tragłębokiej czy laparoskopowej daje możliwości skutecznej redukcji liczebności plemników w dawce inseminacyjnej. Seksowanie, liofilizacja czy mikrokapsułkowanie nasienia pozwala na wstępną obróbkę plemników do dalszego przechowywania lub bezpośrednio przed samym momentem zdeponowania ich w drogach rodnych lochy. Rozwój technologii transferu genów (mikroiniekcja, transfer przy pomocy plemników, przenoszenie jądra komórki somatycznej) pozwolił na izolacje pojedynczych genów i przenoszenie ich do genomów zwierząt. Ma to szczególne znaczenie dla rozwijającej się dziedziny ksenotransplantacji, a co za tym idzie – produkcji transgenicznych świń. Powszechność zastosowania wyżej wymienionych metod jest jednak uwarunkowana ekonomiczną opłacalnością oraz możliwością ich użycia w warunkach terenowych. Duże wysiłki powinny być skierowane głównie na udoskonalanie metod wprowadzania plemników i ich wstępnego przygotowania, co powinno wpłynąć na poprawę efektywności funkcjonowania obiektów. Kontynuacja badań nad biotechnologią w rozrodzie świń zapewne wpłynie na popularyzację niektórych rozwiązań i ich wdrożenie do praktyki produkcyjnej.

Literatura: 1. Fantinati P., Zannoni A., Bernardini C., Webster N., Lavitrano M., Forni M., Seren E., Bacci M.L., 2005 – Theriogenology 63, 806--817. **2. Foote R.H.**, 2002 – J. Anim. Sci. 80, 1-10. **3. Gajda B., Smorąg Z.**, 2007 – Biotechnologia 79, 55-65. **4. Garcia-Rosello E., Garcia-Mengual E., Coy P., Alfonso J., Silvestre M.A.**, 2009 – Reprod. Domest. Anim. 44, 143-151. **5. Gerrits R.J., Lunney J.K., Johnson L.A., Pursel V.G., Kraeling R.R., Rohrer G.A., Dobrinsky J.R.**, 2005 – Theriogenology 63, 283-299. **6. Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., Plante C., Pollard J.W., Fan M.Z., Hayes M.A., Laursen J., Hjorth J.P., Hacker R.R., Phillips J.P., Forsberg C.W.**, 2001 – Nat. Biotechnol. 19, 741-745. **7. Huang S.Y., Tu C.F., Liu S.H., Kuo Y.H.**, 2005 – Anim. Reprod. Sci. 87, 111-120. **8. Johnson L.A., Rath D., Vazquez J.M., Maxwell W.M., Dobrinsky J.R.**, 2005 – Theriogenology 63, 615-624. **9. Kolbe T., Holtz W.**, 2000 – Anim. Reprod. Sci. 64, 97-101. **10. Krueger C., Rath D.**, 2000 – Reprod. Fertil. Dev. 12, 113-117. **11. Kwon I.K., Park K.E., Niwa K.**, 2004 – Biol. Reprod. 71, 1430-1436. **12. Lavitrano M., Busnelli M., Cerrito M.G., Giovannoni R., Manzini S., Vargiolu A.**, 2006 – Reprod. Fertil. Dev. 18, 19-23. **13. Lavitrano M., Forni M., Bacci M.L., Di Stefano C., Varzi V., Wang H., Seren E.**, 2003 – Mol. Reprod. Dev. 64, 284-291. **14. Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Parrilla I., Vazquez J.L., Day B.N.**, 2002 – Reproduction 123, 163-170. **15. Martins C.F., Bao S.N., Dode M.N., Correa G.A., Rumpf R.**, 2007 – Theriogenology 67, 1307-1315. **16. Meyers S.A.**, 2006 – Reprod. Fertil. Dev. 18, 1-5. **17. Nebel R.L., Bame J.H., Saacke R.G., Lim F.**, 1985 – J. Anim. Sci. 60, 1631-1639. **18. Niemann H., Rath D., Wrenzycki C.**, 2003 – Reprod. Domest. Anim. 38, 82-89. **19. Park K.W., Cheong H.T., Lai L., Im G.S., Kuhholzer B., Bonk A.**, 2001 – Anim. Biotechnol. 12, 173-181. **20. Roca J., Vazquez J.M., Gil M.A., Cuello C., Parilla I., Martinez E.A.**, 2006 – Reprod. Domest. Anim. 41 (Suppl. 2), 43-53. **21. Saeki K., Matsumoto K., Kinoshita M., Suzuki I., Tasaka Y., Kano K., Taguchi Y., Mikami K., Hirabayashi M., Kashiwazaki N., Hosoi Y., Murata N., Iritani A.**, 2004 – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 6361-6366. **22. Vazquez J.M., Parrilla I., Roca J., Gil M.A., Cuello C., Vazquez J.L., Martínez E.A.**, 2009 – Theriogenology 71, 80-88. **23. Vazquez J.M., Roca J., Gil M.A., Cuello C., Parilla I., Vazquez J.L., Martinez E.A.**, 2008 – Theriogenology 70, 1216-1240. **24. Vigo D., Faustini M., Torre M.L., Pecile A., Villani S., Asti A., Norbert R., Maggi L., Conte U., Cremonesi F., Stacchezzini S., Maffeo G.**, 2002 – Reprod. Fertil. Dev. 14, 307-314. **25. Wieczorek J., Kosenyuk Y., Grad I., Cegła M.**, 2012 – Przegląd Hod. 7-9, 24-26.

Nowe związki osłaniające i antyoksydanty w kriokonserwacji nasienia knura – wstępne wyniki badań

Monika Trzcińska, Magdalena Bryła

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Balicach k. Krakowa

Metodą biotechnologiczną, która pozwoliła lepiej wykorzystać potencjał rozrodczy samców jest sztuczne unasienianie. Jest coraz szerzej stosowaną metodą rozrodu w hodowli świń, przyspiesza bowiem postęp genetyczny, zwiększa wykorzystanie wartościowych samców, obniża koszty utrzymania rozpłodników w przeliczeniu na jedno prosię. Do inseminacji używane jest głównie nasienie konserwowane w stanie płynnym, co umożliwia, w zależności od rodzaju stosowanego rozcieńczalnika, stopnia rozrzedzenia i warunków przechowywania, zachowanie jego przydatności przez okres kilku dni.

Pomimo prowadzenia intensywnych badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji, użycie mrożonego nasienia knura w praktyce jest bardzo ograniczone i kształtuje się na poziomie poniżej 1% ogólnej liczby wykonywanych zabiegów inseminacyjnych. Przy stosowaniu mrożonego nasienia knura w praktyce inseminacyjnej obserwuje się o 20% niższe wskaźniki rozrodcze w stosunku do nasienia konserwowanego w stanie płynnym oraz wskaźnik oproszeń mniejszy o 1-2 prosięta w miocie. Istotnym problemem w kriokonserwacji jest również zróżnicowana indywidualna podatność nasienia knurów na proces zamrażania-rozmrażania. Oprócz zmienności osobniczej pomiędzy poszczególnymi samcami, wykazano również różnice w zamrażalności między ejakulatami od tego samego osobnika. Aktualnie prowadzone badania mają na celu uzyskanie stałego wskaźnika płodności na poziomie 65-75%, przy użyciu nasienia większości knurów, przy liczbie plemników w dawce inseminacyjnej nie większej niż 3 miliardy plemników. Niskie wskaźniki rozrodu uzyskiwane po inseminacji loch nasieniem mrożonym wynikają głównie z faktu, iż błona komórkowa plemników knura charakteryzuje się dużą podatnością na uszkodzenia kriogeniczne [9].

Plemniki knura są bardziej wrażliwe na czynniki związane z zamrażaniem niż plemniki innych zwierząt gospodarskich. Stres osmotyczny, szok chłodowy oraz tworzenie się wewnątrz komórek kryształków lodu powodują uszkodzenia błon plazmatycznych i innych organelli komórkowych plemników knura. Przypuszcza się, że istotnym czynnikiem powodującym zwiększoną wrażliwość plemników na zamrażanie jest wysoki udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach i ich specyficzny skład. W składzie lipidów plemników knura wielonienasycone kwasy tłuszczowe (C22:5 i C22:6) stanowią około 65% całkowitej zawartości wszystkich kwasów tłuszczowych. Stosunek ilościowy kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych w plemniach knura wynosi 3,5 (u buhaja i tryka 2,8). Wysoki udział kwasów nienasyconych stanowi zagrożenie dla struktury błon plazmatycznych plemników, z powodu podatności tych kwasów na procesy peroksydacji. W wyniku nadmiaru reaktywnych form tlenu (RTF) lub wyczerpania możliwości kompensacyjnych układu antyoksydacyjnego w nasieniu, dochodzi do stresu oksydacyjnego [2]. Długotrwała ekspozycja plemników na RTF jest przyczyną zmian peroksydacyjnych w lipidach błon komórkowych plemników oraz ma niekorzystny wpływ na strukturę błon komórkowych, jak również zwiększa poziom fragmentacji DNA [6]. Proces ten może być redukowany w obecności antyoksydantów. W warunkach fizjologicznych złożony system antyoksyda-

cyjny plazmy nasienia i plemników zabezpiecza je przed szkodliwym wpływem RTF. Są to tzw. antyoksydanty endogenne, do których należą m.in.: selenozależna peroksydaza glutationowa (GSH--Px), dysmutaza nadtlenkowa (SOD) i katalaza. Procedura konserwacji nasienia w dużym stopniu narusza działanie systemu endogennych antyoksydantów, czemu mają przeciwdziałać niektóre komponenty rozcieńczalników o działaniu antyoksydacyjnym. Do grupy egzogennych związków wykazujących zdolność neutralizowania wolnych rodników należą m.in.: witamina A, C, E, karotenoidy (α- i β-karoten, luteina), ksantofile, egzogenny koenzym Q_{10} i polifenole. Nadmiar RTF, wytworzonych podczas procesu krio-konserwacji, może być zminimalizowany poprzez dodanie związków o działaniu antyoksydacyjnym do rozcieńczalników stosowanych w procedurze mrożenia nasienia.

Z badań przeprowadzonych w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB wynika, że dodatek niskiego stężenia chlorowodorku L-cysteiny do rozcieńczalnika Biosolwens wydłuża czas przeżywania nasienia knura. Yoshimoto i wsp. [13] stwierdzili, że dodatek kwasu askorbinowego do rozcieńczalnika używanego do mrożenia nasienia ochrania plemniki przed peroksydacją lipidów i fragmentacją DNA. Z kolei badania Funahashi i Sano [7] wykazały, że dodatek cysteiny i glutationu do rozcieńczalnika umożliwiającego konserwację nasienia w stanie płynnym powoduje wydłużenie czasu przeżywania i pozytywnie wpływa na integralność błon komórkowych plemników. Natomiast dodatek hypotauryny nie powodował istotnego wydłużenia czasu przechowywania nasienia knura. W badaniach przeprowadzonych przez Szczęśniak-Fabiańczyk i wsp. [12] wykazano, że pomimo wydłużenia czasu przeżywania plemników przechowywanych w rozcieńczalniku z dodatkiem fumaranu magnezu, wraz z czasem przechowywania wzrasta odsetek plemników z uszkodzoną chromatyną. Badania nad wpływem dodatku glutationu do rozcieńczalnika mrożeniowego wykazały wzrost odsetka plemników żywych, które nie uległy procesowi kapacytacji oraz spadek odsetka plemników wykazujących zaburzenia w strukturze grup sulfhydrylowych białek błonowych [8]. Z doświadczeń przeprowadzonych przez Ijaza i wsp. [10] na nasieniu bawoła domowego (*Bubalus bublis*) wynika, że dodatek butylowanego hydroksytoluenu do rozcieńczalnika mrożeniowego poprawia ruchliwość plemników i wpływa korzystnie na integralność akrosomu oraz żywotność plemników ocenianych po rozmrożeniu. Podobne wyniki uzyskali Roca i wsp. [11] w odniesieniu do nasienia knura. W badaniach własnych (niepublikowane) wykazano, że dodatek butylowanego hydroksytoluenu do rozcieńczalnika Biosolwens Plus wydłuża o 2,7 dnia czas przechowywania nasienia knura w temperaturach dodatnich, nie powodując zarazem istotnego wzrostu odsetka plemników apoptotycznych w porównaniu z grupą kontrolną.

Osobną kwestię w doskonaleniu technologii kriokonserwacji nasienia knura stanowi wprowadzanie do składu rozcieńczalnika komponentów o właściwościach osłaniających błony plazmatyczne plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi. W związku z tym, powszechnie stosuje się jako główny składnik rozcieńczalnika mrożeniowego żółtko jaja kurzego. Składnik ten stanowi jednak kontrowersyjny element rozcieńczalnika, zawiera bowiem komponenty, które są potencjalnymi nośnikami patogenów. Stąd w praktyce konserwacji stosowane są komercyjne rozcieńczalniki, nie zawierające składników pochodzenia zwierzęcego [5] lub zawierające ich substytuty w postaci białek roślinnych. Białko roślinne jest znacznie bezpieczniejszym suplementem pod względem sanitarnym, niż komponenty pochodzenia zwierzęcego. W porównaniu do surowicy zwierzęcej białka te nie wykazują zmienności pomiędzy wyprodukowanymi seriami, co umożliwia standaryzację warunków doświadczenia.

Z badań przeprowadzonych przez Bochenka i Smorąga [4] wynika, że zastąpienie surowicy zwierzęcej mieszaniną białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) w mediach używanych do separacji plemników na frakcje X i Y, spowodowało statystycznie istotny wzrost odsetka plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową. Jednocześnie dotychczasowe badania własne (niepublikowane) wykazały, że dodatek Pp do rozcieńczalnika znacznie obniża odsetek plemników apoptotycznych i nekrotycznych, w porównaniu z pozostałymi rozcieńczalnikami stosowanymi do konserwacji nasienia knura w stanie płynnym. Z badań przeprowadzonych przez Beccaglia i wsp. [3] na nasieniu wilka wynika, że dodatek lecytyny sojowej do rozcieńczalnika mrożeniowego działa ochronnie na błonę plazmatyczną plemników. Z kolei badania przeprowadzone przez Aires i wsp. [1] wykazały, że rozcieńczalnik mrożeniowy zawierający lecytynę sojową wpływa korzystnie na ruchliwość plemników buhaja po rozmrożeniu i wzrost odsetka zacielonych jałówek.

W badaniach nad doskonaleniem techniki kriokonserwacji dąży się do opracowania wiarygodnych nowych metod, pozwalających na identyfikację subpopulacji plemników zamrożonych-rozmrożonych o wysokiej zdolności zapładniającej.

Powszechnie stosowanymi testami w laboratoryjnej ocenie jakości nasienia są: koncentracja nasienia, procent plemników ruchliwych i rodzaj ich ruchu. Ocena ruchu, dokonywana coraz częściej za pomocą urządzeń komputerowych (Computer Assisted Sperm Analysis), a także określenie czasu przeżywania plemników, pozwalają jedynie na eliminację ejakulatów ewidentnie nieprzydatnych do mrożenia i inseminacji.

Prace prowadzone w ostatnich latach zarówno na nasieniu różnych gatunków zwierząt, jak i ludzi, wskazują, że obecność plemników apoptotycznych w nasieniu może być przyczyną obniżonej płodności. Pomimo intensywnych badań nad apoptozą w ejakulowanych plemnikach, nadal istnieje szereg niewyjaśnionych dotąd zagadnień, dotyczących zwłaszcza indukcji tego zjawiska na różnych etapach postępowania technologicznego z nasieniem, związanych bezpośrednio z wartością materiału biologicznego używanego do inseminacji.

W Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ-PIB przeprowadzono badania, mające na celu przygotowanie modyfikacji składu rozcieńczalnika mrożeniowego poprzez dodatek mieszaniny białek roślinnych i/lub lecytyny sojowej (Pp) oraz antyoksydantów. W celu przetestowania różnych stężeń antyoksydantów (L-glutationu, butylowanego hydroksytoluenu, katalazy), badaniami objęto nasienie pochodzące od 15 knurów (1-3 ejakulaty od knura) standardowo wykorzystywanych do inseminacji w Stacji Eksploatacji Knurów w Kleczy Dolnej. Nasienie po pobraniu (frakcja gęsta) transportowano do Działu Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ-PIB. Ocenę ruchliwości, koncentracji i morfologii przeprowadzono przy zastosowaniu systemu CASA (Computer Assisted Semen Analysis Systems). Świeże nasienie wszystkich knurów wykazywało ruch postępowy w przedziale od 87,5 do 91,1% oraz ponad 80% plemników o prawidłowej morfologii. Jednocześnie przeprowadzono ocenę zmian apoptotycznych przy zastosowaniu trzech metod fluorescencyjnych. Zastosowane metody opierają się na ocenie zmian apoptotycznych z zastosowaniem fluorochromu YO-PRO-1 oraz jodku propydyny (PI), pomiarze transbłonowego potencjału mitochondrialnego przy zastosowaniu barwnika JC-1 oraz ocenie fragmentacji DNA plemników metodą TUNEL. W nasieniu świeżym odsetek plemników apop-

Tabela 1

Odsetek plemników apoptotycznych (A), nekrotycznych (N) i żywych (Z) ocenianych przy zastosowaniu YO-PRO-1/PI; odsetek plemników żywych z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1$^+$) i plemników apoptotycznych/nekrotycznych z obniżonym potencjałem mitochondrialnym (JC-1$^-$) oraz odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA (TUNEL$^+$) w nasieniu świeżym przed procedurą zamrażania

Nasienie przed procedurą zamrażania						
ruchliwość (%)	YO-PRO-1/PI (%)			JC-1 (%)		TUNEL (%)
	A	N	Z	JC-1$^+$	JC-1$^-$	TUNEL$^+$
86,4 ±11,5	3,5 ±1,4	8,1 ±4,2	88,4 ±9,7	91,2 ±5,4	8,8 ±5,4	1,4 ±0,8

Tabela 2

Odsetek plemników apoptotycznych (A), nekrotycznych (N) i żywych (Z) ocenianych przy zastosowaniu YO-PRO-1/PI; odsetek plemników żywych z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1$^+$) i plemników apoptotycznych/nekrotycznych z obniżonym potencjałem mitochondrialnym (JC-1$^-$) oraz odsetek plemników wykazujących fragmentację DNA (TUNEL$^+$) po procedurze zamrażania-rozmrażania nasienia kriokonserwowanego

Rozcieńczalnik mrożeniowy	Nasienie po procedurze zamrażania-rozmrażania						
	ruchliwość (%)	YO-PRO-1/PI (%)			JC-1 (%)		TUNEL (%)
		A	N	Z	JC-1$^+$	JC-1$^-$	TUNEL$^+$
Kontrola (rozieńczalnik żółtkowo-laktozowy)	47,1^a ±8,2	14,2^a ±6,4	39,4^a ±11,4	46,4^a ±10,7	52,8^a ±4,1	47,2^a ±4,1	1,7 ±0,2
Kontrola+Pp	63,2^b ±8,5	8,5^b ±3,1	27,9^{ab} ±7,3	63,6^{bc} ±7,0	68,5^a ±3,7	31,5^a ±3,7	1,6 ±0,7
Kontrola+GLU	50,6^{ab} ±7,8	11,2^{ab} ±4,5	36,0^a ±6,9	52,8^{ab} ±3,8	57,9^a ±2,5	42,1^a ±2,5	1,3 ±0,6
Kontrola+BHT	71,2^c ±9,2	8,9^b ±2,7	17,8^b ±1,8	73,3^c ±7,4	77,6^b ±6,9	22,4^b ±6,9	1,9 ±1,1
Kontrola+KAT	54,0^{ab} ±6,2	10,8^{ab} ±2,9	34,8^a ±3,8	54,4^{ab} ±11,9	59,1^a ±8,2	40,9^a ±8,2	0,9 ±0,6

a, b, c – średnie wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie przy P<0,05

totycznych wynosił od 0,5% do 13% (YO/PRO-1/PI, JC-1), podczas gdy fragmentację DNA stwierdzono w 0,5-2% plemników.

Procedurę mrożenia nasienia knura przeprowadzono według metody Westendorfa i wsp. (1975). Nasienie (frakcja gęsta) po pobieraniu rozcieńczano w stosunku 1:2 przy użyciu rozcieńczalnika Biosolwens Plus, a następnie schładzano do temperatury +15°C przez 60 minut. Po tym czasie nasienie wirowano przy 800 g przez 25 minut, w temperaturze +15°C, celem oddzielenia plemników od osocza i rozcieńczalnika. Uzyskany po wirowaniu osad plemników rozcieńczano przy użyciu następujących rozcieńczalników:

- żółtkowo-laktozowego (80 ml 11% roztworu laktozy + 20 ml żółtka jaja kurzego) – grupa kontrolna;
- żółtkowo-laktozowego z dodatkiem mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) (stężenie: 0,0005 g/ml);
- żółtkowo-laktozowego z dodatkiem mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) (stężenie: 0,001 g/ml);
- żółtkowo-laktozowego z dodatkiem wybranych antyoksydantów:
  – L-glutationu (stężenie: 2,5 mM),
  – L-glutationu (stężenie: 5 mM),
  – butylowanego hydroksytoluenu (stężenie: 0,5 mmol),
  – butylowanego hydroksytoluenu (stężenie: 1 mmol),
  – butylowanego hydroksytoluenu (stężenie: 2 mmol),
  – katalazy (stężenie: 200 IU/ml,
  – katalazy (stężenie: 400 IU/ml).

Następnie nasienie schładzano do temperatury +4°C przez 90 minut. Po schłodzeniu próbkę mieszano w stosunku 2:1 z odpowiednim rozcieńczalnikiem (spośród wyżej wymienionych) zawierającym dodatkowo 9% glicerol, tak by końcowa koncentracja plemników wynosiła 1x10^9 plemników/ml, a koncentracja glicerolu 3%. Rozcieńczone i schłodzone plemniki umieszczano w słomkach o objętości 0,5 ml i zamrażano w parach ciekłego azotu (temperatura ok. –120°C). Po 15 minutach słomki przenoszono do ciekłego azotu. Ogółem zamrożono 1248 słomek (4 słomki na każdy wariant zmodyfikowanego rozcieńczalnika). Rozmrażanie słomek odbywało się przez ich rozmrożenie w temperaturze +37°C i przeniesienie ich zawartości do rozcieńczalnika Biosolwens Plus o tej samej temperaturze.

W wyniku przeprowadzonej oceny zmian apoptotycznych plemników ustalono optymalne stężenie mieszaniny białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp), wynoszące 0,0005 g/ml oraz stężenia antyoksydantów: L-glutationu (GLU) – 5 mM, butylowanego hydroksytoluenu (BHT) – 2 mmol, katalazy (KAT) – 400 IU/ml.

Do kriokonserwacji przeznaczono nasienie pochodzące od 6 knurów (4 ejakulaty od knura). Zarówno nasienie świeże (przed procedurą zamrażania), jak i nasienie po procedurze zamrażania-rozmrażania oceniano w kierunku zmian apoptotycznych. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 1. i 2.

Z danych zestawionych w tabelach wynika, że po procedurze zamrażania-rozmrażania najwyższy odsetek plemników wykazujących ruch postępowy, jak również najwyższy odsetek plemników żywych i plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym obserwowano w rozcieńczalniku z dodatkiem butylownego hydroksytoluenu (BHT). Najniższy odsetek plemników apoptotycznych zidentyfikowano w rozcieńczalniku z dodatkiem białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) (0,0005 g/ml). Wykazano istotne statystycznie różnice (P<0,05) w odsetku poszczególnych subpopulacji plemników pomiędzy różnymi wariantami rozcieńczalników. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że procedura kriokonserwacji nie indukuje fragmentacji DNA w plemnikach knura.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono wstępne wyniki badań nad opracowaniem składu rozcieńczalnika mrożeniowego do nasienia knura. Z przeprowadzonych badań wynika, że w rozcieńczalniku z dodatkiem butylownego hydroksytoluenu (BHT) lub białek roślinnych i lecytyny sojowej (Pp) stwierdzono najniższą jakość nasienia po procedurze zamrażania-rozmrażania.

Literatura: 1. Aires V.A., Hinsch K.D., Mueller-Schloesserb F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E., 2003 – Theriogenology 60, 269-279. **2. Aitken R.J.,** 1999 – J. Reprod. Fertil. 115, 1-7. **3. Beccaglia M., Anastasi P., Chigioni S., Luvoni G.C.,** 2009 – Reprod. Domest. Anim. 44, 345-349. **4. Bochenek M., Smorąg Z.,** 2008 – Reprod. Fertil. Dev. 20, 209 (abstr). **5. Cuello C., Gil M.A., Parrilla I., Tornel J.,Vazquez J.M., Roca J., Berthelot F., Martinat-Botte F., Martinez E.A.,** 2004 – Theriogenology 62, 353-361. **6. Frączek M., Kurpisz M.,** 2005 – Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 59, 523-534. **7. Funahashi H., Sano T.,** 2005 – Theriogenology 63, 1605--1616. **8. Gadea J., Gumbao D., Matás C., Romar R.,** 2005 – J. Androl. 26 (6), 749-756. **9. Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M.C., Rath D.,** 2008 – Theriogenology 70, 1225-1233. **10. Ijaz A., Hussain A., Aleem M., Yousaf M.S., Rehman H.,** 2009 – Theriogenology 71, 1326--1329. **11. Roca J., Gil M.A., Hernandez M., Parrilla I., Vazquez J.M., Martinez E.A.,** 2004 – J. Androl. 25 (3), 397-405. **12. Szczęśniak-Fabiańczyk B., Bochenek M., Smorąg Z., Ryszka F.,** 2003 – Reprod. Biol. 3(1), 81-95. **13. Yoshimoto T., Nakamura S., Yamauchi S., Muto N., Nakada T., Ashizawa K., Tatemoto H.,** 2008 – Cryobiology 57, 30-36.

New protectants and antioxidants in cryopreservation of boar semen – preliminary results of the studies

Summary

Despite intensive research to develop an effective cryopreservation method, the use of frozen boar semen is very limited in practice and accounts for less than 1% of all inseminations. Boar spermatozoa are more sensitive to freezing compared to the sperm of other farm animals. The semen preservation procedure largely disturbs the endogenous antioxidant system, which is counteracted by some antioxidant extender components. Another issue in the improvement of boar semen cryopreservation technique is the introduction into

the extender of the components that protect sperm plasma membranes against cryogenic damage. Research was conducted at the Department of Animal Reproduction Biotechnology of the National Research Institute of Animal Production to modify the composition of freezing extender by supplementing it with a mixture of vegetable protein and/or soybean lecithin (Pp) as well as antioxidants L-glutathione, butylated hydroxytoluene (BHT), and catalase. This study, involving 54 ejaculates, showed that following the freezing-thawing procedure, the highest percentage of progressively motile sperm and the highest percentage of live sperm and sperm with high mitochondrial potential were observed for the extender supplemented with BHT. The lowest percentage of apoptotic spermatozoa was identified in the extender supplemented with vegetable proteins and soybean lecithin (Pp) (0.0005 g/ml). Statistically significant differences (P<0.05) were found for the percentage of individual sperm subpopulations between different extender variants. The present study shows that cryopreservation procedure does not induce DNA fragmentation in boar spermatozoa.

KEY WORDS: boars, semen quality, cryopreservation, antioxidants, apoptotic markers

Wpływ dodatku witamin E i C w żywieniu loch na ich użytkowość i odchów prosiąt

Maria Kawęcka[1], Anna Sosnowska[1], Eugenia Jacyno[1], Anita Kołodziej[1], Beata Matysiak[1], Marian Kamyczek[2]

[1]Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
[2]IZ PIB Zakład Doświadczalny Pawłowice

Wprowadzając odpowiednie komponenty w żywieniu loch wysokoprośnych i karmiących można wpływać nie tylko na ich użytkowość rozpłodową, ale także na wyniki odchowu karmionych przez nie prosiąt. Rezultaty niektórych badań wskazują, że zwiększony dodatek witaminy E do pasz może wpływać na wzrost wielkości miotu oraz funkcji układu immunologicznego (obserwowany wzrost koncentracji IgG), zmniejszenie strat prosiąt do odsadzenia, włączając infekcje *Escherichia coli.* W wielu badaniach podkreśla się synergistyczne działanie witaminy E z selenem. W wyniku suplementacji α-tokoferolu i selenu uzyskano wzrost liczebności miotów przy urodzeniu i odsadzeniu, większą masę prosiąt urodzonych i wyższy ich status zdrowotny. Stwierdzono, że po zastosowaniu dodatku witaminy E zmniejsza się wystąpienie zespołu MMA. Witamina E współdziała również z witaminą C, co zwiększa zarówno odporność komórkową, jak i humoralną. Pełni też rolę regenerującą w stosunku do antyoksydantów hydrofobowych, w tym przede wszystkim α-tokoferolu. Istnieją dwa krytyczne okresy w zapotrzebowaniu prosiąt na witaminę E – po urodzeniu oraz po odsadzeniu. Niski poziom tej witaminy po urodzeniu prosiąt jest związany z niskim jej transferem przez łożysko. Zapotrzebowanie to pokrywane jest poprzez siarę i mleko loch, a później w niewielkim stopniu z paszy**.** Po odsadzeniu prosiąt stężenie α-tokoferolu znacznie się obniża, co może być spowodowane ograniczonym wchłanianiem stosowanych form witaminy E w paszy. Deficyt witaminy E częściej występuje u potomstwa loch starszych, w których ciele dochodzi do znacznego wyczerpania rezerw zgromadzonego tokoferolu**.**

Witamina C nie jest dodawana do paszy dla świń, gdyż mają one zdolność jej syntetyzowania z glukozy. Intensywna synteza witaminy C zachodzi również u płodów świń w pierwszym okresie ciąży, natomiast podczas późnego okresu ciąży głównym jej źródłem jest transfer od matki. Jest to ważny proces, ponieważ prosięta w pierwszych dniach po urodzeniu nie są zdolne do syntezy witaminy C. Uzależnione są od zapasów z transferu łożyskowego i podaży witaminy C w siarze i mleku matki. Jednocześnie zaobserwowano obniżoną koncentrację kwasu askorbinowego u loch, co może być spowodowane jej transferem do płodów i gruczołu mlecznego, a później do siary i mleka. Wykazano zmniejszenie poziomu witaminy E i C w surowicy prosiąt po podaniu im w iniekcji żelaza, co powinno być brane pod uwagę, ze względu na ważność tych substancji w prewencji chorób zakaźnych**.** Zapotrzebowanie na kwas askorbinowy gwałtownie wzrasta w sytuacjach stresowych, np. stres związany z porodem (szczególnie przedłużającym się), odsadzaniem prosiąt, przegrzaniem. Może też być spowodowane występowaniem niektórych chorób oraz wysoką produkcyjnością zwierząt. W niektórych badaniach wykazano, że zastosowanie dodatku witaminy C u prosiąt wpłynęło pozytywnie na zmniejszenie śmiertelności oraz wzrost odpowiedzi immunologicznej.

Coraz częściej sugeruje się stosowanie zwiększonych, nawet dwukrotnie, dawek witamin [16]. W niektórych badaniach podjęto próby zastosowania znacznie wyższych dawek witaminy E i C w żywieniu świń niż w obowiązujących w wielu krajach normach [7, 15]. W praktyce producenci premiksów często przekraczają, nawet podwójnie, zalecane w normach ilości witamin dodawanych do preparatów. Dzieje się tak ze względu na większą wydajność aktualnie utrzymywanych świń i stres temperaturowy w okresie letnim.

Mając na uwadze powyższe spostrzeżenia, podjęto badania nad oceną wpływu zastosowania większej, niż w zalecanych normach, ilości witaminy E oraz dodatku witaminy C w żywieniu loch w ostatnim okresie ciąży i w okresie karmienia prosiąt na użytkowość rozrodczą loch i odchów prosiąt. Materiał badawczy stanowiło 139 loch wieloródek linii 990, inseminowanych nasieniem knurów tej linii. Doświadczenie przeprowadzono w dwóch częściach, obejmujących dwie pory roku, tj. okres jesienno-zimowy (60 loch) oraz okres letni (79 loch). Lochy od 90. dnia ciąży żywiono mieszanką pełnoporcjową (granulowaną) dla loch prośnych i karmiących, o tej samej wartości pokarmowej, zgodnie z obowiązującymi w Polsce normami żywienia (tab. 1). Żywienie loch w poszczególnych grupach zróżnicowane było udziałem stosowanego zwiększonego dodatku witamin, zgodnie z układem podanym w tabeli 2. Okres karmienia prosiąt wynosił 32 dni.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż w wyniku zastosowania zwiększonego dodatku witaminy E (200 mg/kg) w paszy dla loch od 90. dnia ciąży i w okresie laktacji, nastąpił znaczny wzrost jej koncentracji w surowicy krwi (tab. 3). Należy podkreślić, że najwyższą koncentrację witaminy E w surowicy stwierdzono u loch otrzymujących witaminę E podaną łącznie z witaminą C (500 mg/kg). Potwierdzałoby to zdolności witaminy C do ochrony witaminy E przed utlenianiem bądź zwiększeniem jej regeneracji. Wielu autorów podkreśla występowanie interakcji pomiędzy witaminą E i C. W badaniach Laurdsen i Jensen [7] dodatek witaminy C w paszy dla odsadzonych prosiąt spowodował wzrost zawartości tokoferolu w ich wątrobie oraz wzrost jej poziomu w mięśniach.