

Wpływ dimeru lizozymu na jakość konserwowanego w niskich temperaturach nasienia knura

WIESŁAW BIELAS, ANDRZEJ DUBIEL, WOJCIECH NIŻAŃSKI

Katedra Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Bielas W., Dubiel A., Niżański W.

Effect of lysozyme dimer on the quality of deep frozen boar semen

Summary

The object of these investigations was to estimate the effect of adding different concentrations of lysozyme dimer on the quality of deep frozen boar spermatozoa packaged in flat 2 ml plastic straws (Minitüb GmbH, Germany). The investigations were carried out on 25 ejaculates collected from 5 pure-bred boars. After collection and qualification, the investigated ejaculate was divided into 6 equal samples: 1 control and 5 experimental. Small doses of 2, 4, 6, 8, or 10 $\mu\text{g/ml}$ dimer of lysozyme in pure form were added to the experimental samples of boar semen no. 1, 2, 3, 4, 5, respectively. The control samples had no dimer supplement. Then all samples were prepared and frozen according to the authors' own modification of Pursel and Park freezing technique (1987). After the thawing of straws, sperm viability (progressive motility, acrosome morphology, AspAT release from spermatozoa) was estimated by a 30 min thermoresistance test. After the thawing of experimental samples no. 1, 2, 3, 4, 5, progressive motility was detected at 24.3; 38.6; 34.5; 23 and 22.3% of spermatozoa respectively. Compared to the control sample (24.6%), significantly higher motility was observed in samples no. 2 (38.6%) and no. 3 (34%), where 4 and 6 μg dimer of lysozyme was added to 1 ml of semen ($P < 0.01$). Percentages of normal acrosomes in control and in experimental samples of spermatozoa no 1, 2, 3, 4, 5 were 62.7, 63.7, 62.4, 62.1, 63.3 and 63.3%. There was no effect of the dimer on acrosomal morphology. AspAT release from spermatozoa in experimental samples no. 1, 2, 3, 4 and 5 was 496, 327, 273, 501 and 541 mU/109 of spermatozoa, respectively. Compared with the control sample (546 mU), significantly lower activity of enzyme ($P < 0.01$) was observed in experimental samples no. 1, 2, 3 and 4. The lowest activity of AspAT in relation to the control sample was observed in experimental samples no. 2 (327 mU) and no. 3 (273 mU). The addition of dimer of lysozyme acted favorably on middle pieces of frozen spermatozoa probably due to its inexplicable effect either on the cells' membranes or on components of seminal plasma or diluents before freezing.

Keywords: freezing, boar, semen, lysozyme dimer

W celu sztucznego unasienniania trzody chlewnej stosuje się głównie nasienie konserwowane w stanie płynnym. Na całym świecie trwają jednak badania, które mają na celu włączenie do praktyki inseminacyjnej loch również nasienia mrożonego.

Plemniki knura są szczególnie podatne na szok chłodowy powstający w procesie obniżania temperatury środowiska zewnętrznego poniżej 15°C , co manifestuje się utratą zarówno możliwości ruchu jak i zdolności do zapłodnienia komórki jajowej (19, 20). Za zwiększoną podatność plemnika knura na uszkodzenia niskotemperaturowe odpowiada w głównej mierze specyficzna budowa błony komórkowej gamety. Wymieniona struktura plemnika cechuje się nierównym rozdziałem cholesterolu między warstwy lipidowe błony komórkowej, zawiera też więcej białek i mniej cholesterolu w porównaniu do samców innych gatunków (2-4, 11). Ponadto fosfolipidy membran

plemnika knura posiadają prawie dwa razy więcej długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych niż plemniki człowieka, psa, królika i koguta – gatunków – znoszących dobrze proces obniżania temperatury poniżej 15°C (3, 4, 11, 20). Na przestrzeni lat modyfikowano składy ilościowe i jakościowe rozrzedzalników stosowanych do mrożenia nasienia knura. Jednak nadal nie udało się osiągnąć w tej dziedzinie znaczącego przełomu (7, 12).

Celem badań była ocena wpływu dodatku dimeru lizozymu do świeżego nasienia knura konserwowanego w ciekłym azocie w słódkach na wybrane właściwości plemników.

Material i metody

Badanie przeprowadzono na 25 ejakulatach pozyskanych od 5 knurów o sprawdzonej, dobrej płodności, 3 rasy hampshire, 1 pietrain, 1 rasy duroc, w wieku 1-5 lat o masie od

200 do 400 kg. Przez cały tok badań, samce żywiono zgodnie z normami przewidzianymi dla tego gatunku zwierząt. Nasienie pobierano metodą manualną 1 raz w tygodniu, na specjalnie do tego celu skonstruowanym fantomie. Frakcję bogatą w plemniki zakwalifikowanego do badań ejakulatu knura dzielono na 6 równych części, na próbkę kontrolną K oraz na próbki doświadczalne nr 1, 2, 3, 4 i 5. Do próbki doświadczalnej nr 1 dodawano czystą postać dimeru lizozymu (Nika Health Products) w ilości 2 μg na 1 ml nasienia. Do pozostałych próbek doświadczalnych nr 2, 3, 4, 5 dodawano odpowiednio: 4, 6, 8 i 10 μg dimeru na 1 ml nasienia. Próbkę kontrolną stanowiło nasienie bez dodatku immunomodulatora. Wszystkie próbki nasienia zamrażano jednocześnie w słódkach płaskich o objętości 2 ml wg zmodyfikowanej technologii badaczy amerykańskich (14). Słódki płaskie rozmrażano przez zanurzenie i obracanie w łaźni wodnej o temperaturze 39°C przez 15 sekund. Tuż po rozmrożeniu do 0,5 ml nasienia dodawano 4,5 ml rozrzedzalnika BTS podgrzanego do temperatury pokojowej. Następnie rozrzedzone nasienie przenoszono w zamkniętych próbkach, które inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. W nasieniu świeżym i na każdym etapie postępowania technologicznego (po rozrzedzeniu, po schłodzeniu i ekwilibracji przed zamrażaniem, po zamrożeniu-rozmrożeniu), badano właściwości plemników takie jak: koncentracja, odsetek plemników o ruchu postępowym, morfologię akrosomów oraz oznaczano aktywność AspAT w plazmie nasienia i w płynach nadosadowych. Oceny morfologii akrosomu dokonywano według metodyki i klasyfikacji opracowanej przez Watsona (18). Aktywność AspAT w plazmie nasienia świeżego i płynach nadosadowych nasienia ekwilibrowanego, rozmrożonego określano fotokolorymetryczną metodą Reitmana-Frankela (15) według metodyki opracowanej przez Strzeżka i wsp. (16). Aktywność wymienionego enzymu podano w jednostkach międzynarodowych w przeliczeniu na 10^9 plemników ($\text{mU}/10^9$ plemników). Istotność różnic pomiędzy średnimi poszczególnych cech badano na poziomie istotności alfa = 0,01. Hipotezę o równości średnich odrzucano na poziomie istotności alfa = 0,05. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z uwzględnieniem testu t-Studenta przy pomocy pakietu statystycznego Statistica PL.

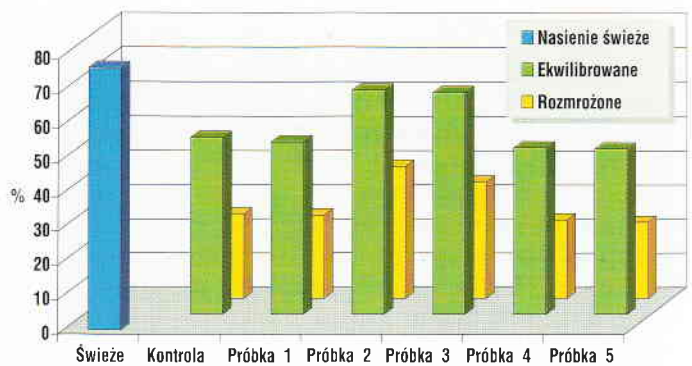
Wyniki i omówienie

Po rozmrożeniu próbek doświadczalnych nr 1, 2, 3, 4, 5 ruch postępowy wykazywało odpowiednio: 24,3; 38,6; 34,5; 23 i 22,3% plemników. Najwyższy odsetek plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu nasienia knurów stwierdzano w próbkach doświadczalnych nr 2 (38,6%) i nr 3 (34%), w których dodawano odpowiednio: 4 i 6 μg dimeru lizozymu do 1 ml nasienia świeżego. W próbce kontrolnej bez dodatku dimeru, średnio 24,6% gamet wykazywało ruch postępowy (różnice istotne statystycznie $P < 0,01$) (ryc. 1).

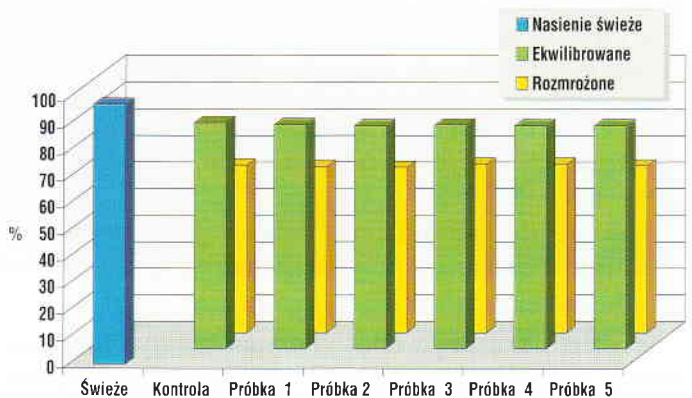
Odsetek normalnych akrosomów wynosił w próbce kontrolnej i w próbkach doświadczalnych plemników nr 1, 2, 3, 4, 5 odpowiednio: 62,7 oraz 63,7; 62,4; 62,1; 63,3; 63,3 % (ryc. 2). Dodatek dimeru nie miał wpływu na morfologię plemników. Zarówno średnie war-

tości odsetka komórek o ruchu postępowym w próbkach nr 1, 4 i 5 (ryc. 1) jak i wartość wskaźnika plemników z niezmiennym akrosomem we wszystkich próbkach doświadczalnych, nie różniły się istotnie z analogicznymi wskaźnikami próbki kontrolnej (ryc. 2).

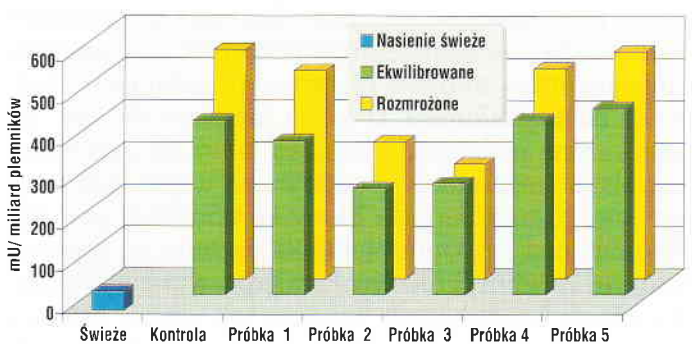
Wyciek AspAT z plemników w próbce doświadczalnej nr 1, 2, 3, 4 i 5 wynosił, odpowiednio: 496, 327, 273, 501 i 541 $\text{mU}/10^9$ plemników (ryc. 3). W porównaniu z próbką kontrolną (546 $\text{mU}/10^9$ plemników), istotnie niższą aktywność enzymu ($P < 0,01$) obserwowano w próbce doświadczalnej nr 1, 2, 3 i 4. Najniższą aktywność AspAT w stosunku do próbki kontrolnej obserwowano w próbce doświadczalnej nr 2



Ryc. 1. Procent plemników o ruchu prawidłowym (n = 25)



Ryc. 2. Procent plemników z normalnym akrosomem (n = 25)



Ryc. 3. Aktywność AspAT w płynach nadosadowych (n = 25)

(327 mU/10⁹ plemników) i nr 3 (273 mu/10⁹ plemników). Dodatek dimeru lizozymu nie miał istotnego wpływu na aktywność AspAT tylko w próbce nr 5 (dodatek 10 µg dimeru lizozymu do 1 ml nasienia świeżego).

Generalnie, w próbce doświadczalnej nr 2 i nr 3 z dodatkiem, odpowiednio: 4 i 6 µg dimeru, stwierdzono istotnie wyższe, średnie wartości wskaźnika ruchliwości oraz istotnie niższe, wartości liczbowe aktywności AspAT w stosunku do próbki kontrolnej, nie tylko po ekwilibracji, ale również po rozmrożeniu słomek płaskich.

Z uzyskanych wyników można wnioskować, że dodatek dimeru lizozymu wywierał pozytywny wpływ na część wstawkową plemników. Świadczą o tym prezentowane wysokie średnie wartości wskaźnika ruchliwości plemników (ryc. 1) oraz niskie wartości liczbowe aktywności AspAT w płynach nadosadowych nasienia próbki nr 2 i 3 (ryc. 3).

Dimer lizozymu dodawano w niewielkich ilościach do nasienia knura, tuż po pobraniu ejakulatu na fantomie. Następnie następował 2-godzinny etap inkubacji próbek nasienia z dimerem w temperaturze pokojowej. Inkubacja nasienia knura po pobraniu jest bardzo ważna dla dalszego procesu konserwacji, zarówno w stanie płynnym, jak i w niskich temperaturach. W czasie przetrzymywania próbek nasienia w temperaturze pokojowej zachodzą jeszcze nie do końca zbadane procesy, które polegają prawdopodobnie na nadaniu plemnikom knura możliwości zachowania funkcji życiowych poniżej 15°C (12, 17, 19). Udowodniono, że świeżo ejakulowane plemniki knura nie przeżywiają nagłego obniżenia temperatury otoczenia poniżej 15°C (12). Niektórzy autorzy (12, 17, 19) są zdania, że komórki płciowe knura mogą przetrwać z powodzeniem schładzanie poniżej 15°C, pod warunkiem, że są przetrzymywane kilka godzin w temperaturze pokojowej oraz w bardzo wolnym tempie oziębiane poniżej temperatury 20°C.

Molekuły dimeru lizozymu mogły w niniejszych badaniach oddziaływać na błony komórkowe plemników knura lub na substancje zawarte w plazmie nasienia przez około 2-3 godziny inkubacji w temperaturze pokojowej bezpośrednio po pobraniu ejakulatu i sporządzeniu próbek.

Zgodnie z opinią Glogowskiego i Strzeżeka (7) zasadowe, „cynkozależne” białka zawarte w plazmie nasienia większości knurów, posiadają zdolność precipitacji cząsteczek żółtka jaja kurzego, dzięki czemu lipoproteiny żółtka nie opłaszczają plazmolemy plemników i nie chronią jej dostatecznie przed skutkami szoku chłodowego. Częściowym rozwiązaniem tego problemu była eliminacja plazmy nasienia przez wirowanie oraz dodawanie do pozostawionego osadu plemników rozrzedzalników zawierających żółtko jaja kurzego wraz z substancjami obniżającymi ujemne oddziaływanie szoku chłodowego i niskotemperaturowego.

W stosowanych aktualnie technologiach konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach, nieodzownym wydaje się dodawanie do rozrzedzalników takich substancji jak glicerol, Orvus Es Paste, czy wersenian sodu w celu zachowania po rozmrożeniu, jak największej liczby plemników zdolnych do zapłodnienia komórki jajowej (1, 9, 13).

W publikacjach na temat mrożenia gamet knura, znajdują się opisy doświadczeń polegających na dodawaniu różnych substancji do nasienia lub do rozrzedzalników w celu osiągnięcia poprawy jakości plemników po rozmrożeniu, np. katalazy, kofeiny, witaminy E, selenu, glicerofosfocholiny, peptonu, polivinylpirolidonu, baclanoside, chloroquine, hydroksytoluenu butylowego, DMSO (di-metylo-sulfo-tlenku) oraz kwasu sjałowego (1, 20).

W badaniach nad zastosowaniem wymienionych związków w technologiach konserwacji gamet w niskich temperaturach, usiłowano wykazać wpływ tych substancji na mrożone plemniki knura. Ze względu na dalsze zapotrzebowanie na tego typu badania, wydawało się nieodzownym przeprowadzenie podobnych prac w celu określenia wpływu dimeru lizozymu na mrożone plemniki knura. Ponadto, ważnym czynnikiem przemawiającym za podjęciem przeprowadzenia niniejszych badań, były prace Dubiela i wsp. (5) oraz Niżańskiego i wsp. (10) poświęcone zagadnieniu oceny wpływu dimeru lizozymu na jakość mrożonego nasienia ogiera i psa. Niżański i wsp. (10) wykazali, iż dodatek dimeru w ilości od 10 do 15 µg/ml ekwilibrowanego i rozrzedzonego nasienia, wywierał korzystny wpływ na jakość rozmrożonych plemników psa w aspekcie ruchliwości i integralności akrosomów w ujęciu statystycznym. Dubiel i wsp. (5) stwierdzili, iż dodanie od 4 do 10 µg dimeru na ml świeżego nasienia ogiera powodowało istotny statystycznie wzrost odsetka plemników o ruchu prawidłowym, niższe straty akrosomów oraz niższe wycieki AspAT z komórek po rozmrożeniu. W bieżących badaniach wykazano natomiast pozytywne oddziaływanie suplementacji dimerem na stabilność błony komórkowej plemnika w regionie wstawki, co przejawiało się istotnie wyższym odsetkiem komórek ruchliwych oraz istotnie niższymi wyciekami AspAT z mrożonych gamet knura.

Jedną z przesłanek prowadzących do zastosowania dimeru lizozymu w niniejszych badaniach, były również prace opisujące pomyślne zastosowania tego związku w formie skutecznego specyfiku w lecznictwie weterynaryjnym (5, 6, 10). Poznane już właściwości dimeru lizozymu to działanie immunomodulacyjne polegające na wzmocnieniu naturalnych mechanizmów obronnych żywego organizmu. Dimer lizozymu stymuluje aktywność komórek żernych aktywując fagocytozę, a ponadto wzmacnia produkcję interferonu alfa oraz moduluje syntezę czynnika nekrotyzującego nowotwory TNF. Odznacza się równocześnie bardzo małą toksycznością (6, 8). Związek ten jest

zdimeryzowaną formą lizozymu otrzymywanego z białka jaja kurzego (8).

Niniejsze badania nad mrożeniem nasienia knura wykazały, iż niewielki dodatek dimeru lizozymu spowodował poprawę ruchliwości plemników i zmniejszenie „wycieku” AspAT w czasie ekwilibracji w temperaturze 5°C. Ten pozytywny, bliżej nie zdefiniowany wpływ dimeru na stabilność błon aparatu wstawkowego plemnika knura został utrzymany również po rozmrożeniu gamet. Opisanemu wyżej istotnemu wzrostowi wymienionych wskaźników jakości mrożonego nasienia knura, nie towarzyszył jednak wzrost wartości odsetka niezmiennych akrosomów, zarówno przed jak i po zamrożeniu/rozmrożeniu gamet.

Podsumowanie

Dimer lizozymu dodany do świeżego nasienia knura w ilości 4 lub 6 µg na 1 ml na wstępnym etapie technologii zamrażania, może wpływać korzystnie na wstawkowy aparat ruchu plemników konfekcjonowanych i zamrażanych w słomkach płaskich. Informuje o tym statystycznie istotnie wyższa średnia wartość odsetka plemników o ruchu postępowym oraz istotnie niższa wartość aktywności AspAT w porównaniu z próbą kontrolną, zarówno przed jak i po rozmrożeniu nasienia.

Piśmiennictwo

1. *Bwanga C. O.*: Cryopreservation of boar semen: A Literature review. *Acta Vet. Scand.* 1991, 32, 431-453.
2. *Darin-Bennet A., White J. G.*: Influence of cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology* 1977, 14, 466-477.
3. *Dee Lecuw F. E., Ching-Chen H., Colenbrander B., Verkleij A. J.*: Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 1990, 27, 171-83.
4. *De Lecuw F. E., Colenbrander B., Verkleij A. J.*: The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Dom. Anim. Suppl.* 1, 1991, 95-104.
5. *Dubiel A., Bielas W., Niżański W.*: The effect of Lysozyme dimer (KLP-602) on stallion spermatozoa depending on method of preservation at low temperatures.

6. *Garbuliński T.*: Lydium – KLP w farmakoterapii weterynaryjnej. *Życie wet.* 1994, 69, 137-138.
7. *Głogowski J., Strzeżek J.*: Badania nad składem rozcieńczalnika do mrożenia nasienia knura. Zależność pomiędzy białkami plazmy nasienia knura i lipoproteinami żółtka jaja kurzego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 1986, 263, 241-253.
8. *Kiczka W.*: Od monomeru do dimeru lizozymu. *Życie wet.* 1994, 69, 131-136.
9. *Larson K.*: Current research on the deep freezing of boar semen. *World Rev. Anim. Reprod.* 1978, 14, 59-64.
10. *Niżański W., Dubiel W., Bielas W.*: Effect of lysozyme dimer on the quality of deep frozen dog semen. *Proc. 14th Internat. Congr. Animal Reprod., Stockholm 2-6 July 2000, Abstracts t. 2, s.164.*
11. *Parks J. E., Lynch D. V.*: Lipid composition and the thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992, 29, 255-272.
12. *Pursel V. G., Johnson L. A., Schulman L. L.*: Effect of dilution, seminal plasma, and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 1973, 37, 528-531.
13. *Pursel V. G., Schulman L. L., Johnson L. A.*: Effect of Orvus-Es paste on acrosome, morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.* 1978, 47, 198-202.
14. *Pursel V. G., Park C. S.*: Duration of thawing on post acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5 ml maxi-straws. *Theriogenol.* 1987, 28, 683-690.
15. *Reitman S., Frankel S.*: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 1957, 28, 56-63.
16. *Strzeżek J., Głogowski J., Śmigielska J., Czeżot H.*: Testy enzymatyczne w zastosowaniu do oceny stanu błon cytoplazmatycznych plemników po zamrożeniu w ciekłym azocie. *ART-Olsztyn* 1979, s.1-20.
17. *Tamuli M. K., Watson P. F.*: Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation. *Vet. Rec.* 1994, 13, 160-162.
18. *Watson P. F.*: Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 1975, 97, 12-15.
19. *Watson P. F., Plummer J. M.*: The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *W: Proc. Ist. Conf. Deep Freezing of Boar Semen.* (red.) Johnson L. A., Larsson K., Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala, 1985, s.113-125.
20. *Watson P. F.*: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fert. Develop.* 1995, 7, 871-891.

Adres autora: dr Wiesław Bielas, ul. Długa 46/6, 53-658 Wrocław; e-mail: bielas@ozi.ar.wroc.pl

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

ZBIGNIEW DUDA: Angielsko-polski słownik terminologiczno-frazeologiczny nauki o mięsie i technologii mięsa. Wyd. Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowe fleisch maschaft – Polska Sp. z o.o. Świdwin, 2002. str. 195, ryc. barwnych 8. ISBN 83-916071-0-0

Słownik jest cennym i aktualnie w Polsce jedynym tego typu opracowaniem. Prof. Z. Duda, znany technolog żywności zwierzęcego pochodzenia, zadał sobie niemały trud zebrania 4353 głównych (wyczerpionych) haseł i co najmniej drugie tyle określeń pochod-

nych. Słownik jest cenną pozycją, która będzie bezsprzecznie pomocą dla wielu służb mających kontakt z anglosaską strefą językową. Wskazany byłoby, aby książkę tę mieli w swej dyspozycji także lekarze wet., inspekcji weterynaryjnej, wykonujący nadzór nad obrotem międzynarodowym żywności zwierzęcego pochodzenia. Autor przygotowuje obecnie odwrotną wersję wym. książki, tj. Polsko angielski słownik terminologiczno-frazeologiczny... i można nie wątpić, że będzie to podobnie dobra pozycja.

E. K. Prost

