

Aktualne poglądy na kriokonserwację nasienia tryka

Anna Kosiek

AR w Krakowie

Prowadzone od wielu lat, zarówno w kraju jak i za granicą, badania nad zamrażaniem nasienia tryków pozwoliły co prawda na uzyskanie zadowalającej płodności po inseminacji owiec w rui spontanicznej, jednak przy inseminacji owiec w rui synchronizowanej wyniki płodności nie są jeszcze na poziomie, który umożliwiłby osiągnięcie stabilnych efektów (Kareta, 1999). Osiągnięcie zadowalającej płodności zależy z jednej strony od powodzenia procesu mrożenia nasienia, z drugiej od metody inseminacji, a więc głębokości deponowania nasienia w drogach rodnych samicy, a także dawki inseminacyjnej czy czasu inseminacji.

Proces zamrażania nasienia tryka powoduje uszkodzenie gamet oraz zmniejszenie ich przeżywalności w żeńskich drogach rodnych. Dlatego też wciąż podejmuje się badania związane z ograniczeniem strat, wynikających z procesu kriokonserwacji.

Omawiane trudności w technologii zamrażania nasienia tryka wynikają z faktu, iż bez względu na zastosowane rozcieńczalniki i metodę mrożenia każdy etap kriokonserwacji wywołuje w plemnikach zmiany biochemiczne, które naruszają podstawowe funkcje gamety męskiej, powodując obniżenie jej przeżywalności i zdolności zapładniającej. Wiadomo już od dawna, że w procesie tym uszkodzone zostają najpierw komponenty plazmolemy, które na skutek peroksydacji lipidów błonowych zmieniają jej dwuwarstwową strukturę, właściwości fizykochemiczne oraz przepuszczalność (Strzeżek, 1987). W konsekwencji prowadzi to do wycieku enzymów akrosomalnych (m.in. akrosyny, hialuronidazy, neuraminidazy) i wstawkowych (m.in. aminotransferazy i dehydrogenazy) oraz zmian w mitochondriach i strukturze nukleoproteinowej jądra (Salamon, Maxwell, 1995; Upreti i wsp., 1996). Przyjmuje się, iż wymienione powyżej czynniki powodują tak duże uszkodzenia, że z 40-60% plemników zachowujących ruchliwość, połowa ma zniekształcone mitochondria i włókna osiowe (aksonemy) i nie jest zdolna do penetracji osłonki przejrzystej. Tak więc tylko pozostałe 20-30% plemników można uznać za biologicznie zdolne do zapłodnienia komórki jajowej (Nath, 1972; Salamon i Maxwell, 1995; Windsor i wsp., 1995).

Celem licznych badań nad opracowaniem rozcieńczalnika do mrożenia nasienia tryka było ustalenie odpowiedniego stężenia związków osłaniających oraz poszukiwanie ich substytutów, jak również rozpoznanie czynników usprawniających metabolizm komórkowy, biochemiczną integralność i stabilność błony komórkowej czy ruchliwość. Spośród wielu przebadanych związków chemicznych glicerol stanowi nadal pod-

stawowy środek kriochronny, przy czym jego stężenie zależy od składu rozcieńczalnika, metody dodawania oraz tempa ochładzania i szybkości mrożenia nasienia.

Każdy kontakt plemników z glicerolem podczas procesu ekwilibracji narusza strukturę akrosomu i mitochondrii, hamuje aktywność oddechową i zakłóca fosforylację oksydacyjną, co jest główną przyczyną krótkiej przeżywalności plemników po rozmrożeniu nasienia (Strzeżek, 1983). Dlatego też zaleca się nie przekraczanie większych stężeń glicerolu niż 4-6% (Fiser i Fairfull, 1984; 1986). Wyższe stężenia w granicach 7-8% co prawda zwiększają ruchliwość plemników, ale dość istotnie deformują akrosom (Watson i Martin, 1975). Należy pamiętać jednak, że glicerol wprowadzony do nasienia o obniżonej aktywności metabolicznej plemników wywiera słabsze działanie destrukcyjne na błony komórkowe (Strzeżek, 1987).

Ze względu na niekorzystne oddziaływanie glicerolu na gamety męskie podejmuje się działania zmierzające do modyfikacji technologii zamrażania, głównie przez ograniczenie czasu kontaktu plemników z glicerolem, obniżenie jego stężenia lub całkowite wyeliminowanie go z rozcieńczalnika. I tak podjęte przez Abdelhakeam i wsp. (1991) próby mrożenia nasienia tryka w rozcieńczalniku bez glicerolu z 25-30% dodatkiem żółtka jaja kurzego zakończyły się dość obiecująco, bowiem po inseminacji doszyjkowej tak zamrożonym nasieniem wykocilo się ponad 52% maciorek. Okazało się więc, że wysoki poziom lipoprotein, występujący w rozcieńczalniku z dużą zawartością żółtka, zabezpiecza plemniki tryka podczas mrożenia.

Szczególnie aktywna okazała się frakcja lipoprotein niskiej gęstości. Semenova (1987) zastosowała ją w rozcieńczalniku w celu poprawy integralności błon akrosomalnej i mitochondrialnej oraz ruchliwości, a nieco później Parks i Graham (1992) zwrócili szczególną uwagę na dobre właściwości osłaniające tej frakcji lipoprotein.

Jednym z głównych składników wchodzących w skład rozcieńczalników do mrożenia są węglowodany, które stanowią źródło energii dla plemników, ale mogą również być stosowane jako krioprotektory. Badania przeprowadzone przez Molinię i wsp. (1994) wskazują, że disacharydy, takie jak sacharoza czy trehaloza, skuteczniej stabilizują kompleks białka – lipidy niż monosacharydy. Podobnie bowiem jak glicerol, stabilnie wiążą się z fosfolipidami błony komórkowej plemników, aczkolwiek glicerol jako substancja niskocząsteczkowa łatwiej penetruje błonę gamety męskiej niż wielocząsteczkowe disacharydy (Anchordoguy i wsp., 1987).

W celu ochrony lipidów i białek błonowych Sánchez-Partida i wsp. (1992) zastosowali w rozcieńczalniku aminokwasy, takie jak prolina oraz glicyno-betaina i wykazali korzystny ich wpływ na ruchliwość plemników po rozmrożeniu.

Aby usprawnić proces mrożenia i zmniejszyć straty wynikające z uszkodzeń struktur plemników, jakie występują podczas konserwacji, zastosowano też peptydy (AFP) i glikoproteiny (AFGP), uzyskiwane z tkanek ryb arktycznych, które obniżają punkt zamrażania i oddziałują stabilizująco na błonę komórkową. Próba użycia tych substancji w rozcieńczalniku do mrożenia nasienia tryka wykazała, że zwiększają one ruchliwość nasienia po rozmrożeniu (Payne i wsp., 1994).

Wzmocniony proces peroksydacji lipidów podczas mrożenia nasienia powoduje, jak wiadomo, tworzenie się rodników hydroksylowych i nadtlenuków lipidów (Strzeżek, 1987). Dlatego też wielu autorów zastosowało w rozcieńczalnikach do mrożenia nasienia tryka substancje antyoksydacyjne, takie jak wit. E, BHT (butylohydroksytoluen), fosfoetanolamina, ditrobutylkrezol (DTBK), kwas askorbinowy czy karnozyna (Salomon, Maxwell, 1995; Sánchez-Partida i wsp., 1997; Ollero i wsp., 1998). Do tzw. zmiataczy wolnych rodników, a więc związków, które zabezpieczają komórki przed toksycznością tlenu, zalicza się również Tris i glukozę (Kleczkowski i wsp., 1998).

Ciekawe badania zaprezentowali Gillan i Maxwell (za Maxwell i Watson, 1996), stosując w rozcieńczalniku dysmutazę i katalazę – enzymy, które biorą udział w rozpadzie rodników i nadtlenuku wodoru. Po inseminacji laparoskopowej nasieniem mrożonym z dodatkiem tych związków uzyskali oni 15% wzrost liczby zakończonych maciorek.

Aby zwiększyć ruchliwość i przeżywalność plemników tryka po rozmrożeniu, zastosowano także substancje uaktywiające metabolizm komórkowy plemników. I tak Maxwell i wsp. (1995), po przetestowaniu kalikreiny, kofeiny, pentoxyfiliny, cAMP i pochodnych adenozyliny wykazali, że tylko pentoxyfilina zwiększa ruchliwość nasienia po rozmrożeniu. Należy przy tym zaznaczyć, że już wiele lat wcześniej zwrócono uwagę na dodatnie oddziaływanie tych związków na nasienie buhaja i człowieka (Mann i Lutwak-Mann, 1981; Aitken i wsp., 1986; Hammit i wsp., 1989).

Jako dodatek do rozcieńczalnika Sánchez-Partida i wsp. (1997) testowali również składniki płynu najądrza, takie jak tauryna, hypotauryna i inozytol. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że tylko tauryna poprawiała ruchliwość plemników tryka w granicach od 7-13%.

Korzystny wpływ na jakość plemników po rozmrożeniu ma też dodawanie do rozcieńczalnika plazmy nasienia innych gatunków zwierząt, np. buhaja i knura, ze względu na zawarte w nich inhibitory proteaz akrosomowych czy antyoksydanty. Już wiele lat wcześniej podejmowano próby mrożenia nasienia tryka z plazmą nasienia buhaja (Kareta i wsp., 1972). Jak wykazują badania przeprowadzone przez Fischera i wsp. (1992), mrożenie nasienia tryka z dodatkiem nasienia buhaja oraz plazmą nasienia knura zwiększa liczbę wykończonych maciorek w porównaniu do grupy kontrolnej odpowiednio o 12% i 6%.

Z kolei Ollero i wsp. (1997) stwierdzili, że nasienie tryka, z którego wymyto plazmę przed mrożeniem, a następnie dodano ją po rozmrożeniu (w całości lub frakcją >10kDa) uzyskuje wyższe wskaźniki heterogeniczności i przeżywalności.

Dla przeżywalności plemników istotna jest również temperatura rozmrażania nasienia. Jak wynika z ostatnich badań przeprowadzonych przez Söderquist i wsp. (1996), wyższe temperatury rozmrażania zwiększają ruchliwość nasienia oraz integralność błon komórkowych. I tak przy rozmrażaniu nasienia w temp. 70°C przez 5 s uzyskali oni 66% ruchliwych plemników i 63% nie wykazujących uszkodzeń błony komórkowej, a przy rozmrażaniu w temperaturze 35°C przez 12 s parametry te układały się odpowiednio na poziomie 50,5% i 41,7%.

Proces mrożenia nasienia samców zwierząt gospodarskich uszkadza ponad 50% plemników. Ta frakcja martwych plemników i „wyciekające” z uszkodzonych struktur komórkowych enzymy oddziałują szkodliwie na pozostałe żywe gamety. Jako postępowanie zapobiegające de las Heras i wsp. (1996) zalecają filtrowanie plemników przez Sephadex G-10, po którym to uzyskuje się ok. 90% plemników z nieuszkodzonymi akrosomami w nasieniu mrożonym i ok. 98% w nasieniu świeżym. W tak przefiltrowanych plemnikach Valcarcel i wsp. (1996) stwierdzili aż 73% ruchliwych gamet w porównaniu do 41% w nasieniu niefiltrowanym. Frakcja plemników uzyskana po przefiltrowaniu wykazywała także bardziej stabilną integralność plazmolemmy i błony akrosomalnej.

Drugim sposobem oddzielenia frakcji martwych plemników jest przemywanie ich w gradiencie Percollu o stężeniu 45-90%, który w porównaniu z rozdziałem plemników na Sephadexie G-10 okazał się sposobem bardziej przydatnym do tego celu ze względu na uzyskanie wyższej ruchliwości plemników oraz lepszej integralności plazmolemmy i błony akrosomalnej (Valcarcel i wsp., 1996).

Nasienie tryka cechuje się wysokim poziomem prostaglandyn PGE i PGF, które czynnie stymulują jego ruchliwość poprzez wzrost koncentracji cykazy adenylowej i cAMP (Fayez i wsp., 1987). Hormony te zwiększają również częstotliwość skurczów mięśniówki gładkiej i ułatwiają transport plemników w narządach rozrodczych samicy. Z uwagi na fakt, iż proces mrożenia i rozmrażania redukuje zawartość prostaglandyn w nasieniu, Anel i wsp. (1988) zalecają dodawanie od 5 do 15 µg PGF_{2α} na kulkę, które istotnie poprawiają parametry nasienia. Z kolei wyższa koncentracja prostaglandyn zmniejsza ruchliwość plemników i uszkadza akrosom (Memon i wsp., 1980).

Populacja plemników poddanych mrożeniu jest bardziej homogeniczna i wymaga krótszego czasu kapacytacji niż nasienie niekonserwowane (Watson, 1995). Konsekwencją destabilizacji błony i przedwczesnej reakcji akrosomalnej jest krótszy czas przeżywania plemników w drogach rodnych maciorki oraz zmniejszenie płodności przy inseminacji doszyjkowej. Dlatego też o wiele większą skuteczność zapłodnienia przy stosowaniu nasienia mrożonego uzyskuje się po inseminacji domacicznej (Gillan i wsp., 1997). Poza tym inseminacja domaciczna pozwala na zmniejszenie liczby plemników w dawce.

Przedstawiając najnowsze doniesienia na temat prób polepszenia metody mrożenia nasienia tryków wydaje się, iż należy skłaniać się do sugestii wysuwanych przez Watsona (1995), który twierdzi, że postępu w mrożeniu nasienia tryka nie osiągnie się dalszym modyfikowaniem krioostłaniających komponentów rozcieńczalników, lecz poprzez rozpoznanie biochemicznych i biofizycznych procesów związanych z tą metodą. Szczególną uwagę należałoby zwrócić na modyfikowanie płynności błony komórkowej oraz zwiększenie jej stabilności podczas krikonserwacji. Poznanie procesów biochemicznych i biofizycznych, zachodzących podczas mrożenia nasienia tryka, pozwoli na wyeliminowanie niekorzystnych wpływów środowiska oraz zachowanie prawidłowej funkcji gamety męskiej po rozmrożeniu.

Reasumując należy podkreślić, że autorzy podejmujący badania nad poprawą wyników mrożenia nasienia tryka przy-

mują różne kryteria oceny, takie jak ruchliwość nasienia po rozmrożeniu, przeżywalność, zmiany morfologiczne czy wskaźniki metabolizmu. Właściwą ocenę wyników mrożenia utrudniają z jednej strony różne sposoby deponowania nasienia do dróg rodnych maciorki (inseminacja doszyjkowa lub domaciczna), a z drugiej wielkość wprowadzanej dawki. Należy również zwrócić uwagę na to, że pewne sposoby postę-

powania z nasieniem podczas mrożenia były już wcześniej stosowane (np. zastosowanie w rozcieńczalniku do mrożenia katalazy, plazmy nasienia innych gatunków zwierząt czy prostaglandyn), ale biorąc pod uwagę zmiany w technice uznaje się te metody za bardziej dopracowane.

38 pozycji literatury do wglądu u Autorki i w Redakcji

Problem otłuszczenia jagniąt rzeźnych

Cz. III. Konsystencja i barwa tłuszczu

Alfred Dankowski

ATR w Bydgoszczy

Konsystencja i barwa tłuszczu jest ważnym zagadnieniem w praktyce owczarskiej i badaniach prowadzonych w różnych krajach Europy Zachodniej, zwłaszcza we Francji, najbardziej dotkniętej wadami tych cech u jagniąt. Chociaż problem ten w Polsce jeszcze nie występuje, warto już obecnie go zasygnalizować. Zmiana relacji Polski z Unią Europejską z pewnością wpłynie także na choćby częściową zmianę formy sprzedaży jagniąt: z żywca na tusze chłodzone, mrożone lub wyręby [4]. Wtedy stopień otłuszczenia, a zwłaszcza wady samego tłuszczu będą w znacznej mierze decydowały o ocenie jakości naszej produkcji.

Warto wspomnieć, że już w 1997 r. wyeksportowano do Unii Europejskiej 0,1 tys., a w 1998 r. – 0,2 tys. ton mięsa baraniego. I chociaż udział w całym eksporcie owiec [8], wynoszącym w przeliczeniu na mięso 2,3 tys. ton (2,1 tys. ton stanowił żywiec, czyli 206 tys. szt., w tym 85% – jagnięta do 1 roku) był niewielki (8,7%), to może być zwiastunem większej zmiany struktury naszego eksportu owiec do UE, do której od roku 1994 kierowane jest 90% sprzedaży (w 1993 r. 51%).

Ocena jakości tuszy, oprócz innych cech, dotyczy także konsystencji i barwy tłuszczu, głównie okrywowego (podskórnego). Pod pojęciem szeroko rozumianej konsystencji (w literaturze francuskiej używa się wieloznaczącego słowa „tenue” [7], w którym zawiera się właściwość krzepliwości w wyniku chłodzenia w takim stopniu, żeby tuszka była pokryta zwartą jędrną warstwą tłuszczu). Wadą jest więc tłuszcz miękki na całej lub nawet pewnej partii tuszy. Palce łatwo ślizgają się, a powierzchnia tuszy może być nawet lepka, oleista, pozostawiając wyraźne ślady na palcach.

Barwa tłuszczu (nie należy mylić z barwą mięsa) powinna być białopertłowa, opalizująca. Może jednak pod wpływem różnych czynników przybrać barwę żółtą, w różnych odcieniach aż do czerwobrunatnej. Zdecydowanie żółta występuje rzadko i powinna być przedmiotem uwagi kontroli weterynaryjnej jako objaw żółtaczki. Już w 1975 r. Kirton i wsp. [7]

zwrócili uwagę na fakt, że u części tusz występuje żółte zabarwienie tłuszczu, nie mające jednak ujemnego wpływu na smak mięsa. Może ono jednak poważnie zahamować popyt. Wady konsystencji i barwy występują często łącznie, chociaż nie jest to regułą [5]. Wpływają one ujemnie zwłaszcza na odczucia estetyczne. Oprócz tego mają wpływ, chociaż znacznie mniejszy, na wartość technologiczną (tab.), gdyż utrudniają precyzyjny podział na wyręby (ślizganie się mięśni) i powodują silniejszy specyficzny zapach (smak) baraniny [2]. Nie stwierdzono natomiast ujemnego wpływu na przechowywanie mięsa w normalnych warunkach chłodzenia (0-2°C).

Należy jednak nadmienić, że według poczynionych obserwacji konsumenci zwracają mniejszą uwagę na kolor i konsystencję tłuszczu, większą natomiast na ilość tłuszczu, kolor mięsa, wielkość i świeżość przygotowywanych w sklepach samoobsługowych porcji, a także cenę [7].

Przyczyny tworzenia się tłuszczu miękkiego, a nawet oleistego, nie są jeszcze zupełnie poznane. Wydaje się, że jedną z nich mogą być zmiany w funkcjonowaniu zwierza, np. przyspieszenie przechodzenia dawki pokarmowej ze względu na brak lub niedostateczną ilość włókna przy nadmiarze skrobi, a także zbyt duży udział nienasyconych kwasów tłuszczowych. W rezultacie osadzona tkanka tłuszczowa zawiera zredukowaną ilość kwasów tłuszczowych nasyconych o parzystej liczbie węgla, na korzyść kwasów tłuszczowych nienasyconych, o rozgałęzionych łańcuchach i o nieparzystej liczbie atomów węgla. Kwasy te wpływają na niski punkt topnienia i silne powinowactwo chemiczne z wodą [5, 7].

Nie jest także znana przyczyna brązowoczerwonego zabarwienia tłuszczu. W przypadku jednoczesnego wystąpienia wad barwy i konsystencji uważa się, że zmiana składu tłuszczu i obecność wolnych rodników (pobieranie pasz z zawartością związków trujących, dawki o obniżonym poziomie białka, nadmierny wysiłek fizyczny i inne czynniki stresowe) łączy się z osłabieniem błon czerwonych ciałek krwi, które łatwo pękają, a zawarty w nich barwnik odkłada się w tłuszczu [7, 9]. Ponadto duże nasycenie tłuszczami przyspiesza zjawiska utlenienia, przyczyniając się do zabarwień, które w miarę czasu brunatnieją. Nie bez znaczenia jest także fakt,

Tabela

Wpływ wad jakości tłuszczu na zapach i smak mięsa (klatka piersiowa), w punktach natężenia intensywności, wg Jabet [2]

Cecha	Tuszka z otłuszczeniem		
	białym, jędrnym	lekko zabarwionym i lekko miękkim	mocno zabarwionym i bardzo miękkim
Zapach	35,2	53,9	52,1
Smak	43,1	57,0	65,1

Natężenie intensywności w pkt.: 0 – brak, 100 – maksymalnie