Możliwości modyfikacji kriokonserwacji nasienia młodych buhajów o obniżonej podatności na zamrażanie¹⁾

BARBARA SZCZĘŚNIAK-FABIAŃCZYK, MICHAŁ BOCHENEK*,
PIOTR GOGOL, ZDZISŁAW SMORĄG

Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, Instytut Zootechniki PIB,
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice/Kraków

*Laboratorium Biologii Rozwoju, Małopolskie Centrum Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7A, 30-387 Kraków

Otrzymano 28.11.2019

Zaakceptowano 28.04.2020

Szczęśniak-Fabiańczyk B., Bochenek M., Gogol P., Smorąg Z.

Modified cryopreservation of semen of young bulls with reduced freezability

Summary

The aim of the study was to improve cryopreservation of young bulls' semen. Bioxcell and Tris extenders were modified by adding α -linoleic acid (ALA) or linoleic acid albumin (LAA). Non-modified Bioxcell extender was used as control. Semen diluted in modified, glycerol-free Tris extender was subjected to a longer equilibration (26-28 hours at +4°C). Thirty-one ejaculates collected from 12 bulls aged 12-17 months were used in this research. After collection, fresh semen was divided into 7 portions, and each portion was diluted in one of experimental diluents, as well as in the control diluent. After equilibration, semen was frozen in a freezer. Subsequently, the semen was thawed and its motility was assessed (approximately and by CSA) along with cell membrane integrity (SYBR-14 and PI). The highest motility was observed in Bioxcell diluent supplemented with α -linoleic acid (ALA), and it was significantly higher ($p \leq 0.5$) than in Bioxcell diluent (control). No significant differences in cell membrane integrity were observed between experimental groups that were subjected to a 2.5 hour equilibration. The extension of the equilibration time to 26-28 hours caused a significant ($p \leq 0.01$) decrease in both the motility and the cell membrane integrity of spermatozoa compared to semen frozen in Bioxcell diluent (control) as well as to all other experimental diluents. In the case of semen that did not meet qualitative standards (motility below 50%) when frozen in the control diluent, significantly better results ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$) in terms of motility (assessed approximately and by SCA) were observed when the semen was diluted in Bioxcell diluent supplemented with α -linoleic acid (ALA) as well as in Bioxcell diluent supplemented with linoleic acid albumin (LAA) ($p \leq 0.05$). No significant differences in cell membrane integrity were observed. The extension of equilibration time caused a significant ($p \leq 0.01$) decrease in both the motility and the cell membrane integrity of spermatozoa. The study confirmed the possibility of improving cryopreservation of young bulls' semen by modification of freezing diluents.

Keywords: young bull semen, cryopreservation, ALA, LAA

Plemniki buhaja stosunkowo dobrze znoszą procesy zamrażania i rozmrażania, a nasienie mrożone stosowane jest w hodowli bydła od ponad pół wieku. Technologia kriokonserwacji nasienia buhajów wykorzystuje obecnie komercyjne rozrzedzalniki produkowane na bazie trisu, kwasu cytrynowego, fruktozy i glicerolu, uzupełnianych żółtkiem jaja kurzego (Biladyl® i Triladyl® – Mini-tüb, Niemcy, Optidyl® – Cryovet, Francja). W niektórych ośrodkach jako pod-

stawowy składnik rozrzedzalnika używane jest świeże lub liofilizowane mleko (Laiciphos – IMV, Francja). Występujące w żółtku i mleku lipoproteiny niskiej gęstości (LDL), poprzez opłaszczanie błony komórkowej plemników, działają ochronnie i zmniejszają podatność plemników na szok chładowy powodowany procesem zamrażania i rozmrażania. Wykonane próby zastąpienia żółtka lipoproteinami niskiej gęstości wykazały korzystny wpływ na ruchliwość plemników, integralność błon oraz zapłodnienie *in vitro* (1, 2). W wyniku tego wprowadzono do praktyki następujące rozrzedzalniki,

¹⁾ Praca wykonana w ramach projektu BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG 2/297267/14/NCBR/2016.

w których zastąpiono żółtko jaja kurzego lecytyną uzyskaną z ziaren soi: Biociphos-Plus® i Bioxcell® (IMV, Francja) oraz AndroMed® (Mini-tüb, Niemcy).

Kriokonserwacja nasienia buhaja z wykorzystaniem rozrzedzalników komercyjnych pozwala na ogół uzyskać satysfakcjonujące wyniki płodności krów po inseminacji nasieniem mrożonym, niemniej jednak zdarzają się samce, od których otrzymuje się nasienie „słabej zamrażalności”, czyli po rozmrożeniu uzyskuje ono za niską ocenę odsetka plemników o ruchu prawidłowym. W związku z tym podejmowane są rozmaite próby uzyskania poprawy jakości nasienia mrożonego. Obejmują one zastosowanie dodatkowych, oprócz glicerolu, krioprotektantów (14) lub uzupełnianie składu rozrzedzalników antyutleniaczami, takimi jak cysteina czy glutation, osłaniających błony komórkowe plemników w trakcie procesu konserwacji (4, 15). Do rozrzedzonego nasienia dodawano cholesterol w postaci jego koniugatów, aby zmienić stosunek cholesterolu i fosfolipidów w błonie komórkowej (3, 10). Wykonano również próby włączania do składu rozrzedzalnika kwasów tłuszczowych wielonienasyconych (PUFA) rodziny n-3 i n-6 (6, 7, 13), wprowadzono także zmianę samej metody konserwacji polegającą na wydłużeniu ekwilibracji (13).

Podatność na zamrażanie nasienia młodych buhajów jest na ogół niższa niż nasienia buhajów dojrzałych. Wprowadzenie oceny genomowej bydła sprawiło, że informacje o wartości hodowlanej osobnika uzyskiwane są tuż po urodzeniu. To spowodowało chęć wcześniejszego rozpoczęcia rozplodowej eksploatacji buhajów i związanej z nią kriokonserwacji nasienia. Postanowiono sprawdzić, czy modyfikacja składu rozrzedzalnika oraz wydłużenie ekwilibracji przyczyni się do poprawy ruchliwości i obniżenia odsetka plemników z uszkodzoną błoną komórkową w nasieniu mrożonym pobranym od młodych buhajów.

Celem przeprowadzonych badań była ocena efektywności kriokonserwacji nasienia pochodzącego od młodych buhajów po zastosowaniu rozrzedzalników wzbogaconych dodatkiem kwasu α -linolenowego (ALA) lub albuminą kwasu linolowego (LAA) i poprzez wydłużenie czasu ekwilibracji.

Materiał i metody

Buhaje. Do badań wytypowano 12 młodych buhajów w wieku od 12 do 15 miesięcy, które utrzymywane były w Małopolskim Centrum Biotechniki w Krasnem: 7 rasy polskiej czerwonej (RP), 2 rasy polskiej czerwono-białej (RW), 1 rasy polskiej czarno-białej (ZB) i 2 rasy simentalskiej (SM). Wszystkie zwierzęta przebywały w jednakowych warunkach utrzymania i żywienia. Nasienie od powyższych buhajów pozyskiwano na sztuczną pochwę raz w miesiącu. Uzyskano łącznie 31 ejakulatów, od 2 do 4 ejakulatów od każdego samca.

Rozrzedzalniki. Rozrzedzalnikiem kontrolnym był komercyjny rozrzedzalnik Bioxcell® (IMV, Francja). Był on również podstawą dwóch modyfikacji.

Pozostałe 4 rozrzedzalniki doświadczalne były przygotowane na bazie wcześniej stosowanego w inseminacji bydła rozrzedzalnika Tris o następującym składzie: Tris-(hydroksymetyl)-aminometan – 36,05 g (Sigma), kwas cytrynowy – 20,24 g (Sigma), D-fruktoza – 14,88 g (Sigma), zestaw antybiotyków „Coctail AB” (Mini-tüb, Niemcy) oraz woda redetylowana do ogólnej objętości 1000 ml. Rozrzedzalnik podstawowy przygotowano zgodnie z instrukcją „Technologia mrożenia nasienia buhajów w słomkach” (11). Mieszaninę antybiotyków „Coctail AB” po rozpuszczeniu w wodzie redetylowanej dodawano w trakcie przygotowywania rozrzedzalnika tak, aby w 1 ml rozcieńczonego nasienia znajdowało się 50 μ g tylozyny, 250 μ g gentamycyny, 150 μ g spektynomycyny i 300 μ g linkomycyny.

Modyfikacje rozrzedzalników Bioxcell i Tris polegały na uzupełnieniu ich składu albuminą kwasu linolowego (LAA) lub kwasem α -linolenowym (ALA). Dla nasienia rozrzedzonego zmodyfikowanym rozrzedzalnikiem Tris zastosowano również wydłużenie czasu ekwilibracji.

LA – Linoleic Acid (kwas linolowy, $C_{18}H_{32}O_2$, C18:2 n-6) jest nienasyconym kwasem tłuszczowym o osiemnastowęglowym łańcuchu i 2 wiązaniach podwójnych: między 9. a 10. oraz 12. i 13. węglem. W badaniach przeprowadzonych przez Takahashi i wsp. (13), w których zastosowano dodatek albuminy kwasu linolowego do rozrzedzalnika cytrynianowo-żółtkowego uzyskano istotny wzrost odsetka plemników ruchliwych po rozmrożeniu w nasieniu buhaja o „niskiej zamrażalności”. Postanowiono więc sprawdzić, czy albumina kwasu linolowego poprawi wyniki oceny po rozmrożeniu nasienia pochodzącego od młodych buhajów. LAA (Linoleic acid albumin, Sigma) po rozpuszczeniu w wodzie redetylowanej dodawano w ilości 1 mg/1 ml (13) gotowego rozrzedzalnika Bioxcell i sporządzonych rozrzedzalników Tris.

ALA – α -Linolenic acid (kwas α -linolenowy, $C_{18}H_{30}O_2$, C18:3 n-3) jest kwasem wielonienasyconym, ma łańcuch również osiemnastowęglowy, 3 wiązania podwójne i pierwsze wiązanie podwójne występuje między 3. a 4. węglem (od końca z grupą metylową CH_3). W badaniach przeprowadzonych przez Kaka i wsp. (6, 7) ustalono, że najwyższe wyniki ruchliwości i odsetka nieuszkodzonych błon plemników po rozmrożeniu uzyskano po dodaniu 5 ng ALA do 1 ml rozrzedzalnika. Kwas α -linolenowy (ALA – α -Linolenic acid, Sigma) jest substancją oleistą, trudno rozpuszczalną w wodzie, rozpuszczano go w 0,05% roztworze alkoholu etylowego i dodawano do gotowego rozrzedzalnika Bioxcell oraz do sporządzonych rozrzedzalników Tris.

Składy modyfikowanych rozrzedzalników przedstawiono poniżej:

- R.1. Bioxcell wzbogacony dodatkiem albuminy kwasu linolowego (LAA – Linoleic acid albumin) w ilości 1 mg/1 ml rozrzedzalnika;
- R.2. Tris do jednostopniowego rozrzedzania nasienia z dodatkiem albuminy kwasu linolowego (LAA) w ilości 1 mg/1 ml rozrzedzalnika;
- R.3. Tris bez glicerolu do dwustopniowego rozrzedzania nasienia z dodatkiem albuminy kwasu linolowego (LAA) w ilości 1 mg/1 ml roztworu jako rozrzedzalnik do rozrzedzenia wstępnego oraz Tris z 14% zawartością glicerolu do rozrzedzenia ostatecznego przed konfekcjonowaniem w słomki i zamrożeniem;

- R.4. Bioxcell wzbogacony dodatkiem kwasu α -linolenowego (ALA – α -Linolenic acid) w ilości 5 ng/1 ml rozrzedzalnika;

- R.5. Tris do jednostopniowego rozrzedzania nasienia z dodatkiem kwasu α -linolenowego (ALA) w ilości 5 ng/1 ml rozrzedzalnika;

- R.6. Tris bez glicerolu do dwustopniowego rozrzedzania nasienia z dodatkiem kwasu α -linolenowego (ALA) w ilości 5 ng/1 ml roztworu jako rozrzedzalnik do rozrzedzenia wstępnego oraz Tris z 14% zawartością glicerolu do rozrzedzenia ostatecznego przed konfekcjonowaniem w słomki i zamrożeniem.

Postępowanie z nasieniem. Bezpośrednio po pobraniu oceniano objętość ejakulatu, koncentrację i ruchliwość plemników. Następnie nasienie dzielono na 7 części, a każdą z nich rozrzedzano jednym z rozrzedzalników doświadczalnych lub kontrolnym w ten sposób, aby w objętości 0,2 ml znajdowało się co najmniej 20 mln plemników ogółem.

Nasienie rozrzedzone rozrzedzalnikami: 1., 2., 4., 5. oraz kontrolnym konfekcjonowano w standardowych słomkach o poj. 0,2 ml i przenoszono do temperatury +4°C, a po 2,5-godzinnej ekwilibracji nasienie zamrażano we freezerze i przekładano do kontenerów z ciekłym azotem. Nasienie rozrzedzone wstępnie rozrzedzalnikami 3. i 6. oraz rozrzedzalnik Tris z 14% zawartością glicerolu przenoszono do temperatury +4°C na 26 do 28 godzin (długa ekwilibracja), po czym do nasienia dodawano odpowiednią objętość rozrzedzalnika Tris z glicerolem, konfekcjonowano w standardowych słomkach, zamrażano i przekładano do kontenerów z ciekłym azotem.

Po rozmrożeniu w łaźni wodnej o temperaturze +38°C nasienie poddawane było ocenie wykonanej w wyspecjalizowanym w diagnostyce andrologicznej laboratorium Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki PIB w Balicach. Obejmowała ona: szacunkową ocenę odsetka plemników o ruchu prawidłowym; komputerową ocenę CSA: ruch szybki, ruch szybki postępowy i ruch postępowy; cytometryczną ocenę integralności błony komórkowej plemników (odsetek plemników z nienaruszoną błoną komórkową).

Ocenę szacunkową przeprowadzały komisyjnie 2 osoby z długoletnim doświadczeniem. Nasienie oceniano w mikroskopie optycznym Nikon z kontrastem fazowym i stołkiem podgrzewczym pod powiększeniem 100 ×.

Oceny ruchu szybkiego, szybkiego postępowego i postępowego dokonywano przy użyciu komputerowego systemu analizy jakości nasienia (Sperm Class Analyzer, S.C.A V5.1, Microptic, Barcelona, Hiszpania). Nasienie oceniano w ośmiokomorowych szkiełkach Leja (Leja Products B.V., Holandia) o grubości preparatu 20 mikronów. Do komory wkraplano próbkę rozmrożonego nasienia o objętości 1 μ l. W obrębie preparatu oceniano 5 pól. Program komputerowy wyliczał średnie wartości. Ocenę wykonywały i weryfikowały te same osoby, które przeprowadzały ocenę szacunkową.

Ocenę integralności błon komórkowych wykonywano w cytometrze przepływowym (CytoFLEX, Beckman Coulter, USA) przy zastosowaniu podwójnego barwienia fluorochromami: SYBR-14 i jodkiem propidyny (PI) (Live/Dead Sperm Viability Kit, Thermofisher) (5). Podwójne

barwienie umożliwia kwalifikowanie plemników do trzech grup: plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową, z rozrwaną błoną oraz z uszkodzoną błoną komórkową, lecz jeszcze aktywnych metabolicznie. Jednocześnie z analizy eliminowane są często występujące w nasieniu zanieczyszczenia niekomórkowe.

Do oceny statystycznej zastosowano 3-czynnikową analizę wariancji wykonaną pakietem statystycznym SAS przy pomocy procedury GLM. W obliczeniach uwzględniono wpływ trzech czynników na badane cechy (ruchliwość ocenianą szacunkowo i parametry ruchu oceniane z wykorzystaniem komputerowej oceny CSA oraz odsetek plemników z nienaruszoną błoną komórkową): rozrzedzalnika jako czynnika stałego, buhaja jako czynnika losowego oraz wieku buhaja w dniu pobierania nasienia jako zmiennej towarzyszącej. Obliczenia wykonano według następującego modelu matematycznego:

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_j + \alpha x_{ijk} + e_{ijk}$$

gdzie:

Y_{ijk} – wartość badanej cechy,

m – średnia populacji,

a_i – efekt rozrzedzalnika,

b_j – efekt buhaja,

α – współczynnik regresji,

x_{ijk} – wiek buhaja (zmienna towarzysząca),

e_{ijk} – błąd losowy.

Istotność różnic stwierdzono testem F. Istotność różnic między średnimi oszacowano metodą najmniejszych kwadratów LSM przy pomocy procedury LSMEANS.

Wyniki i omówienie

Średnia objętość uzyskanych ejakulatów wynosiła 4,5 ml, koncentracja 1230×10^3 w mm^3 , a ruchliwość plemników w nasieniu świeżym wynosiła średnio 71,5%.

Wyniki oceny ruchliwości i integralności błony komórkowej plemników w nasieniu mrożonym przedstawiono w tab. 1.

Najwyższe wyniki ruchliwości zarówno w ocenie szacunkowej, jak i z wykorzystaniem komputerowego programu wspomagającego (SCA) obserwowano w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Bioxcell z ALA (R.4.). Stwierdzono istotnie wyższy ($p \leq 0,05$) odsetek plemników ruchliwych zarówno w ocenie szacunkowej, jak i w ocenie ruchu postępowego z wykorzystaniem programu SCA niż w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell.

W nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Tris z ALA (R.5.) notowano istotnie niższą ($p \leq 0,05$) ruchliwość w ocenie szacunkowej oraz w ocenie ruchu szybkiego z wykorzystaniem programu SCA niż w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Bioxcell z ALA (R.4.). W nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Tris z ALA (R.5.) stwierdzono również istotnie niższy ($p \leq 0,05$) odsetek plemników wykazujących ruch postępowy szybki (SCA) niż w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell.

W nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Tris z LAA (R.2.) stwierdzono istotnie niższy ($p \leq 0,01$)

Tab. 1. Ocena ruchliwości i integralności błon plemników w nasieniu młodych buhajów mrożonym w różnych rozrzedzalniach (średnia $\pm$ błąd standardowy)

Rozrzedzalnik + ekwilibracja	Ocena szacunkowa – ruch prawidłowy (%)	Ocena komputerowa SCA			Plemniki z nienaruszoną błoną (%)
		ruch szybki (%)	ruch postępowy szybki (%)	ruch postępowy (%)	
Bioxcell – kontrola	44,8 $\pm$ 2,6 ^{Aa}	42,6 $\pm$ 3,1 ^A	32,5 $\pm$ 2,2 ^{Aa}	47,9 $\pm$ 3,2 ^{Aa}	37,4 $\pm$ 2,5 ^A
Bioxcell + LAA (R.1.)	49,7 $\pm$ 2,7 ^A	45,7 $\pm$ 3,1 ^A	34,0 $\pm$ 2,2 ^{AB}	53,3 $\pm$ 3,1 ^A	36,0 $\pm$ 1,9 ^A
TRIS + LAA (R.2.)	47,3 $\pm$ 2,7 ^A	43,3 $\pm$ 3,0 ^A	25,6 $\pm$ 1,7 ^{BC}	51,8 $\pm$ 3,0 ^A	35,0 $\pm$ 2,1 ^A
TRIS + LAA + długa ekwilibracja (R.3.)	25,0 $\pm$ 2,4 ^B	23,0 $\pm$ 2,5 ^B	12,5 $\pm$ 1,5 ^{BD}	28,0 $\pm$ 2,9 ^B	18,6 $\pm$ 2,3 ^B
Bioxcell + ALA (R.4.)	51,1 $\pm$ 2,7 ^{Ab}	48,0 $\pm$ 2,9 ^{Aa}	35,1 $\pm$ 2,3 ^{AB}	54,6 $\pm$ 3,0 ^{Ab}	36,1 $\pm$ 2,3 ^A
TRIS + ALA (R.5.)	44,4 $\pm$ 2,4 ^{Aa}	40,4 $\pm$ 2,4 ^{Ab}	26,5 $\pm$ 1,6 ^{BCb}	49,5 $\pm$ 2,5 ^A	33,1 $\pm$ 2,2 ^A
TRIS + ALA + długa ekwilibracja (R.6.)	25,3 $\pm$ 2,8 ^B	23,7 $\pm$ 2,9 ^B	13,3 $\pm$ 1,8 ^{BD}	28,2 $\pm$ 3,2 ^B	16,1 $\pm$ 2,0 ^B

Objaśnienia: LAA – albumina kwasu linolowego; ALA – kwas α -linolenowy; A, B, C, D – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,01$); a, b – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,05$)

Tab. 2. Ocena ruchliwości i integralności błon plemników w nasieniu młodych buhajów mrożonym w różnych rozrzedzalniach – nasienie spełniające standardy jakościowe wg szacunkowej oceny ruchliwości w rozrzedzalniku Bioxcell (11 ejakulatów) (średnia $\pm$ błąd standardowy)

Rozrzedzalnik + ekwilibracja	Ocena szacunkowa – ruch prawidłowy (%)	Ocena komputerowa SCA			Plemniki z nienaruszoną błoną (%)
		ruch szybki (%)	ruch postępowy szybki (%)	ruch postępowy (%)	
Bioxcell – kontrola	60,5 $\pm$ 2,3 ^{Aa}	59,1 $\pm$ 3,0 ^{Aa}	43,6 $\pm$ 2,7 ^A	65,6 $\pm$ 2,8 ^A	48,7 $\pm$ 2,9 ^{Aa}
Bioxcell + LAA (R.1.)	60,5 $\pm$ 2,2 ^{Aa}	58,5 $\pm$ 3,5 ^{Aa}	40,5 $\pm$ 2,2 ^{ADa}	67,3 $\pm$ 3,5 ^A	42,8 $\pm$ 2,3 ^A
TRIS + LAA (R.2.)	56,8 $\pm$ 3,5 ^A	53,8 $\pm$ 4,3 ^A	30,5 $\pm$ 2,7 ^{BEc}	62,8 $\pm$ 4,2 ^A	41,1 $\pm$ 3,1 ^{Ab}
TRIS + LAA + długa ekwilibracja (R.3.)	27,3 $\pm$ 3,8 ^B	24,7 $\pm$ 4,8 ^B	12,5 $\pm$ 2,2 ^C	29,5 $\pm$ 5,2 ^B	18,7 $\pm$ 3,5 ^B
Bioxcell + ALA (R.4.)	60,0 $\pm$ 2,6 ^{Aa}	56,4 $\pm$ 4,0 ^A	38,7 $\pm$ 2,8 ^{ADeab}	65,3 $\pm$ 3,6 ^A	45,6 $\pm$ 2,6 ^A
TRIS + ALA (R.5.)	48,6 $\pm$ 4,0 ^{Ab}	47,9 $\pm$ 3,2 ^{Ab}	31,7 $\pm$ 2,3 ^{BDb}	57,4 $\pm$ 3,2 ^A	40,6 $\pm$ 2,7 ^{Ab}
TRIS + ALA + długa ekwilibracja (R.6.)	30,9 $\pm$ 4,5 ^B	28,8 $\pm$ 4,7 ^B	15,9 $\pm$ 2,9 ^C	33,2 $\pm$ 4,9 ^B	16,7 $\pm$ 2,7 ^B

Objaśnienia: LAA – albumina kwasu linolowego; ALA – kwas α -linolenowy; A, B, C, D, E – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,01$); a, b, c – wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p \leq 0,05$)

Tab. 3. Ocena ruchliwości i integralności błon plemników w nasieniu młodych buhajów mrożonym w różnych rozrzedzalniach – nasienie nie spełniające standardów jakościowych wg szacunkowej oceny ruchliwości w rozrzedzalniku Bioxcell (20 ejakulatów) (średnia $\pm$ błąd standardowy)

Rozrzedzalnik + ekwilibracja	Ocena szacunkowa – ruch prawidłowy (%)	Ocena komputerowa SCA			Plemniki z nienaruszoną błoną (%)
		ruch szybki (%)	ruch postępowy szybki (%)	ruch postępowy (%)	
Bioxcell – kontrola	36,3 $\pm$ 1,9 ^{Aa}	31,8 $\pm$ 2,1 ^A	25,3 $\pm$ 1,6 ^{Aa}	36,4 $\pm$ 2,2 ^{Aa}	31,2 $\pm$ 2,6 ^A
Bioxcell + LAA (R.1.)	43,7 $\pm$ 3,3 ^{ACb}	38,7 $\pm$ 3,5 ^{AC}	30,3 $\pm$ 2,9 ^{AAb}	45,6 $\pm$ 3,3 ^{ABb}	32,3 $\pm$ 2,4 ^A
TRIS + LAA (R.2.)	42,0 $\pm$ 3,3 ^{AC}	37,5 $\pm$ 3,5 ^{AC}	23,0 $\pm$ 2,1 ^{ACac}	45,8 $\pm$ 3,5 ^{ABb}	31,6 $\pm$ 2,6 ^A
TRIS + LAA + długa ekwilibracja (R.3.)	23,8 $\pm$ 3,2 ^B	22,0 $\pm$ 2,9 ^B	12,6 $\pm$ 2,1 ^B	27,2 $\pm$ 3,5 ^{ACc}	18,6 $\pm$ 3,1 ^B
Bioxcell + ALA (R.4.)	46,3 $\pm$ 3,5 ^C	43,3 $\pm$ 3,6 ^C	33,1 $\pm$ 3,1 ^{ADb}	48,7 $\pm$ 3,6 ^B	30,9 $\pm$ 2,6 ^A
TRIS + ALA (R.5.)	42,0 $\pm$ 3,0 ^{AC}	36,3 $\pm$ 3,0 ^{AC}	23,7 $\pm$ 1,9 ^{ACac}	45,1 $\pm$ 3,1 ^{AB}	28,9 $\pm$ 2,7 ^A
TRIS + ALA + długa ekwilibracja (R.6.)	22,3 $\pm$ 3,5 ^B	20,9 $\pm$ 3,7 ^B	11,9 $\pm$ 2,2 ^B	25,9 $\pm$ 4,2 ^C	15,8 $\pm$ 2,8 ^B

Objaśnienia: jak w tab. 1.

odsetek plemników wykazujących ruch postępowy szybki (SCA) niż w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell.

Wydłużenie czasu ekwilibracji do 26-28 godzin powodowało istotne ($p \leq 0,01$) obniżenie wyników oceny zarówno ruchliwości, jak i integralności błon komórkowych w stosunku do nasienia zamrożonego

we wszystkich rozrzedzalnikach z zastosowaniem ekwilibracji trwającej 2,5 godziny.

Na podstawie szacunkowej oceny ruchliwości w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell dokonano podziału otrzymanych wyników na 2 grupy: w jednej zebrano te ejakulatory, w których stwierdzono po rozmrożeniu w rozrzedzalniku Bioxcell co najmniej 50%

plemników ruchliwych (nasienie spełniające standardy jakościowe – 11 ejakulatów od 7 buhajów) oraz te, w których po rozmrożeniu stwierdzono mniej niż 50% plemników ruchliwych (nasienie nie spełniające standardów jakościowych – 20 ejakulatów od 9 buhajów). Wyniki oceny ruchliwości i integralności błony plemników w nasieniu mrożonym we wszystkich badanych rozrzedzalnikach, spełniającym standardy jakościowe wg szacunkowej oceny ruchliwości w rozrzedzalniku kontrolnym przedstawiono w tab. 2, a w nasieniu nie spełniającym standardów jakościowych wg szacunkowej oceny ruchliwości w rozrzedzalniku kontrolnym w tab. 3.

W grupie ejakulatów, w których ruchliwość oceniana szacunkowo w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku komercyjnym Bioxcell osiągnęła wartości co najmniej 50%, nie stwierdzono korzystnego wpływu dodania LAA lub ALA do rozrzedzalnika Bioxcell.

W nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Tris z ALA (R.5.) oraz w rozrzedzalniku Tris z LAA (R.2.) obserwowano niższe ($p \leq 0,05$) wyniki ruchliwości w ocenie szacunkowej oraz w ocenach wspomaganych komputerowo (ruch szybki i postępowy szybki) niż w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell oraz w rozrzedzalniku Bioxcell z LAA (R.1.) lub ALA (R.4.).

W rozrzedzalnikach Tris z LAA (R.2.) oraz ALA (R.5.) stwierdzono również istotnie ($p \leq 0,05$) niższy odsetek plemników z nienaruszoną błoną niż w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell.

Wydłużenie czasu ekwilibracji do 26-28 godzin powodowało istotne ($p \leq 0,01$) obniżenie wyników oceny zarówno ruchliwości, jak i nienaruszalności błon komórkowych plemników w stosunku do nasienia zamrożonego we wszystkich rozrzedzalnikach z zastosowaniem ekwilibracji trwającej 2,5 godziny.

W grupie ejakulatów, w których ruchliwość oceniana szacunkowo w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku komercyjnym Bioxcell nie osiągnęła wymaganej wartości co najmniej 50% plemników ruchliwych, istotnie wyższe ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) wyniki ruchliwości ocenianej szacunkowo i z użyciem SCA uzyskano w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Bioxcell z ALA (R.4.) niż w kontroli.

Nasienie zamrożone w rozrzedzalniku Bioxcell z LAA (R.1.) uzyskało również wyższe wyniki oceny ruchliwości w ocenie szacunkowej ($p \leq 0,05$) i w ocenie ruchu postępowego (SCA) ($p \leq 0,05$) niż nasienie zamrożone w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell.

W nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku Tris z LAA (R.2.) zanotowano wyższy ($p \leq 0,05$) odsetek plemników wykazujących ruch postępowy (SCA) niż w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalniku kontrolnym Bioxcell, natomiast w ocenie ruchu postępowego szybkiego (SCA) stwierdzono niższy ($p \leq 0,01$) odsetek plemników wykazujący ruch niż w nasieniu zamrożonym w rozrzedzalnikach Bioxcell z LAA

(R.1.) i Bioxcell z ALA (R.4.). Również w ocenie tego parametru ruchu nasienie zamrożone w rozrzedzalniku Tris z ALA (R.5.) uzyskało istotnie niższe wyniki niż zamrożone w rozrzedzalniku Bioxcell z dodatkiem ALA ($p \leq 0,01$) i z dodatkiem LAA ($p \leq 0,05$).

W tej grupie ejakulatów wydłużenie czasu ekwilibracji do 26-28 godzin również powodowało istotne ($p \leq 0,01$) obniżenie wyników oceny zarówno ruchliwości, jak i integralności błon komórkowych plemników w stosunku do nasienia zamrożonego we wszystkich rozrzedzalnikach z zastosowaniem ekwilibracji trwającej 2,5 godziny.

Pomimo rutynowego stosowania w rozrodzie bydła inseminacji nasieniem mrożonym nadal dąży się do udoskonalenia technologii zamrażania, aby móc skutecznie zakonserwować nasienie słabszej jakości lub szczególnie wrażliwe na proces kriokonserwacji. W badaniach przeprowadzonych przez Taşdemira i wsp. (14) uzyskano wzrost ruchliwości i obniżenie odsetka plemników z uszkodzoną błoną komórkową poprzez wprowadzenie do rozrzedzalnika Tris glikolu etylenowego jako dodatkowego (oprócz glicerolu) związku osłaniającego. Również wzbogacenie składu rozrzedzalnika Tris glutationem (4) lub cholesterolem (3, 10) przyczyniło się do poprawy parametrów jakościowych mrożonego nasienia buhajów. Naszą uwagę zwróciły badania nad wykorzystaniem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Pierwsze to badania Kaka i wsp. nad zastosowaniem dodatku kwasu α -linolenowego (ALA) zarówno do rozrzedzalnika Tris (6), jak i Bioxcell (7). W badaniach tych porównywano różne dawki ALA i ustalono poziom 5 ng/ml, który najbardziej korzystnie wpłynął na ruchliwość i stan błon komórkowych plemników po rozmrożeniu. Drugie to prace badawcze Takahashi i wsp. (13), w których użyli kwasu linolowego w postaci albuminy (LAA) w ilości 1 mg/1 ml jako dodatku do rozrzedzalnika cytrynianowo-żółtkowego oraz dodatkowo wydłużyli do 30 godzin ekwilibrację nasienia w temperaturze 4°C rozrzedzonego rozrzedzalnikiem bez glicerolu. Badacze uzyskali istotny wzrost ruchliwości plemników po rozmrożeniu właśnie w przypadku zastosowania długiej ekwilibracji. Jedynie zastosowanie dodatku cysteiny i glutationu do rozrzedzalnika mlekowego (15) nie przyczyniło się do poprawy jakości konserwowanego nasienia. Wszystkie wspomniane wyżej badania przeprowadzone zostały na nasieniu pochodzącym od dojrzałych, co najmniej dwuletnich samców.

W przedstawionych przez nas badaniach przeprowadzono ocenę wpływu dodania kwasu α -linolenowego (ALA) i albuminy kwasu linolowego (LAA) do rozrzedzalnika Bioxcell na ruchliwość i integralność błon plemników pochodzących od bardzo młodych buhajów, w wieku od 12 do 17 miesięcy. Jako rozrzedzalnik dodatkowy wprowadzono Tris, którego skład nie jest chroniony patentem i można go sporządzić samemu w laboratorium, aby mieć możliwość oceny zastosowania długiej ekwilibracji rozrzedzonego

nasienia w rozrzedzalniku bez glicerolu w obecności kwasu α -linolenowego (ALA) lub albuminy kwasu linolowego (LAA).

Kwas α -linolenowy (ALA) jest kwasem egzogennym, jego niedobory objawiają się u ludzi i zwierząt zaburzeniami wzrostu, funkcjonowania układu oddechowego i metabolizmu energetycznego, chorobami skóry oraz uszkodzeniem nerek (12). Jak większość długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych bierze udział w wielu procesach regulacyjnych w pojedynczych komórkach i tkankach – jest substratem w syntezie biologicznie aktywnych związków mających charakter hormonów tkankowych (8).

Kwas linolowy (LA) wykazuje szerokie działanie prozdrowotne na organizm człowieka. Jest aktywnym antyoksydantem (zapobiega powstawaniu wolnych rodników), ma właściwości przeciwmiażdżycowe i antynowotworowe, a poprzez regulację przemian lipidów w organizmie powoduje redukcję masy ciała. Zwiększa odporność organizmu i zapobiega rozwojowi cukrzycy oraz osteoporozy (9).

Nie wszystkie z zastosowanych modyfikacji przyniosły oczekiwane efekty. Szczególnie dotyczy to długiej ekwilibracji, która w badaniach Takahashi i wsp. (13) przebiegała w obecności rozrzedzalnika cytrynianowo-żółtkowego (stosowanego dawniej do konserwacji nasienia buhaja w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$) i poprawiała ruchliwość plemników w nasieniu po ekwilibracji i po rozmrożeniu. Być może w rozrzedzalniku Tris nastąpiły niekorzystne procesy metaboliczne skutkujące negatywnym oddziaływaniem na komórki plemnikowe w miarę wydłużania czasu ich ekspozycji. Można zakładać, że są to procesy analogiczne do tych, jakie obserwuje się np. w miarę upływu czasu przechowywania nasienia konserwowanego w stanie płynnym w temperaturach plusowych. Należałoby wykonać badania porównawcze z zastosowaniem obu rozrzedzalników.

Przeprowadzone badania wykazały jednak możliwości bardziej efektywnej kriokonserwacji nasienia młodych buhajów, które charakteryzuje się wyższą wrażliwością na proces kriokonserwacji. Z tego punktu widzenia obiecującym rozwiązaniem jest użycie rozrzedzalnika Bioxcell z dodatkiem kwasu α -linolenowego.

Piśmiennictwo

- Amirat L., Anton M., Tainturier D., Chatagnon G., Battut I., Courtens J. L.: Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 2005, 129, 535-543.
- Amirat L., Tainturier D., Jeanneau L., Thorin C., Gerard O., Courtens J. L., Anton M.: Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004, 61, 895-907.
- Amorim E. A. M., Graham J. K., Spizziri B., Meyers M., Torres C. A. A.: Effect of cholesterol or cholesterol conjugates on cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 2009, 58, 210-214.
- Ansari M. S., Rakha B. A., Andrabi S. M. H., Ullah N., Iqbal R., Holt W. V., Akhter S.: Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves

- the post-thaw quality and in vivo fertility of Buffalo (*bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Biol.* 2012, 12, 271-276.
- Christensen P., Stenvang J. P., Godfrey W. L.: A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *J. Androl.* 2004, 25, 255-264.
 - Kaka A., Wahid H., Rosnina Y., Yimer N., Khumran A. M., Behan A. A., Kaka U., Ebrahimi M.: Alpha-linolenic acid supplementation in Tris extender can improve frozen-thawed bull semen quality. *Reprod. Dom. Anim.* 2015, 50, 29-33.
 - Kaka A., Wahid H., Rosnina Y., Yimer N., Khumran A. M., Sarsaifi K., Behan A. A., Kaka U., Ebrahimi M.: α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 2015, 153, 1-7.
 - Karwat J., Gil-Kulik P., Kotula L., Niedojadlo A., Kocki J., Sawiuk M.: CLA – właściwości prozdrowotne. *Med. Og. Nauk Zdr.* 2013, 19, 535-538.
 - Kolanowski W.: Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 – znaczenie zdrowotne w obniżaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2007, 3, 229-237.
 - Moraes E. A., Graham J. K., Torres C. A. A., Meyers M., Spizziri B.: Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 2010, 118, 148-154.
 - Pilch J., Morstin J., Schmidt-Kalińska I., Pakula A.: Technologia mrożenia nasienia buhajów w słomkach – instrukcja dla laboratoriów stacji hodowli i unasienniania zwierząt. CSHZ Warszawa 1994, s. 13.
 - Pluta A., Manitius J.: Znaczenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. *Forum Nefrologiczne* 2013, 6, 43-47.
 - Takahashi T., Itoh R., Nishinomiya H., Katoh M., Manabe N.: Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reprod. Dom. Anim.* 2012, 47, 92-97.
 - Taşdemir U., Büyükleblebici S., Tuncer P. B., Coşkun E., Özgürtaş T., Aydınlı F. N., Büyükleblebici O., Gürcane I. S.: Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 2013, 66, 38-42.
 - Tuncer P. B., Bucak M. N., Büyükleblebici S., Sariözkan S., Yeni D., Eken A., Akalin P. P., Kinet H., Avdatek F., Fidan A. F., Gündoğan M.: The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology* 2010, 61, 303-307.

Adres autora: dr inż. Barbara Szcześniak-Fabiańczyk, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice; e-mail: barbara.fabianczyk@izoo.krakow.pl