

Możliwości zastosowania komory HHP do kriokonserwacji nasienia knura

Magdalena Bryła, Monika Trzcńska

Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji

W inseminacji sów stosowane jest nasienie bezpośrednie po pobraniu lub po przechowywaniu w stanie płynnym przez okres kilku dni w temperaturze 15-20°C [5]. Standardowe rozcieńczalniki do nasienia knura zapewniają uzyskanie wyników unasienniania na niezmiennym poziomie do 3 dni po rozrzedzeniu. Dłuższe przechowywanie nasienia, mimo że umożliwia zachowanie ruchliwości plemników na wysokim poziomie, skutkuje spadkiem ich zdolności zapładniającej. Metodą biotechnologiczną pozwalającą na pełne wykorzystanie potencjału rozrodczego i produkcyjnego samców jest kriokonserwacja. Kolekcjonowanie materiału biologicznego w postaci nasienia pozwala na zabezpieczenie puli genetycznej populacji na wypadek jej zubożenia, spadku zmienności, wyginięcia czy eliminacji całych stad ze względów epidemiologicznych. Nieograniczone czasowo przechowywanie materiału biologicznego umożliwia przesunięcie okresu reprodukcyjnego samca i wykorzystanie jego nasienia w dowolnym miejscu i czasie. Pomimo tych korzyści faktyczne wykorzystanie kriokonserwowanego nasienia knura w praktyce inseminacyjnej jest ograniczone.

Poszczególne etapy technologii kriokonserwacji indukują fizyczne i chemiczne zmiany w błonie komórkowej plemników, zmniejszając efektywność procesu. Schładzanie, zamrażanie i rozmrażanie nasienia knura zwiększa podatność plemników na uszkodzenia kriogeniczne związane z zaburzeniami systemu endogennych antyoksydantów, zmianami w stabilności plazmolemy plemników oraz zwiększoną podatność plemników na zmiany peroksydacyjne [1]. Ponadto, zmiany biochemiczne błon plazmatycznych plemników powstałe podczas kriokonserwacji nasienia zaburzają ich funkcje w procesie zapłodnienia komórki jajowej, powodując obniżenie wskaźników rozrodczych i liczebność miotów.

W Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ PIB prowadzone są badania zarówno nad doskonaleniem techniki kriokonserwacji nasienia knura, zastosowaniem nowoczesnych metod oceny jakości plemników przed i po mrożeniu, jak również wykorzystywaniem nowych rozwiązań technologicznych.

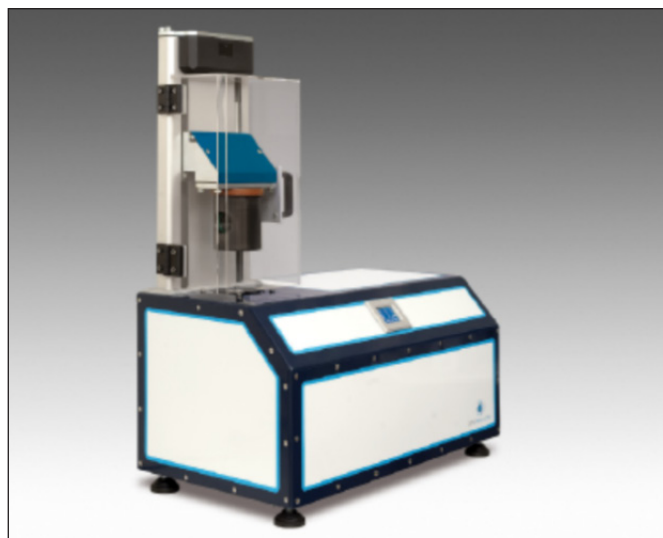
Badania nad opracowaniem składu rozcieńczalnika mroźniowego doprowadziły do uzyskania w 2018 roku

patentu na wynalazek pt. „Rozcieńczalnik do mrożenia nasienia knura i sposób mrożenia nasienia”. Badania własne [11] wykazały, że dodatek do rozcieńczalnika mroźniowego butylowanego hydroksytoluenu o stężeniu 1 mM ochrania błony komórkowe plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi i zapewnia uzyskanie wysokich wskaźników rozrodczych.

Do kriokonserwacji kwalifikowane są ejakulatory, w których stwierdza się udział plemników ruchliwych i prawidłowych morfologicznie na poziomie 80%. Wykazano jednak, że klasyfikacja ejakulatów do kriokonserwacji na podstawie dwóch ww. standardowych parametrów nie jest wystarczająca do uzyskania wysokiej jakości nasienia po rozmrożeniu. Zastosowanie panelu nowoczesnych metod do oceny nasienia przeznaczonego do mrożenia, jak też nasienia kriokonserwowanego pozwoliło na precyzyjne określenie jakości subpopulacji plemników zamrożonych-rozmrożonych, a także określenie nowych kryteriów selekcji ejakulatów przeznaczonych do kriokonserwacji. W badaniach zastosowano metody oparte na ocenie zmian apoptotycznych, poziomu transbłonowego potencjału mitochondrialnego oraz stanu akrosomów w plemnikach. Zmiany w przepuszczalności błony komórkowej plemników identyfikowano na podstawie mikroporów w zewnętrznej błonie cytoplazmatycznej za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 oraz jodku propydydy (PI) [2]. Wykrywanie translokacji fosfatydyloseryny na powierzchni błony komórkowej plemników analizowano przy użyciu aneksyny V sprzężonej z izotiocyanidem fluoresceiny (FITC) [10]. Natomiast ocenę mitochondrialnego potencjału transbłonowego przeprowadzono przy zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego JC-1 [12]. Ponadto określano stan akrosomów plemników za pomocą lektyny PNA, łączącej się z resztami β -galaktozowymi zewnętrznej błony akrosomowej skoniugowanej z barwnikiem FITC. Na podstawie wyników oceny jakości nasienia knurów przed i po procedurze kriokonserwacji ustalono nowe kryteria selekcji knurów do procedury kriokonserwacji zapewniające jego wysoką jakość po rozmrożeniu. Nasienie świeże przeznaczone do kriokonserwacji ma wysoką jakość po rozmrożeniu jeśli odsetek plemników apoptotycznych oraz plemników z uszkodzoną błoną akrosomalną nie przekracza 10%, odsetek plemników z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym nie jest niższy niż 70%, a kriooporność ejakulatów (liczona jako całkowita ruchliwość plemników po rozmrożeniu/całkowita ruchliwość plemników w nasieniu świeżym x100%) wynosi nie mniej niż 70%.

Zamrażalność nasienia knurów jest cechą osobniczą. Ejakulatory niektórych knurów mają obniżoną jakość i nie spełniają opracowanych przez nas kryteriów selekcyjnych, jednak stanowią cenny materiał genetyczny pod względem hodowlanym. W celu zabezpieczenia materiału pochodzącego od takich samców poszukiwane są nowe rozwiązania technologiczne w konserwacji ich nasienia. Jedną z takich możliwości jest zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP; ang. *high hydrostatic pressure*) wytwarzanego w komorze ciśnieniowej (fot.). Zastosowanie takiego rozwiązania

w kontekście kriokonserwacji nasienia knura zostało po raz pierwszy zaproponowane przez zespół Pribenszky i wsp. [7]. Urządzenie wypełnione wodą destylowaną wykonuje program zgodny z ustawionymi przez operatora parametrami, takimi jak wielkość i czas trwania ciśnienia oraz temperatura. Program przeznaczony do nasienia knura daje możliwości wyboru ciśnienia hydrostatycznego w zakresie 10-80 MPa i czasu jego działania w zakresie 30-120 minut.



Fot. Komora z wysokim ciśnieniem hydrostatycznym model GBOX 2140 przeznaczona do nasienia knura (Appleid Cell Technology Ltd, Węgry)

Wysokie ciśnienie hydrostatyczne o właściwie dobranej wartości i czasie działania indukuje reakcję obronną na stres, zwiększając odporność na działanie kolejnego niekorzystnego czynnika, jakim jest proces kriokonserwacji. Komórki poddane HHP aktywują białka opiekuńcze, tzw. chaperony (ang. *chaperone* – opiekun), które przeciwdziałają niekorzystnym zmianom wywołanym czynnikiem stresogennym i pozwalają osiągać bezpieczny poziom stresu. Występujące w komórkach chaperony biorą udział m.in. w stabilizacji chromatyny i cytoszkieletu, kontroli cyklu komórkowego, pełnią funkcję katalizatorów w reakcji utleniania, metabolizmie lipidów i kwasów tłuszczowych oraz degeneracji uszkodzonych białek [9].

Dotychczasowe wyniki badań z wykorzystaniem komory ciśnieniowej przeprowadzone na nasieniu knura przedstawiono w tabeli 1. Zastosowanie HHP w konserwacji nasienia knura w temperaturach dodatnich wydłuża okres przechowywania bez obniżenia jego jakości [8]. Inseminacja świń nasieniem świeżym poddanym działaniu ciśnienia o wielkości 30 MPa przez 90 minut powoduje wzrost liczby urodzonych prosiąt w miocie. Do-

świadczenia przeprowadzone przez Pribenszky i wsp. [7] oraz Huang i wsp. [4] wykazały, że zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w kriokonserwacji nasienia knura poprawia jego kriotolerancję na proces zamrażania-rozmrażania. W badaniach przeprowadzonych przez Huang i wsp. [4] wykazano wyższą ekspresję białek biorących udział w procesie zapłodnienia w nasieniu poddanym działaniu HHP przed procesem kriokonserwacji. Ponadto użycie nasienia mrożonego do inseminacji loszek powodowało wzrost liczby prosiąt urodzonych w miocie [3, 6].

Wyniki uzyskane przez Pribenszky i wsp. [7] skłoniły do podjęcia prób, których celem była ocena wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na jakość kriokonserwowanego nasienia knura. Badania przeprowadzono na 8 knurach (36 ejakulatów), których nasienie nie spełniało kryteriów selekcji ejakulatów do kriokonserwacji. Nasienie poddano wpływowi HHP przed procedurą kriokonserwacji. Zastosowano wartości wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w przedziale 250-400 barów, w cyklu trwającym 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Jednocześnie sporządzono grupę kontrolną (kontrola), inkubując nasienie przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie poddając je kriokonserwacji. Do konserwacji nasienia zastosowano roztwór chłodziwa mrożeniowego z dodatkiem butylowanego hydroksytoluenu o stężeniu 1 mM, a procedurę przeprowadzono według opatentowanej metody własnej. Oceniano jakość plemników w nasieniu świeżym oraz po procedurze zamrażania-rozmrażania nasienia nie poddanego przed mrożeniem (kontrola) i poddanego działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Podstawowe parametry jakościowe nasienia analizowano przy zastosowaniu systemu CASA (*Computer Assisted Semen Analysis Systems*), określając ruch całkowity (TM%) i postępowy (PM%) plemników. Jednocześnie nasienie oceniano metodami fluorescencyjnymi, określając odsetek plemników apoptotycznych, z integralną błoną akrosomową oraz z wysokim transbłonowym potencjałem mitochondrialnym (ΔY_m). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że spośród zastosowanych wartości wysokiego ciśnienia hydrostatycznego najwyższą jakość nasienia po rozmrożeniu uzyskano

Tabela 1
Wyniki wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na nasienie knura (według Pribenszky i Vajta [9])

Procedura po zastosowaniu HHP	Oceniany parametr	Grupa kontrolna	Grupa HHP
Kriokonserwacja nasienia	udział plemników ruchliwych po rozmrożeniu (%)	37	60
Inseminacja nasieniem kriokonserwowanym	liczba prosiąt w miocie (szt.)	4,4-6,7	9,4-10,0
Konserwacja nasienia świeżego w stanie płynnym	udział plemników ruchliwych w 5. dniu konserwacji (%)	55	64
	udział plemników ruchliwych w 11. dniu konserwacji (%)	43	53
Inseminacja nasieniem świeżym	średnia liczba prosiąt w miocie (szt.)	11,4	12,4

Wartości w wierszach różnią się istotnie statystycznie ($P \leq 0,05$)

Tabela 2

Parametry jakościowe nasienia świeżego oraz po procedurze zamrażania-rozmrażania nie poddanego przed mrożeniem (kontrola) i poddanego działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) o wartości 350 barów ($\bar{x} \pm SD$)

Parametry jakościowe plemników	Nasienie świeże	Nasienie kriokonserwowane	
		kontrola (bez HHP)	HHP o wartości 350 bar
Ruch całkowity (%)	69,4 \pm 12,8	38,5* \pm 3,4	52,5* \pm 3,9
Ruch postępowy (%)	59,2 \pm 4,3	31,8* \pm 2,6	49,7* \pm 2,6
Plemniki żywe z uszkodzoną błoną akrosomalną (%)	23,7 \pm 8,2	48,8* \pm 3,1	37,6* \pm 4,1
Plemniki apoptotyczne (%)	14,2 \pm 8,4	22,1* \pm 2,9	16,3* \pm 2,2
Plemniki z wysokim ΔY_m (%)	61,5 \pm 10,9	40,2* \pm 4,3	50,4* \pm 6,2

*Wyniki w wierszach różnią się istotnie statystycznie ($P \leq 0,05$)

stosując przed procedurą kriokonserwacji ciśnienie 350 barów, w porównaniu z nasieniem kontrolnym nie poddanym działaniu HHP (tab. 2).

Reasumując, wstępne badania dotyczące zastosowania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) do mrożenia nasienia knura wskazują na możliwość poprawy efektywności metody kriokonserwacji. Zastosowanie nowych kryteriów selekcji ejakulatów umożliwi wybór właściwego rozwiązania technologicznego, które pozwala na uzyskanie wysokiej jakości nasienia po rozmrożeniu. Przedstawione wyniki badań uzasadniają potrzebę kontynuacji prac z tego zakresu, w celu określenia zdolności zapładniającej nasienia poddanego działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.

Badania wykonano w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG.

Literatura: 1. Agarwal A., Nallella K.P., Allamaneni S.S., Said T.M., 2004 – Role of antioxidants in treatment of male in-

fertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online* 8 (6), 616-627. 2. Bryła M., Trzcińska M., 2012 – The antioxidative effects of hyaluronic acid (HA) and catalase (CAT) on post-thaw boar semen parameters. *Reproduction of Domestic Animals* 47, 78. 3. Horváth A., Szenci O., Nagy K., Végh L., Pribenszky C., 2016 – Stress preconditioning of semen before cryopreservation improves fertility and increases the number of offspring born: a prospective randomised study using a porcine model. *Reproduction Fertility and Development* 28, 475-481. 4. Huang S.Y., Pribenszky C., Kuo Y.H., Teng S.H., Chen Y.H., Chung M.T., Chiu Y.F., 2009 – Hydrostatic pressure affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Animal Reproduction Science* 112, 136-149. 5. Johnson L., Weitzel K., Fiser P., Maxwell W., 2000 – Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 6, 143-172. 6. Kuo Y.H., Pribenszky C., Huang S.Y., 2008 – Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 70, 1395. 7. Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Harnos A., Szenci O., 2006 – Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 18, 162-163. 8. Pribenszky C., Molnár M., Kútvoölgyi G., Harnos A., Horváth A., Héjja I., 2009 – Sublethal hydrostatic pressure treatment improves fresh and chilled boar semen quality *in vitro* and *in vivo*. *Reproduction, Fertility and Development* 21, 107. 9. Pribenszky C., Vajta G., 2011 – Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance. *Reproduction, Fertility and Development* 23, 48-55. 10. Trzcińska M., Bryła M., 2015 – Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 18, 473-480. 11. Trzcińska M., Bryła M., Gajda B., Gogol P., 2015 – Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology* 83, 307-313. 12. Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z., 2008 – Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *Journal of Animal Feed Sciences* 17, 372-380.

Potential use of a high hydrostatic pressure chamber for cryopreservation of boar semen

Summary

Research is being conducted at the Department of Reproductive Biotechnology and Cryopreservation of the National Research Institute of Animal Production on improvement of techniques for cryopreservation of boar semen, the application of modern methods for assessing sperm quality, and the use of new technological solutions. Our research showed that the addition of butylated hydroxytoluene to the semen extender ensures that high-quality sperm are obtained after thawing. Moreover, the classification of ejaculates for cryopreservation based on morphology and motility was found to be insufficient. The use of a panel of modern methods for quality assessment of cryopreserved semen enabled precise determination of the quality of a sub-population of sperm that had been frozen and thawed, as well as the specification of new selection criteria for ejaculates for cryopreservation. Treatment of sperm with high hydrostatic pressure (HHP) before freezing is a new technological solution proposed for sperm cryopreservation. Our study demonstrated that treatment with 350 bar protected sperm against damage during freezing.

KEY WORDS: boar, semen, cryopreservation, quality, high hydrostatic pressure