

Wpływ Equex STM na wybrane właściwości plemników psa w nasieniu poddanym konserwacji w niskich temperaturach^{*})

WOJCIECH NIŻAŃSKI, WIESŁAW BIELAS

Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy i Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Niżański W., Bielas W.

Effect of Equex STM on the quality of frozen-thawed dog semen

Summary

The aim of the study was to estimate the effect of Equex STM on some spermatozoa properties in cryopreserved dog semen. The study was carried out on 94 ejaculates collected from 25 stud dogs, aged 2-7 years. Each sperm-rich fraction of ejaculates was divided into two samples: experimental and control. Experimental samples were diluted in Tris-citric acid-glucose extender with 1% addition of surfactant Equex STM (active ingredient – SDS sodium dodecyl sulphate). Control samples were diluted in the same extender, but without adding the surfactant. The extended, cooled and equilibrated semen was frozen in 0,5 ml Cassou straws in liquid nitrogen vapors at -140°C for 10 minutes. The straws were thawed in a water bath at 70°C for 6 seconds. The percentage of progressive motile spermatozoa and GOT activity in extracellular fluid were significantly different in experimental and control samples after equilibration, as well as after thawing. Motility was higher and GOT activity was lower in the experimental samples. It was proved that adding a surfactant to the extender improves the post-thaw longevity of dog spermatozoa incubated at 22°C . The results of the investigation suggest that Equex STM exerts a beneficial effect on spermatozoa structure, metabolism and, in particular, on midpiece membrane integrity in cryopreserved dog semen. Prolonging spermatozoal longevity after thawing could improve the results of artificial insemination of bitches with frozen-thawed dog semen.

Keywords: dog, semen, cryopreservation, sodium dodecyl sulphate, Equex STM

Obserwowany w ostatnich latach znaczny przyrost populacji wartościowych pod względem genetycznym psów rasowych przyniósł potrzebę podjęcia badań nad fizjologią procesów rozrodczych oraz możliwościami zastosowania u tego gatunku nowych technik biotechnologicznych. Coraz powszechniej stosowana jest u psów sztuczna inseminacja i konserwacja nasienia w stanie płynnym (8, 16). Uzyskiwane obecnie wysokie wyniki płodności suk sztucznie inseminowanych nasieniem świeżym i schłodzonym do temperatury 5°C (8) zbliżają się do wartości notowanych przy unasiennianiu naturalnym i świadczą o opracowaniu w tym zakresie właściwych technologii postępowania z nasieniem. Wyniki unasienniania suk nasieniem poddanym konserwacji w niskich temperaturach są jednak bardzo zróżnicowane (9, 10, 13) i często niezadawalające, co ogranicza wykorzystanie w praktyce rozmrożonych dawek inseminacyjnych.

Jednym z istotnych problemów konserwacji nasienia psa w niskich temperaturach jest wyraźnie krótka przeżywalność komórek rozrodczych po rozmrożeniu (2, 3, 6). Doak i wsp. (4) wykazali, że plemniki wprowadzone w trakcie kopulacji do narządu płciowego suki wykazują długo aktywność ruchową w jego obrębie przez okres przekraczający często 4-6 dni. Morton i Bruce (12) stwierdzili, iż ruchliwość plemników psa w nasieniu świeżym oraz rozmrożonym jest diametralnie różna, wynosi bowiem po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 4°C kolejno 91,7% i 45%. Inni autorzy wykazali, że przeżywalność w temperaturze 37°C lub 22°C rozmrożonego nasienia psa nie przekracza 24 godzin (2, 3, 27). Wynikiem tego sztuczne unasiennianie suk nasieniem poddanym uprzednio konserwacji w niskich temperaturach przeprowadzone w terminie nie korespondującym ściśle z obecnością w jajowodach dojrzałych, zdolnych do zapłodnienia oocytów jest nieskuteczne (2). Gwałtownie obniżająca się aktywność ruchowa plemników w nasieniu

^{*}) Badania wykonane w ramach projektu badawczego KBN 3 PO6K 004 23.

rozrożonym ogranicza możliwości ich transportu w narządzie płciowym suk, co posiada szczególne znaczenie w kontekście istnienia u tego gatunku szczelnej, charakterystycznie uformowanej bariery szyjkowej (15). Silva i wsp. (20) zaznaczyli, że obserwowana po rozmrożeniu krótka przeżywalność plemników jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za niski odsetek szczennych suk po sztucznej inseminacji nasieniem poddanym konserwacji w niskich temperaturach. Linde-Forsberg i Forsberg (cyt. 9) w badaniach obejmujących analizę wyników 527 zabiegów sztucznej inseminacji nasieniem świeżym i rozmrożonym stwierdzili ciężę kolejno u 69,1% i 54,5% unasiennianych suk. W przypadku stosowania nasienia rozmrożonego zanotowano 30,5% spadek liczebności miotów.

W świetle przytoczonych danych celowe jest poszukiwanie dróg przedłużenia przeżywalności plemników. Obiecujące wyniki w zakresie poprawy jakości rozmrożonego nasienia wielu gatunków zwierząt uzyskano stosując, jako dodatek do rozrzedzalników, substancje powierzchniowo czynne, w tym Orvus ES Paste i Equex STM (14, 19, 21, 30).

Celem badań była ocena wpływu substancji powierzchniowo czynnej Equex STM na niektóre właściwości plemników psa w nasieniu poddanym konserwacji w niskich temperaturach.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na ejakulatach pozyskanych od 25 hodowlanych psów rasowych w wieku 2 do 7 lat, stanowiących własność prywatną. Badaniami objęto nasienie samców następujących ras: owczarek niemiecki (7 psów), dog de bordeaux (4 psy), wyżeł niemiecki (3 psy), rottweiler (2 psy), doberman (2 psy), dog niemiecki (2 psy), nowofunland (2 psy), bokser (1 pies), chow-chow (1 pies) i basset (1 pies). W ramach niniejszego eksperymentu przebadano łącznie 94 ejakulatory. Nasienie pobierano w sposób frakcjonowany, metodą masażu żołądźci prącia, do kalibrowanych 12 ml zbiorniczków z płaszczem wodnym, ogrzanych do temperatury 37°C. Do badań pozostawiano jedynie plemnikową frakcję ejakulatu. Po pobraniu przeprowadzono makroskopowe i mikroskopowe wstępne badanie jakości nasienia oraz przygotowywano materiał do badań uzupełniających, tj. oceny koncentracji i morfologii plemników.

Badaniami objęto ejakulatory cechujące się zarówno ruchliwością, jak i odsetkiem plemników o prawidłowej budowie morfologicznej mieszczącymi się w sugerowanej dla tego gatunku fizjologicznej normie wynoszącej nie mniej niż 70% (7). Właściwości makro- i mikroskopowe wszystkich frakcji nasiennych ejakulatów poddanych badaniom kształtowały się na prawidłowym dla psa poziomie (7), przy czym koncentracja wynosiła powyżej 100×10^6 plemników/ml.

Frakcję nasienną ejakulatu dzielono każdorazowo na dwie równe części – próbkę doświadczalną i kontrolną. W odniesieniu do próbek doświadczalnych stosowano rozrzedzenie nasienia za pomocą rozrzedzalnika o składzie opartym na komponentach Tris-kwas cytrynowy-glukoza

(27) z 1% (objętościowo) dodatkiem substancji powierzchniowo czynnej Equex STM (Minitüb GmbH), której składnikiem aktywnym jest laurylosiarczan sodu. Drugą część nasienia, oznaczoną jako próbkę kontrolną, rozrzedzano w opisanym wyżej rozrzedzalniku, jednak bez dodatku wymienionej substancji powierzchniowo czynnej. Procedura dzielenia każdego ejakulatu na próbki pozwoliła na wykluczenie zafałszowań wyników wynikających z osobniczo uwarunkowanej różnej podatności plemników na proces mrożenia.

Rozrzedzenie wstępne w stosunku objętościowym nasienia do rozrzedzalnika wynoszącym 1:1 przeprowadzano w temperaturze 33°C. Mieszaninę nasienia i rozrzedzalnika schładzano następnie przez 30 minut do temperatury 22°C, w której następowało rozrzedzenie wyrównawcze za pomocą identycznej, jak uprzednio objętości wymienionych wyżej rozrzedzalników. Po dalszych 60 minutach schładzania do temperatury 5°C przeprowadzano rozrzedzenie ostateczne przy użyciu wyżej opisanych dwóch rozrzedzalników, z dodatkiem i bez dodatku detergentu, zawierających ponadto glicerol w takiej ilości, aby końcowe stężenie tego środka osłaniającego w mieszaninie nasienia i rozrzedzalnika wynosiło 4% (objętościowo). Ostateczny stosunek objętościowy nasienia do rozrzedzalnika był w każdym przypadku stały i wynosił 1:4. Pozwoliło to zachować za każdym razem jednakowe stężenie wszystkich składników rozrzedzalnika w mieszaninie z nasieniem, w odniesieniu do wszystkich poddanych kriokonserwacji ejakulatów. Okres ekwilibracji nasienia w temperaturze 5°C wynosił 90 minut.

Po ekwilibracji rozrzedzone nasienie było mrożone w 0,5 ml słomkach Cassou (Minitüb GmbH), w parach azotu, w temperaturze -140°C przez 10 minut. Nasienie było składowane w ciekłym azocie przez okres 1 miesiąca przed rozmrożeniem. Proces rozmrażania słomek przeprowadzano w łaźni wodnej, w temperaturze 70°C przez 6 sekund.

W trakcie kolejnych etapów konserwacji nasienia, tj. po pobraniu, ekwilibracji i po rozmrożeniu, przeprowadzano ocenę wybranych właściwości plemników, w tym odsetka plemników o ruchu prawidłowym, odsetka plemników z niezmiennym akrosomem, aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AST) w płynie nadosadowym oraz przeżywalności plemników. Ruchliwość plemników oceniano pod mikroskopem kontrastowo-fazowym przy powiększeniu 400× i stałym podgrzewaniu szkiełka podstawowego do temperatury 39°C. Za plemniki ruchliwe uznawano komórki charakteryzujące się aktywnością ocenianą wg skali opisanej przez Dobrinski i wsp. (5) jako 3, 4 lub 5, tj. wolny, umiarkowany lub szybki ruch postępowy.

Przeżywalność plemników oceniano podczas 5-godzinnej porozmrożeniowej inkubacji nasienia w temperaturze 22°C (27). Probówki z nasieniem pomiędzy pomiarami były zamykane korkiem i przechowywane w zamkniętej cieplarni. Ocenę ruchliwości plemników dokonywano wg opisanych wcześniej zasad w odstępach 60-minutowych.

Ocenę morfologii akrosomów przeprowadzano w preparatach barwionych. Rozmazy po wysuszeniu barwiono barwnikiem Giemzy wg metodyki opisanej przez Watsona (28). Morfologię akrosomów oceniano przy pomocy dostosowanej do obrazów obserwowanych w preparatach

barwionych, zmodyfikowanej klasyfikacji przyjętej przez Syväri (25) i Terhaer (26).

Powyższe badania jakości nasienia uzupełniono o analizę biochemiczną. Przeprowadzono badanie aktywności AST w osoczu nasienia świeżego oraz w płynach nadosadowych nasienia ekwilibrowanego i rozmrożonego. Oznaczenia aktywności tego enzymu przeprowadzono według metody Reitmana-Frankela (18). Próbkki do analizy aktywności AST przygotowywano według metodyki opisanej przez Strzeżka i wsp. (23). Uzyskane wyniki aktywności enzymu w jednostce objętości (U/l) przeliczano na wartości przypadające na miliard plemników ($\text{mU}/10^9$ plemników).

Obliczenia statystyczne wykonano przy wykorzystaniu pakietu statystycznego Statgraphics 6.0. W celu porównania wpływu metod konserwacji nasienia w niskich temperaturach na jego jakość zastosowano model jednokierunkowej analizy wariancji z klasycznym testem F (Fisera). W przypadku odrzucenia hipotezy H orzekającej brak istotnych różnic pomiędzy średnimi efektami wywieranymi przez metody, zastosowano test Tukey'a (11).

Wyniki i omówienie

Stwierdzono, że już w trakcie wstępnych faz konserwacji nasienie rozrzedzone w medium z dodatkiem substancji powierzchniowo czynnej cechowało się korzystniejszymi parametrami jakościowymi. Po zakończonym procesie ekwilibracji zanotowano statystycznie istotne różnice pomiędzy próbkami doświad-

czalnymi i kontrolnymi ($p \leq 0,001$) w odniesieniu do aktywności ruchowej plemników i aktywności AST w płynie nadosadowym. Średni odsetek plemników o ruchu prawidłowym w próbce doświadczalnej i kontrolnej wynosił odpowiednio 79,5% i 71,3% (tab. 1), podczas gdy aktywność AST w płynie pozakomórkowym kształtowała się kolejno dla obu próbek na poziomie 392,3 $\text{mU}/10^9$ plemników i 561,3 $\text{mU}/10^9$ plemników. Zatem spadek jakości nasienia w próbkach doświadczalnych, konserwowanych z dodatkiem substancji Equex STM był mniejszy w trakcie rozrzedzania, schładzania i ekwilibracji w stosunku do próbek kontrolnych.

Wyniki badań własnych wydają się potwierdzać wnioski sformułowane przez Żorna (31) w odniesieniu do nasienia knurów. Autor ten przedstawił dane, że rozrzedzalnik z dodatkiem substancji powierzchniowo czynnej i żółtka jaja kurzego skutecznie przeciwdziała szokowi chłodowemu w temperaturze powyżej 0°C . Stwierdził on, że wykorzystanie rozrzedzalnika z dodatkiem żółtka i Orvus ES Paste (aktywny czynnik – laurylosiarczan sodu) zapobiega indukowanemu zjawisku udaru termicznego męskich gamet i zapewnia poprawę ruchliwości plemników o 60%, w porównaniu do próbek, gdzie wymienionych substancji nie dodawano.

Również po rozmrożeniu aktywność AST w płynie zewnątrzkomórkowym była istotnie niższa w próbkach

Tab. 1. Właściwości plemników u 25 psów w nasieniu konserwowanym w niskich temperaturach z wykorzystaniem rozrzedzalnika z dodatkiem i bez dodatku Equex STM ($n = 94$, $\bar{x} \pm s$)

Etap konserwacji nasienia	Próbka	Odsetek plemników o ruchu prawidłowym (%)	Odsetek plemników z niezmiennym akrosomem (%)	Aktywność AST w płynie nadosadowym nasienia ($\text{mU}/10^9$ plemników)
Nasienie świeże		87,3 \pm 4,7	95,2 \pm 1,2	274,9 \pm 112,5
Po ekwilibracji	Doświadczalna	79,5** \pm 3,3	87,9 \pm 3,7	392,3** \pm 109,6
	Kontrolna	71,3 \pm 3,7	86,4 \pm 2,9	561,3 \pm 132,2
Po rozmrożeniu	Doświadczalna	55,2 \pm 4,8	69,2 \pm 3,9	693,5* \pm 81,3
	Kontrolna	51,4 \pm 5,3	67,1 \pm 4,4	772,6 \pm 70,3

Objaśnienia: * różnica pomiędzy średnimi uzyskanymi w obu próbkach istotna statystycznie przy $p \leq 0,01$, ** różnica pomiędzy średnimi uzyskanymi w obu próbkach istotna statystycznie przy $p \leq 0,001$

Tab. 2. Przeżywalność plemników psa w temperaturze 22°C po rozmrożeniu nasienia konserwowanego przy wykorzystaniu rozrzedzalnika z dodatkiem i bez dodatku Equex STM ($n = 94$, $\bar{x} \pm s$)

Próbka	Odsetek plemników o ruchu prawidłowym podczas inkubacji nasienia po rozmrożeniu					
	0 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.	300 min.
Doświadczalna	55,2 \pm 4,8	49,2* \pm 6,7	46,2** \pm 7,9	41,7** \pm 8,1	38,5** \pm 9,3	35,2** \pm 10,6
Kontrolna	51,4 \pm 5,3	40,3 \pm 4,9	34,9 \pm 5,8	27,9 \pm 5,7	24,7 \pm 6,7	18,0 \pm 8,1

Objaśnienia: jak w tab. 1

doświadczalnych ($p \leq 0,01$), niż w nasieniu kontrolnym i wynosiła odpowiednio 693,5 mU/10⁹ i 772,6 mU/10⁹ plemników. Choć bezpośrednio po rozmrożeniu nie wykazano istotnych różnic ruchliwości plemników pomiędzy próbkami doświadczalnymi i kontrolnymi, to spadek aktywności ruchowej męskich gamet w trakcie dalszej inkubacji nasienia był zdecydowanie niższy w grupie, gdzie zastosowano dodatek substancji powierzchniowo czynnej. Średni odsetek plemników o ruchu prawidłowym bezpośrednio po rozmrożeniu w próbce doświadczalnej i kontrolnej był podobny i wynosił odpowiednio 55,2% i 51,4%. Jednak już po 60 minutach inkubacji w temperaturze 22°C różnice pomiędzy średnimi były istotne statystycznie ($p \leq 0,01$), a ruchliwość kształtowała się kolejno na poziomie 49,2% i 40,3% (tab. 2). Korzystny wpływ substancji powierzchniowo czynnej na ruchliwość plemników ulegał pogłębieniu w przebiegu dalszej inkubacji nasienia.

Wyższa aktywność ruchowa plemników oraz niższy stopień uwalniania AST do środowiska zewnątrzkomórkowego w próbkach doświadczalnych przemawiają za ochronnym oddziaływaniem zastosowanej substancji powierzchniowo czynnej na aparat ruchu męskich gamet poddanych konserwacji w niskich temperaturach. Oznaczanie aktywności AST w nasieniu jest czułą metodą pośredniego, biochemicznego określania stanu błon plemnikowych, pozwalającą stwierdzić zmiany ich przepuszczalności. Uwalnianie enzymu do płynu zewnątrzkomórkowego świadczy o większej labilności lub uszkodzeniu struktury błon plazmatycznych. Zmiany aktywności AST uważane są również za wskaźnik prawidłowości przebiegu procesów metabolicznych wstawki plemnika, w szczególności spirali mitochondrialnej (24). AST jest enzymem uczestniczącym w przemianach aminokwasów, których końcowym produktem są ketokwasy. Biorą one udział w procesach energetycznych związanych z przemianami ATP. Tak więc zarówno lepsze właściwości ruchowe plemników, jak i niższy stopień uwalniania AST do płynu zewnątrzkomórkowego w nasieniu rozrzedzonym z dodatkiem detergentu przemawiają za tezą, iż ochronny wpływ Equex STM w trakcie konserwacji dotyczy części wstawkowej plemnika. Pytanie, czy to ochronne oddziaływanie realizowane jest wyłącznie poprzez stabilizację błony komórkowej, czy wpływ na funkcjonowanie całości odcinka wstawkowego męskich gamet, pozostaje otwarte.

Wyniki badań własnych są w dużej mierze zgodne z rezultatami uzyskanymi przez Thomasa i wsp. (27), którzy stosując konserwację w słomkach wykazali korzystny wpływ rozrzedzalnika z dodatkiem Orvus ES Paste w stężeniu 0,25%-2% na przeżywalność plemników psa po rozmrożeniu. Badacze ci stwierdzili równocześnie bezpośrednio po rozmrożeniu wyższą ruchliwość plemników w nasieniu rozrzedzonym w rozrzedzalniku z dodatkiem substancji powierzchniowo czynnej. Peña i Linde-Forsberg (14) oraz Rota

i wsp. (19) wykazali, stosując barwienie fluorescencyjne i cytometr przepływowy, że rozrzedzalnik z domieszką substancji powierzchniowo czynnej w stężeniu 1% wywiera korzystny wpływ na ocenianą po rozmrożeniu ciągłość błon plazmatycznych główki plemnika i prawidłowość budowy akrosomu. W badaniach własnych nie stwierdzono natomiast istotnie wyższego odsetka plemników z niezmienionym akrosomem w nasieniu rozmrożonym, konserwowanym przy wykorzystaniu rozrzedzalnika z dodatkiem detergentu. Należy jednak mieć na uwadze zastosowaną w badaniach własnych metodę przygotowywania preparatów do oceny morfologii akrosomów. Biorąc pod uwagę fakt wykorzystania do badań mikroskopowych preparatów barwionych barwnikiem Giemzy, należałoby zastanowić się, czy zastosowana w niniejszym eksperymencie technika oceny nie stanowiła przeszkody w uchwyceniu niewielkich zmian morfologii plemników. Należy jednak podkreślić, iż o ile w przeprowadzonym doświadczeniu nie potwierdzono oddziaływania detergentu na ciągłość błon plazmatycznych główki, o tyle uzyskane wyniki przemawiają za korzystnym wpływem Equex STM na stabilność błon oraz funkcjonowanie wstawki plemników.

Mechanizm działania ochronnego substancji powierzchniowo czynnych w procesie konserwacji nasienia w niskich temperaturach nie jest do końca wyjaśniony. Możliwy jest ich bezpośredni wpływ na błony komórkowe lub działanie na lipoproteinowy komponent żółtka jaja kurzego (27). Strzeżek i wsp. (22) uważają, iż substancje zawierające laurylosiarczan sodu powodują dyspersję składników żółtka i osocza nasienia, co zwiększa stabilizujący wpływ opłaszczających lipoprotein na błony plemników w trakcie konserwacji, czego wyrazem są korzystniejsze wyniki ruchliwości i integralności akrosomów. Podobnie Watson (29) oraz Zorn (31) wyrażają opinię, iż substancje powierzchniowo czynne pogłębiają ochronny wpływ żółtka jaja kurzego na przeżywalność plemników. Tezę tę potwierdzają również Pursel i wsp. (17), którzy poprzez wyłączenie żółtka ze składu rozrzedzalnika zniewelowali korzystny wpływ substancji powierzchniowo czynnej na właściwości plemników. Za mechanizmem działania synergistycznego detergentu i żółtka przemawiają również wyniki otrzymane przez Aarioła i Foote (1), którzy stwierdzili relację pomiędzy optymalną koncentracją substancji powierzchniowo czynnej a stężeniem żółtka jaja kurzego.

Substancje powierzchniowo czynne wywierają prawdopodobnie również działanie bezpośrednie na błony komórek rozrodczych. Laurylosiarczan sodu zmniejsza depresyjny wpływ jednostopniowego, gwałtownego rozrzedzenia nasienia rozrzedzalnikiem z dodatkiem glicerolu. Działanie takie umożliwiają zmiany właściwości błon wywołane przez detergent, prowadzące do ograniczenia szoku osmotycznego podczas rozrzedzenia (1).

Uzyskane wyniki badań własnych skłaniają do wyrażenia opinii, że zastosowanie substancji powierzchniowo czynnych typu Equex STM do rozrzedzalników stanowi cenne ich uzupełnienie, zwiększające szansę skutecznej inseminacji suk, umożliwiając przedłużenie przeżywalności plemników po rozmrożeniu.

Piśmiennictwo

1. *Arriola J., Foote R. H.*: Glycerololation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 1987, 70, 1664-1670.
2. *Badinand F., Fontbonne A., Maurel M. C., Siliart B.*: Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and lucinizing hormone and vaginal smears. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1993, 47, 63-67.
3. *Battista M., Parks J., Concannon P.*: Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, TRIS or TEST extenders. *Proc. XI Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem.*, Dublin 1988, t.3, 229-230.
4. *Doak R. L., Hall A., Dale H. E.*: Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J. Reprod. Fert.* 1967, 13, 51-58.
5. *Dobrniski I., Lulać C., Barth A. D., Post K.*: Effect of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1993, 47, 291-296.
6. *England G. C. W.*: Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1993, 47, 243-255.
7. *Feldman E. C., Nelson R. W.*: Canine and feline endocrinology and reproduction. W.B. Saunders Comp., Philadelphia 1996.
8. *Linde-Forsberg C.*: Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 1991, 21, 467-485.
9. *Linde-Forsberg C.*: Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Sem. Vet. Med. Surg., Small Animal* 1995, 10, 48-58.
10. *Linde-Forsberg C., Forsberg M.*: Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1989, 39, 299-310.
11. *Luszniewicz A., Slaby T.*: Statystyka stosowana. Wyd. PWN, Warszawa 1996.
12. *Morton D. B., Bruce S. G.*: Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 1989, 39, 311-316.
13. *Olar T. T., Bowen R. A., Pickett B. W.*: Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 1989, 31, 451-461.
14. *Peña A., Linde-Forsberg C.*: Effect of Equex, one or two step dilution and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000, 54, 859-875.
15. *Pineda M. H., Kainer R. A., Faulkner L. C.*: Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *Am. J. Vet. Res.* 1973, 34, 1487-1491.
16. *Province C. A., Amann R. P., Pickett B. W., Squires E. L.*: Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 1984, 22, 409-415.
17. *Pursell V. G., Schulman L. L., Johnson L. A.*: Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.* 1978, 47, 198-202.
18. *Reitman S., Frankel S.*: A colorimetric method for the determination of serum glutamic-oxaloacetic transaminase and serum glutamic pyruvic transaminase. *Amer. J. Clin. Path.* 1957, 28, 56-63.
19. *Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C., Rodriguez-Martinez H.*: Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997, 47, 1093-1101.
20. *Silva L. D. M., Onclin K., Lejeune B., Versteegen J. P.*: Comparisons of intra-vaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.* 1996, 17, 154-157.
21. *Strohmeier M.*: Tiefgefrierung von Ziegenbocksperma inter besonderer Berücksichtigung der Saisonalität sowie der Zentrifugation und der Verwendung eines Detergents. *Praca dokt., Tierärztliche Hochschule, Hannover* 1988.
22. *Strzeżek J., Głogowski J., Magierska E., Luberda Z., Jabłonowska Cz.*: Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. *Proc. X Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem.*, Urbana-Champaign 1984, 244.
23. *Strzeżek J., Głogowski J., Śmigalska J., Czeżot H.*: Testy enzymatyczne w zastosowaniu do oceny stanu błon cytoplazmatycznych plemników po zamrożeniu w ciekłym azocie. *ZUPWR, AR-T Olsztyn* 1979.
24. *Strzeżek J., Śmigalska J., Czeżot H., Al-Taha T. J., Głogowski J., Limonowicz J.*: Kriobiochemiczne zmiany w nasieniu buhaja, tryka i kuura. *Mat. XVI Sesji Nauk. Sekcji Fizjologii i Patologii Rozrodu PTNW*, 1979, t.2, 163-174.
25. *Sywäri K.*: Morphologische und funktionelle Untersuchungen am Akrosom der Hundesamenzelle. *Praca dokt., Tierärztliche Hochschule, Hannover* 1984.
26. *Terhaer P.*: Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma: Motilität, ATP-Konzentration und Akrosomintegrität der Spermien bei Zusatz unterschiedlicher Glycerinkonzentrationen sowie von Seminalplasma zum verdünnten bzw. aufgetauten Samen. *Praca dokt., Tierärztliche Hochschule, Hannover* 1993.
27. *Thomas P. G. A., Surman V., Myers-Wallen V. N., Concannon P. W., Ball B. A.*: Addition of sodium dodecyl sulphate to Tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. *Proc. XII Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem.*, Haga, 1992, t.4, 1823-1825.
28. *Watson P.F.*: Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 1975, 97, 12-15.
29. *Watson P.F.*: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fert. Dev.* 1995, 7, 871-891.
30. *Westendorf P., Richter L., Treu H.*: Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 1975, 82, 261-267.
31. *Zorn M.*: Zur Kälteschockempfindlichkeit von Eberspermien nach Verwendung unterschiedlicher Verdünnungsmedien und Zusätzen von Solcoseryl®, Eidotter und Orvus Es Paste. *Praca dokt., Tierärztliche Hochschule, Hannover* 1987.

Adres autora: dr Wojciech Nizański, Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław; e-mail: nizanski@ozi.ar.wroc.pl

NELL A., JAMES S. A., BOND C. J., HUNT B., HERRTAGE M. E.: Identyfikacja i występowanie nowego gatunku grzyba *Malassezia* na zdrowej skórze koni. (Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin). *Vet. Rec.* 150, 395-398, 2002 (13)

Określono występowanie *Malassezia* sp. w różnych okolicach ciała koni, W tym celu na skórę koni nakładano taśmy samoprzylepne, które po barwieniu zmodyfikowaną metodą Wrighta oglądano pod mikroskopem. Z miejsc, z których padanie mikroskopowe wypadło pozytywnie wykonywano posiewy na agar z krwią końską, agar Sabourauda z dekstrozą i zmodyfikowane podłoże Dixona i inkubowano w 26°C i 32°C. Czyste hodowle drobnoustrojów o właściwościach *Malassezia* uzyskano na podłożu Sabourauda z dekstrozą i dodatkiem kwasu olejowego przy inkubacji w 30°C. *Malassezia* sp. występowała najczęściej na skórze pachwin, rzadziej w okolicy odbytu i pach. Obecność *Malassezia* nie była skorelowana z płcią i wiekiem koni. Analiza sekwencji 26S rybosomalnego DNA D1/D2 wykazała, że izolaty występujące na skórze koni należą do nowego gatunku, ściśle spokrewnionego z *M. sympodialis*.

G.

KIMURA K. M., HARITANI M., KUBO M., HAYASAKA S., IKEDA A.: Ocena histopatologiczna i immunochemiczna pierwszego przypadku BSE w Japonii. (Histopathological and histochemical evaluation of the first case of BSE in Japan). *Vet. Rec.* 151, 328-330, 2002 (11)

Pierwszy przypadek BSE zdiagnozowano w Japonii u krowy rasy holsztyńskiej w wieku 5 lat z zaburzeniami koordynacji ruchów kończyn. Chorobę zdiagnozowano w oparciu o wyniki badań histopatologicznych, immunochemicznych i technikę western blot. Rozpoznanie potwierdziło laboratorium referencyjne w Weybridge. Badaniem histopatologicznym stwierdzono wakuolizację w neuropilu pnia mózgu. Zmiany gąbczaste były najsilniej wyrażone w śródmózgowiu i rdzeniu przedłużonym, zwłaszcza w jądrze szlaku rdzeniowego nerwu trójdzielnego. Badaniem immunohistochemicznym stwierdzono nagromadzenie PrP głównie w pniu mózgu, w jądrze szlaku rdzeniowego nerwu trójdzielnego, w jądrze grzbietowym nerwu błędnego, jądrze szlaku samotnego, jądrze oliwkowym oraz w istocie szarej tworzącej siateczkowatego.

G.