

BADANIA NAD SKŁADEM ROZCIĘNCZALNIKA DO MROŻENIA NASIENIA
KNURA. III. WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE PLEMNIKÓW KNURA PO
ZAMROŻENIU W DWÓCH UKŁADACH ROZCIĘNCZALNIKÓW*

Jerzy Strzeżek, Jan Glogowski, Jadwiga Śmigielka,
Krystyna Świdowicz

Zakład Biochemii Zwierząt Instytutu Fizjologii
i Biochemii Zwierząt Akademii Rolniczo-Technicznej
w Olsztynie

Opracowane w ostatnim okresie, przez wielu autorów, technologie zamrażania nasienia knura różnią się między sobą składem stosowanych rozcieńczalników, sposobem rozcieńczania nasienia i jego glicerynizacji, czasem schładzania do temperatury 278 K oraz koncentracją plemników w nasieniu poddawanemu zamrożeniu [2, 4, 7, 9, 11].

Zróznicowane efekty końcowe stosowanych technologii, określone ruchliwością plemników i stopniem ich uszkodzenia po rozmrożeniu, wykazały, że obecna w plazmie nasienia knura duża ilość białek zasadowych, wydzielanych przez gruczoły pęcherzykowe, uczuła plemniki na udary chłodowe [1, 5, 8, 10]. Obniżenie temperatury nasienia knura poniżej 283 K wpływa destrukcyjnie na

*Praca została wykonana w ramach problemu resortowego 419E Ministerstwa Rolnictwa, koordynowanego przez Instytut Zootechniki w Krakowie.

błony plazmatyczne plemników [12]. Wymienione aspekty zmian kriogennych w plemnikach knura spowodowały podjęcie badań nad sposobami wyeliminowania z plazmy nasienia białek zasadowych, zwłaszcza podczas wstępnych etapów technologii zamrażania. Prace Moore i wsp. [6] wskazały, że vesiculektomia knura wprawdzie powoduje zanik puli białek zasadowych w plazmie, ale w zasadzie nie wpływa w istotny sposób na polepszenie wartości biologicznej nasienia po rozmrożeniu w porównaniu do prób nasienia zamrażanego, pochodzącego od knurów normalnych.

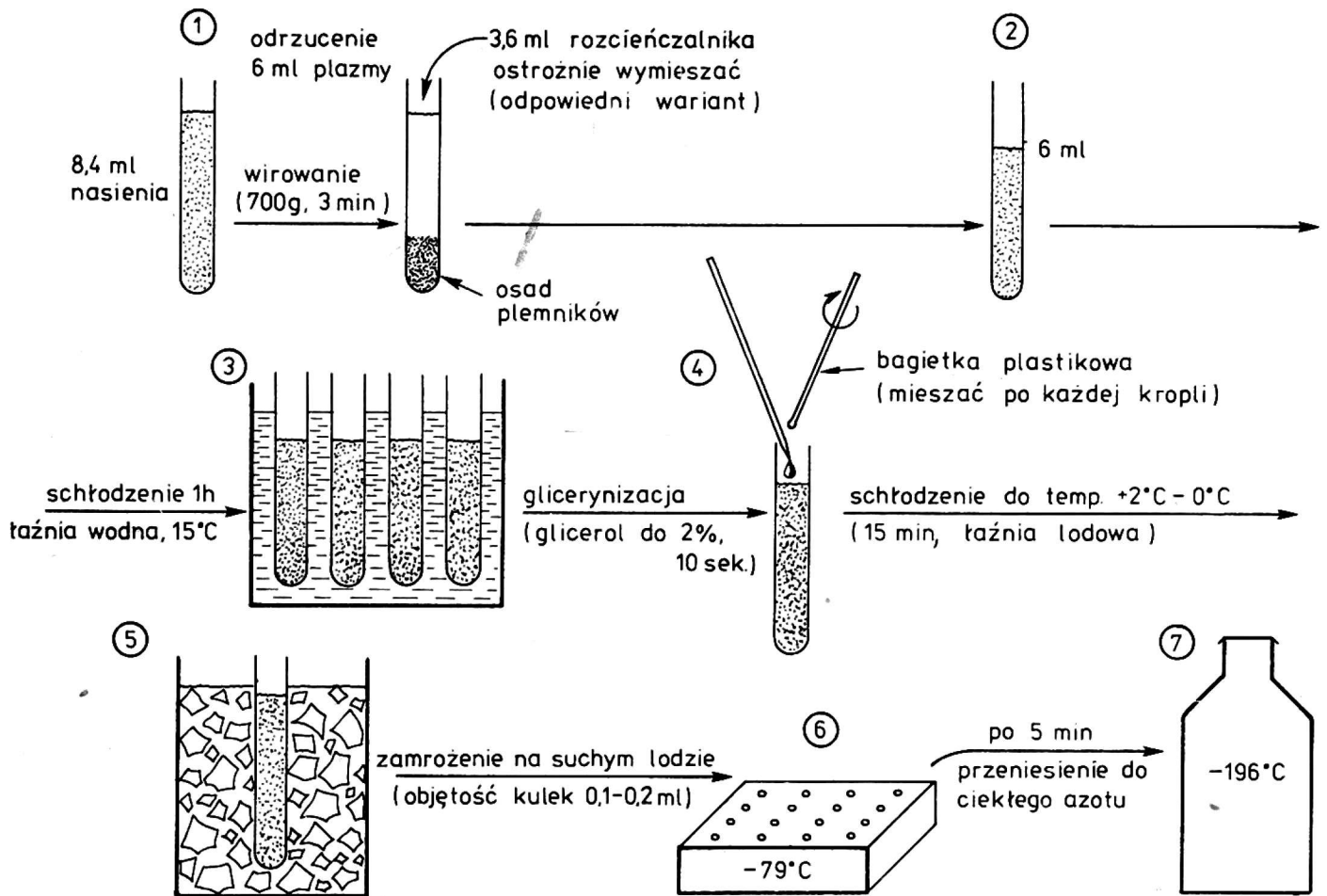
W naszych badaniach stwierdziliśmy, że białka plazmy nasienia większości knurów przejawiają precypitujące właściwości w stosunku do lipoprotein żółtka jaja kurzego. Zjawisko to stanowić może jedną z przyczyn zmian kriogenicznych plemników knura [3].

Opierając się na rezultatach naszych, wcześniej przedstawionych badań, podjęliśmy obserwacje, które miały na celu określenie zmian kriobiochemicznych plemników knura w różnych etapach opracowanej przez nas technologii zamrażania nasienia, z jednoczesnym uwzględnieniem różnic osobniczych oraz właściwości dwóch zastosowanych rozcieńczalników.

MATERIAŁ I METODY

Do badań używano bogatej w plemniki frakcji ejakulatów, pobieranych metodą manualną od 15 knurów użytkowanych w fermie tu-
czu przemysłowego w Knopinie. Po ocenie makro- i mikroskopowej ejakulatory wykazujące co najmniej 60% ruchliwych plemników przeznaczano do zamrażania.

Opracowano własną metodykę postępowania, przedstawioną schematycznie na rysunku 1.



Rys. 1. Etapy postępowania technologicznego w trakcie zamrażania nasienia knura

Obejmuje ona kilka specyficznych etapów:

- 1) Zagęszczanie nasienia, mające jednocześnie na celu obniżenie zawartości białek precypitujących żółtko jaja kurzego ;
- 2) Rozcieńczenie nasienia odpowiednim wariantem rozrzedzalnika;
- 3) Schłodzenie rozcieńczonego nasienia do temperatury 288 K ;
- 4) Glicerynicacje prób ;

5) Ekwilibracje na łaźni wodnej (obniżenie temperatury nasienia do 275 - 273K) ;

6) Zamrażanie prób w temperaturze suchego lodu;

7) Przeniesienie prób do ciekłego azotu.

Zastosowano układy rozcieńczalników o następującym składzie chemicznym:

I. Rozcieńczalnik wg Salamon i Visser [13] jako układ kontrolny

Tris	- 3,4 g
Fruktoza	- 1,999 g
EDTA- Na_2	- 1,1167 g
Kwas cytrynowy	- 1,670 g
H_2O dest. do 100 ml	(pH = 7,2-7,4)

Do 83 ml tak przygotowanego rozcieńczalnika dodawano 15 ml żółtka jaja kurzego, a następnie 2 ml glicerolu w momencie zaznaczonym schematycznie na rysunku 1.

II. Rozcieńczalnik wg Salamon i Visser z dodatkiem kofeiny do stężenia 10 mM (na 100 ml rozcieńczalnika 0,1942 g kofeiny).

III. Rozcieńczalnik o podstawowym składzie podanym w pkt. II, w którym żółtko jaja kurzego zastąpiono połączeniem liofilizowanych frakcji białkowych plazmy nasienia (I frakcja) oraz żółtka jaja kurzego (I + II frakcja) o końcowym stężeniu białka 30 mg/ml (tzn. po 10 mg każdej frakcji na ml rozcieńczalnika).

Rozcieńczenia nasienia dokonywano po uprzednim doprowadzeniu obu układów do temperatury 303 K. Nasienie rozmrażano na łaźni wodnej o temperaturze 310 K.

Zarówno przed rozcieńczeniem, jak również w poszczególnych etapach technologii zamrażania pobierano próby do analiz bio-

chemicznych. Dotyczyły one:

1) Oznaczania aktywności aminotransferazy asparaginianowej (GOT), hialuronidazy (HD), akrosyny, inhibitorów akrosynowych w płynach po odwirowaniu nasienia, według uprzednio opisanych przez nas metod [15].

Wymieniony zakres analizowanych wskaźników służył do oceny stanu błon plazmatycznych plemników w poszczególnych etapach zamrażania nasienia.

2) Określenia wartości współczynników oddychania plemników (ZO_2) oraz zmian zawartości ATP w tych komórkach.

Wymienione analizy stanowiły obok badań nasienia ruchliwości plemników wskaźnik oceny przebiegu metabolizmu podczas zamrażania nasienia.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Jednym z podstawowych kryteriów oceniających praktyczną przydatność technologii zamrażania nasienia knura jest stopień nasilenia ruchliwości plemników po rozmrożeniu prób. W przeprowadzonych badaniach wartości omawianego wskaźnika dla 60 ejakulatów, poddanych technologii zamrażania według opracowanej przez nas metody, zawierały się w granicach od 15% do 40%. Wskazywać to może na poprawność postępowania technologicznego. Najmniej wyraźnie zaznaczonymi wahaniami ruchliwości plemników po rozmrożeniu charakteryzowały się próby nasienia z zastosowaniem rozcieńczalnika z dodatkiem 10 mM kofeiny (rozcieńczalnik II).

Przedstawione przez nas w latach ubiegłych wyniki obserwacji, dotyczących zmian kriobiochemicznych plemników buhaja, try-

ka i knura, wykazały, że w nasieniu knura mechanizmy stabilizacji struktur plemników podczas zamrażania nasienia są szczególnie zachwiane [15, 16].

Technologia zamrażania wg Salamon [14], którą zastosowaliśmy w badaniach, oparta była na 1,5-godzinnej ekwilibracji plemników w temperaturze 278K w obecności 2% glicerolu. Etap ten okazał się najbardziej destrukcyjnie oddziałujący na struktury plemników knura. Obserwowano bowiem obok naruszenia syntezy ATP, intensywny wyciek enzymów wstawkowych oraz akrosomowych z jednoczesnym zanikiem aktywności fosfatazy kwaśnej, zlokalizowanej na błonie plemnika. Zmianom tym towarzyszyła w większości przypadków utrata ruchliwości plemników po rozmrożeniu.

Rezultaty wymienionych badań zwróciły uwagę na potrzebę wprowadzenia istotnych zmian technologicznych, zwłaszcza podczas ekwilibracji nasienia knura.

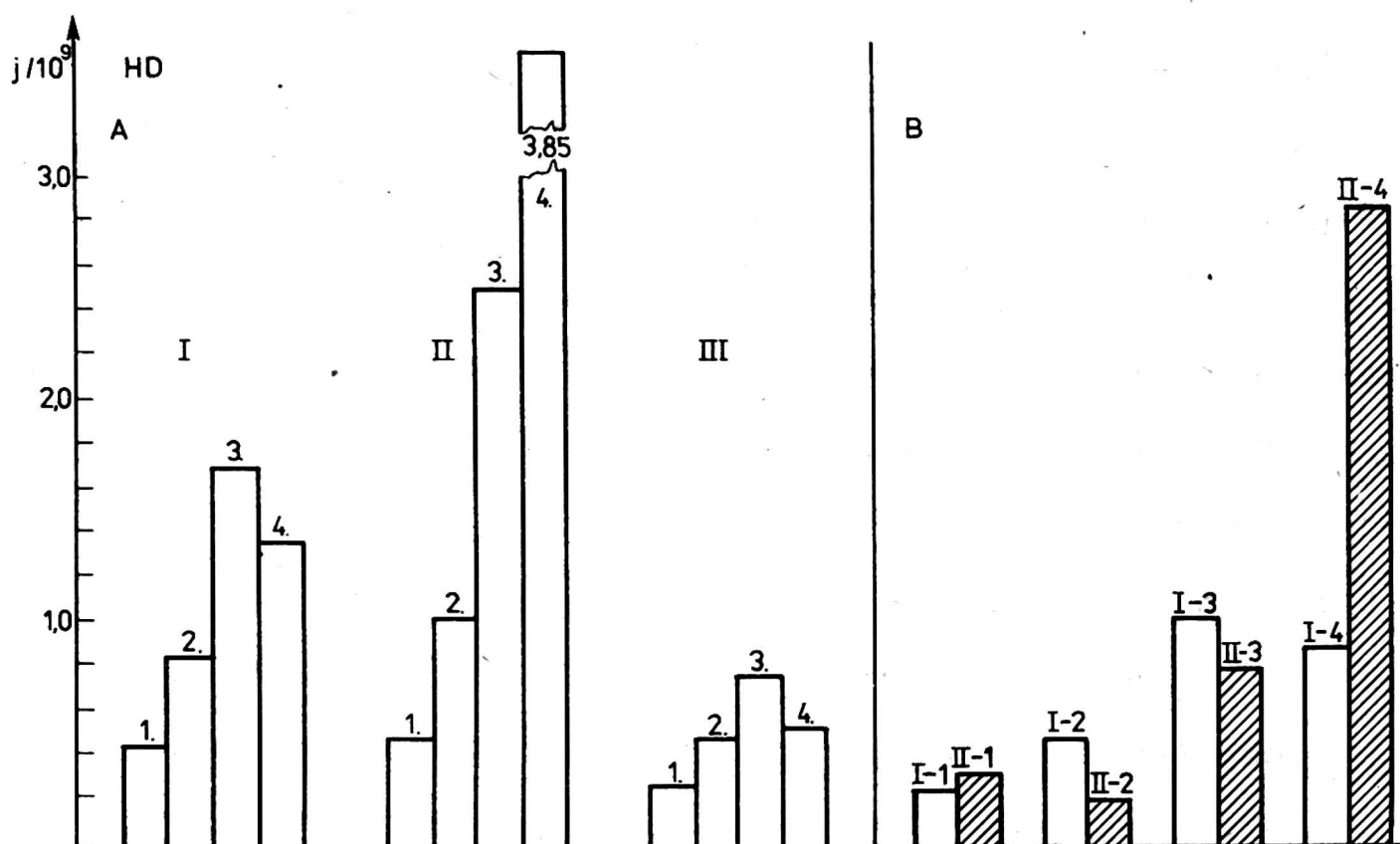
Etap ten, wyraźnie zmodyfikowany w zastosowanej przez nas technologii, poprzedzony został szeregiem czynności przygotowawczych, związanych z odrzuceniem większości białek plazmowych oraz wprowadzeniem do podgęszzonego nasienia rozcieńczalnika z dodatkiem kofeiny jako czynnika stabilizującego błony komórkowe oraz modulującego metabolizm nukleotydów wysokoenergetycznych w plemnikach. Główną intencją takiego postępowania było stworzenie okrywającego plemniki „płaszczka” lipoproteinowego z żółtka jaja kurzego, chroniącego błony plazmatyczne plemnika przed udarem chłodowym. Jak zaznaczyliśmy w poprzednim naszym opracowaniu [3], ze względu na właściwości precypitujące białek plazmy nasienia większości knurów, uzyskanie takiego układu fizykochemicznego w przypadku tego gatunku zwierząt jest niezwy-

kle trudne i właściwie osobniczo uwarunkowane. Spowodowało to, że w próbach mrożeniowych zastosowano dwa warianty zmodyfikowanych rozcieńczalników Salamona.

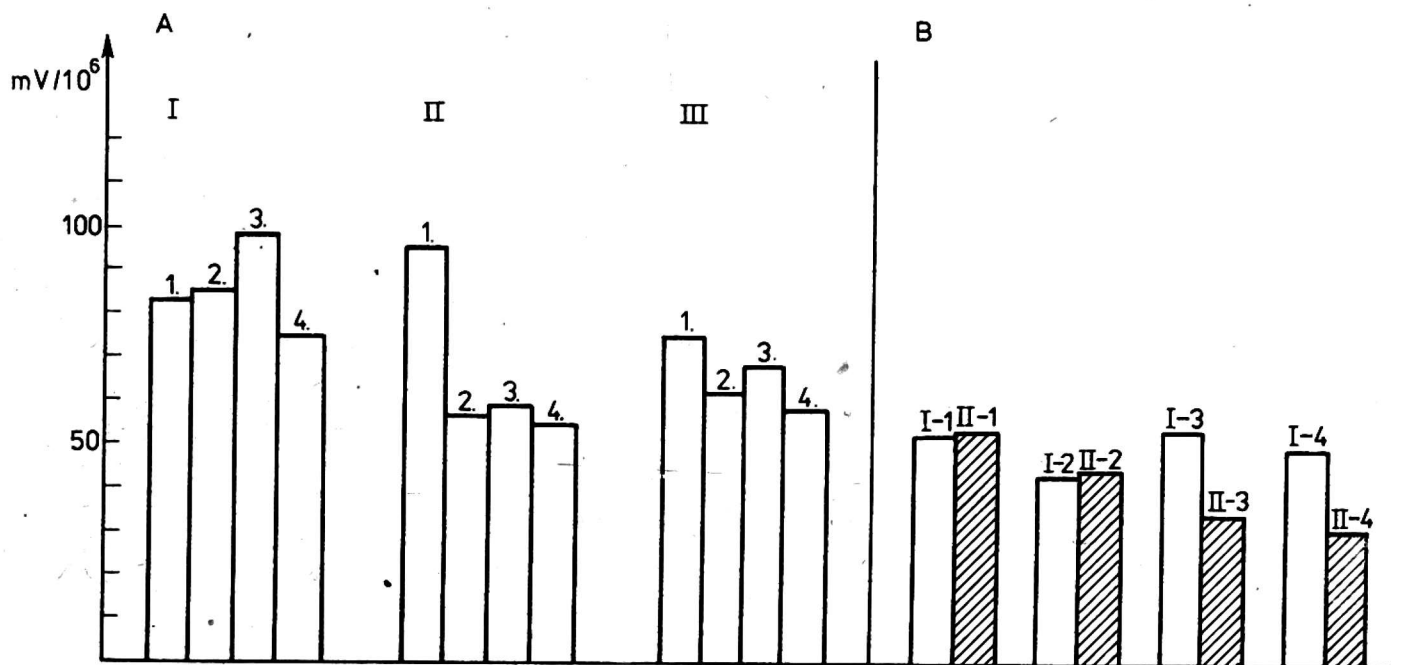
Również sposób gliceryniczacji nasienia istotnie różni się od metod dotychczas stosowanych. Wydawało się nam bowiem, że kontakt plemników z tym krioprotektorem powinien być jak najkrótszy ze względu na jego bezpośredni negatywny wpływ na stabilność struktur plemników oraz powodowanie stymulacji ich metabolizmu podczas wydłużonego czasu ekwilibracji nasienia w temperaturze 288 K.

Obok badań ruchliwości plemników po rozmrożeniu, przeprowadziliśmy ocenę postępowania technologicznego na podstawie zmian kriobiochemicznych w tych komórkach na podstawowych etapach technologii, tj. przed rozcieńczeniem, po rozcieńczeniu nasienia, po ochłodzeniu i 15 min. ekwilibracji z glicerolem oraz po rozmrożeniu prób.

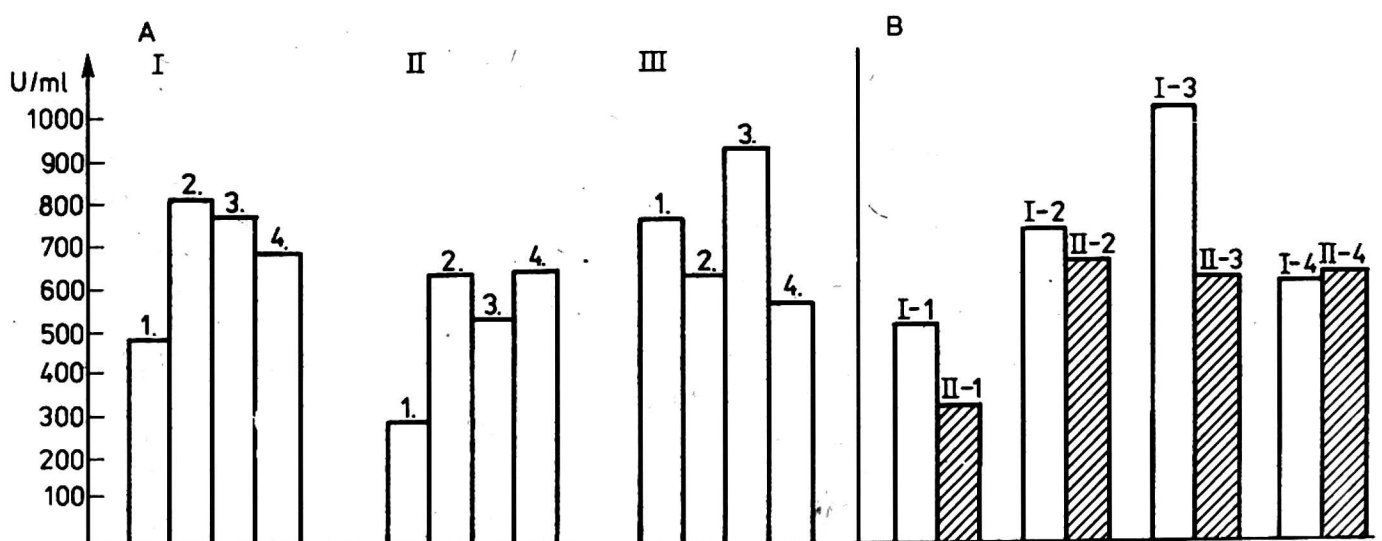
Spośród struktur plemnika najbardziej czułymi na technologię zamrażania są akrosom i mitochondria. Biochemicznym kryterium stanu tych struktur jest intensywność uwalniania do środowiska zewnątrzkomórkowego specyficznych układów enzymatycznych. Nasilenie „wycieku” akrosyny, inhibitorów akrosynowych oraz hialuronidazy charakteryzuje stan akrosomu plemników. Jak wynika z rezultatów naszych analiz (rys. 2, 3, 4), w przypadku stosowania zmodyfikowanych wariantów rozcieńczalnika Salamona (II i III) obserwuje się zjawisko stabilizowania wewnętrznej struktury akrosomu na poszczególnych etapach technologicznych. Wyraźny efekt ochraniający w odniesieniu do omawianej struktury daje się zauważyć w przypadku stosowania rozcieńczalnika z dodatkiem 10 mM



Rys. 2. Uwalnianie hialuronidazy z plemników knura podczas zamrażania nasienia w różnych wariantach rozcieńczalników; A - ejakulatory knurów, których plazmy nasienia precypitują żółtko jaja kurzego, B - ejakulatory knurów, których plazmy nasienia nie precypitują żółtka jaja kurzego; I - rozcieńczalnik kontrolny, II - rozcieńczalnik z dodatkiem 10 mM kofeiny, III - rozcieńczalnik z kompozycją liofilizowanych frakcji żółtkowo-plazmowych oraz 10 mM kofeina; 1 - przed rozcieńczeniem nasienia, 2 - po rozcieńczeniu nasienia, 3 - po schłodzeniu, glicerynizacji oraz 15 min. ekwilibracji nasienia, 4 - po rozmrożeniu w temp. 310 K



Rys. 3. Aktywność akrosyny po łagodnej, octanowej ekstrakcji plemników jako wskaźnik stanu wewnętrznej błony akrosomu podczas etapów technologii zamrażania nasienia knura. Objasnienia jak na rysunku 2.



Rys. 4. Aktywność inhibitorów akrosomowych w płynach nadosadowych w poszczególnych etapach technologii zamrażania nasienia knura. Objasnienia jak na rysunku 2.

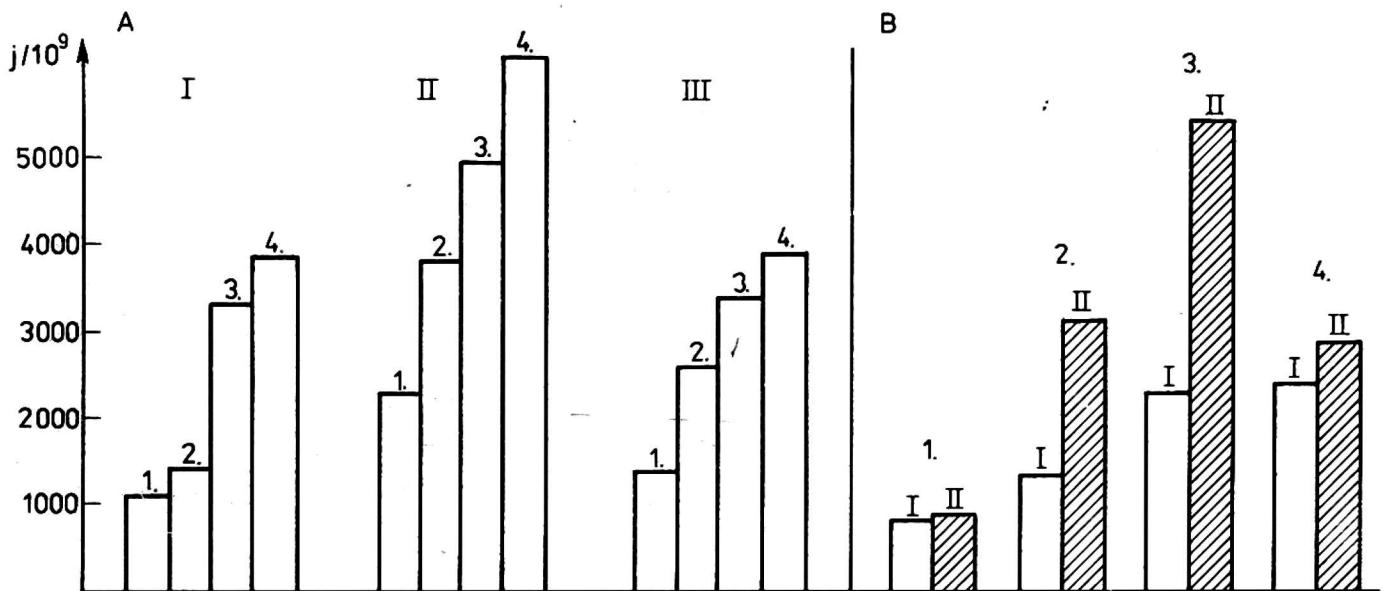
kofeiny (rys. 3, 4 pkt II). Również oddziaływanie ochraniające wyselekcjonowanych frakcji żółtkowych (livetin + phosvitin) oraz plazmowych (I frakcja nieprecypitująca żółtka) na akrosom wydaje się być zaznaczone mniejszym „wyciekem” enzymów akrosomowych (rys. 3, 4, pkt III).

Należy nadmienić, że w obu przypadkach zastosowanych rozcieńczalników obserwowano niskie wartości współczynnika zmienności w zakresie aktywności enzymów w płynach nadosadowych.

Przedstawionego zjawiska stabilizowania wewnętrznej błony akrosomu nie można stwierdzić jednoznacznie odnośnie błony plazmatycznej oraz zewnętrznej akrosomu. Obserwowany bowiem intensywny „wyciek” hialuronidazy na etapie schładzania nasienia i ekwilibracji z glicerolem na łaźni wodnej, zwłaszcza w przypadku zastosowania rozcieńczalnika z dodatkiem kofeiny, wskazuje na zmiany przepuszczalności wymienionych błon (rys. 2, pkt. II).

Reakcja uwalniania jest natomiast wyraźnie zahamowana w przypadku stosowania wariantu III rozcieńczalnika, opartego na liofilizowanych frakcjach białkowych.

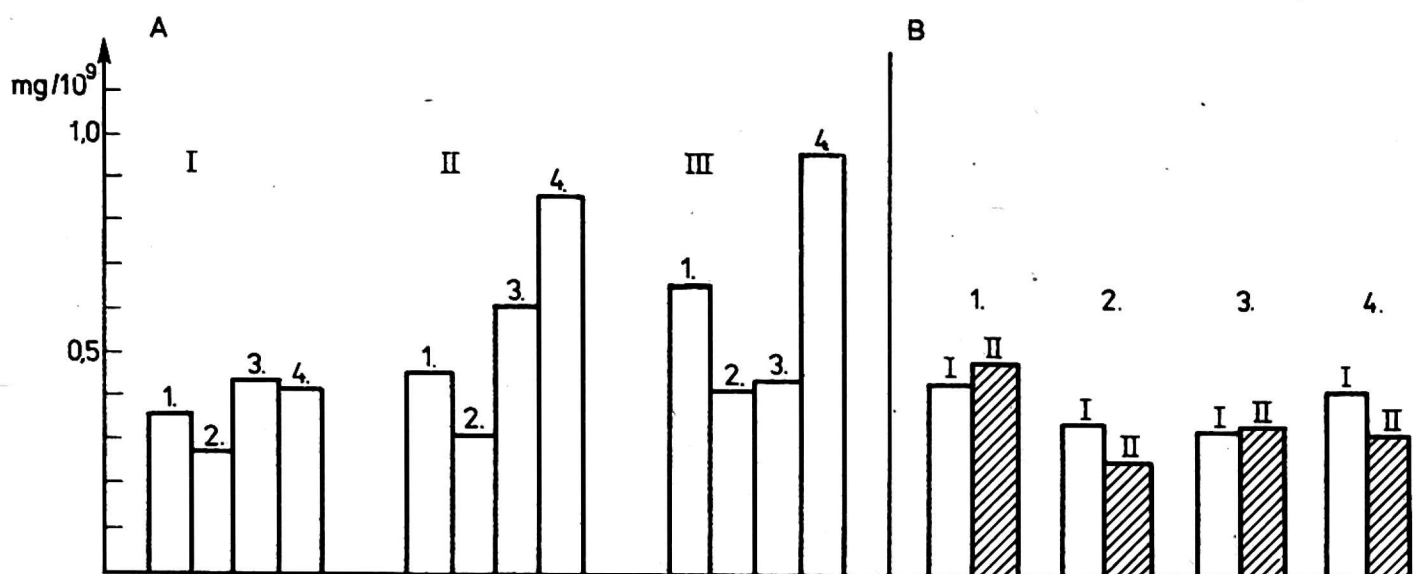
Potwierdzenie naszej sugestii o obniżonym efekcie ochraniającym analizowanych wariantów rozcieńczalników wobec błony komórkowej plemników stanowią rezultaty otrzymane dla GOT (rys. 5). „Wyciek” tego enzymu z plemników właściwie równomiernie wzrastał podczas całej technologii mrożenia, co wskazywać może na postępujące zaburzenia przepuszczalności błon wstawki plemnika, a zwłaszcza zewnętrznej błony mitochondrialnej. Także i w tym przypadku efekt ochraniający liofilizowanych frakcji jest wyraźniej zaznaczony. Podkreślić należy, że dla obu enzymów zja-



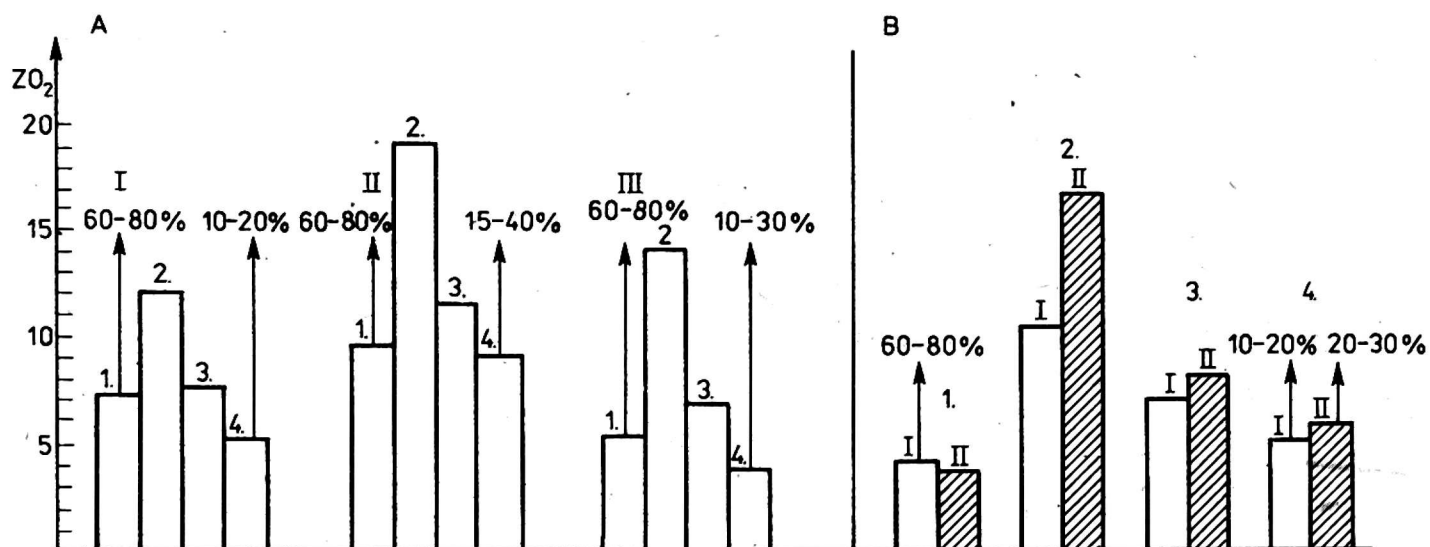
Rys. 5. „Wyciek” GOT do płynu nadosadowego jako wskaźnik stanu wstawki plemników knura podczas zamrażania nasienia. Objasnienia jak na rys. 2

wisko „wycieku” na poszczególnych etapach technologicznych warunkowane jest dużą zmiennością indywidualną w obrębie zamrażanych grup ejakulatów.

Bardzo korzystne oddziaływanie na metabolizm plemników wydadają się wywierać układy rozcieńczalników Salamona z dodatkiem kofeiny (rys. 6, 7, pkt. II i III). Wpływ kofeiny na metabolizm nasienia charakteryzuje się wzrastającym poziomem ATP w plemnikach (rys. 6). Jeśli po rozcieńczeniu nasienia zawartość tego nukleotydu wyraźnie obniża się, to na dalszych etapach technologicznych obserwuje się stałe nagromadzenie ATP w plemnikach. Zjawisko to spowodowane może być bezpośrednim oddziaływaniem kofeiny na układ enzymatyczny plemnika; cykloaza adenylowa - fosfo-



Rys. 6. Zawartość ATP w plemnikach knura w różnych etapach technologii zamrażania nasienia. Objasnienia jak na rys. 2



Rys. 7. Współczynniki ZO₂ oraz ruchliwość plemników knura w różnych etapach technologii zamrażania nasienia. Objasnienia jak na rys. 2

diesteraza cyklicznych nukleotydów. Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku 7, w przypadku zastosowania rozcieńczalnika II obserwuje się gwałtowne przyspieszenie tempa zużycia tlenu przez plemniki na etapie rozrzedzenia nasienia. Stwierdzone zazwyczaj na pozostałych etapach technologii mrożenia nasienia gwałtowne spadki współczynnika oddychania ZO_2 , w tym wariantcie mrozeniowym wydają się być bardziej łagodnie zaznaczone. Odpowiada to utrzymaniu na znacznie wyższym poziomie stopnia nasilenia ruchliwości plemników po rozmrożeniu.

Reasumując należy stwierdzić, że wariant rozcieńczalnika Salamon z dodatkiem 10 mM kofeiny, mimo słabszego efektu ochraniającego w stosunku do błony komórkowej oraz zewnętrznej błony akrosomowej i mitochondrialnej plemników, wydaje się właściwie zabezpieczać główne układy enzymatyczne plemników przed zmianami kriogenicznymi.

Podstawowym wnioskiem wynikającym z przedstawionych uprzednio rezultatów badań [17] było stwierdzenie korzystnego oddziaływania kofeiny na plemniki oraz wykazanie silnej reakcji precypitacji pomiędzy białkami plazmy nasienia i żółtka jaja kurzego, która może nasilać kriogeniczne zmiany plemników.

W punkcie B kolejnych rysunków przedstawiliśmy charakterystykę kriobiochemicznych zmian plemników, pochodzących od knurów, których plazmy nasienia nie przejawiały reakcji precypitacji z żółtkiem jaja kurzego. Poszczególne ejakulatory zamrażano jednocześnie przy zastosowaniu dwóch wariantów rozcieńczalnika Salamona, tj. z dodatkiem 10 mM kofeiny oraz bez dodatku tej substancji.

Odnosnie do wszystkich analizowanych parametrów biochemicznych otrzymano rezultaty wskazujące na zdecydowanie lepsze efekty stabilizujące poszczególne struktury plemnikowe, zwłaszcza w układzie rozcieńczalnika z dodatkiem kofeiny. Zjawisko to potwierdzają uzyskiwane niskie wartości współczynników zmienności. Sugerowałoby to potrzebę bardziej wnikliwej selekcji knurów, których nasienie przeznaczone jest do zamrażania w ciekłym azocie.

Obserwacja miana reakcji precypitacji żółtka jaja kurzego przez białka plazmy nasienia tych osobników może być szczególnie pomocna w dalszym postępie badań nad technologią zamrażania nasienia tego gatunku zwierząt.

PIŚMIENNICTWO

1. Boursnell J.C., Johnson P., Zamora J.: An electrophoretic and ultracentrifugal study of boar seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 63, 374, 1962.
2. Crabo B.G., Einarsson S.: Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta vet. Scand.*, 12, 125, 1971.
3. Glogowski J., Strzeżek J.: Badania nad składem rozcieńczalnika do mrożenia nasienia knura. Cz.I. *Zesz. Prob.Post. Nauk Rol.* 263, 241, 1986.
4. Łyczyński A.: Badania nad zamrażaniem nasienia knurów. Cz.I. *Rocz. Nauk Zoot.*, 2, 23, 1974.
5. Moore H.D.M., Hibbit K.G.: The binding of labelled basic proteins by boar spermatozoa. *J.Reprod. Fert.*, 46, 71, 1976.
6. Moore H.D.M., Hall G.A., Hibbit K.G.: Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars without seminal vesicles to cooling. *J.Reprod. Fert.*, 47, 39, 1976.

7. Paquignon M., Du Mesnil du Buisson F.: Fertilité et prolificité de truies inseminées avec du sperme congelé. *Livestock Production Sci.*, 5, 293, 1978.
8. Paquignon M., Courot M.: Survie des spermatozoïdes de verrat apres decongélation. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 15, 517, 1975.
9. Pursel V.G., Johnson L.A.: Fertility with frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 33, 265, 1971.
10. Pursel V.G., Johnson L.A.: Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40, 99, 1975.
11. Richter L., Liedicke A.: Ein Verfahren zum Tiefgefrieren von Ebersperma. *Proc. VII-th Int. Kong. Tier. Fortpf. München, Band II*, 1617, 1972.
12. Roberts T.K., Bournsnel J.C., Brown A.D.: The role of zinc in promoting the opalescence and cold precipitation of boar seminal plasma. *J. Reprod. Fert.*, 37, 373, 1974.
13. Salamon S., Visser D.: Insemination with frozen boar semen. *Proc. VII-th Int. Congr. Anim. Reprod. München, II*, 1645, 1972.
14. Salamon S.: Fertility of ram and boar semen after long-term storage. *Proc. VIII-th Int. Congr. Anim. Reprod., Kraków, vol. IV*, 1069, 1976.
15. Strzeżek J., Śmigieliska J., Czeczot H., Al-Taha T.J., Glogowski J., Liminowicz J.: Kriobiochemiczne zmiany w nasieniu tryka, buhaja i knura. *Cz. II, PWRiL, Poznań 1979*, 163.
16. Strzeżek J., Hosaja M., Śmigieliska J., Czeczot H., Al-Taha T.J., Glogowski J.: Biochimizieskije i ultrastrukturnyje izmieniija spermatozoidow chrjaka, barana i byka pri zamoraživani siemieni. *Mater. Konf. RWPG, Kraków, 5-10. XII. 1977*.
17. Strzeżek J., Glogowski J., Magierska E.: Badania nad składem rozcieńczalnika do mrożenia nasienia knura. *Zesz. Prob. Post. Nauk Roln.*, 263, 353, 1986.

J. Strzeżek, J. Glogowski, J. Śmigielka, K. Świdowicz

STUDIES UPON THE COMPOSITION OF A DILUENT FOR FREEZING BOAR SEMEN. III. BIOCHEMICAL PROPERTIES OF BOAR SPERMATOZOA FOLLOWING FREEZING IN TWO SYSTEMS OF DILUENTS

S u m m a r y

The results of previous investigations (p. I and II), brought about the elaboration of two variants of Salamon and Visser's diluent for freezing boar semen in liquid nitrogen: 1. The diluent with 15% of fresh egg-yolk and 10 mM of caffeine. 2. The diluent with 10 mM of caffeine and freeze-dried protein fractions of boar seminal plasma (I fraction), and of hen egg-yolk (I and II fraction).

In both diluents the following basal components were present: fructose, Tris, EDTA- Na_2 , citric acid and 2% of glycerol. Authors own freezing method has been applied. Simultaneously with determining the semen characters biochemical examinations of the semen at each step of freezing process have been performed.

The diluent with 10 mM of caffeine and fresh egg-yolk proved to be the most favourable for freezing boar semen. However the least biochemical changes and highest sperm motility post thawing (40%) was observed in individuals whose seminal plasma did not show gel precipitation with egg-yolk.

Е.Стшажек, Я.Глоговски, Я.Сьмигельска, К.Свидзвич

Исследования над составом разбавителя для замораживания семени хряка. III. Биохимические свойства живчиков хряка после замораживания в двух вариантах разбавителей

Резюме

Результаты прежде представленных опытов (ч. I и II) позволили разработать состав двух вариантов разбавителя Саломон и Виссер для замораживания семени хряка в жидком азоте: 1. разбавитель с прибавкой цельного желтка куриного яйца (15%) и 10 мМ кофеина, 2. разбавитель с прибавкой лиофилизированных фракций белковых плазмы семени хряка (I-ая фракция), желток куриного яйца (I-ая и II-ая фракции) и 10 мМ кофеина. Контрольную пробу составлял разбавитель с прибавкой цельного куриного яйца.

Во всех сериях разбавителей основными компонентами были: фруктоза, Трис, ЕДТА- Na_2 (Этилендиаминотетрауксусного натрия), лимонная кислота, 2% глицерол.

Применяли собственную технологию замораживания семени. Кроме исследования свойств семени проводили одновременно анализ биохимический семени по отдельным этапам замораживания. Разбавитель с прибавкой цельного желтка куриного яйца и 10 мМ кофеина оказался наиболее пригодным к замораживанию семени хряка в жидком азоте. Наименьшее усиление биохимических изменений живчиков и наивысшую подвижность живчиков после разморозения (до 40%) наблюдали, однако, в случае особи, которых плазмы семени не обнаруживали реакции преципитации железой с желтком куриного яйца.