

# AUTOREFERAT

## Opis dorobku i osiągnięć naukowych

**Dr Dariusz Gączarzewicz**

Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

e-mail: [dariusz.gaczarzewicz@zut.edu.pl](mailto:dariusz.gaczarzewicz@zut.edu.pl)

**1. Imię i nazwisko, adres do korespondencji****Dariusz Gączarzewicz**

Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

tel. 608 323 684; e-mail: dariusz.gaczarzewicz@zut.edu.pl

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

Tytuł zawodowy, stopnie i tytuł(y) naukowe	Rok uzyskania	Miejsce uzyskania	Dziedzina, dyscyplina
Doktor	2002	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt; Tytuł rozprawy doktorskiej: <i>Zmiany w nasieniu knura przechowywanym w rozrzedzalniku BTS przygotowanym z zastosowaniem wody destylowanej i otrzymanej poprzez odwróconą osmozę.</i> promotor prof. dr hab. Jan Udała	Nauki rolnicze, zootechnika
Magister	1997	Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Przyrodniczych; Tytuł pracy magisterskiej: <i>Cechy plastyczne i merystyczne hybrydów troci (Salmo trutta L.) i łososia (Salmo salar L.).</i> promotor prof. dr hab. Józef Domagała	Nauki biologiczne, biologia

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

Okres	Miejsce zatrudnienia	Stanowisko
01.01.2010 – do obecnie	Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska	Adiunkt
01.10.2005 – 31.12.2009	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Rozrodu Zwierząt	Adiunkt
01.11.2004 – 30.09.2005	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zakład Rozrodu Zwierząt	Specjalista inżyniersko-techniczny (½ etatu), adiunkt (½ etatu)
07.03.2002 – 31.10.2004	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zakład Rozrodu Zwierząt	Specjalista inżyniersko-techniczny

**4. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego (zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Wybrane strukturalne i funkcjonalne wskaźniki plemników w aspekcie optymalizacji przechowywania i oceny jakości nasienia knurów**

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Lp.	Autorzy i tytuł publikacji	IF*	Punkty MNiSW**
H1	Gączarzewicz D., Piasecka M., Udała J., Błaszczuk B., Stankiewicz T., Laszczyńska M., 2010. <i>Plasma membrane changes in the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods</i> . Acta Veterinaria Hungarica 58 (1): 105–116.	1,264	27
H2	Gączarzewicz D., Udała J., Piasecka M., Błaszczuk B., Stankiewicz T., 2015. <i>Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability</i> . Turkish Journal of Biology 39 (4): 582–594.	1,183	20
H3	Gączarzewicz D., Udała J., Piasecka M., Błaszczuk B., Stankiewicz T., 2016. <i>Bacterial contamination of boar semen and its relationship to sperm quality preserved in the commercial extender containing gentamicin sulfate</i> . Polish Journal of Veterinary Sciences 19 (3): 451–459.	0,719	20
H4	Gączarzewicz D., 2015. <i>Influence of chamber type integrated with computer-assisted semen analysis (CASA) system on the results of boar semen evaluation</i> . Polish Journal of Veterinary Sciences 18 (4): 817–824.	0,719	20
Łącznie H1–H4		3,885	87

\* współczynnik impact factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy; dla pracy H3 wykazano IF za rok 2015.

\*\* liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy; dla pracy H3 – liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW z dnia 18 grudnia 2015 roku.

Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych wraz z określeniem ich indywidualnego udziału zawarto w Załączniku nr 6.

Łączna liczba punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy wynosi **87** punktów.

Sumaryczny IF za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy wynosi **3,885**.

### 4.3. Omówienie celu naukowego /artystycznego ww. pracy /prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

**Celem zasadniczym** badań była analiza zmian zachodzących na poziomie wybranych struktur komórkowych – głównie błony komórkowej i mitochondriów plemników, uwzględniająca próbę określenia wpływu niektórych czynników, które mogą warunkować zachowanie i/lub ocenę jakości przechowywanego w stanie płynnym nasienia knurów.

Realizacja głównego zagadnienia badawczego obejmowała wyodrębnione następujące **cele szczegółowe**:

- weryfikacja niektórych metod strukturalnej i/lub funkcjonalnej oceny integralności błony komórkowej plemników w nasieniu natywnym, podczas długoterminowego przechowywania nasienia rozrzedzonego w komercyjnych rozcieńczalnikach i standardowo stosowanej temperaturze 16–17 °C, a także podczas konserwacji w temperaturze 5 °C i 25 °C;
- określenie aktywności mitochondriów w plemnikach poddanych długoterminowej konserwacji w temperaturze 5 °C, 16°C i 25 °C na podstawie metod umożliwiających monitorowanie zmian transbłonowego potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz zdolności oksydoredukcyjnych mitochondriów;
- określenie statusu ilościowego i jakościowego zanieczyszczenia mikrobiologicznego ejakulatów jako potencjalnego czynnika mogącego mieć wpływ na jakość nasienia konserwowanego w standardowych warunkach stosowanych w centrach pozyskiwania, obróbki i przechowywania nasienia;
- określenie wpływu typu komory pomiarowej na wyniki oceny koncentracji i ruchliwości plemników uzyskiwane za pomocą systemu komputerowo-wspomaganej analizy nasienia;
- ustalenie i analiza zależności pomiędzy ocenianymi parametrami jakości nasienia w celu zwiększenia efektywności technologicznego procesu konserwacji i oceny nasienia.

Wspólnym elementem badań była ocena jakości nasienia knurów użytkowanych rozplodowo analizowana w oparciu o różne techniki wykorzystywane w diagnostyce seminologicznej na poszczególnych etapach konserwacji nasienia w stanie płynnym. Dokładny opis postępowania analitycznego znajduje się w pracach, stanowiących osiągnięcie naukowe.

### Wprowadzenie i uzasadnienie podjętego tematu badań

Pomimo badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat dotyczących doskonalenia technologii konserwacji nasienia knura na potrzeby sztucznego unasieniania, do chwili obecnej nie opracowano w pełni satysfakcjonujących procedur tego procesu. Aktualnie zakres stosowania kriokonserwowanego nasienia jest znikomy i ograniczony głównie do realizacji programów hodowlanych podnoszących wartość genetyczną trzody chlewnej. Podstawowe znaczenie w praktyce inseminacyjnej ma nadal wykorzystanie nasienia przechowywanego w stanie płynnym, które w odniesieniu do nasienia mrożonego umożliwia uzyskanie znacznie korzystniejszych wskaźników płodności (Johnson i wsp. 2000, Bailey i wsp. 2008, Riesenbeck 2011). Wydaje się jednak, że w obu metodach konserwacji nasienia, podstawowym i jednocześnie wyznaczającym kierunki badań problemem pozostaje utrzymanie zdolności zapładniającej plemników na poszczególnych etapach konserwacji. Jest to trudne do osiągnięcia, głównie ze względu na specyficzne gatunkowo właściwości zarówno plemników, jak i plazmy nasienia knurów, które w dużej mierze determinują efektywność obecnie stosowanych metod konserwacji.

W praktyce inseminacyjnej wymiernym efektem konserwacji nasienia w stanie płynnym jest zachowanie właściwości biologicznych plemników przez założony w procedurze okres czasu i taką ich ilość, która zagwarantuje zapłodnienie owulujących oocytów. Jednocześnie założeniem jest umieszczenie w dawce inseminacyjnej, jak najniższej liczby zdolnych do zapłodnienia plemników. Ma to z kolei na celu minimalizację kosztów, bardzo istotnych dla zakładów produkujących nasienie. Problematyczne może być jednak wyznaczenie odpowiedniej liczby plemników knura zdolnych do utrzymania swoich funkcji biologicznych podczas przechowywania. Związane jest to z utratą kompetencji plemników do zapłodnienia, która wynika między innymi z uwarunkowań procedury konserwacji – konieczności przechowywania nasienia w temperaturze 15–20 °C. Powszechnie wiadomo, że zmniejszenie tempa metabolizmu komórkowego osiągnąć poprzez obniżenie temperatury inkubacji (i odpowiedni skład rozcieńczalnika) umożliwia wydłużenie okresu przechowywania nasienia (Johnson i wsp. 2000, Gadea 2003, 2005). Plemniki knura wykazują jednak, uwarunkowaną specyficzną budową błony komórkowej, ekstremalnie dużą wrażliwość na temperatury z zakresu tzw. udaru chłodowego. Ochładzanie rozrzedzonego nasienia knura poniżej temperatury progowej udaru chłodowego, według Althouse i wsp. (1998) niższej od 12 °C, intensyfikuje występowanie w plemnikach uszkodzeń istotnych dla ich funkcji biologicznych. W odniesieniu do kriokonserwacji stanowi to najważniejszą przeszkodę w praktycznym stosowaniu nasienia mrożonego, natomiast w przypadku konserwacji nasienia w temperaturach dodatnich przyczynia się do trudności w skutecznej inhibicji procesów życiowych plemników przy jednoczesnym zachowaniu ich potencjału do zapłodnienia przez maksymalnie długi okres czasu. W związku z tym, konieczność przechowywania nasienia knura w temperaturze powyżej 15 °C powodować może występowanie, różnych pod względem nasilenia i tempa, niekorzystnych zmian w obrębie struktur plemników i ich środowiska, ogólnie określanymi mianem „starzeniowych” (Johnson i wsp. 2000, Waberski i wsp. 2011). Zmiany te skracają czas wykorzystania przechowywanego nasienia, który pomimo opracowanych i stosowanych najbardziej optymalnych procedur postępowania, w praktyce ograniczony jest obecnie do kilku dni. Płodność przechowywanego w stanie płynnym nasienia knura uwarunkowana jest jednak nie tylko wpływem czynników limitujących efektywność samego procesu konserwacji (m.in. wyjściową jakością nasienia, częstotliwością pobierania ejakulatów, typem rozcieńczalnika, temperaturą i czasem przechowywania, liczbą plemników w dawce inseminacyjnej i jej objętością), ale także determinowana wpływem wielu czynników ogólnie związanych są z płodnością i organizacją rozrodu świń. Do czynników tych należą przede wszystkim: rasa i wiek zwierząt, pora roku, stan odżywienia, długość okresów laktacji i odsadzenia prosiąt do wystąpienia rui, stosowanie metod synchronizacji rui i jej wykrywania, liczba i termin zabiegów inseminacji, miejsce deponowania nasienia w narządach rozrodczych samicy, technika zabiegu inseminacyjnego (Johnson i wsp. 2000, Anil i wsp. 2004, Gadea 2005, Khalifa i wsp. 2014). Szeroki zakres znanych i potencjalnych czynników mogących oddziaływać na efektywność produkcji trzody chlewnej, z jednej strony podkreśla złożoność i wieloaspektowość problemów dotyczących stosowania sztucznego unasienniania u tego gatunku, z drugiej natomiast, w kontekście zasygnalizowanych wyżej ograniczeń metod konserwacji nasienia wskazuje na możliwość i potrzebę ich doskonalenia.

Dążenia do poprawy efektywności konserwacji nasienia knura w stanie płynnym koncentrują się na różnych płaszczyznach. Dotyczą one modyfikacji składu rozcieńczalników i procedur przygotowania nasienia, w tym zarówno do przechowywania w temperaturach 15–20 °C, jak i z zakresu udaru chłodowego. Metody hipotermicznego przechowywania nasienia (w temperaturze nieco powyżej 0°C) poprzez skuteczniejsze obniżenie tempa metabolizmu plemników i ograniczenie wzrostu mikroorganizmów umożliwić mogą wydłużenie okresu konserwacji. Opracowanie takich metod może być również pomocne w udoskonaleniu technologii zamrażania nasienia knura. Najważniejszym jednak problemem pozostaje utrzymanie stabilności błony komórkowej plemników, która u knura ze względu na specyficzny skład lipidowo-białkowy (relatywnie wysoką zawartość

wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i niską cholesterolu, a w konsekwencji niski stosunek steroli do fosfolipidów) jest szczególnie podatna na uszkodzenia funkcjonalne i molekularne (Johnson i wsp. 2000, Gadea 2005, Bailey i wsp. 2008, Casas i Althouse 2013, Khalifa i wsp. 2014). Przejścia fazowe lipidów lub reorganizacje składników błon plemników knura przebiegają w zakresie temperatur około 10–30 °C (Schmid i wsp. 2013) co wskazuje, że w tym zakresie temperatur również może dochodzić do destabilizacji struktury i obniżenia funkcji błony komórkowej plemników. Stąd działania doskonalące procedury konserwacji ukierunkowane są m.in. na zwiększenie osłaniającego działania rozcieńczalników na błonę komórkową plemników, a także na poszukiwanie jak najbardziej precyzyjnych metod oceny jej integralności i stabilności podczas przechowywania. Uszkodzenia błony komórkowej związane mogą być m.in. z zaburzeniami jej przepuszczalności prowadzącymi do wycieku istotnych składników wewnątrzkomórkowych (np. jonów, nukleotydów adeninowych, antyoksydantów, enzymów), co destabilizuje homeostazę biochemiczną przechowywanych gamet wpływając na zmiany ich ruchliwości i żywotności. Podłożem uszkodzeń błony komórkowej może być także peroksydacja lipidów błonowych i niekontrolowane generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) w przechowywanych plemnikach i ich środowisku. Następstwem tych procesów mogą być subletalne i/lub letalne zmiany w plemnikach związane ze stresem oksydacyjnym (m.in. nasilenie dysfunkcji błon plazmatycznych, zmniejszenie aktywności łańcucha oddechowego, czy wzrost fragmentacji jądrowego DNA) (Cerolini i wsp. 2000, Brouwers i wsp. 2005, Großfeld i wsp. 2008, Awda i wsp. 2009, Waberski i wsp. 2011, Guthrie i Welch 2012).

Prawidłowa integralność błony komórkowej i utrzymanie jej stabilności w czasie konserwacji warunkuje niezaburzoną funkcję pozostałych struktur subkomórkowych plemnika, w tym tych ściśle związanych z metabolizmem energetycznym. Mechanizmy przebiegu procesów metabolicznych plemników knura są wciąż słabo poznane, zwłaszcza w warunkach konserwacji. Niejasna jest m.in. rola mitochondriów w generowaniu energii do ruchu plemników. W ostatnich latach postuluje się, że procesy fosforylacji oksydacyjnej w obrębie aparatu wstawkowego nie są bezpośrednio związane z poruszaniem się plemnika, a podstawowym źródłem energii wykorzystywanej na potrzeby ruchliwości jest proces glikolizy (fruktolizy). Funkcjonalne mitochondria są niemniej niezbędne dla prawidłowego przebiegu i kontroli wielu procesów w plemniku, w tym także tych odpowiedzialnych za zachowanie ruchu (Marin i wsp. 2003, Peña i wsp. 2009). Kluczowa dla plemnika jest nie tylko aktywność, ale również sprawna i przebiegająca w odpowiednim czasie kooperacja mitochondriów z pozostałymi przedziałami komórkowymi, które zaangażowane są m.in. w proces kapacytacji, hyperaktywacji, reakcji akrosomowej, interakcji plemnika z *zona pellucida* i jego fuzji z komórką jajową. Wytworzone w mitochondriach plemnika związki makroergiczne (obok pochodzących z glikolizy/fruktolizy) wykorzystywane są do transportu metabolitów, jonów, powstawania cAMP i fosforylacji białek. Dzięki temu mitochondria regulują m.in. równowagę oksydacyjno-redukcyjną i osmotyczną, utrzymują homeostazę  $Ca^{2+}$ , będąc prawdopodobnie rezerwuarem tych jonów w plemniku. Organelle te wykazują także zdolność do produkcji RFT powstających podczas transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego (Peña i wsp. 2009, Amaral i wsp. 2013). Proces ten może mieć istotne znaczenie w przypadku przekroczenia niskich u knura możliwości ochronnych systemów antyoksydacyjnych w plemniku. Mitochondria poprzez nadmierne generowanie RFT mogą także przyczynić się do stresu oksydacyjnego. Ponadto organelle te zaangażowane są w regulację śmierci komórkowej, prawdopodobnie poprzez szlaki sygnalizacyjne związane z  $Ca^{2+}$  i/lub zależne od RFT (Kim i wsp. 2011, Amaral i wsp. 2013). Ostatnio wskazuje się, że również procesy „starzenia się” plemników knura podczas technologicznej obróbki nasienia mogą być regulowane aktywnością mitochondriów poprzez szlaki zbliżone i charakterystyczne dla apoptozy. Mechanizmy starzenia się i śmierci plemników wymagają jednak wyjaśnienia zwłaszcza, że właściwa interpretacja obrazu zamian tych procesów w plemnikach obserwowanego w pracach eksperymentalnych jest utrudniona i

wzbudza kontrowersje ze względu na podobieństwo do procesu kapacytacji (Peña i wsp. 2009, Waberski i wsp. 2011, Amaral i wsp. 2013).

Prawidłowo przebiegające procesy w poszczególnych przedziałach komórkowych przejawiają się zdolnością plemnika do ruchu, stąd ocena ruchliwości jest standardowym parametrem jakości nasienia wskazującym na integralność błony komórkowej, odpowiedni status energetyczny i sprawność aparatu ruchu plemnika. Odsetek plemników o prawidłowym ruchu jest decyzyjnym wskaźnikiem jakościowym brany pod uwagę w określaniu przydatności nasienia do produkcji. Należy mieć jednak na uwadze, że w kontekście monitorowania jakości nasienia przed i w czasie przechowywania wartość predykcyjna oceny ruchliwości, zwłaszcza za pomocą konwencjonalnej techniki mikroskopowej może być ograniczona (Tejerina i wsp. 2008, Schulze i wsp. 2013). Wynika to nie tylko z subiektywności przypisywanej tej metodzie. Ocena wyłącznie ruchliwości wyklucza możliwość diagnozowania subtelných zmian na poziomie struktur subkomórkowych, które nie przejawiają się spadkiem ruchliwości plemników, a ze względu na potencjalnie niekorzystne działanie szeregu czynników (fizycznych, biochemicznych, biologicznych) mogą występować i nasilać się podczas konserwacji upośledzając funkcję biologiczną plemników. Rozwiązanie tego problemu umożliwi postępowanie w zakresie diagnostyki laboratoryjnej, która pozwala obecnie na kompleksową ocenę struktury i funkcji poszczególnych organelli plemnika (Gadea 2005, Silva i Gadella 2006). W ostatnich latach do diagnostyki seminologicznej wprowadzono wiele różnych rozwiązań, przy czym aktualnie podkreślana jest szczególnie duża wartość testów funkcjonalnych oraz takich testów i metod oceny, które uwzględniają heterogeniczność plemników, tj. umożliwiają zróżnicowanie różnych subpopulacji i analizę ich zmian na podstawie określonych cech plemników (Petrukina i wsp. 2007, Rodríguez-Martínez 2007, Peña i wsp. 2009). Koniecznością jest jednak wskazanie najbardziej odpowiednich testów i metod diagnostycznych, a także w oparciu o nie opracowanie procedur standaryzujących badanie seminologiczne u knura. Podkreślić należy, że problem standaryzacji oceny nasienia dotyczy nie tylko wdrożeń do praktyki inseminacyjnej, ale również stosowania bardziej dokładnie określonych procedur w warunkach eksperymentalnych (Waberski i wsp. 2011).

Coraz powszechniej w badaniach nasienia, również w praktyce inseminacyjnej trzody chlewnej, wykorzystywana jest komputerowo wspomagana analiza nasienia (CASA, computer-assisted sperm analysis), głównie do określania ruchliwości, koncentracji oraz morfologii plemników. Ocena ruchliwości plemników za pomocą systemów komputerowych uważana jest za szybką i bardziej „obiektywną” (vs. rutynowa metoda mikroskopowa) ze względu na szeroką możliwość szczegółowej charakterystyki parametrów kinetycznych określanych na podstawie trajektorii i/lub prędkości pojedynczego plemnika, ogólnie dla całej populacji oraz wyodrębnianych subpopulacji plemników. Nowoczesne systemy CASA dają możliwość uzyskiwania większej dokładności i powtarzalności wyników ruchliwości niemniej, aby otrzymane dane były wiarygodne i miały wartość w prognozowaniu płodności, wymagają wprowadzenia odpowiednich ustawień wstępnych oraz standaryzacji procedury pomiarowej (Waberski i wsp. 2011, Schulze i wsp. 2013). Wiele czynników może wpływać na ocenę ruchliwości i koncentracji plemników uzyskaną za pomocą systemów CASA (Rijsselaere i wsp. 2003, Contri i wsp. 2010, Broekhuijse i wsp. 2011, Amann i Waberski, 2014). W ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na możliwość wpływu typu komory pomiarowej wykorzystanej do analizy na parametry kinetyczne plemników, który związany jest głównie z głębokością i sposobem jej napełniania (tj. za pomocą sił kapilarnych lub nanoszenia kropli nasienia). Zagadnienie to wymaga wyjaśnienia, bowiem wyniki nielicznych prac dotyczących tego problemu są niejednoznaczne (Iguer-Ouada i Versteegen 2001; Massányi i wsp. 2008, Contri i wsp. 2010, Lenz i wsp. 2011, Hoogewijs i wsp. 2012, Gloria i wsp. 2013, Palacín i wsp. 2013). Brak jest jednak ogólnie dostępnych opracowań w tym zakresie odnoszących się do nasienia knura. Należy ponadto podkreślić, że ocena koncentracji plemników za pomocą CASA nie jest powszechnie akceptowana (Hoogewijs i wsp. 2012), co spowodowane jest rozbieżnościami wyników pomiędzy różnymi typami komór

porównywanymi w tym samym urządzeniu, jak również pomiędzy wynikami uzyskanymi za pomocą CASA a innymi technikami określania koncentracji (np. w komorze Bürkera) traktowanymi jako referencyjne (Rijsseleere i wsp. 2003, Vyt i wsp. 2004, Kuster 2005, Maes i wsp. 2010, Hoogewijs i wsp. 2012).

Podstawowym warunkiem prowadzenia sztucznego unasienniania jest wysoka jakość mikrobiologiczna nasienia, co przy bardzo częstym występowaniu bakterii w ejakulatach knurów wymaga odpowiednich działań asekuracyjnych, tym bardziej że pobieranie i przetwarzanie nasienia nie są procedurami sterylnymi (Althouse 2008, Goldberg i wsp. 2013, Schulze i wsp. 2015, Kuster i Althouse 2016). Stąd, oprócz wysokich standardów higienicznych podczas produkcji nasienia mających minimalizować ryzyko kontaminacji, obligatoryjnym komponentem rozcieńczalników są związki działające bakteriobójczo i/lub bakteriostatycznie. Rozcieńczalniki komercyjne stosowane w praktyce inseminacyjnej na terenie Unii Europejskiej muszą spełniać odpowiednie wymogi (zgodne z Dyrektywą 90/429/EWG z późniejszymi zmianami), a tym samym wykazywać skuteczne działanie antybakteryjne. Takie założenie oraz fakt występowania w ejakulatach knurów bakterii na ogół uważanych za niepatogenne (Althouse i wsp. 2000, Maes i wsp. 2008, Morrell i Wallgren 2014) mogą przyczynić się do niezwracania należytej uwagi na potencjalne problemy wynikające z zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia. Ponieważ oddziaływanie bakterii uwarunkowane jest ich typem i ilością, a z ejakulatów i dawek inseminacyjnych knurów izolowane są różne, często współwystępujące gatunki i szczepy bakterii wykazujące zróżnicowaną, czasem całkowitą odporność na powszechnie stosowane antybiotyki (Althouse i wsp. 2008, Baracaldo i Ward 2008, Maroto Martín i wsp. 2010, Morrell i Wallgren 2011, Bresciani i wsp. 2014, Speck i wsp. 2014, Schulze i wsp. 2015, Kuster i Althouse 2016), utrudnione jest określenie rangi niekorzystnego wpływu zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia wykorzystywanego w sztucznym unasiennianiu na jego jakość i wydajność reprodukcyjną świń. Również dane w piśmiennictwie dotyczące tych zagadnień nie są jednoznaczne. Niewątpliwie dominującym i uzasadnionym jest pogląd, że wysoki stopień zanieczyszczenia mikrobiologicznego przechowywanego nasienia knura niesie ze sobą ryzyko obniżenia wskaźników płodności (Kuster i Althouse 2016). Z drugiej strony stwierdza się również brak wpływu bakterii na płodność świń (Reicks i Levis 2008) oraz brak negatywnego oddziaływania niektórych gatunków drobnoustrojów na jakość przechowywanego nasienia nawet przy wysokiej ilości bakterii (do  $10^{12}$  jednostek tworzących kolonie/mL – CFU/mL) (Sone 1990, Kuster i Althouse 2016). Stąd być może poza zaleceniami minimalizacji liczby bakterii (Althouse i wsp. 2000, Althouse 2008, Goldberg i wsp. 2013, Schulze i wsp. 2015, Kuster i Althouse 2016) nie ustalono jeszcze wartości referencyjnych dla stopnia zanieczyszczenia mikroorganizmami niepatogennymi nasienia knura (Goldberg i wsp. 2013). Być może przy ustalaniu krytycznych wartości poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego ejakulatów/dawek inseminacyjnych okaże się także konieczne uwzględnianie obecności w nasieniu konkretnych gatunków mikroorganizmów. Wskazują na to badania przeprowadzane w ostatnich latach, w których indukcja niekorzystnych zmian w nasieniu knura i/lub negatywne oddziaływanie na płodność zachodziły przy różnym poziomie ilościowym podczas kontrolowanej inokulacji nasienia poszczególnymi gatunkami bakterii (Maroto Martín i wsp. 2010, Busselleu i wsp. 2011, Sepúlveda i wsp. 2013, 2014, Prieto-Martínez i wsp. 2014, Sa i wsp. 2014). Prawdopodobnie istotne będzie również uwzględnienie wielu czynników, takich jak np. czas i temperatura przechowywania, które regulują namnażanie i współzależności wzrostu bakterii oraz działanie antybiotyku(ów) w rozcieńczalniku (Althouse i wsp. 2008). Efektywność działania przeciwbakteryjnego rozcieńczalników w czasie przechowywania nasienia knura w kontekście kontroli wzrostu drobnoustrojów jest słabo udokumentowana. Przy nieskutecznym działaniu osłaniającym rozcieńczalnika, niektóre bakterie w zależności od ich rodzaju i ilości oraz ze względu na swoje właściwości, m.in. nabywania odporności na powszechnie stosowane antybiotyki i skuteczne dostosowywanie się do zmieniających się warunków środowiska (np. obniżenia temperatury do 15–20 °C) stanowiąc mogą istotną przyczynę utraty jakości



nasienia podczas długoterminowego przechowywania w stanie płynnym (Althouse i Lu 2005, Althouse 2008, Maes i wsp. 2008, Speck i wsp. 2014, Morrell i Wallgren 2011, 2014). Podłoże negatywnych efektów wynikających z obecności licznych populacji bakterii może być różne. Oprócz bezpośredniej konkurencji z plemnikami o składniki odżywcze zawarte w rozcieńczalniku (Morrell i Wallgren 2014), niektóre bakterie mogą wykazywać właściwości adhezyjne względem plemników oraz mogą wytwarzać i eksponować na powierzchni czynniki wirulencji lub uwalniać rozpuszczalne czynniki spermatotoksyczne, np. lipopolisacharydy – LPS,  $\alpha$ - i  $\beta$ -hemolizyny, cytotoksyczny czynnik nekrotyzujący, czynnik immobilizacji plemników – SIF, czynnik aglutynacji plemników – SAF (Kaur i wsp. 2010, Prabha i wsp. 2010, Schulz i wsp. 2010, Frączek i Kurpisz 2015). Niektóre bakterie i ich toksyny mogą generować szereg poważnych zmian w przechowywanym nasieniu przejawiających się uszkodzeniami błony komórkowej i akrosomu, upośledzeniem ruchliwości i aglutynacją plemników oraz obniżeniem pH do poziomu 5,7–6,4 (Althouse i wsp. 2008, Maroto Martín i wsp. 2010, Busselleu i wsp. 2011, Goldberg i wsp. 2013). Zmiany te związane mogą być m.in. z peroksydacją lipidów, utratą asymetrii błon plazmatycznych, eksternalizacją fosfatydyloseryny, depolaryzacją błon mitochondriów, czy fragmentacją DNA, i w konsekwencji prowadzić do śmierci plemników, prawdopodobnie przynajmniej częściowo poprzez szlaki apoptozy (Okazaki i wsp. 2010, Frączek i Kurpisz 2015).

### Uzyskane wyniki i ich omówienie

Zachowanie stabilności błony komórkowej plemników przez cały założony okres konserwacji jest krytycznie ważnym warunkiem umożliwiającym zapłodnienie. Skład lipidowy i domenowa budowa błony komórkowej przyczyniają się do dużej wrażliwości plemników knura na stres hipotermiczny oraz do podatności na uszkodzenia komórkowe pod wpływem czynników związanych z konserwacją nasienia, głównie z rozrzedzaniem, tempem schładzania oraz temperaturą i czasem przechowywania. Zastosowanie precyzyjnych metod oceny właściwości błony komórkowej i pozostałych substruktur komórkowych plemników wynika z potrzeb analityki andrologicznej, odpowiednio dostosowanych do monitoringu zmian jakie zachodzą podczas przechowywania nasienia knura. Kompleksowe podejście w tym zakresie uwzględniające poszczególne regiony morfologiczne (główki, wstawki i witki) plemników oraz ich środowisko zewnątrzkomórkowe może mieć także aspekt poznawczy.

W pierwszej z prac (**H1**) stanowiącej osiągnięcie naukowe oceniano jakość nasienia natywnego i przechowywanego przez 9 dni w rozcieńczalniku Safe Cell Plus w temperaturze 17 °C. W badaniach skupiono się na porównaniu czterech metod oceny integralności błony komórkowej, przy czym zmiany jakości nasienia monitorowano również na podstawie ruchliwości, uszkodzeń akrosomu, oraz pomiarów pH i osmolalności w płynach zewnątrzkomórkowych. Użyte metody mikroskopowe oraz biochemiczna różniły się zasadą detekcji uszkodzeń błony komórkowej. W technice barwienia eozyną-nigrozyną (EN) wykorzystywany jest brak możliwości przenikania eozyny do plemników z integralną błoną komórkową (komórki żywe) (Merkies i wsp. 2000). W technice barwienia fluorescencyjnego (test SYBR-14/PI) z sondami wykazującymi powinowactwo do DNA – acylowy barwnik SYBR-14 przenika przez nieuszkodzone błony komórkowe i po dyfuzji do jądra komórkowego jest deacylowany przez wewnątrzkomórkowe esterazy w plemnikach żywych (SYBR-14-pozytywnych), natomiast jodek propidyny (PI) wnika do jądra komórkowego przy utracie integralności błony komórkowej plemników, które traktowane są jako martwe (PI-pozytywne) (Silva i Gadella 2006). W teście hipoosmotycznym (HOS) integralność strukturalna i jednocześnie funkcjonalność błony komórkowej identyfikowane są na podstawie charakterystycznych zmian witki wynikających z aktywnego transportu wody do plemników umieszczonych w środowisku hipotonicznym (Ramu i Jeyendran 2013). Pomiar aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AAT; EC 2.6.1.1) w płynach

zewnątrzkomórkowych umożliwia określenie nasilenia zaburzeń błony komórkowej plemników na podstawie wycieku enzymu do środowiska zewnętrznego (Ciereszko i wsp. 1994).

Wyniki badań wykazały, że już na etapie rozrzedzania nasienia mogą następować istotne zmiany parametrów jakości nasienia, wskazujące na wpływ tzw. efektu rozrzedzenia, który związany może być z działaniem komponentów rozcieńczalnika i/lub nieoptymalnym stopniem rozrzedzenia nasienia (Maxwell i Johnson 1999, Johnson i wsp. 2000, Khalifa i wsp. 2014). W odniesieniu do nasienia natywnego po rozrzedzeniu obniżył się odsetek plemników ruchliwych, z prawidłowym akrosomem oraz z nieuszkodzoną błoną komórkową określany na podstawie barwienia EN i testu HOS. Odnotowano także istotne obniżenie odczynu środowiska zewnątrzkomórkowego, natomiast wzrost ( $p < 0,05$ ) aktywności AAT potwierdzał zwiększenie dysfunkcji błony komórkowej plemników na etapie rozrzedzania nasienia. Przechowywanie rozrzedzonego nasienia przez 9 dni wpłynęło istotnie statystycznie na obniżenie się ruchliwości i wzrost uszkodzeń akrosomu (odpowiednio o 15% i 10%), przy czym zakres i tempo nasilania się niekorzystnych zmian plemników były zależne od długości okresu przechowywania. Podobne zależności, uwarunkowane czasem trwania konserwacji, stwierdzono w przypadku uszkodzeń błony komórkowej plemników określanych na podstawie każdej z użytych metod. Po 9-ciu dniach konserwacji istotne ( $p < 0,01$ ) obniżenie liczby plemników żywych (z integralną i/lub funkcjonalną błoną komórkową) wykazały bezpośrednio techniki mikroskopowe (barwienie EN, test SYBR-14/PI i test HOS – spadek odpowiednio o 7,5%, 11% i 9%), a pośrednio pomiary aktywności AAT (wzrost o 46,5 mU/10<sup>9</sup> plemników). **Każda z użytych metod wskazywała na inne tempo utraty stabilności błony komórkowej, a poszczególne metody mikroskopowe – na znacząco różny ( $p < 0,01$ ) udział procentowy plemników z uszkodzeniami błony komórkowej.** Analiza wyników uzyskanych podczas całego okresu konserwacji wykazała, że **najniższą liczbę plemników z uszkodzoną błoną komórkową ujawniano przy wykorzystaniu barwienia EN, natomiast istotnie wyższą – gdy stosowano barwienie fluorescencyjne.** W odniesieniu do obu technik polegających na barwieniu, **najwyższy ( $p < 0,01$ ) udział procentowy plemników z uszkodzoną błoną komórkową obserwowano stosując test HOS.** Wyniki tego testu nie różniły się istotnie od wyników ruchliwości plemników, z kolei uzyskane zarówno w teście SYBR-14/PI jak i za pomocą barwienia EN były istotnie wyższe ( $p < 0,01$ ) w odniesieniu do ruchliwości. Stwierdzone w badaniach różnice, związane ze specyfiką detekcji danej metody, wynikać mogły prawdopodobnie z kilku, niezależnych lub współwystępujących przyczyn, np. z lokalizacji uszkodzeń błony komórkowej w obrębie główki bądź wtyki plemnika lub ze strukturalnego bądź funkcjonalnego charakteru uszkodzenia błony komórkowej. Mogły wynikać również z wpływu stresu osmotycznego, który w przypadku testu HOS służy do selekcji plemników z wysoką odpornością błony komórkowej, przy czym warunki hipotoniczne mogą dodatkowo uszkadzać błonę komórkową przechowywanych plemników. Sugestie te znajdują częściowe potwierdzenie w piśmiennictwie (Nagy i wsp. 1999, Fraser i wsp. 2001, Lechniak i wsp. 2002), a na różnice pomiędzy metodami oceny błony komórkowej wskazywali wcześniej niektórzy autorzy (Vazquez i wsp. 1997, Merckies i wsp. 2000, Brito i wsp. 2003, Šernienė i wsp. 2005).

W omawianej pracy **nie zaobserwowano znaczących ( $p > 0,05$ ) zmian pH i osmolalności w środowisku przechowywanych plemników**, co wskazywało na dobre właściwości rozcieńczalnika, odpowiednio buforującego i utrzymującego lekko hipertoniczne środowisko, bardziej preferowane przez plemniki knura w czasie konserwacji w stanie płynnym (Johnson i wsp. 2000, Gadea 2003, Vyt i wsp. 2007). W badaniach stwierdzono występowanie istotnych statystycznie zależności pomiędzy prawie wszystkimi analizowanymi parametrami jakości nasienia. Metody mikroskopowej oceny integralności błony komórkowej plemników korelowały istotnie ( $p < 0,001$ ) pomiędzy sobą (wartość współczynników korelacji wynosiła od 0,52 do 0,81) i z aktywnością AAT (wartość współczynników korelacji wynosiła od -0,59 do -0,41). Ponieważ wszystkie zastosowane metody oceny integralności błony komórkowej korelowały nie tylko pomiędzy sobą, ale również istotnie ( $p < 0,001$ ) z innymi

analizowanymi wskaźnikami jakości nasienia (ruchliwością, liczbą plemników z nieuszkodzonym akrosomem i pH), wnioskowano o przydatności użytych metod w laboratoriach centrów zajmujących się produkcją nasienia do określania strukturalnych i/lub funkcjonalnych zmian zachodzących w błonie komórkowej plemników podczas konserwacji w stanie płynnym.

W kolejnej pracy (H2) przedłożonej jako osiągnięcie naukowe, analizę zmian integralności błony komórkowej plemników przeprowadzono określając wpływ temperatury przechowywania (5 °C, 16 °C i 25 °C) podczas 10-ciu dni konserwacji w rozcieńczalniku Vitasem LD. W badaniach tych, oprócz oceny ruchliwości i stabilności środowiska plemników (pomiar pH i osmolalności), szczególną uwagę zwrócono na zmiany aktywności mitochondriów, w związku z czym w plemnikach jednocześnie oceniano stan błony komórkowej i mitochondriów stosując barwienie kombinacją trzech fluorochromów – SYBR-14, PI oraz JC-1 (test SYBR-14/PI/JC-1). Status uszkodzeń błony komórkowej weryfikowano ponadto na podstawie testu HOS i pomiaru aktywności AAT. W pracy zgodnie z założeniem **stwierdzono wpływ temperatury i czasu przechowywania na ruchliwość plemników, niemniej jednak zależne od tych czynników zaobserwowane zmiany ruchliwości nie były spójne z obrazem zmian integralności błony komórkowej określanej na podstawie barwienia fluorescencyjnego i testu HOS.** Udział plemników z ruchem postępowym (wynoszący po rozrzedzeniu 76%) obniżał się wraz z wydłużaniem okresu konserwacji we wszystkich trzech wariantach temperatur, z istotnym ( $p < 0,05$ ) spadkiem wartości w 2., 6. i 4. dniu przechowywania, odpowiednio w temperaturze 5 °C, 16 °C i 25 °C. Po 10 dniach konserwacji liczba plemników z ruchem postępowym zmniejszyła się o 64% w temperaturze 5 °C, o 22% w 16 °C i o 38% w 25 °C, przy czym przez cały okres przechowywania w temperaturze 5 °C ruchliwość plemników była istotnie niższa niż w temperaturze 16 °C. Z kolei, pomimo stopniowego nasilania się uszkodzeń błony komórkowej podczas przechowywania, w 10. dniu konserwacji udział procentowy plemników z integralną błoną komórkową – PI-negatywnych i HOS test-pozytywnych – utrzymywał się we wszystkich analizowanych wariantach temperatur na względnie wysokim poziomie, ogólnie nieco korzystniejszym w 16 °C. Odsetek plemników PI-negatywnych wynoszący na początku konserwacji 84% obniżył się istotnie ( $p < 0,05$ ) w 2. dniu przechowywania w temperaturze 5 °C, 16 °C i 25 °C, przy czym podczas całego okresu konserwacji zmniejszył się odpowiednio o 29%, 19% i 28%. W przypadku testu HOS, udział plemników z prawidłową integralnością błon oszacowany po rozrzedzeniu na 76%, po 10 dniach konserwacji w temperaturze 5 °C i 16 °C zmniejszył się nieznacznie (odpowiednio o 10% i 4%), a pomiędzy tymi wariantami temperatur nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Natomiast w nasieniu przechowywanym w temperaturze 25 °C w 6. dniu konserwacji odnotowano istotny ( $p < 0,05$ ) spadek liczby plemników HOS test-pozytywnych, który w ciągu całego okresu przechowywania oszacowano na 14%. Ponadto w nasieniu przechowywanym w temperaturze 25 °C w odniesieniu do 16 °C, istotnie ( $p < 0,05$ ) niższy odsetek plemników HOS test-pozytywnych stwierdzono od 4. do 8. dnia przechowywania.

**Wyniki uzyskane na podstawie testów SYBR-14/PI/JC-1 i HOS wskazywały, że podczas konserwacji w temperaturze z zakresu udaru chłodowego błona komórkowa plemników utrzymywała swoją integralność strukturalną i funkcjonalną. Stwierdzono jednak zależne od temperatury i czasu przechowywania zmiany aktywności AAT w środowisku zewnątrzkomórkowym, które wskazywały na występowanie destabilizacji błony komórkowej związanej z zaburzeniami jej przepuszczalności.** Aktywność AAT wynosząca na początku konserwacji 93 mU/10<sup>9</sup> plemników, już w 2. dniu przechowywania nasienia w temperaturze 5 °C wzrosła istotnie ( $p < 0,01$ ) do 382 mU/10<sup>9</sup> plemników, a w 10. dniu do 430 mU/10<sup>9</sup> plemników. Przez cały okres konserwacji aktywność enzymu była istotnie statystycznie wyższa w nasieniu przechowywanym w temperaturze 5 °C w odniesieniu do pozostałych analizowanych wariantów temperatur. Konserwacja nasienia w temperaturze 16 °C skutkowała istotnym ( $p < 0,05$ ) wzrostem aktywności AAT dopiero w 6. dobie przechowywania (przy poziomie 137 mU/10<sup>9</sup> plemników),

natomiast w 10. dniu wynosiła 176 mU/10<sup>9</sup> plemników. W nasieniu przechowywanym w temperaturze 25 °C istotny ( $p < 0,05$ ) wzrost aktywności AAT stwierdzono – podobnie jak w temperaturze 5 °C – już w 2. dniu konserwacji, przy czym poziom aktywności enzymu był ponad dwukrotnie niższy (159 mU/10<sup>9</sup> plemników). W ostatnim dniu konserwacji w temperaturze 25 °C aktywność AAT wynosiła 302 mU/10<sup>9</sup> plemników.

Przeprowadzone badania z jednej strony potwierdziły wcześniejsze spostrzeżenia niektórych autorów, że wrażliwe na wpływ temperatury i czasu przechowywania błony plemników knura są zasadniczym miejscem uszkodzeń wywołanych działaniem temperatur z zakresu udaru chłodowego (Bailey i wsp. 2008, Kim i wsp. 2011, Waberski i wsp. 2011, Casas i Althouse 2013). Z drugiej zaś strony wykazały **specyficzny charakter uszkodzeń błony komórkowej – wzrost przepuszczalności (intensywny wyciek AAT) nasilony zwłaszcza w początkowym okresie konserwacji w 5 °C przy zachowaniu strukturalnej stabilności i integralności w regionie główki (test SYBR-14/PI/JC) i/lub w regionie witki (test HOS) plemników**. Badania niektórych autorów (Schmid i wsp. 2013) wskazują, że przechowywanie w stanie płynnym nasienia knura w warunkach hipotermicznych nie powoduje drastycznych zmian w składzie i organizacji lipidów błony komórkowej plemników. Stwierdzili oni, że konserwacja nasienia w temperaturze 5 °C, 10 °C i 17 °C przyczynia się w ciągu pierwszej doby do tym większego obniżenia ruchliwości i liczby plemników żywych z nieuszkodzonymi akrosomami (PI/FITC-PNA-negatywnych) im niższą stosuje się temperaturę. Przechowywanie natomiast przez kolejne 3 dni nie ma już wpływu na te parametry (Schmid i wsp. 2013).

Wywołana przez ochładzanie zwłaszcza przy działaniu temperatury 5 °C destabilizacja błony komórkowej plemników knura związana jest ze wzrostem jej płynności (Casas i Althouse 2013). Nie można wykluczyć, że wskazywane przez niektórych autorów (Canvin i Buhr 1989, Brouwers i wsp. 2005) różnice w stabilności błony komórkowej w poszczególnych regionach morfologicznych plemnika mogły mieć wpływ na wyniki uzyskane za pomocą zastosowanych w pracy testów. Ze względu na lokalizację AAT w cytoplazmie plemników, wzrost aktywności tego enzymu w środowisku zewnątrzkomórkowym jest odnoszony głównie do uszkodzeń błony komórkowej witki (Ciereszko i wsp. 1994), która może być bardziej podatna na uszkodzenia związane z działaniem temperatury 5 °C. Stwierdzono, że błony witki plemników knura charakteryzują się wyższą płynnością niż błony główki, a przez to oba te regiony komórki wykazują różną wrażliwość na działanie temperatury (Canvin i Buhr 1989). Niektórzy autorzy wskazują również, że wstawka i witka plemnika knura są bardziej podatne niż główka na peroksydację lipidów, a procesy peroksydacji intensywnie nasilają się w żywych plemnikach po rozmrożeniu (Brouwers i wsp. 2005) lub w trakcie przechowywania nasienia w stanie płynnym (Cerolini i wsp. 2000, Guthrie i Welch 2012). Defekty plemników związane z peroksydacją podczas ochładzania i przechowywania nasienia mogą naruszać strukturę fosfolipidów i płynność błony komórkowej zwiększając jej przepuszczalność oraz zakłócając transport jonów i aktywność enzymów (Großfeld i wsp. 2008, Awda i wsp. 2009, Kumaresan et al. 2009). Zaburzenia homeostazy głównie jonów wapnia indukują w plemnikach zależne od nich procesy podobne do kapacytacji (Huo i wsp. 2002, Bailey i wsp. 2008, Waberski i wsp. 2011, Schmid i wsp. 2013), które w konsekwencji prowadzić mogą do przedwczesnej degeneracji (starzenia się) i śmierci plemników (Peña i wsp. 2009, Waberski i wsp. 2011). Schmid i wsp. (2013) wskazują, że ochładzanie nasienia upośledza zdolność do reagowania na bodźce kapacytacji w wyniku destabilizacji błon plemników, które prowadzą do przejściowego podwyższenia poziomu wapnia w komórce, a następnie do ich śmierci. Stąd, w odniesieniu do rutynowo ocenianych wskaźników jakości nasienia knura, określanie zdolności plemników do reagowania na czynniki wywołujące kapacytację poprzez ocenę zmian poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia jest bardziej czułym wskaźnikiem defektów powodowanych ochładzaniem i zależnych od czasu przechowywania (Schmid i wsp. 2013).

Podsumowując, wyniki dotyczące zmian integralności błony komórkowej w omawianej pracy wykazały, że **żywołność plemników (komórek PI-pozytywnych i HOS test-pozytywnych) zmniejsza się umiarkowanie podczas 10 dni przechowywania w każdej analizowanej temperaturze, ale wpływ temperatury 5 °C w początkowym okresie konserwacji generuje najbardziej nasilone uszkodzenia błony komórkowej, które przejawiają się wyciekami AAT i związane mogą być prawdopodobnie z utratą innych składników komórkowych niezbędnych do funkcjonowania plemników.** Zastosowanie w pracy różnych metod oceny integralności błony komórkowej plemników wykazało, że **do określania wpływu temperatur z zakresu udaru chłodowego (5 °C) bardziej przydatne mogą być techniki umożliwiające ocenę dysfunkcji związanych ze zmianami przepuszczalności błony komórkowej.** Sugerować można ponadto, że metody takie jak pomiar aktywności AAT po dokładniejszym opracowaniu mogą zostać wykorzystane w doskonaleniu procedur przechowywania nasienia knura w warunkach hipotermicznych czy kriokonserwacji, a być może także do selekcji nasienia po wprowadzeniu tych metod konserwacji do praktyki inseminacyjnej.

W omawianej pracy (H2) ocenę procesów energetycznych w mitochondriach plemników przeprowadzono wykorzystując test z fluorochromem JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro - 1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazo-karbocyaniny; test SYBR-14/PI/JC-1) do określenia stanu transbłonowego potencjału mitochondrialnego ( $\Delta\Psi_m$ ) oraz za pomocą cytochemicznego testu na oksydoreduktazy zależne od NADH (test NADH-NBT, test formazanowy) umożliwiającego oznaczenie zdolności oksydoredukcyjnych mitochondriów. Na podstawie barwienia z sondą JC-1 podczas oceny mikroskopowej wśród plemników żywych (z integralnymi błonami komórkowymi; SYBR-14-pozytywnych, PI-negatywnych) stwierdzono występowanie skategoryzowanych wspólnie dwóch subpopulacji plemników, które w regionie wstawek emitowały intensywną lub nieco słabszą żółto-pomarańczową fluorescencję reprezentującą aktywne mitochondria, odpowiednio z wysokim  $\Delta\Psi_m$  i obniżonym  $\Delta\Psi_m$ , oraz występowanie subpopulacji plemników emitujących zieloną fluorescencję w obszarze wstawki wskazującą na obecność głównie mitochondriów z niskim  $\Delta\Psi_m$ . **W badaniach wykazano, że temperatura przechowywania i czas przechowywania mają istotny wpływ na aktywność mitochondriów plemników związaną z zaburzeniami ich potencjału błonowego.** Udział procentowy plemników z wysokim i obniżonym  $\Delta\Psi_m$  zmniejszył się istotnie statystycznie podczas 10 dni konserwacji we wszystkich analizowanych temperaturach (z 81% na początku konserwacji do 28%, 54% i 42% odpowiednio w temperaturze 5 °C, 16 °C i 25 °C), przy czym w nasieniu przechowywanym w 5 °C i 25 °C istotny ( $p < 0,01$ ) spadek stwierdzono już w 2. dniu, natomiast w temperaturze 16 °C – w 4. dniu przechowywania ( $p < 0,01$ ). Przez cały okres konserwacji liczba plemników z aktywnymi mitochondriami w temperaturze 16 °C była istotnie wyższa ( $p < 0,05$ ) od obserwowanej w nasieniu przechowywanym w 5 °C. Różnic istotnych statystycznie nie stwierdzono pomiędzy wariantami temperatur 16 °C i 25 °C oraz 5 °C i 25 °C. Przechowywanie nasienia przez 10 dni w temperaturze 16 °C skutkowało najniższym (z 13% do 31%), natomiast w temperaturze 5 °C najwyższym (do 54%) wzrostem odsetka plemników żywych z niskim  $\Delta\Psi_m$ . W pracy jednoznacznie wykazano, że **przy wydłużaniu okresu przechowywania nasienia sukcesywnie wzrastać może depolaryzacja błon mitochondrialnych plemników, a działanie obniżonej temperatury (5 °C) może być dodatkowym czynnikiem istotnie nasilającym tego typu zmiany.** Biorąc pod uwagę, że wysoki  $\Delta\Psi_m$  odnoszony jest do prawidłowo przebiegających procesów i aktywności wewnątrzkomórkowej plemników, a przez to zdolności plemników do zapłodnienia (Amaral i wsp. 2013), oba analizowane w pracy czynniki – czas i temperatura przechowywania – wpływając na stan energetyczny plemników, determinują jakość konserwowanego w stanie płynnym nasienia knura, co jak wskazują przeprowadzone badania może mieć istotne znaczenie przy stosowaniu w praktyce rozcieńczalników długoterminowych. Uzyskane wyniki są zgodne z otrzymanymi przez innych autorów stwierdzających upośledzenie funkcji mitochondriów plemników

knura podczas ochładzania do niskich temperatur (5 °C) oraz temperatur standardowo stosowanych w praktyce inseminacyjnej (15–17 °C), a następnie przechowywanych w takich warunkach (Huo i wsp. 2002, Dziekońska i wsp. 2009, Fantinati i wsp. 2009, Kumaresan i wsp. 2009, Trzcińska i wsp. 2011, Dziekońska i Strzeżek 2011). Są zgodne również z wynikami badań, w których konserwacja nasienia w rozcieńczalniku Vitasem LD (takim samym jak w omawianej pracy) w temperaturze 17 °C znacząco obniżała udział plemników z wysokim  $\Delta\Psi_m$  podczas 7 dni (Martín-Hidalgo i wsp. 2011) i 10 dni przechowywania (Dziekońska i wsp. 2013).

Drugi z zastosowanych testów oceny aktywności mitochondriów – test cytochemiczny NADH-NBT ujawnia aktywność oksydoreduktaz-NAD(P)H, które w plemnikach są enzymami specyficznymi (*sperm-specific diaphorases*) i określane są jako diaforaza-NAD(P)H. Diaforaza reprezentuje oksydoreduktazy odnoszone do flawoprotein, które współpracując z łańcuchem oddechowym pośredniczą w przenoszeniu elektronów z NAD(P)H na akceptor elektronów, w warunkach *in vitro* na NBT (błękit tetrazolowy, sól ditetrazolową). W pracy zastosowano wariant testu z egzogennym NADH stymulującym głównie procesy oksydoredukcyjne wstawki i stanowiącym źródło elektronów wykorzystywane przez aktywne mitochondrialne oksydoreduktazy-NADH bezpośrednio do redukcji NBT. Efektem pełnej redukcji cząsteczki NBT (atomów azotu w pierścieniach tetrazolowych przez 4 elektrony) jest powstawanie nierozpuszczalnego w wodzie, ciemnoniebieskiego diformazanu. Zawartość formazanów deponowanych w obrębie mitochondriów, zależna jest od szybkości redukcji NBT warunkowanej zdolnościami oksydoredukcyjnymi mitochondriów plemników (Hrudka 1965, 1978, 1979, Piasecka i wsp. 2001, Golas i wsp. 2010). W związku z tym, wykorzystując komputerową analizę obrazu w celu precyzyjnej weryfikacji intensywności reakcji cytochemicznej NADH-NBT, przeprowadzono w pracy pomiary densytometryczne produktu reakcji – formazanów. Mierzono średnią gęstość optyczną – MOD (*mean optical density*) piksela wstawki plemnika oraz całkowitą gęstość optyczną całej wstawki plemnika – IOD (*integrated optical density*) stanowiącą sumę wartości gęstości optycznej wszystkich pikseli w obrębie wstawki.

**Zastosowanie testu formazanowego wykazało występowanie w nasieniu knura plemników ze zróżnicowanymi morfologicznymi obrazami odczynu cytochemicznego NADH-NBT w regionie wstawek, reprezentatywnymi dla różnej – od wysokiej do obniżonej – aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów.** W plemnikach obserwowano m.in. odczyn intensywny z dużą ilością depozytów formazanów (*compact formazan pattern*) wskazujący na prawidłowe zdolności oksydoredukcyjne i wysoką aktywność mitochondriów na całej długości wstawki, oraz odczyn ze zmniejszoną ilością lub brakiem produktu reakcji (*diffuse-focal formazan pattern*) występujące lokalnie lub na całej długości wstawki, które wskazywały na obniżenie i/lub utratę zdolności oksydoredukcyjnych mitochondriów. W poszczególnych wstawkach, **wartości parametrów gęstości optycznej odzwierciedlały intensywność odczynu cytochemicznego NADH-NBT.** Plemniki z odczynem intensywnym wykazywały wyższe wartości densytometryczne formazanów (MOD i IOD) niż plemniki z osłabioną, wygasającą reakcją cytochemiczną lub z lokalnymi ubytkami produktu reakcji. Należy podkreślić, że zastosowany test umożliwił zwizualizowanie jednoczesnej obecności aktywnych i nieaktywnych mitochondriów w obrębie wstawki plemnika. **W pracy na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że wraz z upływem czasu konserwacji nasienia wzrastała liczba plemników z odczynami cytochemicznymi ujawniającymi zaburzenia funkcjonalne mitochondriów wstawki.** Obserwacje te zostały potwierdzone przez wyniki pomiarów densytometrycznych odczynów cytochemicznych, a **analiza wyników wykazała, że niekorzystny wpływ czasu konserwacji na zdolności oksydoredukcyjne mitochondriów plemników jest również zależny od temperatury przechowywania.** Wyjściowe wartości MOD i IOD formazanów deponowanych we wstawkach plemników (odpowiednio 0,48 i 240) po 10 dniach konserwacji obniżyły się istotnie ( $p < 0,01$ ) we wszystkich analizowanych temperaturach, w 5 °C (odpowiednio 0,18 i 110), w 16 °C (odpowiednio 0,24 i 130) i w 25 °C (odpowiednio 0,22 i

121). Wyższe wartości obu parametrów densytometrycznych obserwowano w nasieniu podczas przechowywania w standardowych warunkach temperaturowych (16 °C). Niemniej jednak wartości MOD w temperaturze 16 °C w odniesieniu do pozostałych analizowanych temperatur były istotnie ( $p < 0,05$ ) wyższe tylko w 4–8 dniu konserwacji. W przypadku IOD istotne statystycznie różnice pomiędzy nasieniem przechowywanym w temperaturze 16 °C a 5 °C stwierdzano przez cały okres konserwacji, natomiast porównując 16 °C z 25 °C tylko w 6. i 8. dniu przechowywania.

Uwzględniając czas i temperaturę przechowywania, w pracy wykazano, że obserwowany obraz zmian zdolności oksydoredukcyjnych mitochondriów plemników odpowiadał zmianom  $\Delta\Psi_m$ , a jednocześnie analizowane parametry aktywności mitochondriów korespondowały ze zmianami ruchliwości plemników. Pomimo postulowanego obecnie poglądu o ograniczonej roli mitochondriów w generowaniu energii na potrzeby związane z poruszaniem się plemników (Marin i wsp. 2003, Peña i wsp. 2009), wyniki uzyskane w pracy wskazywały wyraźnie, że **podczas długoterminowego przechowywania nasienia utrzymanie przez plemniki ruchu postępowego jest ściśle związane z aktywnością mitochondriów**. Potwierdzało to wyniki podobnych badań, w których nasienie knura konserwowano w temperaturze 5 °C lub około 17 °C (Fantinati i wsp. 2009, Kumaresan i wsp. 2009, Trzcńska i wsp. 2011, Dziekońska i wsp. 2009, 2013, Martín-Hidalgo i wsp. 2013). Powiązania prawidłowego ruchu z prawidłową funkcją mitochondriów dowiodły także stwierdzone w pracy istotne ( $p < 0,01$ ) wartości współczynników korelacji, m.in. pomiędzy ruchliwością a odsetkiem plemników z wysokim i obniżonym  $\Delta\Psi_m$  (0,88) oraz parametrami densytometrycznymi MOD i IOD formazanów (odpowiednio 0,52 i 0,61). Wszystkie wymienione parametry korelowały istotnie statystycznie ( $p < 0,01$ ) również z wskaźnikami oceny integralności błony komórkowej (odsetkiem plemników PI-negatywnych, współczynnik korelacji rang Spearmana,  $r_s = 0,57-0,90$ ; odsetkiem plemników HOS test-pozytywnych,  $r_s = 0,38-0,50$ ; aktywnością AAT,  $r_s = -0,54--0,73$ ), co pozwoliło na stwierdzenie, że **obserwowane zaburzenia ruchu plemników mogły wynikać z utraty stabilności błony komórkowej i/lub dysfunkcji mitochondriów**. Można przypuszczać, że najbardziej nasiloną utratą kompetencji komórkowych plemników przechowywanych w temperaturze 5 °C była wynikiem wzrostu przepuszczalności ich błony komórkowej. Do uzyskanych wyników mógł się przyczynić także wpływ temperatury związany z sugerowaną przez niektórych autorów możliwością modulowania szlaków metabolicznych plemników knura – dominacją glikolizy (fruktolizy) w temperaturze 5 °C, natomiast procesów mitochondrialnych w 16 °C (Dziekońska i wsp. 2009). Ponadto prawdopodobnie słabsza inhibicja procesów metabolicznych w temperaturze 25 °C mogła powodować bardziej nasilone tempo zmian (vs. 16°C) związanych ze starzeniem się plemników podczas konserwacji. Uzasadniały to zmiany pH środowiska zewnątrzkomórkowego, które biorąc pod uwagę zależność od temperatury, były zgodne z wynikami badań innych autorów (Paulenz i wsp. 2000). W pracy pH nasienia przechowywanego w 25 °C charakteryzowało się największą tendencją spadkową, co mogło wskazywać na wyższą aktywność metaboliczną plemników i związaną z nią produkcję kwasu mlekowego obniżającego pH nasienia (Paulenz i wsp. 2000). Jedynie **przechowywanie nasienia w temperaturze 5 °C skutkowało istotnym wzrostem pH** (w 4. dniu konserwacji), co przyczyniło się najprawdopodobniej do odnotowanych istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do temperatury 25 °C. Pomimo, że w każdej analizowanej temperaturze przez cały okres konserwacji średnie wartości pH mieściły się w fizjologicznym dla nasienia knura zakresie (Johnson i wsp. 2000, Paulenz i wsp. 2000), ze względu na prawdopodobne ograniczenie właściwości buforujących rozcieńczalnika w 5 °C, stwierdzony w tej temperaturze wzrost pH mógł odzwierciedlać znaczące pogorszenie się warunków dla utrzymania jakości przechowywanego nasienia (Vyt i wsp. 2004, Fantinati i wsp. 2009). W pracy **nie stwierdzono wpływu temperatury i czasu przechowywania na osmolalność**, której średni poziom podczas konserwacji utrzymywał się w zakresie 312–314 mOsm/kg. Niemniej parametr ten istotnie ( $p < 0,01$ ) ujemnie korelował z udziałem plemników o ruchu postępowym ( $r_s = -0,41$ ).

Podsumowując wyniki dotyczące oceny aktywności mitochondriów plemników w pracy wykazano, że **nasilające się zależnie od czasu i temperatury przechowywania nasienia knura dysfunkcje mitochondriów związane są z zaburzeniami ich potencjału transbłonowego i oksydoredukcyjnego. Tego typu zaburzenia mitochondriów mogą mieć powiązania z defektami błony komórkowej plemników i mogą przyczyniać się do obniżonej ruchliwości.** Oba zastosowane w pracy testy fluorescencyjny z JC-1 i cytochemiczny NADH-NBT dowiodły, że **plemniki knura podczas konserwacji nasienia stanowią populację heterogenną w kontekście funkcjonalnym mitochondriów.** Biorąc powyższe pod uwagę można polecać test cytochemiczny NADH-NBT, zwłaszcza weryfikowany obiektywnym pomiarem gęstości optycznej, do wykorzystywania jako dodatkowego wskaźnika oceny plemników w badaniach eksperymentalnych dotyczących określania funkcji mitochondriów podczas konserwacji nasienia knura.

W kolejnej pracy (H3) prezentowanej jako osiągnięcie naukowe przeprowadzono ilościową i jakościową ocenę zanieczyszczenia mikrobiologicznego ejakulatów knurów, a także nasienia przechowywanego przez pięć dni w komercyjnym rozcieńczalniku X-cell® w temperaturze 16 °C. Na podstawie analizy wyników oceny mikrobiologicznej podjęto próbę określania skuteczności osłaniającego działania antybiotyku (siarczanu gentamycyny) zawartego w rozcieńczalniku oraz ustalenia zależności zanieczyszczenia bakteryjnego z jakością przechowywanego nasienia. Wykazano, że w ejakulatach badanej populacji knurów występował różny stopień i rodzaj zanieczyszczenia bakteryjnego. Obecność bakterii tlenowych stwierdzono w 99% ejakulatów, przy czym 9% ejakulatów zawierało tylko jeden typ bakterii, natomiast większość (42%) trzy różne typy drobnoustrojów. **W mikrobiomie plazmy nasienia stwierdzono występowanie gatunków należących do Gram-ujemnych pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae: *Enterobacter* spp., *Escherichia (E.) coli*, *Proteus* spp.,** oraz z rodziny Pseudomonadaceae: ***Pseudomonas (P.)* spp., *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*,** a także gatunków należących do bakterii Gram-dodatnich: ***Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.** Najczęściej izolowanymi bakteriami były gronkowce i paciorkowce, obecne odpowiednio w 68% i 66% ejakulatów, oraz niezidentyfikowane gatunki należące do rodzaju *Pseudomonas*, które stwierdzono w 54% ejakulatów. Jakościowy profil zanieczyszczenia mikrobiologicznego ejakulatów, wskazywał na różne źródła pochodzenia bakterii stwierdzonych w nasieniu. Zgodnie z Baracaldo i Ward (2008), oprócz mikroorganizmów związanych z samymi zwierzętami (np. *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Staphylococcus* spp.), do kontaminacji ejakulatów mogły przyczynić się warunki higieniczno-sanitarne bytowania knurów i środowiska laboratoryjnego, a także warunki w czasie pobierania nasienia, na co wskazywała obecność w nasieniu bakterii z rodzaju *Bacillus* czy *Pseudomonas*. W pracy **wykazano stosunkowo wysoki poziom zanieczyszczenia bakteriami tlenowymi (mediana  $7,7 \times 10^3$  CFU/mL), przy zróżnicowanym ogólnym stopniu zanieczyszczenia ejakulatów (w zakresie od 80 CFU/mL do  $370 \times 10^6$  CFU/mL), a także rozpatrywanym dla poszczególnych bakterii.** W związku z tym, uzyskane wyniki ilościowej i jakościowej analizy bakteriologicznej sugerowały konieczność, ale też możliwość obniżenia stopnia zanieczyszczenia bakteriologicznego ejakulatów poprzez zwrócenie uwagi na stosowane procedury higieniczne, np. przy pobieraniu nasienia. Sugestia ta znajduje także uzasadnienie w niektórych badaniach dotyczących wdrażania wysokich standardów higienicznych przy pozyskiwaniu i obróbce nasienia (Goldberg i wsp. 2013, Schulze i wsp. 2015). Z drugiej strony nie można również wykluczyć, że stwierdzona zróżnicowana liczba bakterii wynikała z fizjologicznych właściwości ejakulatów knurów, które jak wskazują dane w piśmiennictwie mogą zawierać dużą liczbę, nawet do  $10^9$  bakterii tlenowych w mL (Althouse i wsp. 2000, Baracaldo i Ward 2008, Schulze i wsp. 2015).

W pracy wykazano, że w przechowywanym nasieniu występowały charakterystyczne, ilościowe i jakościowe zmiany mikrobiologicznego profilu zanieczyszczeń, związane prawdopodobnie z ograniczonym działaniem przeciwbakteryjnym rozcieńczalnika. Rozcieńczenie nasienia skutkowało obniżeniem liczby izolacji ogólnie bakterii tlenowych (z 96% do 63%) oraz większości gatunków



bakterii (*Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*), które obecne były w nasieniu natywnym. Bezpośrednio po rozcieńczeniu nasienia nie stwierdzono wzrostu *Enterobacter* spp. i *E. coli*, wzrosła natomiast częstość izolacji niezidentyfikowanych bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Na podstawie częstości izolacji poszczególnych bakterii w trakcie przechowywania stwierdzono, że **zmiany w strukturze profilu mikrobiologicznego zasadniczo przejawiały się redukcją wzrostu bakterii Gram-ujemnych, z wyjątkiem *Pseudomonas* spp., przy ograniczeniu inhibicji wzrostu bakterii Gram-dodatnich**. Zmiany te najwyraźniej widoczne były w końcowym okresie przechowywania (dzień 4.-5.), w którym nie stwierdzano już w nasieniu obecności *Enterobacter* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*. Do 3. dnia konserwacji wzrastała z kolei liczba izolatów z *Streptococcus* spp., natomiast podczas 5-ciu dni przechowywania zwiększającą tendencją częstości izolacji odnotowano dla *Staphylococcus* spp. (z 4% do 37%) oraz *Bacillus* spp. (z 22% do 70%). Bakterie *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. należały do najczęściej izolowanych przez cały okres przechowywania. Stwierdzony selektywny wzrost poszczególnych typów bakterii w czasie konserwacji mógł wynikać z właściwości siarczanu gentamycyny, antybiotyku który przy stosunkowo wąskim spektrum działania, większą skuteczność wykazuje wobec bakterii Gram-ujemnych (Althouse i Lu 2005). Mając to na uwadze, uzyskane wyniki wskazywały również (choć nie wykazywano tego metodami bezpośrednimi), że często izolowane z przechowywanego nasienia, np. niezidentyfikowane Gram-ujemne bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, czy Gram-dodatnie z rodzaju *Bacillus*, mogły być odporne na działanie gentamycyny.

Na ograniczenia skuteczności przeciwbakteryjnego działania antybiotyku w czasie konserwacji wskazywały także zaobserwowane znaczne wahania stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia wyrażanego ogólną liczbą bakterii tlenowych. Stwierdzono, że statystycznie istotny wpływ na ten parametr miały rozcieńczenie ( $p < 0,01$ ) oraz czas przechowywania ( $p < 0,05$ ) nasienia. Po rozcieńczeniu ejakulatów średnia ogólna liczba bakterii tlenowych obniżyła się z  $724 \times 10^3$  do  $2,7 \times 10^3$  CFU/mL. W 2. dniu, w przechowywanym nasieniu odnotowano istotny statystycznie wzrost ogólnej liczby bakterii tlenowych. W kolejnym dniu konserwacji ilość bakterii tlenowych obniżyła się istotnie, a następnie – w 4. dniu, ponownie istotnie wzrosła. Średni stopień zanieczyszczenia bakteriami tlenowymi w 2., 4. i 5. dniu przechowywania był zbliżony do poziomu odnotowanego dla nasienia natywnego. Różnice zaobserwowane pomiędzy ogólną liczbą bakterii tlenowych w poszczególnych okresach konserwacji interpretowano zmianami wynikającymi z dynamiki wzrostu mikroorganizmów w nasieniu (Althouse 2008, Althouse i wsp. 2008). Uzyskane **wyniki wskazywały wyraźnie na występowanie okresu adaptacji bakterii do środowiska i temperatury przechowywania związanego z niższą na początku konserwacji ilością bakterii tlenowych w dawkach inseminacyjnych**. Ujawniły ponadto, że **w dalszych etapach konserwacji przy braku odpowiedniej „kontroli” przeciwbakteryjnej ze strony rozcieńczalnika, w przechowywanym nasieniu występować mogą okresy intensywnej proliferacji poszczególnych typów i gatunków bakterii tlenowych, których namnażanie może mieć związek z obniżeniem jakości przechowywanego nasienia**.

Podczas 5-ciu dni konserwacji w nasieniu stwierdzono statystycznie istotne ( $p < 0,01$ ) obniżenie się udziału plemników z ruchem postępowym (z 75% do 54%) i komórek z nieuszkodzonym akrosomem (z 92% do 82%), a także znaczący ( $p < 0,05$ ) wzrost aglutynacji plemników. Odnotowano zależne od czasu przechowywania zmiany pH nasienia i stabilności błony komórkowej plemników określanej na podstawie aktywności AAT w płynach zewnątrzkomórkowych. Niektóre uzyskane w pracy **wyniki umożliwiły wskazanie niekorzystnego wpływu zanieczyszczenia bakteriami tlenowymi na jakość przechowywanego nasienia**. Wnioskowano o tym m.in. na podstawie wykazanych istotnych ( $p < 0,05$ ) zależności między ogólną liczbą bakterii tlenowych a aglutynacją plemników ( $r_s = 0,19$ ) i odsetkiem plemników z nieuszkodzonym akrosomem ( $r_s = -0,18$ ). Wskazać należy, że odnotowane niskie wartości współczynników korelacji wynikać mogły

z dużej zmienności prób w zakresie ilościowym oraz gatunkowym bakterii tlenowych, w tym być może tych które niekoniecznie oddziaływały niekorzystnie na plemniki. Przeprowadzone badania wykazały, że **szkodliwy wpływ niektórych bakterii związany był z ich adhezją do powierzchni wszystkich regionów morfologicznych (główki, wstawki, witki) plemnika, a interakcje tego typu, wraz z towarzyszącą im wzmożoną aglutynacją plemników nasilały się wraz z wydłużaniem czasu przechowywania i intensyfikowały się zwłaszcza w końcowym okresie konserwacji.** W pracy stwierdzono także, że **w ciągu całego okresu konserwacji wzrosła częstość występowania dawek inseminacyjnych wykazujących wysoki stopień zanieczyszczenia mikrobiologicznego ze stosunkiem liczby plemników do liczby bakterii tlenowych wynoszącym poniżej 100:1, jak również poniżej 1:1.** W nasieniu takim, zgodnie z wskazaniami niektórych autorów (Althouse 2008, Althouse i wsp. 2008) oraz w oparciu o wyniki prac eksperymentalnych z nasieniem inokulowanym *E. coli* (Bussalleu i wsp. 2011), *P. aeruginosa* (Sepúlveda i wsp. 2014), *Clostridium perfringens* (Sepúlveda i wsp. 2013), czy *Enterobacter cloacae* (Prieto-Martínez i wsp. 2014), wysoki poziom zanieczyszczenia bakteryjnego może prowadzić do upośledzenia ruchliwości, utraty integralności akrosomu, wzrostu aglutynacji plemników, a także do obniżenia pH przechowywanego nasienia knura. W omawianej pracy, ze względu na utrzymywanie się w każdym dniu konserwacji pH nasienia na poziomie nieco wyższym od obojętnego (średnio 7,18–7,24), potwierdzono jednak możliwość niepożądanego oddziaływania bakterii na plemniki przy braku kwaśnego odczynu środowiska plemników (Althouse i wsp. 2000, Bresciani i wsp. 2014, Sepúlveda i wsp. 2014).

Podsumowując, przeprowadzone badania dostarczyły informacji o zróżnicowaniu stopnia i rodzaju zanieczyszczenia bakteryjnego w ejakulatach knurów przy znacznym rozpowszechnieniu występowania w nich bakterii tlenowych. **Wykazano, że w praktyce inseminacyjnej eliminacja i/lub kontrola namnażania mikroorganizmów podczas przechowywania nasienia w stanie płynnym może być nieskuteczna, co prowadzi do obniżenia jakości nasienia w dawkach inseminacyjnych. Przyczyną tego może być najprawdopodobniej ograniczona aktywność bakteriobójcza i/lub bakteriostatyczna antybiotyków zawartych w rozcieńczalniku.** W pracy, na podstawie zmian w częstości izolacji poszczególnych mikroorganizmów (stanowiących oryginalny element podjętych badań) oraz zwiększania się ogólnej liczby bakterii tlenowych na różnych etapach przechowywania nasienia, wnioskowano o wybiórczej i ograniczonej skuteczności przeciwbakteryjnego działania siarczanu gentamycyny. Najwyraźniejszym stwierdzonym przejawem bezpośredniego, szkodliwego działania bakterii na plemniki podczas przechowywania nasienia było ścisłe przyleganie bakterii do powierzchni gamet oraz wzrost aglutynacji plemników w obecności drobnoustrojów. Przeprowadzone badania sugerują, że oprócz stosowania wysokich standardów higienicznych przy produkcji nasienia, należy zwracać uwagę na dobór właściwego pod względem skuteczności działania przeciwbakteryjnego rozcieńczalnika, który na podstawie kontrolnych badań mikrobiologicznych powinien być odpowiednio dostosowywany do profilu zanieczyszczenia bakteryjnego nasienia danej populacji knurów. Ponadto wydaje się, że ze względu na stwierdzone w pracy współwystępowanie w nasieniu różnych typów bakterii tlenowych, większe znaczenie w określaniu ich ewentualnego negatywnego oddziaływania na jakość długoterminowo przechowywanego nasienia może mieć analiza zmian ilościowych uwzględniająca poszczególne typy i gatunki mikroorganizmów.

Wobec niejednoznacznych rezultatów badań dotyczących uwarunkowania wyników oceny jakości nasienia od typu komory pomiarowej zastosowanej w CASA, jak dotąd nielicznych i przeprowadzonych u innych gatunków zwierząt, w przedłożonej jako osiągnięcie naukowe pracy **H4** zweryfikowano hipotezę wpływu typu komory pomiarowej wykorzystywanej w komputerowo wspomaganą analizę nasienia na wyniki oceny koncentracji i ruchliwości plemników knura. Wykorzystując rozrzedzone nasienie porównano trzy powszechnie stosowane komory różniące się m.in. głębokością i/lub sposobem deponowania do nich nasienia. Analizę nasienia przeprowadzono w

komorze Leja (LJ), komorze Maklera (MK) oraz na szkiełku mikroskopowym podstawowym (SL), w grubości warstwy ocenianego nasienia wynoszącej odpowiednio 20  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  oraz 10,3  $\mu\text{m}$ . **Wykazano istotny ( $p < 0,001$ ) wpływ typu komory pomiarowej na wyniki koncentracji plemników otrzymane na podstawie CASA.** Stwierdzono, że **ocena wykonywana w MK prowadziła do uzyskania istotnie ( $p < 0,01$ ) wyższych średnich wartości koncentracji plemników niż w LJ i SL** (odpowiednio  $45 \times 10^6/\text{mL}$  vs.  $27 \times 10^6/\text{mL}$  i  $31 \times 10^6/\text{mL}$ ). Pomiedzy liczbą plemników oszacowaną w LJ i SL nie odnotowano różnic istotnych statystycznie. W pracy wyniki koncentracji plemników oceniane na podstawie CASA odnoszono również do otrzymanych metodą hemocytometryczną w komorze Bürkera (BH), którą traktowano jako referencyjną. W związku z tym, że określana w BH średnia wartość koncentracji plemników (zbliżona do ilości plemników, na którą standaryzowano dawki nasienia –  $2,7 \times 10^9/100 \text{ mL}$  i wynosząca  $30 \times 10^6/\text{mL}$ ) była istotnie ( $p < 0,01$ ) niższa od stwierdzonej w MK, w pracy wnioskowano o **możliwości przeszacowywania liczby plemników podczas oceny koncentracji nasienia knurów w komorze Maklera przy użyciu systemów CASA.** Uzyskane wyniki potwierdziły wskazania Christensen i wsp. (2005) o niższej precyzji oceny koncentracji plemników buhaja w MK w zestawieniu z komorami hemocytometrycznymi. Zgodne były ponadto z otrzymanymi przez Hoogewijs i wsp. (2012), którzy znacząco wyższą koncentrację plemników ogiera stwierdzili m.in. w MK w porównaniu do ocenianej za pomocą metody wzorcowej (z NucleoCounter SP-100), nieróżniącej się z kolei istotnie od oceny przeprowadzonej w LJ o głębokości 20  $\mu\text{m}$  (bez korekty efektu Segre-Silberberg'a).

W omawianej pracy wykazano, że typ użytej komory pomiarowej miał wpływ na ilość plemników ruchliwych kategoryzowanych w obrębie analizowanych subpopulacji oraz na większość ocenianych parametrów kinetycznych charakteryzujących prędkość i trajektorię ruchu plemników. Uzyskane wyniki wskazywały wyraźnie, że **wpływ na wskaźniki ruchliwości plemników związany był z głębokością zastosowanych komór pomiarowych.** Średni udział procentowy plemników ruchliwych (TMS), plemników wykazujących ruch postępowy (PMS) oraz ruch postępowy szybki (RPMS) odnotowany w głębszej 20- $\mu\text{m}$  komorze Leja (wynoszący odpowiednio 92%, 78% oraz 69%) był istotnie statystycznie wyższy niż w obu płytszych komorach, w MK (odpowiednio o 2%, 5% oraz 26%) i w SL (odpowiednio o 1%, 6% oraz 24%). Wskaźniki TMS, PMS oraz RPMS nie różniły się istotnie pomiędzy MK i SL, natomiast odsetek plemników o ruchu niepostępowym (NPMS) kształtował się na zbliżonym poziomie (14–19%) we wszystkich trzech komorach. Przeprowadzone badania wskazywały, że **wyznaczona głębokością komory pomiarowej przestrzeń, w której poruszają się plemniki może przyczyniać się do modyfikacji prędkości oraz kształtu trajektorii ruchu plemników.** Analiza wartości parametrów kinetycznych zarejestrowanych w poszczególnych komorach oraz stwierdzone istotne statystycznie różnice większości tych parametrów pomiędzy LJ a MK i SL, sugerowały bardziej ograniczony sposób poruszania się wiatki plemników w płytszych komorach pomiarowych (prawdopodobnie limitowany w wymiarze wyznaczonym przez głębokość komory). Większą swobodę ruchu plemników w głębszej komorze sugerowały zarejestrowane w LJ m.in. istotnie wyższe ( $p < 0,01$ ; vs. MK i SL) wartości prędkości średniej plemników (VAP), średniej prędkości krzywoliniowej (VCL) oraz amplitudy (ALH) i częstotliwości (BCF) bocznych wychyleń główki plemnika. Wartości tych parametrów wskazywały na bardziej dynamiczny (energiczny) charakter ruchu plemników w LJ, przy czym jednocześnie poruszały się one po bardziej nieregularnych trajektoriach i z mniejszą progresywnością, na co wskazywały niższe wartości liniowości (LIN) i prostości (STR) ruchu plemników. Z kolei w obu płytszych komorach, które pomiędzy sobą nie różniły się istotnie pod względem zarejestrowanych w nich wskaźników kinetycznych, plemniki poruszały się mniej energicznie (stwierdzono niższą VAP, VCL, ALH i BCF vs. LJ) wzdłuż bardziej prostoliniowych trajektorii (stwierdzono wyższą LIN i STR vs. LJ), pokonując odległości podobne do zaobserwowanych w LJ (stwierdzono zbliżone wartości średniej prędkości liniowej – VSL). Uzyskane wyniki potwierdziły wskazania innych autorów dotyczące wpływu

głębokości komór pomiarowych na ocenę ruchliwości plemników za pomocą systemów CASA (Contri i wsp. 2010, Lenz i wsp. 2011, Gloria i wsp. 2013, Palacín i wsp. 2013). W badaniach tych autorów, odmiennie jednak niż w omawianej pracy, ogólnie odnotowano niższe wartości niektórych wskaźników ruchliwości (np. TMS, PMS, VCL, VSL, VAP) w komorach o głębokości 20  $\mu\text{m}$  (LJ lub podobnych pod względem głębokości i nanoszenia nasienia) w porównaniu do komór o głębokości około 10  $\mu\text{m}$  (MK i/lub SL). Ze względu na to, że badania cytowanych powyżej autorów przeprowadzono na nasieniu innych gatunków zwierząt, trudno je bezpośrednio odnieść do uzyskanych w prezentowanej pracy. Niewykluczone, że specyficzne gatunkowo właściwości związane z rozmiarem i dynamiką poruszania się plemników i odróżniające gamety knura od innych ssaków (Quintero-Moreno i wsp. 2004) mogły przyczynić się do stwierdzonych różnic. Wymaga to jednak wyjaśnienia w przyszłych badaniach.

Należy podkreślić, że wynikające z otrzymanych rezultatów informacje ujawniające prawdopodobnie zależne od głębokości komory różnice w sposobie poruszania się plemników, mogą mieć szczególne jak się wydaje znaczenie przy ustalaniu modelowych wzorców ruchu plemników knura. Można przypuszczać biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, że głębokość komory odgrywać może dużą rolę w ocenie wskaźników kinetycznych (np. ALH i BCF) takich plemników, które podczas ruchu wykazują wysoki stopień wygięcia wlotki. Sugestia ta wymaga dokładnego zweryfikowania w przyszłych badaniach, niemniej wydaje się ważną wskazówką, ponieważ obecnie wiele prac skupia się na wnikliwych analizach zmian subpopulacji ruchliwych plemników w różnych warunkach eksperymentalnych, w tym również podczas hyperaktywacji (Schmidt i Kamp 2004, Flores i wsp. 2009, Matás i wsp. 2010).

Podsumowując przeprowadzone badania stanowią uzupełnienie nielicznych doniesień opisujących znaczące uwarunkowania wyników pomiaru koncentracji plemników knura od typu komory pomiarowej zastosowanej w komputerowo wspomaganą analizę nasienia. Uzyskane wyniki wskazują, że **istnieje możliwość oszacowywania zawyżonej liczby plemników w próbie, gdy ocena koncentracji plemników knura przy pomocy CASA wykonywana jest w komorze Maklera.** W pracy, po raz pierwszy w świetle dostępnego piśmiennictwa, wykazano wpływ typu komory pomiarowej zastosowanej w komputerowo wspomaganą analizę na ocenę ruchliwości plemników knura. Stwierdzono, że **głębokość komory determinując prawdopodobnie sposób poruszania się w niej plemników, w konsekwencji może wpływać na różnice pomiędzy wynikami wskaźników ruchliwości rejestrowanymi przez system CASA dla tej samej próbki nasienia ocenianej w warstwie o różnej grubości (20  $\mu\text{m}$  vs. 10  $\mu\text{m}$ ).** Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę zdefiniowania optymalnej głębokości komory do pomiarów koncentracji i/lub ruchliwości plemników knura przy pomocy CASA, a także zwracają uwagę na konieczność przeprowadzania dalszych badań dotyczących standaryzacji procedur automatycznej analizy nasienia u tego gatunku.

### Piśmiennictwo:

- Althouse G.C., 2008. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod Domest Anim* 43: 374–378.
- Althouse G.C., Kuster C.E., Clark S.G., Weisiger R.M., 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53: 1167–1176.
- Althouse G.C., Lu K.G., 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63: 573–584.
- Althouse G.C., Pierdon M.S., Lu K.G., 2008. Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology* 70: 1317–1323.
- Althouse G.C., Wilson M.E., Kuster C., Parsley M., 1998. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 50: 535–543.
- Amann R.P., Waberski D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81: 5–17.

- Amaral A., Lourenço B., Marques M., Ramalho-Santos J., 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146: R163–R174.
- Anil S.S., Larriestra A., Deen J., Morrison R.B., Minion L., 2004. A retrospective study on the preserving capacity of a commercial boar semen extender. *Theriogenology* 62: 425–436.
- Awda B.J., Mackenzie-Bell M., Buhr M.M., 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol Reprod* 81: 553–561.
- Bailey J.L., Lessard C., Jacques J., Breque C., Dobrinski I., Zeng W., Galantino-Homer H.L., 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70: 1251–1259.
- Baracaldo M., Ward J., 2008. Quality control of extended boar semen. London Swine Conference – Facing the Now Reality. 1-2 April 2008, London, pp 195–206.
- Bresciani C., Cabassi C.S., Morini G., Taddei S., Bettini R., Bigliardi E., Di Ianni F., Sabbioni A., Parmigiani E., 2014. Boar semen bacterial contamination in Italy and antibiotic efficacy in a modified extender. *Ital J Anim Sci* 13: 83–87.
- Brito L.F., Barth A.D., Bilodeau-Goeseels S., Panich P.L., Kastelic J.P., 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology* 60: 1539–1551.
- Broekhuijse M.L., Šoštarić E., Feitsma H., Gadella B.M., 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology* 76: 1473–1486.
- Brouwers J.F., Silva P.F.N., Gadella B.M., 2005. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze–thawing. *Theriogenology* 63: 458–469.
- Bussalleu E., Yeste M., Sepúlveda L., Torner E., Pinart E., Bonet S., 2011. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E. coli* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci* 127: 176–182.
- Canvin A.T., Buhr M.M., 1989. Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes. *J Reprod Fert* 85: 553–540.
- Casas I., Althouse G.C., 2013. The protective effect of a 17 °C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 °C. *Cryobiol* 66: 69–75.
- Cerolini S., Maldjian A., Surai P., Noble R., 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 58: 99–111.
- Christensen P., Stryhn H., Hansen C., 2005. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* 63: 992–1003.
- Ciereszko A., Glogowski J., Demianowicz W., Strzeżek J., 1994. Stimulation of aspartate aminotransferase from farm animal semen by pyridoxal 5'-phosphate. *Anim Reprod Sci* 34: 327–341.
- Contri A., Valorz C., Faustini M., Wegher L., Carluccio A., 2010. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74: 424–435.
- Dziekońska A., Fraser L., Majewska A., Lecewicz M., Zasiadczyk Ł., Kordan W., 2013. Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17 °C. *Pol J Vet Sci* 16: 517–525.
- Dziekońska A., Fraser L., Strzeżek J., 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J Anim Feed Sci* 18: 638–649.
- Dziekońska A., Strzeżek J., 2011. Boar variability affects sperm metabolism activity in liquid stored semen at 5 °C. *Pol J Vet Sci* 14: 21–27.
- Fantinati P., Zannoni A., Bernardini C., Forni M., Tattini A., Seren E., Bacci M.L., 2009. Evaluation of swine fertilisation medium (SFM) efficiency in preserving spermatozoa quality during long-term storage in comparison to four commercial swine extenders. *Animal* 3: 269–274.
- Flores E., Fernández-Novell J.M., Peña A., Rodríguez-Gil J.E., 2009. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* 72: 784–797.
- Fraczek M., Kurpisz M., 2015. Mechanisms of the harmful effects of bacterial semen infection on ejaculated human spermatozoa: potential inflammatory markers in semen. *Folia Histochem Cytobiol* 53: 201–217.
- Fraser L., Gorszczaruk K., Strzeżek J., 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod Dom Anim* 36: 325–329.
- Gadea J., 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. A review. *Spanish J Agric Res* 1: 17–27.
- Gadea J., 2005. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology* 63: 431–444.

- Gloria A., Carluccio A., Contri A., Wegher L., Valorz C., Robbe D., 2013. The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Andrology* 1: 879–885.
- Golas A., Malek P., Piasecka M., Styrna J., 2010. Sperm mitochondria diaphorase activity – a gene mapping study of recombinant inbred strains of mice. *Int J Dev Biol* 54: 667–673.
- Goldberg A.M.G., Argenti L.E., Faccin J.E., Linck L., Santi M., Bernardi M.L., Cardoso M.R.I., Wentz I., Bortolozzo F.P., 2013. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Res Vet Sci* 95: 362–367.
- Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M.C., Rath D., 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70: 1225–1233.
- Guthrie H.D., Welch G.R., 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 78: 1700–1708.
- Hoogewijs M.K., De Vliegher S.P., Govaere J.L., De Schauwer C., De Kruif A., Van Soom A., 2012. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Vet J* 44: 542–549.
- Hrudka F., 1965. Cytochemical demonstration of catabolic activity in spermatozoa by the formazan test. *J Reprod Fertil* 10: 15–20.
- Hrudka F., 1978. A morphological and cytochemical study on isolated sperm mitochondria. *J Ultrastruct Res* 63: 1–19.
- Hrudka F., 1979. Cytochemistry of oxidoreductases in spermatozoa: the technique revisited. *Andrologia* 11: 337–353.
- Huo L.J., Yue K.Z., Yang Z.M., 2002. Characterization of viability, mitochondrial activity, acrosomal integrity and capacitation status in boar sperm during in vitro storage at different ambient temperatures. *Reprod Fert Develop* 14: 509–514.
- Iguer-Ouada M., Verstegen J.P., 2001. Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology* 55: 733–749.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C., 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62: 143–172.
- Kaur S., Prabha V., Sarwal A., 2010. Receptor mediated agglutination of human spermatozoa by spermagglutinating factor isolated from *Staphylococcus aureus*. *J Urol* 184: 2586–2590.
- Khalifa T., Rekkas C., Samartzi F., Lymberopoulos A., Kousenidis K., Dovenski T., 2014. Highlights on artificial insemination (AI) technology in the pigs. *Mac Vet Rev* 37: 5–34.
- Kim S., Lee Y.J., Kim Y.J., 2011. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 124: 118–124.
- Kumaresan A., Kadirvel G., Bujarbaruah K.M., Bardoloi R.K., Das A., Kumar S., Naskar S., 2009. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 110: 162–171.
- Kuster C., 2005. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: why can they be different. *Theriogenology* 64: 614–617.
- Kuster C.E., Althouse G.C., 2016. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology* 85: 21–26.
- Lechniak D., Kedzierski A., Stanislawski D., 2002. The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reprod Dom Anim* 37: 379–380.
- Lenz R.W., Kjelland M.E., Vonderhaar K., Swannack T.M., Moreno J.F., 2011. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *J Anim Sci* 89: 383–388.
- Maes D., Nauwynck H., Rijsselaere T., Mateusen B., Vyt P., de Kruif A., Van Soom A., 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 70: 1337–1345.
- Maes D., Rijsselaere T., Vyt P., Sokolowska A., Deley W., Van Soom A., 2010. Comparison of five different methods to assess the concentration of boar semen. *Vlaams Diergen Tijds* 79: 42–47.
- Marin S., Chiang K., Bassilian S., Lee W.N., Boros L.G., Fernandez-Novell J.M., Centelles J.J., Medrano A., Rodriguez-Gil J.E., Cascante M., 2003. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by metabolomics characterization. *FEBS Lett* 554: 342–346.
- Maroto Martín L.O., Muñoz E.C., De Cupere F., Van Driessche E., Echemendia-Blanco D., Rodríguez J.M.M., Beeckmans S., 2010. Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim Reprod Sci* 120: 95–104.
- Martín-Hidalgo D., Barón F.J., Bragado M.J., Carmona P., Robina A., García-Marín L.J., Gil M.C., 2011. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology* 75: 1550–1560.
- Martín-Hidalgo D., Hurtado de Llera A., Yeste M., Gil M.C., Bragado M.J., García-Marín L.J., 2013. Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 80: 285–294.

- Massányi P., Chrenek P., Lukáč N., Makarevich A.V., Ostro A., Živčák J., Bulla J., 2008. Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak J Anim Sci* 41: 60–66.
- Matás C., Sansegundo M., Ruiz S., García-Vázquez F.A., Gadea J., Romar R., Coy P., 2010. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology* 74: 1327–1340.
- Maxwell W.M., Johnson L.A., 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52: 1353–1362.
- Merkies K., Chenier T., Plante C., Buhr M.M., 2000. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology* 54: 1215–1224.
- Morrell J.M., Wallgren M., 2011. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Anim Reprod Sci* 123: 64–69.
- Morrell J.M., Wallgren M., 2014. Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. *Pathogens* 3: 934–946.
- Nagy S., Házás G., Papp A.B., Iváncsics J., Szász F., Szász F. Jr., Kovács A., Foote R.H., 1999. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology* 52: 1153–1159.
- Okazaki T., Mihara T., Fujita Y., Yoshida S., Teshima H., Shimada M., 2010. Polymyxin B neutralizes bacteria-released endotoxin and improves the quality of boar sperm during liquid storage and cryopreservation. *Theriogenology* 74: 1691–1700.
- Palacín I., Vicente-Fiel S., Santolaria P., Yániz J.L., 2013. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Res* 112: 128–135.
- Paulenz H., Kommisrud E., Hofmo P.O., 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod Domest Anim* 35: 83–87.
- Peña F.J., Rodríguez Martínez H., Tapia J.A., Ortega Ferrusola C., González Fernández L., Macías García B., 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim* 44: 345–349.
- Petrunkina A.M., Waberski D., Günzel-Apel A.R., Töpfer-Petersen E., 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134: 3–17.
- Piasecka M., Wenda-Rózewicka L., Ogoński T., 2001. Computerized analysis of cytochemical reactions for dehydrogenases and oxygraphic studies as methods to evaluate the function of the mitochondrial sheath in rat spermatozoa. *Andrologia* 33: 1–12.
- Prabha V., Sandhu R., Kaur S., Kaur K., Sarwal A., Mavuduru R.S., Singh S.K., 2010. Mechanism of sperm immobilization by *Escherichia coli*. *Adv Urol* 2010: 1–6.
- Prieto-Martínez N., Bussalleu E., Garcia-Bonavila E., Bonet S., Yeste M., 2014. Effects of *Enterobacter cloacae* on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Anim Reprod Sci* 148: 72–82.
- Quintero-Moreno A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61: 673–690.
- Ramu S., Jeyendran R.S., 2013. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods Mol Biol* 927: 21–25.
- Reicks D.L., Levis D.G., 2008. Fertility of semen used in commercial production and the impact of sperm numbers and bacterial counts. *Theriogenology* 70: 1377–1379.
- Riesenbeck A., 2011. Review on international trade with boar semen. *Reprod Domest Anim* 46 (Suppl. 2): 1–3.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A., 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 60: 1553–1568.
- Rodríguez-Martínez H., 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev* 19: 91–101.
- Sa S.J., Choi S.H., Kim H.J., Cho K.H., Hong J.K., Kim D.W., Kim Y.H., Park J.C., Chung K.H., 2014. Effect of different inoculation concentration of *Escherichia coli* on boar sperm quality and reproductive performance in sow. *Reprod Dev Biol* 38: 159–163.
- Schmid S., Henning H., Oldenhof H., Wolkers W.F., Petrunkina A.M., Waberski D., 2013. The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermally stored boar spermatozoa. *Andrology* 1: 376–386.
- Schmidt H., Kamp G., 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128: 171–179.

- Schulz M., Sánchez R., Soto L., Risoptrón J., Villegas J., 2010. Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. *Fertil Steril* 94: 619–623.
- Schulze M., Ammon C., Rüdiger K., Jung M., Grobbel M., 2015. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology* 83: 430–437.
- Schulze M., Ruediger K., Mueller K., Jung M., Well C., Reissmann M., 2013. Development of an *in vitro* index to characterize fertilizing capacity of boar ejaculates. *Anim Reprod Sci* 140: 70–76.
- Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S., 2014. Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci* 150: 96–106.
- Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M., Torner E., Bonet S., 2013. How do different concentrations of *Clostridium perfringens* affect the quality of extended boar spermatozoa? *Anim Reprod Sci* 140: 83–91.
- Šernienė L., Riškevičienė V., Banys A., Žilinska, H., 2005. Comparison of *in vitro* methods for evaluation of boar semen quality. *Medycyna Wet* 61: 278–281.
- Silva P.F., Gadella B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958–978.
- Sone M., 1990. Investigations on the control of bacteria in boar semen. *Jpn J Anim Reprod* 36: 23–29.
- Speck S., Courtiol A., Junkes C., Dathe M., Müller K., Schulze M., 2014. Cationic synthetic peptides: assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. *PLoS ONE* 9: e105949.
- Tejerina F., Buranaamnuay K., Saravia F., Wallgren M., Rodriguez-Martinez H., 2008. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology* 69: 1129–1138.
- Trzcińska M., Bryła M., Smoraż Z., 2011. Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 124: 90–97.
- Vazquez J. M., Martinez E. A., Martinez P., Garcia-Artiga C., Roca J., 1997. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47: 913–922.
- Vyt P., Maes D., Dejonckheere E., Castryck F., Van Soom A., 2004. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim* 39: 8–12.
- Vyt P., Maes D., Sys S.U., Rijsselaere T., Van Soom A., 2007. Air contact influences the pH of extended porcine semen. *Reprod Domest Anim* 42: 218–220.
- Waberski D., Henning H., Petrunkina A.M., 2011. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod Domest Anim* 46: 45–48.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych /artystycznych

### 5.1. Informacje ogólne o dorobku naukowo-publikacyjnym (bez publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy)

Efektom mojej dotychczasowej pracy badawczej jest współautorstwo 31 oryginalnych prac naukowych, z których 27 zostało opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora. Spośród nich, 17 pozycji stanowią publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Pozostałe oryginalne prace ukazały się w recenzowanych czasopismach ogólnokrajowych (14 publikacji). Mój dorobek obejmuje także współautorstwo 5 artykułów przeglądowych, w tym 4 w czasopismach z bazy JCR oraz 2 rozdziałów w opracowaniach książkowych. Wyniki prowadzonych badań były prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych (11 doniesień przed uzyskaniem stopnia doktora i 62 doniesienia po uzyskaniu stopnia doktora; 5 oryginalnych prac twórczych i 2 opracowania przeglądowe).

- Sumaryczny *impact factor* (IF) publikacji, liczony zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 22,243.
- Łączna liczba punktów za publikacje wg wykazu czasopism naukowych MNiSW, liczona zgodnie z rokiem ich opublikowania, wynosi 426, z czego 409 punktów przypada na okres po uzyskaniu stopnia doktora.



- Liczba cytowań publikacji wg bazy *Web of Science* wynosi 104 (bez autocytoowań – 91).
- Index Hirscha opublikowanych publikacji wg bazy *Web of Science* wynosi 6.

Szczegółowy wykaz prac naukowych oraz informacje o współpracy naukowej i popularyzacji nauki zawarto w Załączniku nr 4.

## 5.2. Główne kierunki badawcze i ich omówienie

W mojej działalności naukowo-badawczej i publikacyjnej, związanej głównie z oceną przebiegu czynności rozrodczych samców, wyróżnić można następujące kierunki badań:

1. Diagnostyczna ocena właściwości biologicznych plemników i zaburzeń ich stabilności podczas konserwacji nasienia.
2. Środowiskowe i genetyczne uwarunkowania przebiegu procesów rozrodu i jakości nasienia u samców zwierząt gospodarskich.
3. Identyfikacja czynników i markerów męskiej niepłodności – kompleksowa diagnostyka i mechanizmy uszkodzeń plemników mężczyzn.
4. Monitoring i regulacja procesów rozrodczych u samic zwierząt gospodarskich.

### 5.2.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

#### ***Diagnostyczna ocena właściwości biologicznych plemników i zaburzeń ich stabilności podczas konserwacji nasienia***

Moje zainteresowania naukowe skupiają się na jednym z głównych kierunków badań prowadzonych w Katedrze Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska. Związany jest on z zagadnieniami andrologii przede wszystkim dotyczącymi poszukiwania i doskonalenia metod oceny właściwości biologicznych plemników, które mogą zwiększyć efektywność technologicznych procedur konserwacji nasienia oraz kierowanego rozrodu zwierząt. Z tą tematyką związana była również moja praca doktorska, w której zająłem się określaniem wpływu rozcieńczalnika BTS (*Beltsville Thawing Solution*) przygotowanego z zastosowaniem wody destylowanej lub otrzymanej metodą odwróconej osmozy (*reverse osmosis*) na zmiany jakości oraz na zdolności zapładniające przechowywanego nasienia knurów. Kluczowe wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej opublikowano w formie oryginalnych prac w czasopismach specjalistycznych (Zał. 4: B7, B9, B10). Stwierdzono, że w nasieniu przechowywanym przez okres 4 dni w rozcieńczalniku BTS, niezależnie od rodzaju wody użytej do jego przygotowania, następował szeroki zakres zmian starzeniowych obniżających jakość nasienia, które nasilały się zwłaszcza w końcowym okresie konserwacji. Zmiany te przejawiały się znaczącą utratą integralności błony komórkowej (pomiar aktywności AAT), wzrostem uszkodzeń akrosomu, zaburzeniami aparatu ruchu i zdolności oksydoredukcyjnych mitochondriów (test NADH-NBT) plemników, a także destabilizacją niektórych parametrów (pH) środowiska zewnątrzkomórkowego gamet. Uzyskane wyniki wykazały, że rodzaj wody użytej do przygotowania rozcieńczalnika BTS może mieć znaczący wpływ na skalę i tempo niektórych zaburzeń plemników podczas konserwacji, a w konsekwencji na ich właściwości zapładniające. Podczas całego okresu konserwacji, w nasieniu przechowywanym w rozcieńczalniku przygotowanym z wykorzystaniem wody otrzymanej metodą odwróconej osmozy stwierdzano wyższy odsetek plemników poruszających się ruchem postępowym oraz z nieuszkodzonym akrosomem w odniesieniu do nasienia przechowywanego w rozcieńczalniku przygotowanym na bazie wody destylowanej (Zał. 4: B10). W badaniach nie stwierdzono znaczącego wpływu rodzaju wody użytej do przygotowania

rozcieńczalnika na zdolności oksydoredukcyjne mitochondriów plemników w czasie przechowywania nasienia, stwierdzono natomiast, że oprócz czasu konserwacji nasienia istotnym czynnikiem upośledzającym funkcję mitochondriów plemników może być etap rozrzedzania nasienia rozcieńczalnikiem BTS (Zał. 4: B7). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że unasiennianie loch nasieniem do rozrzedzania którego użyto wodę oczyszczaną systemem odwróconej osmozy skutkowało statystycznie istotnie wyższą ilością prosiąt urodzonych w miocie w porównaniu do samic inseminowanych nasieniem przygotowanym z zastosowaniem wody destylowanej (Zał. 4: B10). U loch unasiennianych nasieniem przechowywanym w rozcieńczalniku przygotowanym na bazie wody otrzymanej poprzez odwróconą osmozę stwierdzono także korzystniejsze kształtowanie się pozostałych analizowanych wskaźników użytkowości rozplodowej, indeksu inseminacyjnego, wskaźnika wyproszeń, wskaźnika wyproszeń po pierwszym zabiegu inseminacyjnym oraz liczby prosiąt odsadzonych z miotu. W przypadku jednak tych wskaźników różnice między badanymi wariantami rozcieńczalnika okazały się statystycznie nieistotne.

Przeprowadzona analiza zanieczyszczenia mikrobiologicznego ujawniła w ejakulatach i w nasieniu konserwowanym w rozcieńczalniku BTS obecność *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Staphylococcus aureus* oraz niezidentyfikowanych bakterii z rodzaju *Proteus* i *Pseudomonas* (Zał. 4: B9). W badaniach stwierdzono dużą zmienność osobniczą dotyczącą ilości i typów bakterii występujących w nasieniu natywnym i rozrzedzonym. Wykazano, że podczas czterech dni przechowywania w rozcieńczalniku BTS, w każdej kolejnej dobie konserwacji w nasieniu następował bardzo intensywny wzrost stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego, ogólnie bakteriami tlenowymi, jak również poszczególnymi typami bakterii (z wyjątkiem *E. coli*). Zmianom tym towarzyszył sukcesywny, znaczący spadek udziału procentowego plemników wykazujących ruch postępowy oraz komórek z nieuszkodzonym akrosomem. Po drugim dniu konserwacji w środowisku zewnątrzkomórkowym plemników stwierdzono także istotne statystycznie obniżenie się pH oraz wzrost aktywności AAT związany z zaburzeniami integralności błony komórkowej gamet. Uzyskane wyniki wskazywały na niewystarczające zabezpieczenie przechowywanego nasienia przed namnażaniem w nim bakterii oraz potrzebę modyfikacji komponentów bakteriostatycznych i/lub bakterioobójczych zastosowanych w rozcieńczalniku BTS.

W toku dalszych badań określono wrażliwość na różne antybiotyki wyizolowanych z nasienia knura szczepów z rodzaju *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* oraz dwa o nieustalonej przynależności gatunkowej), których obecność stwierdzono w każdej analizowanej próbce nasienia przechowywanego w rozcieńczalniku BTS (Zał. 4: B8). W badaniach wykazano, że antybiotyk gentamycyna zawarty w rozcieńczalniku nie hamował wzrostu pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*. Wszystkie badane szczepy bakterii odporne były ponadto na amoksycylinę, amoksycyline z kwasem klawulanowym, cefradynę, linkomycynę, neomycynę oraz streptomycynę. Stwierdzono, że aktywnymi antybiotykami w stosunku do wyizolowanych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* były jedynie imipenem i norfloksacyna.

Wyniki powyższych badań stały się inspiracją do realizacji kolejnych, które przyczyniły się do powstania prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego. Efektem realizowanych badań oraz zainteresowania problematyką związaną z opisywanym kierunkiem badawczym było również współautorstwo rozdziału książkowego dotyczącego biologii i konserwacji nasienia tryka (Zał. 4: B15) oraz pracy popularno-naukowej podkreślającej znaczenie sztucznego unasienniania w rozrodzie i efektywności produkcji trzody chlewnej (Zał. 4: B12).

### ***Środowiskowe i genetyczne uwarunkowania przebiegu procesów rozrodu i jakości nasienia u samców zwierząt gospodarskich***

Zagadnienia dotyczące uwarunkowań przebiegu procesów rozrodczych i jakości nasienia samców zwierząt od początku mojej działalności naukowej stanowiły podstawowy kierunek realizowanych przeze mnie badań. Związane z tą tematyką prace badawcze koncentrowały się przede wszystkim na wskazaniu czynników mogących wpływać na funkcję gonad i innych narządów rozrodczych, oraz na poszukiwaniu wskaźników jakości nasienia, które umożliwiałyby uzyskanie dokładniejszych informacji o rzeczywistych kompetencjach funkcjonalnych nasienia decydujących o sukcesie w reprodukcji.

W ramach badań nad czynnikami kształtującymi właściwości biologiczne nasienia knura wykazano, że genotyp oraz wiek samca mogą być czynnikami znacząco różnicującymi i wpływającymi na jakość ich nasienia. Stwierdzono, że w początkowym okresie użytkowania rozplodowego nasienie knurów mieszańców duroc × pietrain w porównaniu do ras czystych pbz i wbp, odznacza się większą koncentracją i ruchliwością plemników, ale mniejszą objętością ejakulatu i w efekcie istotnie niższą ogólną liczbą plemników w ejakulacie (Zał. 4: B1). W badaniach tych wykazano, że knury mieszańce osiągały największe przyrostyienne, natomiast należące do rasy wbp charakteryzowały się najwyższym indeksem selekcyjnym. Stwierdzono ponadto występowanie zależności między analizowanymi parametrami nasienia a cechami użytkowości tucznej i mięsnej knurów. Uzyskane wyniki wskazywały, że przy zachowaniu odpowiedniego tempa wzrostu masy ciała i mięsności, możliwe jest pozyskanie od młodych knurów nasienia o odpowiedniej jakości. W innej pracy badawczej potwierdzono, że nasienie młodszych knurów, do 12-go miesiąca życia, charakteryzować się może niższą jakością związaną z mniejszą objętością, niższą koncentracją i liczbą plemników ruchliwych w ejakulacie (Zał. 4: B20). W ejakulatach młodszych samców nie potwierdzono natomiast występowania zwiększonej ilości plemników obarczonych wadami morfologicznymi, a uzyskane wyniki wskazywały, że wraz z wiekiem knurów wzrastała w ich nasieniu liczba plemników z wadami morfologicznymi, które nie obejmowały uszkodzeń akrosomu. W badaniach tych nie stwierdzono jednoznacznych różnic w jakości nasienia między grupami genetycznymi. Niemniej u knurów mieszańców wielorasowych (linii 890 i linii 990), w odniesieniu do nasienia knurów czystych ras, odnotowano większą objętość ejakulatów, z ogólnie wyższą liczbą plemników ruchliwych, przy wysokim jednak udziale plemników z wadami morfologicznymi podrzędnymi. W celu dokładniejszego sprecyzowania wartości rozrodowej knurów rutynową ocenę wskaźników jakości nasienia poszerzono o badania składu biochemicznego plazmy nasienia. Stwierdzono ogólnie wysoką aktywność gamma-glutamylotranspeptydazy i fosfatazy zasadowej w plazmie nasienia, a uzyskane wyniki wskazywały na związane z wiekiem zmiany funkcjonalne w dodatkowych gruczołach płciowych knurów, o czym świadczyła obniżająca się aktywność, zwłaszcza fosfatazy zasadowej. Wykazano ponadto, że wzrost aktywności AAT w plazmie nasienia knurów związany może być z niższą liczbą plemników z ruchem postępowym w ejakulacie oraz z wyższym udziałem plemników z uszkodzonym akrosomem i/lub z podrzędnymi wadami morfologicznymi.

W badaniach dotyczących szczegółowej analizy obrazu morfologicznego plemników knurów wykazano, że najczęściej występującymi zmianami głównymi były kropla cytoplazmy w położeniu proksymalnym, a w dalszej kolejności niby-kropla w obrębie wstawki oraz zwężenie u podstawy główki plemnika (Zał. 4: B2). Dominującymi wadami podrzędnymi były z kolei kropla cytoplazmy w położeniu dystalnym oraz pojedyncza pętla witki plemnika. Uzyskane wyniki wskazywały m.in. na nadmierną eksploatację rozplodową niektórych, zwłaszcza starszych knurów (powyżej 12-go miesiąca życia), przyczyniającą się prawdopodobnie do skrócenia czasu dojrzewania plemników w najądrzu, a w efekcie do częstszego występowania plemników z kroplą cytoplazmy w ejakulatach. Dowiedziono także, że wysoki odsetek plemników z wadami morfologicznymi głównymi i/lub podrzędnymi w ejakulacie knura związany może być z występowaniem większej liczby plemników z uszkodzonym

akrosomem oraz zaburzeniami ruchliwości. W badaniach stwierdzono, że wyższy udział procentowy plemników z nieprawidłową budową morfologiczną oraz plemników z uszkodzeniami akrosomu występował w ejakulatach knurów rasy duroc i pbz w porównaniu do nasienia knurów rasy wbp, mieszańców pietrain i duroc oraz linii pic i p-76. W pracy stwierdzono ponadto, że ejakulatory knurów rasy duroc, w odniesieniu do nasienia pozostałych grup genetycznych, charakteryzowały się niższą objętością, koncentracją i ogólną liczbą plemników ruchliwych w nasieniu.

W ramach omawianego kierunku badawczego realizowałem również prace dotyczące wpływu dodatków żywieniowych na efektywność procesów reprodukcyjnych samców. W opracowaniu, którego byłem współautorem stwierdzono, że wydajność użytkowanych rozplodowo knurów zwiększyć można za pomocą odpowiedniej diety (Zał. 4: B21). W badaniach tych wykazano, że dodatek do paszy treściwej preparatu KR, który zawierał głównie susz z owoców, warzyw oraz kiełków zbożowych, korzystnie wpłynął na zmianę jakości nasienia knurów, przyczyniając się do zwiększenia objętości ejakulatów i ogólnej liczby plemników żywych w nasieniu.

Obniżenie płodności samców ma szeroką etiologię, na co wpływać może wiele czynników w tym również środowiskowe czynniki toksyczne. Stąd w prowadzonych na knurach badaniach podjęto próbę określenia zależności między jakością ich nasienia a stężeniem kadmu i ołowiu we krwi oraz w nasieniu (Zał. 4: B19). Wykazano, że zwiększone stężenie ołowiu w osoczu nasienia knurów może mieć związek z częstszym występowaniem podrzędnych wad morfologicznych plemników. Stwierdzono ponadto występowanie skorelowanych dodatnio zależności między stężeniem kadmu we krwi i w nasieniu, oraz skorelowanych ujemnie, między stężeniami kadmu a ołowiu w nasieniu knurów.

Moja dotychczasowa aktywność naukowo-badawcza obejmuje również prace eksperymentalne nad regulacją hormonalną procesów rozrodczych samców związaną z funkcjonowaniem receptorów androgenowych. Efektem tych prac było ujawnienie wysokiej wrażliwości plemników knura na działanie flutamidu i jego metabolitu hydroksyflutamidu (Zał. 4: A8). Związki te łącząc się z receptorami androgenowymi blokują możliwość działania androgenów. W badaniach prowadzonych na modelu *in vivo* oraz *in vitro* wykazano odpowiednio, niekorzystny wpływ flutamidu na ultrastrukturę plemników najądrzowych (transmisyjna mikroskopia elektronowa, TEM) oraz również niekorzystny, zależny od stężenia i czasu oddziaływania, wpływ hydroksyflutamidu na integralność (test SYBR-14/PI) i stabilność błony komórkowej (test z merocyjaniną 540, M540), a także zdolności oksydoredukcyjne mitochondriów (test NADH-NBT) plemników knura. Z kolei w badaniach dotyczących indukowanej eksperymentalnie (metoklopramidem) hiperprolaktynemii u szczurów wykazano, że modyfikacja profilu hormonalnego (wyższy poziom prolaktyny, przy obniżonym poziomie testosteronu w surowicy), w zróżnicowany sposób wpływa na zmiany w komórkach nabłonkowych poszczególnych płatów prostaty (Zał. 4: A10). W płatach grzbietowych i brzusznych stwierdzono spadek, natomiast w płatach bocznych wzrost ekspresji receptorów androgenowych w komórkach walcowatych nabłonka. Zaobserwowano, że hiperprolaktynemia nie miała wpływu na zmiany morfologiczne w komórkach nabłonkowych walcowatych brzusznych płatów prostaty, podczas gdy w nabłonku pozostałych płatów powodowała nieprawidłowości ultrastrukturalne mogące przyczyniać się do niepłodności zwierząt. Oddziaływanie androgenów, a także innych czynników wpływających na schorzenia prostaty opisano w pracy przeglądowej (Zał. 4: B14).

Realizując prace badawcze związane z omawianym kierunkiem, uczestniczyłem także w badaniach określających zmiany hormonalne zachodzące w okresie dojrzewania płciowego przepiórki japońskiej (Zał. 4: A14). Na podstawie zmian stężenia testosteronu w osoczu krwi stwierdzono m.in., że samce przepiórki rasy faraon pełną aktywność płciową osiągają w 8. – 9. tygodniu życia, a hormon ten odgrywa rolę w kontroli procesu dojrzewania u obu płci. Zaangażowany byłem w badania prowadzone na konikach polskich utrzymywanych na terenie Parku Natury Zalewu

Szczecińskiego, w których wykazano m.in. różnice między ogierkami a ogierami w zawartości selenu i aktywności peroksydazy glutationowej (GSHPx) w tkance jądrowej, sugerujące związek tych parametrów z procesami zależnymi od dojrzałości płciowej (Załącznik 4: A4).

### ***Identyfikacja czynników i markerów męskiej niepłodności – kompleksowa diagnostyka i mechanizmy uszkodzeń plemników mężczyźni***

Od wielu lat w mojej działalności naukowo-badawczej skupiałem się również na zagadnieniach związanych z męską niepłodnością. Badania w tym zakresie realizowałem w ramach współpracy z Zespołami badawczymi Katedry i Zakładu Histologii i Biologii Rozwoju Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie oraz Zakładu Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Problematyka podjętych badań koncentrowała się na diagnostyce i ustaleniu przyczyn występowania uszkodzeń plemników, które przeprowadzano na podstawie dodatkowych, niestosowanych w standardowym badaniu seminologicznym testów morfologicznej i funkcjonalnej oceny wstawki plemników oraz analizy integralności plemnikowego DNA (Załącznik 4: A13, A16, B3, B6). Badania dotyczyły także wpływu mediatorów stanu zapalnego układu moczowo-płciowego – bakterii i leukocytów, na uszkodzenia struktur subkomórkowych i funkcję plemników (Załącznik 4: A1, A3, A5, A9), oraz zagadnień związanych z eliminacją plemników przez komórki zapalne (Załącznik 4: A6).

Ze względu na ograniczoną wartość predykcyjną standardowej analizy seminologicznej, zwłaszcza w przypadkach trudnych klinicznie, istnieje potrzeba wprowadzania do badania nasienia mężczyźni nowych technik umożliwiających wnikliwą ocenę struktury i funkcji poszczególnych organelli plemnika. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono przydatność w postępowaniu diagnostycznym niepłodności męskiej zastosowanych testów, cytochemicznego NADH-NBT, cytofluorymetrycznego z JC-1, cytofluorymetrycznego TUNEL (znakowanie nacięć nici DNA przy użyciu terminalnej transferazy deoksynukleotydowej) oraz oceny ultrastrukturalnej za pomocą TEM (Załącznik 4: A13, A16, B3, B6). Wykazano zależności pomiędzy morfologicznymi, molekularnymi i funkcjonalnymi defektami wstawek plemników oraz uszkodzeniami ich chromatyny. W przypadkach asteno- i astenoteratozoospermii ujawniono występowanie w nasieniu m.in. zwiększonej liczby niedojrzałych form gamet, plemników z morfologicznymi cechami apoptozy i z nasiloną fragmentacją jądrowego DNA, a także wzrost obecności konglomeratów zawierających niekiedy już częściowo zdegradowane struktury plemników (Załącznik 4: A13, B3, B6). Uzyskane rezultaty wykazały różne przyczyny obniżenia ruchliwości plemników mężczyźni. Oprócz przypadków związanych z uszkodzeniami struktur aparatu ruchu (np. grubych włókien obwodowych, osłonki włóknistej i aksonemy) oraz będących efektem zaburzeń energetycznych mitochondriów w morfologicznie prawidłowych wstawkach, stwierdzono i opisano takie, w których niska ruchliwość plemników w nasieniu nie była spowodowana dysfunkcją mitochondriów. Wynikała ona z obecności aktywnych mitochondriów (również nadliczbowych w osłonce mitochondrialnej) z prawidłowymi zdolnościami oksydoredukcyjnymi i wysokim  $\Delta\Psi_m$ , które obserwowano w nieprawidłowych morfologicznie wstawkach zarówno zróżnicowanych plemników, jak i w niedojrzałych formach plemników (Załącznik 4: B3, B6). W badaniach dowiedziono ponadto, że przy obniżonej ruchliwości plemników, w nasieniu mężczyźni dochodzić może do nasilonego uszkodzenia chromatyny plemników przejawiającego się zaburzeniami jej kondensacji i fragmentacją jądrowego DNA (Załącznik 4: A13, B6). Uzyskane rezultaty wskazywały, że astenozoospermia może być efektem zaburzeń morfogenezy plemników prowadzących do występowania w nasieniu komórek z defektami chromatyny i/lub z nieprawidłowo wykształconą wstawką, która zawiera mitochondria z niekoniecznie upośledzoną funkcją (Załącznik 4: A13, B3, B6). Możliwość występowania obniżonej integralności strukturalnej chromatyny plemników wykazano także w nasieniu mężczyźni z normozoospermią (Załącznik 4: A16).

W badaniach tych stwierdzono powiązania nieprawidłowej budowy morfologicznej gamet ze wzrostem fragmentacji DNA plemników. Ocena w TEM wskazywała natomiast, że niewłaściwa organizacja materiału genetycznego plemników może być konsekwencją molekularnych zaburzeń procesów przebudowy jądra podczas spermiogenezy.

Do wyjaśnienia patogenyzy procesów związanych z infekcją bakteryjną nasienia w części badań (Zał. 4: A3, A5, A9) wykorzystano wyizolowane z ejakulatów szczepy bakterii, uropatogenny *E. coli* (serotyp O75:NHT) oraz dwa szczepy potencjalnie patogenne, tlenowy *Staphylococcus* (*S.*) *haemolyticus* i beztlenowy *Bacteroides* (*B.*) *ureolyticus*. W badaniach *in vitro* wykazano negatywny wpływ poszczególnych szczepów bakterii na ejakulowane plemniki (Zał. 4: A9). Przejawiał się on znaczącym obniżeniem stabilności błony komórkowej plemników (test z merocyjaniną 540, M540), a w przypadku *B. ureolyticus* również żywotności plemników (test SYBR-14/PI). Stwierdzono, że obecność zwłaszcza szczepów *E. coli* i *B. ureolyticus* przyczynia się do dysfunkcji mitochondriów plemników (test z JC-1 i test NADH-NBT). Ocena w mikroskopie świetlnym oraz elektronowym skaningowym (SEM) ujawniła właściwości adhezyjne wszystkich zastosowanych szczepów bakterii względem plemników, a w przypadku *E. coli* również specyficzny sposób kontaktu z gametami męskimi poprzez fimbrie. W dalszych badaniach uszczegółowiono obraz destrukcyjnego wpływu szczepów bakteryjnych na błonę komórkową plemników (Zał. 4: A5). Stwierdzono, że zastosowane szczepy bakterii, oprócz obniżenia ruchliwości, powodowały znaczące zaburzenia architektury dwuwarstwy lipidowej błon, uszkodzenia oksydacyjne lipidów błon plazmatycznych oraz obniżenie funkcji błony komórkowej plemników (określanych odpowiednio na podstawie testu z M540, stężenia dialdehydu malonowego, MDA w lizatach komórkowych oraz testu HOS). W badaniach wykazano, że czynnik bakteryjny istotnie statystycznie obniża zdolność plemników do penetracji oocytów chemicznych (*sperm penetration assay*, test SPA), a ponadto, że dodatkowa obecność leukocytów w nasieniu może znacząco nasilać procesy peroksydacyjne błon plazmatycznych plemników, a w efekcie także zmniejszać ich potencjał zapładniający w teście SPA. Na podstawie uzyskanych wyników, po raz pierwszy udokumentowano i dowiedziono występowanie zależności pomiędzy zmianami w błonach biologicznych plemników w środowisku zapalnym a ich funkcją biologiczną w warunkach *in vitro*. W badaniach podjęto także próbę wyjaśnienia przebiegu procesu obumierania plemników ekspozowanych na czynniki stanu zapalnego (Zał. 4: A3). Analizując markery śmierci komórkowej stwierdzono, że wszystkie zastosowane szczepy bakterii znacząco przyczyniły się do obniżenia odsetka plemników z prawidłowym  $\Delta\Psi_m$ , a w przypadku *S. haemolyticus* i *B. ureolyticus* do jednoczesnego wzrostu liczby plemników z translokacją fosfatydyloseryny w błonach komórkowych (test z aneksyną V). Wykazano, że ekspozycja plemników na oba te szczepy bakteryjne, osobno bądź w koinkubacji z leukocytami, powodowała wzrost fragmentacji DNA (test TUNEL), zarówno w plemnikach żywych – apoptycznych, jak i martwych – nekrotycznych. Uzyskane wyniki wskazywały, że mediatory zapalne, bakterie i/lub leukocyty, mogą indukować jednocześnie apoptozę i nekrozę w ejakulowanych plemnikach ludzkich, przy czym proapoptyczny i pronekrotyczny wpływ potencjalnie patogennych bakterii może być silniejszy niż szczepów patogennych (*E. coli* serotyp O75:NHT). W toku dalszych badań opisane wyżej wyniki w modelu *in vitro*, weryfikowano na nasieniu mężczyzn z normozoospermią (w zakresie koncentracji, ruchliwości i morfologii plemników), z bezobjawową bakteriospermią i/lub leukocytoospermią *in situ* (Zał. 4: A1). W nasieniu większości (70%) mężczyzn ujawniono obecność na poziomie patologicznym mediatorów stanu zapalnego, przy stosunkowo częstej izolacji bakterii beztlenowych. Na podstawie przeprowadzonej kompleksowej analizy wielu wskaźników seminologicznych w badaniach wykazano i udokumentowano, po raz pierwszy u młodych zdrowych mężczyzn z normozoospermią, szkodliwy wpływ bakteriospermii i/lub leukocytoospermii na parametry subkomórkowe plemników. Stwierdzono, że bakteriospermia i leukocytoospermia niekorzystnie oddziaływały na koncentrację, ruchliwość i morfologię plemników. Zbyt wysoka liczba bakterii w nasieniu przyczyniała się m.in. do obniżenia  $\Delta\Psi_m$  i zdolności

oksydoredukcyjnych mitochondriów plemników, do spadku stabilności (test M540) przy wzroście eksternalizacji fosfatydyloseryny w błonie komórkowej gamet oraz do zwiększenia fragmentacji DNA w żywych i martwych plemnikach. Przeprowadzone badania wykazały, że bakterie uczestniczą głównie w wewnętrznych mechanizmach śmierci komórkowej plemników zależnych od mitochondriów. Ponadto wykazano, że oznaczanie stężenia MDA w lizatach komórkowych, a nie w plazmie nasiennej, może stanowić lepszy biomarker stanów stresu oksydacyjnego związanego z leukocytospermią.

W innych badaniach ujawniono, że przy leukocytospermii zaktywowane leukocyty są zdolne do uruchamiania i przeprowadzania procesów usuwania ejakulowanych plemników w drodze różnych mechanizmów (Zał. 4: A6). Na podstawie badań mikroskopowo-elektronowych (SEM) wykazano, że oprócz tradycyjnej fagocytozy, komórki zapalne mogą eliminować plemniki przez uwalnianie do przestrzeni pozakomórkowej specyficznych struktur, sieci zewnątrzkomórkowych (*extracellular traps*, ET). Są one formowane z niektórych składników komórkowych (m.in. DNA, histonów oraz innych bójczych molekuł białkowych) po uprzedniej dekondensacji chromatyny i przerwaniu ciągłości błon plazmatycznych leukocytów, co wiąże się z wejściem pobudzonych komórek zapalnych w program śmierci nazwany etozą. Przeprowadzone obserwacje ultrastrukturalne wykazały, że wyrzucone ET lokalnie powodują uwięzienie w nich plemników przyczyniając się następnie prawdopodobnie do dezintegracji gamet. Uzyskane w pracy wyniki po raz pierwszy ujawniły, że komórki zapalne w ludzkim nasieniu mogą przeprowadzać eliminację plemników równocześnie w drodze fagocytozy i etozy. Wykazano ponadto, że oba procesy nasilają się w obecności czynnika bakteryjnego, uropatogennego szczepu *E. coli*.

Należy podkreślić, że przedstawione powyżej badania reprezentują nie tylko wartość diagnostyczną i prognostyczną, ale również poznawczą. W związku z tym, zarówno zastosowane metody badawcze jak i uzyskane rezultaty, mogą być pomocne w identyfikacji etiopatogenezy niepłodności męskiej oraz wykorzystane w pracach klinicznych i doświadczalnych.

Poza wyżej opisanymi pracami eksperymentalnymi jestem współautorem 2-ch prac przeglądowych podsumowujących aktualną wiedzę na temat zaburzeń procesów związanych z protaminacją chromatyny plemników (Zał. 4: A18, A19), pracy przeglądowej dotyczącej apoptycznej eliminacji komórek gametogenicznych podczas spermatogenezy (Zał. 4: A20), a także rozdziału książkowego stanowiącego kompilację wiedzy i oryginalnych badań współautorskich dotyczących znaczenia diagnostyki morfologicznej plemników (Zał. 4: B11).

### ***Monitoring i regulacja procesów rozrodczych u samic zwierząt gospodarskich***

W mojej dotychczasowej działalności naukowej uczestniczyłem w pracach badawczych dotyczących regulacji procesów rozrodczych u samic zwierząt gospodarskich. Zaangażowałem się w badania związane ze zjawiskiem sezonowości rozrodu, interesującym pod względem poznawczym, ale ważnym również w aspekcie praktycznym. U niektórych gatunków zwierząt gospodarskich, u których sezonowość rozrodu przejawia się w największym stopniu, istnieją możliwości pełniejszego wykorzystania ich potencjału rozrodczego. Stąd w badaniach prowadzonych na kozach i owcach oceniano możliwości regulacji procesów rozrodczych określając i porównując zmiany zachodzące podczas synchronizowanej hormonalnie rui w sezonie i poza sezonem rozrodczym (Zał. 4: A11, A17, B5, B18, C4, C5). W badaniach na kozach wykazano, że mimo zastosowania tej samej metody synchronizacji rui występują istotne różnice sezonowe (jesień vs. wiosna) w przebiegu okresu okołooowulacyjnego dotyczące zarówno nasilenia objawów rujowych, jak i stężenia we krwi obwodowej jajnikowych hormonów steroidowych ( $17\beta$ -estradiolu,  $E_2$  i progesteronu,  $P_4$ ), melatoniny (MEL), prolaktyny (PRL) oraz wolnej tyroksyny ( $FT_4$ ) (Zał. 4: A17). Stwierdzono, że po

synchronizowanej rui zmiany stężenia MEL w sezonie i poza sezonem rozrodczym, w tym okołodobowe różnice uwalniania tego hormonu są powiązane z wydzielaniem  $E_2$  i  $FT_4$ . Uzyskane wyniki wskazywały na znaczący udział PRL i  $FT_4$  w sezonowej regulacji przebiegu procesów rozrodczych u kóz.

Trudności związane z wykrywaniem rui, a także występowanie nieprawidłowości w przebiegu rozrodu samic przyczyniły się do przeprowadzenia badań dotyczących kontroli procesów rozrodczych kóz. Wykazano w nich, że określanie stężenia  $P_4$  w krwi obwodowej może mieć większą przydatność w monitorowaniu funkcjonalnej aktywności jajnika niż ocena pomiarów  $E_2$  (Zał. 4: B5). Stwierdzono także możliwość wykorzystania metody immunofluorescencyjnej jako metody alternatywnej do radioimmunologicznej w oznaczaniu progesteronu u kóz (Zał. 4: A11). Ponadto wykazano, że analiza zmian stężeń tego hormonu pozwala nie tylko na monitorowanie prawidłowego przebiegu cyklu jajnikowego, ale również jest pomocna w sygnalizowaniu nieprawidłowości takich jak obecność cyst jajnikowych. Dzięki temu możliwe jest wczesne wykrycie tych zaburzeń i podjęcie właściwego leczenia. Uzyskane rezultaty dowiodły też dużej wartości diagnostycznej ultrasonografii transrektalnej w kontroli cyklu jajnikowego kóz. Analiza obrazu ultrasonograficznego pozwoliła określić czas owulacji, czas trwania kolejnych faz cyklu jajnikowego, oraz potwierdzić ewentualne stany patologiczne. W innej pracy, na podstawie stwierdzonych zmian procentowego udziału poszczególnych typów komórek nabłonkowych w śluzie pochwowym, wykazano przydatność oceny indeksu kariopyknozy w monitorowaniu faz cyklu rujowego u kóz (Zał. 4: B18).

Efektom badań przeprowadzonych na owcach było wskazanie, na podstawie analizy stężeń  $P_4$ ,  $E_2$  i hormonu luteinizującego (LH), optymalnego momentu krycia u maciorek rasy suffolk (tj. 1. i 2. krycie odpowiednio w około 41 i w 53 godzinie) po zastosowaniu stymulacji progestagenowej wraz z iniekcją eCG (gonadotropina surowicy ciężarnych kłaczy; PMSG) (Zał. 4: C4). Wskazano metody synchronizacji rui u owiec charakteryzujące się najwyższą skutecznością pod względem płodności i plenności oraz przedstawiono przydatność oznaczeń stężenia  $P_4$  do wczesnej diagnozy ciąży (Zał. 4: C5). W innych badaniach wykazano, że właściwe zaopatrzenie owiec w selen, w formie dodatku drożdży selenowych do paszy, wpływa na poprawę wskaźników reprodukcyjnych, płodności i plenności, oraz na zmniejszenie śmiertelności jagniąt. Rezultatem zastosowania dodatku selenu były również większa masa urodzeniowa jagniąt i wyższe dzienne przyrosty masy ciała jagniąt do 90. dnia odchowu (Zał. 4: A7).

Zagadnienia związane z problematyką regulacji i kontroli procesów rozrodczych u samic przedstawiono w pracach przeglądowych i popularno-naukowych (Zał. 4: A21, B13, B16, B17, C3).

W ramach badań nad procesami rozrodczymi u samic zwierząt gospodarskich uczestniczyłem również w pracach doświadczalnych związanych z określaniem potencjału rozrodczego pęcherzyków jajnikowych oraz oceną ich statusu biochemicznego podczas folikulogenezy i oogenezy. Rezultaty tych prac wykazały, że skład biochemiczny płynu pęcherzyków jajnikowych zmienia się wraz z rozwojem i wzrostem pęcherzyka, co może wynikać z modyfikacji m.in. aktywności steroidogennej w metabolizmie komórek pęcherzyka, i może być uwarunkowane wpływem pory roku (Zał. 4: A2, A12, A15, B4). W badaniach prowadzonych na bydłowych pęcherzykach jajnikowych stwierdzono, że w czasie rozwoju pęcherzyka w płynie folikularnym następuje znaczący bardzo intensywny wzrost stężenia  $E_2$  oraz spadek poziomu  $FT_4$  (Zał. 4: B4, A15). Odnotowano także mniej intensywny, przy czym istotny statystycznie wzrost stężenia glukozy, wskazujący na zwiększające się zapotrzebowanie na energię podczas rozwoju pęcherzyków oraz duże znaczenie glukozy w dojrzewaniu oocytu. W płynie pęcherzykowym nie stwierdzono zależnych od wielkości pęcherzyków jajnikowych zmian w stężeniu  $P_4$ , wolnej trójiodotyroniny ( $FT_3$ ), wapnia, cholesterolu oraz frakcji lipoprotein wysokiej gęstości. Wykazano wpływ pory roku na zawartość  $FT_3$  i cholesterolu w płynie pęcherzykowym oraz utrzymywanie się w nim wyższego poziomu  $FT_3$  niż  $FT_4$ , niezależnie od wielkości pęcherzyków



jajnikowych i pory roku. Uzyskane wyniki wskazywały na istotny udział wolnych frakcji jodotyronin w procesie folikulogenezy i istnienie związku pomiędzy tymi hormonami a metabolizmem cholesterolu na poziomie pęcherzyka jajnikowego krwi. Wyniki badań przeprowadzonych na trzodzie chlewnej potwierdziły występowanie zależnych od pory roku zmian w aktywności jajników u tego gatunku zwierząt (Zał. 4: A12). Oprócz znaczących różnic masy i wskaźników morfometrycznych jajników loszek stwierdzonych pomiędzy poszczególnymi porami roku, wykazano różnice w stężeniu hormonów steroidowych w płynie pęcherzyków jajnikowych, które świadczyły o sezonowym przebiegu pęcherzykowej aktywności steroidogennej z większym jej nasileniem w okresie zimowym i mniejszym w okresie letnim. Najwyższe stężenia estradiolu, testosteronu oraz progesteronu stwierdzono w pęcherzykach jajnikowych ocenianych w okresie zimowym. W badaniach wykazano ponadto występowanie znacząco wyższego stężenia tyroksyny w płynie pęcherzykowym w okresie zimowym i jesiennym. Uzyskane wyniki dowodziły, że w jajnikach świni również jodotyroniny mają istotny wpływ na funkcję pęcherzyka jajnikowego. W niedawno podjętych badaniach określono stężenie magnezu, wapnia i fosforu w płynie pęcherzyków jajnikowych różnej wielkości u kłaczy (Zał. 4: A2). Nowatorskim elementem przeprowadzonych badań było uwzględnienie wpływu sezonu rozrodczego na skład jonowego płynu folikularnego. Wykazano, że w okresie letniej aktywności płciowej stężenie magnezu i wapnia w płynie pęcherzykowym jest statystycznie istotnie niższe niż zimą, oraz że poziom stężenia wszystkich analizowanych makroskładników w czasie sezonu rozrodczego jest znacząco zależny od stadium folikulogenezy. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki stanowią uzupełnienie badań nad aktywnością sekrecyjną komórek pęcherzyków jajnikowych u poszczególnych gatunków, a informacje dotyczące stwierdzonych zależności pomiędzy analizowanymi składnikami w płynie pęcherzykowym mogą zostać wykorzystane w opracowywaniu składu mediów hodowlanych dla komórek somatycznych pęcherzyka oraz w procedurze dojrzewania oocytów *in vitro*.

*Dariusz Gączarzewicz*