

KRIOKONSERWACJA NASIENIA KNURA – WYBRANE KIERUNKI BADAŃ*

Monika Trzcńska, Magdalena Bryła

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa
e-mail: monika.trzcinska@izoo.krakow.pl

W hodowli trzody chlewnej wykorzystanie mrożonego nasienia knura do zabiegów inseminacyjnych ogranicza się do zwiększenia postępu genetycznego zwierząt. Brak praktycznego wykorzystania nasienia mrożonego w porównaniu z nasieniem przechowywanym w stanie płynnym wynika z podatności plemników knura na uszkodzenia kriogeniczne i skomplikowaną procedurę mrożenia. Proces schładzania, zamrażania i rozmrażania indukuje fizyczne i chemiczne zmiany w błonie komórkowej plemników. Co więcej, wywołany procedurą kriokonserwacji szok chłodowy i stres oksydacyjny, wpływając na błony plazmatyczne plemników, obniżają ich żywotność i zmniejszają efektywność mrożenia. Ponadto, po użyciu do inseminacji nasienia zamrożonego-rozmrożonego uzyskuje się niskie wskaźniki rozrodcze i mniejszą liczebność miotu. Celem artykułu jest podsumowanie wybranych kierunków badań nad czynnikami, które mogą zwiększyć efektywność kriokonserwacji nasienia knura. Jednocześnie została przedstawiona metoda mrożenia nasienia knura opracowana w Instytucie Zootechniki PIB.

Słowa kluczowe: knur, nasienie, rozcieńczalniki mrożeniowe, kriokonserwacja

Pomimo licznych badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji użycie mrożonego nasienia knura w praktyce jest nadal ograniczone i kształtuje się na poziomie poniżej 1% ogólnej liczby wykonywanych zabiegów inseminacyjnych. Niskie wskaźniki rozrodu uzyskiwane po inseminacji loch nasieniem mrożonym wynikają głównie z faktu, iż błona komórkowa plemników knura charakteryzuje się dużą podatnością na uszkodzenia kriogeniczne (Großfeld i in., 2008). Plemniki knura są w dużo większym stopniu wrażliwe na czynniki związane z zamrażaniem niż plemniki innych gatunków zwierząt gospodarskich. Istotnym czynnikiem powodującym zwiększoną wrażliwość plemników na zamrażanie jest wysoki udział wielonienasy-

*Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Zootechniki PIB.

conych kwasów tłuszczowych w lipidach i ich specyficzny skład. W składzie lipidów plemników knura wielonienasycone kwasy tłuszczowe (C22:5 i C22:6) stanowią około 65% całkowitej zawartości wszystkich kwasów tłuszczowych. Stosunek ilościowy kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych w plemniach knura wynosi 3,5, podczas gdy u buhaja i tryka 2,8. Stres osmotyczny, szok chłodowy oraz tworzenie się wewnątrz komórek kryształków lodu powodują uszkodzenia błon plazmatycznych i innych organelli komórkowych plemników knura (Holt, 2000). W konsekwencji po procedurze mrożenia w plemnikach następują zmiany związane z obniżeniem zawartości sfingomieliny przy równoczesnym zwiększeniu poziomu fosfatydylocholiny. Zmiany w interakcjach lipidów plazmolemy kriokonserwowanych plemników oraz naruszenie ich wrażliwości na jony Ca^{2+} skutkują z kolei zaburzeniami w procesie zapłodnienia (Berger i in., 1996).

Pierwsze próby mrożenia nasienia ssaków podejmowane były w XVIII i XIX wieku, ale dopiero w XX wieku opracowano skuteczne metody kriokonserwacji nasienia buhaja (Polge i Rowson, 1952) oraz nasienia ogiera (Polge, 1957). Natomiast w 1957 roku zespół Hessa po raz pierwszy uzyskał prosięta po inseminacji loch rozmrożonym nasieniem knura. Prowadzone przez kolejne lata intensywne badania nad skuteczną i powtarzalną metodą kriokonserwacji nasienia knura doprowadziły do opracowania dwóch metod: amerykańskiej (Pursel i Johnson, 1975) oraz niemieckiej (Westendorf i in., 1975).

Od tego czasu wiele zespołów badawczych podejmowało próby zwiększenia skuteczności kriokonserwacji nasienia knura poprzez modyfikację składu rozrzedzalnika mrożeniowego, jak i opracowanie technologicznych procedur postępowania z nasieniem.

Niniejszy artykuł przedstawia wybrane zagadnienia dotyczące kriokonserwacji nasienia knura, jak również metodę mrożenia opracowaną w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB.

Skład rozcieńczalnika mrożeniowego nasienia knura

Podstawowy skład rozrzedzalnika stosowanego do mrożenia nasienia knura zawiera cukry, substancję krioochronną, żółtko jaja ptaków oraz syntetyczny detergent dodecylsulfian sodu (SDS) (Equex STM lub Orvus ES Paste). Najczęściej w skład rozrzedzalnika mrożeniowego wchodzi cukry proste (glukoza, galaktoza, fruktoza, sorbitol) lub dwucukry (laktoza, laktuloza, trehaloza, melibioza). Są one nie tylko źródłem energii, ale również wywierają pozytywny wpływ na plemniki ochraniając je przed dehydratacją i formowaniem kryształków lodu (Yeste, 2015). Z badań przeprowadzonych przez Gómeza-Fernándeza i in. (2012) wynika, że zastosowanie dwucukrów, a w szczególności trehalozy zapewnia wysoką skuteczność kriokonserwacji. Z kolei badania Malo i in. (2010a) wykazały, że użycie do zapłodnienia *in vitro* plemników kriokonserwowanych w rozrzedzalniku zawierającym trehalozę zapewnia uzyskanie wyższego wskaźnika zapłodnialności (44,8%) w porównaniu z rozrzedzalnikiem z dodatkiem laktozy (28,6%) lub glukozy (34,4%).

W celu ochrony błon plazmatycznych plemników przed uszkodzeniami kriogenicznymi stosuje się związki o działaniu osłaniającym, m.in.: dimetyloformamid, dimetyloacetamid, dimetylosulfotlenek oraz glicerol. Jak wynika z badań przeprowa-

dzonych przez Buhr i in. (2001), glicerol o stężeniu powyżej 4% wpływa negatywnie na zmiany w strukturze lipidów plazmolemy plemnika, obniżając skuteczność kriokonserwacji. Natomiast glicerol dodawany bezpośrednio przed etapem zamrażania o stężeniu wynoszącym 3% (Holt, 2000) lub w przedziale od 2% do 3% (Zeng i in., 2014) zapewnia optymalną ochronę błon komórkowych plemników przed zmianami kriogenicznymi.

Aby utrzymać odpowiednie ciśnienie osmotyczne oraz ograniczyć uszkodzenia błonowe plemników spowodowane przez wolne rodniki tlenowe (ROS), do rozrzedzalnika mroźniowego dodaje się lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), których źródłem jest żółtko jaja ptaków. Najczęściej w celu ochrony plemników przed szokiem chłodowym stosuje się dodatek żółtka jaja kurzego do rozcieńczalnika mroźniowego. Jednakże doświadczenia przeprowadzone przez Fräsera i Strzeżka (2005), wykazały, że LDL ekstrahowane z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo) w większym stopniu niż LDL żółtka jaja kurzego ograniczają negatywne skutki szoku chłodowego plemników knura. Dodatek do rozrzedzalnika mroźniowego LPFo zwiększa odsetek plemników z integralnym DNA (24,4%) w porównaniu ze standardowym rozrzedzalnikiem zawierającym żółtko jaja kurzego (17,8%). Obecnie, badania przeprowadzone przez Wanga i in. (2014) porównujące wpływ frakcji LDL wyekstrahowanej z żółtka jaja różnych gatunków ptaków (kura, struś, kaczka, przepiórka, gołąb) wykazały, że dodatek lipoprotein żółtka jaja gołębia do rozrzedzalnika mroźniowego pozwala na uzyskanie po rozmrożeniu 43,2% plemników ruchliwych, 52,57% plemników żywych z integralnym akrosomem oraz 48,13% plemników z integralną błoną komórkową.

Niezależnie od zastosowanego źródła lipoprotein podczas procesu kriokonserwacji dochodzi do tworzenia agregatów lipoproteinowych, powstających po zmieszaniu żółtka jaja ptasiego z białkami plazmy nasienia (Holt, 2000). Dlatego w celu ograniczenia tego zjawiska do składu rozrzedzalnika mroźniowego stosuje się dodatek syntetycznego detergentu dodecylsulfianu sodu (SDS) (Equex STM lub Orvus ES Paste) (Shimazaki i in., 2015). Jednocześnie prowadzone są badania mające na celu zastąpienie tego składnika rozrzedzalnika mroźniowego substytutami w postaci białek roślinnych (Masoudi i in., 2016).

W ostatnich latach wiele prac poświęconych jest modyfikacji składu rozrzedzalnika mroźniowego w oparciu o dodatek substancji o działaniu antyoksydacyjnym i osłaniającym błony plazmatyczne plemników. Dodatek związków o działaniu antyoksydacyjnym ogranicza negatywne skutki wywołane przez reaktywne formy tlenu (RFT) oraz przyczynia się do wzrostu efektywności kriokonserwacji. Do najczęściej stosowanych antyoksydantów poprawiających jakość nasienia knura po rozmrożeniu można zaliczyć m.in: glutation (Zhang i in., 2012); α -tokoferol (Satorre i in., 2012); dysmutazę ponadtlenkową i/lub katalazę (Roca i in., 2005); kwas askorbinowy w połączeniu z glutationem (Giaretta i in., 2015). Zastosowanie dodatku butylowanego hydroksytoluenu (Roca i in., 2004) oraz L-cysteiny (Malo i in., 2010b) do rozrzedzalnika mroźniowego pozwala na uzyskanie wyższego odsetka plemników z integralnym akrosomem w porównaniu z kontrolą (60,7% vs. 44,07% oraz 61,2% vs. 46,0%).

Związkami o właściwościach osłaniających błony plazmatyczne plemników, które znalazły zastosowanie w kriokonserwacji nasienia knura, są kwas hialuronowy (Peña i in., 2004) i gamma-oryzanol (Kaeoket i in., 2012). Jednocześnie wzbogacenie roz-

rzedzalnika mrożeniowego o 1000 $\mu\text{g/ml}$ kwasu hialuronowego lub 0,1 mg/ml gamma-oryzanol wpływa na wzrost odsetka plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu w porównaniu z rozrzedzalnikiem bez ich dodatku (54,8% vs. 31,9% lub 48,5% vs. 34,0%).

Technologia kriokonserwacji nasienia knura

W Polsce pierwsze próby opracowania metody kriokonserwacji nasienia knura prowadzone były w ośrodkach poznańskim oraz olsztyńskim. W 1985 roku zespół pod kierunkiem prof. Jerzego Strzeżka przedstawił kompleksową metodę kriokonserwacji nasienia knura nazwaną „kortowską metodą zamrażania nasienia knura” (Strzeżek i in., 1985). W wyniku inseminacji loszek nasieniem mrożonym z zastosowaniem metody kortowskiej uzyskano wskaźnik prośności 77,7% oraz wskaźnik efektywności rozrodu loch oproszonych – 11,35 żywych prosiąt w miocie (Strzeżek, 2011).

Pomimo różnic technologicznych wszystkie metody kriokonserwacji składają się z podobnych etapów postępowania z nasieniem: pobieranie, schładzanie, zagęszczanie, ekwilibracja, glicerolizacja, zamrażanie i rozmrażanie.

Do kriokonserwacji wykorzystuje się frakcję gęstą ejakulatu, a zastosowanie pierwszych 10 ml tej frakcji do mrożenia (Saravia i in., 2010) oraz pobieranie ejakulatu w okresie zimowym i wiosennym (Barranco i in., 2013) powoduje wzrost efektywności tego procesu. Frakcję gęstą należy przechowywać do momentu rozpoczęcia procedury w temperaturze 15–17°C (Rodriguez-Gil, 2006; Casas i Althouse, 2013). Minimalny zalecany czas przechowywania nasienia knura w komercyjnym rozcieńczalniku wynosi od 1 do 3 godzin, jednakże większość protokołów mrożeniowych sugeruje wydłużenie tego czasu nawet do 24 godzin. Jak donoszą Casas i Althouse (2013), takie postępowanie może dodatkowo stabilizować lipidy w błonie komórkowej plemników knura, poprawiając efektywność kriokonserwacji.

Do kriokonserwacji kwalifikuje się ejakulaty, w których stwierdza się minimum 70% plemników ruchliwych i 80% prawidłowych morfologicznie. Jednocześnie ze względu na zmienność osobniczą w zamrażalności nasienia pomiędzy knurami wprowadza się dodatkową selekcję osobników na podstawie ruchliwości plemników ocenianej po rozmrożeniu. Roca i in. (2006) dzielą knury na trzy grupy o wysokiej („good freezers”), średniej („moderate freezers”) oraz niskiej przydatności do mrożenia („poor freezers”), u których ruchliwość plemników po rozmrożeniu wynosi odpowiednio >60%, 40–60% oraz <40%. Użycie do inseminacji mrożonego nasienia knurów z pierwszej grupy pozwala na uzyskanie wyższego wskaźnika płodności (53,8%) w porównaniu z wynikami uzyskanymi po inseminacji nasieniem o niższej jakości (26,3%) (Casas i in., 2009). Jednocześnie badania przeprowadzone przez Hernández i in. (2007) wykazały, że dodatek do rozcieńczalnika mrożeniowego 5% plazmy nasienia knurów o wysokiej jakości zmniejsza wrażliwość plemników na szok chłodowy. Najnowsze badania przeprowadzone przez Fernández-Gago i in. (2016) wykazały, że 4-godzinna inkubacja plemników po rozmrożeniu w rozrzedzalniku z dodatkiem 50% plazmy nasienia zmniejsza podatność chromatyny plemnikowej na uszkodzenia powstałe podczas procesu kriokonserwacji.

Innym rozwiązaniem technologicznym w kriokonserwacji nasienia jest zastosowanie dializ nasienia jako etapu tego procesu. Dializy pozwalają zredukować nie-

korzystne dla plemników substancje peptydowe oraz wolne jony nieorganiczne. Z badań przeprowadzonych przez Fräsera i in. (2007) wynika, że zastosowanie dializy pozwala na uzyskanie po rozmrożeniu wyższego odsetka plemników z integralną błoną komórkową (52,8%) w porównaniu z nasieniem niepoddanym dializie (43,7%).

Ważnym etapem procesu kriokonserwacji jest właściwy wybór sposobu konfekcjonowania nasienia. Mogą to być duże słomki okrągłe-makro i mikro-tuby, płaskie słomki, kulki lub plastikowe torebki. Obecnie stosuje się słomki o mniejszej pojemności (0,5 ml), które zmniejszają różnice przepływu szybkości temperatur zamrażania i rozmrażania w obrębie słomki poprzez zwiększenie stosunku powierzchni do objętości (Didion i in., 2013). Zalecana temperatura zamrażania nasienia w takich słomkach wynosi 30°C/min przy 3% stężeniu glicerolu (Fiser i Fairfull, 1990). Zastosowanie 0,5 ml słomek zwiększa przeżywalność plemników po rozmrożeniu w porównaniu do plemników zamrożonych i rozmrożonych w dużych słomkach o pojemności 5–6 ml. W słomkach tych temperatura zamrażania powinna wynosić 16°C/min przy 3,3% stężeniu glicerolu (Park i Pursel, 1985).

Kompleksowa technologia kriokonserwacji nasienia knura opracowana w IZ PIB

W Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB od kilku lat prowadzono prace nad opracowaniem składu rozrzedzalnika mroźeniowego, jak również sposobu postępowania z nasieniem knura podczas mrożenia. Realizacja prac była możliwa w ramach projektu badawczego nr N311 524840 pt.: „Antyoksydanty i nowe związki osłaniające w kriokonserwacji nasienia knura ocenianego przy zastosowaniu markerów apoptotycznych” oraz działalności statutowej IZ PIB. Poprawę efektywności kriokonserwacji nasienia knura planowano osiągnąć poprzez dodatek substancji przeciwdziałających procesom oksydacyjnym oraz substancji o właściwościach osłaniających wrażliwe na uszkodzenia kriogeniczne błony plazmatyczne plemników. W badaniach zastosowano suplementację rozrzedzalnika żółtkowo-laktozowo-glicerolowego wybranymi antyoksydantami (glutation, butylowany hydroksytoluen, dysmutaza nadtlenkowa i/lub katalaza) oraz solą sodową kwasu hialuronowego jako substancją osłaniającą. Jakość nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu oceniano na podstawie odsetka plemników wykazujących ruch całkowity i postępowy, odsetka plemników żywych ocenianych za pomocą markerów apoptotycznych (YOPRO-1/PI, Annexin V-Fluos/PI), odsetka plemników żywych z integralnym akrosomem (PNA-FITC/PI), plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym (JC-1) oraz odsetka plemników niewykazujących fragmentacji DNA (TUNEL). Na podstawie przeprowadzonych badań (Trzcińska i Bryła, 2015; Trzcińska i in., 2015; Bryła i Trzcińska, 2014) opracowano nowy skład rozcieńczalnika mroźeniowego i technologię kriokonserwacji nasienia knura. Opracowany nowy rozrzedzalnik do kriokonserwacji nasienia knura zawiera następujące części składowe:

– wyekstrahowany etanolem butylowany hydroksytoluen (BHT; 2,6-bis(1,1-dimetyloetylo)-4-metylofenol) dodawany w ilości 1 mmol do rozrzedzalnika zawierającego glicerol;

- rozrzedzalnik żółtkowo-laktozowy zawierający w swoim składzie 80% laktozy oraz 20% żółtka jaja kurzego;
- rozrzedzalnik zawierający glicerol jako związek osłaniający uzyskany poprzez dodanie 9% glicerolu oraz 1,5% Equex-STM® do 89,5% rozrzedzalnika żółtkowo-laktozowego.

Technologię kriokonserwacji nasienia knura według metody własnej przedstawiono w instrukcji wdrożeniowej (Trzcńska i in., 2013). Zamrożone nasienie przechowywano w ciekłym azocie (-196°C) przez okres dwóch tygodni (Trzcńska i in., 2015). W celu określenia skuteczności zastosowanego rozcieńczalnika mrozeniowego opracowano metodę chirurgicznej inseminacji loszek na potrzeby nowej technologii kriokonserwacji nasienia knura (Trzcńska i in., 2014). Dzięki zastosowaniu tej metody inseminacji możliwe było wprowadzenie do dróg rodnych samicy niewielkiej dawki rozmrożonego nasienia (1×10^9). Jednocześnie w celu optymalizacji wyników płodności zabieg inseminacji loszek kriokonserwowanym nasieniem wykonano około 4–6 godzin przed owulacją. Przeprowadzone inseminacje nasieniem kriokonserwowanym w rozrzedzalniku żółtkowo-laktozowo-glicerolowym z dodatkiem 1 mM butylowanego hydroksytoluenu pozwoliły na uzyskanie wskaźnika płodności rzędu 86,7% i średnio $10,8 \pm 1,6$ prosięcia w miocie. Niższe wskaźniki płodności i średnią liczbę prosiąt w miocie po inseminacji kriokonserwowanym nasieniem uzyskali zarówno Roca i in. (2003) (70% i $9,25 \pm 0,23$), jak i Bolarin i in. (2008) (71,3% i $10,3 \pm 0,3$). Natomiast po inseminacji nasieniem mrożonym w rozrzedzalniku z dodatkiem 2 mM glutationu zespół Estrady (2014) uzyskał wyższy wskaźnik płodności (92,7%) oraz wyższą liczbę urodzonych prosiąt w miocie ($13,0 \pm 1,0$).

Opracowana własna metoda mrożenia nasienia knura pozwala na uzyskanie zadowalających wskaźników płodności porównywalnych do uzyskiwanych po inseminacji nasieniem płynnym (Trzcńska i in., 2011; Bryła i Trzcńska, 2015) i może znaleźć zastosowanie w bankach zwierzęcego materiału biologicznego.

Piśmiennictwo

- Barranco I., Ortega M.D., Martinez-Alborcia M.J., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. (2013). Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. *Cryobiology*, 67: 299–304.
- Berger T., Anderson D.L., Penedo M.C.T. (1996). Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.*, 44: 231–239.
- Bolarin A., Hernandez M., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. (2008). Influence of seasonality on reproductive performance of sows inseminated with frozen-thawed semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43, p. 66.
- Bryła M., Trzcńska M. (2014). Zastosowanie związków osłaniających w kriokonserwacji nasienia knura. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 41 (1): 33–39.
- Bryła M., Trzcńska M. (2015). Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. *Anim. Reprod. Sci.*, 163: 157–163.
- Buhr M.M., Fiser P., Bailey J.L., Curtis E.F. (2001). Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl.*, 2: 961–969.
- Casas I., Althouse G.C. (2013). The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. *Cryobiology*, 66: 69–75.

- Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S. (2009). Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, 118: 69–76.
- Didion B.A., Braun G.D., Duggan M.V. (2013). Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim. Reprod. Sci.*, 137: 189–196.
- Estrada E., Rodríguez-Gil J., Rocha L.G., Balasch S., Bonet S., Zeste M. (2014). Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2: 88–99.
- Fernández-Gago R., Álvarez-Rodríguez M., Alonso M.E., González J.R., Alegre B., Domínguez J.C., Martínez-Pastor F. (2016). Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations. *Reprod. Fert. Develop.*; doi: 10.1071/RD15530.
- Fiser P.S., Fairfull R.W. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.*, 25: 123–129.
- Fraser L., Strzeżek J. (2005). Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod. Domest. Anim.*, 40: 530–536.
- Fraser L., Dziekońska A., Strzeżek R., Strzeżek J. (2007). Dialysis of boar semen prior to freezing–thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*, 67: 994–1003.
- Giaretta E., Estrada E., Buccì D., Spinaci M., Rodríguez-Gil J.E., Yeste M. (2015). Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 83: 399–407.
- Gómez-Fernández J., Gómez-Izquierdo E., Tomás C., Mocé E., de Mercado E. (2012). Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 133: 109–116.
- Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M.C., Rath D. (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, 7: 1225–1233.
- Hernández M., Roca J., Calvete J.J., Sanz L., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2007). Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl.*, 28: 689–697.
- Hess E.A., Teague H.S., Ludwick T.M., Martig R.C. (1957). Swine can be bred with frozen semen. *Ohio Fm. Home Res.*, 42, p. 100.
- Holt W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 3–22.
- Kaeket K., Donto S., Nualnoy P., Noiphinit J., Chanapiwat P. (2012). Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 1149–1153.
- Malo C., Gil L., Gonzalez N., Cano R., de Blas I., Espinosa E. (2010a). Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*, 61: 17–21.
- Malo C., Gil L., Gonzalez N., Martínez F., Cano R., de Blas I., Espinosa E. (2010b). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61: 142–147.
- Masoudi R., Sharafi M., Zareh Shahneh A., Towhidi A., Kohram H., Esmaeili V., Shahverdi A., Davachi N.D. (2016). Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*; doi:10.1016/j.cryobiol.2016.05.010.
- Park C.S., Pursel V.G. (1985). Effect of freezing rate on boar sperm frozen in maxi-straws. *J. Anim. Sci.*, 61, p. 411.
- Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez-Martínez H. (2004). Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Theriogenology*, 61: 63–67.
- Polge C. (1957). Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.*, 147: 498–508.
- Polge C., Rowson L.E.A. (1952). Results with bull semen stored at -79°C . *Vet. Rec.*, 64: 851–853.

- Pursel V.G., Johnson L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40: 99–102.
- Roca J., Carvajal G., Lucas X., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 60: 77–87.
- Roca J., Gil M.A., Hernandez M., Parrilla I., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.*, 25: 397–405.
- Roca J., Rodríguez M.J., Gil M.A., Carvajal G., Garcia E.M., Cuello C., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.*, 26: 15–24.
- Roca J., Hernández M., Carvajal G., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2006). Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, 84: 2692–2699.
- Rodríguez-Gil J.E. (2006). Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod. Domest. Anim.*, 41: 11–20.
- Saravia F., Wallgren M., Rodríguez-Martínez H. (2010). Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. *Anim. Reprod. Sci.*, 117: 279–287.
- Satorre M.M., Breininger E., Beconi M.T. (2012). Cryopreservation with α -tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*, 78: 1548–1556.
- Shimazaki M., Sambuu R., Sato Y., Kim Do L.T., Tanihara F., Taniguchi M., Otoi T. (2015). Effects of Orvus ES Paste on the motility and viability of yak (*Bos grunniens*) epididymal and ejaculated spermatozoa after freezing and thawing. *Cryo-Lett.*, 36: 264–269.
- Strzeżek J. (2011). Kriobank nasienia knura w Polsce – potrzeba i możliwość utworzenia. *Informator SHiUZ 50/3/2011*.
- Strzeżek J., Głogowski J., Hopfer E., Wojtkiewicz K. (1985). Kortowska metoda zamrażania nasienia knura. *Med. Weter.*, 41: 349–353.
- Trzcńska M., Bryła M. (2015). Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18: 473–480.
- Trzcńska M., Bryła M., Smorąg Z. (2011). Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced in vivo. *Anim. Reprod. Sci.*, 124: 90–97.
- Trzcńska M., Bryła M., Gogol P., Cegła M. (2013). Kriokonserwacja nasienia knura, Wyd. IZ PIB, ss. 1–12.
- Trzcńska M., Bryła M., Gajda B. (2014). Domaciczna inseminacja loszek przy użyciu kriokonserwowanego nasienia knura. *Wyd. IZ PIB*, ss. 1–12.
- Trzcńska M., Bryła M., Gajda B., Gogol P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 83: 307–313.
- Wang P., Wang Y.F., Wang C.W., Bu S.H., Hu J.H., Li Q.W., Pang W.J., Yang G.S. (2014). Effects of low-density lipoproteins extracted from different avian yolks on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. *Zygote*, 22: 175–178.
- Westendorf P., Richter L., Treu H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 82: 261–267.
- Yeste M. (2015). Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. *Reprod. Domest. Anim.*, 50: 71–79.
- Zeng C., Tang K., He L., Peng W., Ding L., Fang D., Zhang Y. (2014). Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, 68: 395–404.
- Zhang W., Yi K., Chen C., Hou X., Zhou X. (2012). Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 132: 123–128.

MONIKA TRZCIŃSKA, MAGDALENA BRYŁA

Boar semen cryopreservation – some lines of research

SUMMARY

In commercial pig production, frozen-thawed boar semen for artificial insemination is mostly used to improve the genetic progress. This semen has not been used under production conditions as efficiently as liquid-preserved semen, due to the high susceptibility of boar spermatozoa to damage during cryopreservation and a complicated process of deep freezing. The processes of cooling, freezing, and thawing produce physical and chemical stress on the sperm membrane. Moreover, the cryopreservation protocol produced cold shock and oxidative stress on the sperm membrane, which decreased sperm survival and freezing effectiveness. Therefore, the artificial insemination with frozen-thawed boar semen still results in low conception rate and small litter sizes. The purpose of this paper is to summarize selected knowledge about factors that may contribute positively to increasing the effectiveness of boar semen cryopreservation. The review also represents the methodology of boar semen cryopreservation developed by the National Research Institute of Animal Production.

Key words: boar, semen, freezing extenders, cryopreservation