

PRÓBY MROŻENIA NASIENIA JENOTÓW HODOWLANYCH PRZY UŻYCIU ROZRZEDZALNIKÓW O RÓŻNYCH POZIOMACH GLICEROLU

Olga Szeleszczuk, Bartosz Sipczyński, Piotr Niedbała

Akademia Rolnicza w Krakowie

Streszczenie. Celem badań była próba głębokiej konserwacji nasienia jenotów hodowlanych przy użyciu rozrzedzalnika o różnych stężeniach glicerolu. Nasienie pozyskiwano metodą manualną. Zastosowano zmodyfikowany rozrzedzalnik EDTA dla lisów z 4% (RI); 6% (RII) i 10% (RIII) dodatkiem glicerolu jako czynnika kriogennego. Nasienie po ekwilibracji konfekcjonowano w słódkach MINITUB, schładzano w oparach azotu przez 15 min a następnie wkładano stopniowo do kontenera z ciekłym azotem. Przebieg procesu mrożenia i rozmrażania nasienia kontrolowano oceniając ruchliwość oraz morfologię plemników. W plazmie świeżego i rozmrożonego nasienia określano aktywność AspAT oraz akrosyny, Z testowanych rozrzedzalników najlepsze właściwości kriogenne posiadał rozrzedzalnik RIII z 10% dodatkiem glicerolu. Uzyskane wyniki wskazują na mniejszą przydatność rozrzedzalnika EDTA do rozcieńczania nasienia samców tego gatunku.

Słowa kluczowe: glicerol, jenot, krioprotektor, mrożenie, nasienie

WSTĘP

Od kilku lat obserwuje się duże zainteresowanie skórami jenotów hodowlanych połączone z wysokimi cenami uzyskanymi na światowych aukcjach futrzarskich. Sytuacja ta trwa już od paru lat [Helle i Kauhala 1995]. Pomimo to przy tak wielkim popycie ilość skór produkowanych na polskich fermach zmniejsza się z roku na rok [Fortuńska i Barabasz 2002]. Przyczyną tego stanu są obniżająca się płodność i plenność samic hodowlanych. Niezbędne staje się zatem, wprowadzenie nowoczesnych metod biotechnologicznych. Nie można już prowadzić nowoczesnej hodowli bez zastosowania na szeroką skalę inseminacji. Zabieg ten, poza zmniejszeniem ryzyka chorób zakaźnych, umożliwia pełne wykorzystanie potencjału rozrodczego samców, ostrzejszą selekcję jak i międzynarodową wymianę nasienia [Jarosz 1996]. Konieczne jest jednak opracowanie metody głębokiego mrożenia nasienia, co nie jest łatwe, pomimo zbliżonej budowy i wymagań środowisko-

Adres do korespondencji – Corresponding author: prof. dr hab. Olga Szeleszczuk, Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, e-mail: rzszeles@cyf-kr.edu.pl

wych plemników. Ważnym problemem, podczas kriokonserwacji nasienia jest uniknięcie szoku chłodowego, prowadzącego do trwałego uszkodzenia plemnika, utraty jego ruchliwości i potencjału biologicznego [Nizański 1994]. W Akademii Rolniczej w Krakowie od 1994 roku prowadzone są badania nad pozyskaniem i oceną nasienia od samców tego gatunku. Udoskonalono metody pozyskiwania nasienia jak również kontynuowano badania nad jego rozrzedzaniem [Niedbała i Szeleszczuk 2003, 2004] i [Szeleszczuk i in. 2004]. Następnym etapem jest kriokonserwacja nasienia, którą rozpoczęto od opracowania rozrzedzalnika i krioprotektora.

Celem niniejszej pracy była próba mrożenia nasienia jenota przy użyciu rozrzedzalnika EDTA o różnym dodatku glicerolu.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 10 jednorocznych i starszych samcach jenotów hodowlanych. Zwierzęta żywione karmą fermową według norm zalecanych dla tego gatunku, były w dobrej kondycji zdrowotnej i rozplodowej.

Nasienie pozyskiwano metodą manualną po uprzednim przyzwyczajeniu samców do pomieszczenia i osoby pobierającej. Podczas tego etapu wyselekcjonowano grupę samców, od których pozyskiwano nasienie w późniejszych etapach doświadczenia. Nasienie pobierano do ogrzanych szklanych zbiorników i przetrzymywano w temperaturze 37°C w elektrycznym podgrzewaczu. Ocenę i wstępne rozcieńczanie nasienia przeprowadzono w pomieszczeniu ogrzonym i przy użyciu ogrzanego sprzętu.

Wszystkie pozyskane ejakulatory poddane zostały ocenie wstępnej (makroskopowej) i szczegółowej (mikroskopowej). Oceny tej dokonano wykorzystując metodę opracowaną i stosowaną do oceny nasienia lisów polarnych [Jarosz i in. 1991].

Do dalszych etapów rozcieńczania, ekwilibracji i mrożenia kwalifikowano nasienie cechującą się, co najmniej: objętością 0,3 cm³, barwie białej lub białawej, konsystencją mlecznej lub śmietany, zapachu swoistym, gęstością SD i 50% udziale plemników o ruchu postępowym. Nasienie rozrzedzano do uzyskania koncentracji w dawce inseminacyjnej 150 mln. plemników. Nasienie rozcieńczano zmodyfikowanym rozrzedzalnikiem EDTA dla lisów z następującym dodatkiem glicerolu (v/v): RI – 4%; RII – 6%; RIII – 10%.

Pozyskane nasienie dzielono na 3 porcje. Do każdego z nich dodawano połowę przewidywanej ilości rozrzedzalnika. Tak rozcieńczone nasienie schładzano w temperaturze pokojowej i po kilku minutach rozcieńczano do końcowej koncentracji, następnie poddano godzinnej ekwilibracji w temperaturze chłodni. Po określeniu ruchliwości wykonaniu rozmazu, nasienie konfekcjonowano w słomach MINITUB. Schładzano je w oparach ciekłego azotu przez około 15 min, a następnie wkładano stopniowo do kontenera z ciekłym azotem.

Słomki rozmrażano bezpośrednio po wyjęciu z kontenera, w wodzie o temperaturze 70°C przez 7–8 s, lub 37°C przez 30–40 s. Przebieg procesu mrożenia i rozmrażania nasienia kontrolowano oceniając ruchliwość oraz morfologię plemników. W plazmie świeżego i rozmrożonego nasienia określano aktywność AspAT oraz akrosyny. Aktywność

aminotransferazy asparaginowej oznaczano metodą kinetyczną przy użyciu zestawu firmy Alpha Diagnostics, Warszawa, natomiast akrosyny metodą Kennedyego i in. [1989].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu wieloczynnikowej analizie wariancji. Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą zestawu Statistica [Stanisz 1998].

WYNIKI I DISKUSJA

Badania nad pobieraniem, oceną i konserwacją nasienia jenotów rozpoczęto stosunkowo niedawno, bo dopiero pod koniec ubiegłego wieku. Badania te prowadzili w Finlandii Heikkilä i in. [2000] oraz w Polsce już w 1994 roku [Rudnik 1996]. Pierwsze próby pobierania nasienia od samców jenotów były nieefektywne, co być może wynikało z różnic w budowie anatomicznej prącia jenotów. Wstępne wyniki badań jasno wykazały, że zwierzęta te, pomimo przynależności do rodziny psowatych, wymagają opracowania specyficznej dla tego gatunku metody pozyskiwania nasienia. Szukając rozwiązania opracowano własną, specyficzną metodę pozyskiwania nasienia, którą dopracowano w latach następnym [Niedbała 2003] oraz [Szeleszczuk i in. 2004].

Podjęto, zatem następny etap badań, których celem była próba głębokiej konserwacji nasienia jenotów hodowlanych przy użyciu rozrzedzalnika EDTA o różnych stężeniach glicerolu. Przygotowanie samców rozpoczęto 10 lutego, ale dopiero od 23 lutego pozyskiwano pełne ejakulatory. Z 10 grupy zwierząt do dalszych badań wybrano jedynie 4 samce, które oddawały nasienie odpowiedniej jakości. Od pozostałych 6 samców nie uzyskano nasienia. Otrzymywano tylko pierwszą jego frakcję, były zbyt agresywne, aby można było pobierać od nich nasienie. Z powodu wady anatomicznej prącia od jednego osobnika również nie pobrano nasienia.

W sumie pobrano 66 ejakulatów. Średnia objętość uzyskanego nasienia wynosiła $0,58 \text{ cm}^3$, z wahaniami od $0,1$ do $1,5 \text{ cm}^3$. Pozyskane nasienie miało głównie barwę białą lub białawą, a wyeliminowane z dalszego wykorzystania miało barwę szarą lub żółtawą. Konsystencja nasienia była od wodnistej do mlecznej, w kilku tylko przypadkach otrzymano nasienie o konsystencji śmietany. W ejakulatach tych można było zauważyć falowanie masy plemników, co świadczyło o bardzo dużej koncentracji i ruchliwości plemników. Poza dwoma przypadkami, kiedy to nasienie było zanieczyszczone moczem, zapach nasienia określano jako swoisty 1° . Koncentracja plemników wahała się od 670 do 1305 tys. plemników na mm^3 , średnio 515,877 tys. na mm^3 . W większości pozyskanych ejakulatów gęstość określono jako gęstą D (*Densum*) lub średnio-gęstą SD (*Semidensum*).

Do mrożenia zakwalifikowano jedynie 30 ejakulatów, co stanowiło 45,45% wszystkich pozyskanych. Ruchliwość plemników po końcowym rozcieńczeniu obniżyła się najmniej w nasieniu rozrzedzonym RIII (z 10% dodatkiem glicerolu) średnio o 11%. Spadek ruchliwości w pozostałych próbach był nieco wyższy (tab. 1). Te różnice w ruchliwości plemników pomiędzy testowanymi rozrzedzalnikami utrzymały się również w nasieniu, które ekwilibrowano. Najwięcej ruchliwych plemników (37,14%) i tym razem obserwowano w rozrzedzalniku z 10% dodatkiem glicerolu. Po rozmrożeniu we wszystkich próbach nastąpił drastyczny spadek ruchliwości plemników do średnio 10,83% w RI, 10,56% w RII i 14,29% w RIII.

Tabela 1. Ruchliwość plemników podczas mrożenia i rozmrażania nasienia jenotów
Table 1. Sperm motility in raccoon dog semen during freezing/thawing

Rozrzedzalnik Extender	Nasienie świeże Fresh semen		Rozcieńczenie I I dilution		Rozcieńczenie II II dilution		Po ekwilibracji After equilibration		Po rozmrożeniu After thawing	
	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD
RI	50	19,54	43	7,87	41,11	13,63	34,44	14,88	10,83	6,65
RII	50	19,54	44	8,52	41	13,70	33,34	13,46	10,56	1,68
RIII	50	19,54	46	7,98	44,29	11,34	37,14	14,68	14,29	4,5

Badania morfologiczne (tab. 2) rozmazów nasienia metodą Bloma [1981] wykazały spadek odsetka plemników niezmienionych z 59,05% w nasieniu świeżym do 54,33% w RI, 51,44% w RII i do 54,56% w RIII. Wstępne badania wskazują, że szczególnie podatne na uszkodzenia podczas procesu mrożenia – rozmrażania są wstawka i czapeczka.

W rozmazach wykonanych z nasienia świeżego, odsetek plemników ze zmienionym akrosomem wynosił średnio 0,28%, a po rozmrożeniu zwiększył się do 0,94% w nasieniu rozrzedzonym z 10% dodatkiem glicerolu. Przy 4% dodatku glicerolu wzrost ten był znacznie wyższy w RI i RII, odpowiednio zwiększył się do 1,4 i 1,31%.

Tabela 2. Morfologia plemników w procesie mrożenia i rozmrażania nasienia jenotów
Table 2. Morphology of spermatology in raccoon dog semen during freezing/thawing

Nasienie Semen		I	II	III	IV	V	VI	VII
Świeże Fresh	średnia mean	59,05	9,68	15,24	4,31	5,56	0,28	1,29
	SD	7,35	4,15	5,29	2,83	3,73	0,65	1,21
I rozcieńczenie I dilution	średnia mean	59,43	5,43	20,71	6,43	3,93	0,14	1,36
	SD	7,23	2,77	6,85	3,35	2,02	0,52	1,34
II rozcieńczenie II dilution	średnia mean	57,00	2,50	24,19	9,00	4,88	0,13	1,00
	SD	6,27	2,25	6,11	4,16	2,33	0,34	1,59
RI	średnia mean	55,56	1,38	25,25	10,94	5,25	0,06	0,88
	SD	6,39	1,89	4,77	4,61	3,79	0,25	0,96
Po ekwilibracji After equilibration	średnia mean	54,64	1,14	26,00	10,79	5,29	0,21	1,36
	SD	7,10	1,41	4,59	3,64	2,92	0,58	1,22
RIII	średnia mean	58,06	1,94	24,13	11,38	2,88	0,00	0,81
	SD	4,57	2,98	4,30	5,38	2,42	0,00	1,38
RI	średnia mean	54,33	1,00	22,87	15,67	3,60	1,40	1,07
	SD	0,17	0,93	5,22	7,58	2,35	1,59	1,10
Po rozmrożeniu After thawing	średnia mean	51,44	1,06	23,11	16,31	4,44	1,31	2,06
	SD	9,59	2,24	5,19	6,94	3,74	1,54	2,29
RIII	średnia mean	54,56	0,56	23,69	16,69	2,75	0,94	0,75
	SD	7,42	0,81	5,17	7,36	2,11	1,39	0,93

I – plemniki nieuszkodzone – intact sperm; II – z kroplą protoplazmatyczną – with protoplasmatic drop; III – z zapętloną wtką – bent tail; IV – ze zwiniętą ślimakowato wtką – coiled tail; V – plemniki uszkodzone – damaged sperm; VI – ze zmienionym akrosomem – acrosomal damaged; VII – zlepione plemniki – agglutination spermatozoa.

Niedostateczna ochrona plemników podczas procesu mrożenia i rozmrażania według Christiansen i in. [1984], Aquire i in. [1987] powoduje uszkodzenie przede wszystkim struktur główki (akrosomu) i witki (wstawki). Prowadzi to do „wycieku” znajdujących się w tych strukturach akrosyny i AspAT enzymów bardzo ważnych dla procesu zapłodnienia.

Aktywność AspAT w plazmie nasienia świeżego wynosiła średnio 161,38 μ IU w ml. Po rozmrożeniu aktywność tego enzymu wzrosła do 232 μ IU w ml w RI, 372 μ IU w ml, w RI,I a tylko do 170 μ IU w ml w nasieniu z rozrzedzalnikiem z 10% dodatkiem glicerolu (RIII). Podobnie zmieniała się aktywność akrosyny (tab. 3). W nasieniu świeżym wynosiła ona średnio 24,74 mIU na 10^6 plemników, po rozmrożeniu najwyższą jej aktywność stwierdzono w nasieniu rozrzedzonym RII (158,25 mIU na 10^6 plemników) z 6% dodatkiem glicerolu, natomiast najniższą, ale równie wysoką – 121,38 (mIU na 10^6 plemników) w nasieniu rozrzedzonym RIII z 10% dodatkiem glicerolu.

Tabela 3. Aktywność AspAT i akrosyny w nasieniach jenotów

Table 3. AspAT and acrosine activity in raccoon dog semen

Cecha Items	Aktywność AspAT – AspAT activity (μ IU w ml nasienia – μ IU in ml semen)				Aktywność akrosyny – Acrosine activity (μ IU na 10^6 plemników – μ IU per 10^6 sperm)			
	nasienie świeże fresh semen	po rozmrożeniu after thawing			nasienie świeże fresh semen	po rozmrożeniu after thawing		
		RI	RII	RIII		RI	RII	RIII
Średnia – Mean	161,38	232,00	372,96	170,24	24,33	137,03	158,25	121,38
SD	93,31	83,84	270,13	75,60	9,43	72,32	66,24	47,76
Minimum	21,33	109,74	153,95	76,41	15,89	51,17	105,05	75,42
Maximum	333,81	389,93	987,73	265,22	47,75	250,50	300,33	220,87
Współczynniki korelacji	świeże – fresh – RI	świeże – fresh – RII	świeże – fresh – RIII	świeże – fresh – RI	świeże – fresh – RII	świeże – fresh – RIII	świeże – fresh – RIII	świeże – fresh – RIII
Correlation coefficients	0,213	-0,276	0,044	-0,267	0,261	0,261	0,261	0,261
	RI – RII	R I – RIII	RII – RIII	RI – RII	RI – RIII	RI – RIII	RII – RIII	RII – RIII
	0,218	0,177	0,351	0,305	0,001	0,001	-0,034	-0,034

Uzyskane wyniki jasno wskazują na wyjątkową wrażliwość plemników jenota na szok termiczny. Wskazują również na niedostateczną ochronę plemników przed szokiem termicznym podczas procesu mrożenia i rozmrażania. W badaniach jako krioprotektor został zastosowany glicerol, powszechnie uważany za jeden z najlepszych środków kriochronnych. Optymalna zawartość glicerolu w rozrzedzalniku to kompromis między chroniącym a toksycznym jego działaniem [Jurka 1996]. Stopień toksycznego oddziaływania glicerolu na plemniki zależy od jego stężenia i czasu kontaktu z komórką, dotyczy to głównie zmian przepuszczalności plazmolemy wskutek denaturacyjnego działania tego związku na kompleksy glikoproteinowe błony. W kompleksowych badaniach kriobiochemicznych nasienia buhaja, tryka i knura stwierdzono, że już w pierwszych minutach kontaktu plemników z rozrzedzalnikiem zawierającym glicerol obserwuje się efekt glicerolowej aktywacji lub „efekt rozrzedzania”. Przejawia się on intensywnym uwalnianiem do środowiska zewnętrznego komórki białek enzymatycznych związanych z plazmolemą lub zlokalizowanych w akrosomie i wstawce [Strzeżek 1998].

Zdolność plemnika do zapłodnienia w dużej mierze zależy właśnie od enzymów akrosomu [Bielańska-Osuchowska i Sysa 1998]. Funkcja biologiczna akrosyny polega na katalizowaniu reakcji hydrolitycznego rozszczepiania glikoproteinowej osłonki przejrzystej *Zona pellucida* komórki jajowej [Strzeżek 1988]. Akrosyny wspomaga również procesy fizjologiczne związane z transportem i metabolizmem plemników w drogach rodnych samicy. Przyspiesza on ruch plemników przez mukoproteinowy śluz szyjki macicy [Strzeżek 1985]. Plemniki z poważnym uszkodzeniem plazmolemy nie poruszają się [Strzeżek 1996]. Badana zależność pomiędzy ruchliwością w poszczególnych etapach mrożenia a aktywnością akrosyny w plazmie nasienia wykazała, że wraz ze spadkiem ruchliwości wzrastała aktywność enzymu. Już Froman i in. [1984] wykazali ścisłe powiązanie jej aktywności ze stopniem uszkodzenia plemników.

Natomiast poziom aminotransferazy asparaginowej w plazmie nasienia świeżego w porównaniu do poziomu enzymu w plazmie nasienia rozmrożonego jest stosunkowo wysoki. Co może wskazywać na słabą podatność na zamrażanie nasienia jenotów lub też na mniejszą rozrzedzalnika EDTA do rozcieńczenia nasienia samców tego gatunku. Badania Kosiniaka i in. [1992], Kosiniaka i Bittmar [1994] wykazały, że można prognozować przydatność nasienia psa do zamrażania w oparciu o wynik badania aktywności AspAT i poziomu białka. Enzym ten służy jako marker wskazujący na stopień uszkodzenia aparatu enzymatycznego plemnika, co wiąże się z jego wartością biologiczną.

WNIOSKI

Z testowanych rozrzedzalników najlepsze właściwości kriogenne posiadał rozrzedzalnik RIII z 10% dodatkiem glicerolu.

Uzyskane wyniki wskazują również na słabą przydatność do zamrażania nasienia jenotów hodowlanych lub też na mniejszą przydatność rozrzedzalnika EDTA do rozcieńczenia nasienia samców tego gatunku.

Celowym wydaje się prowadzenie dalszych badań z zastosowaniem innych rozrzedzalników i krioprotektorów.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego Nr 2 P06Z 046 26 finansowanego przez KBN.

PIŚMIENNICTWO

- Aquirre S.M., Capaul E., De Luca L., 1987. Morphological and biochemical evaluation of fresh and cold-shocked dog semen. *Vet. Argentina* 4 (35), 433–439.
- Bielańska-Osuchowska Z., Sysa P., 1998. Ultrastruktura plemnika [w: Ultrastruktura i funkcja komórki. Mechanizmy regulujące spermatogenezę]. Red. A. Łukaszczyk, B. Bilińska, J. Kawiak, Z. Bielańska. T. 7. PWN, Warszawa.

- Blom E., 1981. Ocena morfologiczna wad plemników buhaja. Zmiany patologiczne plemników w świetle nowych badań. Med. Weter. 37, 239–242.
- Christiansen J., Cleemann T., Schmidt M., 1984. Extenders for dilution of fox semen meant for deep-freezing and the resulting on motility of the spermatozoa. Institute Sterilitetsforskning. KVL 27, 214–219.
- Fortuńska D., Barabasz W., 2002. Sytuacja w hodowli jenotów ustabilizowała się. Hod. Prod. Zwierz. Futer. 11, 23–25.
- Froman D.P., Amann R.P., Riek P.M., Olar T.T., 1984. Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. J. Reprod. Fertil. 70, 301–308.
- Heikkilä M., Savolainen R., Jalkanen L., 2000. Artificieli insemination tilampad pa finnsjub. Finsk Palstidskrift 34 (12), 13–14.
- Helle E., Kauhala K., 1995. Reproduction in the raccoon dog in Finland. J. Mammal. 76 (4), 1036–1046.
- Jarosz S., 1996. Unasiennianie lisów. Andrologia w rozrodzie zwierząt. IZ i PAU, Kraków, 209–218.
- Jarosz S., Szeleszczuk O., Zoń A., 1991. Pobieranie, ocena i konserwacja nasienia samców lisów niebieskich. Biul. Reg. ZUP 292, 199–208.
- Jurka P., 1996. Mrożenie nasienia psa – możliwości i metody. Nowa Wet. Wydaw. Medyczne i Oświatowe I, 42–47.
- Kennedy W.P., Kaminski M.J., Van Der Ven H.H., Jeyendran S.R., Reid S.D., Blackwell J., Bielfield P., Zeneveld J.D.L., 1989. A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. J. Andrology 10 (3), 221–231.
- Kosiniak K., Bittmar A., 1994. Prognosis of dog semen freezability: biochemical markers in seminal plasma. ARTA 5, 129–131.
- Kosiniak K., Bittmar A., Sallwerk W., 1992. Relationship between biochemical components of dog seminal plasma and semen freezability. Proceeding of XIIth International Congress on Animal Reproduction 4. Haag, 23–27 August 1992, [b.w.] 1791–1792.
- Niedbała P., 2003. Właściwości biologiczne i biochemiczne oraz przydatność do mrożenia nasienia jenotów hodowlanych (*Nyctereutes procyonoides* Gray). Rozprawa doktorska. AR, Kraków (maszynopis).
- Niedbała P., Szeleszczuk O., 2003. Pozyskiwanie nasienia od samców jenotów (*Nyctereutes procyonoides*, Gray), Konferencja naukowa pt. Nauka – praktyce, Lublin, 227.
- Niedbała P., Szeleszczuk O., 2004. Morphological changes of spermatozoa in breeding raccoon dogs semen during cryopreservation. Proceedings of the International Scientific Congress in fur Animal Production, Sci. 28 (3), 259–262.
- Niżański W., 1994. Konserwacja nasienia psów w niskich temperaturach. Zesz. Nauk. AR Wroc. 240, 54–59.
- Rudnik M., 1996. Próby pozyskiwania nasienia od samców jenota (*Nyctereutes procyonoides* Gray). AR, Kraków (maszynopis).
- Stanisz A., 1998. Przystępny kurs statystyki w oparciu o program Ststistica®Pl. Statsoft Polska, Kraków.
- Strzeżek J., 1985. Białka enzymatyczne akrosomu plemnika i ich funkcja w procesie zapłodnienia komórki jajowej. Med. Weter. 5, 292–296.
- Strzeżek J., 1988. Struktury morfologiczne plemnika i ich funkcja biochemiczna. Biul. Inf. ART Olsztyn 25, 67–96.
- Strzeżek J., 1996. Molekularne aspekty konserwacji nasienia knura. Uroczysta sesja naukowa z okazji 70. urodzin prof. Stefana Wierzbowskiego pt. Andrologia w rozrodzie zwierząt. IZ i PAN, Kraków, 90–107.

- Strzeżek J., 1998. Fizjologia i biochemia struktur plemnik ssaka [w: Ultrastruktura i funkcja komórki]. Red. A. Łukaszyk, B. Bilińska, J. Kawiak, Z. Bielańska-Osuchowska. PWN, Warszawa.
- Szeleszczuk O., Niedbała P., Rudnik M., 2004. Semen collection from males raccoon dog. *Sci. Messenger of Lviv National Academy of Veterinary Medicine* 6 (2), 148–151.

THE TRIALS OF SEMEN FREEZING OF BREEDING RACCOON DOGS BY USE OF DILUENTS OF DIFFERENT LEVELS OF GLYCEROL

Abstract. The aim of study was the trial of deep conservation of breeding raccoon dog semen by use of EDTA diluent of different glycerol concentration. The semen was collected by manual method after earlier males accustomed to the room and the person who collected semen. All collected ejaculates were estimated macro- and microscopically. For further steps of dilution, equilibration and freezing ejaculates of volume above 0.3 cm, mobility of 40–60% of spermatozoa of progressive motion were qualified. Modified EDTA diluent was applied of the content 4% (RI), 6% (RII) and 10% (RIII) of glycerol as cryogenic factor. The process freezing and thawing of semen was controlled by mobility estimation as well as morphology of spermatozoa. In plasma of fresh and defrosted semen AspAT and acrosine activity was tested. From 66 collected ejaculates only 30 were qualified for freezing, what was 45.45% of all ejaculates. Sperm mobility in fresh semen was 50% average, but after defrosting participation of a mobile spermatozoa decreased even up to 9.44% in semen with diluent RI with 4% glycerol addition. In this diluent participation of damaged spermatozoa increased from 35.5% to 53%. AspAT activity in fresh semen was $161.38 \mu\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ average. After thawing, activity of the enzyme increased to $232 \mu\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ in RI, $372 \mu\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ in RII and only up to $170 \mu\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$ in semen with diluent with 10% glycerol addition (RIII). Similar correlations were observed in acrosine activity.

Key words: freezing, glycerol, kryoprotector, raccoon dog, semen

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 31.10.2007