

## Zastosowanie butylowanego hydroksytoluenu w kriokonserwacji nasienia knura\*

Monika Trzcńska, Magdalena Bryła

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,  
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice; e-mail: monika.trzcinska@izoo.krakow.pl

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu dodatku butylowanego hydroksytoluenu (BHT) do rozcieńczalnika mrożeniowego na jakość plemników knura oraz ich zdolność zapładniającą po procedurze zamrażania-rozmrażania. Nasienie pochodzące od 5 knurów (36 ejakulaty) kriokonserwowano w rozcieńczalniku żółtkowo-laktozowo-glicerolowym uzupełnionym różnymi stężeniami BHT: 0 mM (kontrola); 1,0 mM (R1); 1,5 mM (R2); 2,0 mM (R3). Jakość nasienia po rozmrożeniu oceniano na podstawie: ruchliwości plemników (CASA; ruch całkowity – TM, ruch postępowy – PM), translokacji fosfatydyloseryny (Annexin-V-FLUos Staining Kit) oraz stopnia fragmentacji DNA (TUNEL Assay). Jednocześnie kriokonserwowane nasienie użyto do inseminacji loszek, a zdolność zapładniającą plemników określano na podstawie skuteczności inseminacji oraz liczby prawidłowych morfologicznie zarodków ocenianych na podstawie stopnia fragmentacji DNA. Najwyższy odsetek plemników o ruchu postępowym oraz plemników żywych stwierdzono w rozcieńczalniku R3 ( $74,8 \pm 4,4\%$  oraz  $63,7 \pm 5,8\%$ ) w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym ( $38,3 \pm 2,8\%$  oraz  $36,1 \pm 2,6\%$ ). Jednocześnie stwierdzono, że dodatek BHT do rozcieńczalnika mrożeniowego nie indukuje wzrostu odsetka plemników wczesnoapoptotycznych po rozmrożeniu, w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym. Niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika mrożeniowego, procedura zamrażania-rozmrażania nie indukuje fragmentacji DNA w plemnikach knura. Najwyższą liczbę zarodków prawidłowych morfologicznie uzyskano od loszek inseminowanych nasieniem kriokonserwowanym w rozcieńczalniku z dodatkiem 1,5 mM BHT. Nie wykazano różnic w jakości zarodków, ocenianych na podstawie stopnia fragmentacji DNA, uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem mrożonym w badanych rozcieńczalnikach.

**SŁOWA KLUCZOWE:** knur / kriokonserwacja / butylowany hydroksytoluen / zarodki / TUNEL

Kriokonserwacja materiału biologicznego jest jedną z technologii pozwalających na zachowanie genetycznie uwarunkowanej różnorodności. Mrożenie nasienia, które jak do-

\*Badania wykonano w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG.

tychczas jest jedyną metodą jego konserwacji, pozwala na racjonalne sterowanie rozrodem oraz w sposób istotny wpływa na postęp hodowli. Czas przechowywania i wykorzystania do inseminacji nasienia poddanego kriokonserwacji jest praktycznie nieograniczony. Stwarza to możliwość wykorzystania materiału genetycznego pochodzącego od szczególnie wartościowych samców w dowolnym miejscu i czasie.

Plemniki knura są w dużo większym stopniu wrażliwe na czynniki związane z zamrażaniem-rozmrażaniem niż plemniki innych zwierząt gospodarskich. Powodem tego stanu jest m.in. wysoki udział kwasów nienasyconych, które stanowią zagrożenie dla struktury błon plazmatycznych plemników z powodu podatności na procesy peroksydacji. W wyniku nadmiaru reaktywnych form tlenu (RFT) lub wyczerpania możliwości kompensacyjnych układu antyoksydacyjnego w nasieniu dochodzi do utleniania lipidów [5]. W konsekwencji prowadzi to do utraty integralności błony komórkowej i asymetrii lipidów, uszkodzenia DNA oraz śmierci komórki na drodze apoptozy i obniżenia wartości biologicznej nasienia. Dodatek związków o działaniu antyoksydacyjnym do rozcieńczalników używanych do mrożenia nasienia knura może minimalizować negatywne skutki wywołane przez RFT oraz przyczynia się do wzrostu efektywności kriokonserwacji [11].

Butylowany hydroksytoluen (BHT) to organiczny związek lipofilowy, wykorzystywany ze względu na właściwości przeciwutleniające zarówno w przemyśle spożywczym, paszowym, jak i chemicznym. W rozrodzie zwierząt stosowany jest w celu zminimalizowania szoku chłodowego podczas kriokonserwacji nasienia różnych gatunków zwierząt, m.in.: koźła [7], buhaja [12], psa [9], bawołu domowego [6] oraz knura [11, 13].

Celem podjętych badań była modyfikacja składu rozcieńczalnika mrożeniowego, polegająca na zastosowaniu dodatku butylowanego hydroksytolenu jako substancji o działaniu antyoksydacyjnym. Do określenia jakości nasienia po procedurze zamrażania-rozmrażania stosowano standardowe metody oceny oraz wybrane markery apoptotyczne. Jednocześnie, w celu sprawdzenia zdolności zapładniającej plemników knura po kriokonserwacji, przeprowadzono ocenę jakości zarodków uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem mrożonym w rozcieńczalnikach o zmodyfikowanym składzie.

## Material i metody

W badaniach wykorzystano nasienie od 5 knurów mieszańców międzyrasowych (polska biała zwisłoucha x wielka biała polska) o masie ciała  $252,5 \pm 34,6$  kg i w wieku  $17,8 \pm 0,8$  miesięcy. Knury utrzymywano w Stacji Eksploatacji Knurów w Kleczy Dolnej. Nasienie pobierano 2 razy w tygodniu w okresie od października do listopada. Ogółem przebadano 40 ejakulatów (8 ejakulatów/knur). Do dalszej części doświadczenia przeznaczono tylko te ejakulatory, w których najniższy odsetek plemników o ruchu postępowym wynosił 70%, a odsetek plemników prawidłowych morfologicznie nie był niższy niż 80%. Do dalszych analiz zakwalifikowano 36 ejakulatów. Procedurę mrożenia nasienia knura przeprowadzono według metody własnej [16].

Nasienie (frakcja gęsta) pobierano metodą manualną na fantomie i rozrzedzano w rozcieńczalniku *Biosolwens Plus* (Biochefa, Polska) w stosunku 1:1. Rozrzedzone nasienie schładzano do temperatury  $15^{\circ}\text{C}$  i ekwilibrowano przez 60 minut. W celu oddzielenia plemników od plazmy nasienia i rozcieńczalnika, nasienie wirowano w tempera-

turze 15°C przy 800 g przez 25 minut. Zawiesinę plemników rozrzedzano do koncentracji  $1,5 \times 10^9$  plemników/ml przy zastosowaniu rozcieńczalnika żółtkowo-laktozowego (LEY). Rozcieńczone nasienie schładzano do temperatury 5°C i ekwilibrowano przez 120 minut. Zawiesinę plemników rozrzedzano rozcieńczalnikiem z glicerolem (LEYG: 89,5% LEY zawierający 9% glicerol oraz 1,5% Equex-STM®; Nova Chemical Sales, USA) tak, aby uzyskać końcową koncentrację plemników  $1 \times 10^9$ /ml oraz 3% glicerol.

Zawiesinę plemników rozrzedzoną w rozcieńczalniku LEY i LEYG uzupełniano antyoksydantem, uzyskując końcową koncentrację BHT: 0 mM (kontrola); 1,0 mM (rozcieńczalnik R1); 1,5 mM (rozcieńczalnik R2); 2,0 mM (rozcieńczalnik R3). Rozrzedzonym nasieniem napełniano słomki o objętości 0,5 ml. Napełnione słomki zamrażano w parach ciekłego azotu o temperaturze ok. -120°C przez 15 minut w pojemniku z twardego styropianu. Zamrożone słomki przechowywano w kontenerze z ciekłym azotem (-196°C) przez dwa tygodnie. Rozmrażanie słomek przeprowadzano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 40 sekund. Po rozmrożeniu zawartość słomek przenoszono do rozcieńczalnika *Biosolwens Plus* o temperaturze 37°C.

Ocenę kriokonserwowanego nasienia przeprowadzono po 15 minutach inkubacji w temperaturze 37°C. Jakość plemników oceniano na podstawie ruchliwości, określając za pomocą systemu CASA (SM-CMA, MTM, Szwajcaria) ruch całkowity (TM%) i postępowy (PM%). Jednocześnie jakość plemników analizowano fluorescencyjnie za pomocą wybranych markerów apoptotycznych. Zmiany apoptotyczne oceniano na podstawie identyfikacji reszt fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej plemników przy zastosowaniu zestawu Annexin V-Fluos Staining Kit (Roche, Niemcy), wyróżniając następujące subpopulacje plemników: żywe (AnV/PI<sup>-</sup>), wczesnoapoptotyczne (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), późnoapoptotyczne/wczesnonekrotyczne (AnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) oraz plemniki martwe (AnV/PI<sup>+</sup>) [13]. Jednocześnie oceniano stopień fragmentacji DNA plemników metodą TUNEL przy użyciu zestawu In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Niemcy), określając odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA (TUNEL<sup>+</sup>) [13]. Obserwację poszczególnych subpopulacji plemników przeprowadzono przy zastosowaniu mikroskopu epifluorescencyjnego firmy Nikon Eclipse E600 (Japonia), używając odpowiednich filtrów: filtr o długości fali  $520 \pm 20$  nm – detekcja zielonej fluorescencji; filtr o długości  $>620$  nm – detekcja czerwonej fluorescencji. Analizę przeprowadzano na 200 plemnikach z każdej próbki.

Do inseminacji nasieniem zamrożonym-rozmrożonym przeznaczono 20 sześciomiesięcznych loszek różnych ras (pietrain x duroc, pbz, wbp) o masie ciała od 85 do 90 kg, utrzymywanych w standardowych warunkach zootechnicznych w Stacji Doświadczalnej IZ-PIB Żerniki Wielkie. Loszki poddawano standardowej synchronizacji przez domięśniową iniekcję 750 j.m. PMSG (Folligon, Intervet B.V., Holandia). Po 72 godzinach podawano 500 j.m. hCG (Chorulon, Intervet B.V., Holandia). W dniu wystąpienia rui (24 godziny po podaniu hCG) loszki przygotowywano do zabiegu domacicznej inseminacji, według metody własnej [14]. Do każdego rogu macicy (w pobliżu połączenia jajowodowo-macicznego) wprowadzano igłę tępokończystą zakończoną strzykawką z rozmrożonym nasieniem ( $1 \times 10^9$  plemników w 3 ml rozcieńczalnika *Biosolwens Plus*). Loszki odizolowano od reszty zwierząt i po 5,5 dniach od inseminacji uzyskiwano zarodki w stadium blastocysty ekspandującej. Zarodki uzyskano poprzez przepłukanie macicy uzupełnionym płynem PBS (Invitrogen, USA) o temperaturze 38°C. Przepłukiwanie powtarzano 2-krotnie przy

użyciu około 500 ml płynu na jeden róg macicy. Wyszukiwanie i ocenę morfologiczną zarodków przeprowadzono przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (powiększenie 100x). Następnie zarodki przenoszono do płynu PBS uzupełnionego 20% surowicą płodów ciętych (Sigma, Niemcy). Zarodki w specjalnej komorze utrzymującej stałą temperaturę 38°C przewieziono do laboratorium i przeprowadzono ocenę stopnia fragmentacji DNA [2].

Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie z siedzibą przy Instytucie Farmakologii PAN.

Uzyskane wyniki oceny jakości nasienia opracowano statystycznie przy użyciu jednozmiennikowej analizy wariancji ANOVA (według wzoru  $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ ; gdzie:  $y$  – oceniana zmienna,  $\mu$  – średnia wartość,  $a_i$  – 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 wysoko istotne statystycznie przyjęto różnice pomiędzy parametrami na poziomie  $P < 0,01$ . Wyniki oceny skuteczności inseminacji oraz wyniki oceny jakości zarodków opracowano przy użyciu testu  $\chi^2$ , a za istotne statystycznie przyjęto różnice na poziomie  $P < 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Wyniki oceny jakości nasienia kriokonserwowanego w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach przedstawiono w tabeli 1. Z przeprowadzonych badań wynika, że dodatek butylowanego hydroksytoluenu do rozcieńczalnika mrozeniowego w istotny sposób poprawia parametry ruchu plemników (TM%, PM%) po procedurze zamrażania-rozmrażania, w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym. Wzrost ten obserwowano przy dodatku do rozcieńczalnika mrozeniowego zarówno 1,0, 1,5, jak i 2,0 mM butylowanego hydroksytoluenu. Jednak spośród zastosowanych stężeń, najwyższy odsetek plemników o ruchu całkowitym i postępowym uzyskano po uzupełnieniu rozcieńczalnika mrozeniowego 2,0 mM BHT, uzyskując odpowiednio 80,9  $\pm$  5,2% i 74,8  $\pm$  4,4%. Zarówno badania własne [13], jak również przeprowadzone przez Bamba i Crana [1] oraz Roca i wsp. [11] wykazały, że dodatek BHT do rozcieńczalnika mrozeniowego w istotny sposób poprawia ruchliwość plemników knura po zamrożeniu-rozmrożeniu.

W badaniach nad doskonaleniem techniki kriokonserwacji ważne jest opracowanie metod pozwalających na identyfikację subpopulacji plemników zamrożonych-rozmrożonych o wysokiej zdolności zapładniającej. W badaniach Pena i wsp. [10] wykazano, że zastosowanie aneksyny V oraz jodku propydydny pozwala na precyzyjną ocenę jakości rozmrożonego nasienia knura. Uzyskane wyniki własne pokazują, że statystycznie istotne różnice w odsetku plemników AnV/PI<sup>-</sup>, AnV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>, AnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>, AnV/PI<sup>+</sup> obserwowano pomiędzy rozcieńczalnikiem kontrolnym a rozcieńczalnikami o zmodyfikowanym składzie. Najniższy odsetek plemników wczesnoapoptotycznych (6,8  $\pm$  2,3%) oraz późnoapoptotycznych (23,7  $\pm$  4,1%) stwierdzono w rozcieńczalniku R3. Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowanie BHT w stężeniu od 1,0 mM do 2,0 mM prawdopodobnie w znaczący sposób ogranicza utratę asymetrii lipidów w błonie komórkowej plemników wywołanej nagromadzeniem reaktywnych form tlenu podczas mrożenia nasienia, w porównaniu z rozcieńczalnikiem kontrolnym nie zawierającym substancji o działaniu antyoksydacyjnym. Z kolei

**Tabela 1 – Table 1**

Wyniki oceny jakości nasienia kriokonserwowanego w zmodyfikowanych rozcieńczalnikach

The results of quality assessment of boar semen cryopreserved in modified extenders

| Parametry jakości plemników<br>Sperm quality parameters |  | Rozcieńczalniki – Extenders   |                  |                  |                  |
|---|--|---|------------------|------------------|------------------|
|   |  | kontrola<br>control   | R1<br>extender 1 | R2<br>extender 2 | R3<br>extender 3 |
| Ruchliwość<br>Motility                                  | Odsetek plemników o ruchu całkowitym<br>Total motility (%)   | 42,3 ±5,3   | 78,3 ±5,2**      | 77,5 ±4,8**      | 80,9 ±5,2**      |
|   | Odsetek plemników o ruchu postępowym<br>Progressive motility (%)   | 38,3 ±2,8   | 72,4 ±3,5**      | 71,7 ±4,2**      | 74,8 ±4,4**      |
| Annexin V<br>Fluos<br>Staining/PI                       | Odsetek plemników żywych (AnV/PI <sup>-</sup> )<br>Viable spermatozoa (AnV/PI <sup>-</sup> ) (%)   | 36,1 ±2,6   | 62,8 ±4,2**      | 63,5 ±5,1**      | 63,7 ±5,8**      |
|   | Odsetek plemników wczesnoapoptotycznych (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )<br>Early apoptotic spermatozoa (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> ) (%) | 19,8 ±3,8   | 7,1 ±1,9**       | 6,9 ±2,1**       | 6,8 ±2,3**       |
|   | Odsetek plemników późnoapoptotycznych (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )<br>Late apoptotic spermatozoa (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> ) (%)    | 33,2 ±4,6   | 24,3 ±6,7**      | 23,9 ±3,7**      | 23,7 ±4,1**      |
|   | Odsetek plemników martwych (AnV <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> )<br>Nonviable spermatozoa (AnV <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> ) (%)                    | 13,4 ±4,4   | 5,8 ±1,9**       | 5,7 ±2,1**       | 5,8 ±1,2**       |
|   | TUNEL  | Odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA<br>TUNEL <sup>+</sup> (%) | 2,1 ±0,9         | 1,9 ±0,5         | 2,0 ±0,4         |

\*\*Wartości w postaci średnich arytmetycznych ±odchylenie standardowe w wierszach różnią się wysoko istotnie statystycznie (P&lt;0,01) w porównaniu z kontrolą

\*\*Values expressed as means ±SD in rows differ significantly (P&lt;0.01) from control

badania Roca i wsp. [11] wykazały, że użycie butylowanego hydroksytoluenu w przedziale od 0,2 do 0,8 mM pozwala na uzyskanie najwyższej jakości nasienia po rozmrożeniu.

Jednocześnie wykazano, że procedura kriokonserwacji zarówno w rozcieńczalniku kontrolnym, jak i w rozcieńczalnikach zmodyfikowanych nie indukuje fragmentacji DNA w plemnikach knura. Poziom fragmentacji DNA plemnikowego wahał się w przedziale od 1,8 ±0,2% do 2,1 ±0,9%. Podobny wynik uzyskali Chanapiwat i wsp. [3], przeprowadzając badania na kriokonserwowanym nasieniu knura oraz Martin i wsp. [8], oceniając mrożone nasienie buhajów. Natomiast Fraser i Strzeżek [4] wykazali, że proces zamrażania-rozmrażania powoduje destabilizację struktury chromatyny plemnikowej, co zwiększa podatność na fragmentację DNA.

W celu określenia zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia w badanych rozcieńczalnikach, przeprowadzono ocenę jakości zarodków uzyskanych od loszek inseminowanych rozmrożonym nasieniem. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2 – Table 2**

Skuteczność inseminacji oraz ocena zarodków uzyskanych od loszek inseminowanych nasieniem kriokonserwowanym

Conception rate and quality of embryos obtained from gilts inseminated with cryopreserved semen

|  | Rozcieńczalniki – Extenders |                  |                  |                  |
|--|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|
|  | kontrola<br>control         | R1<br>extender 1 | R2<br>extender 2 | R3<br>extender 3 |
| Liczba unasienionych loszek (szt.)<br>Number of inseminated gilts (head/%)                                     | 5                           | 5                | 5                | 5                |
| Liczba skutecznie unasienionych loszek (szt./%)<br>Number of successfully inseminated gilts (head/%)           | 3 / 60                      | 4 / 80*          | 5 / 100*         | 5 / 100*         |
| Liczba blastocyst/średnia liczba na loszkę<br>Number of total blastocysts/blastocysts per gilt                 | 35 / 11,7                   | 54 / 13,5*       | 70 / 14,0*       | 69 / 13,8*       |
| Liczba prawidłowych morfologicznie blastocyst (szt./%)<br>Number of morphologically normal blastocysts (no./%) | 27 / 77,1                   | 49 / 90,7*       | 65 / 92,9*       | 64 / 92,7*       |
| TUNEL* (%)   | 2,8                         | 2,1              | 2,1              | 2,3              |

\*Wartości w wierszach różnią się istotnie statystycznie ( $P < 0,05$ ) w porównaniu z kontrolą

\*Values in rows differ significantly ( $P < 0,05$ ) from control

Najniższą skuteczność inseminacji, wynoszącą 60%, stwierdzono u loszek inseminowanych nasieniem kriokonserwowanym w rozcieńczalniku kontrolnym. Jednocześnie uzyskano wysoką skuteczność inseminacji nasieniem mrożonym w rozcieńczalnikach R1, R2 oraz R3, wynoszącą odpowiednio: 80%, 100% oraz 100%. Po inseminacji loszek nasieniem mrożonym w rozcieńczalniku z dodatkiem 1,5 mM BHT uzyskano najwyższą liczbę zarodków w stadium blastocysty ekspandującej, z których 92,9% określono jako prawidłowe morfologicznie. Ponadto stwierdzono statystycznie istotne różnice w ogólnej liczbie blastocyst oraz prawidłowych morfologicznie zarodków pomiędzy rozcieńczalnikiem kontrolnym a pozostałymi rozcieńczalnikami, użytymi do inseminacji loszek. Badania przeprowadzone przez Roca i wsp. [11] wykazały, że zastosowanie do zapłodnienia *in vitro* nasienia mrożonego w rozcieńczalniku z dodatkiem BHT zwiększa kompetencje rozwojowe zarodka do stadium blastocysty. Jednocześnie w badaniach własnych [15] uzyskano wysoki wskaźnik oproszeń po inseminacji nasieniem kriokonserwowanym w rozcieńczalniku z dodatkiem BHT. Analiza jakości zarodków metodą TUNEL nie wykazała istotnych statystycznie różnic w stopniu fragmentacji DNA pomiędzy blastocystami uzyskanymi od loszek inseminowanych rozcieńczalnikiem kontrolnym a rozcieńczalnikami zawierającym różne stężenia BHT. Uzyskany w badaniach odsetek fragmentacji DNA w zarodkach był niski i wynosił od 2,1 do 2,8%.

Podsumowując wyniki badań można stwierdzić, że suplementacja rozcieńczalnika mroźniowego butylowanym hydroksytoluenem ochrania plemniki knura przed uszkodzeniami kriogenicznymi. Wykazano, że procedura kriokonserwacji nie indukuje fragmentacji DNA w plemnikach. Jednocześnie, użycie do inseminacji nasienia kriokonserwowanego

w rozcieńczalniku z dodatkiem BHT pozwala na uzyskanie wyższej skuteczności inseminacji oraz wyższej liczby prawidłowych morfologicznie zarodków, w porównaniu z nasieniem mrożonym w standardowym rozcieńczalniku żółtkowo-laktozowo-glicerolowym.

## PIŚMIENNICTWO

1. BAMBA K., CRAN D.G., 1992 – Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *Journal of Reproduction and Fertility* 95, 69-77.
2. BRYŁA M., TRZCIŃSKA M., WIECZOREK J., SŁOMSKI R., SMORAG Z., 2010 – Effect of semen quality in transgenic boars on the developmental competence of preimplantation embryos. *Animal Reproduction Science* 118, 77-82.
3. CHANAPIWAT P., KAEOKET K., TUMMARUK P., 2009 – Effects of DHA-enriched hen egg yolk and L-cysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology* 11, 600-608.
4. FRASER L., STRZEŻEK J., 2007 – Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology* 68, 248-257.
5. GADEA J., SELLÉS E., MARCO M.A., COY P., MATAS C., ROMAR R., RUIZ S., 2004 – Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690-701.
6. IJAZ A., HUSSAIN A., ALEEM M., YOUSAF M.S., REHMAN H., 2009 – Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the postthawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 71, 1326-1329.
7. KHALIFA T.A., LYMBEROPOULOS A.G., EL-SAIDY B.E., 2008 – Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reproduction of Domestic Animals* 43, 525-530.
8. MARTIN G., SABIDO O., DURAND P., LEVY R., 2004 – Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction* 71, 28-37.
9. NEAGU V.R., GARCÍA B.M., SANDOVAL C.S., RODRÍGUEZ A.M., FERRUSOLA C.O., FERNÁNDEZ L.G., TAPIA J.A., PENA F.J., 2010 – Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology* 73, 645-650.
10. PEÑA F.J., JOHANNISSON A., WALLGREN M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., 2003 – Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60, 677-689.
11. 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. *Journal of Andrology* 25, 397-405.
12. SHOAE A., ZAMIRI M.J., 2008 – Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science* 104, 414-418.
13. TRZCIŃSKA M., BRYŁA M., 2015 – Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 18, 473-480.

14. TRZCIŃSKA M., BRYŁA M., GAJDA B., 2014 – Domaciczna inseminacja loszek przy użyciu kriokonserwowanego nasienia knura. Zespół Wydawnictw i Poligrafii IZ PIB, Kraków.
15. TRZCIŃSKA M., BRYŁA M., GAJDA B., GOGOL P., 2015 – Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology* 83, 307-313.
16. TRZCIŃSKA M., BRYŁA M., GOGOL P., CEGŁA M., 2013 – Kriokonserwacja nasienia knura. Zespół Wydawnictw i Poligrafii IZ PIB, Kraków.

Monika Trzcińska, Magdalena Bryła

## The use of butylated hydroxytoluene in cryopreservation of boar semen

### Summary

The objective of the study was to determine the effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the quality and fertilizing capacity of frozen-thawed (FT) boar semen. Semen from five boars (36 ejaculates) was resuspended in lactose-egg yolk-glycerol extender supplemented with 0 (control), 1.0 (R1), 1.5 (R2) or 2.0 mM BHT (R3). Sperm quality was assessed based on motility (CASA; TM: total motility; PM: progressive motility), phosphatidylserine (PS) translocation across the plasma membrane (Annexin-V-FLuos Staining Kit) and DNA fragmentation (TUNEL Assay). The FT semen was also used for intrauterine artificial insemination (AI) of synchronized gilts. The fertilizing capacity of the FT semen was assessed on the basis of the gilt insemination rate and the number of morphologically normal embryos. The quality of the preimplantation embryos was determined by observing a TUNEL-positive reaction. The highest percentage of progressive motile and viable spermatozoa was noted in extender R3 (74.8 ±4.4% and 63.7 ±5.8%), as compared with the control (38.3 ±2.8% and 36.1 ±2.6%). The addition of BHT to the extender did not increase early apoptotic changes in the frozen-thawed spermatozoa with respect to the control. Irrespective of the variant of the extender, cryopreservation and thawing did not induce fragmentation in the boar spermatozoa. The highest number of morphologically normal embryos from inseminated gilts was observed in the case of semen cryopreserved in extender supplemented with 1.5 mM BHT. No significant differences were observed in DNA fragmentation in the expanded blastocysts from gilts inseminated with FT semen cryopreserved in the extenders analysed.

**KEY WORDS:** boar / cryopreservation / butylated hydroxytoluene / embryos / TUNEL