do inseminacji.

Do najczęstszych przejawów transdukcji sygnałów apoptotycznych należą zmiany biochemiczne i biofizyczne zachodzące w komórce obejmujące m.in.: 1) translokację reszt fosfatydyloseryny na powierzchni zewnątrzkomórkowej błony i nieodwracalną utratę asymetrii składu fosfolipidowego, 2) wzrost przepuszczalności plazmolemy dla drobnocząsteczkowych związków, np. fluorochromu YO-PRO-1, 3) spadek transbłonowego potencjału mitochondrialnego oraz 4) fragmentację DNA. Identyfikacja tych zmian w nasieniu świeżym i kriokonserwowanym może stanowić wyznacznik jakości nasienia po rozmrożeniu i kryterium selekcji ejakulatów przeznaczonych do kriokonserwacji.

Zastosowana w badaniach technologia kriokonserwacji nasienia knura indukuje zmiany apoptotyczne plemników niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika mrożeniowego. Jednak, suplementacja rozcieńczalnika wybranymi antyoksydantami lub substancjami osłaniającymi zwiększa kriooporność plemników i pozwala na uzyskanie ich wysokiej jakości po rozmrożeniu. Najniższy odsetek plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) oraz plemników wczesnoapoptotycznych (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) uzyskano w rozcieńczalnikach z dodatkiem 1 mM butylowanego hydroksytoluenu lub 0,0005 g mieszaniny lecytyny sojowej i białek roślinnych. Na podstawie analizy uzyskanych wyników dotyczących dodatku do rozcieńczalnika mrożeniowego dysmutazy ponadtlenkowej i/lub katalazy można stwierdzić, że równoczesne zastosowanie tych dwóch antyoksydantów w ochronie plemników przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu przynosi najlepsze rezultaty. Uzyskano wówczas statystycznie istotnie niższy odsetek plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) i wczesnoapoptotycznych (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym.

Podczas procedury kriokonserwacji w plemnikach dochodzi do dysfunkcji mitochondriów i spadku transbłonowego potencjału mitochondrialnego. Dzięki zastosowaniu fluorescencyjnych cząsteczek lipofilnych, które w prawidłowych plemnikach agregują w mitochondriach tworząc świecące na czerwono/pomarańczowo kompleksy polimerowe, można oceniać aktywność mitochondrialną plemników. Zastosowany w badaniach dodatek 1,0 mM butylowanego hydroksytoluenu pozwala na uzyskanie po rozmrożeniu ponad 70% plemników o wysokim transbłonowym potencjale mitochondrialnym. Podobny odsetek plemników JC<sup>+</sup> wykazano w rozcieńczalnikach z dodatkiem mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (niezależnie od zastosowanego stężenia) oraz 1% soli sodowej kwasu hialuronowego. Badania Qian i in. (2016) potwierdzają pozytywny wpływ HA na aktywność mitochondrialną plemników knura po rozmrożeniu.

Niezależnie od zastosowanego dodatku substancji przeciwdziałających procesom oksydacyjnym lub substancji osłaniających błony komórkowe plemników wykazano, że procedura kriokonserwacji nie indukuje fragmentacji DNA w plemnikach knura. Podobne wyniki na kriokonserwowanym nasieniu knura uzyskali Chanapiwat i in. (2010) a na mrożonym nasieniu buhajów Martin i in. (2004). Fraser i in. (2007) wykazali natomiast, że procedura zamrażania powoduje destabilizację struktury chromatyny, co może być przyczyną wzrostu odsetka plemników knura z fragmentacją DNA.

Na podstawie uzyskanych wyników oceny jakości nasienia kriokonserwowanego w rozcieńczalniku żółtkowo-laktozowo-glicerolowym oraz rozcieńczalnikach z dodatkiem związków o działaniu antyoksydacyjnym lub osłaniającym błony plemników wyznaczono parametry wartości biologicznej nasienia. Do ejakulatów o wysokiej jakości po rozmrożeniu zaliczone te,

u których kriooporność wynosiła minimum 70%, odsetek plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) oraz wczesnoapoptotycznych (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) był  $\leq 10\%$ , odsetek plemników żywych z uszkodzoną błoną akrosomalną (PNA<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) wynosił  $\leq 10\%$  oraz odsetek plemników z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym  $\geq 70\%$ . Wymienione kryteria spełniały ejakulatory kriokonserwowane w rozcieńczalnikach z dodatkiem 1 mM butylowanego hydroksytoluenu; 0,005 g mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej oraz 1% soli sodowej kwasu hialuronowego.

Wykorzystanie kriokonserwowanego nasienia knura do inseminacji jest ograniczone ze względu na niskie zdolności zapładniające plemników po rozmrożeniu (Yeste i in., 2017). Czas przeżywania plemników po rozmrożeniu jest krótki, dlatego zabieg domacicznej inseminacji powinien być wykonany 4–6 godzin przed owulacją (Spencer i in., 2010; Yeste, 2015), a nasienie należy rozmrozić 10–30 minut przed inseminacją (Knox, 2015). W przeprowadzonych przez nas badaniach wykonano domaciczne inseminacje loszek w celu określenia zdolności zapładniających kriokonserwowanego nasienia na podstawie wskaźnika zapładnialności, wskaźnika wyproszeń oraz liczby żywych prosiąt urodzonych w miocie. Po inseminacji loszek nasieniem kriokonserwowanym w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach uzyskano statystycznie istotnie wyższą skuteczność inseminacji oraz wskaźnik wyproszeń w porównaniu z rozcieńczalnikiem żółtkowo-laktosowo-glicerolowym. Porównanie wskaźników rozrodczych loszek po inseminacji nasieniem mrożonym w rozcieńczalnikach o zmodyfikowanym składzie wykazało, że suplementacja rozcieńczalnika 1 mM BHT zapewnia uzyskanie najwyższej liczby żywych prosiąt w miocie. Roca i in. (2004) wykazali związek pomiędzy dodatkiem BHT do rozcieńczalnika mrożeniowego nasienia knura a wzrostem kompetencji rozwijających zarodków do stadium blastocysty.

## 7. Wnioski

Uzyskane wyniki badań pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Opracowanie nowego składu rozcieńczalników mrożeniowych nasienia knura w oparciu o jego suplementację związkami o działaniu antyoksydacyjnym lub osłaniającym błony pozwala na uzyskanie wysokiej jakości plemników po rozmrożeniu.
2. Zastosowane kryteria selekcji ejakulatów oparte na komputerowo wspomaganą analizę ruchliwości plemników oraz fluorescencyjnej ocenie integralności błon akrosomowych i markerów apoptotycznych pozwalają na wybór rozcieńczalnika mrożeniowego zapewniającego najwyższą jakość nasienia knura po zamrożeniu-rozmrożeniu.

3. Najwyższe właściwości kriochronne plemników zapewnia suplementacja rozcieńczalnika mrożeniowego butylovanym hydroksytoluenem o stężeniu 1,0 mM; mieszaniną białek roślinnych i lecytyny sojowej o stężeniu 0,0005 g lub 1% solą sodową kwasu hialuronowego.
4. Weryfikacja zdolności zapładniających kriokonserwowanego nasienia knura wykazała, że inseminacja nasieniem mrożonym w rozcieńczalniku uzupełnionym butylovanym hydroksytoluenem o stężeniu 1 mM pozwala na uzyskanie wysokich wskaźników rozrodczych.

## 8. Piśmiennictwo

- Agarwal A., Nallella K.P., Allamaneni S.S., Said T.M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online*, 8: 616–627.
- Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E. (2003). *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60: 269–279.
- Aitken R.J., Best F.S., Richardson D.W., Djahanbakhch O., Lees M.M. (1982). The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertil. Steril.*, 38: 68–76.
- Aitken R.J., Sutton M., Warner P., Richardson D.W. (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 73: 441–449.
- Anzar M., He L., Buhr M.M., Kroetsch T.G., Pauls K.P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.*, 66: 354–360.
- Askar H.A., Check J.H., Peymer N., Bollendorf A. (1994). Effect of Natural Antioxidants Tocopherol and Ascorbic Acids in Maintenance of Sperm Activity During Freeze-Thaw Process. *Arch. Androl.*, 33: 11–15.
- Bajena M., Iwanina M., Kondracki S. (2013). Wpływ czynników środowiskowych na jakość nasienia knurów inseminacyjnych. *Wiad. Zoot.*, 51, 2: 79–86.
- Bamba K., Cran D.G. (1992). Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fertil.*, 95: 69–77.
- Barranco I., Ortega M.D., Martinez-Alborcia M.J., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. (2013). Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. *Cryobiology*, 67: 299–304.
- Bartosz G. (1998). Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post. Biochem.*, 44: 22–31.
- Beccaglia M., Anastasi P., Luvoni G.C. (2009). Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Vet. Res. Commun.*, 33: 77–80.
- Bedner E., Smolewski P., Amstad P., Darzynkiewicz Z. (2000). Activation of caspases measured *in situ* by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.*, 259: 308–313.

- Beeler C.R. (1981). Controlling cooling rates with a variable vacuum in a Dewar flask. *Cryobiology*, 18: 79–81.
- Berthelot F., Marinat-Botté F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M. (2000). Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. *Cryobiology*, 41: 116–1124.
- Berthelot F., Marinat-Botté F., Perreau C., Locatelli A., Manceau P., Venturi E., Terqui M. (2002). The use of an appropriate vitrification medium allows development of 30% of cryopreserved blastocysts and their birth as live piglets. *Pig News Inf.*, 23: 103–108.
- Blankenberg F.G., Tait J.F., Strauss H.W. (2000). Apoptotic cell death: its implications for imaging in the next millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, 27: 359–367.
- Blom E. (1981). Ocena morfologiczna wad plemników buhaja. I. Zmiany patologiczne plemników w świetle wyników nowych badań [The morphological estimation of the spermatozoa defects of bull II. The proposal of new classification of spermatozoa defects]. *Med. Weter.*, 37: 104–106.
- Boekelheide K., Fleming S.L., Johnson K.J., Patel S.R., Schoenfeld H.A. (2000). Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 225: 105–115.
- Bonde J.P., Ernst E., Jensen T.K., Hjollund N.H., Kolstad H., Henriksen T.B., Scheike T., Giwercman A., Skakkebaek O. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planner. *Lancet*, 10: 1172–1177.
- Borner C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*, 39: 615–647.
- Bryła M., Trzcińska M. (2018). The effect of hydrostatic pressure treatment (HHP on quality of poor boar ejaculates after cryopreservation. 22nd Annual Conference of the European-Society-for-Domestic-Animal-Reproduction (ESDAR). *Reprod. Domest. Anim.*, 53: 114–114.
- Bryła M., Trzcińska M., Smorąg Z. (2017). Effect of sodium hyaluronate (HA) on liquid stored and cryopreserved boar semen. 21st Annual Conference of the European-Society-for-Domestic-Animal-Reproduction (ESDAR). *Reprod. Domest. Anim.*, 52: 74–74.
- Buhr M.M., Fiser P., Bailey J.L., Curtis E.F. (2001). Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl.*, 2: 961–969.
- Bustamante-Filho I.C., Pederzolib C.D., Sgaravattib A.M., Mattosc R.C., Dutra-Filho C.S., Jobim M.I.M. (2006). Activity of glutathione peroxidase and catalase instillation semen during cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 94: 70–73.
- Cameron R.D.A., Lising R., Nagashima H., Blackshaw A.W. (1992). Cryopreservation of cultured and uncultured porcine embryos with glycerol and trehalose. In: *Proceeding 12th International Congress on Pig Vet Soc, The Hague*, 476.
- Casas I., kokoAlthouse G.C. (2013). The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. *Cryobiology*, 66: 69–75.
- Chanapiwat P., Kaeoket K., Tummaruk P. (2010). The Sperm DNA damage after cryopreservation of boar semen in relation to post-thawed semen qualities, antioxidant supplementation and boars effects. *Thai J. Vet. Med.*, 40: 187–193.

- Chang H.Y., Yang X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 821–846.
- Chong A.P., Walters C.A., Weinrieb S.A. (1983). The neglected laboratory test. *J. Androl.*, 4: 280–282.
- Cocero M.J., Espina D.M.S. de la, Aguilar B. (2002). Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. *Biol. Reprod.*, 66: 1244–1258.
- Coetzee K., Kruger T.F., Lombard C.J. (2001). Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum. Reprod.*, 4: 73–82.
- Crabo B., Einarsson S. (1971). Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet. Scand.*, 12: 125–127.
- Dalesman R.F. (1968). A different kind of country. MacMillan Company, New York; ISBN 0-02-072810-7.
- Day J.G., Stacey G.N. (2007). Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Methods in molecular biology*, 368, Humana Press, Totowa, New Jersey, 39–57.
- Denecker G., Vercammen D., Declercq W., Vandebelle P. (2001). Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 356–370.
- Didion B.A., Braun G.D., Duggan M.V. (2013). Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim. Reprod. Sci.*, 137:189–196.
- Dobrinsky J.R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57: 285–302.
- Dukelow W.R., Graham E.F. (1962). Freezing of porcine semen. *J. Anim. Sci.*, 21: 1020–1021.
- Fabian D., Gjørret J.O., Berthelot F., Martinat-Botte F., Maddox-Hyttel P. (2005 a). Ultrastructure and cell death of *in vivo* derived and vitrified porcine blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 155–165.
- Fabian D., Koppel J., Maddox-Hyttel P. (2005 b). Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*, 64: 221–231.
- Fadeel B., Zhivotovsky B., Orrenius S. (1999). All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB J.*, 13: 1647–1657.
- Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cottell D.C., Hyttel P., Ward F.A., Boland M.P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.*, 58: 186–195.
- Fraser L., Dziekońska A., Strzeżek R., Strzeżek J. (2007). Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*, 67: 994–1003.
- Fraser L., Zasiadczyk Ł., Strzeżek J. (2010). Interactions of egg yolk lipoprotein fraction with boar spermatozoa assessed with a fluorescent membrane probe. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 48: 292–298.
- Frączek M., Kurpisz M. (2005). System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 59: 523–534.
- Fujino Y., Ujisato Y., Endo K., Tomizuka T., Kojima T., Oguri N. (1993). Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology*, 30: 299–305.

- Gadea J., Gumbao D., Matás C., Romar R. (2005). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *J. Androl.*, 26: 749–756.
- Gajda B., Smorąg Z. (2000). Survival of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. *Cry-Lett.*, 21: 231–236.
- Gajda B., Smorąg Z. (2003). Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni. *Biotechnologia*, 60: 138–150.
- Gączarzewicz D., Udała J., Błaszczuk B. (2000). Apoptoza komórek gametogenicznych w czasie spermatogenezy. *Med. Weter.*, 56: 639–644.
- Giaretta E., Estrada E., Bucci D., Spinaci M., Rodriguez-Gil J.E., Yeste M. (2015). Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 83: 399–407.
- Gomez-Fernandez J., Gomez-Izquierdo E., Tomas C., Moce E., de Mercado E. (2012). Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 133: 109–116.
- Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.*, 207: 202–205.
- Graham E.F., Rajamannan A.H.J., Schmehl M.K.L., Makilaurilla M., Bower R.E. (1971). Fertility studiem with frozen boar spermatozoa. „AI Digest”, Columbia, 9: 6–7.
- Gross A., Mc Donnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 13: 1899–1911.
- Halicka H.D., Bedner E., Darzynkiewicz Z. (2000). Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 260: 248–255.
- Hayashi S., Kobayashi K., Mizuno J., Saitih K., Hirano S. (1989). Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Record.*, 125: 43–44.
- Hess E.A., Teague H.S., Ludwick T.M., Martig R.C. (1957). Swine can be bred with frozen semen. *Ohio Fm. Home Res.*, 42: 100.
- Holt W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 3–22.
- Idziorek T., Estaquier J., Bels F. de, Ameisen J.C. (1995). YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods*, 185: 249–258.
- Kameyama K., Takedomi T., Itakura H., Onihara T. (1990). Effect of lecithin on cryopreservation of porcine embryos. *Proc.: The 78th Annals Conference Japan Society Animal Reproduction*, 22 pp.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, 26: 239–257.
- Klimowicz M., Niżański W., Savic M.A., Zbyryt I., Dubiel A. (2005). Evaluation of dog semen quality using a conventional microscopic method, flow cytometry and HTM IVOS computer sperm quality analyzer. *Med. Weter.*, 61: 1250–1255.
- Knox R.V. (2015). The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reprod. Domest.*, 50: 90–97.

- Krueger C., Rath D. (2000). Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reprod. Fertil. Dev.*, 12: 113–117.
- Krueger C., Rath D., Johnson L.A. (1999). Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*, 52: 1363–1373.
- Lee J., Richburg J.H., Younkin S.C., Boekelheide K. (1997). The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, 138: 2081–2088.
- Leibo S.P., Songsasen N. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57: 303–326.
- Liebermann J., Nawroth F., Isachenko V., Isachenko E., Rahimi G., Tucker M.J. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.*, 67: 1671–1680.
- Lin W.W., Lamb D.J., Wheeler T.M., Lipshultz L., Kim E.D. (1997). *In situ* end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil. Steril.*, 68: 1065–1069.
- Malo C., Gil L., Gonzalez N., Martínez F., Cano R., Blas I. de, Espinosa E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61: 142–147.
- Marchetti C., Gallego M., Defossez A., Formstecher P., Marchetti P. (2004). Staining of human sperm with urochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. *Hum. Reprod.*, 19: 1127–1134.
- Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R. (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.*, 71: 28–37.
- Martin G., Cagnon N., Sabido O., Sion B., Grizard G., Durand P., Levy R. (2007). Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 22: 380–388.
- Masoudi R., Sharafi M., Zareh Shahneh A., Towhidi A., Kohram H., Esmaeili V., Shahverdi A., Davachi N.D. (2016). Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*, 73:69–72.
- Max A. (2017). Biotechnologia rozrodu w ratowaniu zagrożonych gatunków zwierząt. *Życie Wet.*, 92: 105–108.
- Maxwell W.M.C., Johnson L.A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48: 209–219.
- Mazur P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, *J. Gen. Physiol.*, 47: 347–369.
- Nagashima H., Kato Y., Yamakawa H., Ogawa S. (1988). Survival of pig hatched blastocysts expose below 15°C. *Jpn J. Anim. Reprod.*, 34: 123–131.
- Nagata S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.*, 256: 12–18.
- Nakamura K., Bossy-Wetzel E., Burns K., Fadel M.P., Lozyk M., Goping I.S., Opsa M., Bleackley R.C., Green D.R., Michalak M. (2000). Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J. Cell Biol.*, 150: 731–740.



- Nekoonam S., Nashtaei M.S., Zangi B.M, Amidi F. (2016) Effect of Trolox on sperm quality in normozoospermia and oligozoospermia during cryopreservation. *Cryobiology* 72: 106–111.
- Niimura S., Ishida K. (1980). Histochemical observation of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. *J. Anim. Reprod.*, 26: 46–49.
- Niwińska A. (2016). Przegląd metod kriokonserwacji pod kątem techniki witrifikacyjnej. *Życie Wet.*, 91: 505–508.
- Niżański W. (2006). Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*, 66: 470–483.
- Ochota M., Niżański W. (2018). Effect of vitrification on apoptotic changes in feline embryos. *Czech J. Anim. Sci.*, 63: 144–151.
- Oosterhuis G.J., Mulder A.B., Kalsbeek-Batenburg E., Lambalk C.B., Schoemaker J., Vermes I. (2000). Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil. Steril.*, 74: 245–250.
- Ozkavucu S., Erdemli E., Isik A., Oztuna D., Karahuseyinoglu S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 25: 403–411.
- Partyka A., Niżański W., Łukaszewicz E. (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*, 74: 1019–1027.
- Patel H., Siddiquee G. M., Chaudhari D.V., Suthar V.S. (2016). Effect of different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability (-196°C) of buffalo semen. *Vet. World.*, 9: 299–303.
- Pegg D.E. (1972). *Cryobiology Proceedings of the Fourth International Cryogenic Engineering Conference, Eindhoven; IPC Science and Technology Press, Guilford, UK, pp. 47–54.*
- Peña F.J., Johannisson, A., Wallgren M., Rodriguez Martinez H. (2003). Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.*, 78: 85–98.
- Peña F.J., Saravia F., Johannisson A., Walgren M., Rodriguez-Martinez H. (2005). A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *J. Androl.*, 28: 107–114.
- Pokrywka K., Ruda M., Augustyńska-Prejsnar A. (2001). Kształtowanie się wybranych cech ejakulatów knurów ras matecznych w zależności od pory roku i odstępu między pobieraniem nasienia. *Prz. Hod.*, 8: 13–15.
- Polge C. (1957). Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 147: 498–508.
- Polge C., Salomon S., Wilmut I. (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.*, 87: 424.
- Polge C., Wilmut I., Rowson L.E.A. (1974). The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiology*. 11: 560.
- Pollack M., Leeuwenburgh C. (2001). Apoptosis and aging: Role of the mitochondria. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 56: 475–482.
- Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Harnos A., Szenci O. (2006). Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18: 162–163.

- Print C.G., Loveland K.L. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*, 22: 423–430.
- Pursel V.G., Johnson L.A. (1971). Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *US. Dept. Agric. ARS*, 44: 227.
- Pursel V.G., Johnson L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40: 99–102.
- Pursel V.G., Park C.S. (1988). Duration of thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5 ml maxi-straws. *Theriogenology*, 28: 683–691.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. (1972). Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, 34: 278–83.
- Qian L., Yu S., Zhou Y. (2016). Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *Int. J. Biol. Macromol.*, 87: 287–289.
- Rath D. (2002). Low dose insemination in the sow – a review. *Reprod. Domest. Anim.*, 37: 201–205.
- Roca J., Gil M.A., Hernandez M., Parrilla I., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.*, 25: 397–405.
- Roca J., Rodríguez M.J., Gil M.A., Carvajal G., Garcia E.M., Cuello C., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2005). Survival and *in vitro* fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.*, 26: 15–24.
- Rodriguez I., Ody C., Araki K., Garcia I., Vassalli P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.*, 16: 2262–2270.
- Rojas C., Palomo M.J., Albarracín J.L., Mogas T. (2004). Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology*, 49: 211–220.
- Ron-El R., Nachum H., Herman A., Golan A., Caspi E., Soffer Y. (1991). Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil. Steril.*, 55: 338–344.
- Ryu E.K., Yong Soo Hur Y.S., Ann J.Y., Maeng J.Y., Park M., Park J.H., Yoon J., Yoon S.H., Hur Ch. J., Lee W.D., Lim J.H. (2012). Vitrification of mouse embryos using the thin plastic strip method. *Clin. Exp. Reprod. Med.*, 39: 153–160.
- Said T.M., Agarwal A., Sharma R.K., Mascha E., Sikka S.C., Thomas A.J. (2004). Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. *Fertil. Steril.*, 82: 871–877.
- Saravia F., Wallgren M., Rodríguez-Martínez H. (2010). Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. *Anim. Reprod. Sci.*, 117: 279–287.
- Satorre M.M., Breininger E., Beconi M.T. (2012). Cryopreservation with  $\alpha$ -tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*, 78: 1548–1556.
- Sbracia M., Grasso J., Sayme N., Stronk J., Huszar G. (1997). Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 12: 1949–1954.

- Shafiei M., Forouzanfar M., Hosseini S.M., Esfahani M.H. (2015). The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat semen. *Theriogenology*, 83: 1321–1327.
- Shimazaki M., Sambuu R., Sato Y., Kim Do L.T., Tanihara F., Taniguchi M., Otoi T. (2015). Effects of orvus es paste on the motility and viability of yak (*Bos grunniens*) epididymal and ejaculated spermatozoa after freezing and thawing. *Cryo Letters*, 36: 264–269.
- Silva P.F., Gadella B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm. *Theriogenology*, 65: 958–978.
- Silber S.J., Barbey N., Lenahan K., Silber D.Z. (2013). Applying clinically proven human techniques for contraception and fertility to endangered species and zoo animals: a review. *J. Zoo Wildl. Med.*, 44: 111–122.
- Spencer K.W., Purdy P.H., Blackburn H.D., Spiller S.F., Stewart T.S., Knox R.V. (2010). Effect of number of motile, frozen-thawed boar sperm and number of fixed-time inseminations on fertility in estrous-synchronized gilts. *Anim. Reprod. Sci.*, 121: 259–266.
- Strzeżek J., Głogowski J., Hopfer E., Wojtkiewicz K. (1985). Kortowska metoda zamrażania nasienia knura. *Med. Weter.*, 41: 349–353.
- Thornberry N.A., Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312–1316.
- Trzcińska M., Bryła M. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology* 83: 307–313.
- Trzcińska M., Bryła M. (2016). Zastosowanie butylowanego hydroksytoluenu w krio-konserwacji nasienia knura. *Rocz. Nauk. PTZ*, 12: 21–28.
- Trzcińska M., Bryła M., Gogol P., Cegła M. (2013). Kriokonserwacja nasienia knura, Wyd. IZ PIB, ss. 1–12.
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2007). Relationship between boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and motility following storage at 15°C. *Reprod. Domest. Anim.*, 42: 6.
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2008). Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *J. Anim. Feed Sci.*, 17: 372–380.
- Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61: 357–364.
- Vajta G., Booth P.J., Holm P., Greve T., Callesen H. (1997). Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryo-Lett.*, 18: 191–195.
- Varo-Ghiuru F., Miclea I., Hettig A., Ladoși I., Miclea V., Egerszegi I., Zăhan M. (2015). Lutein, trolox, ascorbic acid and combination of trolox with ascorbic acid can improve boar semen quality during cryopreservation. *Cryo-Lett.*, 36: 1–7.
- Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 182: 1597–1601.
- Visser D., Salamon S. (1974). Effect of composition of tris based diluent on survival of boar spermatozoa following deep-freezing. *Aust. J. Biol. Sci.*, 27: 485.

- Wang P., Wang Y.F., Wang C.W., Bu S.H., Hu J.H., Li Q.W., Pang W.J., Yang G.S. (2014). Effects of low-density lipoproteins extracted from different avian yolks on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. *Zygote*, 22: 175–181.
- Westendorf P., Richter L., Treu H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren. *Dtsch Tierärztl. Wschr.*, 82: 261–267.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 178: 411–414.
- Wilczyńska E., Kondracki S., Wysokińska A., Kowalewski D., Gajownik K. (2013). Jakość nasienia knurów ras wbp, pbz, duroc i pietrain w poszczególnych miesiącach roku. *Rocz. Nauk. PTZ*, 9: 49–56.
- Wysokińska A., Kondracki S., Banaszewska D. (2005). Wpływ pory roku na cechy fizyczne ejakulatu knurów mieszańców duroc x pietrain i hampshire x pietrain oraz czysto rasowych knurów duroc, hampshire i pietrain. *Rocz. Nauk. PTZ*, 3: 535–544.
- Yang J., Liu X., Bhalla K. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275: 1129–1136.
- Yeste M. (2015). Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives. *Reprod. Domest. Anim.*, 50: 71–79.
- Yeste M., Rodríguez-Gil J.E., Bonet S. (2017). Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 8: 802–813.
- Yoshida M. (2000). Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61: 349–355.
- Zeng C., tang K., He L., Peng W., Ding L., Fang D., Zhang Y. (2014). Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, 68: 395–404.
- Zhang W., Yi K., Chen C., Hou X., Zhou X. (2012). Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 132: 123–128.
- Zhang S., Hu J., Li Q., Jiang Z., Zhang X. (2009). The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *Afr. J. Biotechnol.*, 8: 6476–6480.
- Zhu Z., Fan X., Lv Y., Zhang N., Fan C., Zhang P., Zeng W. (2015) Vitamin E Analogue Improves Rabbit Sperm Quality during the Process of Cryopreservation through Its Antioxidative Action. *PLoS ONE* 10 (12): e0145383. doi:10.1371/journal.pone.0145383.

# **DIRECTIONS AND POSSIBILITIES OF MODIFICATION OF CRYOPRESERVATION METHODS AND ASSESSMENT OF BOAR SEMEN QUALITY**

## **Summary**

Cryopreservation of boar semen plays a very important role in protecting animal genetic resources with a particular breeding value. This method also allows for keeping biodiversity by collecting and storing material with unique functional and adaptive features. It mainly concerns native breeds and highly effective breeds which are endangered because of an intensive selection or animal disease epidemic.

In Department of Reproductive Biotechnology and Cryoconservation in recent years research has been done on the modification of the composition of freezing extender, the method of handling boar semen during a freezing procedure. There is also complex coverage and reliable methods of semen assessment before and after freezing procedure.

The aim of the research was a modification of freezing extender. It was based on the addition of substances which suppress the sperm oxidative damage or substances that protect to cryogenic damage. At the same time in research there was used apoptotic markers to define new criteria for the selection of semen for cryopreservation and assessing the quality of frozen-thawed boar semen.

The lowest percentage of live sperm with damaged acrosome was found in extender with the addition of 1,0 mM butylated hydroxytoluene (BHT). Statistically, the lowest percentage of apoptotic sperm was in extender supplemented with BHT regardless of applied concentration. No differences were observed in sperm DNA fragmentation between control extender and different variants of freezing extenders.

Cryopreservation of semen with the use of extender with addition of 1,0 mM BHT and 1% hyaluronic acid led to obtaining effective insemination up to 92,8%. Surgical intaruterine insemination with frozen-thawed semen cryopreserved in these extenders of modified composition ensured the reproductive performance of 85,7%. The highest number of piglets was born after insemination with semen cryopreserved in extender supplemented with 1,0 mM BHT.

The verification of sperm fertilizing ability showed that insemination with freezing semen in extender containing 1,0 mM BHT allows getting high reproductive performance.