

Stres oksydacyjny w kriokonserwowanym nasieniu neosamców oraz normalnych samców pstrąga tęczowego

Sylwia Judycka^{1*}, Mariola Słowińska¹, Joanna Nynca¹, Ewa Liszewska¹, Stefan Dobosz², Andrzej Ciereszko¹

¹Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

²Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

WSTĘP

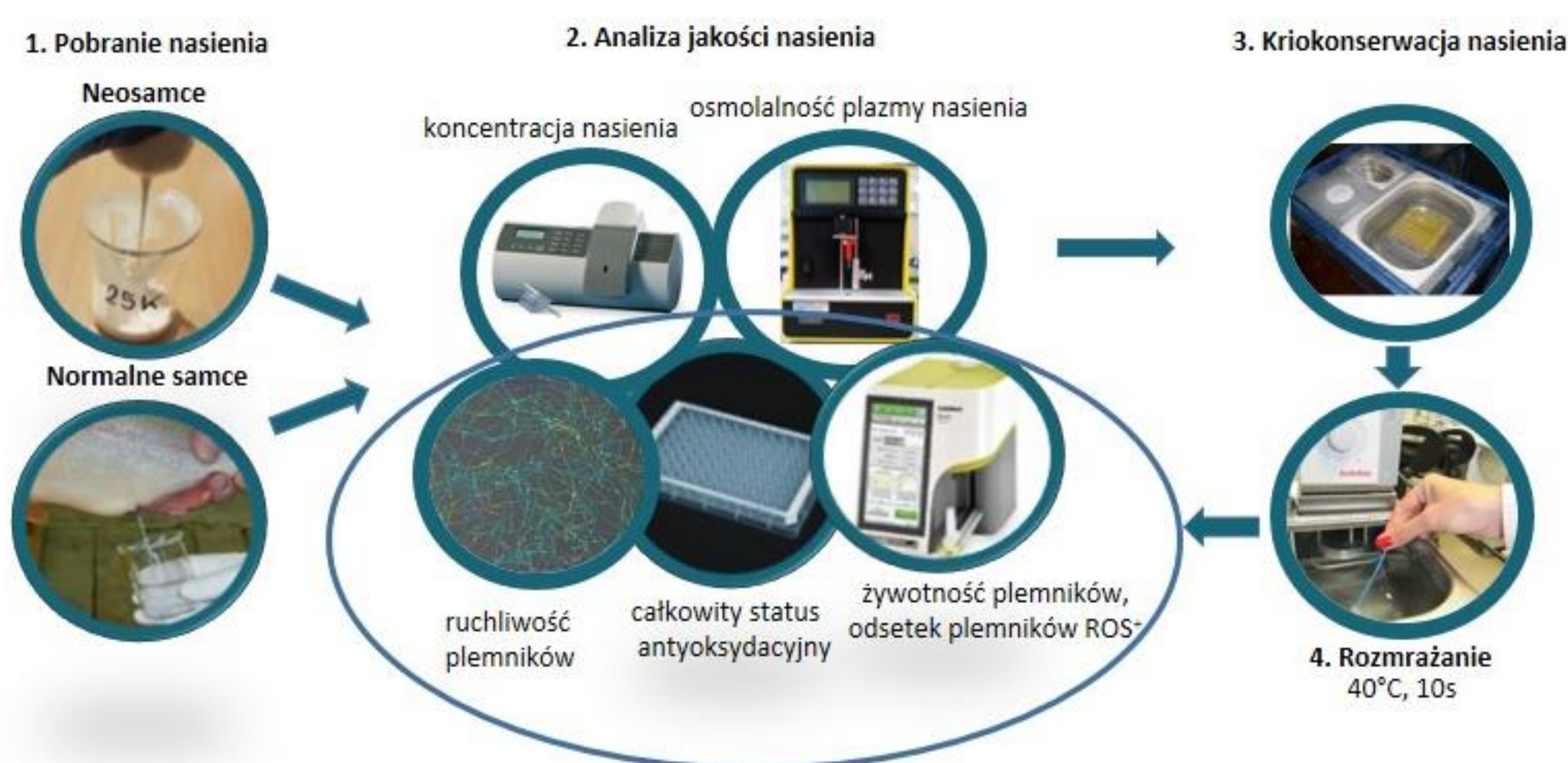
Kriokonserwacja nasienia ryb zapewnia całoroczny dostęp do nasienia, umożliwia bezpieczny transport gamet z odległych wylęgarni oraz usprawnia przeprowadzenie tarła poprzez eliminację problemów z asynchroniczną dojrzałością płciową pomiędzy samcami i samicami. Jednakże kriokonserwacja powoduje nieodwracalne uszkodzenia plemników, co skutkuje znaczącym obniżeniem jakości nasienia po rozmrożeniu. Niektóre z tych uszkodzeń są spowodowane stresem oksydacyjnym. Stres oksydacyjny powoduje przede wszystkim peroksydację lipidów błon komórkowych i uszkodzenie DNA. Ponadto skutkuje obniżeniem ruchliwości i żywotności plemników oraz zdolności zapładniającej kriokonserwowanego nasienia. Stres oksydacyjny powstaje w wyniku zwiększonego wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) oraz zmniejszenia ilości dostępnych antyoksydantów.

CEL PRACY

Celem pracy było określenie parametrów jakości nasienia neosamców oraz normalnych samców pstrąga tęczowego, mierzonych jako odsetek plemników ROS⁺ i poziom TAC (całkowity status antyoksydacyjny) w nasieniu kriokonserwowanym przy różnych stężeniach glukozy [optymalne (0,15 M), niskie (0,11 M) i wysokie (0,19, 0,21 M odpowiednio dla neosamców i normalnych samców pstrąga tęczowego)] w rozrzedzalniku glukoza–metanol. Nasza hipoteza zakładała, że nieoptymalne (zbyt wysokie lub zbyt niskie) stężenia glukozy generują wzmożone wytwarzanie ROS, co z kolei powoduje specyficzne uszkodzenia plemników, które są odmienne dla neosamców i normalnych samców pstrąga tęczowego. Takie podejście pozwoli opisać mechanizmy odpowiedzi plemników neosamców i normalnych samców na stres oksydacyjny wywołany kriokonserwacją. Uzyskana wiedza może przyczynić się do optymalizacji protokołów krótkookresowego przechowywania oraz kriokonserwacji nasienia neosamców i normalnych samców pstrąga tęczowego.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem nasienia pozyskanego od neosamców (n=8; 1500 ± 45 g, 47 ± 3 cm) oraz normalnych samców pstrąga tęczowego (n=8; 460 ± 60 g, 33 ± 2 cm) w okresie ich naturalnego tarła. Neosamce były utrzymywane w Wylęgarni Ryb „Dąbie”. Normalne samce pstrąga tęczowego utrzymywane były w Zakładzie Hodowli Ryb Łososiowatych Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie. Kriokonserwacji nasienia dokonano stosując rozrzedzalnik glukoza–metanol. Słomki o pojemności 0,5 ml (IMV Technologies, L'Aigle, Francja) po napełnieniu rozrzedzonym nasieniem umieszczono na ramkach (Neopor®, MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Niemcy), po czym zamrażano przez 5 min w oparach ciekłego azotu 3 cm nad jego powierzchnią. Następnie słomki przenoszono do ciekłego azotu (Rys. 1).



Rys. 1. Schemat badań.

WYNIKI

Nasienie neosamców charakteryzowało się wyższą koncentracją plemników w porównaniu do nasienia normalnych samców pstrąga tęczowego (Tab. 1). Odsetek ruchliwych plemników i prędkości krzywoliniowej (VCL) były wyższe w nasieniu uzyskanym od normalnych samców w porównaniu do neosamców. Żywotność plemników i ROS⁺ były podobne dla obu grup. Wartości TAC były znacznie wyższe w plazmie nasienia neosamców niż w plazmie normalnych samców, podczas gdy TAC w ekstraktach świeżych plemników był wyższy u normalnych samców. Plazma nasienia neosamców charakteryzowała się wyższą osmolalnością w porównaniu do normalnych samców.

Tabela 1. Parametry jakości nasienia neosamców i normalnych samców pstrąga tęczowego (średnia ± SD). Wartości oznaczone różnymi literami wykazywały różnice statystyczne (P < 0,05) pomiędzy parametrami jakości nasienia neosamców i normalnych samców.

	NEOSAMCE (n=8)	NORMALNE SAMCE (n=8)
Koncentracja plemników (× 10 ⁹ plemników ml ⁻¹)	31,8 ± 3,2 ^a	12,0 ± 2,0 ^b
Żywotność plemników (%)	87,5 ± 1,0 ^a	87,2 ± 1,0 ^a
Ruchliwość plemników (%)	77,3 ± 6,9 ^a	91,4 ± 4,3 ^b
VCL (μm s ⁻¹)	227,8 ± 30,2 ^a	262,3 ± 16,4 ^b
Plemniki ROS ⁺ (%)	3,3 ± 2,8 ^a	3,4 ± 1,2 ^a
TAC w plazmie nasienia (mM Trolox)	5,2 ± 1,8 ^a	1,8 ± 0,3 ^b
TAC w ekstraktach plemników (mM Trolox)	1,9 ± 0,5 ^a	2,8 ± 0,4 ^b
Osmolalność plazmy nasienia (mOsm kg ⁻¹)	299 ± 8 ^a	278 ± 12 ^b

PODSUMOWANIE

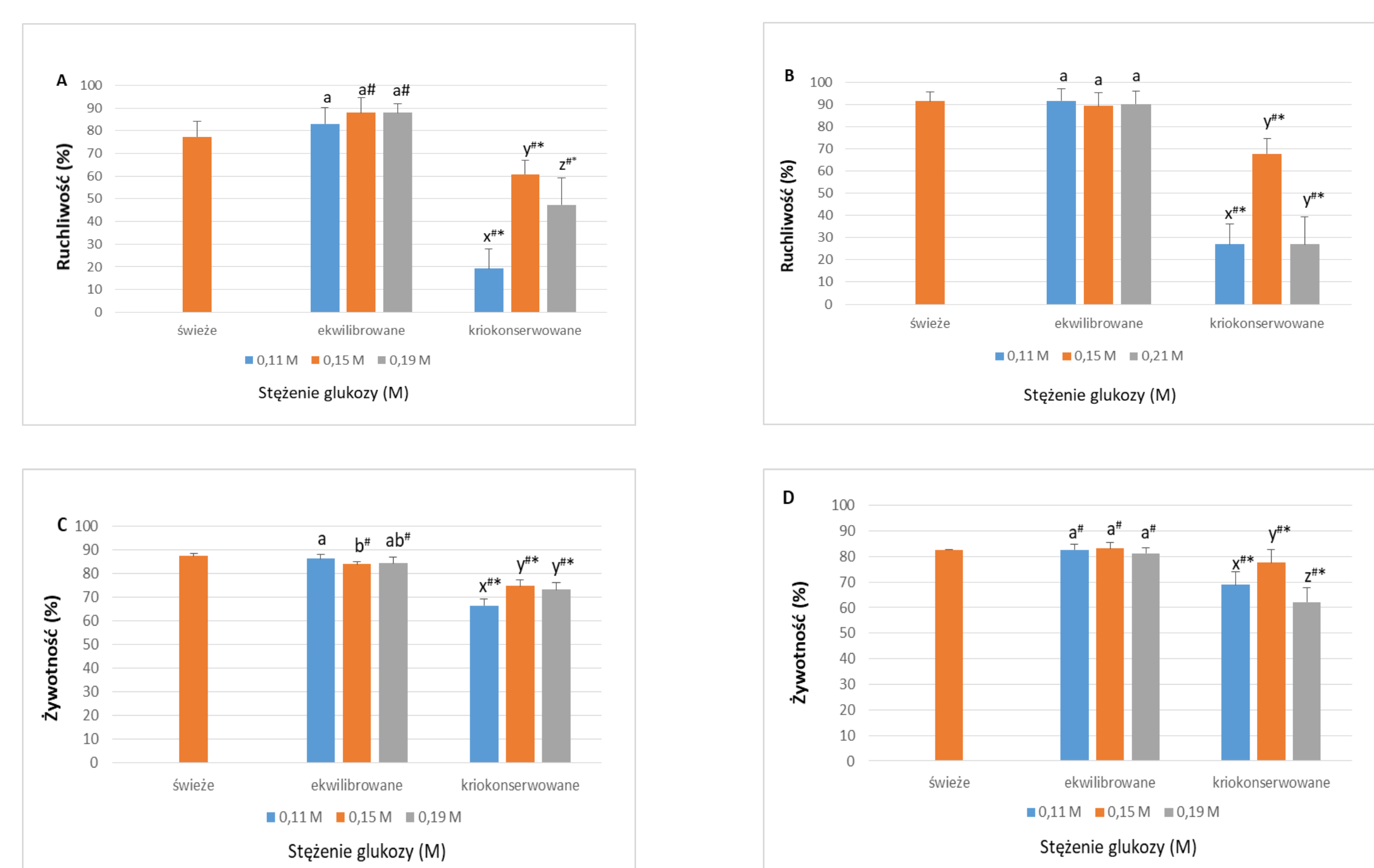
Podsumowując, nasze wyniki wskazują, że różnice w stężeniach glukozy w rozrzedzalniku wpływają na stres oksydacyjny w kriokonserwowanym nasieniu neosamców i normalnych samców pstrąga tęczowego. Większość zmian dotyczy zamrażania/rozmróżania; lecz niektóre zmiany mogą wystąpić również podczas ekwilibracji. Specyficzne zmiany w charakterystyce stresu oksydacyjnego występują pomiędzy nasieniem świeżym i kriokonserwowanym. Ujemny związek między odsetkiem plemników ROS⁺ i wartościami TAC jest prawdopodobnie spowodowany neutralizacją antyoksydantów przez ROS⁺. Uzyskane wyniki mogą być przydatne do optymalizacji protokołów kriokonserwacji ryb łososiowatych. Konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia mechanizmów, które powodują różnice w przebiegu stresu oksydacyjnego w nasieniu neosamców i normalnych samców pstrąga tęczowego.

Ekwilibracja nasienia w rozrzedzalniku zawierającym glukozę o stężeniu 0,15 i 0,19 M spowodowała wzrost odsetka ruchliwych plemników neosamców w porównaniu do nasienia świeżego (Rys. 2A). Kriokonserwacja znacznie obniżyła ruchliwość plemników po rozmrożeniu przy wszystkich badanych stężeniach glukozy w porównaniu z nasieniem świeżym i ekwilibrowanym. Najwyższy odsetek ruchliwych plemników po rozmrożeniu stwierdzono podczas kriokonserwacji w 0,15 M glukozy.

Wartości odsetka ruchliwych plemników świeżego nasienia normalnych samców nie różniły się do wartości w próbach ekwilibrowanych (Rys. 2B). Kriokonserwacja spowodowała obniżenie ruchliwości plemników po rozmrożeniu w porównaniu zarówno z nasieniem świeżym, jak i ekwilibrowanym. U normalnych samców najwyższy odsetek ruchliwych plemników po rozmrożeniu obserwowano przy 0,15 M glukozy.

Ekwilibracja nasienia spowodowała znaczący spadek żywotności plemników neosamców przy 0,15 i 0,19 M glukozy w porównaniu do nasienia świeżego (Rys. 2C). Kriokonserwacja spowodowała znaczący spadek żywotności plemników we wszystkich badanych stężeniach glukozy w porównaniu, zarówno z nasieniem świeżym, jak i ekwilibrowanym.

Ekwilibracja nasienia spowodowała znaczący spadek żywotności plemników normalnych samców przy wszystkich badanych stężeniach glukozy w porównaniu z nasieniem świeżym (Rys. 2D). Kriokonserwacja spowodowała znaczący spadek żywotności plemników we wszystkich badanych stężeniach glukozy w porównaniu zarówno z nasieniem świeżym, jak i ekwilibrowanym.



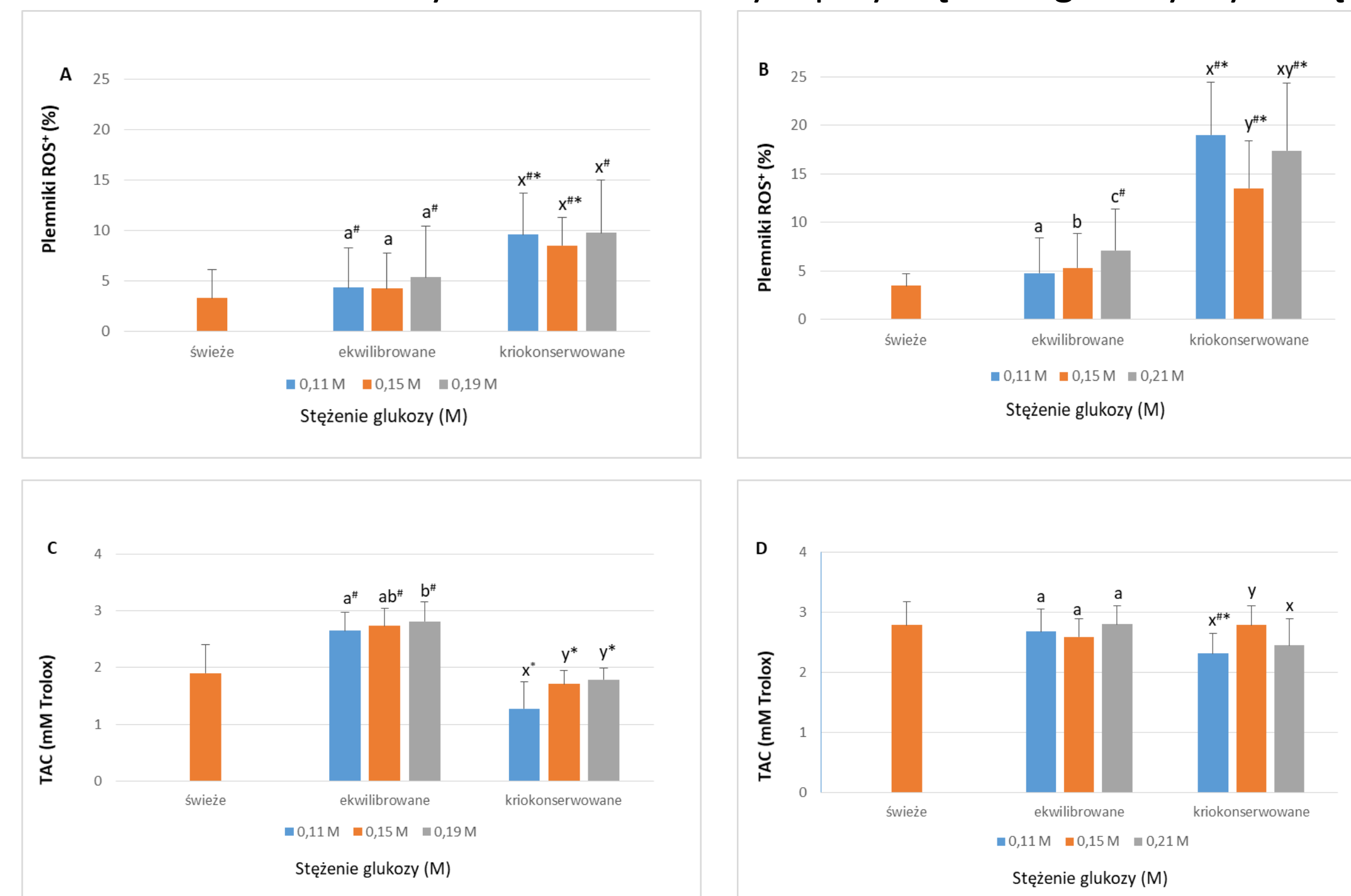
Rys. 2. Wpływ stężenia glukozy w rozrzedzalniku na ruchliwość i żywotność plemników w nasieniu świeżym, ekwilibrowanym i kriokonserwowanym neosamców (n = 8) i normalnych samców pstrąga tęczowego (n = 8). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). Wartości oznaczone różnymi literami wykazywały różnice statystyczne (P < 0,05) między stężeniami glukozy w nasieniu ekwilibrowanym (a, b) i kriokonserwowanym (x, y, z). (#) wskazują statystycznie istotne różnice między nasieniem świeżym a ekwilibrowanym lub kriokonserwowanym. Gwiazdki (*) wskazują na statystycznie istotne różnice między nasieniem ekwilibrowanym i kriokonserwowanym przy takim samym stężeniu glukozy.

Ekwilibracja nasienia neosamców w 0,11 i 0,19 M glukozy spowodowała wzrost odsetka plemników ROS⁺ w porównaniu do nasienia świeżego (Rys. 3A). Kriokonserwacja nasienia przy wszystkich stężeniach glukozy skutkowała znaczącym wzrostem odsetka plemników ROS⁺ w porównaniu z nasieniem świeżym. Ponadto kriokonserwacja spowodowała wzrost plemników ROS⁺ przy 0,11 i 0,15 M glukozy w porównaniu do nasienia ekwilibrowanego.

Ekwilibracja nasienia normalnych samców w stężeniu glukozy 0,21 M prowadziła do wzrostu odsetka plemników ROS⁺ w porównaniu do nasienia świeżego normalnych samców (Rys. 3B). Kriokonserwacja nasienia generowała znaczny wzrost odsetka ROS⁺ w porównaniu z nasieniem świeżym i ekwilibrowanym przy wszystkich badanych stężeniach glukozy. Najwyższe wartości ROS⁺ po ekwilibracji odnotowano przy 0,21 M glukozy.

Wartości TAC w nasieniu neosamców były znacznie wyższe w ekstraktach plemników nasienia ekwilibrowanego niż w ekstraktach plemników świeżego nasienia przy wszystkich badanych stężeniach glukozy (Rys. 3C). Kriokonserwacja spowodowała spadek TAC w porównaniu do nasienia ekwilibrowanego przy wszystkich badanych stężeniach glukozy. Jednakże wartości te nie różniły się od świeżego nasienia.

Wartości TAC w ekstraktach plemników świeżego nasienia normalnych samców były zbliżone do wartości w nasieniu ekwilibrowanym (Rys. 3D). Nie odnotowano różnic w TAC w nasieniu ekwilibrowanym przy różnych stężeniach glukozy. Kriokonserwacja spowodowała spadek TAC w porównaniu z nasieniem świeżym i ekwilibrowanym przy stężeniu glukozy wynoszącym 0,11 M.



Rys. 3. Wpływ stężenia glukozy w rozrzedzalniku na odsetek plemników ROS⁺ oraz wartości TAC w ekstraktach plemników w nasieniu świeżym, ekwilibrowanym i kriokonserwowanym neosamców (n = 8) i normalnych samców pstrąga tęczowego (n = 8). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± odchylenie standardowe (SD). Wartości oznaczone różnymi literami wykazywały różnice statystyczne (P < 0,05) między stężeniami glukozy w nasieniu ekwilibrowanym (a, b) i kriokonserwowanym (x, y, z). (#) wskazują statystycznie istotne różnice między nasieniem świeżym a ekwilibrowanym lub kriokonserwowanym. Gwiazdki (*) wskazują na statystycznie istotne różnice między nasieniem ekwilibrowanym i kriokonserwowanym przy takim samym stężeniu glukozy.