

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT



Mgr inż. Karolina Danuta Wasilewska-Sakowska

**WPLYW MODYFIKACJI WYBRANYCH ETAPÓW TECHNOLOGII
KRIOKONSERWACJI NASIENIA KNURA NA WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE
PLEMNIKÓW**

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
pod kierunkiem
prof. dr hab. Leylanda Frasera, prof. zw.
oraz promotora pomocniczego
dr inż. Łukasza Zasiadczyka

Olsztyn 2019

Wyniki badań własnych będące podstawą rozprawy doktorskiej przedstawiono w następujących publikacjach:

1) **Wasilewska K**, Zasiadczyk Ł, Fraser L, Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W. 2016. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. *Reproduction in Domestic Animals* 51(5): 781–788 (IF=1,400; 25pkt).

2) **Wasilewska K**, Fraser L. 2017. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. *Animal Reproduction Science* 185: 161–173 (IF=1,647; 30pkt).

3) **Wasilewska-Sakowska K**, Zasiadczyk Ł, Fraser L. 2019. Effect of fractionated seminal plasma on sperm characteristics following cryopreservation of boar semen. *Annals of Animal Science* 19(3): 695-712 (IF=1,515; 15pkt).

4) **Wasilewska-Sakowska K**, Zasiadczyk Ł, Fraser L, Strzeżek J, Karpiesiuk K. 2019. Effect of post-thaw supplementation of fractionated seminal plasma on survival of boar spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 22 (3) (IF=0,802; 20pkt).

STRESZCZENIE

Wpływ modyfikacji wybranych etapów technologii kriokonserwacji nasienia knura na właściwości biologiczne plemników

Słowa kluczowe: knur, plemniki, frakcjonowana plazma nasienia, białka, kriokonserwacja

Niniejsza praca obejmowała trzy doświadczenia (Dośw. 1, Dośw. 2 oraz Dośw. 3) oparte na modyfikacjach protokołu zamrażania nasienia. W Dośw. 1 zbadano wpływ różnych długoterminowych rozcieńczalników na właściwości biologiczne plemników po 24-godzinnym okresie przechowywania nasienia w temperaturze 10°C. Następnie dokonano oceny przeżywalności plemników przechowywanych z dodatkiem frakcjonowanej plazmy nasienia zarówno przed zamrożeniem (Dośw. 2), jak i po rozmrożeniu (Dośw. 3). W tym celu zastosowano różne warianty okresu przechowywania nasienia z dodatkiem rozcieńczalników długoterminowych (2 godz./17°C, HT 1; 24 godz./10°C, HT 2). W Dośw. 2 próby schłodzonego nasienia inkubowano w obecności frakcjonowanej plazmy nasienia uzyskanej po sączeniu molekularnym (SP 1 > 40 kDa i SP 2 < 40 kDa), pełnej plazmy nasienia (wSP) oraz rozcieńczalnika Beltsville Thawing Solution (BTS). Dośw. 3 polegało na dodatku frakcji opisanych w Dośw. 2 do prób zamrażanych-rozmrażanych plemników (PT) pochodzących od knurów produkujących ejakulatory o dobrej i słabej przydatności do kriokonserwacji. Znaczne różnice w parametrach ruchliwości plemników obserwowano zarówno przed zamrożeniem jak i po rozmrożeniu nasienia w zależności od wariantu HT. Wartości charakterystyki kinematycznej ruchu kriokonserwowanych plemników były istotnie wyższe w okresie opłaszczania HT 2. Uzyskano także wyższy odsetek plemników PT z nienaruszonymi błonami plazmatycznymi w okresie opłaszczania HT 2. Analiza SDS-PAGE wykazała zmiany w profilach elektroforetycznych białek membranowych kriokonserwowanych plemników pomiędzy grupami HT. Różnice międzyosobnicze w przeżywalności plemników uwidaczniały się w próbach z dodatkiem SP 1 lub SP 2. W Dośw. 3 wykazano, że dodatek frakcji SP 1 lub SP 2 po rozmrożeniu istotnie obniżył podatność plemników na uszkodzenia w porównaniu z próbami przechowywanymi z BTS. Przeprowadzone badania dowodzą, że przedłużone w czasie schładzanie rozcieńczonego nasienia zwiększa kriotolerancję plemników. Stwierdzono ponadto, że interakcje składników plazmy nasienia z plazmolemą plemników podczas kriokonserwacji zwiększają przeżywalność tych komórek po rozmrożeniu. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą być przydatne w udoskonalaniu technologii kriokonserwacji nasienia knura.

Wawrzyniec - Szeląg

ABSTRACT

Effect of modifications of cryopreservation protocol of boar semen on sperm quality characteristics

Keywords: boar, spermatozoa, fractionated seminal plasma, proteins, cryopreservation

In this study three experiments (Exp. I – Exp. III), based on the modifications of the freezing protocol, were performed to improve the quality of post-thaw (PT) boar semen. Exp. I was performed to investigate the effect of different long-term extenders on PT semen quality following a 24-h holding time (HT) period, whereas the other two experiments were based on the assessment of PT sperm survival following the supplementation of fractionated seminal plasma (SP) to pre-freeze and frozen-thawed semen (Exp. II and Exp. III, respectively). Prior to freezing, semen was diluted in long-term extenders and held at different time periods and temperatures (2h/17°C, HT 1; 24h/10°C, HT 2). Fractionated SP obtained by gel filtration chromatography (SP 1 > 40 kDa and SP 2 < 40 kDa), whole seminal plasma (wSP) and Beltsville Thawing Solution (BTS) were added to the pre-freeze semen at the initial stage of the freezing protocol (Exp. II). In Exp. III fractionated SP was added to frozen-thawed semen from boars with different sperm freezability. Sperm quality characteristics were monitored in the pre-freeze and PT semen. Wide variations in motility characteristics were observed among boars in the pre-freeze and PT semen, irrespective of the HT group. Sperm motility characteristics were significantly higher in the HT 2 group after freezing-thawing. Likewise, higher proportions of frozen-thawed spermatozoa with intact membrane integrity were observed in the HT 2 group. SDS-PAGE analysis of FT spermatozoa showed variations in the amounts of sperm membrane proteins between the HT groups. In Exp. II it was found that boar and treatment were the main sources of variations in PT semen quality. Consistent boar differences in frozen-thawed spermatozoa with intact membrane integrity and viability were more marked in the SP1- and SP2-treated samples. In the third experiment treatment of frozen-thawed semen with either SP 1 or SP 2 significantly improved the sperm survival compared with BTS-treated semen. The results of this study showed that prolonged cooling of extended semen increases the sperm cryo-tolerance. Furthermore, it has been confirmed that the interactions of the SP components with the plasma membrane of spermatozoa, prior to freezing or after freezing-thawing, enhance sperm cryo-survival. The results of this study are useful to improve the cryopreservation of boar semen.

Wanlinda - Schowp