

to liquid nitrogen. One-step system of quick thawing was used to remove a protective substance. The highest survival rate was observed after freezing in a solution of 1.0 M propanediol and 0.1 M saccharose: 95.8% of developing germs in vitro and 39.7% in vivo were observed. Apart from a satisfactory effect the advantage of the method was its simplicity without

the necessity to use a special apparatus for freezing. No development of the germs frozen in 0.1 M solution of propanediol or 0.01 M sol. of saccharose was found. In contrast, 32 per cent of developing germs was observed if they were frozen in a solution of propanediol (1.0 M) and saccharose (0.01 M), and 12 per cent when frozen in 0.8 M sol. of saccharose.

ROMAN SŁAWETA, WACŁAW AKSIUTO\*, JERZY KOBLAŃSKI, GRAZYNA SOSIŃSKA\*\*

## Badania nad wpływem dodatku glutationu (GSH) na jakość konserwowanego nasienia buhaja<sup>1)</sup>

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna

\* Stacja Hodowli i Unasienniania Zwierząt, ul. Bydgoska 1/3, 10-243 Olsztyn

\*\* Stacja Hodowli i Unasienniania Zwierząt w Kocierzowach, 97-345 Gunned

Plemniki buhaja w warunkach tlenowych ulegają szybkiemu procesowi starzenia się, przejawiającego się obniżeniem funkcji metabolicznych takich jak fruktoliza i oddychanie (14). W obecności tlenu oddychanie nie opiera się wyłącznie na substratach pozakomórkowych, lecz także występuje zjawisko polegające na utlenianiu składników komórki, głównie lipidów (15).

W wyniku peroksydacji lipidów błon komórkowych dochodzi do nagromadzenia się plemnikobójczych nadtlenuków (10, 11), które powodują zaburzenia biochemiczne dotyczące aktywności oddechowej plemników, fruktolizy i syntezy ATP (2, 16).

Ponadto w procesie konserwacji plemników buhaja, średnio około 30% komórek ulega uszkodzeniu, w wyniku czego dochodzi do uwalniających się plemników oksydazy L-aminokwasów (17). Enzym ten katalizuje reakcję utleniania L-tyrozyny, L-fenylalaniny oraz L-tryptofanu, zawartych w nasieniu buhaja oraz żółtku jaja kurzego, stanowiącego komponent rozrzedzalnika do konserwacji plemników (19). Jednym z końcowych produktów tej przemiany jest  $H_2O_2$  (12). Przeprowadzona analiza poziomu nadtlenuków lipidów w nasieniu buhaja poddanemu konserwacji i przechowywanemu w ciekłym azocie, wykazała około 8-krotny ich wzrost w stosunku do nasienia świeżego (12). Związkiem obniżającym szybkość procesów peroksydacji jest glutation (GSH) będący substratem w systemie enzymatycznym peroksydaza-reduktaza (4).

Stąd przeprowadzone badania, których celem była ocena ruchu postępowego plemników oraz wartości biologicznej nasienia konserwowanego z dodatkiem glutationu zredukowanego w rozrzedzalniku mlekowo-żółtkowo-glicerolowym.

### Materiał i metody

Oceny wartości biologicznej nasienia konserwowanego w rozrzedzalniku mlekowo-żółtkowo-glicerolowym dokonano na 30 ejakulatach od 6 buhajów rasy

czarno-białej w wieku 18 miesięcy, użytkowanych w SHiUZ Olsztyn. Ejakulatory, w których odsetek plemników o ruchu postępowym był wyższy niż 60%, dzielono na dwie równe porcje i rozcieńczano rozrzedzalnikiem złożonym z: 78% odtłuszczonego mleka, 15% żółtka jaja kurzego, 7% glicerolu, 2g fruktozy/100 ml, penicyliny i streptomycyny (500 i.u./ml). Rozrzedzalnik ten opracowano w IGIHZ PAN w Jastrzębcu (22).

Wstępnie ejakulatory rozcieńczono do połowy objętości końcowej (nasienie plus rozrzedzalnik) rozrzedzalnikiem bez glicerolu i w okresie 1 godziny schładzano w lodówce do 4°C. Następnie uzupełniono do objętości końcowej rozrzedzalnikiem o 4°C z glicerolem, zaś próby doświadczalne zawierały dodatkowo GSH. Końcowe stężenie glicerolu w próbach nasienia było stałe i wynosiło 3,5% (24), zaś GSH 5mM (20). Po 2,5 godzinnej ekwilibracji nasienia (13) próby zamrażano na suchym lodzie. W dawce o objętości 0,1 ml było około  $30 \times 10^6$  plemników.

W okresie od maja do grudnia 1984 r. unasienniono po raz pierwszy 1118 krów, z czego 470 nasieniem z dodatkiem GSH, zaś 648 stanowiło grupę kontrolną. Skuteczność zabiegów ustalano wstępnie do 60 dnia od daty pierwszego zabiegu unasienniania, na podstawie niepowtarzalności rui (NR/60). Następnie powyżej 90 dnia lekarze weterynarii przeprowadzali ponowne badania w celu stwierdzenia ciąży. Ponadto 144 ejakulatory pozyskane w okresie roku od 20 buhajów użytkowanych w SHiUZ Kocierzowy, konserwowano według wyżej opisanej metody i oceniano ruch postępowy plemników w nasieniu bezpośrednio po rozmrożeniu oraz 3 i 5-godzinnej inkubacji w 37°C. Próby nasienia rozmrażano w 1 ml 0,9% NaCl.

W statystycznej analizie wyników wartości biologicznej nasienia zastosowano test różnicy między dwoma frakcjami. Dla oceny wpływu egzogenego GSH na ruch plemników przeprowadzono analizę wariacji jednoczynnikowej w układzie ortogonalnym. Istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami określano testem t Studenta.

### Wyniki i omówienie

W nasieniu, bezpośrednio po rozmrożeniu, średni odsetek plemników o ruchu postępowym w próbach nasienia zawierających GSH był wyższy o 2,8% (różnica przy  $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do prób kontrolnych. W teście oporności w temperaturze 37°C po 3- i 5-godzinnej inkubacji, w nasieniu poddanym konserwacji bez dodatku GSH, liczba plemników o zachowanym ruchu była niższa odpowiednio o 6,4% i 8,4% (różnica przy  $p \leq 0,01$ ) w stosunku do wartości uzyskanych dla prób z GSH (tab. 1).

<sup>1)</sup> Praca wykonana w ramach podproblemu MR II.10.1. Fizjologia Rozrodu.

Tab. 1. Ruch postępowy plemników buhaja (wyrażony w procentach) nasienia konserwowanego bez i z glutationem (GSH) obserwowany w nasieniu bezpośrednio po rozmrożeniu i inkubacji w 37°C oraz wartość testu F

Czas inkubacji	Miary statystyczne	Ruch postępowy plemników		Wartość F
		- n=144	+GSH n=144	
0 godz.	$\bar{x}$	30,3	33,1 <sup>A</sup>	9,6**
	s	8,5	7,3	
3 godz.	$\bar{x}$	17,9	24,3 <sup>B</sup>	33,9**
	s	10,3	9,1	
5 godz.	$\bar{x}$	5,2	13,6 <sup>C</sup>	95,6**
	s	6,2	8,4	

Objaśnienia:  $\bar{x}$  — średnia arytmetyczna, s — odchylenie standardowe, A, B, C — różnice istotne przy  $p \leq 0,01$ , istotność F \*\* przy  $p \leq 0,01$ .

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotny ( $p \leq 0,01$ ) wpływ egzogenego GSH na liczbę plemników o ruchu postępowym nasienia bezpośrednio po rozmrożeniu i poddanego 3- i 5-godzinnej inkubacji w 37°C. Zatem egzogeny GSH zabezpiecza funkcje metaboliczne plemników związane z wytwarzaniem energii niezbędnej dla zachowania ruchu. Obserwacje te są zgodne z danymi innych autorów, którzy stwierdzili dodatni wpływ egzogenego glutationu zredukowanego na liczbę plemników o zachowanym ruchu (7, 8, 20, 21).

Omawiane zjawisko może być związane ze stymulacją procesów fruktolizy nasienia, w której GSH jest koenzymem dehydrogenazy aldehydu 1,3-dwufosfoglicerynowego (9). W poprzednich badaniach wykazano bowiem zależną od GSH stymulację fruktolizy nasienia mierzoną ilością powstającego mleczanu (23). Ponadto wymieniony peptyd jako związek obniżający proces peroksydacji lipidów podtrzymuje ruch plemników, gdyż produkty peroksydacji powodują zaburzenia w aparacie ruchu męskich komórek płciowych (1, 5).

Dane dotyczące wartości biologicznej nasienia buhajów konserwowanego z egzogenym GSH stwierdzone na podstawie liczby krów nie powtarzających rui do 60 dnia po pierwszym zabiegu unasienniania i badania na ciążę powyżej trzeciego miesiąca od daty inseminacji zawarto w tabeli 2.

Tab. 2. Wartość biologiczna rozmrożonego nasienia buhaja konserwowanego bez i z glutationem (GSH) na podstawie liczby krów nie powtarzających rui do 60 dnia (NR/60) i badania na ciążę w trzech rejonach stacji

Rejon	Ogólna liczba krów unasiennionych (szt)		Liczba krów nie powtarzających rui do 60 dnia (szt)		Wskaźnik NR/60 (%)		Liczba krów cielných (szt)		Wskaźnik cielnosci (%)	
	-	+GSH	-	+GSH	-	+GSH	-	+GSH	-	+GSH
I	265	100	190	52 <sup>A</sup>	71,6	52,0 <sup>A</sup>	128	46	48,3	46,0
II	197	241	118	161	59,9	66,8	101	142	51,2	58,9
III	186	129	140	96	75,2	74,4	122	96	65,5	74,4
suma	648	470	448	309 <sup>a</sup>	69,1	65,7 <sup>a</sup>	351	284 <sup>a</sup>	54,1	60,4 <sup>a</sup>

Objaśnienia: a — różnica istotna przy  $p \leq 0,05$ , A — różnica istotna przy  $p \leq 0,01$ .

W rejonie pierwszym średni odsetek krów nie powtarzających rui do 60 dnia (NR/60) po pierwszym zabiegu unasienniania nasieniem zawierającym GSH wyniósł 52,0% i był niższy o 19,6% w stosunku do nasienia konserwowanego bez GSH (różnica przy  $p \leq 0,01$ ), zaś w rejonie drugim wartość wskaźnika NR/60 dla grupy doświadczalnej i kontrolnej wyniosły odpowiednio 66,8% i 59,9% (różnica przy  $p > 0,05$ ). Rejon trzeci charakteryzował się podobnymi wskaźnikami niepowtarzalności rui i wyniósł dla obydwu grup około 75%. Średnia wartość wskaźnika NR/60 z trzech rejonów u krów inseminowanych nasieniem z GSH wyniosła 65,7% i była niższa o 3,4% (różnica przy  $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej.

Przeprowadzone badania na ciążę krów z rejonu pierwszego, inseminowanych nasieniem z GSH wykazały 46,0% krów cielných, zaś w grupie kontrolnej 48,3%. Zarówno w rejonie drugim, jak i trzecim, liczba krów cielných inseminowanych nasieniem z GSH była wyższa odpowiednio o 7,7% i o 8,9% (różnica przy  $p > 0,05$ ) w stosunku do nasienia bez dodatku GSH. Ogólnie średni wskaźnik cielnosci u krów w trzech rejonach wyniósł dla nasienia z GSH — 60,4%, zaś dla nasienia kontrolnego — 54,1%. Stwierdzona 6,3% różnica okazała się istotna ( $p \leq 0,05$ ).

Rezultaty te wskazują, że dodatek GSH do nasienia, o stężeniu 5 mM, zwiększa istotnie liczbę krów cielných, aczkolwiek wskaźnik niepowtarzalności rui do 60 dnia u krów inseminowanych nasieniem z dodatkiem GSH był istotnie niższy w porównaniu do wartości uzyskanych dla nasienia kontrolnego.

Wykazane różnice w przypadku obserwacji rui mogą wynikać z faktu występowania rui mimo zacielenia się lub odwrotnie — braku rui z jednoczesnym niezacieleniem. Ponadto, jak wynika z danych przedstawionych w tab. 2, rejon pierwszy charakteryzował się bardzo dużą różnicą, bo aż 23,3% między obserwacjami rui a stwierdzoną cielnoscią u krów inseminowanych nasieniem kontrolnym, zaś w tym samym rejonie różnica dla nasienia doświadczalnego wyniosła 6,0%. W pozostałych dwóch rejonach różnice pomiędzy wskaźnikami NR/60 a



cielnością dla obydwu grup nasienia wyniosły od 9,7% do 7,9%, a w jednym przypadku różnica ta nie wystąpiła. Zatem istnieje duże prawdopodobieństwo, iż na wskaźnik NR/60 w rejonie pierwszym miało wpływ występowanie zakłóceń płodności u krów, lub też wykonawstwo zabiegów unasiwienia.

Tym niemniej zwraca uwagę niską, bo 5,3% różnicą między wskaźnikiem niepowtarzalności rui a badaniami na cielność krów inseminowanych nasieniem z egzogennym GSH. W przypadku zaś nasienia kontrolnego, różnica ta była wyższa i wyniosła 15,0% (tab. 2).

Dane te potwierdzają, wcześniejsze obserwacje, z których wynika, że w nasieniu poddanym konserwacji bez dodatku GSH mają miejsce intensywniejsze procesy starzenia się plemników, przejawiające się niższym odsetkiem plemników o zachowanym ruchu postępowym w porównaniu do prób z GSH. Uzyskana zaś wyższa wartość wskaźnika niepowtarzalności rui do 60 dnia u krów inseminowanych nasieniem bez GSH w porównaniu do nasienia z GSH, może mieć związek z wczesnym zamieraniem zarodków, wskutek czego występuje za-blokowanie cyklu płciowego poprzez progesteron produkowany w utrzymującym się ciałku żółtym rzekomociażowym, pozostałym po obumarłym zarodku.

Uzyskane rezultaty badań dotyczące wskaźnika NR/60 dla obydwu grup, są zgodne z obserwacjami Goosensa i wsp. (6). Autorzy ci wykazali, że wartość biologiczna (NR/60) nasienia konserwowanego w kulkach i zawierającego  $10 \times 10^6$  plemników żywych, wyniosła od 65,1% do 68,4%. Z kolei Bortoff (3) stwierdził, że odsetek krów nie powtarzających rui pomiędzy 60 a 90 dniem, inseminowanych nasieniem z dodatkiem 4 mM GSH, wyniósł 69,4%, zaś bez GSH — 58,3% (różnica przy  $p > 0,05$ ).

#### Wnioski

1. Dodatek 5 mM GSH do mrożonego nasienia buhaja istotnie ( $p \leq 0,05$ ) zwiększa jego wartość biologiczną.

2. Różnica pomiędzy wskaźnikiem niepowtarzalności rui do 60 dnia, a badaniem na cielność powyżej 90 dnia wyniosła dla krów inseminowanych nasieniem z GSH — 5,3%, zaś bez GSH — 15,0%.

3. Egzogenny GSH istotnie ( $p \leq 0,01$ ) podtrzymuje ruchliwość nasienia buhaja po rozmrożeniu oraz poddanego testowi oporności w temperaturze 37°C.

#### Piśmiennictwo

1. Alvarez J. G., Storey B. T.: Biol. Reprod. 27, 1102, 1982.
2. Bar-Sagi D., Mayevsky A., Bortoff B.: J. appl. Physiol. Resp. Environ. exer. Physiol. 50, 531, 1981.
3. Bortoff A.: Anat. Rec. 3, 631, 1955.
4. Christophersen B. O.: Biochim. biophys. Acta 164, 35, 1968.
5. Diezel W., Engel S., Sonnichsen N., Horne W. E.: Andrologia 12, 167, 1980.
6. Goosens J. M. M., Berg T. P. R., van Der.: Theriogenology 14, 429, 1980.

7. Gupta H. P., Tripathi S. S.: Indian J. Anim. Sci. 35, 755, 1983.
8. Gupta H. P., Tripathi S. S.: Indian J. Anim. Sci. 34, 494, 1984.
9. Jocelyn P. C.: Biochemistry of the SH groups. Academic Press London, New York, 1972.
10. Jones R., Mann T.: Proc. R. Soc. Ser. B. 184, 103, 1973.
11. Jones R., Mann T.: Proc. R. Soc. Ser. B. 193, 317, 1976.
12. Lubarda Z., Sirzech J.: Mat. XXI Zjazdu nauk. PTB 1985, s. 181.
13. Koyama H., Nawa T.: Biol. Labor. A. J. Iwata Univ. 1, 42, 1981.
14. Mann T., Lutwak-Mann C.: Aging Gametes, J. Blandau, S. Karger, Basel, 122, 1975.
15. Mann T., Jones R., Sherwin R.: Testicular Development, Structure and Function. A. Streiber, E. Streiber, New York, 497, 1980.
16. Mann T., Lutwak-Mann C.: Male Reproductive Function and Semen, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981.
17. Shannon P., Curson B.: J. Dairy Sci. 55, 614, 1972.
18. Shannon P., Curson B.: J. Reprod. Fert. 64, 463, 1982.
19. Shannon P., Curson B.: N. Z. J. agric. Res. 26, 85, 1983.
20. Shannon P., Curson B., Pitt C. J., Lai K. C.: N. Z. J. agric. Res. 26, 297, 1983.
21. Świątek L.: Medycyna Wet. 29, 11, 1973.
22. Świątek R., Sirzech J., Sosinska G.: Mat. Międz. Symp. nauk. Olsztyn, 1983, s. 23.
23. Świątek R., Wiecherek M., Łaskowska T.: Mat. XXI Zjazdu nauk. PTB 1985, s. 357.
24. Sirzech J., Torcia J., Głogowski J., Świątek R., Koziorowski M.: Medycyna Wet. 39, 202, 1983.

Adres autora: dr Roman Świątek, ul. Bełska 28 m. 20, 02-638 Warszawa

Славета Р., Аксюто В., Коблянский Е., Сосинская Г. — Исследования влияния добавки глутатиона на качество консервированного бычьего семени

Выполнили исследования с целью наблюдения за биологическими изменениями в семени, подвергнутому консервации в низких температурах в молочно-желточно-глицероловом разбавителе с добавкой 5 mM глутатиона.

Наблюдали, что экзогенный глутатион существенно ( $p \leq 0,01$ ) увеличивал число живчиков с поступательным движением в семени непосредственно после разморозения, а также 3- и 5-часовой инкубации в 37°C.

Сверх того на основе проведенного биологического испытания на 1118 коровах, 470 из которых инсеминировали семенем с глутатионом, а 648 составляло контрольную группу, отметили у коров, инсеминированных семенем без глутатиона, что разница между показателем неповторяемости охоты до 60 дня а исследованиями на стельность свыше 90 дня составляла 15,0%, для коров же инсеминированных семенем с глутатионом — 5,3%. Это внушает увеличенную зародышевую замираемость в контрольной группе.

Средний процент стельных коров, инсеминированных семенем с глутатионом, составил 60,4%, контрольных же 54,1% (разница при  $p \leq 0,05$ ).

Świątek R., Aksiuto W., Koblański J., Sosinska G. — Effect of glutathione (GSH) on the quality of the preserved semen of bulls

The aim of the work was to trace the biological changes taking place in the semen preserved at low temperatures in the presence of a solution containing milk, yolk and glycerol and the same solution with the addition of 5 mM glutathione (GSH). It was found that ectogenous GSH increased significantly the number of spermatozoons ( $P \leq 0,01$ ) with the progressive move directly after thawing and also after 3 and 5 hour incubation at 37°C. Besides, out of 470 cows inseminated with the addition of GSH and 648 control cows inseminated without GSH the difference between the index of non-repeating heat up to 60 days and the results of examinations toward pregnancy after 90 days was 15,0%, and in cows inseminated without the component only 5,3%. This suggests an increased embryonal death in the control group. A mean percentage of pregnant cows inseminated with the addition of GSH was 60,4% and in the control group 54,1% ( $P \leq 0,05$ ).