

Doskonalenie kriokonserwacji nasienia jelenia szlachetnego pobranego metodą sztucznej pochwy

WIESŁAW DEMIANOWICZ, ZYGMUNT GIŻEJEWSKI, DOROTA KUBIAK,
RADOSŁAW KOWALSKI, JAN GLOGOWSKI

Zakład Andrologii Molekularnej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Demianowicz W., Giżejowski Z., Kubiak D., Kowalski R., Glogowski J.

Improvement of the cryopreservation of red deer (*Cervus elaphus* L.) semen collected with an artificial vagina

Summary

Cryopreservation of red deer sperm is essential for establishing the biodiversity of this species. The aim of the study was to test four extenders and two freezing methods on the cryosurvival of red deer spermatozoa. Semen collected with an artificial vagina from 4 stags was diluted with compared extenders: A (citrate-fructose-egg yolk-glycerol), B (Tris-fructose-citric acid-egg yolk-glycerol), C (Triladyl® with egg yolk) and D (Bioxcell®). Sperm, loaded into 0.25 ml straws, was frozen in nitrogen vapor (method L) and in the Minicool 40 PC (method M) cryogenic unit. After thawing the motility of spermatozoa was evaluated subjectively. Viability was assessed using nigrosin-eosin (N-E test), SYBR-14 with propidium iodide (L/D test) and hypoosmotic swelling test (test HOS) to detect membrane integrity. The best post-thaw motility was obtained with the use of extender D ($43.0 \pm 14.2\%$). Similarly, more viable spermatozoa ($p < 0.05$) at N-E and L/D tests ($42.4 \pm 11.3\%$ and $39.9 \pm 14.0\%$ respectively) were preserved in extender D. The lowest results in those tests were received in extender A. The percentage of HOST-responsive spermatozoa was higher ($p < 0.05$) in method M than in L ($19.8 \pm 9.8\%$ vs $14.3 \pm 7.6\%$), independently of the utilized extenders. In conclusion, the use of extender D in combination with freezing method M significantly improved freezability of red deer spermatozoa.

Keywords: red deer, cryopreservation, sperm

Zastosowanie biotechnologicznych metod w rozrodzie ma duże znaczenie w tworzeniu banków genomów zwierząt nieudomowionych oraz zagrożonych wyginięciem (15). Powinny one służyć do utrzymania małych populacji dzikich gatunków i podgatunków oraz zmniejszenia wpływu inbrodu, często występującego na skutek terytorialnych ograniczeń ich występowania oraz gospodarki łowieckiej (4, 24). Zgromadzony materiał genetyczny może być wykorzystywany do zapewnienia bioróżnorodności w populacjach, jak również do badań i pełniejszego zrozumienia ich biologii rozrodu (15, 19, 23).

Kriokonserwacja nasienia i inseminacja wciąż pozostają najczęściej stosowanymi biotechnikami rozrodu jeleniowatych (1). Zamrożone nasienie przy rozwijającej się fermowej hodowli jeleni szlachetnych oraz danieli staje się przedmiotem wymiany między ośrodkami krajowymi i zagranicznymi. Procedury stosowane do konserwacji nasienia nieudomowionych przeżuwaczy są najczęściej modyfikacjami standardowych metod używanych w rozrodzie zwierząt domowych (3, 9, 28). Stwierdzono jednak znaczne różni-

cowanie wrażliwości plemników na skład rozcieńczalników oraz parametry procesu mrożenia między poszczególnymi gatunkami i osobnikami (1, 9, 19).

Większość rozcieńczalników wprowadzonych do konserwacji nasienia jeleni oparta jest na bazie cytrynianu sodu lub Tris z udziałem żółtka jaja kurzego oraz glicerolu jako krioprotektora (3, 6-8, 18). Żółtko zawiera lipoproteiny chroniące plazmolemę plemników w procesie zamrażania, jednakże w jego skład wchodzi związek, który może mieć negatywny wpływ na przeżywalność plemników (5, 8). Nie bez znaczenia jest obecność zwierzęcego białka w rozcieńczalnikach i potencjalna możliwość przenoszenia czynników patogennych (5, 26). Stąd w praktyce kriokonserwacji stosowane są często komercyjne rozcieńczalniki nie zawierające składników pochodzenia zwierzęcego (28).

Pozyskiwanie nasienia od samców zwierząt nieudomowionych następuje wiele problemów. Najczęściej wykorzystuje się plemniki z ogona najądrzy, pozyskiwane *post mortem* (6, 8, 20, 21, 24, 28). Środowisko, w jakim znajdują się plemniki najądrzowe, nie odpo-

wiada pełnemu nasieniu, co może powodować obniżenie ich przydatności do kriokonserwacji (21). Różnice we właściwościach błon plazmatycznych plemników najądrzowych i ejakulowanych mogą mieć wpływ na przeżywalność komórek po mrożeniu (6), stąd podejmowane są próby uzupełniania płynów plazmą nasienia (20).

W ośrodkach hodowlanych lub ogrodach zoologicznych stosowane jest pozyskiwanie nasienia metodą elektro ejakulacji (3, 9). Opracowanie metody pozyskiwania nasienia jelenia szlachetnego przy użyciu sztucznej pochwy umożliwiło prowadzenie badań na pełnych ejakulatach w ciągu kolejnych sezonów rozrodczych (12-14).

Oprócz podstawowego kryterium oceny skuteczności kriokonserwacji, jakim jest ruchliwość plemników po mrożeniu-rozmrożeniu (2, 11, 24), coraz częściej stosowane są testy do morfologicznej oceny integralności plazmoemy plemników. Zastosowanie nigrozyny-eozyny pozwala na zróżnicowanie plemników żywych i obumarłych (2, 6, 8). Do barwień fluoroscencyjnych nasienia przeżuwaczy stosowany jest SYBR-14 w połączeniu z jodkiem propydyiny (10, 11, 27). Powyższe barwienia pozwalają na obiektywną ocenę stanu membran i są przydatne do prognozowania skuteczności zapłodnień w testach *in vitro* oraz biologicznych próbach polowych (2, 16). Duże znaczenie w procesie zapłodnienia ma funkcjonalny stan plazmoemy w obrębie witki. Zachowanie się plemników w środowisku hypoosmotycznym jest wykorzystywane w teście HOS (hypoosmotic swelling test). Test HOS jest stosowany przez wielu autorów do oceny jakości nasienia (2, 6, 8, 9) i może świadczyć o potencjalnej zdolności zapładniającej (wartości biologicznej) plemników (24).

Większość autorów stosuje do konfekcjonowania nasienia słomki o pojemności 0,25 ml, a proces mrożenia przeprowadzany jest w parach ciekłego azotu na określonej wysokości nad jego powierzchnią (22, 24). W odróżnieniu od powyższej metody zastosowanie urządzeń do komputerowo sterowanego mrożenia materiału biologicznego (3, 20) pozwala na programowanie tempa schładzania w wybranych zakresach temperatur, zapewniając powtarzalność procedur kriokonserwacji.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu różnych rozcieńczalników oraz wybranych procedur mrożenia ejakulatów jelenia szlachetnego, uzyskanych metodą sztucznej pochwy, na przeżywalność i jakość plemników poddanych kriokonserwacji.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 24 próbkach nasienia jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus* L.). Nasienie pobierano w warunkach fermowych od 4 dojrzałych płciowo byków w wieku od 2,5 do 12 lat w Popielnie w okresie wrzesień-listopad w latach 2004-2006, przy użyciu zmodyfikowanej sztucznej pochwy (12). Bezpośrednio po pobraniu każdego ejakulatu białą frakcję nasienia dzielono na cztery

części i wstępnie rozrzedzano odpowiednimi rozcieńczalnikami w proporcji 1 : 3. Do rozrzedzenia nasienia użyto czterech rozcieńczalników: rozcieńczalnika A (cytrynian sodu-fruktoza-żółtko jaja kurzego-glicerol) (18), rozcieńczalnika B (Tris-fruktoza-kwas cytrynowy-żółtko jaja kurzego-glicerol) (7), rozcieńczalnika C (Triladyl® Minitube) oraz rozcieńczalnika D (Bioxcell® IMV). Po przewiezieniu do laboratorium i określeniu koncentracji metodą cytometryczną w komorze Bürkera, nasienie rozrzedzano do końcowej koncentracji $40 \times 10^6/\text{ml}$ oraz oceniono odsetek plemników ruchliwych. Badane próbki konfekcjonowano w 0,25 ml słomkach i ekwilibrowano w temperaturze $+4^\circ\text{C}$. Czas między pobraniem nasienia a jego mrożeniem wynosił około 4 godzin.

Mrożenie przeprowadzono przez 10 minut na styropianowych ramkach 4 cm nad powierzchnią ciekłego azotu (metoda L) oraz z wykorzystaniem urządzenia Minicool 40PC (Air Liquide) do sterowanego komputerowo procesu kriokonserwacji (metoda M). Zaprogramowane tempo mrożenia wynosiło, odpowiednio: w zakresie od $+4^\circ\text{C}$ do -10°C $5^\circ\text{C}/\text{min.}$, od -10°C do -100°C $40^\circ\text{C}/\text{min.}$ i od -100°C do -140°C $20^\circ\text{C}/\text{min.}$ Po zamrożeniu nasienie przechowywano w ciekłym azocie przez okres co najmniej 3 miesiące. Próbki nasienia rozmrażano w temperaturze 38°C w czasie 30 sekund i wykorzystano do przeprowadzenia testów oceny jakości plemników.

Odsetek plemników ruchliwych określono w temperaturze 38°C przy użyciu mikroskopu kontrast-fazowego i 400-krotnego powiększenia. Do barwień fluoroscencyjnych wykorzystano test Live/Dead® (Molecular Probes). Do 0,1 ml rozmrożonego nasienia dodano 1 μl roztworu roztworu SYBR-14 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie dodano 1 μl roztworu jodku propydyiny i po kolejnych 10 minutach inkubacji wykonano mokre preparaty. Do oceny wybarwień stosowano mikroskop Olympus BX40 z filtrami NB i NG. Plemniki świecące zielono określono jako żywe w teście L/D. W każdej próbie oceniano 200 plemników. Do określenia integralności błon plazmatycznych kriokonserwowanych plemników zastosowano również barwienie nigrozyna-eozyna. Na podgrzane do 37°C szkiełko nanoszono nasienie i barwnik, mieszano i po 30 sekundach wykonano rozmaz. Po wysuszeniu określono stopień wybarwienia 200 plemników pod 400-krotnym powiększeniem. Stan plazmoemy wyrażano odsetkiem komórek, które pozostały niewybarwione (żywe) w teście N-E. Dodatkowo do oceny stanu błon komórkowych wykorzystano zachowanie się plemników w środowisku o obniżonym ciśnieniu osmotycznym. Do 0,01 ml rozmrożonego nasienia dodawano 0,1 ml hypoosmotycznego roztworu cytrynianu sodu (100 mOsm/kg) i po inkubacji w temperaturze pokojowej przez 30 minut utrwalono próbki w zbuforowanym 2% roztworze aldehydu glutarowego. Jednocześnie wykonano próby kontrolne, zastępując hypoosmotyczny roztwór odpowiednimi rozcieńczalnikami wyjściowymi. Plemniki mające charakterystyczne zawinięcie witek oceniono jako reagujące dodatnio w teście HOS.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując program Graph PadPrism, stosując analizę wariancji (ANOVA), zaś zależności między badanymi parametrami oceniono testem Pearsona.

Wyniki i omówienie

W pobranych ejakulatach średnia koncentracja plemników wynosiła $1,93 \times 10^9/\text{ml} \pm 0,73$ i wahała się od 0,45 do $3,96 \times 10^9/\text{ml}$.

Odsetek ruchliwych plemników w rozrzedzonych próbach nasienia przed mrożeniem wynosił od $49,3 \pm 15,0\%$ w rozcieńczalniku A do $61,2 \pm 11,3\%$ w rozcieńczalniku D (tab. 1). Wartości uzyskane w rozcieńczalniku D były statystycznie istotnie wyższe ($p < 0,05$) w porównaniu z pozostałymi wariantami. Po kriokonserwacji średni odsetek ruchliwych plemników różnił się statystycznie istotnie między poszczególnymi rozcieńczalnikami i wynosił od $25,4 \pm 10,9\%$ w rozcieńczalniku A do $43,0 \pm 14,2\%$ w rozcieńczalniku D niezależnie od metody mrożenia (tab. 1).

Odsetek plemników żywych, ocenianych w teście L/D był istotnie wyższy w nasieniu konserwowanym rozcieńczalnikami A i B (tab. 1). Test N-E zastosowany do określenia odsetka komórek żywych również wykazał statystycznie istotne różnice między wariantami rozcieńczalnika niezależnie od metody kriokonserwacji. Wartość tej cechy dla plemników w rozcieńczalniku D ($42,4 \pm 11,3\%$) istotnie różniła się od pozostałych, wśród których w rozcieńczalniku A odsetek ten był najniższy ($25,2 \pm 13,5\%$). Liczba plemników reagujących dodatnio w teście HOS nie różniła się statystycznie istotnie między typami zastosowanych rozcieńczalników.

W tab. 2 przedstawiono wartości badanych parametrów nasienia po zastosowaniu dwóch metod mrożenia niezależnie od użytych rozcieńczalników. Odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu oraz plemników żywych w teście L/D i N-E był nieznacznie wyższy w metodzie mrożenia M, jednak nie różnił się statystycznie istotnie od uzyskanych wyników w metodzie L. Istotnie wyższy odsetek plemników reagujących dodatnio w teście HOS stwierdzono w nasieniu

Tab. 1. Wpływ rozcieńczalnika niezależnie od metod mrożenia na badane parametry nasienia ($n = 24$; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Parametr	Typ rozcieńczalnika			
	A	B	C	D
Odsetek plemników ruchliwych po rozrzedzeniu	$49,3 \pm 15,0^a$	$51,7 \pm 12,2^{ab}$	$54,3 \pm 12,0^b$	$61,2 \pm 11,3^c$
Odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu	$25,4 \pm 10,9^a$	$30,7 \pm 9,3^b$	$35,1 \pm 10,4^c$	$43,0 \pm 14,2^d$
Odsetek plemników żywych po rozmrożeniu (test L/D)	$30,3 \pm 13,6^a$	$33,4 \pm 13,4^{ac}$	$36,9 \pm 14,2^{bc}$	$39,9 \pm 14,0^b$
Odsetek plemników żywych po rozmrożeniu (test N-E)	$25,2 \pm 13,5^a$	$34,2 \pm 11,3^b$	$35,1 \pm 11,7^b$	$42,4 \pm 11,3^c$
Odsetek plemników reagujących dodatnio po rozmrożeniu (test HOS)	$15,7 \pm 9,7$	$15,2 \pm 8,3$	$16,4 \pm 9,3$	$19,3 \pm 8,7$

Objaśnienia: wartości w wierszach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$)

Tab. 2. Wpływ metody mrożenia niezależnie od stosowanego rozcieńczalnika na wybrane parametry nasienia po rozmrożeniu ($n = 24$; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Parametr	Metoda mrożenia	
	L	M
Odsetek plemników ruchliwych	$32,8 \pm 12,7$	$34,4 \pm 13,3$
Odsetek plemników żywych (test L/D)	$34,0 \pm 14,2$	$36,4 \pm 14,0$
Odsetek plemników żywych (test N-E)	$32,4 \pm 13,0$	$36,6 \pm 13,5$
Odsetek plemników reagujących dodatnio (test HOS)	$14,3 \pm 7,6^a$	$19,8 \pm 9,8^b$

Objaśnienia: jak w tab. 1.

konserwowanym metodą M ($19,8 \pm 9,8\%$) w porównaniu do metody L ($14,3 \pm 7,6\%$).

Szczegółowe wyniki mrożenia próbek nasienia w poszczególnych rozcieńczalnikach i różnymi metodami przedstawiono w tab. 3. Odsetek plemników, które po mrożeniu-rozmrożeniu były ruchliwe, osiągnął wartość $45,2 \pm 13,9\%$ w przypadku zastosowania rozcieńczalnika D oraz metody M i różnił się statystycznie istotnie od wartości w rozcieńczalnikach A i B bez względu na metodę mrożenia. W rozcieńczalniku C uzyskany odsetek ruchliwości ($35,0 \pm 10,4\%$ dla me-

Tab. 3. Wpływ rozcieńczalnika i metody mrożenia na wybrane parametry nasienia po rozmrożeniu ($n = 24$; $\bar{x} \pm \text{SD}$)

Parametry	Mrożenie L				Mrożenie M			
	Typ rozcieńczalnika				Typ rozcieńczalnika			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Odsetek plemników ruchliwych	$25,2 \pm 10,5^a$	$30,0 \pm 9,7^a$	$35,0 \pm 10,4^{ab}$	$41,0 \pm 14,4^b$	$25,7 \pm 11,5^a$	$31,4 \pm 9,1^a$	$35,2 \pm 10,5^{ab}$	$45,2 \pm 13,9^b$
Odsetek plemników żywych (test L/D)	$30,1 \pm 14,4^a$	$31,7 \pm 14,7^a$	$35,9 \pm 15,0^{ab}$	$39,5 \pm 15,4^b$	$30,9 \pm 14,4^a$	$35,4 \pm 12,9^{ab}$	$39,2 \pm 14,2^b$	$40,3 \pm 13,8^b$
Odsetek plemników żywych (test N-E)	$23,8 \pm 13,3^a$	$30,7 \pm 11,4^{ab}$	$33,6 \pm 11,1^{ab}$	$41,7 \pm 10,3^b$	$27,1 \pm 14,4^a$	$39,0 \pm 9,6^{ab}$	$37,0 \pm 12,9^{ab}$	$43,3 \pm 13,2^b$
Odsetek plemników reagujących dodatnio (test HOS)	$14,3 \pm 9,4^{ab}$	$10,8 \pm 5,4^a$	$12,4 \pm 9,4^a$	$18,3 \pm 6,6^{ab}$	$15,7 \pm 11,3^{ab}$	$21,0 \pm 8,3^b$	$21,1 \pm 9,0^b$	$21,3 \pm 10,8^b$

Objaśnienia: jak w tab. 1.

tody L i $35,2 \pm 10,5\%$ dla metody M) nie różnił się istotnie od pozostałych wersji rozcieńczalników. Zbliżone wyniki uzyskano przy ocenie odsetka plemników żywych (test L/D), które dla rozcieńczalnika D wynosiły $39,5 \pm 15,4\%$ dla metody L i $40,3 \pm 13,8\%$ dla metody M i różniły się istotnie statystycznie w porównaniu z wartościami dla rozcieńczalnika A ($30,1 \pm 14,4\%$ dla L i $30,9 \pm 14,4\%$ dla M) oraz rozcieńczalnika B w metodzie L ($31,7 \pm 14,7\%$). Najniższy odsetek plemników niewybarwionych (żywych) w teście N-E stwierdzono w nasieniu konserwowanym w rozcieńczalniku A ($23,8 \pm 13,3\%$ dla metody L i $27,1 \pm 14,4\%$ dla metody M). Był on statystycznie istotnie niższy niż uzyskany w wariacie z rozcieńczalnikiem D (odpowiednio $41,7 \pm 10,3\%$ i $43,3 \pm 13,2\%$). W pozostałych wersjach konserwacji (B i C), zarówno w metodzie mrożenia L, jak i M nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zależności od rozcieńczalnika A i D w zakresie omawianej cechy. Mrożenie metodą M w rozcieńczalnikach B, C, D skutkowało istotnie wyższym odsetkiem plemników reagujących dodatnio w teście HOS niż zastosowanie metody L z wykorzystaniem rozcieńczalnika B i C. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic między metodami mrożenia w rozcieńczalnikach A i D.

Wszystkie badane cechy nasienia po procesie mrożenia-rozmrożenia wykazały wzajemnie istotne statystycznie korelacje dodatnie (tab. 4).

Zastosowanie zmodyfikowanej sztucznej pochwy pozwoliło na wydzielenie różnych frakcji w pobranych ejakulatach (12). Okres pobierania nasienia odpowiadał fazie rykowiska właściwego, kiedy biała frakcja nasienna zawierająca plemniki, charakteryzuje się najwyższą wartością biologiczną (13). Średnia koncentracja plemników w badanych próbach nasienia zbliżona była do uzyskanej w poprzednich badaniach (14). Stosunkowo niski średni odsetek plemników ruchliwych przed mrożeniem, po rozrzedzeniu różnymi rozcieńczalnikami może wynikać z określonych warunków pobierania nasienia na fermie. Do konserwacji były wykorzystane ejakulatory jeleni w różnym wieku i nie prowadzono selekcji prób pod względem ruchliwości plemników w świeżym nasieniu. Uzyskane odsetki ruchliwości plemników po mrożeniu-rozmrożeniu potwierdziły różną przydatność zastosowanych rozcieńczalników do kriokonserwacji. Odsetek plemników, które przeżyły proces mrożenia-rozmrażania, obliczony przez porównanie odsetka komórek ruchliwych po rozmrożeniu w stosunku do odsetka plemników po rozrzedzeniu, wynosił w naszych badaniach, odpowiednio, dla rozcieńczalnika A – $51,6\%$, dla B – $59,8\%$ oraz $68,2\%$ dla rozcieńczalnika C i $74,0\%$ dla D. Najniższą ruchliwością zarówno przed, jak i po mrożeniu, charakteryzowało się nasienie rozrzedzane rozcieńczalnikiem A na bazie cytrynianu sodu.

Podobne wyniki uzyskali Cheng i wsp. (3), którzy oceniali przydatność 5 typów rozcieńczalników do

Tab. 4. Współczynniki korelacji pomiędzy wybranymi parametrami nasienia rozmrożonego

1	Odsetek plemników ruchliwych	1			
2	Odsetek plemników żywych (test L/D)	0,81*	2		
3	Odsetek plemników żywych (test N-E)	0,72*	0,74*	3	
4	Odsetek plemników reagujących dodatnio (test HOS)	0,62*	0,71*	0,60*	4

Objaśnienia: * – istotność przy $p \leq 0,001$

kriokonserwacji nasienia 2 gatunków jeleni. Autorzy ci wykazali, że ruchliwość plemników konserwowanych rozcieńczalnikiem cytrynianowym była najniższa wśród badanych typów mediów i wynosiła zależnie od gatunku od $13,0 \pm 6\%$ do $26 \pm 12\%$. Garde i wsp. (9) również badali wpływ różnych rozcieńczalników na jakość nasienia 3 gatunków gazeli. Nasienie rozrzedzane rozcieńczalnikiem cytrynianowo-żółtkowym wykazywało statystycznie istotnie niższy odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu wobec wersji rozcieńczalników na bazie Tris, niezależnie od pochodzenia gatunkowego. Ponadto stwierdzono zbliżoną przydatność obydwu typów rozcieńczalników do mrożenia plemników najądrzowych alpaki (22). Badania te wskazują na duże zróżnicowanie gatunkowe właściwości nasienia konserwowanego przy użyciu różnych rozcieńczalników.

Ponieważ rozcieńczalniki oparte na Tris dają lepszą ochronę plemników jelenia szlachetnego, zostały szeroko wprowadzone do badań nad wpływem różnych czynników na wartość biologiczną mrożonego nasienia (6, 9, 24). Uzyskane w tych badaniach odsetki plemników ruchliwych po rozmrożeniu wynosiły od $42,8 \pm 1,6\%$ (18) do $51,2 \pm 1,4\%$ (8). Na ich poziom wpłynęła wstępna selekcja prób nasienia najądrzowego, bowiem do kriokonserwacji użyto jedynie prób o ruchliwości wyjściowej nie mniejszej niż, odpowiednio, 65% i 80% . Zależność ruchliwości plemników oraz stanu ich błon przed mrożeniem a wartością nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu potwierdzają również badania innych autorów (6, 9, 20, 24).

Do konserwacji nasienia wykorzystano również komercyjne rozcieńczalniki, stosowane w praktyce inseminacyjnej (24). Przeżywalność plemników po rozmrożeniu była zbliżona i nie różniła się statystycznie istotnie w porównaniu z rozcieńczalnikami na bazie Tris. Zambroszky i wsp. (28) zastosowali Triladyl® i Bioxcell® do kriokonserwacji nasienia najądrzowego jelenia szlachetnego i daniela. Nasienie jelenia rozrzedzane rozcieńczalnikiem Triladyl® wykazywało średnio 37% ruchliwości, zaś nasienie daniela 38% . Zastosowanie rozcieńczalnika Bioxcell® dla nasienia daniela obniżyło ten odsetek do $21,9\%$. Obydwa rozcieńczalniki zastosowane w niniejszych badaniach pozwoliły uzyskać, niezależnie od metody mrożenia,

statystycznie istotnie wyższy odsetek plemników ruchliwych po kriokonserwacji w porównaniu z pozostałymi typami rozcieńczalników.

Wprowadzenie do badań kombinacji barwników fluorochromowych SYBR-14 i jodku propydydy jest szybką i powtarzalną metodą dla określenia proporcji żywych i martwych plemników w nasieniu ssaków (10). Odsetek żywych komórek jest istotnie dodatnio skorelowany z odsetkiem plemników ruchliwych oraz innymi klasycznymi metodami oceny nasienia (27) czy fluorometrycznymi wyznacznikami aktywności mitochondrialnej wstawki (11). Zależności te zostały również stwierdzone w naszych badaniach, w których uzyskaliśmy statystycznie istotne dodatnio zależności między testem L/D a pozostałymi ocenianymi parametrami. Podobnie test N-E wykorzystywany był do oceny odporności plazmatycznych błon plemników na dyfuzję barwników (2) i stosowany do oceny przydatności nasienia do inseminacji oraz zapłodnienia *in vitro* (25).

Zachowanie integralności plazmolemy w obrębie główki plemników było w naszym eksperymencie zróżnicowane w zależności od zastosowanych rozcieńczalników. Najwyższy odsetek plemników prawidłowych, określonych jako żywe w obydwu testach stwierdzono w rozcieńczalniku D. Interesujące są wyższe odsetki plemników żywych ocenianych testem L/D w stosunku do odsetka plemników ruchliwych po rozmrożeniu w pozostałych ocenianych rozcieńczalnikach. Wyniki te świadczą o niższych właściwościach ochronnych tych rozcieńczalników wobec błon plazmatycznych plemników jelenia szlachetnego w obrębie wstawki i witki.

Wielu autorów zwraca uwagę na niższe odsetki plemników żywych, reagujących dodatnio w teście HOS w porównaniu do wartości uzyskiwanych w testach barwień przyżyciowych. Plemniki, których błony nie reagują na środowisko hypoosmotyczne, mogą mieć zachowaną zdolność nie przepuszczania barwników w obrębie główki (2, 17). Podobne rezultaty uzyskano w prezentowanych badaniach, potwierdzając obecność żywych komórek, mimo nieaktywnych funkcjonalnie błon w obrębie witki. Wyniki tego testu istotnie dodatnio korelują z pozostałymi testami oceny nasienia po mrożeniu-rozmrożeniu (2, 17, 25) oraz zdolnością zapładniającą plemników (17).

Zastosowanie dwóch metod mrożenia nie miało istotnego wpływu na uzyskane wyniki kriokonserwacji nasienia w różnych rozcieńczalnikach, poza wartościami odsetka plemników reagujących w teście HOS. Wykorzystanie sterowanego procesu mrożenia zapewniło stabilne warunki kriokonserwacji plemników, co mogło mieć wpływ na statystycznie wyższy odsetek komórek reagujących dodatnio w teście HOS.

Przeprowadzone badania wykazały, że najlepsze właściwości ochronne wobec konserwowanych plemników jelenia szlachetnego zapewniło zastosowanie rozcieńczalnika D oraz procedury komputerowo kontrolowanego mrożenia.

Piśmiennictwo

1. Asher G. W., Berg D. K., Ewans G.: Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal. Reprod. Sci.* 2000, 62, 195-211.
2. Brito L. F. C., Barth A. D., Bilodeau-Goeseels S., Panich P. L., Kastelic J. P.: Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology* 2003, 60, 1539-1551.
3. Cheng F. P., Wu J. T., Chan J. P. W., Wang J. S., Fung H. P., Colenbrander B., Tung K. C.: The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology* 2004, 61, 1605-1616.
4. Comizzoli P., Mermillod P., Mauget R.: Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod. Nutr. Dev.* 2000, 40, 493-504.
5. Demianowicz W., Strzeżek J.: Właściwości biologiczne plemników buhaja konserwowanych w różnych typach rozcieńczalników. *Medycyna Wet.* 1990, 46, 449-451.
6. Esteso M. C., Soler A. J., Fernandez-Santos M. R., Quintero-Moreno A., Garde J. J.: Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J. Androl.* 2006, 27, 662-670.
7. Evans G., Maxwell W. M. C.: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth, Sydney 1987, 107-141.
8. Fernandez-Santos M. R., Esteso M. C., Montoro V., Soler A. J., Garde J. J.: Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology* 2006, 66, 1931-1942.
9. Garde J. J., Soler A. J., Cassinello J., Crepsco C., Malo A. F., Espeso G., Gomen-dino M., Roldan E. R. S.: Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorh*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 2003, 69, 602-611.
10. Garner D. L., Johnson L. A.: Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 1995, 53, 276-284.
11. Garner D. L., Thomas C. A., Joerg H. W., Dejarnette J. M., Marshall C. E.: Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 1401-1406.
12. Giżejowski Z.: Improving the artificial vagina for the separation of fractions in the ejaculate of red deer. *Animal Sci. Papers and Reports* 2000, 18, 145-151.
13. Giżejowski Z.: Wpływ sezonu na ilościowe i jakościowe cechy nasienia jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus L.*) z uwzględnieniem zachowania płciowego. *Rozprawy i Monografie, UWM Olsztyn* 2002, nr 54, 5-49.
14. Giżejowski Z., Snochowski M., Mayntz M.: Fractions of the semen of red deer (*Cervus elaphus*) – their occurrence and characteristics in different periods of season. *Polish J. Vet. Sci.* 2003, 6, 219-223.
15. Holt W. V., Pickard A. R.: Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Reprod.* 1999, 4, 143-150.
16. Januskauskas A., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H.: Assessment of sperm quality through fluometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 2001, 55, 947-961.
17. Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez-Pelaez M., Crabo B. G., Zaneveld L. J. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 1984, 70, 219-228.
18. Krzywiński A., Jaczewski Z.: Observations on the artificial breeding of red deer. *Symp. Zool. Soc. London* 1978, 43, 271-287.
19. Leibo S. P., Songsasen N.: Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002, 57, 303-326.
20. Martinez-Pastor F., Anel L., Guerra C., Alvarez M., Soler A. J., Garde J. J., Chamorro C., de Paz P.: Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 2006, 66, 1847-1856.
21. Martinez-Pastor F., Guerra C., Kaabi M., Diaz A. R., Anel E., Herraez P., de Paz P., Anel L.: Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 2005, 63, 24-40.
22. Morton K. M., Bathgate R., Evans G., Maxwell W. M.: Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-tris-and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod. Fert. Develop.* 2007, 19, 792-796.
23. Pukazhenti B., Comizzoli P., Travis A. J., Wildt D. E.: Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod. Fert. Develop.* 2006, 18, 77-99.
24. Soler A. J., Garcia A. J., Fernandez-Santos M. R., Esteso M. C., Garde J. J.: Effects of thawing procedure on post-thawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C . *J. Androl.* 2003, 24, 746-756.
25. Tartaglione C. M., Ritta M. N.: Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2004, 62, 1245-1252.
26. Thibier M., Guerin B.: Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 62, 233-251.
27. Thomas C. A., Garner D. L., Dejarnette J. M., Marshall C. E.: Fluorometric Assessments of Acrosomal Integrity and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1997, 56, 991-998.
28. Zomborszky Z., Nagy S., Nanassy L., Szabari M., Bodo S.: Experiences in deer sperm cryopreservation under practical conditions – A pilot study. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 90, 185-190.