

Wpływ pory roku i przechowywania nasienia knurów na stopień fragmentacji DNA plemników

MICHAŁ KLIMONT, ZYGMUNT WRONA, PIOTR BRODZKI, LESZEK KRAKOWSKI

Zakład Andrologii i Biotechnologii Katedry i Kliniki Rozrodu Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Otrzymano 28.04.2014

Zaakceptowano 28.07.2014

Klimont M., Wrona Z., Brodzki P., Krakowski L.

Influence of the season and storage of boar semen on the degree of DNA fragmentation of sperm

Summary

The goal of the research was to evaluate DNA disintegration in boar sperm, which had been diluted at 18°C in a standard semen diluter to guarantee its usability for insemination purposes for a period of 72 hours from the moment of sampling and diluting. Integrity assessment was carried out twice (i.e. immediately after the sperm had been diluted and brought to 18°C, and in the 72nd hour) in fall, winter, spring and summer, by means of the APO-BRDU test and a flow cytometer.

The degree of defragmentation was follows: autumn – 0 hour: 14.08%, 72nd hour: 33.29%; winter – 0 hour: 22.78%, 72nd hour: 47.15%; spring – 0 hour: 26.13%, 72nd hour: 41.99%; summer – 0 hour: 20.61%, 72nd hour: 33.2%.

The results obtained indicate unambiguously that DNA in sperm stored under standard conditions is subject to progressive disintegration. The lowest percentage of disintegration was observed in summer months i.e. in summer and in fall. The highest disintegration was observed in winter.

Keywords: boar semen, DNA disintegration, year seasons

Jednym z podstawowych czynników decydujących o opłacalności chowu i hodowli trzody chlewnej jest prawidłowy rozród (16). Inseminacja jako metoda biotechniczna rozrodu świń (8, 33) zadomowiła się już na stałe w fermach zarodowych, a także towarowych trzody chlewnej. Zauważalny, szczególnie w ostatnim 10-leciu jest także postęp w dziedzinie oceny nasienia, jego konserwacji i dystrybucji, ułatwiający produkcję nasienia o stałej, dobrej jakości, czego widocznym efektem jest wysoki odsetek zapłodnień. Prawidłowa ocena wartości biologicznej nasienia uwarunkowana jest odpowiednim doбором badanych właściwości plemników czy ejakulatu oraz metod badania, uwzględniających również cechy gatunkowe, jak i charakteryzujących trafnie zdolność zapładniającą plemników (14, 18, 19, 26). Obniżanie współczynnika zapładniałości konserwowanego nasienia jest spowodowane przez procesy starzenia się plemników (3, 28). Zmiany te dotyczą różnych struktur plemników, takich jak: plazmolemma, mitochondria czy chromatyna (13, 19, 22, 27, 28, 32). Dla uzyskania jeszcze dokładniejszych wyników wprowadza się również badania oceniające prawidłowość w składzie i strukturze materiału genetycznego zawartego w plemnikach (17, 23). Aby to osiągnąć, stosuje się ocenę

dodatkowych parametrów, takich jak ocena stopnia dezintegracji DNA, ocena stopnia apoptozy i nekrozy plemników (7, 9, 15, 20, 22, 29, 30). Parametry te są bardzo ważne w ocenie wartości użytkowej samca i przydatności nasienia do obróbki technologicznej, a w ostatecznym efekcie wartości biologicznej nasienia. Analiza struktury chromatyny plemnikowej (SCSA – Sperm chromatin structure assay) jest metodą pozwalającą ocenić stopień denaturacji DNA plemników i była pierwszą metodą wykorzystującą cytometrię przepływową do analizy nasienia (12). W metodzie tej wykorzystuje się metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny (AO) (12). Barwnik ten związany z podwójną, nieuszkodzoną nicią DNA fluoreskuje w paśmie zielonym, w połączeniu zaś z RNA lub pojedynczą nicią DNA – w paśmie czerwonym (6). Ponieważ RNA w plemnikach praktycznie nie występuje, wykrywane jest wyłącznie zdenaturowane DNA. Po łagodnej denaturacji chromatyny za pomocą temperatury lub obniżonego pH, w plemnikach z nieprawidłową strukturą DNA następuje wzmocnienie fluorescencji w paśmie czerwonym. (7, 12, 25). Na podstawie danych uzyskanych z cytometru wyznacza się wskaźnik DFI (DNA fragmentation index) wyrażający stosunek poziomu intensywności czerwonej

fluorescencji do całkowitej (czerwonej i zielonej). Wyniki pomiarów struktury chromatyny plemników są wysoko skorelowane z płodnością, natomiast słabo z konwencjonalnymi parametrami oceny nasienia (7, 11, 20, 25). W przypadku badania nasienia ważne znaczenie ma fakt, iż do wykonania analizy potrzebna jest niewielka ilość ejakulatu (kilkadziesiąt tysięcy plemników). Ponadto metoda cytometrii przepływowej umożliwia przeprowadzenie badania pewnych cech w plemnikach jednocześnie, np. integralność błon komórkowych z aktywnością esteraz, strukturą akrosomu czy aktywnością mitochondrialną (6). W trakcie przechowywania nasienia po rozrzedzeniu następuje obniżenie potencjału antyoksydacyjnego, chroniącego DNA przed uszkodzeniami (25). Przechowywanie nasienia przez 72 godziny w temperaturze 18°C zwiększa podatność DNA na denaturację. Z uwagi na indywidualną wrażliwość poszczególnych samców na obniżanie integralności DNA, szczególnie obserwowaną u knurów, widoczna jest potrzeba indywidualnej oceny wpływu przechowywania nasienia na stan DNA w ich plemnikach (30). Skutkiem tych zmian w DNA plemników jest obniżenie liczebności miotów (13). Do oceny integralności DNA wprowadzono ostatnio nowy test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) (6, 11) oraz test Apo-BrdUTP (trójfosforan 5-bromo-2'deoksyurydyny). Połączenie BrdU jest następnie wykrywane przez przeciwciała anti-BrdU sprzężone z FITC. Metoda ta cechuje się wysoką specyficznością oraz czułością (24). Integralność DNA jest istotnym wskaźnikiem zdolności plemników do zapłodnienia, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (6, 7, 22).

Celem pracy było prześledzenie wpływu pór roku i czasu przechowywania nasienia knurów reproduktorów na stopień fragmentacji DNA ich plemników.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło nasienie pochodzące od 9 knurów produkcyjnych w wieku 12-24 miesięcy, hodowanych systemem zamkniętym, o masie około 150-250 kg. Zwierzęta były własnością jednej ze Stacji Unasienniania Zwierząt w Polsce. Podczas doświadczenia zwierzęta brały udział w planie produkcyjnym Zakładu. Stan zdrowia wszystkich zwierząt był dobry, przebywały pod stałą opieką androloga. Utrzymywane były w warunkach standardowych i żywione komercyjną paszą przeznaczoną dla knurów reproduktorów. Pomieszczenia, w których przebywały knury, nie były klimatyzowane.

Materiałem poddanym analizie było nasienie pobrane w poszczególnych porach roku: jesienią (listopad), zimą (luty), wiosną (przełom kwietnia i maja) oraz latem (przełom sierpnia i września). Ejakulaty pobierano metodą manualną. Po pobraniu i oddzieleniu frakcji galaretowatej określano metodą fotokolorymetryczną koncentrację w pobranym nasieniu i dzielono na dawki inseminacyjne, rozrzedzając komercyjnym rozrzedzalnikiem (BTS-3) gwarantującym przydatność do inseminacji w okresie 72 godzin. Następnie dawki zostały umieszczone w opakowa-

waniach typu Gedis, po czym w termosach utrzymujących temperaturę 18°C.

W okresie doświadczenia w laboratorium nasienie było przechowywane w szklanych, sterylnych naczyniach w cieplarni, w temperaturze 18°C. Parametry nasienia oceniane były bezpośrednio po rozrzedzeniu, a następnie w 72. godzinie. Przed każdą analizą tylko niewielka ilość materiału, niezbędna do badań była pobierana z naczyń, w których były przechowywane dawki inseminacyjne, do próbek o zbliżonej temperaturze, aby zapobiec wahaniom temperatury całego ejakulatu.

Do wykrycia mikropęknięć DNA w nasieniu przechowywanym w warunkach standardowych wykorzystano APO-BRDU Kit, Phoenix Flow Systems, Inc., San Diego, USA. Oznaczenia wykonano zgodnie z załączoną instrukcją. Nasienie zostało rozcieńczone do koncentracji 2×10^6 plemników/ml w PBS (0,01 M NaH_2PO_4 o pH 7,2 i 1,5 M NaCl). Następnie utrwalono je poprzez dodanie 10 ml 1% paraformaldehydu w PBS na mililitr nasienia. Czas utrwalania wynosił 15 minut. Po tym czasie nasienie płukano dwukrotnie w PBS. Po wypłukaniu nasienie zawieszono w zimnym 70% etanolu i przechowywano w temperaturze -20°C przez okres 24 godzin do momentu analizy. Przed analizą cytometryczną próbki nasienia zwirowano, aby usunąć alkohol i dwukrotnie płukano w PBS. Do oznaczeń wykorzystano 100 µl tak przygotowanego nasienia. Następnie do każdej próby badanej dodano 5 µl proteinazy K (20 µg/ml rozcieńczonej w 10 mM Tris-HCL o pH 7,6). Probki inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po okresie inkubacji próby badane płukano dwukrotnie w 1 ml Wash Buffer. Po płukaniu do każdej z prób badanych dodano przygotowanego *ex tempore* 50 µl DNA-labeling solution zawierającego enzym TdT w ilości 0,75 µl, BrdU w ilości 8,0 µl, TdT Reaction Buffer w ilości 10,0 µl i wody destylowanej w ilości 32,25 µl na każdą próbkę. Probki te inkubowano w temperaturze 37°C w łaźni wodnej przez 4 godziny, delikatnie mieszając co 30 minut. Po okresie inkubacji badane próbki dwukrotnie płukano w 1 ml Rinse Buffer, a następnie dodawano przygotowanego *ex tempore* 100 µl Antibody solution zawierającego 5 µl Fluorescein-labeled anti-BrdU oraz 95 µl Rinse Buffer na każdą próbkę. Tak przygotowane próbki inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po okresie inkubacji do każdej próby badanej dodano 500 µl PI/RNase i ponownie inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. W podobny sposób przygotowano próby kontrolne. W przygotowaniu DNA-labeling solution w próbach kontrolnych nie dodano TdT. Przygotowane wg załączonej instrukcji próbki poddano następnie analizie cytometrycznej w cytometrze przepływowym EPICS XL BECKMAN-COULTER, COMESA CH-WERFEN COMPANY MIAMI FL, USA. Zielona fluorescencja (480-530 nm) oraz czerwona fluorescencja (580-630 nm) mierzone były, odpowiednio, w kanale FL1 – logarytmicznym i FL3 – liniowym. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w postaci procentowego wskaźnika defragmentacji.

Do opracowania wyników badań wykorzystano program Statistica 10.0 StatSoft, Inc. Zmienność różnic między średnimi wynikami badań weryfikowano testem t-studenta.

Przyjęto dwa poziomy istotności statystycznej – $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$. Istotność uzyskanych wyników badań w okresie zimy, wiosny i lata odnoszono zarówno do średniorocznej wartości ocenianego wskaźnika, jak i wyników uzyskanych w poszczególnych porach roku.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań przeprowadzonych w poszczególnych porach roku oraz średnią dla całego roku przedstawiono w tab. 1. Uszkodzenia w DNA plemników knurów doświadczalnych bezpośrednio po pobraniu i rozrzedzeniu nasienia, w okresie jesieni stwierdzono w 14,08% plemników. Wyniki te są statystycznie istotnie niższe ($p \leq 0,01$) w porównaniu do wyników uzyskanych w okresie zimy, wiosny i lata. W analizie wykonanej w 72. godzinie doświadczenia zmiany dezintegracyjne w DNA w tej porze roku zaobserwowano już w 33,29% badanych plemników. Wyniki te są statystycznie istotnie niższe ($p \leq 0,01$) niż wartości uzyskane w okresie zimy i wiosny, natomiast nie różnią się statystycznie istotnie w porównaniu do wyników uzyskanych w okresie lata.

W kolejnym etapie doświadczenia, przeprowadzonym w okresie zimowym, zmiany dezintegracyjne DNA wykryto w bezpośrednio po rozrzedzeniu nasienia w 22,78% plemników. Wyniki te są wyższe i statystycznie istotne ($p \leq 0,01$) w porównaniu do jesieni, niższe i statystycznie istotne ($p \leq 0,01$) w porównaniu do lata oraz wyższe, ale tylko statystycznie istotne ($p \leq 0,05$), w porównaniu do wyników uzyskanych na wiosnę. W 72. godzinie obserwacji w tej porze roku, zmiany te wystąpiły aż w 47,15% gamet męskich i były statystycznie istotnie wyższe ($p \leq 0,01$) od uzyskanych w pozostałych porach roku.

W trzecim etapie doświadczenia przeprowadzonym w okresie wiosny, w badaniu wykonanym zaraz po pobraniu i rozrzedzeniu nasienia zmiany w DNA

wykryto w jeszcze wyższym odsetku niż w jesieni i zimie, tj. w 26,13% plemników. Są one statystycznie istotnie wyższe ($p \leq 0,01$) niż w jesieni i lecie oraz tylko statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do zimy. W 72. godzinie uszkodzenia w DNA obserwowano natomiast w niższym procencie plemników niż w okresie zimy – 41,95% ($p \leq 0,05$) oraz w wyższym niż w okresie jesieni i lata.

W ostatnim badaniu przeprowadzonym w okresie letnim, bezpośrednio po pobraniu i rozrzedzeniu nasienia, zaobserwowano zmiany w DNA w 20,61% badanych plemników, a 79,39% nie wykazywało zmian. W 72. godzinie przechowywania nasienia zmiany o charakterze dezintegracji DNA wykazywało w tej porze roku tylko 33,2% plemników. Porównując średnie z wyników badań od 9 knurów w poszczególnych porach roku z ich średnioroczną wartością, nie uzyskano ich istotności zarówno w 0 godzinie, jak i 72. godzinie badania.

Wyniki badań własnych korelują z wynikami innych autorów (5) i wyraźnie z nich wynika, że wraz z upływem czasu od pobrania i rozrzedzenia nasienia, przechowywanego następnie w temperaturze 18°C, znacząco zmniejsza się integralność DNA plemników, przy jednoczesnym braku wyraźnych oznak zmian w tym czasie, chociażby w integracji błony komórkowej plemnika. Wzrasta indeks fragmentacji DNA. Badania przeprowadzone przez Bo-Hansena i wsp. (5) wykazały również wzrost indeksu fragmentacji DNA po 72 godzinach, przy czym w części nasienia knurów wzrost tego indeksu obserwowano już po 24 godz. od pobrania i rozrzedzenia nasienia. Zatem proces dezintegracji DNA zaczyna się wcześniej i nie musi w tym czasie korelować ze stopniem integralności błon komórkowych plemników. Badanie przeprowadzone przez Zini i wsp. (34) na nasieniu człowieka wykazały także korelację dodatnią pomiędzy wzrostem odsetka

Tab. 1. Stopień dezintegracji DNA plemników knurów w poszczególnych porach roku

Nr zwierzęcia	Stopień dezintegracji DNA plemników knurów (w%)									
	jesień		zima		wiosna		lato		średnia dla całego roku	
	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h
1	14,24	34,10	22,79	47,13	26,09	42,01	20,67	33,28	20,95	39,13
2	14,31	33,40	23,01	47,46	26,30	42,06	20,78	33,30	21,10	39,05
3	14,03	32,80	22,49	47,03	26,05	41,85	20,49	33,05	20,76	38,68
4	13,75	33,11	22,69	46,19	26,23	41,92	20,84	33,18	20,79	38,78
5	13,85	32,85	22,78	47,16	25,90	41,91	20,46	33,11	20,75	38,76
6	14,00	33,51	22,84	47,20	26,21	42,08	20,68	33,31	20,93	39,02
7	13,41	32,95	22,65	47,11	26,20	42,10	20,60	33,25	20,71	38,85
8	15,01	33,61	22,95	47,23	25,98	41,90	20,38	33,21	21,08	38,99
9	14,10	33,30	22,82	47,21	26,75	42,08	20,62	33,15	20,85	38,93
Średnia (\bar{x})	14,08 ^{aa, bb, cc}	33,29 ^{aa, bb}	22,78 ^{aa, d, ee}	47,15 ^{aa, dd, ee}	26,13 ^{bb, d, ff}	41,99 ^{bb, dd, ff}	20,61 ^{cc, ee, ff}	33,20 ^{ee, ff}	20,88	38,90
± (SD)	0,442	0,418	0,156	0,153	0,346	0,095	0,150	0,089	5,08	6,87

Objaśnienia: a, b, c, d, e, f – $p \leq 0,05$; aa, bb, cc, dd, ee, ff – $p \leq 0,01$; a – jesień/zima; b – jesień/wiosna; c – jesień/lato; d – zima/wiosna; e – zima/lato; f – wiosna/lato

plemników z dezintegracją DNA a niepłodnością oraz ujemną korelację pomiędzy stopniem uszkodzenia DNA plemników a ruchliwością i prawidłową budową morfologiczną. Natomiast badania López-Fernández i wsp. (11) nie wykazały znaczącej korelacji między fragmentacją DNA a ruchliwością nasienia, stanem akrosomu i występowaniem kropli protoplazmatycznej w położeniu distalnym.

Ocena potencjału rozrodczego samców pozostaje nadal trudnym zadaniem, zarówno dla nauki, jak i w praktyce hodowlanej. Trudność ta jest efektem zarówno złożonego procesu zapłodnienia, dużej heterogenności plemników, a także dużej liczby czynników wpływających na jakość nasienia, nie zawsze możliwych do określenia. W celu uzyskania w miarę obiektywnej oceny konieczne jest stosowanie kombinacji odpowiednio dobranych metod badawczych. Duże znaczenie ma fakt uznania integralności DNA plemników jako istotnego wskaźnika zdolności plemników do zapłodnienia, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (11, 12). Ma ona zasadniczy wpływ na rozwój zarodków i uzyskanie potomstwa. O prawidłowej strukturze chromatyny plemników decydują mechanizmy fizjologiczne warunkujące właściwą kondensację chromatyny przy zachowanej integralności DNA. Do wyjaśniania przyczyn zaburzeń tej struktury niezbędne jest użycie kilku testów, z których jedne badają stabilność i poziom kondensacji, a inne stopień defragmentacji DNA. Złożone procesy kondensacji chromatyny są bardzo wrażliwe na różne czynniki zakłócające jej przebieg. Podatność na denaturację DNA chromatyny plemnika może być skutkiem wielu czynników. Męskie plemniki są zdolne do wytwarzania kontrolowanej, niewielkiej ilości endogennego reaktywnego tlenu, która odgrywa ważną rolę w hiperaktywacji plemników, i usprawnia reakcję akrosomową, jednakże wysokie jego stężenie w postaci takiej, jak anion nadtlenu oraz nadtlenek wodoru, indukują uszkodzenia błon komórkowych i mogą być szkodliwe dla DNA (10). Długi okres przechowywania nasienia może także spowodować utlenienie grup tiolowych i tym samym zmieniać kondensację DNA spermy (7, 20). Obecność zamierających plemników w ejakulacie także zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu, które mogą mieć wpływ na integralność DNA. Obserwowane narastanie uszkodzeń DNA w plemnikach podczas składowania nasienia, może być spowodowane różnicami we wrażliwości DNA na rozrzedzalniki nasienia. Brak przeciwutleniaczy lub obecność defektów genetycznych może również być przyczyną niestabilnej struktury chromatyny. Nie tylko martwe i obumierające plemniki, ale także znaczna część plemników żywych, dotknięta jest defragmentacją DNA (5). Jest prawdopodobne, że żywe i ruchliwe plemniki z defragmentacją DNA mogą zapłodnić komórkę jajową (5). Wiadomo, że dojrzałe plemniki wykazują brak skutecznych sposobów naprawy uszkodzeń DNA (9), a uszkodzone DNA, tylko do pewnego stopnia mogą być naprawione po

zapłodnieniu (4). Z badań Waberskiego i wsp. wynika (31), że plemniki z uszkodzeniami DNA na skutek dłuższego przechowywania nasienia knura mogą obniżyć wielkości miotu.

Podsumowując, przechowywanie rozrzedzonego nasienia knurów w 18°C do 72 h powoduje spadek integralności DNA plemników. Wprowadzenie do standardowej, rutynowej oceny nasienia oceny integralności DNA w plemnikach, wydaje się mieć duże uzasadnienie. Potrzebne są dalsze badania, aby określić związek pomiędzy stopniem uszkodzenia DNA i płodnością. Metoda oceny struktury chromatyny plemnikowej (SCSA – Sperm Chromatin Structure Assay) opiera się na stwierdzeniu, że DNA posiada zmienną wrażliwość na denaturację (23-25). Badania przeprowadzone na dużej ilości nasienia mrożonego buhajów wykazały występowanie wysokiej korelacji między wrażliwością chromatyny na denaturację a płodnością uzyskiwaną po inseminacji tym nasieniem. Podatność na denaturację maleje wraz z wiekiem zwierzęcia. Evanson i wsp. (8, 9) osiągnęli zadowalającą powtarzalność wyników wykazujących przydatność tej techniki badawczej dla oceny chromatyny plemników. Wielu autorów stwierdza, że wyniki pomiarów struktury chromatyny plemników są wysoko skorelowane z płodnością, słabo natomiast z konwencjonalnymi parametrami oceny nasienia (4, 5, 12, 34). Ocena potencjału rozrodczego samców zwierząt gospodarskich, w tym także knurów, pozostaje wciąż trudnym zadaniem. Trudność ta wynika z dużej heterogenności plemników, dużej liczby czynników wpływających na jakość nasienia oraz złożoności procesu zapłodnienia. W celu zapewnienia najlepszej jakości nasienia konieczne staje się wprowadzanie innowacyjnych metod oceny ich żywotności i zdolności do zapłodnienia, nie tylko do etapu pozyskania nasienia, ale także podczas jego przechowywania, a następnie inseminacji.

Piśmiennictwo

1. Ahmadi A., Ng S. C.: Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 1999, 284, 696-704.
2. Ambrogi M. De, Ballester J., Saravia F., Caballero I., Johannisson A., Wallgren M., Anderson M., Rodriguez-Martinez H.: Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.* 2006, 29, 543-552.
3. Anil S. S., Larriestra A., Deen J., Morrison R. B., Minion L.: A retrospective study on the preserving capacity of a commercial boar semen extender. *Theriogenology* 2004, 62, 425-436.
4. Banaszewska D., Kondracki S., Wysokińska A.: Wpływ sezonu na zmiany w budowie morfologicznej plemników wybranych ras knurów inseminacyjnych. *Acta Sci. Pol., Zootechnica* 2007, 6, 3-14.
5. Boe-Hansen Gry B., Ersboll A. K., Greve T., Christensen P.: Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 2005, 63, 2006-2019.
6. Bogucka M., Faudez R., Winnicka A.: Ocena plemników zwierząt hodowlanych – najnowsze testy. *Mag. Wet.* 2006, 15, 12-15.
7. Enciso M., López-Fernández C., Fernandez J. L., Garcia P., Gosálbez A., Gosálvez J.: A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology* 2006, 65, 308-316.
8. Evenson D. P., Larson K. L., Jost L. K.: Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 2000, 23, 25-43.

9. Evenson D. P., Thompson L., Jost L.: Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994, 41, 637-651.
10. Gajda B., Smorąg Z.: Wykorzystanie metod biotechnologii rozrodu w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt. *Biotechnologia* 2007, 4, 55-65.
11. López-Fernández C., Pérez-Liano B., García-Casado P., Sala R., Gosálbez A., Arroyo F., Fernández L. J., Gosálvez J.: Sperm DNA fragmentation in random sample of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science* 2008, 103, 87-98.
12. Love C. C., Thompson J. A., Lowry V. K., Vamer D. D.: Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology* 2002, 57, 1135-1142.
13. May-Panloup P., Chrétien M.-F., Savagner F., Vasseur C., Jean M., Malthiéry Y., Reynier P.: Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction* 2003, 18, 550-556.
14. Mota P. C., Ramalho-Santos J.: Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology* 2006, 65, 1360-1375.
15. Purdy P. H.: Ubiquitination and its influence in boar sperm physiology and cryopreservation. *Theriogenology* 2008, 70, 818-826.
16. Rekiel A.: Rola płodności w opłacalności trzody chlewnej. *Weterynaria w praktyce* 2006, 2, 16-21.
17. Richthoff J., Spano M., Giwercman Y. L., Frohm B., Jepson K., Malm J., et al.: The impact of testicular and accessory sex gland function on sperm chromatin integrity as assessed by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Human Reprod.* 2002, 17, 3162-3169.
18. Rota A., Penzo N., Vincenti L., Mantovani R.: Hypoosmotic swelling (HOS) as screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 2000, 53, 1415-1420.
19. Rozeboom J. Kelvin.: Evaluating Boar Semen Quality. *Animal Science Facts* 2000, publ. number ANS00-812S.
20. Rybar R., Faldikova L., Faldyna M., Machatkova M., Rubes J.: Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina* 2004, 49, 1-8.
21. Sega G. A., Sotomayor R. E., Owens J. G.: A study of unscheduled DNA synthesis induced by X-rays in the germ cells of male mice. *Mutat. Res.* 1978, 49, 239-257.
22. Sadeghi M. R., Hodjat M., Lakpour N., Arefi S., Amirjannati N., Modarresi T., Jadda H. H., Akhondi M. M.: Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Medical Biotechnology* 2009, 1, 173-180.
23. Smital J., Wolf J., De Sousa L. L.: Estimation of genetic parameters of semen characteristics and reproductive traits in AI boars. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 86, 119-130.
24. Smolewski P., Darzynkiewicz Z.: Current methods for measurement of apoptosis. *Acta Hematologica Polonica* 2003, 34, 35-47.
25. Smorąg Z., Bochenek M., Gajda B., Gogol P., Jura J., Skrzyszowska M., Szczęśniak-Fabiańczyk B., Trzcńska M.: *Biotechnologia w rozrodzie świń. Nowe metody cz. I.* *Weterynaria w terenie* 2007, 1, 37-43.
26. Sokol R., Shulman P., Paulsan R.: Comparison of two methods for the measurement of sperm concentration. *Fert. and Steril.* 2000, 73, 591-594.
27. Strzeżek J.: *Biologia rozrodu zwierząt; Biologiczne uwarunkowania wartości rozrodowych samców.* Wydawnictwo UVM, Olsztyn 2007.
28. Szczęśniak-Fabiańczyk B., Bochenek M., Smorąg Z.: Survival time and chromatin damage of boar semen stored in different diluents. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 50 Special Issue 2007, 102-106.
29. Trzcńska M., Bryła M., Smorąg Z.: Ocena jakości nasienia transgenicznych knurów przy zastosowaniu markerów apoptotycznych. *Przegląd hodowlany* 2010, 12, 1-3.
30. Turba M. E., Fantinati P., Bernardini C., Gentilini F., Bacci M. L., Forni M.: Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 99, 72-81.
31. Waberski D., Helms D., Beyerbach M., Weitze K. F., Bollwein H., Bluemig P.: Sperm chromatin structure in boars used in artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.* 2002, 37, abstr. P1, 146.
32. Waterhouse K. E., De Angelis P. M., Haugan T., Paulenz H., Hofmo P. O., Farstad W.: Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* 2004, 62, 1638-1651.
33. Wysokińska A., Kondracki S.: Przydatność knurów mieszańców do inseminacji. *Przegląd hodowlany* 2004, 5, 12-14.
34. Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes M. T.: Correlations between two markers at sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile man. *Fertil. and Steril.* 2001, 75, 674-677.

Adres autora: dr Michał Klimont, ul. Organowa 15/F, 20-882 Lublin;
e-mail: Non5@vp.pl