

## Streszczenie

Nasienie knura różni się wieloma parametrami makro- i mikroskopowymi od nasienia innych gatunków zwierząt. Wiąże się to z koniecznością przechowywania go do celów inseminacyjnych w postaci niezamrożonej. Jednakże, przechowywane w temperaturze 15 – 17°C nasienie zachowuje zdolności zapładniające zaledwie przez kilka dni (1 – 5) z powodu postępującej degradacji plemników będącej wynikiem niekorzystnie działających czynników środowiska zewnętrznego.

Celem pracy było opracowanie metody wytwarzania stabilnego, antyoksydacyjnego preparatu enzymatycznego przeznaczonego do przedłużania zdolności zapładniających plemników nasienia knura przechowywanego w stanie niezamrożonym.

Materiałem do badań był czosnek jadalny (*Allium sativum* L.), z którego wyizolowano roślinną dysmutazę ponadtlenkową, enzymy pochodzenia zwierzęcego - SOD z erytrocytów wołowych i katalazę (CAT) wątroby wołowej, które zastosowano w procesie tworzenia koniugatów enzymatycznych oraz plemniki do testów biologicznych pobrane od knurów rasy PBZ (Polska Biała Zwisłoucha).

Roślinna SOD, tanio i wydajnie wyizolowana z czosnku, występuje w postaci aktywnego monomeru o masie molekularnej około 14 kDa. Zastosowanie dwuetapowego oczyszczania pozwoliło uzyskać jednorodny preparat zawierający 4-krotnie oczyszczony enzym o aktywności 3101  $U_{SOD}/mg$  białka. W przypadku katalazy dwuetapowe oczyszczanie pozwala uzyskać jednorodny preparat, 1,65-krotnie oczyszczony o aktywności 9330  $U_{CAT}/mg$ . Katalaza ma masę molekularną około 125 kDa i jest aktywnym dimerem.

Proces tworzenia koniugatu CAT i SOD przeprowadzono przy użyciu aldehydu dekstranu (AD). Otrzymaną mieszaninę produktów CAT-AD-SOD frakcjonowano na sicie molekularnym. Obecność białka oraz obu aktywności enzymatycznych w tej samej frakcji potwierdzały obecność koniugatu. W koniugatach CAT i SOD łączyły się ze sobą w zmiennym stosunku molowym leżącym w granicach od 0,08 do 1,00. Najliczniejszą grupę połączeń stanowiły związki, w których na dwa monomery katalazy przypadł jeden monomer dysmutazy ponadtlenkowej i koniugaty, w których na jeden monomer katalazy przypadł jeden monomer dysmutazy.

Wolne enzymy CAT i SOD oraz ich koniugaty CAT-AD-SOD zamykano w strukturach liposomowych zbudowanych z lecytyny i cholesterolu (Lec/Chol). Najlepszą wydajność zamykania białka w strukturze liposomów Lec/Chol uzyskano dla liposomów z większą zawartością cholesterolu (Lec/Chol 6:4, mol/mol), formowanych w roztworze o większej zawartości białka (5 mg/ml) przy zastosowaniu procedury FAT-MLV-VET<sub>400 nm</sub>. We wszystkich przypadkach enzymy pozostawały aktywne. Tak otrzymane enzymosomy, przechowywane w temperaturze 4°C, pozostawały stabilne przez co najmniej 2 miesiące.

Do zbadania skuteczności działania antyoksydacyjnego wykonanych enzymosomów wybrano nasienie knura, pobierane rutynowo do inseminacji, które w odróżnieniu od nasienia innych gatunków, z powodu dużej wrażliwości na niskie temperatury nie może być przechowywane w stanie zamrożonym. Do 1 ml nasienia zawieszzonego w rozrzedzalniku dodawano taką ilość enzymosomów, która odpowiadała aktywności 200 U<sub>CAT</sub>, 150 U<sub>SOD</sub> i w przypadku koniugatu 200/150 U<sub>CAT</sub>/U<sub>SOD</sub>. Tak przygotowane próby były przechowywane w temperaturze 17°C przez 12 dni. Po zakończeniu 4., 8. i 12. dnia inkubacji w każdej próbie mierzono aktywność oddechową plemników przy pomocy elektrody tlenowej Clark'a. Uzyskane wyniki potwierdziły negatywny wpływ czasu na aktywność aparatu ruchu plemników knura przechowywanych przez 12 dni, i wykazały, że zmiany te należy wiązać z procesem utraty integralności wewnętrznej błony mitochondriów wstawki plemników.

Wzbogacenie rozrzedzalnika enzymosomami zawierającymi koniugat katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej zabezpiecza plemniki przed uszkodzeniem ich aparatu ruchu, nie ograniczając jednocześnie aktywności enzymów mitochondrialnego systemu transportu elektronów.