

Kriokonserwacja nasienia tryków i kozłów – możliwości wykorzystania metody w programach zachowania bioróżnorodności

Piotr Gogol, Agnieszka Wierzchoś-Hilczer

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

Pomimo wieloletnich prac z zakresu mrożenia nasienia tryków i kozłów, efektywność opracowanych metod wciąż nie jest zadowalająca. Kriokonserwacja nasienia tych gatunków zwierząt powoduje uszkodzenia biochemiczne i strukturalne komórek plemnikowych, co prowadzi do znacznego obniżenia ich przeżywalności, zaburzenia funkcji *in vitro* i *in vivo*, a w konsekwencji do spadku zdolności zapładniającej. Ponadto, uzyskanie zadowalających i powtarzalnych wyników wymaga znacznej selekcji samców i ejakulatów pod kątem przydatności do zamrażania. W związku z tym, konieczne są dalsze badania w celu optymalizacji rozcieńczalników oraz protokołów kriokonserwacji, tak by umożliwić efektywne zamrażanie nasienia, również takiego, które obecnie określa się jako mniej podatne na zamrażanie, bez konieczności ostrej selekcji samców i ejakulatów. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do ras objętych programami zachowania bioróżnorodności.

Pierwszymi rozcieńczalnikami, stosowanymi do kriokonserwacji nasienia tryków były rozcieńczalniki cytrynianowo-węglowodanowe, z powodzeniem stosowane wcześniej do mrożenia nasienia buhajów. Oprócz cytrynianu i cukru w skład tych rozcieńczalników wchodziły najczęściej: żółtko jaja, glicerol i antybiotyki. Najszersze zastosowanie znalazł rozcieńczalnik cytrynianowo-żółtkowo-fruktozowy. Podobnie jak przy konserwacji nasienia w stanie płynnym, zastosowanie znalazły również rozcieńczalniki przygotowywane z pełnego lub chudego mleka w proszku. Ich skład był najczęściej uzupełniany

glukozą lub innym cukrem i żółtkiem jaja oraz glicerolem lub innym związkami osłaniającym (Zamfirescu i in., 1980). Pozytywnie na przeżywalność plemników wpływał dodatek Tris i laktozy. Szereg rozcieńczalników opracowano z użyciem laktozy, często stosowanej z żółtkiem jaja. Ze względu na dobre właściwości buforujące i osmotyczne oraz niską toksyczność przy wysokich stężeniach, szerokie zastosowanie w mrożeniu nasienia tryka znalazły rozcieńczalniki zawierające Tris (Molinia i in., 1994; Salamon i Maxwell, 2000).

Rozcieńczalniki laktozowo-żółtkowe uzupełniano także innymi komponentami, np. rafinozą, cytrynianem sodu, EDTA, gumą arabską czy dwuetyloaminą, co zazwyczaj pozytywnie wpływało na ich właściwości krioosłaniające (Salamon i Maxwell, 2000). W wielu krajach jest obecnie stosowana, opracowana we Francji metoda mrożenia przy wykorzystaniu rozcieńczalnika, opisywanego wyżej jako laktozowo-żółtkowy. W metodzie tej rozcieńczanie nasienia przebiega w 2 etapach. W pierwszym etapie, w temperaturze 30°C do nasienia dodawany jest rozcieńczalnik, składający się z roztworu laktozy i 20% żółtka jaja. W drugim etapie, w temperaturze 4–5°C dodawany jest 11% roztwór mleka w proszku z dodatkiem antybiotyków i sulfamidów, zawierający 10% glicerolu. Koncentracja końcowa glicerolu w rozcieńczonym nasieniu wynosi 4%. Nasienie przy koncentracji plemników na poziomie $0,9 \times 10^9$ /ml jest poddawane dwugodzinnej ekwilibracji i zamrażane w słomkach w parach ciekłego azotu (Fiser i in., 1987).

Badania przydatności różnych związków osłaniających, takich jak np. glicerol, DMSO, glikol etylenowy, propandiol czy albumina, w mrożeniu nasienia tryka wykazały, że najlepsze właściwości osłaniające posiada glicerol (Silva i in., 2012). Z uwagi na przeżywalność i zdolność zapładniającą plemników, za optymalne uznaje się 4% stężenie glicerolu. Glicerol może być dodawany do nasienia jednorazowo lub w dwóch oddzielnych dawkach. Różna może być także temperatura, w której jest dodawany (30°C lub 2–5°C); w praktyce jest to najczęściej 4°C. Ekwilibracja w tej temperaturze trwa zazwyczaj od 2 do 4 godzin, chociaż niekiedy bywa skracana do 20–30 minut. Szybkość schładzania nasienia w procesie zamrażania zależy w dużym stopniu od składu rozcieńczalnika, zawartości glicerolu oraz stosowanej metody przechowywania zamrożonego nasienia. W licznych badaniach nad szybkością zamrażania nasienia wykazano, że plemniki tryka lepiej przeżywają, gdy proces ich schładzania przebiega szybko. Przy zamrażaniu nasienia w słomkach najlepsze wyniki uzyskano w zakresie tempa schładzania 16–35°C/minutę.

W procesie kriokonserwacji nasienia dużą podatność na uszkodzenia wykazują zwłaszcza błony akrosomowe plemnika, które są bardziej wrażliwe na oddziaływanie niekorzystnych czynników niż jądro komórkowe czy wstawka (Nur i in., 2010). W mniejszym stopniu, w porównaniu ze zmianami morfologicznymi plemników, ograniczana jest ich ruchliwość. Stąd też, stosowana powszechnie ocena ruchliwości plemników nie może być jedynym wyznacznikiem jakości nasienia mrożonego. Za główne przyczyny obniżonej płodności owiec po inseminacji nasieniem mrożonym uważa się spadek żywotności plemników i upośledzenie ich transportu w żeńskich narządach rozrodczych. Ponadto przypuszcza się, że glicerol wchodzący w skład rozcieńczalnika przyspiesza reakcję akrosomową, w wyniku czego plemniki zbyt szybko osiągną zdolność zapładniającą, jeszcze przed dotarciem do komórki jajowej. Dodatkowym czynnikiem, obniżającym płodność owiec po inseminacji nasieniem mrożonym, może być także wzrost śmiertelności zarodkowej na skutek uszkodzenia chromatyny plemnikowej (Fiser i Fairfull, 1984, 1986). Po użyciu mrożonego nasienia tryków możliwe jest uzyskanie płodno-

ści na poziomie około 50%. Do doniesień, mówiących o płodności na poziomie 50–75% lub wyższej należy podchodzić z dużą ostrożnością (Salamon i Maxwell, 2000).

Metodyka przejęta z mrożenia nasienia tryków okazała się tylko częściowo przydatna w kriokonserwacji nasienia kozłów. Podobnie jak w przypadku nasienia tryka, do mrożenia nasienia kozła najczęściej są używane rozcieńczalniki na bazie żółtka jaja kurzego lub odtłuszczonego mleka w proszku. Zauważono jednak, że takie rozcieńczalniki mogą negatywnie oddziaływać na plemniki kozła. Po rozcieńczeniu nasienia obserwowano koagulację żółtka i spadek ruchliwości plemników. W sytuacji, gdy przed dodaniem rozcieńczalnika usuwano osocze nasienia, ruchliwość plemników była zachowana. Ustalono, że żółtko jaja ulega koagulacji pod wpływem enzymu, produkowanego w gruczołach opuszkowo-cewkowych kozła. Enzym ten nazwano EYCE (enzym koagulujący żółtko jaja) (Roy, 1957). Zidentyfikowano również inny enzym (BUSgp60), pochodzący z gruczołu opuszkowo-cewkowego, który negatywnie wpływa na plemniki kozła rozcieńczone w rozcieńczalniku mlekowym (Iritani i Nishikawa, 1961, 1963; Pellicer-Rubio i in., 1997; Parkinson i in., 2009). Obecność tego enzymu indukowała reakcję akrosomową i powodowała spadek ruchliwości plemników, inkubowanych w rozcieńczalniku na bazie mleka w temperaturze 37°C (Nunes i in., 1982; Pellicer-Rubio i in., 1997). Enzym EYCE działa jak katalizator, który hydrolizuje lecytynę żółtka jaja do kwasów tłuszczowych i lizolecytyny. Powstające produkty uszkodzają błonę plemników, indukują reakcję akrosomową i powodują dekondensację chromatyny (Upreti i in., 1999; Sawyer i Brown, 1995). Lipaza BUSgp60 ma budowę zbliżoną do lipazy trzustkowej świni i podobnie jak EYCE jest odpowiedzialna za hydrolizę trójglicerydów, znajdujących się w błonie plazmatycznej oraz w mleku odtłuszczonego. W efekcie, dochodzi do produkcji kwasów tłuszczowych z żółtka oraz kwasu oleinowego z mleka, które są toksyczne dla plemników (Carriere i in., 1994; Pellicer-Rubio i in., 1997; Pellicer-Rubio i Combarnous, 1998). Metodą, pozwalającą uniknąć szkodliwego oddziaływania pomiędzy osoczem nasienia a żółtkiem jaja lub mlekiem, jest rozcieńczenie świeżego nasienia w zbuforowanym rozcień-

czalniku, a następnie oddzielenie plemników od osocza poprzez wirowanie (10–15 min przy 550–950 g) (Nunes i in., 1982; Ritar i Salamon, 1982; Memon i in., 1985; Singh i in., 1995; Leboeuf i in., 1998). Zaobserwowano, że zmiany w metodyce mrożenia, polegające na użyciu rozcieńczalnika bez żółtka jaja oraz usunięciu osocza nasienia poprzez dwukrotne rozcieńczanie i wirowanie go, wpływa korzystnie na efektywność mrożenia (Corteel, 1974). Zdania są jednak podzielone, gdyż część badaczy uważa, że usunięcie plazmy nasienia nie jest konieczne dla zachowania dobrej ruchliwości plemników i integralności akrosomów po rozmrożeniu (Drobnis i in., 1980; Ritar i Salamon, 1982; Memon i in., 1985). Proponuje się również użycie alternatywnych rozcieńczalników, których skład zapobiegnie wystąpieniu interakcji między lipazami i plemnikami. Rozcieńczalniki te mogą zawierać w swoim składzie inhibitory lipazy BUSgp60, pozbawione lipidów mleko krowie czy mleko od innych gatunków zwierząt, gdzie szkodliwe reakcje enzymatyczne nie zachodzą (Pellicer-Rubio i Combarnous, 1998).

Związkiem osłaniającym, najczęściej stosowanym w rozcieńczalnikach do mrożenia nasienia kozła jest – podobnie jak u tryka – glicerol. Dodanie glicerolu odbywa się 1-, 2- lub 3-etapowo w temperaturze 37 lub 5°C (Corteel, 1974; Salamon i Ritar, 1982; Tuli i Holtz, 1994; Leboeuf i in., 2000). Kundu i in. (2000) stwierdzili, że po zastosowaniu glicerolu odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu był wyższy w porównaniu do nasienia mrożonego z dodatkiem glikolu etylenowego lub DMSO. Glicerol może wprawdzie powodować uszkodzenie plemników wskutek zmian osmotycznych, zachodzących w komórce, jednak plemniki kozła są bardzo odporne na takie zmiany i ich tolerancja na jego obecność jest bardzo duża. Z kolei próby, polegające na stopniowym dodawaniu glicerolu do nasienia, dały różne wyniki, zależnie od temperatury, w jakiej był on dodawany. Obserwacje te nie dały jednoznacznej odpowiedzi, jednak wydaje się, że w przypadku mrożenia nasienia kozła dodanie glicerolu do rozcieńczalnika jednoetapowo jest wystarczające. Płodność uzyskiwana po inseminacji kóz w dwóch cyklach, przy użyciu nasienia mrożonego, mieści się w granicach 50–66% (Kareta i Cegła, 1997).

Jednym z obiecujących kierunków ba-

dań nad poprawą efektywności kriokonserwacji nasienia jest wprowadzanie do rozcieńczalnika substancji o charakterze antyoksydacyjnym. Zadaniem tych substancji jest przeciwdziałanie peroksydacji lipidów, wywoływanej przez reaktywne formy tlenu, powstające w procesie zamrażania/rozrażania plemników ssaków, w tym także plemników tryków i kozłów (Gogol i in., 2007; Maia i in., 2010.) Przeprowadzone badania wskazują, że dodanie antyoksydantów do rozcieńczalnika przed zamrażaniem nasienia może korzystnie wpłynąć na parametry jakościowe plemników po rozmrożeniu i ich zdolność zapładniającą (Maia i in., 2010; Memon i in., 2012; Saraswat i in., 2012).

Powszechnie stosowaną praktyką w celu uzyskania dobrej jakości nasienia po rozmrożeniu jest selekcja samców, a także ejakulatów, przeznaczonych do kriokonserwacji. Podatność nasienia na kriokonserwację zależy bowiem w dużej mierze od doboru samca i ejakulatu. Dobór samców do mrożenia nasienia może być realizowany, gdy mamy do czynienia z dużą populacją osobników. Jednak, gdy dotyczy to małych populacji, np. gatunków zagrożonych lub zwierząt hodowlanych, objętych programami zachowania bioróżnorodności, takie rozwiązanie nie może być brane pod uwagę. Dlatego też w przypadkach, gdy szczególnie ważne jest zachowanie zmienności genetycznej, należy stosować strategie alternatywne. Istotne jest, aby poprawę jakości plemników po rozmrożeniu uzyskać poprzez zmiany protokołu kriokonserwacji, zmodyfikowanie już stosowanych rozcieńczalników lub opracowanie nowych, które pozwolą na zachowanie funkcji zapładniającej plemników po rozmrożeniu. Badania wskazują, że nie ma jednego optymalnego protokołu zamrażania nasienia dla wszystkich samców. Zauważono na przykład, że w przypadku niektórych knurów niska jakość nasienia po kriokonserwacji z użyciem wybranego rozcieńczalnika i protokołu ulegała poprawie po zastosowaniu innego rozcieńczalnika i niewielkiej korekcie protokołu. Dlatego też, szczególnie w przypadku gatunków czy ras zwierząt, objętych programami zachowania bioróżnorodności, powinno się dobierać protokoły mrożenia nasienia odpowiednie dla poszczególnych samców, a nie stosować jeden, standardowy dla całej populacji.

Podniesienie jakości nasienia kriokon-

serwowanego nie jest jedyną możliwością poprawy skuteczności sztucznej inseminacji, wykonywanej takim nasieniem. Inną możliwością jest modyfikacja techniki inseminacji. Jak już wcześniej wspomniano, kriokonserwacja nasienia powoduje znaczne obniżenie przeżywalności plemników oraz zaburza funkcjonowanie plemników *in vitro* i *in vivo*. Obserwacja ta nasunęła wniosek, że należy inseminację wykonywać w czasie wystąpienia owulacji, jak również, że nasienie powinno być deponowane głęboko w drogach rodnych samicy. Taka technika – inseminacja domaciczna lub do jajowodu – może

być zastosowana, aby nasienie znalazło się jak najbliżej oocytu. Wykonywanie inseminacji domacicznej nasieniem mrożonym przy odpowiedniej synchronizacji samicy jest strategią szeroko stosowaną u wielu gatunków zwierząt. Jest to również jedna ze strategii bardzo często stosowanych w celu poprawy płodności kriokonserwowanego nasienia tryków. Opisane techniki są jednak bardzo pracochłonne i stosunkowo drogie, dlatego nie są one wykonywane na dużą skalę, lecz tylko w warunkach doświadczalnych. W przypadku ras objętych programami zachowania bioróżnorodności mogą być brane pod uwagę.

Literatura

- Carriere F., Thirstrip K., Boel E., Verger R., Thim L. (1994). Structure-function relationships in naturally occurring mutants of pancreatic lipase. *Protein Eng.*, 7: 563–569.
- Corteel J.M. (1974). Viabilite des spermatozoids de bouc conserves et congeles avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose (Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 14: 741–745.
- Drobnis E.Z., Nelson E.A., Burrill M.J. (1980). Effect of several processing variables on motility and glutamic oxalacetic transaminase levels for frozen goat semen. *T. Diluent. J. Anim. Sci., Suppl.*, 51: 439.
- Fiser P.S., Fairfull R.W. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21: 542–551.
- Fiser P.S., Fairfull R.W. (1986). The effects of rapid cooling, cold shock of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23: 518–524.
- Fiser P.S., Ainsworth I., Fairfull R.W. (1987). Evaluation of new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28: 599–607.
- Gogol P., Wierzchoś-Hilczler A., Cegła M. (2007). Iron-induced luminescence as a method for assessing lipid peroxidation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Animal*, 1 (6): 844–848.
- Iritani A., Nishikawa Y. (1961). Studies of the egg yolk coagulating factors in goat semen: II properties of the coagulating factor and influential conditions for coagulating. *Proc. Silver Jubilee Laboratory of Animal Husbandry, Kyoto University*, pp. 97–104.
- Iritani A., Nishikawa Y. (1963). Studies of the egg yolk coagulating enzyme in goat semen. IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 8: 113–117.
- Kareta W., Cegła M. (1997). Inseminacja kóz nasieniem mrożonym. *Mat. instr. Wyd. własne IZ, Kraków*, 21 ss.
- Kundu C.N., Chakraborty J., Dutta P., Bhattacharyya D., Ghosh A., Majumder G.C. (2000). Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 40: 117–125.
- Leboeuf B., Manfredi E., Boue P., Piacere A., Brice G., Baril G., Broqua C., Humblot P., Terqui M. (1998). Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.*, 55: 193–202.
- Leboeuf B., Restall B., Salamon S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 113–141.
- Maia M.S., Bicudo S.D., Sicherle C.C., Rodelo L., Gallego I.C.S. (2010). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed semen cryopreserved in extender with anti-oxidants. *Small Rum. Res.*, 122: 118–123.
- Memon M.A., Bretzlaff K.N., Ott R.S. (1985). Effects of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 473–475.
- Memon A.A., Rosina Y., Goh Y.M., Ebrahimi M., Nadia F.M. (2012). Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk

- glycerol extender. *Anim. Reprod. Sci.*, 136: 55–60.
- Molinia F.C., Evans G., Quintana Casares P.I., Maxwell W.M.C. (1994). Effects of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 36: 113–122.
- Nunes J.F., Corteel J.M., Combarous Y., Baril G. (1982). Role du plasma seminal dans la survie *in vitro* des spermatozoides de bouc. *Reprod. Nutr. Dev.*, 22: 611–620.
- Nur R., Zik B., Ustuner B., Sagirkaya H., Ozguden C.D. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73: 1267–1275.
- Parkinson T., Noakes D.E., Parkinson T.J., England G.C.W. (2009). *Veterinary reproduction and obstetrics* (9th ed.), Saunders-Elsevier, London, UK, pp. 681–806.
- Pellicer-Rubio M.T., Combarous Y. (1998). Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.*, 112: 95–105.
- Pellicer-Rubio M.T., Magallon T., Combarous Y. (1997). Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.*, 57: 1023–1031.
- Ritar A.J., Salamon S. (1982). Effects of seminal plasma and of its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35: 305–312.
- Roy A. (1957). Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 179: 318–319.
- Salamon S., Maxwell W.M. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77–111.
- Salamon S., Ritar A.J. (1982). Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35: 295–303.
- Saraswat S., Jindal S.K., Priyadharsini R., Ramachandran N., Yadav S., Rout P.K., Kharche S.D., Goel A.K. (2012). The effects of antioxidant supplementation to cryopreservation protocol on seminal attributes and sperm membrane characteristic in Sirohi goat. *J. Physiol. Pharmacol. Adv.*, 2 (1): 49–58.
- Sawyer D.E., Brown D.B. (1995). The use of an *in vitro* sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod. Toxicol.*, 9: 351–357.
- Silva E.C.B., Cajueiro J.F.P., Silva S.V., Vidal A.H., Soares P.C., Guerra M.M.P. (2012). *In vitro* evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. *Anim. Reprod. Sci.*, 132: 155–158.
- Singh M.P., Sinha A.K., Singh B.K. (1995). Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43: 1047–1053.
- Tuli R.K., Holtz W. (1994). Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 547–555.
- Upreti G.C., Hall E.L., Koppens D., Olivier J.E., Vishwanath R. (1999). Studies on the measurement of phospholipase A₂(PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 56: 107–121.
- Zamfirescu S., Vicovan A., Barbulescu I. (1980). Results of artificial insemination in sheep using frozen semen. *Rev. Cresterea Anim.*, 30: 11–15.

CRYOPRESERVATION OF RAM AND BUCK SEMEN – POSSIBILITIES FOR USING THE METHOD IN BIODIVERSITY CONSERVATION PROGRAMMES

Summary

Despite many years of work in the field of freezing semen from rams and goats, the effectiveness of the methods developed is still not satisfactory. Cryopreservation of sperm from these species causes biochemical and structural damage to sperm cells, which leads to a significant reduction in their survival, *in vitro* and *in vivo* dysfunction, and consequently a decrease in fertilizing ability. Thus, a protocol optimized for sperm of one species might be inappropriate for sperm of other species. This review updates information relating to the cryopreservation of goat and ram semen, with emphasis on the peculiarities specific to the species. The topics discussed include the effects of cryopreservation, sperm dilution, freezing methodologies, the components of cryopreservation diluents, cryoprotectants and additives.

Research indicates that there is no single optimal semen freezing protocol for all males. Therefore, especially for species or breeds of animals participating in biodiversity conservation programmes, semen freezing protocols suitable for individual males should be chosen rather than using a standard protocol for the whole population.