Ocena zdolności zapładniającej nasienia buhajów w oparciu o analizę *in vivo* i *in vitro*

KAROLINA STASIAK, PAWEŁ ŁAKOTA, KATARZYNA STADNICKA

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Otrzymano 08.08.2016

Zaakceptowano 20.03.2017

Stasiak K., Łakota P., Stadnicka K.

Assessment of fertilizing capacity of bull semen based on *in vivo* and *in vitro* assays

Summary

The aim of this work was to evaluate the fertilizing capacity of bulls on the basis of the assessment of fresh and thawed semen, following the swim-up procedure and immunological assay with IgA and IgG antisperm antibodies. In addition, the suitability of immunological reaction with IgG and IgA antisperm antibodies for seminological assessment of bull semen was examined. Tests were conducted with semen originating from Holstein-Friesian bulls. Ejaculates were collected twice from 15 two-year-old males, yielding 30 samples of semen. After the calculation of sperm concentration and motility, the samples were diluted with Biociphos-Plus® and frozen in straws. After thawing, sperm concentration and motility were calculated again (an average of 101.4 million sperm/ml with a motility of around 21%), and the spermatozoa were subjected to swim-up. At the same time, frozen-thawed bull semen was tested for the presence of antisperm antibodies, using SpermMar Tests for IgG and IgA. According to the records of the insemination centre, 53 515 insemination treatments had been conducted with semen of selected bulls. In a population of 30 324 cows, the calculated insemination index amounted to 1.76. Half of the cows which were qualified for insemination had already been fertilized with the first treatment (ca 52.8%). After the swim-up, there was an average of 4.5 million hyperactivated spermatozoa with a motility of around 41%. Furthermore, spermatozoa associated with IgG antisperm antibodies were found in 20 ejaculates, i.e. in around 66.67% of all semen samples obtained. The spermatozoa reacted positively with IgA antibodies in as many as 23 samples, which constituted 76.67% of all ejaculates obtained. Correlations between the routinely analyzed semen parameters and the selected parameters (immunological, swim-up) which were demonstrated in this work, did not appear to be sufficiently convincing. Therefore, it seems necessary to repeat this study with a population of clinically healthy, fertile bulls, as well as with juvenile bulls newly introduced to the insemination centre or with bulls with reduced fertility.

Keywords: semen, fertility, antisperm antibodies, swim-up

Sztuczne unasiennianie (AI) to jedna z metod kontrolowanego rozrodu, umożliwiającą efektywne wykorzystanie najlepszych samców zarodowych. Pobierając nasienie od buhaja, można uzyskać w ciągu roku kilkadziesiąt tysięcy porcji nasienia stanowiących tzw. dawkę inseminacyjną. Do przygotowania porcji inseminacyjnych przeprowadzane są obowiązkowo tzw. podstawowe badania dotyczące oceny jakościowej i ilościowej pozyskanego nasienia. Ocena koncentracji, ruchliwości i morfologii plemników to kluczowe parametry nasienia, które decydują o jego zdolności zapładniającej. Dzięki nim można, od razu po uzyskaniu ejakulatów, wyeliminować nasienie złej jakości. Według Byrd i wsp. (1), ocena świeżego ejakulatu przeprowadzona zgodnie ze standardowymi procedurami z reguły słabo koreluje z jakością dawek

inseminacyjnych. Dopiero ocena jakości nasienia dokonana po jego mrożeniu/rozrożeniu może dać pełną informację o zdolności zapładniającej samca (7). Według Gadea (4), ocena jakości nasienia może być wykonana poprzez określenie aktywności ruchowej plemników (koncentracja, ruchliwość, odsetek żywych oraz morfologicznie zmienionych plemników) albo poprzez oznaczanie intensywności procesów biochemicznych charakteryzujących metabolizm tej komórki. Możliwość przewidywania i wyjaśnienia zmian zachodzących w plemnikach podczas kriokonserwacji powoduje, że badacze ciągle poszukują parametru, którego ocena w świeżym nasieniu umożliwi określenie zdolności plemników do przeżywania procesu mrożenia, a tym samym zdolności do późniejszego zapłodnienia. Ponieważ skuteczność inseminacji zale-

ży od jakości użytego nasienia, istotne jest określenie wszystkich czynników wpływających na jego zdolność zapładniającą (15).

Niewątpliwie jednym z takich czynników jest kapacytacja plemników (fizjologiczny proces konieczny do osiągnięcia przez plemniki gotowości do penetracji komórek wzgórka jajonośnego i osłonki przejrzystej). Podczas reakcji kapacytacji dochodzi do hiperaktywacji plemnika, w wyniku której zwiększa się jego ruchliwość na skutek wzrostu częstotliwości uderzenia i siły pchania witki (9) oraz zmniejszenia ilości ruchów obrotowych wzdłuż długiej osi plemnika (3). Skutecznym sposobem kapacytacji plemników w warunkach *in vitro* jest metoda migracji wstępującej swim-up, w której ruchliwe plemniki podpływają w górne partie pożywki i tym samym ostatecznie potwierdzają zdolność zapładniającą nasienia.

Innym czynnikiem, wpływającym na zdolność zapładniającą pozyskanego nasienia są obecne w nim przeciwciała przeciwplemnikowe (ASA – Anti-Sperm-Antibodies). Przeciwciała nasienia są produkowane przez organizm podczas przerwania (w wyniku zatoru, infekcji bądź uszkodzenia błon) naturalnej bariery immunologicznej krew–jądro (12). Według Sardoy i wsp. (14), immunoglobuliny klasy IgG są obecne zarówno w nasieniu, jak i w surowicy, natomiast przeciwciała klasy IgA wydzielane są przez dodatkowe gruczoły płciowe i występują wyłącznie w nasieniu. Oznaczenie przeciwciał plemnikowych pozwala wyeliminować nieplodność o podłożu immunologicznym.

Celem badań była ocena zdolności zapładniającej nasienia buhajów, na podstawie jakości jego nasienia: świeżego, rozmrożonego, po zastosowaniu metody swim-up oraz efektu reakcji immunologicznej z przeciwciałami przeciwplemnikowymi klasy IgA i IgG. Ponadto określono, czy istnieje związek pomiędzy przeprowadzonymi oznaczeniami *in vitro* a *in vivo* (ocena terenowa).

Materiał i metody

W badaniu wykorzystano nasienie buhajów rasy holsteińsko-fryzyskiej. Buhaje należały do Wielkopolskiego Centrum Hodowli i Rozrodu Zwierząt w Tulcach k. Poznania. Nasienie pobierano od 15 samców w wieku dwóch lat, dwukrotnie w ciągu dnia, przy użyciu sztucznej pochwy. Wszystkie użyte ejakulatory (n = 30) zostały zakwalifikowane jako prawidłowe na podstawie parametrów ruchliwości (powyżej 70%) i koncentracji plemników (powyżej 500 mln/ml).

Pozyskane ejakulatory poddano wstępnej ocenie. Po zarejestrowaniu całkowitej objętości ejakulatu oceniono: ruch masy i ruch indywidualny plemników. Koncentrację plemników zmierzono fotometrycznie oraz obliczono z wykorzystaniem komory Maklera (Sefi Medical Instruments Ltd). Następnie próbki nasienia – po rozcieńczeniu koncentratem Biociphos-Plus® – schłodzono do 4°C (przez 4 h), zamrożono (4 cm nad lustrem ciekłego azotu, po 10 minutach mrożenia w wym. temperaturze, słomki zanurzano w ciekłym azocie –196°C). Po miesiącu przechod-

wywania słomki z nasieniem rozmrożono w łaźni wodnej o temperaturze 38°C (3 minuty). W nasieniu rozmrożonym obliczono koncentrację plemników oraz ich ruchliwość, a następnie poddano je metodzie migracji wstępującej (swim-up). W tym celu do probówki wirówkowej wprowadzono 1 ml pożywki hodowlanej HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, „GIBCO TM”), ekwilibrowanej min. 12 godzin w komorze inkubacyjnej, wysyczonej 5% CO₂, w temperaturze 37°C. Następnie na dno probówki poprzez podwarstwienie wprowadzono dawkę inseminacyjną rozmrożonego nasienia. Przygotowane w ten sposób probówki ponownie inkubowano w pozycji pochylonej pod kątem 45°. Po 60 min inkubacji około 0,6 ml wierzchniej warstwy zawiesiny z ruchliwą frakcją plemników przeniesiono do nowej probówki. Próbkę wirowano przez 10 minut przy 300 obr./min. Następnie odciągnięto supernatant, a kroplę osadu umieszczono w hemocytometrze w celu oceny pod mikroskopem kontrastowo-fazowym (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL Inverted, Niemcy).

Po rozmrożeniu nasienie buhajów poddano badaniu na obecność przeciwciał przeciwplemnikowych, stosując kliniczne testy bezpośrednie: SpermMar Test IgG oraz SpermMAR test IgA (FertiPro N.V. Belgia). W tym celu do komory Maklera naniesiono po 5 µl rozmrożonego nasienia i odpowiedniego (dla każdego z testów) reagentu lateksowego. Po zmieszaniu składników prowadzono obserwację pod mikroskopem kontrastowo-fazowym przy powiększeniu 200×. Po upływie dwóch minut od dodania odczynników do próbki nasienia oceniono 100 plemników i obliczono procent plemników związanych z przeciwciałami przeciwplemnikowymi.

Nasieniem pozyskanym od wybranych do doświadczenia buhajów zapłodniono ok. 30 324 krów. W celu rozpoznania ciąży u krów przeprowadzono badanie palpacyjne *per rectum*. Na podstawie danych dotyczących liczby przeprowadzonych w terenie zabiegów inseminacyjnych obliczono ich skuteczność, a także płodność danego samca.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej wykorzystując program Statistica 8.0 (StatSoft, USA). W celu określenia różnic istotnych statystycznie zastosowano test U Manna-Whitneya. Ocenę współzależności pomiędzy analizowanymi parametrami przeprowadzono w oparciu o współczynniki korelacji rang Spearmana. Różnice uznano za istotne przy $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Objętość nasienia pozyskanego od wybranej populacji buhajów cechowała się dużą zmiennością od 1,5 do 7,5 ml (średnio ok. $4,2 \pm 1,3$ ml nasienia). W ejakulatach tych można było zauważyć falowanie masy plemników, co z kolei świadczy o dużej ich koncentracji i ruchliwości. W tab. 1 zestawiono średnie wartości koncentracji i ruchliwości plemników buhajów w nasieniu świeżym i mrożonym. Wskazania fotometryczne koncentracji plemników w świeżym ejakulacie przewyższały średnio o 18,9% rezultaty otrzymane po obliczeniu koncentracji plemników z wykorzystaniem komory Maklera. Tak zwane przeszacowanie koncentracji było prawdopodobnie efektem uwzględnienia zanieczyszczeń, tj. komórek nabłonka, krwi i drobno-

Tab. 1. Koncentracja i ruchliwość plemników buhajów w nasieniu świeżym i mrożonym (n = 30)

Cecha	Nasienie świeże				Nasienie mrożone							
	n = 30				po rozmrożeniu n = 30				po zastosowaniu metody swim-up n = 30			
	$\bar{x}$	SD	min	max	$\bar{x}$	SD	min	max	$\bar{x}$	SD	min	max
Koncentracja plemników zmierzona fotometrycznie [mln/ml]	1388,73	476,38	664,0	2339,0	–	–	–	–	–	–	–	–
Koncentracja plemników zmierzona przy użyciu hemocytometru [mln/ml]	1126,47 ^A	434,09	540,0	2060,0	101,4 ^B	38,98	34,0	225,0	4,5 ^C	3,77	1,0	14,0
Ruchliwość plemników [%]	82,18 ^A	8,93	71,0	100,0	21,18 ^B	11,86	2,0	59,0	41,47 ^B	21,72	1,5	77,0

Objaśnienie: a, b, A, B – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w kierunku poziomym – małymi przy $p \leq 0,05$, dużymi przy $p < 0,01$

ustrojów. Ponadto, ocenę mogły utrudniać występujące aglutynacje plemników. Według Klimowicz i wsp. (8), przyczyną zawyżenia wyników (szczególnie przy niskiej koncentracji plemników w nasieniu) są błędne odczyty przez urządzenie elementów niebędących główką plemnika, ale posiadających tę samą, co ona, wielkość. Z uwagi na znaczne różnice w pomiarze koncentracji plemników w dalszych oznaczeniach pominięto oznaczanie jej metodą fotometryczną.

Według Gadea (4), gwarancją wysokiej płodności samca jest nie tylko odpowiednia koncentracja plemników w nasieniu, ale również ich ruchliwość. W badanych ejakulatach średnia ruchliwość plemników przekroczyła wymagane minimum (70%) określające przydatność ejakulatów do procesu inseminacji. Po odpowiednim rozcieńczeniu nasienia, jego mrożeniu i rozmrożeniu, koncentracja oraz ruchliwość plemników w przygotowanych dawkach inseminacyjnych została obniżona, odpowiednio, o 91% i 74,3%. Zastosowana metoda migracji wstępującej swim-up pozwoliła uzyskać ok. 4,5 mln plemników o ruchliwości na poziomie 41,5%. Duża zmienność ejakulatów (zarówno w odniesieniu do koncentracji, jak i ruchliwości plemników) stanowi problem dla stacji unasienniania. W ten sposób ogranicza się liczbę przygotowywanych porcji inseminacyjnych, a to z kolei wpływa niekorzystnie na ekonomiczne użytkowanie buhajów.

Uzyskane w badaniach własnych wartości koncentracji plemników, zarówno w świeżych ejakulatach, jak i w przygotowanych dawkach inseminacyjnych były zbliżone do wartości przedstawionych przez innych autorów (5, 11). Największą aktywnością ruchową charakteryzowały się plemniki bezpośrednio po ejakulacji. Niniejsze badania potwierdzają wcześniejsze dane piśmiennictwa (2), że ruchliwość i przeżywalność nasienia, a co najważniejsze – zdolność do zapłodnienia – obniża się po jego mrożeniu. Obniżona wartość biologiczna nasienia przekłada się na niższą płodność (13).

W wyniku działania niskiej temperatury na plemniki, następuje obniżenie integralności błony komórkowej (poprzez zmiany w jej strukturze), co z kolei prowadzi do zaburzeń w transporcie jonów między środowiskiem zewnątrz i wewnątrzkomórkowym (18). W temperaturze poniżej 0°C dochodzi do zmiany układu lipidów i białek błonowych oraz do wzrostu przepuszczalności błony, a w momencie tworzenia się kryształów lodu i zmiany ciśnienia osmotycznego dochodzi do destabilizacji błony komórkowej i utraty jej funkcji (17). Według Verstegen i wsp. (16), ocena ruchliwości plemników dokonana po rozmrożeniu daje najdokładniejszą informację dotyczącą potencjału zapładniającego nasienia. Wniosek ten wysnuli m.in. na podstawie dodatknych korelacji wyznaczonych między parametrami ruchu plemnika oraz całkowitą liczbą mrożonych/rozmrożonych ruchliwych plemników a wskaźnikami płodności. Wyniki badań własnych również potwierdzają wagę przydatności oceny ruchliwości plemników po mrożeniu nasienia w przewidywaniu płodności zwierząt. Uzyskany współczynnik korelacji ($r = 0,31$) jest wprawdzie dodatni, ale nieistotny statystycznie.

Wyniki danych, dotyczących użytkowania wybranych buhajów zestawiono w tab. 2. Inseminację przeprowadzono wykorzystując przygotowane dawki zawierające średnio 25 mln plemników/słomkę (100 mln plemników/ml o ruchliwości ok. 20%). W ten sposób przeprowadzono 53 515 zabiegów unasienniania, z czego dwukrotnie przeprowadzonych

Tab. 2. Ocena *in vivo* zdolności zapładniającej nasienia buhajów

Parametr	Miary statystyczne			
	średnia	SD	min	max
Ocena płodności buhajów				
% płodności po pierwszym zabiegu inseminacji	65,66	4,43	57,89	73,79
% płodności po wszystkich zabiegach inseminacyjnych	65,93	3,90	57,65	73,15
Ocena unasienniania buhajów				
Skuteczność I zabiegu inseminacyjnego (%)	52,82	4,36	43,64	61,43
Skuteczność II zabiegu inseminacyjnego (%)	22,16	1,40	18,79	24,14
Skuteczność III zabiegu inseminacyjnego (%)	9,79	1,50	7,37	13,20
Skuteczność IV-VI zabiegu inseminacyjnego (%)	8,31	2,01	5,33	12,72
Skuteczność reinseminacji (%)	6,92	1,56	4,46	10,52

Objaśnienie: średnią obliczono na podstawie kilku gospodarstw

Tab. 3. Analiza korelacji między cechami jakości nasienia a danymi dotyczącymi użytkowania buhajów

Cecha	Płodność	Skuteczność inseminacji			
		I	II	III	IV-VI
Koncentracja plemników w nasieniu świeżym	0,28	0,32	-0,19	-0,04	-0,14
Objętość ejakulatu	-0,36	-0,14	0,09	0,24	0,42
Ruchliwość plemników w nasieniu świeżym	0,38	0,00	0,21	-0,11	-0,19
Koncentracja plemników w nasieniu po mrożeniu/rozrożeniu	0,27	-0,30	0,08	0,33	0,16
Ruchliwość plemników w nasieniu po mrożeniu/rozrożeniu	0,31	0,37	0,13	0,12	0,29
Koncentracja plemników w nasieniu rozmrożonym, poddanym zabiegowi swim-up	0,27	0,07	0,52*	-0,01	-0,21
Ruchliwość plemników w nasieniu rozmrożonym, poddanym zabiegowi swim-up	0,26	0,29	-0,30	-0,32	-0,08
Obecność IgG	-0,22	-0,02	0,17	0,28	-0,06
Obecność IgA	-0,18	0,06	0,25	-0,02	-0,03

Objaśnienie: *istotność przy $p \leq 0,05$

inseminacji było 11 695, trzykrotnie – 4625, powyżej czterech zabiegów – 3774 i reinseminacji – 3098. Dla populacji krów (30 324 sztuk) obliczony indeks inseminacji wynosił 1,76. Połowa zakwalifikowanych do inseminacji krów została zapłodniona już podczas pierwszego zabiegu (ok. 52,8%). Ponowne przeprowadzenie inseminacji w trakcie trwania tej samej rui (reinseminacja) zwiększyło skuteczność tego zabiegu do ok. 60%, natomiast sam zabieg inseminacji powtórzony przez trzy kolejne rui dawał już 92% pewności zapłodnienia. Przedstawiona ocena płodności buhajów w warunkach *in vivo* nie jest jednak precyzyjna. Skuteczność zapłodnienia w warunkach terenowych zależy nie tylko od jakości nasienia samca, ale również od wielu czynników związanych z samicą (tj. błędów żywieniowych, nieumiejętnego rozpoznania rui oraz źle przeprowadzonego zabiegu inseminacyjnego).

W wyniku przeprowadzonej selekcji plemników metodą swim-up procentowy udział plemników hiperaktywowanych, a więc zdolnych do zapłodnienia, kształtował się na poziomie 4,44%. Uzyskane wyniki nieznacznie przekraczają poziomy oznaczone przez innych autorów (5, 11). Wykorzystując do inseminacji nasienie, którego plemniki poddano selekcji metodą swim-up, w jednej dawce inseminacyjnej znalazłoby się średnio 4,5 mln plemników, których hiperaktywny ruch byłby na poziomie ok. 41,5%. Pomimo wyraźnej poprawy ruchliwości plemników, przeprowadzona analiza statystyczna (tab. 3) jednoznacznie nie potwierdziła pozytywnego wpływu zastosowanej metody swim-up na zdolność zapładniającą nasienia buhajów. Uzyskane korelacje między koncentracją i ruchliwością plemników po zastosowaniu tej metody a płodnością samca były dodatnie, ale nieistotne statystycznie (odpowiednio, $r = 0,27$ i $r = 0,26$).

Na ryc. 1 przedstawiono występowanie reakcji immunologicznej z przeciwciałami przeciwpłomnikowymi w badanej populacji buhajów. W grupie 30 analizowanych ejakulatów, tylko w trzech z nich (pochodzących od dwóch buhajów) stwierdzono brak jakiegokolwiek reakcji z przeciwciałami. Natomiast obecność plemników związanych z przeciwciałami

Ryc. 1. Reakcja plemników na obecność odpowiednich przeciwciał IgG i IgA

mi przeciwpłomnikowymi IgG stwierdzono w 20 ejakulatach, co stanowi około 66,67% wszystkich pozyskanych próbek nasienia. Z kolei reakcję pozytywną plemników z przeciwciałami IgA rozpoznano aż w 23 próbkach (stanowiących 76,67% wszystkich pozyskanych ejakulatów). Ponadto, tylko w czterech próbkach nasienia (co stanowi 13,33% wszystkich ejakulatów) stwierdzono reakcję główek plemników z cząsteczkami lateksowymi opłaszczonymi IgA przy jednoczesnym braku reakcji z przeciwciałami IgG.

W celu dokładnej oceny zdolności zapładniającej *in vitro* nasienia buhajów przeprowadzono uzupełniająco bezpośrednie testy na obecność przeciwciał przeciwpłomnikowych. Wyniki testu SpermMar IgG zależą od procentowej liczby plemników, których powierzchnia uległa związaniu z przeciwciałami przeciwpłomnikowymi. Obecne w nasieniu przeciwciała IgG mogą wiązać się zarówno z główką plemnika (utrudniając w ten sposób jego reakcję z komórką jajową), jak i z wtką (zaburzając jego ruch) (19). Związanie plemników z przeciwciałami IgG na poziomie nie większym niż 10% nie wpływa ujemnie na proces zapłodnienia. W przypadku, kiedy 10-39% plemników zostanie pokrytych przez kuleczki lateksu, można się spodziewać niepłodności o podłożu immunologicznym. Natomiast gdy liczba związanych plemników przekracza 40%,

świadczy to o wysoce prawdopodobnym istnieniu niepłodności immunologicznej (6). W niniejszych badaniach obecność plemników związanych z przeciwciałami przeciwpłomnikowymi IgG stwierdzono w 20 ejakulatach, natomiast z przeciwciałami IgA aż w 23 próbkach nasienia. Świadczy to o celowości diagnozowania zaburzeń w zdolności do zapłodnienia o podłożu immunologicznym. Z uwagi na fakt wystąpienia reakcji pozytywnej główek plemników z cząsteczkami lateksowymi opłaszczonymi IgA (przy jednoczesnym braku reakcji z przeciwciałami IgG) uzasadnione wydaje się przeprowadzanie testów immunologicznych na obecność w nasieniu IgA.

Przeprowadzona analiza statystyczna pozwoliła na ustalenie zależności między cechami jakości nasienia na różnych etapach oznaczeń a jego immunoreaktywnością (tab. 4). Stwierdzona zależność pomiędzy obecnością w nasieniu przeciwciał przeciwpłomnikowych klasy IgA a koncentracją plemników charakteryzującą nasienie świeże ($r = -0,59$ przy $p \leq 0,05$) była istotna statystycznie. Niniejsze wyniki potwierdzają spostrzeżenia innych autorów (10) dotyczące nasienia ludzkiego. W płazmie nasienia mężczyzn zwiększony poziom IgG zanotowano w ejakulatach pozbawionych plemników (u osobników bezpłodnych) oraz w przypadku stanów zapalnych w obrębie męskiego układu rozrodczego. W niniejszych badaniach niewątpliwie wpływ na wzrost poziomu immunoglobulin z obu klas ma objętość pozyskanych ejakulatów. Wyznaczony współczynnik korelacji między poziomem przeciwciał a ilością pozyskanego od buhajów nasienia był statystycznie istotny (dla klasy IgG $r = 0,38$ przy $p \leq 0,05$, a dla klasy IgA $r = 0,24$).

Reasumując, w produkcji zwierzęcej istotne znaczenie miałaby wiedza nt. zdolności do zapłodnienia każdego pozyskanego ejakulatu. Trudno jest bowiem na podstawie jednego parametru oceniającego nasienie, przewidzieć jego potencjał zapładniający. Wprowadzanie i rozwijanie metod badań bezpośrednio związanych z diagnostyką niepłodności (do niedawna określanej mianem idiopatycznej, a leżącej po stronie immunologicznej), może być cennym uzupełnieniem podstawowych analiz. Stosunkowo prostym i tanim sposobem weryfikacji rzeczywistej wartości przygotowanych dawek inseminacyjnych oraz przydatności nasienia buhajów do zapładniania *in vitro* jest zastosowanie metody migracji wstępującej swim-up. Jednak wykazane w niniejszych badaniach korelacje pomiędzy rutynowo badanymi parametrami nasienia a wybranymi parametrami (immunologicznymi, swim-up) okazały się mało przekonujące. W takiej sytuacji konieczne wydaje się powtórzenie tych badań na grupie klinicznie zdrowych, płodnych buhajów, jak również młodych buhajów dopiero wprowadzanych do stacji unasienniania buhajów o obniżonej płodności.

Tab. 4. Analiza korelacji między wystąpieniem reakcji immunologicznej a cechami jakości nasienia buhajów

Cecha	IgA	IgG
Koncentracja plemników w nasieniu świeżym	-0,59*	-0,18
Objętość ejakulatu	0,24	0,38*
Ruchliwość plemników w nasieniu świeżym	0,29	-0,13
Koncentracja plemników w nasieniu po mrożeniu/rozrożeniu	0,15	-0,01
Ruchliwość plemników w nasieniu po mrożeniu/rozrożeniu	0,22	0,04

Objaśnienie: jak w tab. 3

Piśmiennictwo

- Byrd W., Bradshaw K., Carr B., Edman C., Odom J., Ackerman G.: A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor sperm. *Fertil. Steril.* 1990, 53, 521-527.
- Fargeas E.: Quelques resultats obtenus en insemination artificielle avec la semence congelee. *Cuniculture* 1995, 22, 103-106.
- Frazer L. R.: Requirements for successful mammalian spermatozoa capacitation and fertilization. *Arch. Path. Lab. Med.* 1992, 116, 345-350.
- Gadea J.: Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 2005, 63, 431-444.
- Hallap T., Hård M., Jaakma U., Larsson B., Rodriguez-Martinez H.: Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology* 2004, 62, 702-713.
- Janicki B., Solińska J., Łakota P.: Evaluation of dog semen quality using a conventional microscopic method, flow cytometry and HTM IVOS computer sperm quality analyzer. *Med. Weter.* 2006, 62, 1076-1079.
- Januskauskas A., Zilinskas H.: Bull semen evaluation post thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Vet. Zootec.* 2002, 17, 29-36.
- Klimowicz M., Niziński W., Savic M. A., Zbyryt I., Dubiel A.: Evaluation of dog semen quality using a conventional microscopic method, flow cytometry and HTM IVOS computer sperm quality analyzer. *Med. Weter.* 2005, 61, 1250-1255.
- Kratz E. M., Achcińska M. K.: Molecular mechanisms of fertilization: the role of male factor. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2011, 65, 784-795.
- Kratz E. M., Pupek M., Chelmońska-Soyta A., Kątnik-Prastowska I.: The Molecular Forms of Immunoglobulin A in Human Seminal Plasma. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2004, 13, 541-547.
- Mehmood A., Anwar M., Saqlan Naqvi S. M.: Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2009, 111, 141-148.
- Mikolajczyk M., Baj Z.: Occurrence of the antisperm antibodies in cryptorchidism and their role in infertility induction. *Diagn. Lab.* 2008, 44, 261-268.
- Mocé E., Lavara R., Vicente J. S.: Effect of cooling rate to 5°C, straw size and farm on fertilizing ability of cryopreserved rabbit sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2010, 45, 1-7.
- Sardoy M. C., Anderson D. E., George A., Wilkerson M. J., Skinner S., Ferrer M. S.: Standardization of a method to detect bovine sperm-bound antisperm antibodies by flow cytometry. *Theriogenology* 2012, 78, 1570-1577.
- Sharma M., Singh M., Kapoor S., Jasial S.: Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in Jersey X local hill cattle crossbred bulls. *Open Vet. J.* 2012, 2, 26-31.
- Verstegen J., Iguerouada M., Onclin K.: Computer assisted semen analyzers in andrology and veterinary practice. *Theriogenology* 2002, 57, 149-179.
- Watson P. F.: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 481-492.
- Watson P. F.: The effect of cold shock on sperm cell membranes, [w:] Morris G. J., Clarke A.: Effect of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic Press, London 1981, 187-218.
- Wyrzykowska R., Domagała A., Kurpisz M.: Molecular factor in reproduction. The role and characteristics of antisperm antibodies. *Post. Biol. Kom.* 2005, 32, 537-548.

Adres autora: dr inż. Karolina Stasiak, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz; e-mail: stasiak@utp.edu.pl