

Załącznik 3

AUTOREFERAT

Opis dorobku i osiągnięć naukowych

dr inż. Marek Lucjusz Lecewicz

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt

Wydział Bioinżynierii Zwierząt

Uniwersytet Warmińsko - Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn

tel. (89) 523 35 09

e-mail: mlecew@uwm.edu.pl

OLSZTYN, 2019

	strona
SPIS TREŚCI	
1. Dane personalne	3
2. Posiadane dyplomy stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z artykułu 16 ustęp 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)	4
5. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	5
6. Piśmiennictwo	21
7. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	28
8. Podsumowanie dorobku naukowego	36

1. IMIĘ I NAZWISKO

Marek Lucjusz Lecewicz

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ ARTYSTYCZNE Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1996	tytuł zawodowy: inżynier, kierunek: Zootechnika, specjalność: Marketing i zarządzanie agrobiznesie, Wydział Zootechniczny, Akademia Rolniczo-Techniczna im. Michała Oczapowskiego w Olsztynie
1997	tytuł zawodowy: magister, kierunek: Zootechnika, specjalność: Biotechnologia w hodowli zwierząt, Wydział Zootechniczny, Akademia Rolniczo-Techniczna im. Michała Oczapowskiego w Olsztynie, praca dyplomowa pt.: „Struktura antygenowa plazmy nasienia knurów w przebiegu antyandrogenozy indukowanej octanem cyproteronu”, promotor: prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek
2001	stopień naukowy: doktor nauk rolniczych, Wydział Bioinżynierii Zwierząt UWM w Olsztynie, rozprawa pt: „Zmiany biochemiczne i wartość biologiczna nasienia knura konserwowanego w różnych temperaturach z dodatkiem żółtka jaja ptaków”, promotor: prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

luty 1997 – czerwiec 1997	asystent-stażysta, Katedra Biochemii Zwierząt, Akademia Rolniczo-Techniczna im. Michała Oczapowskiego w Olsztynie
październik 1997 – wrzesień 1998	doktorant, Katedra Biochemii Zwierząt, Akademia Rolniczo-Techniczna im. Michała Oczapowskiego w Olsztynie
październik 1998 – grudzień 2001	asystent, katedra Biochemii Zwierząt, Akademia Rolniczo-Techniczna im. Michała Oczapowskiego w Olsztynie
styczeń 2002 – sierpień 2018	adiunkt, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, UWM w Olsztynie
wrzesień 2018 do chwili obecnej	asystent, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, UWM w Olsztynie

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO 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. 2017 r. poz. 1789)

TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO

Wpływ dodatku wybranych stymulatorów ruchliwości oraz niskocząsteczkowych antyoksydantów na właściwości biologiczne kriokonserwowanych plemników buhaja i psa

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

	Publikacja	IF	pkt MNIŚW	Liczba cytowań	
				WoS	Scopus
H.1	Lecewicz M.* , Hering D.M., Kamiński S., Majewska A., Kordan W. 2015. Selected qualitative and biochemical parameters of cryopreserved semen of Holstein-Friesian (HF) AI bulls. Pol. J. Vet. Sci., 18: 237-239.	0,719	20	3	2
H.2	Lecewicz M.* , Kordan W., Majewska A., Kamiński S., Dziekońska A., Mietelska K. 2016. Effects of the platelet-activating factor (PAF) on selected quality parameters of cryopreserved bull semen (AI) with reduced sperm motility. Pol. J. Vet. Sci., 19: 147-158.	0,839	20	1	1
H.3	Lecewicz M.* , Kordan W., Kamiński S., Majewska A.M., Strzeżek R. 2017. Effect of platelet-activating factor (PAF) supplementation in semen extender on ATP content of cryopreserved bull spermatozoa (AI). Pol. J. Vet. Sci. 20: 421-423.	0,839	20	1	1
H.4	Lecewicz M.* , Strzeżek R., Kordan W. Majewska A.M. 2018. The effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. J. Vet. Res. 62 (2): 221-227.	0,811	15		
H.5	Lecewicz M.* , Strzeżek R., Majewska A.M., Purpurowicz P.S., Kordan W. 2019. The effect of different concentrations of caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine on the biological properties of frozen-thawed canine semen. Ann. Anim. Sci. DOI: 10.2478/aoas-2019-0025.	1,018	15		

RAZEM 4,226 90 5 4

* autor korespondencyjny

Wartości punktowe MNiSW (wg wykazu czasopism punktowanych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego) oraz wartości wskaźników IF (Impact Factor wg listy Journal Citation Reports - JCR) poszczególnych prac podano zgodnie z rokiem wydania publikacji (Załącznik 6). Liczbę cytowań podano według baz Web of Science i Scopus (z dnia 4 kwietnia 2019 roku) (Załącznik 6). Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w Załączniku 5, natomiast oświadczenia Współautorów w Załączniku 7.

5. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO WW. PRACY/PRAĆ I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

5.1. WSTĘP

Obecnie zarówno technologia kriokonserwacji nasienia, jak i sztuczna inseminacja są powszechnie stosowanymi metodami w programach hodowlanych zwierząt gospodarskich, a także coraz szerzej wykorzystywane bywają w kontrolowanym rozrodzie zwierząt towarzyszących. Głównym czynnikiem decydującym o sukcesie procedury inseminacji jest jakość nasienia (Walsh i wsp., 2011). Ruchliwość plemników jest rozpatrywana jako podstawowy parametr, będący wyznacznikiem integralności błon plazmatycznych oraz aktywności metabolicznej, określających wartość biologiczną nasienia, a zatem jego przydatność do procesu zapłodnienia (Johnson i wsp., 2000). Wymiernym efektem procesu kriokonserwacji, minimalizującym koszty zakładów produkujących nasienie jest umieszczenie w dawce inseminacyjnej optymalnej liczby zdolnych do zapłodnienia plemników. Niemniej jednak, poza specyfiką gatunkową, na każdym z etapów procedur zamrażania oraz rozmrażania męskie komórki rozrodcze narażone są na szereg czynników wywołujących w nich zmiany zarówno na poziomie strukturalnym jak i funkcjonalnym. Zatem utrzymanie zdolności zapładniającej plemników jest stale aktualnym problemem wyznaczającym kierunki badań dotyczących doskonalenia technologii kriokonserwacji nasienia.

Mimo różnic w budowie błon plazmatycznych plemników poszczególnych gatunków ssaków, obejmujących m.in. zmienną zawartość i skład kwasów tłuszczowych, fosfolipidów oraz cholesterolu, plazmolema jest strukturą w pierwszej kolejności narażoną na kriouszkodzenia (Holt, 2000; Mandal i wsp., 2014; Lucio i wsp., 2017). Rozpatrując istotną rolę w utrzymaniu właściwości pozostałych elementów komórki, takich jak akrosom czy mitochondria, zachowanie integralności oraz stabilności błon komórkowych ma kluczowe znaczenie w zachowaniu zdolności zapładniającej plemników.

W wyniku udaru chłodowego dochodzi do zmiany układu lipidów oraz białek błonowych, w tym fosforylacji tyrozyny, zaburzeń przepuszczalności plazmolemy, a także deregulacji transportu jonów

oraz fragmentacji DNA (Zhao i Buhr, 1995; Watson, 2000; Bailey i wsp., 2000). Ponadto, do destabilizacji błon komórkowych dochodzi z powodu zmian ciśnienia osmotycznego, wywołanego formowaniem się zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych kryształów lodu (Watson, 2000). Wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia, zjawisko wzmożonej peroksydacji lipidów wraz z następującym niekontrolowanym formowaniem się reaktywnych form tlenu (RTF), skutkuje zmniejszeniem aktywności łańcucha oddechowego, spadkiem ilości wytwarzanego ATP, a tym samym obniżeniem ruchliwości plemników (Thomas i wsp., 1998; Awda i wsp., 2009; Waberski i wsp., 2011). Ponadto wykazano, że zmiany indukowane procesem kriokonserwacji zbliżone są do modyfikacji mających miejsce w gametach w czasie fizjologicznego procesu kapacytacji (Bailey i wsp., 2000; Flores i wsp., 2008)

U wszystkich gatunków zwierząt obserwuje się uszkodzenie od około 40 do 50% plemników w czasie procesu kriokonserwacji (Watson, 2000). W przypadku bydła mlecznego współczynnik zapłodnień nasieniem mrożonym jak i świeżym kształtuje się na podobnym poziomie, jednak należy uwzględnić wyższą liczbę plemników w dawce inseminacyjnej nasienia kriokonserwowanego (Vishwanath i Shannon, 2000). Natomiast u suk inseminowanych nasieniem mrożonym obserwuje się zdecydowanie niższy odsetek zapłodnień, niż w przypadku zastosowania nasienia świeżego, bądź poddanego konserwacji w stanie płynnym. Zjawisko to wiąże się przede wszystkim z krótką przeżywalnością rozmrożonych komórek rozrodczych, zaburzeniami sprawności metabolicznej oraz znacznym obniżeniem ruchliwości plemników (Schäfer-Somi i wsp., 2006). Ponadto, skuteczność inseminacji ograniczona jest w znacznym stopniu długim okresem rui oraz owulacji samic (Linde-Forsberg i Forsberg, 1989).

Ocena parametrów ruchliwości odzwierciedlająca zdolność zapładniającą gamet stosowana jest rutynowo w przypadku nasienia świeżego w celu określenia przydatności do procesu kriokonserwacji oraz w nasieniu rozmrożonym pozwalając na ocenę dawki inseminacyjnej (Aitken i wsp. 1985; Nöthling i wsp., 1997)

Zarówno w przypadku zwierząt gospodarskich jak i psa wykazano statystycznie istotne obniżenie odsetka plemników charakteryzujących się ruchem postępowym w nasieniu poddanemu procesowi kriokonserwacji w porównaniu do nasienia świeżego (Rasul i wsp., 2001; Peña i wsp., 2003; Ortega i wsp., 2009)

Ocena ruchliwości plemników uzyskana metodą mikroskopową nie są w pełni wiarygodna, charakteryzuje się niewielką powtarzalnością, zróżnicowanymi rezultatami oraz może być obarczona subiektywizmem osoby przeprowadzającej analizę (Tejerina i wsp., 2008; Lammers i wsp., 2013). Wyeliminowanie powyższych niedogodności, umożliwiło wprowadzenie komputerowo wspomaganą ocenę jakości nasienia (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA). System ten pozwala na przeprowadzanie obiektywnej, szybkiej, a zarazem precyzyjnej analizy obejmującej ocenę m.in.

odsetka plemników ruchliwych oraz odsetka komórek charakteryzujących się ruchem postępowym. Niemniej jednak, w przypadku monitorowania jakości nasienia po rozmrożeniu, ocena parametrów ruchliwości jest niewystarczająca do określenia zmian na poziomie strukturalnym i biochemicznym komórek.

Techniki barwienia z wykorzystaniem fluorochromów pozwalają na precyzyjne określenie m.in. integralności błon komórkowych. Obecnie, zarówno w przypadku człowieka jak i zwierząt powszechnie stosuje się metodę opartą na kombinacji dwóch barwników: SYBR-14 oraz jodku propidyny (PI) (Garner i Johnson, 1995). Dodatkowo, jednoczesna ocena integralności błon plazmatycznych oraz sprawności funkcjonalnej mitochondriów możliwa jest dzięki wykorzystaniu dwóch fluorochromów JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide) oraz PI (Thomas i wsp., 1998). Monitorowanie potencjału transbłonowego mitochondriów jest niezwykle istotne z uwagi na funkcje pełnione przez te organella. Ich charakterystyczna lokalizacja wzdłuż wstawki, sprawia, że generowana przez nie energia w postaci ATP wykorzystywana jest do ruchu postępowego plemników, aktywnego transportu substratów przez błony, a także w procesie kapacytacji, reakcji akrosomowej oraz hyperaktywacji plemników (Gadella i wsp., 2001, Piasecka 2004a, Piasecka 2004b, Skalska i wsp., 2006). Obserwowane obniżenie odsetka plemników z aktywnymi mitochondriami może być związane ze zmianą przepuszczalności błon plazmatycznych, co z kolei może negatywnie wpływać na utrzymanie wysokiego potencjału transbłonowego mitochondriów (Kumaresan i wsp., 2008). Wprowadzenie kolejnego barwnika (PI) umożliwia dodatkowo jednoczesną ocenę sprawności metabolicznej oraz integralności plazmolemy komórek. Do obniżenia stężenia ATP może dochodzić m.in. na drodze zakłóceń w transporcie elektronów na łańcuch oddechowy w procesie fosforylacji oksydacyjnej, które wywoływane są powstającymi w nadmiarze reaktywnymi formami tlenu (Guthrie i wsp., 2008). Pomiar zawartości ATP może dostarczać cennych informacji o jakości biologicznej nasienia poddanego procesowi kriokonserwacji.

Wysoka zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, ang. polyunsaturated fatty acids) w fosfolipidach błonowych plemników ssaków, czyni je wyjątkowo wrażliwymi na proces peroksydacji lipidów (Alvarez i Storey, 1995). Męskie komórki rozrodcze zdolne są do generowania reaktywnych form tlenu (RTF), które w niskich stężeniach odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych (Bansal i Bilaspuri, 2010). Niemniej jednak, w przypadku nadmiernego formowania się RTF oraz zaburzeń układu antyoksydacyjnego, może dochodzić do powstania zjawiska stresu oksydacyjnego (Guthrie i Welch, 2012). Proces ten przyczynia się do obniżenia płynności błon, zmian ich struktury, czy wzrostu przepuszczalności jonów (Agarwal i wsp., 2014; Aitken i wsp., 2014). Ponadto, zwiększona ekspozycja plemników na RFT jest jedną z przyczyn obniżenia ich ruchliwości, najprawdopodobniej w skutek gwałtownego obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia ATP (Rivlin i wsp., 2004; Yang i wsp., 2006; Awda i wsp., 2009). Utrzymanie prawidłowej homeostazy komórek

zależne jest w dużej mierze od prawidłowo funkcjonującego systemu antyoksydacyjnego zarówno w plazmie nasienia jak i plemnikach, którego podstawowymi elementami są zarówno enzymy wykazujące aktywność antyoksydacyjną oraz niskocząsteczkowe antyoksydanty. Połączenie obserwacji podstawowych parametrów biologicznych plemników wraz z określeniem aktywności enzymów o działaniu antyoksydacyjnym takich jak katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) oraz dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) pozwala na wielopłaszczyznowe monitorowanie zmian wywołanych procesem kriokonserwacji.

Szczegółowa analiza jakości plemników jest niezbędna m.in. w celu oceny przydatności dodatku komponentów do rozcieńczalników stosowanych w technologii zamrażania oraz rozmrażania nasienia. Doskonalenie stosowanych technologii kriokonserwacji nasienia buhaja oraz psa, mających na celu poprawę ruchliwości oraz żywotności komórek rozrodczych po rozmrożeniu jest przedmiotem większości moich prac badawczych, w tym również przedstawionych jako szczególne osiągnięcie naukowe.

W celu poprawy ruchliwości komórek rozrodczych stosuje się dodatek m.in. stymulantów ruchliwości takich jak mtyloksantyny. Kofeina (CAF) oraz pentoksyfilina (PTX), będące konkurencyjnymi oraz nieselektywnymi inhibitorami fosfodiesterazy cyklicznego monofosforanu adenozy (cAMP) zwiększają wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP powodując wzrost fosforylacji tyrozyny w regionie wtyki plemnika, co wzmacnia ich ruchliwość (Estevez i wsp., 2007, Brie i wsp., 2016). Ponadto wykazano, że PTX posiada zdolność hamowania czynnika martwicy nowotworu α (TNF α) odpowiedzialnego za fragmentację DNA oraz apoptozę – programowaną śmierć komórki. Dodatkowo wykazano, że dodatek pentoksyfiliny redukuje wytwarzanie anionów ponadtlenkowych oraz ogranicza proces peroksydacji lipidów (Peeker et al., 1997; Mundle et al., 1999; Zhang et al., 2005). Do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP może dochodzić również w przebiegu innego molekularnego mechanizmu. Wykazano, że dodatek 2'-deoksyadenozy (DAX), analogu adenozy ze zmodyfikowanym pierścieniem rybozy, prowadzi do aktywacji cykazy adenylationowej, pośrednio poprzez receptor A2 (Milani i wsp., 2010).

Pozytywny wpływ na szereg właściwości biologicznych plemników poddanych zarówno konserwacji w stanie płynnym jak i technologii zamrażania wykazano stosując suplementację acetylowanym glicerofosfolipidem – płytkowym czynnikiem aktywującym (PAF - platelet activating factor) (1-alkilo-2-acetylo-sn-glicerolo-3-fosfocholina). Ten naturalnie występujący glicerofosfolipid błonowy odgrywa ważną rolę w procesach reprodukcyjnych, zarówno w męskim, jak i żeńskim układzie rozrodczym (Kordan i wsp., 2003). Wykazano między innymi jego pozytywny wpływ na aparat ruchu plemników (Odeh i wsp., 2003; Kordan i Strzeżek, 2006; Kheradmand i wsp., 2009; Kordan i wsp., 2009; Kordan i wsp., 2010). Synteza PAF odbywa się w różnych typach aktywowanych komórek, głównie w bazofilach, neutrofilach, monocytach, makrofagach oraz komórkach śródbłonna (Roudebush i wsp.

2002). Ponadto wykazano jego obecność w plemnikach człowieka (Minhas i wsp., 1991), innych naczelnych (Roudebush i Mathur 1998; Diaz i wsp., 1999; Roudebush i wsp., 2002) oraz zwierząt gospodarskich (Kumar i wsp., 1988; Hough i Parks, 1994; Roudebush i Diehl, 2001).

Równowaga między generowaniem reaktywnych form tlenu, a aktywnością układu antyoksydacyjnego umożliwia zachowanie homeostazy w układach biologicznych. Niekontrolowane wytwarzanie RFT w czasie procesu kriokonserwacji znacząco obniża jakość nasienia (Stradioli i wsp., 2007). Zatem utrzymanie wysokiego potencjału antyoksydacyjnego w nasieniu może w istotny sposób wpływać na ruchliwość, metabolizm energetyczny plemników oraz ich żywotność, skutkując zachowaniem zdolności wiązania męskich komórek rozrodczych do osłony przejrzystej oocytów. Poza enzymami o działaniu antyoksydacyjnym, niezwykle istotną rolę w przeciwdziałaniu szkodliwego wpływu wolnych rodników przypisuje się niskocząsteczkowym antyoksydantom występującym w nasieniu ssaków, m.in. witaminie E oraz C. Rozpuszczalna w tłuszczach witamina E, hamuje efekt peroksydacji lipidów poprzez eliminację wolnych rodników m.in. nadtlenukowych (ROO•) czy alkoksylowych (RO•) (Asadpour i wsp., 2011; Pour i wsp., 2013). Natomiast kwas askorbinowy działa jako kluczowy kofaktor w procesach hydroksylacji oraz amidacji (Huang i wsp., 2005). Obydwa niskocząsteczkowe antyoksydanty uczestniczą ponadto w syntezie kolagenu, proteoglikanów i komponentów macierzy wewnątrzkomórkowej (Hosen i wsp., 2012; Singh i wsp., 2015).

Doskonalenie technologii kriokonserwacji należy rozpatrywać na różnych płaszczyznach ze względu na mnogość czynników przyczyniających się do kriouszkodzeń, a także gatunkowej zmienności różnicującej nasienie pod względem przydatności do zamrażania. Jedynie kompleksowa analiza nasienia może dać wiarygodną ocenę zastosowanych dodatków mających na celu poprawę zdolności zapładniającej męskich komórek rozrodczych poddanych kriokonserwacji.

Ogólnym celem badań w ramach prezentowanego cyklu publikacji, przewidywanych jako osiągnięcie naukowe w procedurze habilitacji, było określenie wpływu dodatku wybranych stymulatorów ruchliwości i niskocząsteczkowych antyoksydantów na parametry jakościowe oraz biochemiczne kriokonserwowanego nasienia buhaja i psa.

5.2 OMÓWIENIE WYNIKÓW PRAC WSKAZANYCH JAKO SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

5.2.1. Lecewicz M., Hering D.M., Kamiński S., Majewska A., Kordan W. 2015. Selected qualitative and biochemical parameters of cryopreserved semen of Holstein-Friesian (HF) AI bulls. Pol. J. Vet. Sci., 18 (1): 237-239.

Cel pracy, wraz z uzasadnieniem potrzeby badań

Sztuczna inseminacja (AI) z zastosowaniem nasienia kriokonserwowanego jest dominującą metodą stosowaną w rozrodzie bydła mlecznego. O skuteczności programów hodowlanych decyduje wiele czynników, obejmujących m.in. potencjał genetyczny, uwarunkowania fizjologiczne, odpowiednie żywienie oraz utrzymanie zwierząt. Nie mniej jednak gwarantem sukcesu procedury inseminacji jest nasienie wysokiej jakości (Walsh i wsp., 2011). Technologia kriokonserwacji powoduje wiele zmian zarówno na poziomie strukturalnym jak i funkcjonalnym plemników. Rutynowym badaniem nasienia w celu oceny jego przydatności do inseminacji jest ruchliwość plemników. Jednak mając na uwadze wielopoziomowość kriouszkodzeń, szczegółowa analiza parametrów jakości nasienia wydaje się być niezbędna w celu monitorowania zmian indukowanych procesami zamrażania oraz rozmrażania, a także potwierdzeniem rzetelności testów stosowanych w ocenie dawek inseminacyjnych.

Celem prezentowanej pracy była analiza wybranych parametrów jakościowych oraz biochemicznych nasienia buhajów rasy Holsztyńsko – Fryzyjskiej (HF), ze szczególnym uwzględnieniem ruchliwości plemników, aktywności metabolicznej gamet, stanu błon plazmatycznych oraz statusu enzymatycznego układu antyoksydacyjnego.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 120 ejakulatów buhajów rasy HF pochodzących ze Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt sp. z o. o. w Bydgoszczy. Analizę parametrów ruchliwości plemników przeprowadzono przy użyciu systemu CASA (VideoTest Sperm 2.1, St. Petersburg, Russia). Oceny integralności błon plazmatycznych komórek rozrodczych dokonano z wykorzystaniem kombinacji dwóch fluorochromów: SYBR-14 oraz PI (Fraser et al. 2002). Natomiast, do określenia aktywności mitochondriów plemników wykorzystano barwniki JC-1/PI (Thomas i wsp., 1998). Oznaczenie zawartości ATP przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta (Roche Molecular Biochemical, Bioluminescence Assay Kit CLSII). Ponadto, określono aktywność enzymów antyoksydacyjnych – SOD, CAT oraz GPx zgodnie z metodą podaną przez Koziorowską–Gilun i wsp. (2013). Dodatkowo wykonano analizę fragmentacji DNA zgodnie z procedurą opisaną przez Fraser i Strzeżek (2005), a wyniki przedstawiono jako DFI (DNA Fragmentation Index). Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Statistica 10 (StatSoft).

Rezultaty badań wraz z interpretacją

Zgodnie ze standardami Unii Europejskiej, w przypadku buhaja, odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu powinien wynosić 50%. Rezultaty naszych badań wykazały, że ruchliwość plemników

rozrożonych kształtowała się na poziomie $62,51 \pm 6,94$ %. Ponadto, analizowane próby nasienia charakteryzowały się wysokim odsetkiem plemników o ruchu progresywnym (PMOT, $21,46 \pm 6,51$ %), co może świadczyć o odpowiedniej, wysokiej jakości komórek rozrodczych, niezbędnej do przeprowadzenia skutecznego zapłodnienia. Dodatkowo, uzyskane wyniki potwierdzają również otrzymane wartości pozostałych parametrów kinematycznych plemników, które kształtowały się następująco: VCL ($55,47 \pm 6,77$ $\mu\text{m/s}$), VSL ($27,92 \pm 4,99$ $\mu\text{m/s}$), STR ($88,64\% \pm 3,56$ %), LIN ($49,52 \pm 2,89$ %). Natomiast niskie wartości ALH oraz BCF, wynoszące odpowiednio $1,20 \pm 0,15$ μm oraz $7,62 \pm 0,24$ Hz, mogą wskazywać brak hyperaktywacji plemników, a tym samym na ich wysoką zdolność zapładniającą. O dobrej jakości analizowanego nasienia świadczą również: wysoki odsetek plemników o integralnej plazmolemie ($72,21 \pm 2,72$ %) oraz aktywnych mitochondriach ($71,32 \pm 1,85$ %). Stężenie ATP kształtowało się na poziomie ($15,59 \pm 2,16$ nmol/ 1×10^8 komórek), co wskazuje na wysoką aktywność metaboliczną analizowanych prób. Uzyskane wyniki dotyczące aktywności enzymów antyoksydacyjnych CAT ($2847,83 \pm 420,57$ U/ 1×10^9 komórek), GPx ($494,37 \pm 138,52$ U/ 1×10^9 komórek) oraz SOD ($5,31 \pm 1,04$ U/ 1×10^9 komórek) świadczą o wydajnym systemie antyoksydacyjnym badanego nasienia, co dodatkowo znajduje swoje potwierdzenie w niskim indeksie DFI. W podsumowaniu należy stwierdzić, że dodatkowe analizy laboratoryjne są niezbędne w celu dokładnej oceny właściwości kriokonserwowanego nasienia buhaja. Ponadto, uzyskane wyniki wskazały na wysoką zdolność zapładniającą badanych prób nasienia oraz możliwość wykorzystania przedstawionych analiz do oceny plemników kriokonserwowanych, charakteryzujących się obniżoną żywotnością. Prezentowane rezultaty stanowią podstawę do dalszych badań opisanych poniżej.

5.2.2. Lecewicz M., Kordan W., Majewska A., Kamiński S., Dziekońska A., Mietelska K. 2016. Effects of the platelet-activating factor (PAF) on selected quality parameters of cryopreserved bull semen (AI) with reduced sperm motility. Pol. J. Vet. Sci., 19 (1): 147-158.

Cel pracy, wraz z uzasadnieniem potrzeby badań

Ruchliwość plemników jest podstawowym parametrem nasienia analizowanym w centrach inseminacji. Wielu autorów dowodzi, że procent plemników ruchliwych jest wyznacznikiem integralności błon plazmatycznych komórek rozrodczych, a także ich aktywności metabolicznej (Johnson i wsp., 2000, Estienne i wsp., 2007, Kaeoket i wsp., 2010).

Zarówno w przypadku człowieka jak i wielu gatunków zwierząt zaobserwowano pozytywny efekt dodatku egzogenego PAF do nasienia konserwowanego w stanie płynnym oraz poddanego technologii kriokonserwacji. Wykazano korzystny wpływ omawianego glicerofosfolipidu na ruchliwość plemników, integralność plazmolemy, pojemność oraz reakcję akrosomową (Aravindakshan i Sharma,

1996; Roudebush i wsp., 2002; Odeh i wsp., 2003; Kordan i Strzeżek 2006; Kordan i wsp., 2009; Kheradmand i wsp., 2009; Kordan i wsp., 2010; Esmailpour i wsp., 2014).

Reinhardt i wsp. (1999) oraz Roudebush i wsp. (2000) stwierdzili obecność receptorów PAF na powierzchni plazmolemy plemników człowieka. Autorzy wykazali, że wiązanie PAF z jego białkowym receptorem błonowym aktywuje system fosfolipazy C, powodując uwolnienie wtórnych przekaźników – pochodnych fosfatydyloinozytolu – odpowiedzialnych za wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} (Lapetina i wsp., 1982). Wymienione procesy prowadzą do depolimeryzacji sieci włókien aktynowych i aktywacją fosfolipaz, czego wynikiem jest wzmożona ruchliwość plemników (Roudebush i wsp., 2000).

Celem prezentowanej pracy, w pierwszym etapie badań było określenie optymalnego stężenia dodatku egzogenego PAF, wywierającego pozytywny efekt na podstawowe parametry jakościowe rozmrożonego nasienia buhaja. Następnie analizowano wpływ dodatku wybranej koncentracji PAF na ruchliwość plemników, stan błon plazmatycznych oraz sprawność funkcjonalną mitochondriów w próbach nasienia kriokonserwowanego buhajów charakteryzujących się obniżoną ruchliwością plemników.

Materiał i metody

W celu określenia pożądanego stężenia PAF wykorzystano 10 ejakulatów buhajów pochodzących ze Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt sp. z o. o. w Bydgoszczy. Rozmrożone nasienie suplementowano następującymi koncentracjami glicerofosfolipidu: $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-7}M$, $1 \times 10^{-8}M$ oraz $1 \times 10^{-9}M$. Kontrolę stanowiło nasienie bez dodatku PAF. Oceny parametrów (ruchliwość plemników, integralność błon oraz aktywność mitochondriów) dokonywano w różnych przedziałach czasowych : 0, 30, 60, 90 oraz po 120 minutach inkubacji. Analizę ruchliwości plemników przeprowadzono przy użyciu systemu CASA (VideoTesT Sperm 2.1, St. Petersburg, Russia). Analizy integralności błon plazmatycznych komórek rozrodczych dokonano z wykorzystaniem kombinacji dwóch fluorochromów: SYBR-14/PI (Live/Dead Sperm Viability Kit; Molecular Probes) wg metody Garner i Johnson (1995), z modyfikacjami własnymi, natomiast do określenia aktywności mitochondriów plemników wykorzystano barwniki JC-1 (Molecular Probes, Eugene, USA) oraz PI (Molecular Probes, Eugene, USA), zgodnie z metodą opisaną przez Thomas i wsp. (1998) z modyfikacjami (Dziekońska i wsp., 2009). Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Statistica 10 (StatSoft).

Rezultaty badań wraz z interpretacją

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że rozmrożone nasienie buhaja z dodatkiem PAF w koncentracji $1 \times 10^{-9} \text{M}$ charakteryzowało się najwyższym odsetkiem plemników ruchliwych niezależnie od czasu inkubacji. Uzyskane rezultaty zgodne są z wynikami badań przeprowadzonych przez Ricker i wsp. (1989), w których wykazano, że pięciominutowa inkubacja nasienia z dodatkiem syntetycznego PAF w koncentracjach od 10^{-7} do 10^{-13}M skutkowała istotnym wzrostem ruchliwości plemników człowieka, podczas gdy suplementacja glicerofosfolipidu w stężeniu 10^{-5}M prowadziła do natychmiastowej śmierci komórek.

Określenie optymalnej koncentracji PAF umożliwiło ocenę wpływu dodatku fosfolipidu na właściwości rozmrożonych plemników buhajów charakteryzujących obniżonymi parametrami ruchliwości, nie spełniającymi kryteriów przyjętych przez centra inseminacyjne. Analiza ruchliwości wykazała statystycznie istotny wzrost odsetka plemników ruchliwych w próbach z dodatkiem optymalnego stężenia egzogenego PAF bez względu na czas inkubacji. Podobne wyniki uzyskano w przypadku odsetka komórek rozrodczych poruszających się ruchem liniowym oraz nieliniowym. Spośród pozostałych analizowanych parametrów kinematycznych zaobserwowano statystycznie istotny wzrost VSL. Podobne rezultaty zaobserwowano w badaniach przeprowadzonych przez Grassi i wsp. (2010). Autorzy wykazali, że nasienie przeznaczone do domacicznych inseminacji że w przypadku człowieka, charakteryzujące się obniżoną ruchliwością wykazywało istotnie wyższe parametry ruchliwości gamet po 60 minutowej inkubacji z $0,5 \mu\text{M}$ PAF.

Zarówno w pierwszej jak i drugiej części przeprowadzonych badań zaobserwowano pozytywny wpływ dodatku PAF na integralność błon plazmatycznych oraz aktywność mitochondriów. Podobne rezultaty uzyskano w przypadku kriokonserwowanego nasienia knura oraz psa (Kordan i wsp., 2009; Kordan i wsp., 2010).

Męskie komórki rozrodcze o nienaruszonej plazmolemie charakteryzują się wysokim potencjałem mitochondrialnym, którego utrzymanie na odpowiednio wysokim poziomie gwarantuje generowanie ATP, niezbędnego do zachowania ruchliwości plemników oraz ich zdolności zapładniających (Trzcińska i wsp., 2008; de Andrade i wsp., 2007).

Podsumowując, inkubacja rozmrożonego nasienia buhaja charakteryzującego się obniżoną ruchliwością z dodatkiem egzogenego PAF w stężeniu 10^{-9}M wywarła pozytywny wpływ na jakość analizowanego nasienia. Poza wzrostem ruchliwości plemników, odnotowano poprawę parametrów kinematycznych plemników, a także zwiększoną stabilność błon plazmatycznych.

5.2.3. Lecewicz M., Kordan W., Kamiński S., Majewska A.M., Strzeżek R. 2017. Effect of platelet-activating factor (PAF) supplementation in semen extender on ATP content of cryopreserved bull spermatozoa (AI). Pol. J. Vet. Sci. 20: 421-423.

Cel pracy, wraz z uzasadnieniem potrzeby badań

Wykazano, że płytkowy czynnik aktywujący pełni istotną rolę zarówno w męskim, jak i żeńskim układzie rozrodczym (Kordan i wsp., 2003; Bosch i wsp., 2009). Wskazuje się na jego szczególną rolę w utrzymaniu sprawności metabolicznej plemników (Odeh i wsp., 2003; Kordan i Strzeżek, 2006; Kheradmand i wsp., 2009; Kordan i wsp., 2009; Kordan i wsp., 2010). Prezentowana praca, jest kontynuacją poprzednich badań, dotyczących oceny wpływu dodatku PAF na wybrane parametry jakościowe kriokonserwowanego nasienia buhaja (Lecewicz i wsp., 2016).

Celem badań było określenie wpływu suplementacji oraz czasu inkubacji rozmrożonego nasienia buhaja z egzogennym PAF na zawartość ATP w plemnikach.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiło kriokonserwowane nasienie 10 buhajów pochodzących ze Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt sp. z o. o. Rozmrożone nasienie o koncentracji 20×10^6 plemników/cm³ inkubowano przez 0, 30, 60, 90 oraz 120 minut z dodatkiem różnych stężeń PAF: 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M oraz 1×10^{-9} M, w temperaturze 37°C. Oznaczenie zawartości ATP przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta (Roche Molecular Biochemical, Bioluminescence Assay Kit CLSII). Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Statistica 10 (StatSoft). Różnice między średnimi wartościami rozpatrywano jako istotne na poziomie $p \leq 0,05$.

Rezultaty badań wraz z interpretacją

Obecnie ruchliwość plemników jest nadal podstawowym parametrem charakteryzującym jakość nasienia. Istotny wpływ na jej utrzymanie ma zawartość wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, którego odpowiedni poziom zapewnia proces glikolizy zachodzący w cytoplazmie plemników oraz fosforylacja oksydacyjna przebiegająca w mitochondriach (Ford, 2006). W prezentowanej pracy wykazano istotnie wyższe ($p \leq 0,05$) stężenie ATP w nasieniu z dodatkiem PAF o koncentracji 1×10^{-9} M po 90 oraz 120 minutach inkubacji w porównaniu do grupy kontrolnej. Zastosowanie optymalnego stężenia fosfolipidu wpłynęło również na utrzymanie odpowiedniej ruchliwości plemników w kriokonserwowanym nasieniu buhaja (Lecewicz i wsp., 2016), knura (Kordan i wsp., 2009), czy ogiera (Odeh i wsp., 2003).

W podsumowaniu należy stwierdzić że, szczególną uwagę należy zwrócić na rejon wstawkowy plemnika, strukturę bogatą w mitochondria, zaangażowaną w utrzymanie ruchliwości męskich komórek rozrodczych. Potencjalny pozytywny wpływ płytkowego czynnika aktywującego na wzrost

stężenia ATP w kriokonserwowanym nasieniu, może być powodowany ochronną rolą fosfolipidu w przebiegu procesów związanych z aktywnością metaboliczną mitochondriów.

5.2.4. Lecewicz M., Strzeżek R., Kordan W. Majewska A.M. 2018. The effect of extender supplementation with low-molecular - weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. J. Vet. Res. 62 (2): 221-227.

Cel pracy, wraz z uzasadnieniem potrzeby badań

Nowoczesne technologie kriokonserwacji nasienia psa dają możliwość przekazywania pożądanego materiału genetycznego od najbardziej cennych reproduktorów, ponadto przyczyniają się do podtrzymania rzadkich ras psów, czy umożliwiają wzmocnienie pożądanых cech behawioralnych m.in. u psów pomocników oraz psów ratowników (Silva i wsp., 2002; Ogata i wsp., 2015).

Każdy z etapów technologii kriokonserwacji, w tym rozrzedzenie, schładzanie, zamrażanie oraz proces rozmrażania prowadzi do obniżenia zdolności zapładniającej nasienia wykorzystywanego do zabiegu sztucznej inseminacji (Asadpour i wsp., 2011; Pour i wsp., 2013). Utrzymanie odpowiedniej wartości biologicznej plemników ssaków utrudnione jest głównie przez wysoką zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w fosfolipidach błonowych komórek, które czynią je wysoce wrażliwymi na uszkodzenia peroksydacyjne (Hamedani i wsp., 2016). Niskie stężenia wolnych rodników generowanych w łańcuchu oddechowym są niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych w plemnikach. Jednakże, w wyniku procesu kriokonserwacji dochodzi do podniesienia poziomu reaktywnych form tlenu, zakłócających równowagę między ilością wolnych rodników, a systemem antyoksydacyjnym komórek rozrodczych, prowadząc do powstania zjawiska stresu oksydacyjnego (Guthrie i Welch, 2012). Nadmierna ekspozycja plemników na działanie RFT skutkuje utratą integralności plazmolemy, niekontrolowanym spadkiem stężenia ATP oraz uszkodzeniem aksonemy. W konsekwencji dochodzi m.in. do wycieku enzymów wewnątrzkomórkowych, utraty ruchliwości czy fragmentacji DNA, a w rezultacie do obniżenia zdolności zapładniającej komórek (Aitken i Baker 2006; Chi i wsp., 2008; Petruska i wsp., 2014).

Reaktywne formy tlenu mogą być neutralizowane dzięki obecności enzymów antyoksydacyjnych takich jak SOD, GPX oraz CAT. Ponadto, w mechanizm obrony przeciw skutkom peroksydacji lipidów zaangażowany jest system nieenzymatyczny, w skład którego wchodzi m.in. tioredoksyna oraz glutation, molekuly zawierające grupy tiolowe, a także witaminy E, C oraz D (Zeitoun i wsp., 2015). W przypadku człowieka oraz kilku gatunków ssaków prowadzono badania dotyczące suplementacji rozrzedzalnika niskocząsteczkowymi antyoksydantami w celu przeciwdziałania skutkom

stresu oksydacyjnego w nasieniu poddanemu procesowi kriokonserwacji (Peña i wsp., 2003; Michael i wsp., 2007; McCarthy i Meyers 2011; Rossi i wsp., 2016).

Celem prezentowanej pracy było określenie wpływu dodatku różnych koncentracji niskocząsteczkowych antyoksydantów (Trolox, kwas L-askorbinowy), a także ich kombinacji do rozrzedzalnika na wybrane parametry jakościowe kriokonserwowanych plemników psa.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły frakcje plemnikowe ejakulatów kolekcjonowanych raz w tygodniu przez okres 8 tygodni od 4 psów mieszańców. Próby nasienia charakteryzujące się odsetkiem plemników ruchliwych na poziomie wyższym niż 80% oraz koncentracją powyżej 200×10^6 plemników na 1cm^3 przeznaczano do dalszych analiz. Procedurę zamrażania nasienia przeprowadzano zgodnie z metodą podaną przez Niżański i wsp. (2001) z modyfikacjami własnymi.

Rozrzedzone nasienie suplementowano rozpuszczalną w wodzie witaminą E (Trolox, kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowego, Sigma Chemical Co, USA) oraz kwasem L-askorbinowym (Sigma Chemical Co, USA). W badaniach analizowano następujące warianty rozcieńczalników: 1) kontrolny – brak suplementacji; 2) z dodatkiem witaminy E w stężeniu $400\mu\text{M}/1 \times 10^8$ plemników; 3) z dodatkiem witaminy C w stężeniu $200\mu\text{M}/1 \times 10^8$ plemników; 4) z dodatkiem kombinacji witamin C oraz E, odpowiednio $200 + 400\mu\text{M}/1 \times 10^8$ plemników; 5) kombinacji witamin C i E, odpowiednio $200 + 200\mu\text{M}/1 \times 10^8$ plemników. Wybrane parametry jakościowe plemników takie jak, ruchliwość, integralność plazmolemy oraz status funkcjonalny mitochondriów oznaczano po 0, 60 oraz 120 minutach inkubacji w różnych wariantach rozcieńczalnika. Oceny ruchliwości plemników dokonywano z zastosowaniem systemu IVOS – sperm analyser wersja 12.3 (Hamilton-Thorne Biosciences, USA). Integralność plazmolemy oraz funkcje mitochondriów analizowano z zastosowaniem barwników fluorescencyjnych, stosując kombinację fluorochromów, odpowiednio: SYBR-14/ PI (Live/Dead Sperm Viability Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) oraz JC-1 (Molecular Probes, USA)/PI (Sigma Chemical Co., USA). Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu pakietu statystycznego Statistica (StatSoft).

Rezultaty badań wraz z interpretacją

Równowaga między generowaniem reaktywnych form tlenu a aktywnością systemu antyoksydacyjnego, zarówno enzymatycznego jak i nieenzymatycznego, determinuje utrzymanie homeostazy w układach biologicznych. Nadmierna produkcja wolnych rodników indukowana procesem kriokonserwacji prowadzi do obniżenia jakości nasienia (Stradaoli i wsp., 2007). Zachowanie

wysokiego potencjału antyoksydacyjnego w próbach rozmrożonego nasienia, może przyczynić się do poprawy ruchliwości komórek, ich żywotności oraz zdolności do wiązania się z osłoną przejrzystą oocytów.

W prezentowanych badaniach, bez względu na zastosowane stężenie oraz czas inkubacji, nie wykazano istotnego wpływu dodatku Troloxu na analizowane parametry. Niemniej jednak wykazano wyższy odsetek plemników ruchliwych oraz komórek charakteryzujących się ruchem liniowym w porównaniu do próby kontrolnej. Zbliżone wyniki uzyskano w przypadku człowieka, stosując suplementację witaminą E ($40\mu\text{mol/L}$) (Sahib i wsp., 2016). W przypadku kriokonserwowanego nasienia knura, wykazano pozytywny wpływ dodatku omawianego niskocząsteczkowego antyoksydantu na ruchliwość plemników, integralność plazmolemy oraz status mitochondriów w różnych frakcjach ejakulatów (Peña i wsp., 2003; Peña i wsp., 2004). Natomiast w przypadku świeżego nasienia knura, a także przechowywanego w stanie płynnym z dodatkiem α -tokoferolu odnotowano statystycznie istotny wzrost wszystkich parametrów kinematycznych (Jeong i wsp., 2009). Zeitoun i Al-Damegh (2015) wykazali, że w przypadku tryka, optymalne parametry nasienia rozmrożonego obserwuje się przypadku dodatku witaminy E nie przekraczającej ilości 5IU/cm^3 .

Należy nadmienić, iż zastosowane w eksperymencie stężenie witaminy E mogło suboptymalnie wpłynąć na analizowane parametry kriokonserwowanego nasienia psa.

W porównaniu do kontroli, zaobserwowano statystycznie istotnie wyższy odsetek plemników ruchliwych stosując dodatek witaminy C ($200\mu\text{M}/1\times 10^9$ plemników) w korelacji z szybkim czasem rozmrażania, co może mieć związek z mniejszą ekspozycją komórek na peroksydację lipidów. Podobne wyniki uzyskano w przypadku psa (Wittayarat i wsp., 2012), buhaja (Stolbov i Rimanova, 1984; Raina i wsp., 2002; Stradaoli i wsp., 2007; Singh i wsp., 2015) oraz tryka (Azawi i Hussein, 2013). Verma i Kanwar (1999) odnotowali pozytywny wpływ dodatku kwasu L-askorbinowego (800mmol/L) na ruchliwość plemników człowieka. Paradoksalnie, autorzy wykazali, że suplementacja rozrzedzalnika omawianym antyoksydantem w dawce powyżej 1000mmol/L przyczyniała się do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu oraz obniżenia odsetka komórek ruchliwych. Należy podkreślić, że bez względu na czas inkubacji rozmrożonego nasienia z dodatkiem kombinacji witamin C oraz E ($200 + 200\mu\text{M}/1\times 10^9$ plemników) odnotowano statystycznie istotnie ($P\leq 0,05$) wyższy odsetek plemników ruchliwych. Natomiast po 60 oraz 120 minutach inkubacji obserwowaliśmy istotnie wyższy ($p\leq 0,05$) odsetek komórek charakteryzujących się integralną plazmolemą oraz aktywnymi mitochondriami. Podobne rezultaty obserwowano w przypadku knura oraz buhaja (Varo i wsp., 2010; Mittal i wsp., 2014).

Podsumowując, wyniki naszych badań wskazują, że dodatek kombinacji niskocząsteczkowych antyoksydantów (witamina C + E; $200 + 200\mu\text{M}/1\times 10^9$ plemników) w optymalny sposób wpłynął zarówno na całkowitą ruchliwość plemników, odsetek komórek rozrodczych wykazujących ruch

liniowy, a także pozostałe analizowane parametry, jak integralność błon plazmatycznych oraz aktywność mitochondriów, w porównaniu do suplementacji nasienia pojedynczymi badanymi składnikami. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wskazują na synergistyczne działanie witaminy E oraz kwasu L-askorbinowego.

5.2.5. Lecewicz M., Strzeżek R., Majewska A.M., Purpurowicz P.S., Kordan W. 2019. The effect of different concentrations of caffeine, pentoxifylline and 2'-deoxyadenosine on the biological properties of frozen-thawed canine semen. Ann. Anim. Sci. DOI: 10.2478/aoas-2019-0025.

Cel pracy, wraz z uzasadnieniem potrzeby badań

W ostatnim okresie obserwuje się stale rosnące zainteresowanie wykorzystaniem kriokonserwowanego nasienia psa (Jewgenow i wsp., 2017; Lucio i wsp., 2017). Poza zabezpieczeniem cennego materiału genetycznego najlepszych reproduktorów, proces kriokonserwacji umożliwia transport nasienia na duże odległości, obniżając koszty przewozu zwierząt oraz eliminując zagrożenia z tym związane (Comizzoli i wsp., 2009; Belala i wsp., 2016; Lucio i wsp., 2017). Nasienie psa charakteryzuje się względnie niską odpornością na mrożenie, co skutkuje obniżeniem jego jakości biologicznej po rozmrożeniu oraz zmniejszoną zdolnością zapładniającą plemników (Alhaider i Watson, 2009). Utrata ruchliwości, integralności błon plazmatycznych, zmiany w strukturze akrosomu czy uszkodzenia DNA plemników, towarzyszą procesowi kriokonserwacji (Kim, Yu i Kim 2010; Karger i wsp., 2016). Obecność powyższych zmian wymaga wyeliminowania, bądź zmniejszenia skutków niekorzystnych czynników towarzyszących procesom mrożenia oraz rozmrażania. Optymalizacja technologii mrożenia dotyczy m.in. dodatku substancji stymulujących ruchliwość plemników. Do najczęściej stosowanych stymulatorów ruchliwości komórek zaliczmy metyloksantyny, kofeinę oraz pentoksyfilinę, a także 2'-deoksyadenozynę, analog adenozyne ze zmodyfikowanym pierścieniem rybozy.

Celem prezentowanych badań było określenie wpływu suplementacji kriokonserwowanego nasienia psa stymulatorami ruchliwości – kofeiną (CAF), pentoksyfiliną (PTX) oraz 2'-deoksyadenozyną (DAX) na wybrane parametry biologiczne plemników podczas dwugodzinnej inkubacji.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły frakcje plemnikowe ejakulatów kolekcjonowanych raz w tygodniu przez okres 10 tygodni od 4 psów mieszańców. Próby nasienia charakteryzujące się odsetkiem plemników ruchliwych na poziomie wyższym niż 80% oraz koncentracją powyżej 200×10^6 plemników

na 1cm³ kwalifikowano do dalszej części eksperymentu. Procedurę zamrażania nasienia przeprowadzano zgodnie z metodą podaną przez Niżański i wsp. (2001) z modyfikacjami własnymi. Rozmrożone nasienie suplementowano 1) z rozcieńczalnikiem TCF z dodatkiem kofeiny w stężeniach: 5mM, 10mM, 20mM; 2) rozcieńczalnikiem TCF z dodatkiem pentoksyfiliny w stężeniach 5mM, 10mM, 20mM; 3) rozcieńczalnikiem TCF z dodatkiem 2'-deoksyadenozyny w stężeniach 5mM, 10mM, 20mM. Wybrane parametry jakościowe nasienia, takie jak ruchliwość, parametry kinematyczne plemników, a także integralność błon plazmatycznych oraz aktywność mitochondriów analizowano w różnych przedziałach czasowych, tj. po 0, 60 oraz 120 minutach inkubacji komórek z różnymi wariantami rozcieńczalników. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem pakietu statystycznego Statistica (StatSoft).

Rezultaty badań wraz z interpretacją

Bez względu na dostępność zaawansowanych technik wspomaganego rozrodu, poddane kriokonserwacji nasienie charakteryzuje się obniżoną ruchliwością oraz żywotnością. W przypadku psa stosowano wiele wariantów rozcieńczalników oraz protokołów kriokonserwacji, niemniej jednak odsetek zapłodnień suk z użyciem mrożonego nasienia znajduje się na stale niezadawalającym poziomie (Uchoa i wsp., 2012; Rodenas i wsp., 2014; Johnson i wsp., 2014).

Uzyskane wyniki badań wykazały, że inhibitory fosfodiesterazy, zarówno kofeina jak i pentoksyfilina, a także 2'-deoksyadenozyna wpłynęły na wzrost odsetka plemników ruchliwych oraz wybrane wartości parametrów kinematycznych komórek w porównaniu do próby kontrolnej. Ponadto, wykazano, że dodatek badanych substancji w stężeniu 10mM wpłynął optymalnie na analizowane parametry nasienia. Podobne rezultaty odnotowali L'opez i Alvariño (2000) w przypadku królików. Autorzy, wykazali wzrost ruchliwości plemników przy zastosowaniu dodatku kofeiny w stężeniu 10mM, natomiast suplementacja w stężeniu 2,5 oraz 5mM nie przyniosła pożądanego efektu. W przypadku ogiera oraz knura optymalne stężenie CAF, pozytywnie wpływające na ruchliwość komórek, zawiera się w przedziale od 1 do 5mM, co może wskazywać na różnice gatunkowe dotyczące wrażliwości plemników na dodatek omawianego stymulantu (Stephens i wsp., 2013; Barakat i wsp., 2015). Prezentowane badania wykazały zbliżone wyniki dotyczące wpływu dodatku pentoksyfiliny w stężeniu 10mM na ruchliwość rozmrożonych plemników. Ponadto otrzymane rezultaty zgodne są z wynikami uzyskanymi przez Gradil i Ball (2010). Autorzy, wykazali pozytywny wpływ dodatku PTX (3,5mM oraz 7mM) do rozmrożonego nasienia ogiera na wzrost odsetka plemników ruchliwych oraz charakteryzujących się ruchem progresywnym. Banihani i wsp. (2016) zasugerowali, że stymulujący efekt pentoksyfiliny dotyczy wzmożonej produkcji energii, z uwagi na obserwowany wzrost aktywności kinazy kreatyninowej, enzymu katalizującego formowanie się ATP.

W dostępnej literaturze istnieje niewiele danych dotyczących wpływu dodatku 2'-deoksyadenozyny na parametry plemników rozmrożonych. Dla przykładu, w przypadku człowieka wykazano wzrost ruchliwości plemników na poziomie 21–39% oraz zmiany parametrów kinematycznych komórek przy zastosowaniu suplementacji DAX. Wyniki zbliżone do prezentowanych, uzyskał Milani i wsp. (2010). Autorzy, odnotowali pozytywny efekt dodatku DAX w stężeniu zarówno 5mM, jak i 7,5mM na parametry rozmrożonych plemników psa.

W prezentowanej pracy odnotowano zbliżony wpływ dodatku pentoksyfiliny oraz 2'-deoksyadenozyny na stan błon plazmatycznych plemników. Nieliczne doniesienia naukowe również wskazują pozytywną korelację między odsetkiem plemników o integralnej plazmolemie w przypadku zastosowania omawianych stymulantów ruchliwości (Ponce i wsp., 1999; Laokirkkiat i wsp., 2007).

W podsumowaniu należy zaznaczyć, że dodatek stymulatorów ruchliwości (CAF, PTX, DAX) istotnie wpłynął na ruchliwość rozmrożonych plemników psa oraz ich wybrane parametry kinematyczne. Ponadto, w przypadku CAF oraz PTX, wykazano, że optymalnym stężeniem wywołującym zamierzony efekt jest 10mM. Natomiast, nie odnotowaliśmy statystycznie istotnych różnic dotyczących zmian odsetka plemników o integralnej plazmolemie oraz posiadających aktywne mitochondria.

5.3. PODSUMOWANIE

Do najważniejszych rezultatów uzyskanych w ramach osiągnięcia naukowego zaliczam:

1. Wskazanie dodatkowych analiz laboratoryjnych jako niezbędnych w celu dokładnej oceny właściwości biologicznych kriokonserwowanego nasienia, szczególnie w przypadku ejakulatów charakteryzujących się obniżoną jakością.

2. Zastosowanie dodatku PAF do rozmrożonego nasienia buhaja jako czynnika wspomagającego ruchliwość plemników, parametry kinematyczne ruchu, stabilność błon plazmatycznych, a także syntezę ATP, szczególnie w przypadku rozmrożonego nasienia o obniżonej ruchliwości.

3. Wykazanie synergistycznego działania niskocząsteczkowych antyoksydantów jako dodatku do rozcieńczalnika na właściwości biologiczne kriokonserwowanych plemników psa.

4. Wskazanie optymalnych stężeń niskocząsteczkowych stymulatorów ruchliwości stosowanych jako dodatek do rozmrożonego nasienia psa.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że wiedza dotycząca poprawy jakości kriokonserwowanych plemników, w tym ich ruchliwości oraz integralności błon plazmatycznych może

przyczynić się do opracowania nowych, skutecznych technik postępowania z rozmrożonym nasieniem, które najlepiej spełniałyby oczekiwania hodowców. Zastosowanie zaawansowanych metod oceny nasienia, dodatek substancji aktywujących komórki poddane procesom zamrażania może zabezpieczyć ich przydatność technologiczną w technikach wspomaganego rozrodu.

5.4 PIŚMIENNICTWO

- Agarwal A., Virk G., Ong C., du Plessis S.S. (2014) Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*, 32: 1-17
- Agarwal A., Virk G., Ong C., du Plessis S.S. (2014) Effect of oxidative stress on male reproduction. *orld J Mens Health*, 32:1-17.
- Aitken R.J., Baker M.A. (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol*, 250: 66-69.
- Aitken R.J., Smith T.B., Jobling M.S., Baker M.A., De luliis G.N. (2014) Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*, 16: 31-38.
- Aitken R.J., Sutton M., Warner P., Richardson D.W. (1985) Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *J Reprod Fertil*, 73: 441-449.
- Alhaider A.K., Watson P.F. (2009) Cryopreservation of dog semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim Reprod Sci*, 110: 147-161.
- Alvarez J.G., Storey B.T. (1995) Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 42: 334-346.
- Aravindakshan T.V., Sharma A. (1996) Effect of platelet activating factor on the motility and acrosome reaction of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 45: 991-999.
- Asadpour R., Jafari R., Tayefi-Nasrabadi H. (2011) Influence of added vitamin C and vitamin E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and tris-based extenders. *Vet Res Forum*, 1: 37-44.
- Awda B.J., Mackenzie-Bell M., Buhr M.M. (2009) Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod*, 81: 553-61.
- Azawi O.I., Hussein E.K. (2013) Effect of vitamins C or E supplementation to tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5°C. *Vet Res Forum*, 4: 157-160.
- Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. (2000) Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, 21: 1-7.
- Banihani S.A., Abu-Alhayjaa R.F. (2016). The activity of seminal creatine kinase is increased in the presence of pentoxifylline. *Andrologia*, 48: 603-604.
- Bansal A.K., Bilaspuri G.S. (2010) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 7: 686137.
- Barakat I.A., Danfour M.A., Galewan F.A., Dkhil M.A. (2015). Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *Biomed Res Int*, 2015: 1-7.

- Belala R., Fatmi S., Kaidi R., Iguer-Ouada M. (2016). Benefits of cholesterol and α -tocopherol loaded cyclodextrins in dog semen cryopreservation. *Revue Méd Vét*, 167: 22-27.
- Bosch P., Roudebush W.E., McGraw R.A., Mel DeJarnette J., Marshall C.E., Massey J.B., Brackett B.G. (2009) Bull spermatozoa express receptors for platelet-activating factor. *Rev Cient*, 19: 513-521.
- Brie D., Sahebkar A., Penson P.E., Dinca M., Ursoniu S., Serban M.C., Zanchetti A., Howard G., Ahmed A., Aronow W.S., Muntner P., Lip G.Y., Wong N.D., Rysz J., Banach M. (2016) Effects of pentoxifylline on inflammatory markers and blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens*, 34: 2318-2329.
- Chi H.J., Kim J.H., Ryu C.S., Lee J.Y., Park J.S., Chung D.Y., Choi S.Y., Kim M.H., Chun E.K., Roh S.I. (2008) Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reprod*, 23: 1023–1028.
- Comizzoli P., Crosier A.E., Songsasen N., Gunther M.S., Howard J.G., Wildt D.E. (2009) Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. *Reprod Domest Anim*, 44: 47-52.
- de Andrade A.F., de Arruda R.P., Celeghini E.C., Nascimento J., Martins S.M., Raphael C.F., Moretti A.S. (2007) Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Domest Anim*, 42: 190-194.
- Diaz E., Szeto A.C., Roudebush W.E. (1999) Presence of platelet-activating factor in rhesus (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J Med Primatol*, 28: 32-35.
- 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.
- Esmailpour T., Zarei M.-R., Bahmanpour S., Aliabadi E., Hosseini A., Jaberipour M. (2014) Effect of follicular fluid and platelet-activating factor on lactate dehydrogenase C expression in human asthenozoospermic samples. *Iran J Med Sci*, 39: 20-28.
- Esteves S.C., Spaine D.M., Cedenho A.P. (2007) Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. *Braz J Med Biol Res*, 40: 985-992.
- Estienne M.J., Harper A.F., Day J.L. (2007) Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod Biol*, 7: 221-231.
- Flores E., Cifuentes D., Fernández-Novell J.M., Medrano A., Bonet S., Briz M.D., Pinart E., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. (2008) Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology*, 69: 1083-1094.
- Ford WC (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go around? *Hum Reprod Update*, 12: 269-274.
- Fraser L., Lecewicz M., Strzeżek J. (2002) Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol J Vet Sci*, 5: 85-92.
- 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.

- Garner D.L., Johnson L.A. (1995) Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*, 553: 276–284.
- Gradil C.M., Ball B.A. (2000) The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 1041-1047.
- Grassi G., Cappello N., Gheorghe M.F., Salton L., Di Bisceglie C., Manieri C., Benedetto C. (2010) Exogenous platelet-activating factor improves the motility of human spermatozoa evaluated with C. A. S. A.: optimal concentration and incubation time *J Endocrinol Invest*, 33: 684-690.
- Guthrie H.D., Welch G.R., Long J.A. (2008) Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology*, 70: 1209-1215.
- Guthrie H.D., Welch G.R. (2012) Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, 78: 1700–1708.
- Hamedani A.M., Tahmasbi A.M., Naserian A.A., Ahangari Y.J. (2016) Evaluation of vitamin E on microscopic parameters of chilled and frozen stored ram semen. *Der Pharma Chemica*, 8: 16–22.
- Holt W.V. (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 3-22.
- Hosen M.B., Islam M.R., Begum F., Kabir Y., Howlader M.Z.H. (2015) Oxidative stress induced sperm DNA damage, a possible reason for male infertility. *Iran J Reprod Med* 2015, 13: 525–532.
- Hough S.R., Parks J.E. (1994) Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster. *Biol Reprod*, 50: 912-916.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53: 1841–1856.
- Jeong Y.J., Kim M.K., Song H.J., Kang E.J., Ock S.A., Kumar B.M., Balasubramanian S., Rho G.J. (2009) Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 58: 181–189.
- Jewgenow K., Braun B.C., Dehnhard M., Zahmel J., Goeritz F. (2017). Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. *Reprod Domest Anim*, 52: 18-23.
- Johnson A.E., Freeman E.W., Wildt D.E., Songsasen N. (2014). Spermatozoa from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) display typical canid hyper-sensitivity to osmotic and freezing-induced injury, but respond favorably to dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 68: 361-370.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M. (2000) Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 143-172.
- Kaeoket K., Srisowanna T., Wichaidit U., Chanapiwat P., Manee-in S. (2010) Comparative study on six different long term commercial extenders for fresh boar semen. *Thai J Vet Med.*, 40: 257-263.
- Karger S., Geiser B., Grau M., Heuwieser W., Arlt S.P. (2017). Short communication: Progressive motility of frozen-thawed canine semen is highest five minutes after thawing. *Reprod Domest Anim*, 52: 350-352.
- Kheradmand A., Sookhtezary A., Moosavi S.M., Joorabi S. (2009) The effect of platelet activating factor on the motility and acrosome reaction of ram spermatozoa. *Iran J Vet Res*, 10: 315-322.
- 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.

- Kordan W., Lecewicz M., Strzeżek R., Dziekońska A., Fraser L. (2010) Effect of platelet activating factor (PAF) supplementation in semen extender on viability and ATP content of cryopreserved canine spermatozoa. *Pol J Vet Sci*, 13: 571-579.
- Kordan W., Lecewicz M., Tobolski J. (2009) Effect of platelet-activating factor on motility, plasmalemma integrity, the process of capacitation and acrosome reaction of fresh and cryopreserved boar spermatozoa. *Pol J Vet Sci*, 12: 175-181.
- Kordan W., Strzeżek J., Fraser L. (2003) Functions of platelet activating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a review. *Pol J Vet Sci*, 6: 55-60.
- Kordan W., Strzeżek J. (2006) Synthetic platelet activating factor (PAF) as a boar semen extender component. *Med. Weter*, 62: 560-562.
- Koziorowska-Gilun M., Gilun P., Fraser L., Koziorowski M., Kordan W., Stefanczyk-Krzyszowska S. (2013) Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in reproductive tract of adult male European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Reprod Domest Anim*, 48: 7-14.
- Kumar R., Harper M.J., Hanahan D.J. (1988) Occurrence of platelet-activating factor in rabbit spermatozoa. *Arch Biochem Biophys*, 260: 497-502.
- Kumaresan A., Kadirvel G., Bujarbaruah K.M., Bardoloi R.K., Das A., Kumar S., Naskar S. (2009) Preservation of boar semen at 18 degrees C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa *Anim Reprod Sci*, 110: 162-171.
- Lammers J., Spingart C., Barrière P., Jean M., Fréour T. (2014) Double-blind prospective study comparing two automated sperm analyzers versus manual semen assessment. *J Assist Reprod Genet*, 31: 35-43.
- Laokirkkiat P., Kunathikom S., Choavaratana R., Petyim S., Prechapanich J. (2007) Comparison between sperm treated with pentoxifylline and 2-deoxyadenosine using hypo-osmotic swelling test. *J Med Assoc Thai*, 90: 211-215.
- Lapetina E.G. (1982) Platelet-activating factor stimulates the phosphatidylinositol cycle. Appearance of phosphatidic acid is associated with the release of serotonin in horse platelets. *J Biol Chem*, 257: 7314-7317.
- Lecewicz M., Kordan W., Majewska A., Kamiński S., Dziekońska A., Mietelska K. (2016) Effects of the platelet-activating factor (PAF) on selected quality parameters of cryopreserved bull semen (AI) with reduced sperm motility. *Pol J Vet Sci*, 19: 147-158.
- Linde-Forsberg C., Forsberg M. (1989) Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil*, 39: 299-310.
- López F.J., Alvaríño J.M. (2000). Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Anim Reprod Sci*, 58: 147-154.
- Lucio C.F., Angrimani D.S.R., Brito M.M., Vannucchi C.I. (2017). Oxidative stress challenges during the sperm cryopreservation in dogs. *J Vet Androl*, 2: 1-7.
- Mandal R., Badyakar D., Chakrabarty J. (2014) Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Adv Androl*, 2014: 1-9.

- McCarthy M.J., Meyers S.A. (2011) Antioxidant treatment in the absence of exogenous lipids and proteins protects rhesus macaque sperm from cryopreservation-induced cell membrane damage. *Theriogenology*, 76: 168–176.
- Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Saratsis P., Boscós C. (2007) Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68: 204–212.
- Milani C., Fontbonne A., Sellem E., Stelletta C., Gérard O., Romagnoli S. (2010). Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, 74: 153-164.
- Minhas B.S., Kumar R., Ricker D.D., Robertson J.L., Dodson M.G. (1991) The presence of platelet activating factor-like activity in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 55: 372-376.
- Mittal P.K., Anand M., Madan A.K., Yadav S., Kumar J. (2014) Antioxidative capacity of vitamin E, vitamin C, and their combination in cryopreserved Bhadavari bull semen. *Vet World*, 7: 1127–1131.
- Mundle S.D., Reza S., Ali A., Mativi Y., Shetty V., Venugopal P., Gregory S.A., Raza A. (1999) Correlation of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) with high Caspase 3-like activity in myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett*, 140: 201-207.
- Nizanski W., Dubiel A., Bielas W., Dejneka G.J. 2001) Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: 365–369.
- Nöthling J.O., Gerstenberg C., Volkmann D.H. (1997) Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fertil*, 51: 109-116.
- Odeh A.I., Dascanio J.J., Caceci T., Bowen J., Eng L.A. (2003) Effect of platelet-activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*, 126: 605-613.
- Ogata K., Sasaki A., Kato Y., Takeda A., Wakabayashi M., Sarentonglaga B., Yamaguchi M., Hara A., Fukumori R., Nagao Y. (2015) Glutathione supplementation to semen extender improves the quality of frozen-thawed canine spermatozoa for transcervical insemination. *J Reprod De*, 61: 116–122.
- Ortega Ferrusola C., González Fernández L., Macías García B., Salazar-Sandoval C., Morillo Rodríguez A., Rodríguez Martínez H., Tapia J.A., Peña F.J. (2009) Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, 81: 1106-1111.
- Peeker R., Abramsson L., Marklund S.L. (1997) Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol. Hum Reprod*, 3: 1061-1066.
- Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez Martínez H. (2004) Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, 12: 117–124.
- Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez Martínez H. (2003) Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*, 78: 85–98.
- Petruska P., Capcarova M., Sutovsky P. (2014) Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. *Turk J Vet Anim Sci*, 38: 643–652.

- Piasecka M. (2004a) Morfologia i funkcja mitochondriów plemnika a męska płodność. Prawidłowa morfologia i funkcja wstawki plemnika. *Post Biol Kom*, 31: 489-516.
- Piasecka M. (2004b) Morfologia i funkcja mitochondriów plemnika a męska płodność. Zaburzenia morfologiczno-funkcjonalne mitochondriów wstawki plemnika. *Post Biol Kom*. 31: 517-541.
- Ponce A.A., Fiol de Cuneo M., Ruiz R.D., Vincenti L.M., Santillá M.E., Stutz G., Lacuara J.L. (1999). Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. *Arch Androl*, 43: 77-84.
- Pour H.A., Abdol-Mansour T., Abbas-Ali N. (2013) The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. *Euro J Zool Res*, 2: 94–99.
- Raina V.S., Gupta A.K., Raina K.S. (2002) Effect of antioxidant fortification on preservability of buffalo semen. *Asian-Australas J Anim Sci*, 15: 16–18.
- Rasul Z., Ahmad N., Anzar M. (2001) Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl*, 22: 278-283.
- Reinhardt J.C., Cui X., Roudebush W.E. (1999) Immunofluorescent evidence of the platelet-activating factor receptor on human spermatozoa. *Fertil Steril*, 71: 941-942.
- Ricker D.D., Minhas B.S., Kumar R., Robertson J.L., Dodson M.G. (1989) The effects of platelet-activating factor on the motility of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 52: 655-658.
- Rivlin J., Mendel J., Rubinstein S., Etkovitz N., Breibart H. (2004) Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, 70: 518-522.
- Rodenas C., Parrilla I., Roca J., Martinez E.A., Lucas X. (2014). Effects of rapid cooling prior to freezing on the quality of canine cryopreserved spermatozoa. *J Reprod Dev*, 60: 355-361.
- Rossi M., Falomo M.E., Mantovani R. (2016) Role of coenzyme Q and vitamin E on stallion semen motility evaluated both in frozen and cooled-stored semen *Ital J Anim Sci*, 15: 595–603.
- Roudebush W.E., Diehl J.R. (2001) Platelet-activating factor content in boar spermatozoa correlates with fertility. *Theriogenology*, 55: 1633-1638.
- Roudebush W.E., Gerald M.S., Cano J.A., Lussier I.D., Westergaard G., Higley J.D. (2002) Relationship between platelet-activating factor concentration in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa and sperm motility. *Am J Primatol*, 56: 1-7.
- Roudebush W.E., Gerald M.S., Cano J.A., Lussier I.D., Westergaard G., Higley J.D. (2002) Relationship between platelet-activating factor concentration in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa and sperm motility. *Am J Primatol*, 56: 1-7.
- Roudebush W.E., Mathur R.S. (1998) Presence of platelet-activating factor in squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*) spermatozoa: seasonal differences. *Am J Primatol*, 45: 301-305.
- Roudebush W.E., Wild M.D., Maguire E.H. (2000) Expression of the platelet-activating factor receptor in human spermatozoa: differences in messenger ribonucleic acid content and protein distribution between normal and abnormal spermatozoa. *Fertil Steril*, 73: 967-971.
- Sahib Yahya A.L.M. (2016) Effect of the addition of vitamin E to sperm freezing medium on cryosurvival rate of sperm motility in asthenozoospermic patients. *Int J Sci Res*, 6: 590–594.

- Schäfer-Somi S., Kluger S., Knapp E., Klein D., Aurich C. (2006) Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 66: 173-182.
- Silva A.R., de Cássia Soares Cardoso R., Uchoa D.C., Machado da Silva L.D. (2002) Effect of tris-buffer, egg yolk, and glycerol on canine semen freezing. *Vet J*, 164: 244-246.
- Singh S.P., Virmani M., Malik R.K. (2015) Effect of vitamin C on the seminal and biochemical parameters of Murrah buffalo bull semen during different stages of freezing. *Haryana Vet*, 54: 15-18.
- Singh S.P., Virmani M., Malik R.K. (2015) Effect of vitamin C on the seminal and biochemical parameters of Murrah buffalo bull semen during different stages of freezing. *Haryana Vet* 2015, 54: 15-18.
- Skalska J., Dębska-Vielhaber G., Głąb M., Kulawjak B., Malińska D., Koszela-Piotrowska I., Bednarczyk P., Dołowy K., Szewczyk A. (2006) Mitochondrialne kanały jonowe. *Postępy Biochemii*, 52: 137-144.
- Stephens T.D., Brooks R.M., Carrington J.L., Cheng L., Carrington A.C., Porr C.A., Splan R.K. (2013). Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. *Equine Vet Sci*, 33: 615-621.
- Stolbov V.M., Rimanova L.D. (1984) The effect of vitamins in the diluent on the quality of thawed bull semen. *Anim Breed Abstr*, 52: 6546.
- Stradaoli G., Noro T., Sylla L., Monaci M. (2007) Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 15: 1249-1255.
- Stradaoli G., Noro T., Sylla L., Monaci M. (2007) Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 15: 1249-1255.
- Tejerina F., Morrell J., Petterson J., Dalin A.M., Rodriguez-Martinez H. (2009) Assessment of motility of ejaculated stallion spermatozoa using a novel computer-assisted motility analyzer (Qualisperm™). *Anim Reprod*, 6: 380-385.
- Thomas C.A., Garner D.L., DeJarnette J.M., Marshall C.E. (1998) Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, 58: 786-793.
- Thomas C.A., Garner D.L., DeJarnette 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.
- Thomas C.A., Garner D.L., DeJarnette J.M., Marshall C.E. (1998) Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, 58: 786-793.
- Trzcińska M., Bryła M., Smorąg Z. (2008) Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *J Anim Feed Sci*, 17: 372-380.
- Uchoa D.C., Silva T.F., Mota Filho A.C., Silva L.D. (2012). Intravaginal artificial insemination in bitches using frozen/thawed semen after dilution in powdered coconut water (ACP-106c). *Reprod Domest Anim*, 47: 289-292.
- Varo Ghiuru F., Ladoși I., Roman I., Hettig A., Zăhan M, Miclea V. (2010) Antioxidant medium for mangalita boar semen cryopreservation. *Not Bot Horti Agrobo*, 67: 445-451.
- Verma A., Kanwar K.C. (1999) Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl*, 1: 151-154.

- Vishwanath R., Shannon P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*, 62: 23-53.
- Waberski D., Henning H., Petrunkina A.M. (2011) Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod Domest Anim*, 46: 45-48.
- Walsh S.W., Williams E.J., Evans A.C. (2011) A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 123: 127-138.
- Watson P.F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60-61: 481-492.
- Wittayarat M., Kimura T., Kodama R., Namula Z., Chatdarong K., Techakumphu M., Sato Y., Mand T., Otoi T. (2012) Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea polyphenol. *Cryo Letters*, 33: 318-326.
- Yang X., Zhang Y.H., Ding C.F., Yan Z.Z., Du J. (2006) Extract from *Morinda officinalis* against oxidative injury of function to human sperm membrane. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 31: 1614-1617.
- Zeitoun M.M., Al-Damegh M.A. (2015) Effect of nonenzymatic antioxidants on sperm motility and survival relative to free radicals and antioxidant enzymes of chilled-stored ram semen. *Open J Anim Sci*, 5: 50-58.
- Zhang J. Guo H. Su J., Zhao L., Li Y., Sun W., Han H., Hu S., Zhao G., Li Y., Dai Y., Li X. (2014) A comparison of the effects of pentoxifylline on quality of fresh and frozen - thawed bull spermatozoa. *Agriculture Biotechnology*, 3: 20-29.
- Zhao Y., Buhr M.M. (1995) Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. *J Androl*, 16: 278-285.

5.5 OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Badania przed uzyskaniem stopnia doktora

Od początku mojej pracy naukowej obszar moich zainteresowań badawczych koncentrował się wokół problemów związanych z konserwacją nasienia oraz metodami jej doskonalenia. Prace naukowe i doniesienia konferencyjne z tego okresu działalności dotyczyły analiz składników plazmy nasienia, a także technik konserwacji nasienia knura zarówno w stanie płynnym jak i zamrożonym (*Załącznik 5: A.1, P.1, P.2, P.3, P.4, P.5, P.6*).

Od 2000 do 2001 roku byłem wykonawcą projektu promotorskiego KBN (5P06D01819) „Lipoproteiny żółtka jaja ptaków, jako składnik nowego typu rozcieńczalnika do długookresowej konserwacji nasienia knura w temperaturze +5°C i +16°C”, którego kierownikiem był prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek. W ramach projektu wykonywałem badania będące przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pod tytułem „Zmiany biochemiczne i wartość biologiczna nasienia knura konserwowanego w różnych temperaturach z dodatkiem żółtka jaja ptaków” przygotowanej pod kierunkiem prof. zw. dr

hab. Jerzego Strzeżka. W pracy doktorskiej wykazałem, że frakcja lipoprotein o niskiej gęstości (LPF) izolowana z żółtka jaja kury lub strusia afrykańskiego dodana do rozcieńczalnika Kortowo-3 (K-3) skutecznie chroni właściwości biologiczne plemników podczas konserwacji nasienia w temperaturze 5°C i 16°C.

Badania po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania naukowe dotyczyły głównie szeroko rozumianej problematyki konserwacji nasienia zwierząt gospodarskich oraz towarzyszących, ponadto zostały poszerzone o zagadnienia z obszaru proteomiki układu rozrodczego samca, m.in. zwierząt dziko żyjących.

KONSERWACJA NASIENIA ORAZ METODY OCENY WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH PLEMNİKÓW

1. Doskonalenie konserwacji nasienia knura w temperaturach dodatnich z wykorzystaniem lipoprotein izolowanych z żółtka jaja ptaków (*Załącznik 5: A.2, A.3, A.4, B.1, B.2, B.3, B.4, J.1*)

Wrażliwość plemników knura na udar chłodowy prowadzący do zmian strukturalnych i funkcjonalnych komórek rozrodczych przyczynia się do poszukiwania nowych metod optymalizacji konserwacji nasienia w niskich temperaturach. W badaniach dotyczących wpływu dodatku do rozrzedzalnika Kortowo 3 (K3) frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja kury (K3-LPFh) oraz strusia afrykańskiego (K3-LPFo) na ruchliwość plemników knura przechowywanych w temperaturze 5°C oraz 16°C przez okres 4 dni zarówno w sezonie jesienno–zimowym jak i wiosenno–letnim wykazano właściwości protekcyjne dodatku zarówno LPFh, jak i LPFo, szczególnie w przypadku nasienia przechowywanego w temperaturze 5°C. Ponadto, stosując w badaniach podwójne barwienie przy użyciu fluorochromów: rodaminy 123 (R123), jodku propidyny, a także barwnika Hoechst 33258 wykazano, że skład rozcieńczalnika wzbogacony o frakcję lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) izolowanych z żółtka jaja ptaków przyczynia się do poprawy utrzymania żywotności oraz stanu funkcjonalnego mitochondriów plemników knura przechowywanych w niskich temperaturach. Dodatkowo, analizując wpływ wieku knura oraz sezonu na parametry zużycia tlenu (ZO₂), a także zawartość ATP w plemnikach poddanych procesowi konserwacji z dodatkiem LPFo oraz LPFh w temperaturze 5°C zaobserwowano wyższe wartości omawianych parametrów w przypadku prób nasienia pozyskanych w okresie jesienno–zimowym od samców będących w przedziale wiekowym od 25 do 36 m-cy w porównaniu do próby kontrolnej. Należy nadmienić, iż wprowadzenie nowej, prostej metody wodnej ekstrakcji LPFo oraz LPFh umożliwiło przeprowadzenie analizy frakcji lipoprotein

żółtka jaja ptaków, które wykazały znaczne różnice w ich składzie biochemicznym. W przypadku żółtka jaja strusia afrykańskiego stosunek lipidów do białka wynosi odpowiednio 72,5 oraz 27,5%, natomiast u kury 68,1 i 31,8%. Ponadto, w LPFo zaobserwowano wyższą zawartość triacyloglicerolu, cholesterolu oraz fosfolipidów, wśród których dominującą okazała się fosfatydyloseryna. Analizując m.in. zużycie tlenu, poziom ATP oraz produkcję L-mleczanu w plemnikach knura przechowywanych w stanie płynnym w niskiej temperaturze z dodatkiem LPFo wykazano, że molekularne interakcje zachodzące między frakcjami lipoprotein a plazmą nasienia mogą decydować o właściwościach supresyjnych powstających kompleksów wobec indukowanej peroksydacji lipidów (LPO).

Efektym wymienionych badań jest patent na wynalazek „Preparat do konserwacji nasienia zwierząt, zwłaszcza knura”, nr P 217869 (*Załącznik 5: C.1*).

2. Wpływ dodatku płytkowego czynnika aktywującego PAF na jakość kriokonserwowanych plemników knura i psa (*Załącznik 5: A.9, A.11, P.13, P.16*)

Zarówno u knura jak i psa wykazano pozytywny wpływ na szereg właściwości biologicznych plemników poddanych procesowi kriokonserwacji stosując suplementację acetylowanym glicerofosfolipidem – płytkowym czynnikiem aktywującym (PAF). W przypadku knura zastosowanie fosfolipidu w koncentracji $1 \times 10^{-6} \text{M}$ istotnie zwiększyło odsetek plemników ruchliwych po rozmrożeniu. Ponadto, zaobserwowano pozytywny wpływ PAF ($1 \times 10^{-8} \text{M}$) na integralność plazmolemy komórek rozrodczych. Zwrócono również uwagę, na możliwość zastosowania omawianej substancji jako wskaźnika zdolności plemników do określenia indukowanej reakcji akrosomowej (A.10). Natomiast u psa wykazano, że suplementacja nasienia fosfolipidem w stężeniu $1 \times 10^{-3} \text{M}$ wiąże się z utrzymaniem odpowiednich parametrów ruchliwości plemników po rozmrożeniu a także istotnie wyższą zawartością ATP w porównaniu do próby kontrolnej. Nie mniej jednak nie odnotowano istotnych różnic w odsetku plemników z integralną plazmolemą oraz funkcjonalnymi mitochondriami.

3. Zastosowanie komercyjnych rozrzedzalników do przechowywania nasienia w stanie płynnym oraz zamrożonym (*Załącznik 5: A.13, A.18, B.6, B.7, B.8, J.2*)

Przeprowadzenie badań porównawczych dotyczących wpływu powszechnie stosowanych rozcieńczalników długoterminowych Androhep Endura®Guard™ (AeG; Niemcy, Minitüb), Dilu-cell (DC; Niemcy, Alfred Hein-K&WB), SafeCell Plus™ (SCP; Francja, IMV Technologies) i Vitasem LD (VLD; Hiszpania, Megapor SL) na właściwości biologiczne plemników knura poddanych długookresowej konserwacji w temperaturze 17°C, takie jak ruchliwość, integralność błon plazmatycznych i funkcjonalność mitochondriów miało duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne mogące przyczynić się

do znacznego postępu hodowlanego. W przeprowadzonych badaniach wykazano korzystny wpływ działania rozcieńczalników Safe Cell Plus na ruchliwość plemników, Androhep Endura Guard i Safe Cell Plus na integralność plazmolemy w regionie główkowym oraz aktywność mitochondriów plemników. Ponadto, stwierdzono również stopniowe obniżenie zawartości ATP w komórkach niezależnie od czasu przechowywania. Dodatkowo, wykazano, że ruchliwość, stan błon plazmatycznych oraz sprawność mitochondriów plemników knura przechowywanych w stanie płynnym zależy od typu zastosowanego rozcieńczalnika i czasu przechowywania.

Dodatkowo zostały przeprowadzone badania dotyczące wpływu zastosowanego rozcieńczalnika na wybrane parametry jakości biologicznej plemników knura przed zamrożeniem, a następnie po rozmrożeniu. Próby nasienia rozrzedzano w trzech komercyjnych rozcieńczalnikach: BTS (Minitüb, Tiefenbach, Germany), Androhep (AH, Minitüb, Tiefenbach, Germany) i Gedil (GD, Genes Diffusion, France). Analizy jakości plemników dotyczyły oceny ruchliwości, integralności akrosomów, stanu błon plazmatycznych, potencjału transbłonowego mitochondriów, zawartości ATP oraz aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych (SOD i GPx). We wszystkich badanych próbach wykazano obniżenie jakości biologicznej plemników po rozmrożeniu, wyrażające się spadkiem omawianych parametrów. Niemniej jednak, spośród analizowanych rozcieńczalników najlepsze właściwości protekcyjne wykazywał rozrzedzalnik AH. W próbach nasienia z dodatkiem AH obserwowano istotnie wyższy odsetek plemników o nienaruszonych błonach plazmatycznych oraz aktywnych mitochondriach. Dodatkowo, niezależnie od rodzaju zastosowanego rozcieńczalnika nie odnotowano zmian aktywności SOD.

Badania dotyczące wpływu sezonu i wieku na jakość nasienia ogiera przechowywanego w stanie płynnym w rozrzedzalniku EquiPro™ wskazały, że w przypadku nasienia rozrzedzonego brak jest istotnego wpływu sezonu na wybrane parametry jakościowe, ale jednocześnie potwierdziły że wiek ogiera wpływa istotnie na sprawność metaboliczną plemników przechowywanych w stanie płynnym.

4. Metody oceny jakości nasienia i ich znaczenie w technologii reprodukcyjnej (Załącznik 5: A.14)

Niezwykle istotnym czynnikiem mającym wpływ na doskonalenie technologii konserwacji nasienia jest prawidłowa ocena jakości biologicznej plemników, a zatem ich zdolności zapładniających. W pracy przeglądowej przedstawiono szereg metod umożliwiających dokładną ocenę jakości nasienia. Autorzy zwracają uwagę, że poza określeniem ruchliwości komórek rozrodczych z wykorzystaniem komputerowego systemu (CASA), niezwykle przydatnych informacji dotyczących jakości materiału biologicznego dostarczają metody mikroskopowe pozwalające na ocenę sprawności osmotycznej plemników w regionie akrosomowym i witkowym, takie jak test oporności osmotycznej plemników (Osmotic Resistance Test – ORT) oraz test hypoosmotyczny (Hypoosmotic Swelling Test, HOS).

Ponadto, barwienie plemników z wykorzystaniem fluorochromów: diocjanu 6 karboksylfluoresceiny - CFDA, Hoechst 33258 oraz kombinacji barwników SYBR-14/PI pozwalają na wiarygodną analizę stanu błon plazmatycznych komórek. Dodatkowo pomiar ilości dialdehydu malonowego – MDA, produktu indukowanej peroksydacji lipidów umożliwia monitorowanie uszkodzeń plazmolemy komórek spowodowanych występowaniem stresu oksydacyjnego. Oznaczanie aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) umożliwia natomiast identyfikację stanu struktur błonowych wstawki plemnika. Informacji o sprawności funkcjonalnej mitochondriów dostarczają metoda barwienia plemników fluorochromami: JC-1 i R123, których wyniki mogą zostać poszerzone o analizę stanu metabolicznego komórek określanego na podstawie zmian zawartości ATP. Podkreślono również istotną rolę oceny struktury chromatyny oraz integralności DNA (metoda radioizotopowa z zastosowaniem znakowanej trytem aktynomycyny D $-^3\text{H}$ -AMD oraz metody elektroforetyczne - NCA, SCSA), a także oceny zmian apoptotycznych (Aneksyna V, YoPro-1). Dodatkowo, w pracy wskazano aplikacyjne zastosowanie metod proteomicznych takich jak elektroforeza dwukierunkowa (2-D PAGE) oraz chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) w celu identyfikacji oraz określenia funkcji białek plazmy nasienia w procesie zapłodnienia.

Swoją wiedzę dotyczącą kriokonserwacji wykorzystałem przy zamrażaniu zarodków ryb (*Załącznik 5: A.7*). Celem doświadczenia było opracowanie uniwersalnego protokołu kriokonserwacji izolowanych blastomerów pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Przetestowano dwa komercyjnie dostępne rozrzedzalniki do mrożenia oraz dwa eksperymentalne, stosowane wcześniej przy kriokonserwacji zarodków ryb łososiowatych. Porównano dwa protokoły mrożenia-rozmrażania oraz dwa etapy rozwojowe przeznaczonych do kriokonserwacji zarodków. Wykazano, że wskaźniki przeżycia kriokonserwowanych izolowanych blastomerów są porównywalne z uzyskanymi w przypadku blastomerów rozproszonych w stadium połowy okresu rozwoju blastuli, aczkolwiek niższe niż w przypadku rozproszonych blastomerów, kiedy zarodki znajdują się na wcześniejszych etapach rozwoju.

PROTEOMIKA MĘSKIEGO UKŁADU ROZRODCZEGO

1. Mapowanie białek plazmy nasienia knura (*Załącznik 5: A.6, A.8, A.10, P.11*)

Acetylohydrolaza PAF (PAF-AH) jest heterogennym białkiem zbudowanym z czterech polipeptydów o masach cząsteczkowych 43, 55, 65 i 100kDa obecnym w plazmie nasienia knura. Określono, że N-końcowa sekwencja aminokwasów polipeptydu o mr 43kDa, jest homologiczna z sekwencją aminokwasową białek wiążących IgG oraz białek adhezyjnych. Ze względu na silnie zablokowaną N-końcową grupę aminową pozostałych polipeptydów, w celu charakterystyki ich

struktury wykorzystano technikę spektrometrii mas (MS). Analiza widma masowego wykazała obecność w strukturze PAF-AH prekursora α -mannozydazy, a także fibronektyny, spermadhezyn AWN-1 i PSP-II oraz białek wiążących IgG.

W badaniach dotyczących określenia wpływu wieku knurów oraz sezonu na skład białek plazmy nasienia z wykorzystaniem elektroforezy dwukierunkowej wykazano istotnie niższą zawartość polipeptydów u knurów 12-miesięcznych w porównaniu ze zwierzętami trzyletnimi. Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku prób nasienia pozyskanego w sezonie letnim w porównaniu do okresu jesiennego. Różnice w mapach polipeptydowych uwarunkowane zarówno wiekiem zwierząt jak i sezonem mogą być wykorzystane jako marker molekularnych zmian aktywności sekrecyjnej dodatkowych gruczołów płciowych, a także stanowić istotny wyznacznik doboru samców do rozrodu (A.9). Natomiast analiza plazmy nasienia knura przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej (2-D PAGE) pozwoliła na wytypowanie czterech zakonserwowanych polipeptydów o identycznej masie cząsteczkowej (24 kDa), różniących się punktem izoelektrycznym (pI): (1) 7,4-7,7, (2) 8,1-8,4 (3) 8,5-8,8 oraz (4) 9,2-9,4. Zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (LC-MS/MS) pozwoliło na identyfikację omawianych polipeptydów. Wykazano ich podobieństwo do rodziny spermadhezyn, w tym spermadhezyny najądrzowej AWN1. Ponadto stwierdzono homologię peptydów 3 i 4, z prekursorem lizozymu C (1,4-beta-N-acetylmuramidaza C). Przedstawione wyniki podkreślają udział analizowanych substancji białkowych w procesach towarzyszących zapłodnieniu.

2. Charakterystyka proteomu wybranych odcinków układu rozrodczego samca sarny (*Capreolus capreolus*) w różnych okresach sezonu reprodukcyjnego (Załącznik 5: A.20, A.21, P.17, P.19)

Stosując techniki analizy proteomu tj. elektroforezę dwukierunkową w żelu poliakryloamidowym (2D-PAGE) oraz tandemową spektrometrię mas (MALDI TOF/TOF) w homogenatach tkanek jąder i najądrzy oraz płynach tkankowych samca sarny (*Capreolus capreolus*) zidentyfikowano odpowiednio 26 oraz 25 polipeptydów, pełniących m.in. funkcje enzymatyczne, w tym antyoksydacyjne, strukturalne oraz regulujące właściwości biologiczne plemników. Niezależnie od okresu sezonu rozrodczego we wszystkich odcinkach najądrzy obserwowano obecność trzech zakonserwowanych polipeptydów podobnych do: S-transferazy glutationowej (GST), prekursora białkowej izomerazy disiarczkowej A3 oraz białkową izomerazę disiarczkową A3 (PDIA3). Wykazano ekspresję peroksyredoksyny-2 (PRDX2) w tkankach ogona najądrzy niezależnie od sezonu reprodukcyjnego. W tkankach głowy i trzonu najądrzy stwierdzono jej obecność w sezonie rozrodczym, natomiast po zakończonym okresie reprodukcyjnym obserwowano jedynie śladową ekspresję PRDX2. (A.21) W obrębie analizowanych elektroforegramów obecność reduktazy biliwerdyny (BRV) stwierdzono jedynie w tkankach najądrzy pozyskanych w okresie sezonu reprodukcyjnego. Ponadto w

najądrzach zidentyfikowano 12 polipeptydów regulujących biologiczne funkcje plemników oraz uczestniczących w organizacji cytoszkieletu komórek rozrodczych: (α -enolaza izoforma 3, białko retikulum endoplazmatycznego 29, karletikulina, transgelina, kalponina -1 izoforma 1, wimentyna, tubulina, desmina, tropomiozyna, aktyna, α – antytyrypsyna izoforma 1, białko ϵ 14-3-3). Zidentyfikowane w omawianych badaniach białka, pełnią istotną rolę w regulacji procesów reprodukcyjnych u samca sarny. Dotyczy to przede wszystkim ochrony układu rozrodczego tego gatunku przed reaktywnymi formami tlenu, regulacji procesu spermatogenezy oraz dojrzewania plemników w najądrzach. Identyfikacja wybranych białek w jądrach i najądrzach może być pomocna w wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów regulujących procesy reprodukcyjne samca sarny (*Capreolus capreolus*).

GENOMICZNE DETERMINANTY WYBRANYCH CECH NASIENIA BUHAJÓW

(Załącznik 5: A.15, A.16, A.17, A.19, A.22, A.23, P.23, P.24)

W latach 2011-2014 byłem członkiem interdyscyplinarnego zespołu w projekcie Narodowego Centrum Nauki pt. „Genomiczne determinanty wybranych cech nasienia buhajów” (nr 0105-09-17). Badania w ramach projektu dostarczyły szeregu dowodów na powiązania cech jakościowych nasienia buhaja z zmianami występującymi w genomie badanych osobników, stanowiąc również podstawę 3 prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Celem pracy Hering i wsp. (2014) było ustalenie, czy polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) występującego w genie arylosulfatazy D (ARSD) ma związek z parametrami kinematycznymi plemników buhajów rasy Holsztyńsko–Fryzyjskiej. Metodą PCR–RFLP zidentyfikowano mutację punktową C/T w pozycji 139037255 na chromosomie X (rs42207167). Stwierdzono istotny związek pomiędzy genotypami ARSD a parametrami ruchliwości plemników: całkowitą ruchliwością (TM), średnią prędkością plemników wzdłuż linii prostej (VSL), średnią prędkością plemników względem zarejestrowanego toru (VCL), a także dla frakcji komórek charakteryzujących się ruchem progresywnym. Najsilniej zaznaczone różnice obserwowano między homozygotami CC oraz TT. Wyniki przeprowadzonych badań mogą wskazywać na zaangażowanie genu arylosulfatazy D w ruchliwość plemników.

W kolejnej pracy autorzy rozważali, czy mutacja zmiany sensu C/T obecna w genie ETFA ma związek z aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. Metodą PCR – RFLP zgenotypowano 120 buhajów rasy HF, a następnie w próbach rozmrożonego nasienia określono aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy oraz peroksydazy glutationowej. Wśród badanych osobników, najczęściej występowały zwierzęta o genotypie CT (44,2%), w porównaniu do homozygot CC (42,5%) oraz TT (13,3%). Ponadto, zaobserwowano istotne różnice w aktywności peroksydazy glutationowej pomiędzy osobnikami homozygotycznymi (CC vs TT), przy czym

heterozygoty charakteryzowały się pośrednimi wynikami. W przypadku dysmutazy ponadtlenkowej wykazano istotny związek genotypem ETFA, jednak jedynie u osobników o genotypie CT wystąpiły istotne różnice w porównaniu do homozygot CC. Zmiany aktywności katalazy prezentowały się podobnie, jednak nie odnotowano statystycznie istotnych różnic. Wykazano, że buhaje o genotypie TT w genie ETFA charakteryzują się najwyższą aktywnością peroksydazy glutationowej w nasieniu, w związku z czym komórki rozrodcze mogą być efektywniej chronione przed działaniem reaktywnych form tlenu.

Biorąc pod uwagę fakt, iż geny transferazy S–glutationowej kodują enzymy zaangażowane w neutralizację reaktywnych form tlenu (ROS) w męskim układzie rozrodczym, a także odgrywają istotną rolę w czasie procesu spermatogenezy, podjęto badania dotyczące określenia związku mutacji zmiany sensu C/G w genie transferazy–S–Glutationowej M1 (GSTM1) z wybranymi parametrami jakości mrożonego nasienia buhajów HF. Substytucję pojedynczego nukleotydu C/G zidentyfikowano amplifikując fragment genu GSTM1, uprzednio strawiony enzymem restrykcyjnym Ddel. Wykazano, że wśród badanych osobników najczęściej występował genotyp GG (67,96%), w porównaniu do genotypu CC (2,59%) oraz GC (29,45%). Ponadto, potwierdzono istotny związek pomiędzy genotypami GSTM1 a zawartością ATP w nasieniu oraz całkowitą ruchliwością plemników. Należy zaznaczyć, że buhaje o genotypie GG charakteryzowały się najwyższymi wartościami analizowanych parametrów. W przypadku rzadkiego wariantu genotypu CC odnotowano natomiast istotny spadek ruchliwości plemników oraz aktywności metabolicznej nasienia. Uzyskane wyniki potwierdzają związek występowania mutacji zmiany sensu C/G w genie GSTM1 z jakością nasienia buhaja. Dodatkowo przeprowadzono badania obejmujące oznaczenie genotypów buhajów w celu identyfikacji markerów SNP oraz genów kandydujących, potencjalnie zaangażowanych w utrzymanie integralności błon plazmatycznych plemników bydła HF. Analizę stanu błon plazmatycznych komórek rozrodczych przeprowadzono stosując metodę opartą na barwieniu z wykorzystaniem kombinacji dwóch fluorochromów: SYBR–14 oraz jodku propydydy (PI), natomiast ocenę stanu mitochondriów JC-1/PI.

W celu oszacowania wpływu markera SNP na integralność błon plazmatycznych zastosowano addytywny model regresji liniowej. Na podstawie przeprowadzonych badań wskazano 5 markerów SNP obejmujących region o wielkości 2,2Mb zlokalizowany na chromosomie 6, które istotnie wpływały na stan plazmolemy plemników. Dodatkowo, jeden z markerów (rs41570391) wykazał istotność statystyczną w poprawce Bonferroniego. W regionie o wielkości około 3Mb, obejmującym wskazane markery SNP wytypowano trzy geny kandydujące: SGMS2 (syntaza sfingomieliny 2), TET2 (dioksygenaza metylocytozyny) oraz GSTCD (glutathione S-transferase C terminal domain), które potencjalnie zaangażowane są w utrzymanie integralności błon plazmatycznych plemników buhaja HF. Alternatywą dla podejścia statystycznego w wykrywaniu regionów genomu oraz genów kandydujących związanych z cechami zwierząt gospodarskich jest teoria informacji. Celem

przeprowadzonych badań była weryfikacja istotności efektów SNPs na wybrane parametry jakościowe nasienia buhaja z zastosowaniem analizy entropii. W pracy oceniano parametry ruchliwości plemników, stan błon plazmatycznych oraz status mitochondriów komórek rozrodczych, a także zawartość ATP. Ostatecznie do analiz zakwalifikowano 34.794 SNPs. Dla każdego z nich oszacowano entropię oraz entropię warunkową. Uzyskane wyniki wskazują, że istotne regiony genomu oraz geny kandydujące potencjalnie determinujące jakość nasienia buhajów HF znajdują się na wielu chromosomach.

W kolejnej pracy określono wpływ polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) w miejscu splicingu genu LPAR1 (receptor kwasu lizofosfatydowego 1) na wybrane parametry jakościowe nasienia buhajów HF. Metodą PCR–RFLP wykryto mutację splicingową A/G w genie LPAR1 u 120 buhajów rasy HF. Wykazano, że wśród badanych osobników z najwyższą częstotliwością występowały heterozygoty AG (37,5%) porównaniu do homozygot AA (30,8%) oraz GG (31,7%). Zaobserwowane istotne różnice występujące w analizowanych parametrach (całkowita ruchliwość komórek, integralność błon plazmatycznych komórek, zawartość ATP w nasieniu) między osobnikami o różnych genotypach wskazują na możliwość wykorzystania mutacji splicingowej genu LPAR1 jako potencjalnego markera jakości nasienia buhajów HF.

Od 2017 roku jestem zaangażowany w badania dotyczące przechowywania nasienia jelenia szlachetnego w stanie płynnym i zamrożonym, których wstępne wyniki zostały zaprezentowane na II i III edycji sympozjum naukowego „Perspektywy w ochronie bioróżnorodności” w Popielnie (*Załącznik 5: P.29, P.32*).

Wykonałem również 4 recenzje dla czasopism:

- Annals of Animal Science (1),
- Animal Reproduction Science (3).

5.6. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

Jestem autorem lub współautorem 73 pozycji bibliograficznych (TABELA 1):

1. 28 prac twórczych opublikowanych w czasopismach z części A listy JCR, wszystkie w języku angielskim (w tym 27 oryginalnych i 1 przeglądowa), (27 po uzyskaniu stopnia doktora); (5 publikacji stanowi cykl wskazany jako szczególne osiągnięcie w postępowaniu habilitacyjnym w oparciu o art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789);

2. 1 patentu na wynalazek;
3. 8 publikacji w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych, uwzględnionych w Web of Science (wszystkie po uzyskaniu stopnia doktora);
4. 2 prac twórczych opublikowanych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż z listy JCR (1 opublikowanej w języku hiszpańskim i 1 opublikowanej w języku polskim) (wszystkie po uzyskaniu stopnia doktora);
5. 2 wygłoszonych referatów naukowych wygłoszonych na konferencjach międzynarodowych i krajowych (wszystkie po uzyskaniu stopnia doktora);
6. 32 doniesień i komunikatów naukowych przedstawionych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych (7 przed, 25 po uzyskaniu stopnia doktora); w tym na konferencjach zagranicznych – 5.

Biorąc pod uwagę wartości wskaźników bibliometrycznych przypisanych zgodnie z rokiem wydania poszczególnych publikacji, łączna wartość dorobku naukowego w przeliczeniu na punkty MNiSW wynosi 697, w tym 691 punktów zgromadzono po uzyskaniu stopnia doktora. Sumaryczny Impact Factor publikacji jest równy 33,779.

Według bazy bibliograficznej Web of Science/Cited Reference Search liczba cytowań wynosi 163, zaś Indeks Hirscha ma wartość 6.

Marek Lecewicz

TABELA 1. BIBLIOMETRYCZNE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO

	RODZAJ PUBLIKACJI	Liczba pozycji bibliograficznych	liczba pozycji/punkty MNiSW/IF (wg roku wydania)			liczba pozycji/punkty MNiSW/IF (dane dla roku 2018)
			przed uzyskaniem stopnia doktora	po uzyskaniu stopnia doktora	razem	
1.	Publikacje naukowe w czasopismach z listy JCR (lista „A” wykazu MNiSW) (w tym wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym)	27	1/6/-	26/567/23,512	27/573/23,512	<i>27/635/31,133</i>
2.	Publikacja w czasopismach z listy JCR (lista „A” wykazu MNiSW), w procesie wydawniczym, przyjęte do druku (w tym wykorzystane w postępowaniu habilitacyjnym)	1	-	1/15/1,018	1/15/1,018	<i>1/15/1,018</i>
3.	Patent na wynalazek	1	-	1/25/-	1/25/-	<i>1/25/-</i>
4.	Publikacje w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowej, uwzględnionej w Web of Science	8	-	8/90/9,249	8/90/9,249	<i>8/90/12,090</i>
5.	Publikacje w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż z listy JCR	2	-	2/-/-	2/-/-	<i>2/-/-</i>
6.	Referaty naukowe wygłoszone na konferencjach międzynarodowych i krajowych	2	-	2/-/-	2/-/-	<i>2/-/-</i>
7.	Doniesienia i komunikaty konferencyjne	32	7/-/-	25/-/-	32/-/-	<i>32/-/-</i>
RAZEM		73	8/6/-	65/697/33,779	73/703/33,779	<i>73/765/44,241</i>