

AUTOREFERAT

opis dorobku i osiągnięć naukowych

dr Rafał Strzeżek

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2015

1. Imię i nazwisko

Rafał Strzeżek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1999 - tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie

2003 - stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ finasterydu na funkcję prostaty i jakość nasienia u psów, promotor: prof. dr hab. Tomasz Janowski

2003 - tytuł specjalisty z zakresu: Rozród zwierząt, Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy

2012 - tytuł specjalisty z zakresu: Choroby psów i kotów, Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

01.10.1999 – 30.03.2003 - Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką, Wydział Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie, doktorant

15.03.2002 - Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, asystent-doktorant

01.04.2003 - Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, asystent

01.12.2003 - do chwili obecnej, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, adiunkt

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

4.1. tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Zastosowanie wskaźników molekularnych w ocenie jakości nasienia psa z uwzględnieniem różnych aspektów jego konserwacji

4.2. Autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania

Impact factor (IF) podano według listy Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania publikacji; punkty MNiSW według wykazu czasopism naukowych (lista A) opublikowanego przez MNiSW 31 grudnia 2014; liczbę cytowań według ISI Web of Science (z 15.08.2015).

1. **Strzeżek R.***, Filipowicz K., Stańczak M., Kordan W. 2013. *Spectrophotometric analysis of the resazurin reduction test as a tool for assessing canine semen quality*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 57: 281-285. (15 pkt MNiSW, IF₂₀₁₃ = 0,365, liczba cytowań = 0).
2. **Strzeżek R.***, Szemplińska K., Filipowicz K., Kordan W. 2015. *Semen characteristics and selected biochemical markers of canine seminal plasma in various seasons of the year*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 18: 13-18. (20 pkt MNiSW, IF₂₀₁₄ = 0,604, liczba cytowań = 0).
3. **Strzeżek R.***, Fraser L. 2009. *Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality*. Reproductive Biology, 9: 113-126. (15 pkt MNiSW, IF₂₀₀₉ = 0,882, liczba cytowań = 5).
4. **Strzeżek R.***, Koziarowska-Gilun M., Kiełczewski K., Kordan W. 2015. *Effect of dialysis of dog semen on sperm characteristics and some biochemical components of seminal plasma*. Pol J Vet Sci., 18: 447-448. (20 pkt MNiSW, IF₂₀₁₄ = 0,604, liczba cytowań = 0).
5. **Strzeżek R.***, Koziarowska-Gilun M., Stawiszyńska M. 2012. *Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 15: 721-726. (20 pkt MNiSW, IF₂₀₁₂ = 0,570, liczba cytowań = 3).
6. **Strzeżek R.***, Polakiewicz P., Kordan W. 2015. *The effect of two packaging systems on the post-thaw characteristics of canine sperm*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 18: 249-254. (20 pkt MNiSW, IF₂₀₁₄ = 0,604, liczba cytowań = 0).

* - autor korespondencyjny

Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku nr. 3, natomiast oświadczenia współautorów w załączniku nr. 7.

4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

4.3.1. Wstęp

Powszechnie stosowane klasyczne metody badania nasienia, wykorzystywane do tej pory, oparte są o mikroskopową ocenę koncentracji, ruchliwości i morfologii plemników oraz określenie odsetka plemników martwych i żywych (Bukowska i in., 2011). Chociaż część tych analiz może być pomocna w prognozowaniu płodności samców czy przydatności nasienia do konserwacji, to jednak często nie są one w pełni wiarygodne (Payan-Carreira i in., 2013). Spowodowane jest to odmiennym sposobem przygotowania materiału do badań, użyciem różnych technik barwienia oraz stosowaniem odpowiedniej jakości aparatury laboratoryjnej.

Stąd mimo, że plemniki w ocenie mikroskopowej (przeprowadzonej klasycznymi metodami) mogą wykazywać podobne właściwości to niezbędne są jednak bardziej specjalistyczne metody umożliwiające identyfikację różnych subpopulacji plemników o odrębnych cechach biochemicznych i fizjologicznych. Wiadomo bowiem, że połączenie różnych kompetencji funkcjonalnych plemników decyduje w dużej mierze o potencjalnej płodności określonego samca (Payan-Carreira i in., 2013). Kompleksowa analiza wymagana jest także odnośnie monitorowania zmian zachodzących podczas poszczególnych etapów konserwacji, co jest niezmiernie istotne podczas wdrażania nowych procedur technologicznych.

W poszukiwaniu komplementarnych metod oceny jakości nasienia podejmuje się próby wprowadzenia do pakietu badań laboratoryjnych szeregu analiz specjalistycznych opartych o wyznaczniki funkcjonalne i molekularne. Omawiane analizy obejmują przede wszystkim: komputerowo wspomaganą analizę nasienia (CASA), badania strukturalne i funkcjonalne plemników z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych (z wykorzystaniem cytometrii przepływowej lub mikroskopii fluorescencyjnej), analizy funkcjonalne oparte na mechanizmach interakcji plemnik-oocyt (Bukowska i in., 2011; Nizański i in., 2012). Ponadto istotny element oceny jakości nasienia stanowią analizy wskaźników biochemicznych, które pozwalają na określenie zdolności zapładniającej populacji plemników poprzez oznaczanie aktywności enzymów zlokalizowanych w ultrastrukturach plemników oraz oznaczanie specyficznych wyznaczników metabolizmu plemnikowego (Strzeżek, 2013).

Systemy CASA umożliwiają obiektywną ocenę odsetka plemników ruchliwych (MOT), odsetka plemników o ruchu postępowym (PMOT), określenie populacji plemników o ruchu szybkim, umiarkowanym czy wolnym. Ponadto dają możliwość wizualizacji toru ruchu indywidualnych gamet co umożliwia szczegółowy opis parametrów związanych z prędkością i rodzajem ruchu plemników. Nowoczesne analizy CASA pozwalają obecnie także na ocenę morfologiczną i morfometryczną plemników (Antończyk i in., 2010). Istotnym rozwiązaniem wprowadzonym w ostatnich latach jest możliwość przeprowadzania bardziej wiarygodnej oceny ruchliwości plemników poddanych konserwacji w rozcieńczalnikach zawierających komponenty żółtka jaja ptaków, które mogą być rozpoznawane przez analizator jako plemniki. Zasygnalizowana niedoskonałość systemów CASA eliminuje się poprzez zastosowanie metody barwienia fluorescencyjnego opartego o barwnik Hoechst 33342 wykazujący silne powinowactwo do ultrastruktury DNA plemników i fluorescencję w świetle UV (Antończyk i in., 2010). Taka procedura powoduje nieuwzględnianie w analizie ruchu biernego innych elementów komórkowych nasienia wykazujących słabą fluorescencję (nabłonki, komórki krwi) a także ziarnistości komponentów żółtka jaja (brak DNA) (Nizański i Klimowicz, 2005). Należy dodać, że systemy CASA są powszechnie wykorzystywane w badaniach nad optymalizacją procedur konserwacji nasienia psów zarówno w stanie płynnym jak i poddawanego kriokonserwacji (Rijsselaere i in., 2012).

Kolejnym istotnym elementem oceny jakości nasienia są badania strukturalne i funkcjonalne plemników z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych i wykorzystaniem cytometrii przepływowej lub mikroskopii fluorescencyjnej. Jak wskazuje Rijsselaere i in. (2012) omawiane badania wraz komputerową analizą jakości nasienia (CASA) stanowią obecnie „złoty standard” w laboratoryjnej ocenie płodności samców i przydatności ich nasienia do konserwacji. Ocena jakości nasienia z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych ma obecnie szerokie spektrum zastosowań.

Ocena integralności błon plazmatycznych plemników psa może być przeprowadzona z zastosowaniem kombinacji różnych barwników, między innymi: diocyanu karboksylfluoresceiny (CFDA) z jodkiem propydydy (PI) (Kim i in. 2010), Carboxy-SNARF i PI (Peña i in., 1999), kalceiny AM z homodimerem etydydy (EthD-1) (Sirivaidyapong i in., 2000) czy SYBR-14 z PI (Nizański i Klimowicz, 2005). To ostatnie zestawienie kombinacji barwników (SYBR-14 / PI) jest obecnie najczęściej stosowane w ocenie ciągłości plazmolemy plemników psa. Barwnik SYBR-14 wykazuje bowiem powinowactwo do DNA komórkowego i przenika przez nieuszkodzoną błonę komórkową plemników żywych wyzwalając zieloną fluorescencję.

Z kolei jodek propydy (PI), wykazujący fluorescencję czerwoną, jest również barwnikiem o powinowactwie do DNA, lecz penetruje do środowiska wewnątrzkomórkowego jedynie po przerwaniu ciągłości plazmolemy. Podwójne barwienie (SYBR-14/PI) umożliwia wyodrębnienie trzech subpopulacji plemników: żywych (SYBR-14⁺, PI⁻), martwych (SYBR-14⁻, PI⁺) oraz populacji plemników zamierających (moribound cells) wykazujących podwójną fluorescencję w obrębie główki (SYBR-14⁺, PI⁺) (Nizański i Klimowicz, 2005).

Ocena statusu akrosomu może być przeprowadzana z zastosowaniem lektyn pochodzących z orzechów ziemnych (PNA), grochu zwyczajnego (PSA) sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym np. izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) czy Alexa Fluor (Rijsselaere i in., 2012). Lektyny PNA wykazują specyficzne powinowactwo do zewnętrznej błony akrosomowej plemników knura, ogiera natomiast PNA do glikoprotein macierzy akrosomowej (Silva i Gadella, 2006). Ocena akrosomu plemników psa z zastosowaniem lektyn jest obecnie rutynowo wykorzystywana w ocenie jakości nasienia świeżego (Cheuquemán i in., 2012), schłodzonego (Treulén i in., 2012) oraz poddawanego zamrożeniu-rozmrożeniu (Dorado i in., 2011).

W celu określenia funkcjonalności mitochondriów plemników możliwe jest wykorzystanie dwóch barwników fluorescencyjnych: rodaminy (R123) lub JC-1. R123 jest kationowym barwnikiem, który akumuluje się w mitochondriach. Zastosowanie omawianego barwnika pozwala jedynie na detekcję dwóch populacji plemników: wykazujących funkcjonalne mitochondria (wstawka zielona) i nieaktywne mitochondria (wstawka niezabarwiona) (Nizański i in., 2012). Fluorochrom JC-1 także akumuluje się w mitochondriach i przy niskim potencjale transbłonowym występuje w formie monomerów, które emitują fluorescencję zieloną we wstawce plemnika. Natomiast gdy w mitochondriach występuje wysoki potencjał transbłonowy to JC-1 ulega agregacji i emituje czerwono-pomarańczową fluorescencję we wstawce plemnika (Kordan i in., 2013). Obecnie wskazuje się, że barwienie JC-1 może być wykorzystywane w celu wykrywania zmian w potencjale transbłonowym mitochondriów oraz do określenia potencjalnej zdolności zapładniającej plemników (Volpe i in., 2009).

Zjawisko apoptozy - zaprogramowanej śmierci komórki, jest fizjologicznym procesem zachodzącym także w męskim układzie rozrodczym i umożliwiającym eliminację uszkodzonych komórek podczas spermatogenezy. Procedura konserwacji nasienia także indukuje zmiany podobne do tych które zachodzą we wczesnych etapach apoptozy w komórkach somatycznych (ang. apoptotic-like changes) (Martin i in., 2004). We wczesnych

etapach apoptozy dochodzi do translokacji reszt fosfatydyloseryny z wewnętrznej części błony komórkowej na zewnętrzną a tym samym jej ekspozycję na powierzchni plemnika (Peña i in., 2003). Do detekcji omawianego zjawiska wykorzystuje się białko aneksynę V skoniugowaną z barwnikiem fluorescencyjnym (FITC lub Alexa Fluor). Wykazano, iż proces kriokonserwacji indukuje przemieszczenie reszt fosfatydyloseryny w plemnikach m in. buhaja (Martin i in. 2004), knura (Peña i in., 2003) czy psa (Yu i in., 2014). Z kolei zastosowanie kombinacji dwóch fluorochromów YO-PRO-1 i EthD-1 pozwala na rozróżnienie czterech populacji plemników: żywych (YO-PRO-1⁻, EthD-1⁻), wykazujących apoptozę (YO-PRO-1⁺, EthD-1⁻), będących w we wczesnej (YO-PRO-1⁺, EthD-1⁺) lub późnej nekrozie (YO-PRO-1⁻, EthD-1⁺) (Neagu i in., 2010).

Nasilenie procesów peroksydacji lipidów (LPO) w plemnikach spowodowane nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), zwłaszcza podczas procedur kriokonserwacji, jest możliwe do identyfikacji przy zastosowaniu specyficznego barwnika fluorescencyjnego C₁₁-BODIPY_{581/591} (Neagu i in., 2011; Nizański i in., 2012). Przy zastosowaniu omawianego barwnika wzrost odsetka plemników ogiera wykazujących LPO po rozmrożeniu stwierdzili Ortega Ferrusola i in. (2009). Z kolei Neagu i in. (2011) wykazali obniżenie peroksydacji lipidów plemnikowych psa po rozmrożeniu nasienia w porównaniu do prób nasienia świeżego. Autorzy tłumaczą to faktem zaburzenia funkcji mitochondriów, które są głównym źródłem RFT indukujących peroksydację lipidów w plemnikach.

Ocena struktury chromatyny i integralności DNA plemników psa jest dokonywana najczęściej przy pomocy testu SCSA oraz metody TUNEL. W teście SCSA (ang. sperm chromatin structure assay) przeprowadzanym w cytometrze przepływowym wykorzystuje się barwnik oranż akrydyny (AO). W przypadku plemników z prawidłową strukturą chromatyny, poddanych denaturacji w kwaśnym środowisku, oranż akrydyny łączy się z dwuniciowym DNA emitując zieloną fluorescencję. Z kolei w plemnikach z uszkodzoną chromatyną omawiany barwnik łączy się z fragmentowanym DNA emitując czerwone światło (Evenson i in. 1994, 2002). Wskaźnik DFI (ang. DNA fragmentation index) jest istotnym parametrem określającym stopień fragmentacji DNA w plemnikach (Nizański i in., 2012). Wykazano przydatność testu SCSA do określenia stopnia fragmentacji DNA w plemnikach psa poddanych zamrożeniu-rozmrożeniu (Koderle i in., 2009; Kim i in., 2010). Metoda TUNEL (ang. terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labelling), polegająca na wbudowywaniu nukleotydów znakowanych fluoresceiną do pęknięć w łańcuchu DNA także znalazła zastosowanie, chociaż w ograniczonym zakresie, w ocenie jakości nasienia psów (Lange-Consiglio i in., 2010).

W grupie analiz funkcjonalnych opartych na mechanizmach interakcji plemnik-oocyt należy wymienić testy określające w warunkach *in vitro* wiązanie osłony przejrzystej oocytów (ang. ZP-zona binding assay, ZBA) lub wiązania osłony przejrzystej oocytów poddanych bisekcji (Hemizona binding assay, HZA) oraz penetracji pozbawionych osłony przejrzystej oocytów chomika (ang. Hamster zona-free oocyte penetration assay, SPA Sperm Penetration Assay) (Bukowska i in., 2011; Partyka i in., 2012). Omawiane testy mogą dostarczyć istotnych informacji dotyczących potencjalnej płodności samców a także o żywotności plemników pochodzących z danej próby nasienia lub mogą być wykorzystywane do oceny skuteczności nowych procedur konserwacji nasienia (Martinez, 2004). W dostępnym piśmiennictwie wskazuje się na zastosowanie tych metod w badaniach poznawczych dotyczących przebiegu procesu zapłodnienia u psów (Mahi i Yanagimachi, 1978; Hewitt i England, 2001), ocenie płodności psów (Mayenco-Aguirre i Pérez-Cortés, 1998) a także ocenie wpływu konserwacji na zdolności zapładniające plemników psa (Hay i in., 1997; Ivanova i in., 1999).

Do wyznaczników biochemicznych jakości nasienia psa należy zaliczyć enzymy plemników i plazmy nasienia. Spośród licznych enzymów hydrolitycznych akrosomu plemników, trypsynopodobna proteinaza serynowa - akrosyna (EC 3.4.21.10) pełni wiodącą rolę w procesie zapłodnienia jaja. Enzym ten wraz z naturalnymi inhibitorami oraz formą zymogenową – proakrosyną stanowi tzw. system akrosynowy plemników (Glogowski i in., 1998). W nieuszkodzonych ejakulowanych plemnikach, aktywna akrosyna stanowi zaledwie kilka procent ogólnej puli tego enzymu, natomiast znaczna jej część występuje w formie nieaktywnego zymogenu – proakrosyny. Wskazuje się, że zawartość proakrosyny i akrosyny całkowitej w plemnikach jest wyznacznikiem stabilności akrosomów i może być wykorzystywana jako biochemiczny test w ocenie jakości konserwowanego nasienia (Borkowski i Strzeżek, 1994). Kolejnym enzymem wskaźnikowym jest aminotransferaza asparaginianowa (AspAT, EC 2.6.1.1), która ma wieloźródłowe pochodzenie (Ciereszko i Strzeżek, 1989). Obok aktywności w plazmie nasienia, uwarunkowanej syntezą w gruczołach dodatkowych, omawiany enzym jest także trwale związany ze wstawką plemnika (Borkowski i Strzeżek, 1994). Wzrost aktywności AspAT w płynie zewnątrzkomórkowym podczas kolejnych etapów konserwacji nasienia (rozzredzania, schładzania i ekwilibracji) świadczyć może o „wycieku” omawianego enzymu spowodowanego uszkodzeniami błon plazmatycznych plemników. Nizański (2004) wykazał, że podczas zamrażania nasienia psa stopień nasilenia uwalniania AspAT do środowiska zewnątrzkomórkowego, uwarunkowany m in. stopniem

przepuszczalności błony komórkowej, przebiega równoległe z postępującym spadkiem odsetka plemników o ruchu prawidłowym.

W plemnikach psa wykazano także obecność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (E.C. 1.15.1.1) oraz peroksydazy glutationowej (GPx) (EC 1.11.1.9). Nie wykazano natomiast obecności katalazy (CAT) (Strzeżek i in. 2009). Z kolei w plazmie nasienia psów zidentyfikowano aktywność SOD, GPx oraz CAT (Kawakami i in., 2007; Strzeżek i in., 2009; Neagu i in., 2011).

W plazmie nasienia psów wykazano obecność hydrolaz monoestrów fosforanowych różniących się optimum pH tj. fosfatazy alkalicznej (EC 3.1.3.1) i kwaśnej (EC 3.1.3.2). Głównym źródłem sekrecji fosfatazy alkalicznej u psa jest wydzielina najądrzy (Frenette i in., 1986). Dlatego też oznaczanie aktywności omawianego enzymu może być użytecznym wskaźnikiem czynności wydzielniczej najądrzy u tego gatunku (Gobello i in., 2002). W prawidłowym ejakulacie psa aktywność fosfatazy alkalicznej powinna wynosić >5000 U/l, natomiast niska aktywność omawianego enzymu wskazywać może na niekompletną ejakulację lub niedrożność nasieniowodów (Schäfer-Somi i in., 2013). Według Kosiniaka-Kamysza i in. (2007) aktywność fosfatazy alkalicznej oznaczana w świeżej plazmie nasienia psa może pełnić rolę wskaźnika przydatności nasienia tego gatunku do kriokonserwacji.

Aktywność fosfatazy kwaśnej wykazano w wydzielinie prostaty. Aktywności prostatowej fosfatazy kwaśnej (PAP) i całkowitej fosfatazy kwaśnej (TAP) w plazmie nasienia wzrastają znacząco wraz z wiekiem psów (Dubiel, 1973). Wzrost aktywności enzymu jest prawdopodobnie wynikiem degeneracji komórek nabłonkowych wydzielniczych pod wpływem zwiększonej zawartości dihydrotestosteronu (DHT) w gruczole (Corazza i in., 1994). Przez wiele lat uważano, iż oznaczanie aktywności omawianego enzymu w plazmie nasienia psa może być wskaźnikiem funkcji prostaty, pomocnym zwłaszcza w diagnozowaniu schorzeń tego gruczołu. Jednakże Bell i in. (1995) wskazali na brak znaczących różnic w aktywnościach tego enzymu w plazmie nasienia, u psów z fizjologicznym stanem oraz z różnymi schorzeniami gruczołu krokowego. Obecnie wiarygodną funkcję markera stanu prostaty psa pełni oznaczanie zawartości w surowicy krwi psów innego specyficznego enzymu wydzielanego przez ten gruczoł - psiej prostatowej specyficznej esterazy (CPSE) (Lévy i in., 2009).

Istotnym wskaźnikiem funkcji wydzielniczej najądrzy oraz jedyne dodatku gruczołu płciowego – prostaty jest oznaczanie zawartości białka ogólnego w pełnej plazmie nasienia lub poszczególnych jego frakcjach. Zmiany zawartości omawianego wskaźnika w plazmie nasienia mogą świadczyć o stanie i sprawności wydzielniczej omawianych narządów. Dla przykładu,

wyższą zawartość białka stwierdza się w plazmie nasienia pochodzącej z frakcji plemnikowej (Bartlett, 1962; England i Allen., 1989).

Wśród wyznaczników biochemicznych jakości nasienia, obok aktywności określonych enzymów, w ostatnich latach zwraca się uwagę na zdolność komponentów nasienia, a zwłaszcza plemników, do prowadzenia reakcji redukcyjnych. Aktywność redukcyjna plemników jest określana przy pomocy testów z barwnikami resazuryną (RRT) lub błękitem metylenowym (MTT). Omawiane testy znalazły zastosowanie w ocenie jakości nasienia buhaja, knura czy tryka (Chandler i in., 2000; Aziz i in., 2005; Zrimsek i in., 2004). Wyznacznikiem funkcjonalności mitochondriów, oprócz omawianych uprzednio wskaźników fluorescencyjnych, jest także zawartość adenylozotryfosforanu (ATP) w plemnikach. Wskazuje się, że ATP w plemnikach powstaje w wyniku zarówno utleniania mitochondrialnego ale także w reakcjach glikolizy fosforylującej (Mukai i Okuno, 2004). Dlatego też uszkodzenia mitochondriów plemników, występujące zwłaszcza podczas kriokonserwacji nasienia, powodują spadek ilości wytwarzanego ATP, a tym samym i ruchliwości plemników (Thomas i in., 1998).

Podsumowując, w ostatnich latach opracowano szereg metod opartych o mechanizmy reakcji molekularnych, które umożliwiają ocenę właściwości biologicznych plemników i plazmy nasienia różnych gatunków zwierząt, w tym również psa. Nie mniej stosowanie kombinacji omawianych metod może przyczyniać się do uzyskiwania coraz bardziej wiarygodnych wyników określających płodność samców jak i przydatność ich nasienia do konserwacji w różnych temperaturach.

4.3.2. Omówienie wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe

1. Strzeżek R., Filipowicz K., Stańczak M., Kordan W. 2013. Spectrophotometric analysis of the resazurin reduction test as a tool for assessing canine semen quality. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 57: 281-285.

Cel pracy i uzasadnienie potrzeby badań

Celem pracy było określenie przydatności spektrofotometrycznego testu redukcji resazuryny (RRT) do oceny jakości nasienia psa. Test ten oparty jest na zasadzie, iż barwnik resazuryna pod wpływem enzymów z klasy oksydoreduktaz, zawartych w aktywnych metabolicznie komórkach, ulega redukcji do trwałej resorufiny (barwa różowa) a następnie do hydroresorufiny (bezbarwna) (Dart i in., 1994; O'Brien i in., 2000). Pomiar stopnia redukcji resazuryny umożliwia identyfikację metabolicznie aktywnych plemników (Zalata i in., 1998). Test redukcji resazuryny znalazł dotychczas zastosowanie w ocenie jakości nasienia m in. mężczyzn (Mahmoud i in., 1994; Reddy i Bordekar, 1999), buhaja (Dart i in., 1994), tryka (Wang i in., 1998), ogiera (Carter i in., 1998) oraz knura (Zrimsek i in., 2004). Pierwotnie test redukcji resazuryny prowadzono poprzez wizualną ocenę zmiany koloru próby nasienia poddanej inkubacji z omawianym barwnikiem (Carter i in., 1998). Jednakże w celu wyeliminowania subiektywnej oceny rezultatów testu, często obarczonej ludzkim błędem przeprowadzającego badanie, wprowadzono jego modyfikację opierającą się na zastosowaniu spektrofotometrii (Zalata i in., 1998, Zrimsek i in., 2004). W naszych badaniach zastosowaliśmy po raz pierwszy w odniesieniu do nasienia psa zmodyfikowaną metodę spektrofotometryczną.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły ejakulatory pozyskane od 4 psów mieszańców. Każdorazowo nasienie rozdzielano na próby zawierające plemniki oraz plazmę nasienia. Wdrożenie spektrofotometrycznego testu redukcji resazuryny do oceny jakości nasienia psa obejmowało:

- określenie długości fal (nm) przy których występuje szczyt absorbancji dla prób zawierających określoną koncentrację plemników oraz prób plazmy nasienia inkubowanych z resazuryną i jej zredukowaną formą – resorufiną,
- przeprowadzenie testu redukcji resazuryny na próbach zawierających określoną koncentrację plemników oraz próbach plazmy nasienia,
- wyliczenie indeksu RRT określającego stopień redukcji resazuryny przez plemniki (RRT_{sperm}) i komponenty plazmy nasienia (RRT_{plasma}).

Ponadto, w celu wykazania zależności wyników testu RRT z wyznacznikami jakościowymi nasienia przeprowadzono szereg analiz obejmujących: ocenę parametrów ruchliwości

plemników (z wykorzystaniem systemu CASA), ocenę odsetka plemników z prawidłową morfologią, ocenę integralności plazmolemy plemników (SPMI), ocenę odsetka plemników z funkcjonalnymi mitochondriami (MMP). Oznaczano również zawartość ATP w plemnikach.

Rezultaty badań i ich interpretacja

Wykazano statystycznie istotne różnice w zakresie indeksu RRT dla plemników (RRT_{sperm}) pomiędzy poszczególnymi osobnikami (zakres od 3,86 do 5,71). Najwyższą wartością omawianego parametru charakteryzowały się ejakulatory psów z najwyższym odsetkiem plemników ruchliwych (MOT), odsetkiem plemników o ruchu postępowym (PMOT), odsetkiem plemników poruszających się ruchem szybkim (RAPID) oraz z zachowaną integralnością plazmolemy (SPMI). Z kolei indeks RRT dla plazmy nasienia (RRT_{plasma}) wykazywał niższe wartości (zakres od 0.81 do 2.9) w porównaniu do wartości indeksu RRT dla plemników. Wykazano statystycznie istotne dodatnie korelacje indeksu RRT_{sperm} z MOT ($r = 0.68, P < 0.01$), PMOT ($r = 0.72, P < 0.01$), RAPID oraz ujemną zależność z populacją plemników poruszających się ruchem umiarkowanym MEDIUM ($r = -0.54, P < 0.05$). Z kolei dla indeksu RRT plazmy nasienia stwierdzono występowanie ujemnych korelacji z SPMI ($r = -0.60, P < 0.01$) i plemników z prawidłową morfologią ($r = -0.58, P < 0.01$).

Wykazane statystycznie istotne korelacje pomiędzy indeksem RRT_{sperm} a parametrami ruchliwości plemników są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Mahmoud i in. (1994) wykazali statystycznie istotne zależności pomiędzy rezultatami RRT testu w nasieniu mężczyzn a koncentracją plemników ($r = 0.70, p < 0.001$) oraz koncentracją plemników ruchliwych ($r = 0.65, p < 0.001$). Podobnie, Reddy i Bordekar (1999) stwierdzili, że indeks RRT dla nasienia ludzkiego istotnie koreluje z odsetkiem plemników ruchliwych ($r = 0.889, p < 0.001$).

W naszych badaniach nie stwierdziliśmy natomiast istotnych zależności pomiędzy RRT_{sperm} a zawartością ATP w plemnikach. Przypuszczalnie, test RRT obrazuje aktywność procesów redukcyjnych zachodzących w komórkach plemnikowych, nie zaś syntezy ATP. Żywotne plemniki podczas procesów metabolicznych (glikoliza/fruktoliza, cykl pentozofosforanowy czy cykl kwasów trikarboksylowych) wytwarzają zredukowane równoważniki (takie jak NADPH, NADH). Obecność tych zredukowanych nukleotydów w plemnikach jest wskaźnikiem ich metabolicznej aktywności (Zalata i in., 1998). Wskazuje się ponadto, iż za przemianę resazuriny w jej zredukowaną formę – resorufinę odpowiedzialne są enzymy z klasy oksydoreduktaz, zwane diaforazami zależnymi od NAD(P)H (EC 1.6.99) (Zalata i in., 1998; O'Brien i in., 2000, Gączarzewicz i in., 2003). Potwierdzeniem istotnej roli

omawianych enzymów w reakcji redukcji resazuryiny może być fakt identyfikacji ich aktywności w plemnikach mężczyzn oraz wielu gatunków zwierząt, zwłaszcza w ich regionie wstawkowym (Zalata i in., 1998). Ponadto badania prowadzone przez Zalata i in. (1998) wskazują, iż dodatek NADH do zawiesiny plemników lub plazmy nasienia powoduje istotny wzrost konwersji resazuryiny w jej formę zredukowaną.

Niewyjaśniony jest z kolei mechanizm zdolności redukującej plazmy nasienia. Wskazuje się, że źródłem zredukowanych nukleotydów i/lub enzymów od nich zależnych w plazmie nasienia mogą być plemniki zmienione morfologicznie (Zalata i in., 1998). Przykładowo, wykazano wysoką aktywność NAD(P)H - zależnych diaforaz w kroplach cytoplazmatycznych plemników ludzkich (Zini i in., 1998). Potwierdzeniem tego zjawiska w naszych badaniach może być fakt, iż ejakulaty osobnika u którego w plazmie nasienia wykazano najwyższą wartość indeksu RRT_{plasma} , charakteryzowały się najniższym odsetkiem plemników prawidłowych morfologicznie oraz znacznym odsetkiem plemników z kroplą cytoplazmatyczną. Ponadto, dla indeksu RRT_{plasma} stwierdziliśmy występowanie ujemnych korelacji z SPMI i plemników z prawidłową morfologią. Z kolei Mahmoud i in. (1994) wskazują na obecność w plazmie nasienia szeregu substancji wykazujących zdolności redukcyjne, takich jak kwas L-askorbinowy czy L-glutation. W naszych wcześniejszych badaniach dotyczących charakterystyki systemów antyoksydacyjnych w nasieniu psa wykazano znaczną zawartość omawianych substancji w plazmie nasienia psa (Strzeżek i in., 2009).

Podsumowując, spektrofotometryczny test redukcji resazuryiny może stanowić dodatkowy wiarygodny wskaźnik sprawności metabolicznej w ocenie jakościowej nasienia psa.

2. Strzeżek R., Szemplińska K., Filipowicz K., Kordan W. 2015. *Semen characteristics and selected biochemical markers of canine seminal plasma in various seasons of the year. Polish Journal of Veterinary Sciences, 18: 13-18.*

Cel pracy i uzasadnienie potrzeby badań

Celem pracy było określenie wpływu pory roku na wybrane parametry jakościowe nasienia psów oraz biochemiczne wyznaczniki plazmy nasienia. Zasadniczą przesłankę do podjęcia badań dotyczących omawianego problemu stanowił brak dostatecznej wiedzy odnośnie zmian jakościowych nasienia psa w cyklu rocznym. Pomimo, że psy samce są zwierzętami wykazującymi aktywność płciową przez cały rok, w nielicznych badaniach podkreśla się występującą sezonową zmienność wybranych parametrów jakościowych nasienia (Kuroda i Hiroe 1972, Taha i in., 1981). Należy podkreślić, że są to badania pionierskie, przeprowadzone po raz pierwszy w kraju a także jedne z nielicznych w Europie.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły pełne ejakulatory pozyskiwane w odstępach 2-tygodniowych od 5 psów mieszańców w wieku 2-8 lat. W doświadczeniu wykorzystano szereg analiz bowiem każdorazowo po pobraniu, nasienie poddawano ocenie makro- i mikroskopowej (objętość nasienia, ogólna liczba plemników, ocena morfologiczna plemników). Ponadto przeprowadzano ocenę parametrów ruchliwości plemników (z wykorzystaniem systemu CASA), ocenę integralności plazmoemy plemników (SPMI), ocenę odsetka plemników z funkcjonalnymi mitochondriami (MMP) oraz oznaczano zawartość ATP w plemnikach. Badania biochemiczne plazmy nasienia obejmowały oznaczanie zawartości białka ogólnego (TCP) oraz aktywności fosfataz: alkalicznej (AP) i kwaśnej (AcP).

Rezultaty badań i ich interpretacja

W badaniach nie wykazano istotnych zmian objętości pełnego ejakulatu pomiędzy poszczególnymi porami roku. Jednakże ejakulatory pozyskiwane w okresie letnim i jesiennym charakteryzowały się najwyższą ogólną liczbą plemników. Mimo to, ocena integralności błon plazmatycznych plemników (SPMI) oraz form morfologicznych plemników, wskazały na brak wpływu czynników środowiskowych (w tym temperatury otoczenia) na omawiane parametry. W poszczególnych porach roku nie obserwowano bowiem drastycznych zmian w zakresie omawianych wyznaczników.

Wykazano jednakże istotny wpływ pory roku na odsetek plemników z funkcjonalnymi mitochondriami (barwienie fluorescencyjne JC-1 / PI). Obserwowano bowiem obniżenie wartości omawianego wyznacznika w okresie letnim, chociaż nie stwierdzono zakłóceń w procesach fosforylacji oksydacyjnej i szlaku glikolizy identyfikowanych zawartością ATP w plemnikach. Wskazywać to może, że plemniki psa posiadają zdolność do prowadzenia przemian energetycznych na optymalnym poziomie we wszystkich porach roku. Nie wykazano również statystycznie istotnych różnic w zakresie odsetka plemników ruchliwych (MOT) przez cały okres pozyskiwania ejakulatów. Jednak najwyższym odsetkiem plemników o ruchu postępowym (PMOT) charakteryzowały się ejakulatory pozyskane jesienią i zimą.

Analiza wyznaczników biochemicznych plazmy nasienia nie wykazała zmienności zawartości białka ogólnego uwarunkowanej sezonem. Mimo to najwyższą wartość tego wyznacznika stwierdzono w okresie zimowo-wiosennym, najniższą zaś w okresie jesiennym. Niewielkie wahania wartości tego parametru pomiędzy poszczególnymi sezonami mogą wskazywać na umiarkowane zmiany w sekrecji wydzielin najądrzy oraz prostaty. Z kolei wyższa zawartość białka w plazmie nasienia stwierdzona w okresie zimowo-wiosennym może

wskazywać, że pełni ono przypuszczalnie funkcję protekcyjną w stabilizacji integralności błon plazmatycznych plemników, która jest niezbędna dla podtrzymania ich funkcjonowania. Na podobne zależności wskazują Koziorowska-Gilun i in. (2011) w odniesieniu do plemników knura.

Nie wykazano także statystycznie istotnych ($P > 0.05$) zmian aktywności fosfatazy alkalicznej w plazmie nasienia uwarunkowanych porą roku. Należy podkreślić, że stwierdzona w naszych badaniach wysoka aktywność fosfatazy alkalicznej (AP) w plazmie nasienia we wszystkich porach roku, wskazuje na stałą, prawidłową funkcję wydzielniczą najądrzy. Narząd ten jest bowiem głównym źródłem fosfatazy alkalicznej w układzie rozrodczym psa (Frenette i in., 1986). Jednak aktywności omawianego enzymu w poszczególnych ejakulatach u jednego osobnika, jak i pomiędzy osobnikami różniły się nieraz znacznie, na co wskazują stosunkowo wysokie wartości odchyłeń standardowych. Podobne zjawisko obserwowano kilku autorów w odniesieniu do aktywności fosfataz w plazmie nasienia knura oraz dzika (Glogowski i in., 1997; Kozdrowski i Dubiel, 2004).

Stwierdzono natomiast zmiany aktywności fosfatazy kwaśnej (AcP) związane z porą roku. Aktywność omawianego enzymu była istotnie najniższa ($P < 0.05$) w okresie jesiennym, w porównaniu do pozostałych pór roku. Wykazane zjawisko drastycznego obniżenia aktywności fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia psów w okresie jesiennym jest trudne do interpretacji. W dostępnej literaturze brak jest prac dotyczących kształtowania się aktywności fosfatazy kwaśnej plazmy nasienia psów w ciągu roku. Głównym źródłem aktywności fosfatazy kwaśnej w układzie rozrodczym psa jest gruczoł krokowy (Strzeżek i Janowski, 2003). Sekrecja wydzieliny prostaty jest zależna od androgenów (Johnston i in., 2000). Stąd też obniżenie aktywności omawianego enzymu w okresie jesiennym wskazywać może na ograniczenie zdolności wydzielniczej komórek gruczołu krokowego spowodowane prawdopodobnie zmniejszoną koncentracją androgenów. Dlatego też skutkiem ograniczonej zdolności sekrecyjnej prostaty w okresie jesiennym wydaje się być, oprócz obniżonej aktywności fosfatazy kwaśnej, także spadek zawartości białka ogólnego w plazmie nasienia.

Podsumowując, wykazana w poszczególnych porach roku zmienność niektórych wyznaczników makro- i mikroskopowych ejakulatów oraz biochemicznych plazmy nasienia nie zakłócała w sposób jednoznaczny jakości nasienia psów. Zastosowanie szerokiego spektrum analiz jakościowych nasienia, w tym oceny wyznaczników biochemicznych pozwoliło na stwierdzenie, iż psy domowe, w odróżnieniu od psowatych dziko żyjących, wykazują ciągłość produkcji ejakulatów spełniających kryteria normospermii przez cały rok. Badania jednak

wymagają kontynuowania z uwzględnieniem większej populacji psów, także rasowych. Pozwoli to na właściwą selekcję ejakulatów przeznaczonych do inseminacji czy długotrwałej konserwacji nasienia.

3. Strzeżek R., Fraser L. 2009. Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. *Reproductive Biology*, 9: 113-126.

Cel pracy i uzasadnienie potrzeby badań

Zarówno w warunkach fizjologicznych jak i podczas procedur konserwacji, plemniki poddawane są wpływowi zmiennego ciśnienia osmotycznego. W warunkach fizjologicznych, u wielu gatunków zwierząt ciśnienie osmotyczne płynu najądrzowego jest hiperosmotyczne w przeciwieństwie do plazmy nasienia czy płynu macicznego, które wykazują charakter ściśle izotoniczny (Cooper i Yeung, 2003). Z kolei podczas kriokonserwacji plemniki narażone są nie tylko na wpływ zmiennych temperatur ale także na zmiany ciśnienia osmotycznego (Meyers 2005). Na etapie zamrażania plemniki poddawane są bowiem wpływowi stresu spowodowanego zmianami w objętości wody wewnątrzkomórkowej podczas jej krystalizacji. Z kolei w procesie rozmrażania następuje zwiększenie objętości wody wewnątrz plemników (Mazur, 1984; Holt WV, 2000). Omawiane czynniki mogą prowadzić do zaburzeń struktury i funkcjonalności błon plazmatycznych, uszkodzeń aparatu ruchu a w konsekwencji do śmierci gamet (Pukazhenti i in., 2002).

Ograniczony jest również zakres informacji dotyczących wpływu białek plazmy nasienia na przeżywalność plemników psa poddawanych konserwacji. Wskazuje się między innymi, że komponenty plazmy nasienia u wielu gatunków zwierząt pełnić mogą podczas konserwacji funkcję ochronną wobec plemników narażonych na udar chładowy i zmiany ciśnienia osmotycznego (Pursel i in., 1973; Graham 1994; Barrios i in. 2000; Moore i in., 2005). Jednakże brak jest dostatecznej wiedzy dotyczącej wpływu plazmy nasienia na plemniki psa podczas konserwacji w stanie płynnym oraz zamrażania-rozmrażania (Rota i in., 1995; Sirivaidyapong i in., 2001; Nöthling i in., 2007).

Nieliczne publikacje (Songsasen 2002) dotyczące wpływu różnych ciśnień osmotycznych na właściwości plemników psa i ewentualnej funkcji ochronnej plazmy nasienia stanowiły zasadniczą przesłankę do podjęcia omawianych badań.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły ejakulatory pochodzące od 4 psów. Pełne ejakulatory (WE) lub wyłącznie frakcje plemnikowe ejakulatów (SRF) poddawano inkubacji (10 minut, temperatura

pokoju) w wariantach rozcieńczalnika Tris-cytrynian-fruktoza (TCF) o różnych ciśnieniach osmotycznych (150, 300, 350, 550, 800 i 1100 mOsm/kg). Po upływie czasu inkubacji próby nasienia poddawano ocenie ruchliwości plemników metodą mikroskopową. Dokonywano również oceny integralności plazmolemy plemników (SPMI) oraz odsetka plemników z funkcjonalnymi mitochondriami (MF).

Rezultaty badań i ich interpretacja

Rezultaty badań wykazały, że plemniki psa są podatne na zmiany ciśnienia osmotycznego. Należy jednak podkreślić, że stwierdzono osobniczo uwarunkowaną zmienność w zakresie wartości analizowanych wyznaczników w zależności od przedziałów stosowanego ciśnienia osmotycznego rozcieńczalnika. Podobnie jak w przypadku plemników innych gatunków zwierząt, aparat ruchu plemników wydaje się być bardziej wrażliwy na zmiany ciśnienia osmotycznego niż integralność plazmolemy (Curry i in., 1994; Liu i in., 1998; Fraser i in., 2001). Gwałtowne obniżenie ruchliwości plemników stwierdzono w warunkach hiperosmotycznych, zwłaszcza w roztworach powyżej 800 mOsm/kg. Zjawisko to korespondowało ze znacznym obniżeniem odsetka plemników z funkcjonalnymi mitochondriami (barwienie R123/PI), które stanowią źródło energii niezbędnej do poruszania się. Podobne zależności zaobserwowano w odniesieniu do plemników knura (Gilmore i in., 1998), buhaja (Liu i in., 1998) czy kota (Pukazhenti i in., 2002). Natomiast obserwowano stopniowe obniżenie odsetka plemników z zachowaną integralnością błon plazmatycznych (barwienie CFDA/PI). Tendencja taka była słabiej wyrażona w próbach pochodzących z pełnych ejakulatów (WE). W warunkach hypoosmotycznych (150 mOsm/kg) spadkowi ruchliwości towarzyszyło obniżenie odsetka plemników z zachowaną integralnością plazmolemy i aktywnymi mitochondriami. Zjawisko to nie miało jednak charakteru gwałtownego, jak w przypadku inkubacji w roztworach hiperosmotycznych.

Rezultaty badań wskazują, że istotny wpływ na zachowanie integralności plazmolemy plemników psa wywiera sposób kolekcjonowania ejakulatu. W próbach pochodzących bowiem z pełnych ejakulatów (WE), obecność białek plazmy nasienia, których głównym źródłem u psa jest wydzielina prostaty, zdaje się pełnić istotną funkcję ochronną w stosunku do plazmolemy plemników. W warunkach fizjologicznych, jedną z funkcji białek wydzieliny prostaty (PF) jest opłaszczanie błon plazmatycznych plemników, powodujące w ten sposób maskowanie receptorów progesteronowych i zapobieganie przedwczesnej kapacytacji w drogach rodnych suki (Rota i in., 2007).

Powszechnie uważa się, że wydzielina stanowiąca frakcję pierwszą i frakcję trzecią ejakulatu, nie powinna być wykorzystywana do przechowywania plemników psa w temperaturach dodatnich, a także w procesie kriokonserwacji (Rota i in., 1995; Pena i in. 2006). Dlatego też do przechowywania plemników psa w stanie płynnym zaleca się używanie wyłącznie frakcji plemnikowej ejakulatu, a plazmę nasienia należy usunąć przez odwirowanie (Rijsselaere i in. 2002). Omawiane postępowanie przyjęto za normę, bazując na obserwacji mikroskopowej świadczącej o tym, iż zamiana plazmy na medium syntetyczne (rozcieńczalnik) po odwirowaniu ejakulatu pozwala uzyskiwać bardziej korzystne właściwości plemników, zwłaszcza w zakresie ich ruchliwości. Takie postępowanie wydaje się mieć potwierdzenie jedynie w przypadku dłuższego przechowywania nasienia psa. Należy bowiem zaznaczyć, że w naszych badaniach nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w zakresie ruchliwości plemników pochodzących z pełnych ejakulatów (WE) i frakcji plemnikowej (SRF) oraz inkubowanych w rozcieńczalniku o ciśnieniu osmotycznym w granicach fizjologicznego tj. 300 – 350 mOsm/kg. Także w badaniach prowadzonych przez Sirivaidyapong i in. (2001) plemniki psa poddane 6-godzinnej inkubacji w temperaturze +4°C z dodatkiem wydzieliny prostatowej nie wykazywały istotnych zaburzeń ruchliwości, żywotności oraz integralności błon akrosomu plemników. Z kolei Schäfer-Somi i in. (2007) nie wykazali istotnego wpływu na ruchliwość i integralność błon plazmatycznych plemników psa zawieszonych w wydzielinie prostatowej w ciągu 1 godziny od pozyskania nasienia.

W świetle ostatnich badań (Zelli i in., 2012) w plazmie nasienia psa występują ultrastruktury zwane prostasomami, które wykazują zdolność do hydrolizy ATP a także wiązania jonów Zn^{2+} , regulując przypuszczalnie w ten sposób ruchliwość plemników. Potwierdzeniem tej hipotezy są rezultaty naszych badań wskazujące, że dodatek prostasomów o odpowiednim stężeniu (2% zawartości ogólnej białka w plazmie nasienia) indukuje wzrost parametrów ruchliwości plemników podczas 2 godzinnej inkubacji w temperaturze 5°C (Mogielnicka-Brzozowska i in., 2015). Jednakże dłuższy okres kontaktu plemników z plazmą nasienia powoduje prawdopodobnie wyczerpanie zapasów energetycznych spowodowanych nadmierną hydrolizą ATP co skutkuje obniżeniem ruchliwości ogólnej jak i pozostałych parametrów kinematycznych plemników (Rota i in., 2007). Dla przykładu, w badaniach prowadzonych przez Treulen i in. (2012) wykazano istotne obniżenie ruchliwości plemników psa zawieszonych w rozcieńczalniku zawierającym wydzielinę prostaty lub płynu najądrzowego i poddanych konserwacji w stanie płynnym w porównaniu do prób plemnikowych zawieszonych wyłącznie w rozcieńczalniku z żółtkiem jaja kurzego.

Podsumowując wyniki powyższych badań, aparat koordynacji ruchu plemników psa wydaje się być bardziej wrażliwy na zmiany ciśnienia osmotycznego w porównaniu do integralności ich błon plazmatycznych. Plazmolema plemników pochodzących z pełnych ejakulatów (czyli zawierających komponenty plazmy nasienia) wykazuje większą tolerancję na zmiany ciśnienia osmotycznego. Nasze badania wskazują więc na potrzebę stosowania dodatku plazmy nasienia lub jej poszczególnych frakcji podczas konserwacji plemników tego gatunku. Jednakże mankamentem wprowadzenia takich zmian w technologii konserwacji jest zjawisko obniżenia ruchliwości plemników po ich inkubacji z pełną plazmą nasienia. Dlatego też niezbędne są kompleksowe badania mające na celu wybór odpowiedniej frakcji białkowej plazmy nasienia w konserwacji nasienia psa.

4. Strzeżek R., Koziorowska-Gilun M., Kiełczewski K., Kordan W. 2015. Effect of dialysis of dog semen on sperm characteristics and some biochemical components of seminal plasma. Pol J Vet Sci., 18: 367-368.

Cel pracy i uzasadnienie potrzeby badań

Doskonalenie metod konserwacji nasienia psa jest ciągle aktualnym problemem, zwłaszcza w odniesieniu do sposobu przygotowania prób nasienia do dalszych etapów postępowania technologicznego. Występowanie w plazmie nasienia niskocząsteczkowych substancji niekorzystnie oddziałujących na plemniki, stanowi główną przyczynę podejmowanych prób wprowadzania specyficznych technik laboratoryjnych pozwalających na wyrugowanie lub neutralizację omawianych substancji przed dalszymi etapami technologii konserwacji nasienia. Powszechnie stosowaną procedurą poprzedzającą kolejne etapy konserwacji nasienia jest obecnie pozyskanie od psa wyłącznie frakcji plemnikowej ejakulatu i usunięcie plazmy poprzez wirowanie (Rijsselaere i in., 2002). Jak zasygnalizowano wcześniej, omawiane postępowanie prowadzi jednak do usunięcia istotnych jej komponentów np. antyoksydantów, pełniących funkcję protekcyjną wobec plemników (Koderle i in., 2011). Inną z możliwości, zachowującą w pewnym stopniu właściwości protekcyjne komponentów plazmy nasienia wobec plemników a jednocześnie eliminującą szereg niekorzystnie oddziałujących na nie substancji, jest procedura dializy pełnego ejakulatu. Metoda dializy oparta jest o wykorzystanie specjalnych błon dializacyjnych działających jak sito molekularne. Stosując omawianą procedurę, w przypadku nasienia knura stwierdzono, że proces 5 godzinnej dializy powoduje wzrost odsetka plemników ruchliwych z zachowaną integralnością plazmolemy i funkcjonalnymi mitochondriami (Fraser i in., 2007). Bezpośrednim skutkiem omawianego zjawiska była redukcja stężenia niekorzystnych dla plemników substancji peptydowych oraz

wolnych jonów Zn^{2+} , stanowiących przyczynę podatności plemników knura na udar chłodowy (Strzeżek i in., 2002). Pozytywny efekt dializy na jakość nasienia knura stał się przesłanką do podjęcia próby przeprowadzenia badań porównawczych odnośnie psa. Celem badań była próba oceny wpływu procesu dializy nasienia psa na wybrane wyznaczniki jakościowe nasienia oraz wybrane wskaźniki biochemiczne plazmy nasienia.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły ejakulatory pozyskane od 6 psów (wiek 2-8 lat) metodą manualną. Każdy ejakulat dzielono na dwie równo objętościowo porcje. Jedna porcja nie została poddana żadnym procedurom technologicznym. Drugą porcję poddawano 5 godzinnej dializie w workach dializacyjnych o przepuszczalności dla substancji o masie cząsteczkowej 12-14 kDa (Visking® dialysis tubing 36/32, Serva) wobec rozcieńczalnika bazowego Tris-fruktozocytrynian. W próbach nasienia świeżego oraz nasienia poddanego procedurze dializy oceniano odsetek plemników ruchliwych metodą mikroskopową, odsetek plemników z zachowaną integralnością plazmolemy (PMI) oraz funkcjonalnymi mitochondriami (MF). Analizy plazmy nasienia obejmowały oznaczanie następujących wyznaczników biochemicznych: zawartość białka ogólnego (TPC), zawartość wolnych grup sulfhydrylowych (SH), zawartość jonów cynkowych (Zn^{2+}) oraz zawartość antyoksydantów niskocząsteczkowych: L-glutationu (GSH+GSSH), L-ergotioneiny (ERG), L-askorbinianu (ASC).

Rezultaty badań i ich interpretacja

Proces dializy spowodował wyraźny spadek jakości nasienia psa, co przejawiało się zdecydowanym obniżeniem odsetka plemników ruchliwych oraz plemników z nieuszkodzoną plazmolemą i funkcjonalnymi mitochondriami. Wykazano wzrost odczynu pH ejakulatu w kierunku bardziej obojętnego (z 6.45 do 7.1). Stwierdzony istotny wzrost zawartości białka ogólnego (TPC) w plazmie nasienia mógł być spowodowany interferencją komponentów odczynnika biuretowego z występującymi w plazmie nasienia redukującymi czynnikami (SH, GSH+GSSH i ERG), których wzrost zawartości także wykazano po dializie (Buxbaum 2011). Ponadto wzrost TPC sugerować może, że po dializie ejakulatu psa następują zmiany konformacyjne w strukturze białek plazmowych. Stanowić to mogło przyczynę naruszenia stabilności kompleksów jonów Zn^{2+} z białkowymi komponentami plazmy nasienia i uwolnienia omawianych jonów do środowiska płynu dializacyjnego. Należy podkreślić istotne znaczenie jonów Zn^{2+} , pochodzących u psa głównie z wydzieliny prostaty, dla właściwości funkcjonalnych plemników tego gatunku (Mogielnicka-Brzozowska i in., 2012). Ponadto stwierdzony istotny spadek zawartości ASC mógł także stanowić przyczynę obserwowanych zmian funkcjonalnych

plemników psa. Wskazuje się bowiem, na pozytywny wpływ ASC na stabilizację błon plazmatycznych plemników (Ceylan i Serin, 2007).

Prawdopodobną przyczyną niekorzystnego wpływu dializy na właściwości plemników psa były zachodzące podczas tego procesu istotne zmiany konformacyjne w strukturze białek plazmowych oraz „ucieczka” wielu substancji niskocząsteczkowych do płynu dializacyjnego. Należy podkreślić, że w dalszych badaniach prowadzonych w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt wykazano, iż skrócenie czasu (do 1.5 lub 3 godzin) prowadzonej dializy pełnego ejakulatu także nie prowadziło do uzyskania puli plemników charakteryzujących się istotnie wyższymi wartościami wyznaczników funkcjonalnych w porównaniu do nasienia nie poddanego dializie (Batis, 2013).

Podsumowując, metoda długotrwałej dializy nasienia psa przed dalszymi etapami postępowania technologicznego konserwacji nie jest wskazana. Poznanie jednak mechanizmu zmian biochemicznych zachodzących podczas tego procesu wymaga badań kompleksowych.

5. Strzeżek R., Kozirowska-Gilun M., Stawiszyńska M. 2012. Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. Polish Journal of Veterinary Sciences, 15: 721-726.

Cel pracy i uzasadnienie potrzeby badań

Pełne żółtko jaja kury (HEY) ze względu na właściwości osłaniające plemniki przed udarem chłodowym stosowane jest jako składnik rozcieńczalników używanych w procedurach mrożenia nasienia różnych gatunków zwierząt, w tym również nasienia psa (Silva i in., 2002). Stwierdzono jednak, że w pełnym żółtku jaja kury obecne są substancje hamujące proces oddychania plemników i obniżające ich ruchliwość (Pace i Graham 1974; Watson i Martin, 1975). Ponadto pełne żółtko jaja stanowi oryginalny surowy materiał zwierzęcy, który jest potencjalnym źródłem zanieczyszczeń mikrobiologicznych lub nawet wirusowych powodujących obniżenie zdolności zapładniającej nasienia stosowanego w inseminacji ale także ograniczających międzynarodową wymianę nasienia (Amirat i in., 2004; Beccaglia i in., 2009). Stanowiło to przyczynę podjętych badań nad standaryzacją komponentów żółtka jaja kury poprzez technikę ultrawirowania. Otrzymana tą drogą frakcja lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) ze względu na działanie krioprotekcyjne została wykorzystana w składzie rozcieńczalników do mrożenia nasienia buhaja (Pace i Graham, 1974; Foulkes, 1977; Moussa i in., 2002) oraz knura (Demianowicz i Strzeżek, 1995). Omawiana frakcja zastosowana jako składnik rozcieńczalnika dla nasienia psa, pełni istotną rolę w ochronie przechowywanych plemników przed skutkami udaru chłodowego i korzystnie wpływa na ich właściwości

biologiczne. Zastosowanie rozcieńczalnika z dodatkiem frakcji LDL izolowanej z żółtka jaja kury pozytywnie wpłynęło na odsetek plemników ruchliwych, integralność ich błon plazmatycznych podczas procedury zamrażania-rozmrażania nasienia psa (Bencharif i in., 2008; Varela Jr i in., 2009; Bencharif i in., 2010). Oryginalnym rozwiązaniem jest z kolei opracowanie w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt metody izolacji z żółtka jaja strusia afrykańskiego (*Strutio Camelus*) specyficznej frakcji lipoprotein (LPFo), która w formie liofilizowanej (sypkiej) może być długookresowo przechowywana w niskich temperaturach. Unikalny skład biochemiczny i właściwości preparatu LPFo zadecydowały o jego zastosowaniu w składzie rozcieńczalnika Kortowo-3 do konserwacji nasienia w stanie płynnym (temp. 5°C i 16°C) oraz do technologii mrożenia nasienia knura metodą „kortowską” (Fraser i Strzeżek, 2005; Strzeżek i in., 2005; Dziekońska i in., 2009). Metoda uzyskiwania preparatu LPFo i możliwość jego zastosowania w konserwacji nasienia stały się przedmiotem patentu nr 217869, którego jestem współtwórcą. Pilotowe badania dotyczące możliwości zastosowania LPFo w konserwacji nasienia psa wykazały, że rozcieńczalnik TCF z końcowym stężeniem 10% omawianego preparatu wydaje się być najbardziej optymalny w technologii kriokonserwacji nasienia psa (Strzeżek i Lecewicz, 2010).

Celem podjętych badań była ocena porównawcza wpływu dwóch wariantów rozcieńczalnika Tris-cytrynian-fruktoza (TCF) zawierającego 20% dodatek pełnego żółtka jaja kury (HEY) lub 10% dodatek liofilizowanej frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) na wybrane właściwości plemników podanych procedurze zamrożenia-rozmrożenia.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły frakcje plemnikowe ejakulatów pozyskane od 6 psów (4-10 lat). Plemniki poddawano kriokonserwacji w słomkach o objętości 0,25 ml w sterowanej komputerowo komorze zamrażającej CryoCell 1205 (SY-LAB, Austria). Analizy właściwości plemników po rozmrożeniu obejmowały: komputerowo wspomaganą ocenę ruchliwości plemników (CASA), określenie zmian integralności plazmolemy plemników (SPMI), ocenę funkcjonalności mitochondriów plemników (MF). Ponadto określano status antyoksydacyjny plemników oznaczając w próbach nasienia świeżego i po rozmrożeniu aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx). Dodatkowo przeprowadzono indukowaną peroksydację lipidów błonowych plemników (LPO).

Rezultaty badań i ich interpretacja

Stwierdzono, że w próbach nasienia poddanych zamrożeniu-rozmrożeniu w porównaniu do plemników z nasienia świeżego następuje spadek odsetka plemników ruchliwych (MOT). Istotnie wyższymi wartościami MOT charakteryzowały się plemniki poddane kriokonserwacji w rozcieńczalniku zawierającym 20% dodatek żółtka jaja kurzego (HEY). Nie wykazano natomiast różnic statystycznie istotnych w zakresie odsetka plemników o ruchu postępowym (PMOT) oraz niektórych parametrów kinematycznych (VAP, VSL). Ponadto najwyższym odsetkiem plemników z zachowaną integralnością plazmolemy (SPMI) i funkcjonalnymi mitochondriami (MF) po rozmrożeniu charakteryzował się wariant rozcieńczalnika zawierający żółtko jaja kurzego (HEY). Analiza wyznaczników antyoksydacyjnych wykazała obniżenie aktywności SOD w plemnikach kriokonserwowanych w porównaniu do plemników nasienia świeżego. Mimo że nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych, tendencja ta była wyraźniej zaznaczona w próbach nasienia poddanych kriokonserwacji w rozcieńczalniku zawierającym 10% LPFo. Podobne zjawisko dotyczyło spadku aktywności GPx. Jednak w tym przypadku spadek aktywności omawianego enzymu był bardziej drastyczny w plemnikach poddanych kriokonserwacji w rozcieńczalniku zawierającym dodatek pełnego żółtka jaja kury (HEY). Pomiar ilości tworzonego dialdehydu malonowego (MDA) pozwolił na wykazanie różnic w zakresie zmian dynamiki reakcji peroksydacji lipidów plazmolemy plemników psa, uwarunkowanej wariantem rozcieńczalnika (HEY lub LPFo). Niższe wartości produkowanego MDA obserwowano w przypadku plemników zamrażanych w rozcieńczalniku z dodatkiem 20% HEY.

Rezultaty naszych badań wskazują, że w przypadku plemników psa komponenty zawarte w pełnym żółtku jaja kury (HEY) wykazują lepszą funkcję protekcyjną wobec plemników. Jednakże sugeruje się, że istnieje możliwość zastąpienia pełnego żółtka jaja ptaków, jako dodatku do rozcieńczalników nasienia psa, wyizolowaną z niego frakcją LDL (Bencharif i in., 2008, Varela Jr i in., 2009; Bencharif i in., 2010). Za najbardziej optymalny uznano 6% dodatek frakcji LDL do rozcieńczalnika przeznaczonego do kriokonserwacji nasienia psa (Bencharif i in., 2008). Dlatego też wydaje się, że również 10% dodatek frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo), zawierającej znaczne ilości LDL, może stanowić substytut pełnego żółtka jaja kurzego w rozcieńczalnikach stosowanych w procedurach mrożenia plemników psa. Należy także podkreślić, iż zastosowanie liofilizowanej frakcji lipoprotein izolowanej z żółtka jaja strusia afrykańskiego pozwala na uproszczenie procedur kriokonserwacji plemników psa. Preparat LPFo występuje bowiem w formie sypkiej, rozpuszczalnej w

rozcieńczalnikach opartych w swoim składzie na wodzie, a poza tym możliwe jest jego przechowywanie w stanie zamrożonym.

W przypadku naszych badań należy także podkreślić niedoskonałość zastosowanej metody wspomaganej komputerowo analizy ruchliwości (CASA) z wykorzystaniem systemu HTM IVOS. W badaniach zastosowano wprawdzie, zgodnie z zaleceniami producenta, wstępne ustawienia urządzenia mające na celu prawidłową identyfikację plemników psa jednakże nie korzystano z dodatkowego systemu barwienia fluorescencyjnego IDENT. Mogło to stanowić przyczynę uzyskania nie w pełni miarodajnych wyników oceny parametrów ruchliwości, zwłaszcza w przypadku zastosowania dodatku LPFo, którego komponenty występują w formie ziarnistości. Niżański i Klimowicz (2005) wskazują bowiem, że aby ocena ruchliwości plemników psa po rozmrożeniu była przeprowadzona optymalnie należy zastosować uprzednio barwienie firmowym barwnikiem fluorescencyjnym IDENT (Hoechst 33342). Taka procedura powoduje nieuwzględnianie w analizie ruchu biernego innych elementów komórkowych nasienia wykazujących słabą fluorescencję (nabłonki, komórki krwi) a także ziarnistości komponentów żółtka jaja (brak DNA). Procedura barwienia IDENT przed analizą ruchliwości plemników została uwzględniona w pozostałych publikacjach dotyczących konserwacji nasienia psa.

Nie mniej ważnym aspektem kriokonserwacji nasienia psa, poruszonym w omawianej publikacji jest sposób przygotowania próby nasienia przed omawianą procedurą. Dotyczy ona bowiem usunięcia plazmy nasienia przez wirowanie. Konsekwencją tego postępowania jest pozbawienie plemników naturalnych źródeł ochrony antyoksydacyjnej zawartych w plazmie nasienia (Koderle i in., 2011). Prezentowane rezultaty badań wskazują na istotną dysfunkcję enzymów antyoksydacyjnych, zwłaszcza peroksydazy glutationowej (GPx), której substratem jest L-glutation. Wskazywać to może na potrzebę uzupełniania składu rozcieńczalników przeznaczonych do konserwacji nasienia psa dodatkiem enzymatycznych i nieenzymatycznych (niskocząsteczkowych) substancji antyoksydacyjnych. Omawiane zagadnienia były m in. celem projektu NCN, nr N N308 573339 „Status antyoksydacyjny i nasilenie peroksydacji lipidów w nasieniu psów poddanych procedurom biotechnicznym” w którym byłem jednym z wykonawców.

6. Strzeżek R., Polakiewicz P., Kordan W. 2015. The effect of two packaging systems on the post-thaw characteristics of canine sperm. Polish Journal of Veterinary Sciences, 18: 249-254.

Cel pracy i uzasadnienie potrzeby badań

Efektywna procedura kriokonserwacji nasienia psa zależy od wielu czynników m.in. składu rozcieńczalnika, rodzaju użytego krioprotektora, tempa zamrażania i rozmrażania a także metody konfekcjonowania nasienia (Nöthling i in., 2005). Aktualnie nasienie psa przeznaczone do kriokonserwacji konfekcjonuje się najczęściej w słomkach o objętości 0.5 ml lub 0.25 ml. Mniej popularne metody pakowania nasienia to zamrażanie w kulkach lub w minitubach (Nizański i Dubiel, 2003). Wskazuje się ponadto, że stosowanie sposobu konfekcjonowania prób nasienia o większej objętości nie znajduje szerszego praktycznego zastosowania w technologii kriokonserwacji nasienia tego gatunku ze względu na stosunkowo niewielką objętość poddawanej zamrażaniu frakcji plemnikowej ejakulatu (Nizański i Dubiel, 2003). Jednakże w niektórych przypadkach, możliwość dysponowania dużą objętością nasienia o odpowiedniej koncentracji plemników pozwala na skuteczniejsze wykonanie sztucznej inseminacji u suk (Ivanova-Kitcheva i in., 1997). Ponadto konfekcjonowanie nasienia w tubie aluminiowej ze względu na jej wymiar i możliwość wyraźnego i trwałego oznakowania, ułatwia identyfikację próby nasienia przeznaczonego do zabiegu inseminacyjnego. Należy jednak podkreślić, że omawiany sposób konfekcjonowania nasienia w tubie aluminiowej został z powodzeniem wykorzystany w ośrodku krakowskim dla zamrażania nasienia ogiera (Tischner, 1979) a w ośrodku olsztyńskim do zamrażania nasienia knura (Fraser i Strzeżek, 2007). Jednakże w porównaniu do innych gatunków zwierząt brak jest rezultatów badań porównawczych dotyczących wpływu konfekcjonowania nasienia psa z zastosowaniem plastikowych słomek i tub aluminiowych na jakość plemników po zamrożeniu-rozmrożeniu. W dostępnym piśmiennictwie jest tylko jedno doniesienie dotyczące charakterystyki nasienia poddanego zamrażaniu nasienie psa z zastosowaniem wymienionych sposobów jego konfekcjonowania (Kosiniak i in. 1992). Dlatego też celem badań było porównanie metody konfekcjonowania nasienia na właściwości biologiczne plemników psa poddanych kriokonserwacji.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły frakcje plemnikowe ejakulatów pozyskanych 5-krotnie od 4 psów rasy Beagle. Próby nasienia przeznaczone do kriokonserwacji konfekcjonowano w słomkach plastikowych o objętości 0.25 ml oraz co najmniej w dwóch tubach aluminiowych o

objętości 5.0 ml. Zamrażanie nasienia prowadzono w statycznych parach azotu przez okres: 10 minut (słomki) oraz 15 i 20 minut (tuby aluminiowe T15 i T20). Analizy plemników po rozmrożeniu obejmowały komputerowo wspomaganą ocenę ruchliwości plemników (CASA), określenie zmian integralności plazmolemy plemników (SPMI), ocenę funkcjonalności mitochondriów plemników (MMP) oraz ocenę integralności akrosomu plemników (NAR).

Rezultaty badań i ich interpretacja

Rezultaty badań wykazały, że niezależnie od zastosowanego sposobu konfekcjonowania nasienia psa nie stwierdzono po zamrożeniu-rozmrożeniu prób statystycznie istotnych różnic dotyczących odsetka plemników ruchliwych (TMOT) oraz niektórych parametrów ich kinematyki. Jednakże wyższym odsetkiem plemników o ruchu postępowym (PMOT) charakteryzowały się próby nasienia zamrażane w słomkach. Ponadto plemniki kriokonserwowane w 0.25 ml słomkach charakteryzowały się po rozmrożeniu lepszymi wyznacznikami ich sprawności funkcjonalnej, zwłaszcza mitochondriów. Wydłużenie czasu schładzania prób nasienia konfekcjonowanych w tubach aluminiowych (z 15 do 20 minut) nie wpłynęło istotnie na większość parametrów ruchliwości plemników. Po rozmrożeniu nie wykazano różnic statystycznie istotnych ($P > 0.05$) w zakresie SPMI oraz NAR dla prób nasienia konfekcjonowanych w 0.25 ml słomkach oraz tubach aluminiowych poddanych wydłużonemu czasowi schładzania nad parami azotu (T20). Z kolei wyższymi wartościami MMP charakteryzowały się plemniki zamrażane w 0.25 ml słomkach. Nie wykazano natomiast różnic statystycznie istotnych ($P > 0.05$) dla parametrów PMI, MMP i NAR pomiędzy próbami konfekcjonowanymi w tubach aluminiowych i schładzanymi nad parami azotu w różnym czasie (T15 i T20).

Powyższe wyniki badań wskazują, że plemniki psa konfekcjonowane w tubach aluminiowych i zamrażane metodą statyczną są niedostatecznie chronione przed negatywnym wpływem zmian temperatur zachodzących w tym procesie. Uwarunkowane jest to prawdopodobnie stosunkiem powierzchni opakowań w których przeprowadza się zamrażanie nasienia do ich objętości. Przykładowo słomki cechują się wysoką proporcją powierzchni do objętości (*surface-to-volume ratio*), co pozwala na szybkie oziębienie całej objętości zawartego w nich nasienia podczas mrożenia i ograniczenie oscylacji temperatury podczas krystalizacji wody (Bielas i in., 2003). W wyniku tego spadek temperatury wewnątrz nich podąża natychmiast ze zmianami temperatury otoczenia a stopień przechłodzenia jest w tym przypadku minimalny w porównaniu z opakowaniami większymi. Generalnie wskazuje się, że istotnie wyższą jakość nasienia po rozmrożeniu osiąga się, gdy nasienie konfekcjonowane jest

w opakowaniach o przekroju płaskim lub/i okrągłym, o mniejszej objętości. Spowodowane jest to stosunkiem dużej powierzchni do małej objętości opakowania, co sprzyja szybkiej wymianie ciepła pomiędzy zawartością opakowania a otoczeniem (Ericsson i in., 2002; Bielas i in., 2010). Z kolei tuby aluminiowe charakteryzują się dużą powierzchnią i są płaskie co powoduje, że transfer ciepła jest wysoki podczas ich zamrażania. Jednakże objętość nasienia jest także znacząca, co sprawia, że podczas zamrażania nad parami azotu prawdopodobnie mogą występować istotne różnice w szybkości zamrażania części centralnej i peryferyjnej tuby. Dlatego też zamrażanie prób nasienia konfekcjonowanego w tubach aluminiowych charakteryzowało się nieznacznie niższymi, w porównaniu ze słomkami, wynikami średnich wartości niektórych wskaźników jakości nasienia. Optymalnym rozwiązaniem, pozwalającym na osiągnięcie jednorodnych warunków zamrażania nasienia psa konfekcjonowanego w większych opakowaniach jest zastosowanie programowanych urządzeń zamrażających. Wskazuje się bowiem, iż zamrażanie we freezerach jest korzystniejsze bowiem zmniejsza wyraźnie fluktuacje temperatury wewnątrz opakowań z próbami nasienia w porównaniu do metody statycznej przeprowadzanej nad parami ciekłego azotu (Schäfer-Somi i in., 2006). Podsumowując, dzięki wykorzystaniu różnych wyznaczników molekularnych wskazano na możliwość zamrażania dużych objętości nasienia psa w tubach aluminiowych. Efektywniejsza skuteczność omawianej procedury może zostać zwiększona po wprowadzeniu określonych modyfikacji technologii kriokonserwacji dotyczących zwłaszcza czasu inkubacji tub nad parami azotu lub wdrożeniu metody opartej na zamrażaniu w zamrażarkach sterowanych komputerowo.

4.3.3. Podsumowanie

Podstawą rozprawy habilitacyjnej są prezentowane, w załączonych 6 publikacjach, wyniki badań dotyczących możliwości wykorzystania wybranych molekularnych wskaźników do oceny nasienia psa poddanego różnym postępowaniom technologicznym.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy habilitacyjnej zaliczam:

1. Wykazanie, po raz pierwszy, zdolności redukcyjnych plemników i komponentów plazmy nasienia psa,
2. Opracowanie spektrofotometrycznego testu redukcji resazuryny jako dodatkowego wskaźnika sprawności metabolicznej w ocenie jakościowej nasienia psa,
3. Wskazanie, że psy domowe przez cały rok wytwarzają ejakulatory spełniające kryteria normospermii,
4. Określenie zakresu tolerancji plemników psa na zmiany ciśnienia osmotycznego i rolę ochronną komponentów plazmy nasienia,
5. Wykazanie, że procedura dializy nasienia psa jako sposób poprzedzający dalsze etapy technologii konserwacji nie jest wskazana,
6. Zastosowanie liofilizowanej frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) jako oryginalnego komponentu rozcieńczalnika stosowanego w kriokonserwacji nasienia psa,
7. Wskazanie na możliwość zamrażania dużych objętości nasienia psa w tubach aluminiowych.

Podsumowując, część prezentowanych rezultatów badań spełnia aspekt poznawczy wskazujący na dotychczas nieznanne lub w pełni nieokreślone właściwości biologiczne nasienia psa. Znaczący jest również aspekt aplikacyjny omawianych badań umożliwiający wprowadzenie do laboratoriów specjalistycznych, nowych analiz jakości nasienia psa lub prowadzących do zmodyfikowania procedur konserwacji nasienia tego gatunku ssaków.

Literatura

- Antończyk A, Nizański W., Twardoń J., Kozdrowski R., Ochota M., Błasiak K, Mikołajewska N., Stańczyk E. 2010. Współczesne poglądy na komputerową analizę jakości nasienia. *Medycyna Wet* 66, 668-671.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Ge´rard O, Courtens JL, et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61, 895-907.
- Aziz D.M., Ahlswede L., Enbergs H. 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology* 64, 1350-1356.
- Barrios B., Perez-Pe R., Gallego M., Tato A., Osada J, Muino-Blanco T., Cebrian-Perez J.A. 2000. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram. *Biol Reprod* 63, 1531-1537.
- Bartlett D.J. 1962. Studies on dog semen. II. Biochemical characteristics. *J Reprod Fertil* 3, 190-205.
- Batis A. 2013. Technologiczna przydatność procesu dializy pełnego ejakulatu psa przed konserwacją w stanie płynnym. Praca magisterska. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.
- Beccaglia M., Anastasi P., Luvoni G.C. 2009. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Vet Res Commun* 33 (Suppl 1), S77-S80.
- Bell F.W., Klausner J.S., Hayden D.W., Lund E.M., Liebenstein B.B, Feeney D.A., Johnston S.D., Shivers J.L., Ewing Ch.M., Isaacs W.B. 1995. Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *J. of Vet. Int. Med* 9, 149-153.
- Bencharif D., Amirat L., Anton M., Schmitt E., Desherces S., Delhomme G., Langlois M.L., Barrière P., Larrat M., Tainturier D. 2008. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70(9):1478-88.
- Bencharif D., Amirat-Briand L., Garand A., Anton M., Schmitt E., Desherces S., Delhomme G., Langlois M.L., Barrière P., Destrumelle S., Vera-Munoz O., Tainturier D. 2010. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci*. 119(3-4):305-13.
- Bielas W., Dubiel A., Rząsa A., Twardoń J., Nizański W.: Effect of packaging form and methods of boar semen freezing on chosen reproductive indexes of sows. *Medycyna Wet* 2010, 66, 711-715.
- Bielas W., Dubiel A., Nizański W.: Effects of cryopreservation methods, packaging systems and the thermoresistance test on the post-thaw quality of boar semen. *Medycyna Wet* 2003, 59, 172-175.
- Borkowski K., Strzeżek J. 1994. Wykorzystanie wskaźników biochemicznych do oceny jakości nasienia tryka. *Medycyna Wet* 50, 200-202.
- Bukowska D., Kempisty B., Sikora J., Woźna M., Jackowska M., Zaorska K., Antosik P., Jaśkowski J.M. 2011. Analizy funkcjonalne i molekularne plemników w ocenie zdolności rozrodczej samców ssaków. *Medycyna Wet* 67, 29-33.
- Buxbaum E (2011) *Biophysical chemistry of proteins: An Introduction to laboratory methods*. Springer, New York.
- Carter R.A., Ericsson S.A, Corn C.D., Weyerts P.R., Dart M.G, Escue S.G., Mesta J. 1998. Assessing the fertility potential of equine semen samples using the reduction dyes methylene green and resazurin. *Arch Androl* 40, 59-66.
- Ceylan A, Serin I. 2007. Influence of ascorbic acid addition to the extender on dog sperm viability and acrosomal integrity during cooled storage. *Revue Méd Vét* 158, 384-387.
- Chandler J.E., Harrison C.M., Canal A.M. 2000. Spermatozoal methylene blue reduction: an indicator of mitochondrial function and its correlation with motility. *Theriogenology* 54, 261-271.

- Cheuquemán C., Bravo P., Treulén F., Giojalas L.C., Villegas J., Sánchez R., Risopatrón J. 2012. Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 47, 39–43.
- Ciereszko A., Strzeżek J. 1989. Isolation and characteristics of spermatid aminotransferase from boar spermatozoa. *Int J Biochem* 21, 1343-1351.
- Cooper T.G., Yeung C.H. 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Techniq* 61, 28–38.
- Corazza M., Guidi G., Romagnoli S., Tognetti R., Buonaccorsi A. 1994. Serum total prostatic and non-prostatic acid phosphatase in healthy dogs and in dogs with prostatic diseases. *J Small Anim Pract* 35, 307-310.
- Dart M.G., Mesta J., Cremshaw C., Ericsson S.A. 1994. Modified resazurin test for determining the fertility potential of bovine spermatozoa. *Arch Androl* 33, 71-75.
- Demianowicz W., Strzeżek J. 1995. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod Domest Anim* 31, 279–280.
- Dorado J., Alcaráz L., Duarte N., Portero J.M., Acha D., Demyda S., Muñoz-Serrano A., Hidalgo M. 2011. Centrifugation on PureSperm density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 76, 381-385.
- Dziekońska A., Fraser L., Strzeżek J. 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J Anim Feed Sci*, 18, 638–649.
- Dubiel A. 1973. Aktywność gamma-glutamyl-transpeptydazy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej w nasieniu psów płodnych i z zaburzeniami płodności. *Medycyna Wet* 29, 679-681.
- England G.C.W., W.E. Allen W.E. 1989. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec* 125, 399.
- Ericsson B.M., Petersson H., Rodriguez-Martinez H. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new PlatPack container. *Theriogenology* 58, 1065-1079.
- Evenson D.P., Thompson L., Jost L. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41, 637–651.
- Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K. 2002. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23, 25–43.
- Foulkes J.A. 1977. The separation of lipoprotein from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 49, 277–284.
- Fraser L., Dziekońska A., Strzeżek R., Strzeżek J. (2007) Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 67, 994-1003.
- Fraser L., Gorszczaruk K., Strzeżek J. 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Dom Anim* 36, 325–329.
- Fraser L., Strzeżek J. 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod Domest Anim* 40, 530-536.
- Fraser L., Strzeżek J. 2007. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci* 99, 317-329.
- Frenette G., Dube J.Y., Tremblay R.R. 1986. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. *Arch Androl* 16, 235-241.
- Gączarzewicz D., Piasecka M., Udała J., Błaszczuk B., Laszczyńska M., Kram A. 2003. Oxidoreductive capability of boar sperm mitochondria in fresh semen and during their preservation in BTS extender. *Reprod Biol* 3, 161-172.

- Gilmore J.A., Liu J., Peter A.T., Crister J.K. 1998. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod* 58, 28-36.
- Glogowski J., Falkowski J., Rotkiewicz T. 1997. Phosphatase activity in the seminal plasma of boar in a yearly cycle and its links with other ejaculate quality indicators. *Rocz Nauk Zoot* 24, 85-95.
- Glogowski J., Demianowicz W., Piros B., Ciereszko A. 1998. Determination of acrosin activity of boar spermatozoa by the clinical method: optimization of the assay and changes during short-term storage of semen. *Theriogenology* 50, 861-872.
- Gobello C., Castex G., Corrada Y. 2001. Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini - review. *Theriogenology* 57, 1285-1291.
- Hay M.A., King W.A., Gartley C.J., Leibo S.P., Goodrowe K. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 51, 99-108.
- Hewitt D.A., England G.C.W. 2001. Manipulation of canine fertility using in vitro culture techniques. *J Reprod Fertil Suppl* 57, 111-125.
- Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62, 3-22.
- Ivanova-Kicheva M.G., Bobadov N., Somlev B. 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-mL aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology* 48, 1343-1349.
- Ivanova M., Mollova M., Ivanova-Kicheva M.G., Petrov M., Djarkova T., Somlev B. 1999. Effect of cryopreservation of zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* 52, 163-170.
- Johnston S.D., Kamolpatana K., Root-Kustritz M.V., Johnston G.R. 2000. Prostatic disorders in the dog. *Anim Reprod Sci* 60-61, 405-415.
- Kawakami E., Takemura A., Sakuma M., Takano M., Hirano T., Hori T., Tsutsui T. 2007. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J Vet Med Sci* 69, 133-136.
- Kim S-H., Yu D-H., Kim Y-J. 2010. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology* 73, 282-292.
- Koderle M., Aurich C., Schäfer-Somi S. 2009. The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. *Theriogenology* 72, 1215-1520.
- Kordan W., Fraser L., Wysocki P., Strzeżek R., Lecewicz M., Mogielnicka-Brzozowska M., Dziekońska A., Soliwoda D., Koziorowska-Gilun M. 2013. Semen quality assessments and their significance in reproductive technology. *Pol J Vet Sci* 16, 823-833.
- Kosiniak K., Bittmar A., Sallerk K. 1992. Relationship between biochemical components of dog seminal plasma and semen freezability. *Proceedings of 12th International Congress on Animal Reproduction, Hague, 1791-1792.*
- Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z. 2007. Alkaline phosphatase activity as a marker of dog semen freezability. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii* 40, 131-135.
- Kuroda H., Hiroe K. 1972. Studies on the metabolism of dog spermatozoa. I. Seasonal variation in semen quality and aerobic metabolism of spermatozoa. *Jap J Animal Reprod* 17, 89-98.
- Kozdrowski R., Dubiel A. 2004. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. *Anim Reprod Sci* 80, 281-289.
- Koziorowska-Gilun M., Koziorowski M., Strzeżek J., Fraser L. 2011. Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reprod Biol* 11, 37-47.

- Lange-Consiglio A., Antonucci N., Manes S., Corradetti B., Cremonesi F., Bizzaro D. 2010. Morphometric characteristics and chromatin integrity of spermatozoa in three Italian dog breeds. *J Small Anim Pract* 51, 624–627.
- Lévy X., Mimouni P., Fontbonne A., Derre G., Claret E., Audhuy S., Morlet J. 2009. Performance evaluation of the new blood test Odelis® CPSE in the diagnosis of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) in dogs. Proceedings of the 6th EVSSAR Annual Symposium, Wrocław.
- Liu Z, Foote RH, 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci* 81, 1868-1873.
- Mahi C.A, Yanagimachi R. 1978. Capacitation, acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined medium. *Gamete Res* 1, 101–109.
- Mahmoud A.M., Comhaire F.H., Vermeulen L., Andreou E. 1994. Comparison of the resazurin test, adenosine triphosphate in semen and various sperm parameters. *Hum Reprod* 9, 1688-1693.
- Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71, 28–37.
- Martínez A.I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 82-83, 209-224.
- Mayenco-Aguirre A.M., Pérez-Cortés A.B. 1998. Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 50, 195–204.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247, C125–C142.
- Meyers S.A. 2005. Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim Reprod Science* 89, 57-64.
- Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W. 2012. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. *Pol J Vet Sci* 15, 493-498.
- Mogielnicka-Brzozowska M., Strzeżek R., Wasilewska K., Kordan W. 2015. Prostatosomes of canine seminal plasma - zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 50, 484-491.
- Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 63, 2372-2381.
- Moussa M., Martinet V., Trime`che A., Tainturier D., Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57, 1695-1706.
- Mukai C., Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod.* 71, 540-547.
- Neagu V.R., Macías García B., Salazar Sandoval C., Morillo Rodríguez A., Ortega Ferrusola C., González Fernández L., Tapia J.A., Peña F.J. 2010. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology* 73, 645–650.
- Neagu V.R., Macías García B., Morillo Rodríguez A., Ortega Ferrusola C., Gallardo Bolañosa J.M., González Fernández L., Tapia J.A., Peña F.J. 2011. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. *Theriogenology* 75, 10–16.
- Niżański W., Dubiel A. 2003. The effect of packaging systems on post-thaw spermatozoal characteristics in cryopreserved dog semen. *Medycyna Wet* 59, 829-833.
- Niżański W. 2004. Zależności pomiędzy wybranymi właściwościami plemników psa w nasieniu poddanym konserwacji w niskich temperaturach. *Medycyna Wet* 60, 537-543.

- Nizański W., Klimowicz M. 2005. Zastosowanie barwienia fluorescencyjnego SYBR-14/jodek propydyiny i cytometrii przepływowej w ocenie jakości nasienia psów poddanego konserwacji w stanie płynnym. *Medycyna Wet* 61, 1022-1028.
- Nizański W. 2006. Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology* 66, 470-483.
- Nizański W., Partyka A., Rijsselaere T. 2012. Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reprod Domest Anim* 47 Suppl 6, 215-221.
- Nöthling J.O., Shuttleworth R. 2005. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 63, 1469-1480.
- O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267, 5421-5426.
- Ortega Ferrusola C., González Fernández L., Morrell J.M., Salazar Sandoval C., Macías García B., Rodríguez-Martínez H., Tapia J.A., Peña F.J. 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 138, 55-63.
- Pace M.M., Graham E.F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 39, 1144-1149.
- Partyka A., Nizański W., Ochota M. 2012. Methods of Assessment of Cryopreserved Semen. W: *Current Frontiers in Cryobiology*, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8, InTech, DOI: 10.5772/33565.
- Payan-Carreira R., Borges P., Mir F., Fontbonne A. 2013. Molecular Markers in Sperm Analysis. W: *Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed*, Alemayehu Lemma (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/52231.
- Peña A., Johannisson A., Linde-Forsberg C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52, 965-980.
- Pena F. J., Nunez-Martinez I., Moran J. M. 2006. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reprod. Dom. Anim.* 41 (Suppl. 2), 21-29.
- Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez-Martínez H. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60, 677-689.
- Pukazhenth B., Spindler R., Wildt D., May Bush L., Howard J. 2002. Osmotic properties of spermatozoa from felid producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. *Cryobiology* 44, 288-300.
- Reddy K.V., Bordekar A.D. 1999. Spectrophotometric analysis of resazurin reduction test and semen quality in men. *Indian J Exp Biol* 37, 782-786.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. 2002. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1669-1681.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., Nizański W. 2012. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reprod Domest Anim* 47 Suppl 6, 204-207.
- Rota A., Strom B., Linde-Forsberg C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44, 885-900.

- Rota A., Milani C., Romagnoli S. 2007. Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology* 67, 520-525.
- Schäfer-Somi S., Kluger S., Knapp E., Klein D., Aurich C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and membrane integrity of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66, 173-182.
- Schäfer-Somi S., Aurich C. 2007. Use of new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim Reprod Sci* 102, 1-13.
- Schäfer-Somi S., Fröhlich T., Schwendenwein I. 2013. Measurement of Alkaline Phosphatase in Canine Seminal Plasma – An Update. *Reprod Domest Anim* 48, e10-12.
- Silva AR., de Cássia Soares Cardoso R., Uchoa DC., Machado da Silva LD. 2002. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Vet J* 164, 244-246.
- Silva P.F., Gadella B.M. 2005. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978.
- Sirivaidyapong S., Cheng F.P., Marks A., Voorhout W.F., Bevers M.M., Colenbrander B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53, 789–802.
- Sirivaidyapong S., Ursem P., Bevers M.M., Colenbrander B. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 57, 383-386.
- Songsasen N., Yu I., Murton S., Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA, Leibo SP, 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology* 44, 79-90.
- Strzeżek J. 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod. Biol.* 2 (3): 243-266.
- Strzeżek J, Lecewicz M, Dziekońska A, Fraser L (2005) A simple method of extraction of lipoprotein fractions from avian egg yolk – protective effect on cooled boar semen. *Theriogenology* 63: 496-497.
- Strzeżek R., Koziorowska-Gilun M., Kowalówka M., Strzeżek J. 2009. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol J Vet Sci* 12, 55-60.
- Strzeżek J. 2013. Rola proteomiki w seminologii. International Scientific Conference – New trends of research in animal science, Kraków.
- Strzeżek R, Janowski T. 2003. Markery enzymatyczne gruczołu krokowego psa. *Medycyna Wet* 59, 6-9.
- Strzeżek R., Koziorowska-Gilun M., Kowalówka M., Strzeżek J. 2009. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol J Vet Sci*, 12, 55-60.
- Strzeżek R., Lecewicz M. 2011. Frakcja lipoprotein izolowana z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) – oryginalny komponent rozcieńczalnika dla kriokonserwacji nasienia psa. VI Zjazd TBR, Polańczyk.
- Thomas C.A., Garner D.L., De Jarnette J.M., Marshall C.E., 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 58, 786-793.
- Taha M.B., Noakes D.E., Allen W.E. 1981. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Small Anim Pract* 22, 177-184.
- Tischner M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 27, 53-59.
- Treulen F, Sánchez R, Risopatrón J. 2012. Effects of seminal fluid fractions on plasma and acrosome membrane integrity and mitochondrial membrane potential determined by flow cytometry in chilled canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 47, 1043-1048.
- Varela Junior A.S., Corcini C.D., Ulguim R.R., Alvarenga M.V., Bianchi I., Corrêa M.N., Lucia T Jr, Deschamps J.C. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim Reprod Sci* 115, 323-327.

- Volpe S., Leoci R., Aiudi G., Lacalandra G.M., 2009. Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 44, 275–278.
- Wang S., Holyoak G.R., Panter K.E., Liu Y., Evans R.C., Bunch T.D. 1998. Resazurin reduction assay for ram sperm metabolic activity measured by spectrophotometry. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 197-202.
- Watson P.F., Martin CA. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Aust J Biol Sci* 28, 145–152.
- Yu IJ. 2014. Canine sperm cryopreservation using glucose in glycerol-free Tris. *Cryo Letters* 35, 101-107.
- Zalata A.A., Lammertijn N., Christopher A., Comhaire F.H. 1998. The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *Int J Androl* 21, 289-294.
- Zelli R, Bellezza I, Rambotti MG, Minelli A, Polisca A. 2013. Ultrastructural and enzymatic activity of membranous vesicles isolated from canine seminal plasma. *Reprod Domest Anim* 48, 252-257.
- Zini A., O'Bryan M.K., Israel L., Schlegel P.N. 1998. Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: correlation with sperm motility. *Urology* 51, 464-468.
- Zrimsek P., Kurc J., Kosec M., Mrkun J. 2004. Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. *Int J Androl* 27, 57-62.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Główne kierunki prowadzonych badań

5.1. Identyfikacja systemów antyoksydacyjnych w nasieniu psa (A.7, A.10, B.5, B.17)

Celem badań była analiza enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych plemników oraz poszczególnych frakcji nasienia psa.

Stwierdzono, że antyoksydacyjny system obrony enzymatycznej w plemnikach psa jest reprezentowany przede wszystkim przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) i peroksydazę glutationową (GPx). W ekstraktach plemnikowych nie wykazano natomiast aktywności katalazy (CAT). W plazmach pochodzących z poszczególnych frakcji nasienia (przedplemnikowej, plemnikowej i poplemnikowej) zidentyfikowano obecność SOD. Natomiast aktywność GPx występowała jedynie we frakcji plemnikowej i poplemnikowej. Omawiane enzymy wykazywały najwyższą aktywność w płynie frakcji plemnikowej. We wszystkich trzech analizowanych frakcjach nasienia nie wykazaliśmy aktywności CAT.

Ponadto dokonano identyfikacji form molekularnych głównych enzymów antyoksydacyjnych w homogenatach plemników oraz płynach poszczególnych frakcji nasienia psa. Nie stwierdzono znaczącego różnicowania w zakresie aktywności SOD w homogenatach plemników oraz w płynach poszczególnych frakcji ejakulatu psa. Wykazano, że tylko jedno pasmo białkowe posiadało aktywność SOD zarówno w homogenacie plemników, jak i w każdej z analizowanej frakcji ejakulatu. Specyficzne barwienie żeli wskazało na obecność jednego pasma białkowego posiadającego aktywność GPx w homogenacie plemników psa. Natomiast w

płynach frakcji plemnikowej i poplemnikowej ejakulatu psa zidentyfikowano trzy pasma białkowe wykazujące aktywność peroksydazową. Nie stwierdzono natomiast aktywności peroksydazowej we frakcji przedplemnikowej. Zastosowana przez nas metoda barwienia na aktywność katalazową nie potwierdziła występowania aktywności tego enzymu w żadnym z analizowanych płynów.

Dominującym antyoksydantem niskocząsteczkowym frakcji plemnikowej są L-glutation i kwas L-askorbinowy. Wysoką zawartość wolnych grup tiolowych stwierdzono natomiast we frakcji poplemnikowej (prostatowej). We wszystkich trzech frakcjach nasienia wykazano obecność L-ergotioneiny, a najwyższą jej zawartość stwierdzono we frakcji przedplemnikowej.

Wnioski:

Nasienie psa posiada specyficzny gatunkowo system antyoksydacyjny uwarunkowany głównie aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej i niskocząsteczkowymi związkami tiolowymi.

5.2. Identyfikacja systemu akrosynowego w nasieniu psa (A.8, B.6, B.19)

Celem badań było określenie aktywności proakrosyny i akrosyny w plemnikach pochodzących z frakcji plemnikowej ejakulatu oraz pełnego ejakulatu psa. Dodatkowo przeprowadzono oznaczanie aktywności inhibitorów antytrypsynowych w płynach poszczególnych frakcji ejakulatu oraz pełnej plazmie nasienia.

Wykazano, iż w plemnikach pochodzących z frakcji plemnikowej ejakulatu psa dominuje aktywność wolnej akrosyny (akrosyna / proakrosyna; 2.38 ± 0.22 / 1.05 ± 0.08 mU/ 10^6 plemników). Z kolei plemniki pochodzące z pełnego ejakulatu psa wykazują wyższą aktywność proakrosyny (proakrosyna / akrosyna; 2.19 ± 0.19 / 1.30 ± 0.11 mU/ 10^6 plemników). Ponadto stwierdzono obecność oraz aktywność antytrypsynową inhibitorów akrosyny w płynach poszczególnych frakcji ejakulatu oraz w pełnej plazmie nasienia ejakulatu psa. Najwyższą aktywność inhibitorów akrosyny wykazano we frakcji poplemnikowej (prostatowej), natomiast najniższą w przedplemnikowej.

Ponadto określono zmiany aktywności proakrosyny i akrosyny podczas przechowywania plemników w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ w rozcieńczalniku Tris-cytrynian-fruktoza (TCF) przez okres 24 godzin. Wykazano, że proces przechowywania plemników istotnie wpływa na aktywność systemu akrosynowego plemników psa. Podczas przechowywania dochodziło do ograniczonej proteolizy proakrosyny i w konsekwencji do wzrostu aktywności wolnej akrosyny.

Wnioski:

W świeżych plemnikach pochodzących z pełnego ejakulatu psa forma nie-zymogenowa akrosyny reprezentuje około 40% ogólnej aktywności trypsyno-podobnej. Specyficzne inhibitory antytrypsynowe obecne w płynach poszczególnych frakcji ejakulatu psa mogą odgrywać znaczącą rolę w stabilizacji plemnikowego systemu akrosynowego.

5.3. Doskonalenie metod konserwacji nasienia psa i knura

5.3.1. Zastosowanie liofilizowanej frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) w konserwacji nasienia psa (B.20, B.27, B.35)

Przedmiotem badań było określenie możliwości zastosowania liofilizowanej frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) w konserwacji nasienia psa.

Wykazano, że dodatek 5% LPFo do rozcieńczalnika Tris-cytrynian-fruktoza podobnie jak dodatek żółtka jaja kury korzystnie wpływa na stan błon plazmatycznych i funkcjonalność mitochondriów plemników psa przechowywanych w temperaturze +5°C, co sugeruje, że komponent ten może być alternatywnie stosowany do przechowywania nasienia psa w stanie płynnym. Z kolei w badaniach pilotowych dotyczących zamrażania-rozmrażania nasienia psa wykazano, iż rozcieńczalnik TCF z końcowym stężeniem 7,5-10% LPFo wydaje się być najbardziej optymalny w technologii kriokonserwacji nasienia psa.

5.3.2. Wpływ plazmy nasienia i wybranych antyoksydantów: katalazy (CAT) i N-acetylo-L-cysteiny (NAC) na właściwości konserwowanych plemników psa (B.7, B.9, B.10, B.30, B.36)

Badania przeprowadzono w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki, nr N N308 573339 „Status antyoksydacyjny i nasilenie peroksydacji lipidów w nasieniu psów poddanych procedurom biotechnicznym” w którym byłem jednym z wykonawców.

Wstępne wyniki badań wskazują na korzystny wpływ usunięcia plazmy nasienia podczas konserwacji w stanie płynnym na właściwości ruchowe plemników. Z kolei dodatek antyoksydantów nie zmienił parametrów ruchliwości, integralności błon plazmatycznych, ciągłości akrosomów i nasilenia peroksydacji lipidów w plemnikach poddanych przechowywaniu przez 5 dni. Stwierdzono jedynie, że dodatek CAT opóźnia spadek aktywności mitochondriów w plemnikach psa.

Z kolei podczas konserwacji nasienia w niskich temperaturach potwierdzono, że usunięcie plazmy nasienia wywiera korzystny wpływ na właściwości ruchowe plemników po rozmrożeniu. Dodatek CAT do rozcieńczalnika istotnie poprawia właściwości ruchowe plemników. Ponadto dodatek CAT i NAC zmienia parametry kinematyczne plemników tj. VCL, STR i LIN, ale nie ma istotnego wpływu na właściwości strukturalne plemników.

5.3.3. Wpływ płytkowego czynnika aktywującego - PAF (plateled activating factor) na właściwości kriokonserwowanych plemników psa (A.9, B.22)

Celem badań było określenie wpływu różnych stężeń PAF (1×10^{-3} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-5} M i 1×10^{-6} M) na aktywność aparatu ruchu, integralność plazmolemy, funkcjonalność mitochondriów i zawartość ATP kriokonserwowanych plemników psa. Stwierdzono, że dodatek PAF w zakresie stężeń 1×10^{-3} M do rozmrożonego nasienia psa wpływa korzystnie na parametry ruchliwości plemników oraz zawartość ATP w plemnikach. Nie wykazano natomiast istotnego wzrostu odsetka plemników z zachowaną integralnością plazmolemy i funkcjonalnymi mitochondriami w porównaniu do plemników inkubowanych po rozmrożeniu bez dodatku PAF.

Wnioski:

Prezentowane wyniki badań wskazują na możliwość zastosowania PAF jako suplementu rozcieńczalnika stosowanego do kriokonserwacji nasienia psa w celu podwyższenia wartości biologicznej plemników.

5.3.4. Wpływ białek wiążących jony cynkowe na parametry ruchliwości i integralność błon plazmatycznych plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C (A.12, B.8, B.29)

Celem badań było określenie wpływu białek wiążących jony cynkowe na wybrane parametry jakości plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C. Plemniki psa zawieszono w PBS, bez i z dodatkiem białek wiążących jony cynkowe przechowywano w temperaturze 5°C. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że białka wiążące jony cynkowe izolowane z plazmy nasienia psa pozytywnie wpływają na ruchliwość i stan błon plazmatycznych plemników poddanych udarowi chłodowemu w temperaturze 5°C.

Wnioski:

Badania podkreślają rolę białek wiążących jony cynkowe w zapewnieniu odpowiedniej ilości i dostępności jonów cynkowych jako składnika regulującego mechanizm ruchliwości plemników psa. Efekt ochronny omawianych białek podczas konserwacji może być związany z zapobieganiem uszkodzeniom struktur błon plazmatycznych.

5.3.5. Wpływ prostasomów izolowanych z plazmy nasienia na właściwości plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C (A.13, B.38)

Celem badań była było wykazanie zdolności wiązania jonów cynkowych przez prostasomy izolowane z plazmy nasienia psa. Ponadto określono wpływ omawianych struktur na parametry ruchowe i integralność błon plazmatycznych plemników przechowywanych w

temperaturze 5°C. Wykazano, po raz pierwszy, pozytywny wpływ prostasomów, zwłaszcza wariantu stanowiącego 2% całkowitej zawartości białek plazmy nasienia na parametry ruchliwości, integralność błon plazmatycznych oraz ciągłość akrosomu plemników psa po 2 godzinnej inkubacji w temperaturze 5°C.

5.3.5. Wpływ dializy poprzedzającej kriokonserwację na właściwości plemników knura po rozmrożeniu (A.5, B.21, B.28)

W celu polepszenia jakości konserwowanego nasienia knura zastosowano jego dializę w pierwszym etapie technologii konserwacji. Zbadano wpływ procesu dializy na wybrane parametry właściwości biologicznych plemników knura poddanych konserwacji w temperaturach ujemnych. Wykazano, iż proces dializy wywiera pozytywny wpływ na parametry oceny właściwości biologicznych plemników kriokonserwowanych. Zjawisko to skorelowane było z wyższą ruchliwością plemników, wzrostem odsetka komórek plemnikowych wybarwionych fluorochromem CFDA. Omawianym zmianom towarzyszył wzrost odsetka plemników z funkcjonalnymi mitochondriami (R123) oraz wzrost zawartości ATP. Wyniki badań wskazują na możliwość zastosowania dializy w celu poprawy przydatności plemników knura do kriokonserwacji.

Rafał Strzeżek

24.08.2015