

Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w kriokonserwacji nasienia knura*

Magdalena Bryła, Monika Trzcńska

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa; magdalena.bryla@izoo.krakow.pl*

Kriokonserwacja nasienia knura odgrywa ważną rolę w technologii pozwalającej na zachowanie zasobów genetycznych, zwłaszcza osobników o wyjątkowej wartości hodowlanej. Dzięki wykorzystaniu mrożonego nasienia samców możliwe jest racjonalnie sterowanie rozrodem i kontrolowanie postępu genetycznego w hodowli trzody chlewnej. Kriokonserwacja stanowi również podstawę do tworzenia banków rezerwy genetycznej zwierząt gospodarskich. Pomimo prowadzenia badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji użycie mrożonego nasienia knura w praktyce jest ograniczone. Spowodowane jest to głównie obniżoną jakością nasienia samców tego gatunku zwierząt uzyskaną po procedurze zamrażania-rozmrażania. Dostosowanie technologii kriokonserwacji do właściwości biofizycznych nasienia knura jest ograniczone z powodu zmienności osobniczej pomiędzy knurami, jak również pomiędzy ejakulatami pochodzącymi od tego samego osobnika. Osiągnięcie wysokich wskaźników płodności nasienia po procedurze zamrażania-rozmrażania jest możliwe, jeżeli zabieg domacicznej inseminacji zostanie wykonany do 4 godzin po owulacji, co niestety znacznie

ogranicza zastosowanie kriokonserwowanego nasienia w praktyce hodowlanej (Roca i in., 2006). Stres osmotyczny, szok chłdowy oraz tworzenie się wewnątrz komórek kryształków lodu powodują uszkodzenia błon plazmatycznych i innych organelli komórkowych plemników knura, prowadząc do zaburzenia systemu endogennych antyoksydantów. Dlatego też, aby ograniczyć ten proces, do składu rozcieńczalnika mrożeniowego wprowadza się komponenty o właściwościach osłaniających błony plazmatyczne, jak również o działaniu antyoksydacyjnym, mogące ograniczać stres komórkowy. Inną możliwością poprawy efektywności kriokonserwacji może być zastosowanie w technologii mrożenia wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (ang. *high hydrostatic pressure*; HHP). Zmiany środowiskowe, takie jak ciepło lub zimno, zmiany pH, hiper lub hiposmoza, obecność czynników utleniających, napromieniowanie, brak energii to czynniki wywołujące reakcje stresu komórkowego. Czynniki te działają stopniowo, a ich wpływ na komórkę jest uzależniony od czasu ich trwania. W przeciwieństwie do nich, wysokie ciśnienie hydrostatyczne działa natychmiastowo i jednolicie, nie posiada efektu gradientu i może być stosowane precyzyjnie, spójnie i z szerokim marginesem bezpieczeństwa, nie powodując skutków ubocznych.

Pierwsze próby wykorzystania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego sięgają początków lat dziewięćdziesiątych XX wieku (Hite, 1899). Były one związane z wykorzystaniem HHP w zakresie 400–650 MPa (MPa-megapaskal) do obniżenia liczby drobnoustrojów zanieczyszczających pro-

*Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

dukty spożywcze, przy jednoczesnym zachowaniu nie zmienionych właściwości organoleptycznych żywności. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego zwiększyło bezpieczeństwo i przedłużyło trwałość produktów spożywczych, dlatego znalazło szerokie zastosowanie w ich pasteryzacji. Kolejne prace doprowadziły do wielu osiągnięć zarówno w badaniach podstawowych, jak i stosowanych dotyczących wykorzystania HHP w medycynie i farmacji (Demazeau i Rivalain, 2011). Skuteczne eliminowanie czynników chorobotwórczych przy jednoczesnym zachowaniu właściwości leczniczych i biologicznych jest wykorzystywane w produkcji mikrobiologicznie bezpiecznych produktów farmaceutycznych (Van Doorne, 2008), biomateriałów (Gollwitzer i in., 2009) i szczepionek (Shearer i Kniel, 2009), a także do dezynfekcji wyrobów medycznych i ekstrakcji składników komórkowych (Gross i in., 2008).

Innym kierunkiem badań, rozwijającym się obecnie, jest wykorzystanie techniki HHP w celu poprawy jakości gamet męskich i żeńskich, zarodków (Pribenszky i in., 2010) oraz komórek macierzystych hodowanych *in vitro* (Dinnyes i in., 2010). Dotychczasowe badania wykazały, że zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w technikach wspomaganego rozrodu poprawia kriotolerancję oocytów (Pribenszky i in., 2008), blastocyst (Pribenszky i in., 2008), a także plemników (Pribenszky i in., 2008; Huang i in., 2009). Jednak, mechanizm poprawy efektywności kriokonserwacji plemników poddanych działaniu HHP nie jest do końca poznany i wyjaśniony (Pribenszky i in., 2008). Wysokie ciśnienie hydrostatyczne o właściwie dobranej wartości i czasie działania indukuje reakcję obronną na stres, zwiększając odporność na działanie kolejnego niekorzystnego czynnika. Komórki poddane HHP mogą uaktywnić większą ilość białek opiekuńczych, tzw. chaperonów (ang. *chaperone* – opiekun), dzięki czemu mogą przeciwdziałać niekorzystnym zmianom wywołanym czynnikiem stresogennym. 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 (Pribensz-

ky i Vajta, 2011). Główną funkcją tych białek podczas działania czynnika stresogennego jest przywracanie ich natywnej struktury, a także minimalizowanie agregacji różnych białek związanych z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi i zapobieganie „splątaniu” się struktur białkowych w komórce. Wiele spośród chaperonów należy do rodziny białek szoku cieplnego (ang. *Heat shock proteins*; HSP). Można do nich zaliczyć białka Hsp70 i Hsp90, które wiążą się z cytoszkieletem podczas podziału komórkowego, przez co wpływają na jego stabilizację i ochronę podczas stresu komórkowego. Ułatwiają one ponowne zwinięcie się białek, które pod wpływem stresu uległy częściowej denaturacji. Białka opiekuńcze należące do rodziny Hsp70 są inhibitorami procesu apoptozy i zapobiegają aktywacji kaspazy 9, hamują ekspresję białka p53 i kinaz oraz blokują powstawanie apoptosomu (Garrido i in., 2006).

Komora ciśnieniowa (rys. 1) wytwarzająca HHP to urządzenie wykonujące program zgodny z ustawionymi przez operatora parametrami (wielkość i czas trwania ciśnienia, temperatura, poziom ciśnienia). Wypełniona jest wodą destylowaną i ogrzewana do temperatury pokojowej. Nasienie w 0,5 ml zamkniętych słomkach umieszcza się w komorze ciśnieniowej. Program przeznaczony do nasienia knura daje możliwości wyboru ciśnienia hydrostatycznego w zakresie 10–80 MPa i czasu jego działania w zakresie 30–120 min. Zawsze ustala się graniczną tolerancję nasienia na wysokie ciśnienie hydrostatyczne w określonym przedziale czasowym. Ostateczna weryfikacja wpływu HHP na nasienie knura jest oparta na ocenie morfologii i jakości nasienia oraz na podstawie skuteczności inseminacji, współczynnika ciąży i liczby urodzonych żywych prosiąt w miocie.

Dotychczasowe wyniki badań z wykorzystaniem komory ciśnieniowej przeprowadzone na nasieniu knurów i buhajów przedstawiono w tabeli 1. U opisanych w tabeli gatunków zwierząt obserwuje się wzrost tolerancji na kriokonserwację i konserwację w temperaturach dodatnich, spowodowany działaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Nasienie knura poddane działaniu ciśnienia o wielkości 30 MPa przez 90 min przed procesem sztucznej inseminacji loszek powoduje wzrost liczby urodzonych prosiąt w miocie. Po-

zytywny efekt wykazano również w badaniach *in vitro*, w których zastosowanie HHP wydłuża okres konserwacji nasienia knura w temperaturach dodatnich bez obniżenia jego jakości (Pribenszky i in., 2009). Doświadczenia przeprowadzone przez Pribenszky i in. (2006) oraz Huang i in. (2009) wykazały, że zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w kriokonserwacji nasienia knura poprawia jego tolerancję na proces zamrażania-rozmrażania. Jednocześnie, wykazano wzrost jakości kriokonserwowanego nasienia

knura poddanego działaniu HHP, ocenianego na podstawie ruchliwości i integralności błon komórkowych (Pribenszky i in., 2007).

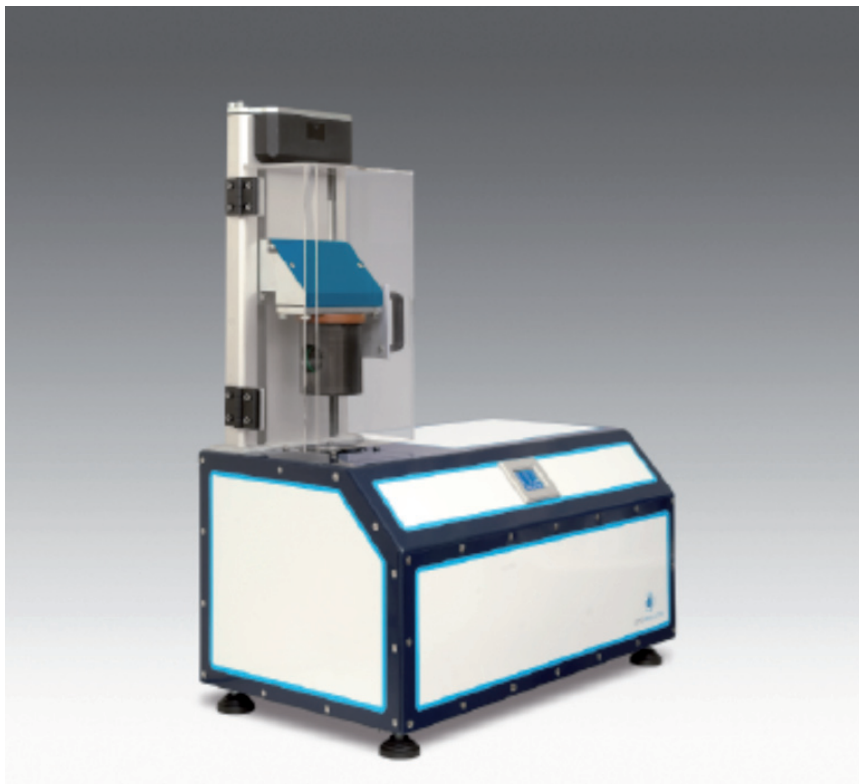
Ponadto, użycie takiego nasienia do inseminacji loszek powoduje wzrost liczby urodzonych prosiąt w miocie (Kuo i in., 2008; Horváth i in., 2014). Jednocześnie, badania Huanga i in. (2009) wykazały wyższą ekspresję białek biorących udział w procesie zapłodnienia w nasieniu, które poddano działaniu HHP przed procesem zamrażania-rozmrażania.

Tabela 1. Wyniki wpływu HHP na nasienie knura i buhaja (wg Pribenszky i Vajta, 2011)
Table 1. The results of HHP influence on boar and bull semen (acc. to Pribenszky and Vajta, 2011)

Procedura po zastosowaniu HHP <i>Procedure after applying HHP</i>	Gatunek <i>Species</i>	Oceniany parametr <i>Parameter evaluated</i>	Grupa kontrolna <i>Control group</i>	Grupa HHP <i>HHP group</i>
Kriokonserwacja <i>Cryopreservation</i>	knur <i>boar</i>	Odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu <i>Proportion of motile spermatozoa after defrosting</i>	37*	59*
Inseminacja nasieniem kriokonserwowanym <i>Insemination with cryopreserved sperm</i>	knur <i>boar</i>	Średnia liczba prosiąt w miocie/ loszkę <i>Average number of piglets per litter/sow</i>	6,7*	9,4*
Kriokonserwacja <i>Cryopreservation</i>	buhaj <i>bull</i>	Odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu <i>Proportion of motile spermatozoa after defrosting</i>	42*	52*
		Odsetek plemników ruchliwych 24 godziny po rozmrożeniu <i>Proportion of motile spermatozoa 24 hours after defrosting</i>	24*	33*
		Odsetek plemników z integralnym akrosomem <i>Proportion of spermatozoa with an integral acrosome</i>	41*	50*
Konserwacja nasienia w stanie płynnym <i>Sperm preservation in liquid state</i>	knur <i>boar</i>	Odsetek plemników ruchliwych w 5. dniu konserwacji <i>Proportion of motile spermatozoa on the 5th day of preservation</i>	55*	64*
		Odsetek plemników ruchliwych w 5. dniu konserwacji <i>Proportion of motile spermatozoa on the 5th day of preservation</i>	43*	53*
Inseminacja nasieniem świeżym <i>Insemination with fresh semen</i>	knur <i>boar</i>	Średnia liczba prosiąt w miocie/ loszkę <i>Average number of piglets per litter/sow</i>	11,4*	12,4*

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

* The results in the columns show statistically significant differences ($P \leq 0,05$).



Rys. 1. Komora z wysokim ciśnieniem hydrostatycznym Model GBOX 2140 przeznaczona do nasienia knura (Appleid Cell Technology Ltd, Węgry)

Fig. 1. High hydrostatic pressure chamber Model GBOX 2140 designed for boar semen (Appleid Cell Technology Ltd, Hungary)

Dotychczasowe badania wykazały, że prawidłowo dobrane parametry wysokiego ciśnienia hydrostatycznego umożliwiają uzyskanie wysokiej jakości nasienia pomimo poddawania go różnym procedurom stosowanym w biotechnologii rozrodu zwierząt. Nadal konieczne są prace nad dostosowaniem parametrów stosowanego

ciśnienia hydrostatycznego do technologii kriokonserwacji i uzyskaniem wysokich wskaźników rozrodczych po inseminacji tym nasieniem. Dzięki temu wysokociśnieniowa technika może przyczynić się do wzrostu użycia kriokonserwowanego nasienia knura w praktyce hodowlanej poprzez poprawę jego zdolności zapładniających.

Literatura

- Demazeau G., Rivalain N. (2011). High hydrostatic pressure and biology: a brief history. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89: 1305–1314.
- Dinnyes A., Polgar Z., Pribenszky C., Purity M.K. (2010). Improved embryoid body cryopreservation and cardiomyocyte differentiation following high hydrostatic pressure treatment. *Proc. 1st Int. Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs, Valencia, Spain (CometMed, Israel), A-7.*
- Garrido C., Brunet M., Didelot C., Zermati Y., Schmitt E., Kroemer G. (2006). Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.*, 5: 2592–2601.
- Gollwitzer H., Mittelmeier W., Brendle M., Weber P., Miethke T., Hofmann G.O., Gerdesmeyer L., Schauwecker J., Diehl P. (2009). High hydrostatic pressure for disinfection of bone grafts and biomaterials: an experimental study. *Open Orthop. J.*, 3: 1–7.

- Gross V., Carlson G., Kwan A.T., Smejkal G., Freeman E., Ivanov A.R., Lazarev A. (2008). Tissue fractionation by hydrostatic pressure cycling technology: the unified sample preparation technique for systems biology studies. *J. Biomol. Tech.*, 19: 189–199.
- Hite B.H. (1899). The effects of pressure in the preservation of milk. *Va Agric. Exp. Station Bull.*, 58: 15–35.
- Horváth A., Szenci O., Nagy K., Végh L., Pribenszky C. (2014). Stress preconditioning of semen before cryopreservation improves fertility and increases the number of offspring born: a prospective randomised study using a porcine model. *Reprod. Fertil. Dev.*, 28: 475–481.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.*, 112: 136–149.
- 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.
- Pribenszky C., Vajta G. (2011). Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance. *Reprod. Fertil. Dev.*, 23 (1): 48–55.
- Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Harnos A., Szenci O. (2006). Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18: 162–163.
- Pribenszky C., Molnár M., Horváth A., Kútvölgyi G., Harnos A., Szenci O., Degg J., Lederer J. (2007). Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19: 181–182.
- Pribenszky C., Du Y., Molnár M., Harnos A., Vajta G. (2008). Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 200–207.
- Pribenszky C., Molnár M., Kútvölgyi G., Harnos A., Horváth A., Héjja I. (2009). Sublethal hydrostatic pressure treatment improves fresh and chilled boar semen quality *in vitro* and *in vivo*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 21: 107.
- Pribenszky C., Vajta G., Molnár M., Du Y., Lin L., Bolund L., Yovich J. (2010). Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biol. Reprod.*, 83: 690–697.
- Roca J., Rodriguez-Martinez H., Vazquez J.M., Bolarin A., Hernandez M., Saravia F., Wallgren M., Martinez EA. (2006). Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. *Soc. Reprod. Fertil., Suppl.*, 62: 261–275.
- Shearer A.E., Kniel K.E. (2009). High hydrostatic pressure for development of vaccines. *J. Food Prot.*, 72 (7): 1500–1508.
- Van Doorne H. (2008). High-pressure treatment, a potential antimicrobial treatment for pharmaceutical preparations: a survey. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 62: 273–291.

ASSESSMENT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE IN CRYOPRESERVATION OF BOAR SEMEN

Summary

Cryopreservation of boar semen plays an important role in the introduction and preservation of superior genetic resources, especially with outstanding breeding value. However, the efficacy of boar semen cryopreservation was often been compromised by the substantially reduced fertilizing capacity of sperm after the freezing-thawing procedure. Farrowing rate and litter size following insemination with cryopreservation boar spermatozoa are still lower, than with fresh semen. The aim of this paper is summarized results, aspects and consideration of high hydrostatic pressure (HHP) treatment for boar semen. Previous studies demonstrated that by utilizing a well-defended and property applied HHP stress treatment to spermatozoa before *in vitro* storage, cryopreservation or insemination, cell survival and fertility improved compared with untreated control. This, high-pressure technique can increase the use of cryopreserved boar semen in breeding practice by improving its fertilization capacity, motility and viability.

Key words: high hydrostatic pressure, cryopreservation, sperm, boar