

Syntetyczny płytkowy czynnik aktywujący (PAF) jako składnik rozcieńczalnika dla nasienia knura^{*}

WŁADYSŁAW KORDAN, JERZY STRZEŻEK

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM w Olsztynie,
ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

Kordan W., Strzeżek J.

Synthetic platelet activating factor (PAF) as a boar semen extender component

Summary

The aim of this study was to investigate the effects of PAF addition on selected motility characteristics and plasmalemma integrity of boar spermatozoa following liquid storage in a boar semen extender, Kortowo-3 (K-3), supplemented with lipoprotein fractions extracted from hen egg yolk (LPFh) or lyophilized lipoprotein fractions extracted from ostrich egg yolk (LPFo), at 5°C and 16°C.

Sperm motility was evaluated using a computer system (CASA). The determination of AspAT activity in sperm extracts as well as fluorescent analysis, with a fluorochrome, Hoechst 33258, were used to assess the plasmalemma integrity overlying the middle-piece and acrosomal regions of spermatozoa, respectively.

It was confirmed that the addition of exogenous PAF to K-3 extender containing LPFh or LPFo had a beneficial effect on the sperm quality parameters during storage at 5°C or 16°C. This phenomenon was manifested by an increase in motility and survivability of spermatozoa. The use of LPFh or LPFo as a component of boar semen extender had a protective effect on the plasmalemma integrity overlying the middle-piece and acrosomal regions of PAF-treated spermatozoa.

Keywords: boar, spermatozoa, motility, PAF, LPF

Płytkowy czynnik aktywujący – PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glicero-3-fosfocholina) – należy do fosfolipidów błonowych. Synteza i degradacja PAF kontrolowana jest aktywnością błonowych, cytozolowych i zewnątrzkomórkowych enzymów, spośród których acetylohydrolaza PAF (PAF-AH; EC 3.1.1.48) pełni rolę zasadniczą (5, 7, 8, 13). Obecność PAF stwierdzono dotychczas w plemnikach buhaja, człowieka, knura, królika oraz myszy (4, 12, 13). Rola plemnikowego PAF dotyczy udziału w mechanizmach regulacji głównych funkcji biologicznych gamety męskiej, tj. ruchliwości, kapacytacji oraz reakcji akrosomowej (9, 10). Wcześniejsze badania własne (6) wykazały stymulujący wpływ płytkowego czynnika aktywującego na aparat ruchu plemników knura, konserwowanych w stanie płynnym. Niemniej wpływ PAF na ruchliwość plemników jest uwarunkowany gatunkowo. W przypadku plemników buhaja nie obserwowano bowiem stymulującego wpływu PAF na ruchliwość omawianych komórek (10).

Doskonalenie metod konserwacji nasienia knura jest problemem ciągle aktualnym. Celowe jest więc prowadzenie badań nad technologią konserwacji oraz doбором odpowiednich komponentów dla rozcieńczalników nasienia. Ostatnio wykazano, że dodatek frakcji lipoproteinowej izolowanej z żółtka jaja ptaków do rozcieńczalników dla nasienia knura zwiększa odporność plemników na udary chładowe, zwłaszcza podczas konserwacji nasienia w temperaturze +5°C (15).

Celem badań było określenie wpływu dodatku syntetycznego PAF na wybrane parametry ruchu i stabilność plaz-

molemy plemników knura w regionie akrosomowym i wstawkowym, konserwowanych w temperaturach +5°C i +16°C w rozcieńczalniku Kortowo 3 z dodatkiem lipoprotein (LPF) izolowanych z żółtka jaja kury domowej (LPFh) i strusia afrykańskiego (LPFo).

Materiał i metody

Ejakulatory uzyskiwano metodą manualną od 3 knurów, rasy wbp oraz duroc-hampshire w wieku 3 lat. Zwierzęta utrzymywano w standardowych warunkach zoohigienicznych. Knury żywiono mieszką pełnoporcjową, ze stałym dostępem do wody. Po pobraniu nasienie sączono przez sterylną gazę w celu usunięcia frakcji żelowej i poddawano wstępnej ocenie makroskopowej i mikroskopowej. Koncentrację plemników określano metodą cytometryczną (1).

Ekstrakcję frakcji LPF prowadzono zgodnie z metodą opracowaną w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie (15). Frakcja lipoproteinowa żółtka jaja kurzego (LPFh) wykorzystywana była w postaci płynnej, natomiast frakcję lipoproteinową z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) poddawano procesowi liofilizacji, przez 24 godziny, z wykorzystaniem liofilizatora Lyph-Lock 6 firmy Labconco.

Próbki nasienia rozrzedzano do koncentracji 20×10^6 plemników/cm³ z zastosowaniem rozcieńczalnika Kortowo 3 (K3) o osmolarności 300 mOsm i następującym składzie: 64,6 mM cytrynian sodu $\times 2 H_2O$, 69,3 mM fruktoza, 8 mM EDTA (wersjan disodowy), 14,2 mM octan potasu. Po określeniu koncentracji sporządzono następujące warianty inkubacyjne: nasienie + K3 (próby kontrolne), nasienie + K3 + PAF (1×10^{-7} M) (Sigma), nasienie + K3 + LPFh, nasienie + K3 + LPFh + PAF (1×10^{-7} M), nasienie + K3 + LPFo, nasienie + K3 + LPFo + PAF (1×10^{-7} M). Próbkę inkubowano w temperaturze +5°C i +16°C, aż do całkowitego zaniku ruchu plemników. We wszystkich próbkach nasie-

^{*}Praca wykonana w ramach tematu badań własnych UWM w Olsztynie nr 0103.0206.

nia, w kolejnych dniach przechowywania, kontrolowano ruchliwość oraz oceniano stabilność plazmolemy plemników.

Ocenę ruchu plemników przeprowadzono przy zastosowaniu systemu CASA (CMA-Mika-System, Strömberg-Mika, Germany). Określano odsetek plemników ruchliwych, lokalnie ruchliwych oraz plemników nieruchliwych. Wśród plemników ruchliwych oceniano odsetek plemników wykazujących ruch liniowy, nieliniowy i cyrkulacyjny.

Stabilność plazmolemy plemników w regionie wstawkowym oceniano poprzez pomiar aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) w ekstraktach plemnikowych, zgodnie z metodą podaną przez Ciereszko i wsp. (2). W tym celu plemniki poddawano udarowi chłodowemu poprzez 1-godziną inkubację komórek w temperaturze +4°C (277,2 K). Próbkę wirowano (10 000 × g), a następnie w płynach nadosadowych określano aktywność enzymu, którą wyrażano w jednostkach międzynarodowych (IU/10⁹ plemników).

Zmiany integralności plazmolemy plemników w regionie akrosomowym oceniano metodą fluorescencyjną (16), przy wykorzystaniu fluorochromu Hoechst 33258 oraz mikroskopu epifluorescencyjnego BX41 (Olimpus) przy użyciu filtru-UV. Stosowano powiększenie 100-krotne. Zliczano plemniki wykazujące fluorescencję i odnoszono do całkowitej liczby komórek widocznych w rozmazie. Wyniki obserwacji wyrażano w % plemników z uszkodzoną plazmolemą.

Analizy statystyczne przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Statistica 6.0 (Statsoft). Stosowano test Dunnetta.

Wyniki i omówienie

Stwierdzono, że dodatek PAF, niezależnie od zastosowanego wariantu rozcieńczalnika, temperatury i czasu przechowywania nasienia, wpływa istotnie na zwiększenie odsetka plemników ruchliwych w porównaniu z próbą kontrolną ($p \leq 0,05$).

W temperaturze +5°C najkorzystniejszy okazał się wariant: K3 + LPFh + PAF (tab. 1). W trzecim dniu przechowywania nasienia obserwowano ponad 80%, a w szóstym prawie 30% plemników ruchliwych. Zadawalające rezultaty otrzymano również przy zastosowaniu wariantu inkubacyjnego z udziałem frakcji LPFo i PAF (K3 + LPFo + PAF). W trzecim dniu przechowywania nasienia stwierdzono prawie 70% plemników ruchliwych.

Z kolei podczas inkubacji próbek nasienia w temperaturze +16°C zdecydowanie najwyższą ruchliwość stwierdzono w wariantcie K3 + LPFo + PAF (tab. 1). W trzecim dniu przechowywania nasienia obserwowano ponad 80% komórek ruchliwych. Należy zaznaczyć, że w omawianym wariantcie wysoka, ponad 40% ruchliwość plemników obserwowano jeszcze w szóstym dniu przechowywania prób, podczas gdy w próbach kontrolnych (K3), w trzecim dniu inkubacji prób stwierdzono tylko w 8% odsetek plemników ruchliwych.

Tab. 1. Wpływ dodatku PAF na ruchliwość plemników knura przechowywanych w różnych wariantach rozcieńczalników w temperaturach +5°C i +16°C (n = 18)

Temperatura inkubacji	Wariant inkubacyjny	Ruchliwość plemników (%)							
		Dni przechowywania							
		D0		D1		D3		D6	
1*	2*	1	2	1	2	1	2		
5°C	K3 (kontrola)	70,3 ^a	6,5	33,3 ^a	6,0	6,3 ^a	3,0	0,0	0,0
	K3 + PAF	94,0 ^b	2,3	71,0 ^b	6,7	64,0 ^b	10,4	10,0 ^a	2,0
	K3 + LPFo	85,0 ^b	2,5	72,0 ^b	4,2	59,0 ^b	3,2	0,0	0,0
	K3 + LPFo + PAF	88,3 ^b	6,0	88,3 ^c	5,0	68,3 ^b	6,7	21,5 ^b	8,0
	K3 + LPFh	87,7 ^b	3,7	80,7 ^c	3,0	70,7 ^c	6,5	17,5 ^b	3,0
	K3 + LPFh + PAF	94,0 ^b	4,0	90,3 ^d	5,0	82,4 ^d	9,0	28,8 ^{b,c}	7,0
16°C	K3 (kontrola)	70,3 ^a	6,5	40,0 ^a	2,0	8,0 ^a	6,0	0,0	0,0
	K3 + PAF	94,0 ^b	2,8	75,4 ^b	8,2	60,0 ^b	20,2	8,0 ^a	3,3
	K3 + LPFo	85,0 ^b	2,6	76,7 ^b	5,8	65,0 ^b	4,9	5,0 ^a	3,0
	K3 + LPFo + PAF	88,6 ^b	6,6	82,7 ^b	8,8	83,6 ^c	8,1	42,3 ^c	3,2
	K3 + LPFh	84,6 ^b	5,6	74,9 ^b	4,4	61,0 ^b	4,7	6,0 ^a	2,8
	K3 + LPFh + PAF	92,0 ^b	4,6	76,2 ^b	10,0	58,8 ^b	6,2	12,0 ^b	9,0

Objaśnienia: 1* – plemniki ruchliwe; 2* – plemniki lokalnie ruchliwe; a, b, c, d – wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($p \leq 0,05$)

Niezależnie od czasu przechowywania nasienia i temperatury inkubacji prób, w wariantach rozcieńczalników z dodatkiem LPF i PAF obserwowano istotnie statystycznie wyższy odsetek plemników wykazujących ruch liniowy w porównaniu z próbą kontrolną. Stwierdzono ponadto, że obecność w składzie rozcieńczalnika LPFh, LPFo i PAF powodowała ograniczenie występowania ruchów nieprawidłowych plemników (ruch cyrkulacyjny, ruch nieliniowy).

Wcześniejsze badania własne (6) wykazały stymulujący wpływ PAF na aparat ruchu plemników knura przy stężeniach nieprzekraczających 1×10^{-6} M. Stanowiło to główną przesłankę do zastosowania w niniejszej pracy optymalnego stężenia tego fosfolipidu (1×10^{-7} M). Należy dodać, że PAF stosowany w stężeniach powyżej 1×10^{-4} M może naruszać stabilność plazmolemy plemników w regionie wstawkowym jak również akrosomowym (6).

Wartość biologiczna nasienia zależy, między innymi, od stanu błon plazmatycznych plemników. Podczas procesu konserwacji nasienia dochodzi do procesów starzeniowych plemników, czego wynikiem mogą być uszkodzenia plazmolemy (15). Wiarygodnym markerem biochemicznym stanu integralności plazmolemy plemników w regionie wstawkowym jest podatność tych komórek na uwalnianie do środowiska zewnątrzkomórkowego cytoplazmatycznego AspAT po zastosowaniu kontrolowanego udaru chłodowego (2).

Jak wynika z danych przedstawionych na ryc. 1, z upływem czasu przechowywania nasienia, niezależnie od zastosowanego wariantu rozcieńczalnika i temperatury inkubacji, obserwowano stopniowe obniżenie aktywności AspAT ekstrahowanego z plemników po udarze chłodowym. Omawiane zjawisko dotyczyło szczególnie wariantów rozcieńczalnika z udziałem frakcji LPFo i PAF, co dowodzi właściwości osłaniających tych substancji wobec plazmolemy plemników. Obserwowana wysoka aktywność AspAT

ekstrahowanego z plemników bezpośrednio po rozrzedzeniu nasienia (D0) spowodowana była zapewne tzw. efektem rozcieńczenia próbek nasienia.

Otrzymane rezultaty badań podkreślają udział frakcji LPF i PAF w stabilizacji plazmoemy plemników w regionie wstawkowym. Wcześniejsze badania wykazały, że dodatek frakcji LPF do rozcieńczalnika Kortowo 3 polepsza jego właściwości osłaniające wobec plemników knura przechowywanych w stanie płynnym (3).

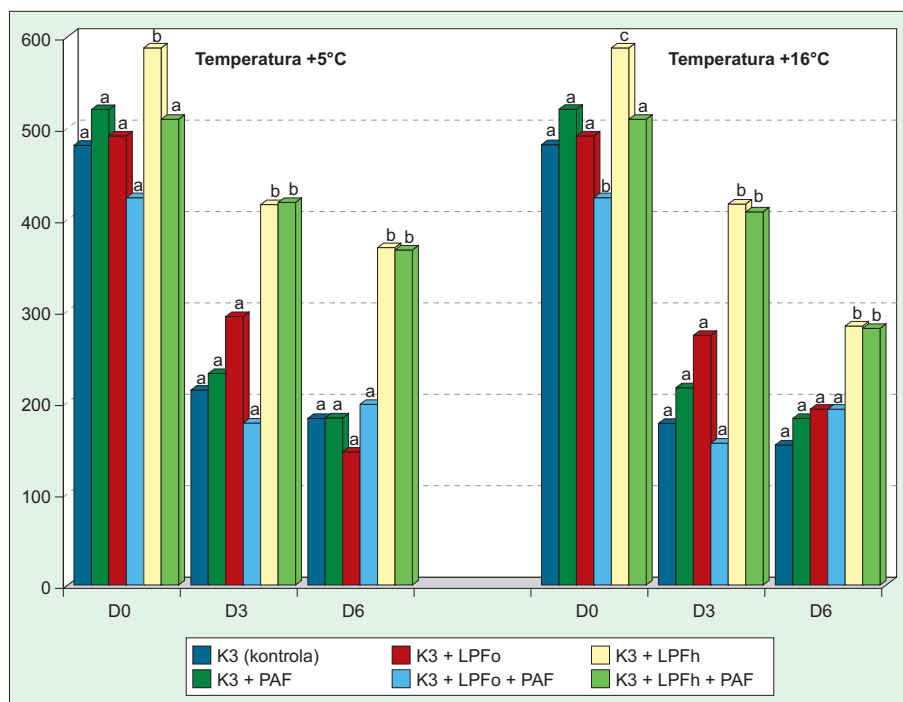
Prawidłowy przebieg procesu zapłodnienia u ssaków uzależniony jest, między innymi, od stanu błon plazmatycznych w regionie akrosomowym (14). Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 2, zastosowanie dodatku LPFo, LPFh oraz PAF, powodowało obniżenie odsetka plemników z uszkodzoną plazmolemą w omawianym regionie. Zjawisko to przejawiało się spadkiem liczby plemników wykazujących fluorescencję, niezależnie od temperatury inkubacji i zastosowanego wariantu rozcieńczalnika.

W posumowaniu należy stwierdzić, że zastosowanie w składzie rozcieńczalnika Kortowo 3 dodatku egzogenego PAF w kombinacji z frakcją lipoprotein (LPFo i LPFh) wpływało pozytywnie na parametry jakości nasienia knura konserwowanego w stanie płynnym w temperaturach +5°C i +16°C. Omawiane zjawisko przejawiało się znacznym wzrostem ruchliwości i przeżywalności plemników, jak również podwyższoną stabilnością plazmoemy omawianych komórek.

Tab. 2. Wpływ dodatku PAF na stabilność plazmoemy w regionie główki plemników knura przechowywanych w różnych wariantach rozcieńczalników w temperaturach +5°C i +16°C (n = 18)

Temperatura inkubacji	Wariant inkubacyjny	Plemniki z uszkodzoną plazmolemą (%)			
		Dni przechowywania			
		D 0	D 1	D 3	D 6
5°C	K3 (kontrola)	11,2 ^a	13,0 ^a	15,8 ^a	30,5 ^a
	K3 + PAF	10,3 ^a	11,2 ^{ab}	12,8 ^a	20,0 ^b
	K3 + LPFo	9,3 ^a	10,3 ^{ab}	15,8 ^a	22,3 ^b
	K3 + LPFo + PAF	10,0 ^a	9,7 ^{ab}	12,8 ^a	19,2 ^b
	K3 + LPFh	9,3 ^a	9,8 ^{ab}	11,2 ^a	18,2 ^b
	K3 + LPFh + PAF	8,8 ^a	8,2 ^b	11,5 ^a	19,4 ^b
16°C	K3 (kontrola)	11,2 ^a	16,3 ^a	16,0 ^a	35,0 ^a
	K3 + PAF	10,3 ^a	12,7 ^{ab}	15,6 ^a	24,3 ^b
	K3 + LPFo	9,3 ^a	10,6 ^b	10,5 ^b	20,0 ^{bc}
	K3 + LPFo + PAF	10,0 ^a	9,0 ^b	9,5 ^b	18,8 ^c
	K3 + LPFh	9,3 ^a	10,0 ^b	11,5 ^{ab}	18,8 ^c
	K3 + LPFh + PAF	8,8 ^a	10,0 ^b	9,8 ^b	16,0 ^c

Objaśnienie: a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p ≤ 0,05)



Ryc. 1. Wpływ dodatku PAF na aktywność AspAT ekstrahowanego z plemników knura (IU/10⁹ plemników) przechowywanych w różnych wariantach rozcieńczalników w temperaturach +5°C i +16°C (n = 18)

Objaśnienie: a, b, c – wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p ≤ 0,05)

Piśmiennictwo

- Bielanski W.: Rozród zwierząt. PWN, Warszawa 1974.
- Ciereszko A., Glogowski J., Demianowicz W., Strzeżek J.: Stimulation of aspartate aminotransferase from animal semen by pyridoxal 5'-phosphate. Anim. Reprod. Sci. 1994, 34, 327-341.
- Fraser L., Leczewicz M., Strzeżek J.: Effect of extender composition and storage temperatures on motility of preserved boar semen. J. Anim. Feed Sci. 2002, 11, 661-669.
- Hough S. H., Parks J. E.: Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster. Biol. Reprod. 1994, 50, 912-916.
- Kordan W.: Właściwości acetylhydrolazy płytkowego czynnika aktywującego (PAF-AH) z plazmy nasienia knura. Praca hab. Rozprawy i monografie nr 44, 2001, 1-53, Wyd. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.
- Kordan W., Strzeżek J.: Effect of platelet-activating factor (PAF) on motility parameters and plasmalemma integrity of boar spermatozoa. Anim. Sci. Pap. Rep. 2002, 20, 37-45.
- Kordan W., Strzeżek J., Fraser L.: Functions of platelet activating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a review. Pol. J. Vet. Sci. 2003, 6, 55-60.
- Kordan W., Wysocki P., Strzeżek J.: A polypeptide from protein complex of platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) of boar seminal plasma belongs to a family of adhesion proteins. Anim. Sci. Pap. Rep. 2004, 22, 341-346.
- Odeh A. I., Dascanio J. J., Caceci T., Bowen J., Eng L. A.: Effect of platelet activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and acrosome reaction. Reproduction 2003, 126, 605-613.
- Parks J. E., Hough S. R.: Effect of platelet activating factor on the motility and acrosome reaction of bovine spermatozoa. Theriogenology 1990, 34, 903-912.
- Reinhardt J. C., Xiaoying Cui, Roudubush W. E.: Immunofluorescent evidence of the platelet-activating factor receptor on human spermatozoa. Fertil. Steril. 1999, 71, 941-942.
- Roudubush W. E., Diehl J. R.: Platelet-activating factor content in boar spermatozoa correlates with fertility. Theriogenology 2001, 55, 1633-1638.
- Soubeyrand S., Lazure C., Manjunath P.: Phospholipase A₂ from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase. Biochem. J. 1998, 329, 41-47.
- Snell W. J., White J. M.: The molecules of mammalian fertilization. Cell 1996, 85, 629-637.
- Strzeżek J., Leczewicz M., Dziekońska A., Fraser L.: A simple method of extraction of lipoprotein fraction from avian egg yolk-protective effect on cooled boar semen. Theriogenology 2005, 63, 496-497.
- Wolders H.: A novel technique for differential live-dead staining using fluorescence microscopy and fluorimetry. Proc. 11th Congress Anim. Reprod. Art. Insem. Dublin 1988, 4, 579.

Adres autora: dr hab. Władysław Kordan, prof. nadzw., ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn; e-mail: wladyslaw.kordan@uwm.edu.pl