

## Wybrane metody oceny kriokonserwowanego nasienia knura\*

Monika Trzcńska, Magdalena Bryła

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa; monika.trzcńska@izoo.krakow.pl*

Stosowanie zabiegów inseminacji świń na coraz szerszą skalę wpłynęło na rozwój badań w kierunku efektywniejszego wykorzystania nasienia knurów o szczególnie wysokich parametrach w zakresie cech tucznych i rzeźnych. Do zabiegów inseminacyjnych najczęściej stosowane jest nasienie bezpośrednio po pobraniu lub po kilkudniowym przechowywaniu w temperaturze 15–17°C (Johnson i in., 2000). Zastosowanie do inseminacji mrożonego nasienia knura jest nadal ograniczone i kształtuje się na poziomie poniżej 1% ogólnej liczby wykonywanych zabiegów inseminacyjnych. Niskie wskaźniki rozrodu uzyskiwane po inseminacji loch nasieniem mrożonym wynikają głównie z faktu, że błona komórkowa plemników knura charakteryzuje się dużą podatnością na uszkodzenia kriogeniczne (Großfeld i in., 2008). Plemniki knura w porównaniu z plemnikami samców innych gatunków zwierząt mają niską tolerancję na procesy zamrażania i rozmrażania. Procedura kriokonserwacji nasienia w dużym stopniu narusza działanie systemu endogennych antyoksydantów i w konsekwencji prowadzi do obniżenia ruchliwości plemników, uszkodzenia błon plazmatycznych oraz wzrostu odsetka plemników wykazujących zmiany apoptotyczne.

Pierwsze próby mrożenia nasienia ssa-ków podejmowane były w XVIII i XIX wieku, ale dopiero w XX w. opracowano skuteczne metody kriokonserwacji nasienia buhaja (Polge i Rowson, 1952) oraz nasienia ogiera (Polge, 1957). W 1957 r. natomiast, zespół Hessa po raz pierwszy uzyskał prosięta po inseminacji loch rozmrożonym nasieniem knura. Prowadzone przez kolejne lata intensywne badania nad skuteczną i powtarzalną metodą kriokonserwacji nasienia knura doprowadziły do opracowania dwóch metod: amerykańskiej (Pursel i Johanson, 1975) oraz niemieckiej (Westendorf i in., 1975). Od tego czasu wiele zespołów badawczych podejmowało próby zwiększenia skuteczności kriokonserwacji nasienia knura poprzez modyfikację składu rozrzedzalnika mrożeniowego, jak i opracowanie technologicznych procedur postępowania z nasieniem.

W Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB prowadzone są intensywne badania zarówno nad doskonaleniem techniki kriokonserwacji nasienia knura, jak również zastosowaniem nowoczesnych metod oceny jakości plemników przed i po procedurze kriokonserwacji. Stosowane powszechnie testy oparte na ocenie koncentracji nasienia, odsetka plemników ruchliwych i rodzaju ich ruchu pozwalają jedynie na eliminację ejakulatów ewidentnie nieprzydatnych do mrożenia i inseminacji. Dlatego, prowadzone są intensywne badania nad wprowadzeniem do oceny plemników knura zmian apoptotycznych jako nowego kryterium umożliwiającego precyzyjne określenie ich jakości i zdolności zapładniających.

---

\*Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

### Ocena podstawowych parametrów jakości nasienia knura

Diagnostyka laboratoryjna nasienia obejmuje ocenę makroskopową (objętość ejakulatu, zapach i barwa) oraz ocenę mikroskopową (morfologia, koncentracja oraz ruchliwość plemników). Jednym z podstawowych kryteriów oceny mikroskopowej jest badanie morfologiczne plemników wykonywane przy użyciu mikroskopu świetlnego na preparatach barwionych. Do najbardziej popularnych metod barwienia należą: różnicujący barwnik nigrozynowo-eozynowy (O'Connel i in., 2002), barwnik gienzy (Nizański, 2006), Papanicolaou (Coetzee i in., 2001), Spermac® (Chong i in., 1983) oraz Diff-Quick (Coetzee i in., 2001). Jako kryterium stosuje się klasyfikację przedstawioną przez Bloma (1981), dzielącą wszystkie anomalie plemników na wady główne i podrzędne. Do wad głównych plemników zalicza się m.in. formy niedojrzałe, plemniki podwójne, „bezglówce”, gruszkowate, z kroplą protoplazmy w położeniu bliższym, czy zwinięte w pętli witki. Mianem wad podrzędnych określa się natomiast inne odchylenia w formach plemników, m.in.: małe lub olbrzymie główki, pojedyncze pętle lub zagięcia na witce, obecność kropli protoplazmatycznej w położeniu dalszym. Ocena morfologii plemników umożliwia wykrycie zmian w podstawowej budowie plemnika lub jego strukturze wewnętrznej (wady główne) oraz wad zlokalizowanych w aparacie ruchu plemnika lub błonach powierzchniowych (wady podrzędne).

Ejakulat kwalifikuje się do konserwacji w stanie mrożonym, jeśli odsetek plemników prawidłowych morfologicznie jest nie mniejszy niż 80%, a odsetek wad głównych i podrzędnych nie przekracza, odpowiednio: 5% i 10%. Z badań przeprowadzonych przez Ron-El i in. (1991) wynika, że obecność wad morfologicznych plemników obniża współczynnik zapłodnialności. Bonde i in. (1998) potwierdzili istotny wpływ odsetka plemników z wadami morfologicznymi na wynik unasienniania.

Koncentracja plemników w jednostce objętości jest określana przy pomocy urządzeń komputerowych: cytometrów przepływowych, spektrofotometrów lub komór hemocytometrycznych (Nizański, 2006). Do kriokonserwacji stosuje się frakcję gęstą ejakulatu knura, w której koncentracja

plemników waha się od 500 do 800x10<sup>6</sup>/ml.

Ruchliwość plemników jest jedną z podstawowych właściwości, która bezpośrednio określa ich funkcję. To właśnie dzięki zdolności ruchu plemniki mogą przemieszczać się przez drogi rodne samicy oraz penetrować osłonkę przejrzystą komórki jajowej (Aitken i in., 1985). Coraz częściej oprócz subiektywnej oceny mikroskopowej ruchliwości stosuje się specjalne urządzenia komputerowe – *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA), które umożliwiają szybką, obiektywną ocenę dużej ilości gamet. Dzięki systemowi CASA możliwa jest precyzyjna ocena odsetka plemników ruchliwych, w szczególności odsetka plemników o ruchu postępowym oraz dokładne określenie właściwości ruchu (ruch szybki, umiarkowany, wolny). Ponadto, CASA umożliwia wizualizację toru ruchu indywidualnych plemników, co pozwala na opis parametrów związanych z prędkością i rodzajem ruchu. Jednocześnie, komputerowa analiza pozwala na ocenę morfologiczną i morfometryczną plemników. Po raz pierwszy zależność pomiędzy ruchem plemników ocenianych systemem CASA a płodnością została wykazana na nasieniu ludzkim (Aitken i in., 1982, 1985).

Ze względu na zmienność osobniczą w zamrażalności nasienia knurów, wprowadza się dodatkową selekcję osobników na podstawie ruchliwości plemników ocenianej po rozmrożeniu. Roca i in. (2006) dzielą knury na trzy grupy o wysokiej („*good freezers*”), średniej („*moderate freezers*”) oraz niskiej („*poor freezers*”) przydatności do mrożenia, u których ruchliwość plemników po rozmrożeniu wynosi odpowiednio >60%, 40–60% oraz <40%. Użycie do inseminacji mrożonego nasienia knurów z pierwszej grupy pozwala na uzyskanie wyższego wskaźnika płodności (53,8%) w porównaniu z wynikami uzyskanymi po inseminacji nasieniem o niższej jakości (26,3%) (Casas i in., 2009). Jednocześnie, badania przeprowadzone przez Hernández i in. (2007) wykazały, że dodatek do rozcieńczalnika mrożeniowego 5% plazmy nasienia knurów o wysokiej jakości nasienia zmniejsza wrażliwość plemników na szok chłodowy. Najnowsze badania przeprowadzone przez Fernández-Gago i in. (2016) wykazały, że 4-godzinna inkubacja plemników po rozmrożeniu w rozrzedzalniku z dodat-

kiem 50% plazmy nasienia wpływa korzystnie na jakość rozmrożonych plemników.

Istotnym parametrem jakościowym plemników jest ocena stanu błony akrosomalnej. Wszelkie zaburzenia integralności lub uszkodzenia błony akrosomu plemnika mogą obniżać skuteczność zapłodnienia. Integralność akrosomu jest oceniana z wykorzystaniem lektyn roślinnych, m.in. pochodzących z orzeszków ziemnych (PNA), grochu zwyczajnego (PSA) lub czarnej fasoli (ConA). Najczęściej stosuje się lektynę PNA, która łączy się z resztami  $\beta$ -galaktozowymi zewnętrznej błony akrosomalnej (Silva i Gadella, 2006). Z lektyną mogą być skoniugowane różne barwniki fluorescencyjne, m.in.: izotiocyanian fluoresceiny (FITC) (Maxwell i Johnson, 1997), AlexaFluor® (Silva i Gadella, 2006), fikoerytryna (PE) (Partyka i in., 2010). Użycie ww. barwników z dodatkowym zastosowaniem jodku propydy (PI) umożliwia wyodrębnienie subpopulacji plemników żywych i martwych z prawidłowym lub uszkodzonym akrosomem (Bryła i Trzcńska, 2014; Trzcńska i Bryła, 2015). W procesie kriokonserwacji dochodzi do formowania kryształków lodu, które mogą indukować zmiany w ciągłości błony akrosomalnej. Ponadto, obniżenie temperatur podczas mrożenia powoduje wzrost stężenia jonów wapnia, wpływ innych jonów oraz egzocytozę zawartości akrosomu (Ozkavukcu i in., 2008). Dokładna analiza stanu akrosomów po procedurze kriokonserwacji przy zastosowaniu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) ujawniała powstawanie przestrzeni między błoną plazmatyczną plemnika a zewnętrzną błoną akrosomalną, co świadczy o utracie ciągłości akrosomu (Rodriguez-Martinez i in., 1993). Z badań własnych wynika, że zastosowanie butylowanego hydroksytoluenu jako dodatku do rozcieńczalnika mrozeniowego umożliwia uzyskanie po rozmrożeniu ponad 60% plemników z integralną błoną akrosomalną (Trzcńska i in., 2015).

### **Ocena zmian apoptotycznych w plemnikach knura**

Z uwagi na specyficzną budowę plemnika przy ocenie zmian apoptotycznych nie można opierać się wyłącznie na cechach morfologicznych, charakterystycznych dla komórek soma-

tycznych, lecz należy skoncentrować się na zmianach biochemicznych. Cechą charakterystyczną wczesnych stadiów apoptozy jest niewielka zmiana w przepuszczalności błony komórkowej. Mikropory powstające w zewnętrznej warstwie błony można identyfikować przy wykorzystaniu fluorochromu YO-PRO-1 (Bryła i Trzcńska, 2012; Trzcńska i in., 2008). Fluorochrom dyfunduje przez mikropory/mikrokanały w plazmolemnie i łączy się z DNA komórki, podczas gdy sama błona komórkowa ma jeszcze zachowaną strukturalną integralność. Dodatkowe zastosowanie w tej metodzie jodku propydy (PI) umożliwia detekcję komórek nekrotycznych. Podczas przeprowadzania analizy w mikroskopie fluorescencyjnym można wyróżnić trzy subpopulacje plemników. Pierwszą z nich stanowią plemniki żywe (YO-PRO-1<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), które nie emitują fluorescencji, drugą plemniki apoptotyczne YO-PRO-1-pozytywne (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), fluoryzujące na zielono oraz trzecią plemniki martwe, nekrotyczne, emitujące zarówno zieloną, jak i czerwoną fluorescencję (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Metodą pozwalającą na relatywnie wczesną diagnostykę apoptozy jest wykrywanie reszt fosfatydyloseryny na powierzchni błony cytoplazmatycznej za pomocą aneksyny V sprzężonej z izotiocyanianem fluoresceiny (ang. *fluorescein isothiocyanate*; FITC). W czasie apoptozy zachodzi translokacja fosfatydyloseryny z powierzchni wewnątrzkomórkowej na zewnętrzną. Aneksyna V w obecności jonów  $Ca^{2+}$  łączy się z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, takimi jak fosfatydyloseryna, dzięki czemu stosuje się ją jako marker apoptozy. Oznaczanie na powierzchni błony komórek reszt PS przy użyciu aneksyny V sprzężonej z FITC oraz weryfikacja stopnia przepuszczalności błony plazmatycznej dla PI, barwiącego DNA i RNA komórek o zaburzonej integralności błony, umożliwia odróżnienie plemników żywych, nieapoptotycznych (aneksyna V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) od wczesnoapoptotycznych (aneksyna V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) oraz wczesnonekrotycznych (aneksyna V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), a także od plemników martwych (nekrotycznych) (aneksyna V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>). Wyznakowane aneksyną V-FITC plemniki emitujące – zieloną, a barwiące się jodkiem propydy – czerwoną fluorescencję można analizować w mikroskopie fluorescencyjnym (Bryła i Trzcńska, 2014). W badaniach własnych

(niepublikowanych) do kriokonserwacji przeznaczono 25 ejakulatów pochodzących od knurów różnych ras. Wszystkie ejakulatory spełniały podstawowe kryteria selekcyjne: 80% plemników ruchliwych oraz 80% plemników prawidłowych morfologicznie. Dodatkowo, przed procedurą kriokonserwacji przeprowadzono ocenę zmian apoptotycznych za pomocą barwienia YO-PRO-1/PI oraz Annexin-V-FITC/PI. W ejakulatach, u których odsetek plemników apoptotycznych (YO-PRO-1<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>, aneksyna V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) wyniósł nie więcej niż 4%, po rozmrożeniu uzyskiwano około 66% plemników wykazujących ruch postępowy. Tymczasem, w ejakulatach z odsetkiem plemników apoptotycznych wynoszącym 25% po rozmrożeniu stwierdzono około 49% plemników ruchliwych. Wzrost odsetka plemników apoptotycznych podczas kriokonserwacji można zredukować poprzez dodatek antyoksydantów do rozcieńczalnika mroźniowego (Trzcńska i Bryła, 2015; Trzcńska i in., 2015).

W czasie procesu apoptozy dochodzi do otwarcia megakanałów mitochondrialnych i spadku mitochondrialnego potencjału transbłonowego. Mitochondria plemnika, dzięki zdolności do produkcji energii – w procesie fosforylacji oksydacyjnej – umożliwiają ruch postępowy plemnika, stając się strukturami określającymi zdolność plemników do zapłodnienia komórki jajowej. Do pomiaru zmian potencjału mitochondrialnego może służyć barwnik JC-1, który w żywych plemnikach gromadzi się w mitochondriach w postaci agregatów widocznych w mikroskopie fluorescencyjnym jako czerwono-pomarańczowa fluorescencja, natomiast w plemnikach apoptotycznych i nekrotycznych o zdepolaryzowanej błonie mitochondrialnej gromadzi się w formie monomerycznej, widocznej w postaci zielonej fluorescencji. Badania własne (Trzcńska i in.,

2008) na plemnikach knura wykazały pozytywną korelację pomiędzy ruchem, spadkiem potencjału mitochondrialnego a odsetkiem plemników apoptotycznych.

Energia produkowana przez mitochondria umożliwia również aktywny transport substratów przez błonę, hyperaktywację plemników i reakcję akrosomalną. Są to procesy niezbędne, aby plemnik był zdolny do zapłodnienia komórki jajowej. Stres oksydacyjny jest czynnikiem, który powoduje otwarcie megakanałów mitochondrialnych (Bartosz, 1998). Zdaniem Kroemera (1997), otwarcie megakanałów i wypływ jonów wapnia z mitochondriów poprzedzają inne zmiany charakterystyczne dla apoptozy, takie jak kondensacja chromatyny oraz fragmentacja DNA. Gorczyca i in. (1993) jako pierwsi zaobserwowali, że fragmentacja DNA ejakulowanych plemników jest analogiczna do apoptozy komórek somatycznych. Martin i in. (2004, 2007) nie stwierdzili negatywnego wpływu kriokonserwacji na fragmentację DNA plemników buhaja. Z badań własnych wynika, że procedura zamrażania-rozmrażania nie indukuje również fragmentacji DNA w plemnikach knura (Trzcńska i Bryła, 2015).

Prace prowadzone w ostatnich latach na nasieniu różnych gatunków zwierząt wskazują, że obecność plemników apoptotycznych w nasieniu może być przyczyną obniżonej płodności. Pomimo intensywnych badań nad apoptozą w ejakulowanych plemnikach nadal istnieją niewyjaśnione zagadnienia związane zwłaszcza z indukcją tego zjawiska na różnych etapach postępowania technologicznego z nasieniem, związanych bezpośrednio z wartością materiału biologicznego używanego do inseminacji. Selekcja ejakulatów na podstawie zmian apoptotycznych może przyczynić się do wzrostu efektywności procesu kriokonserwacji nasienia knura.

#### Literatura

- Aitken R.J., Best F.M., Richardson D.W., Djahanbakchch O., Less M.M. (1982). The correlates of fertilizing capacity in normal fertile man. *Fertil. Steril.*, 38: 68–76.
- Aitken R.J., Sutton M., Warner P., Richardson D.W. (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 73: 441–449.
- Bartosz G. (1998). Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post. Biochem.*, 44: 22–29.
- Blom E. (1981). Ocena morfologiczna wad plemników buhaja. I. Zmiany patologiczne plemników w świetle wyników nowych badań [The morphological estimation of the spermatozoa defects of bull II. The proposal of new classification of spermatozoa defects]. *Med. Weter.*, 37 (3): 104–106.

- Bonde J.P., Ernst E., Jensen T.K., Hjollund N.H., Kolstad H., Henriksen T. B., Scheike T., Giwercman A., Skakkebaek O. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planner. *Lancet*, 10: 1172–1177.
- Bryła M., Trzcińska M. (2012). Relationship between apoptotic-like changes in stored boar semen and DNA fragmentation in preimplantation embryos. *Ann. Anim. Sci.*, 12: 357–366.
- Bryła M., Trzcińska M. (2014). Zastosowanie związków osłaniających w kriokonserwacji nasienia knura. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 41 (1): 33–39.
- Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S. (2009). Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, 118: 69–76.
- Chong A.P., Walters C.A., Weinrieb S.A. (1983). The neglected laboratory test. *J. Androl.*, 4: 280–282.
- Coetzee K., Kruger T.F., Lombard C.J. (2001). Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum. Reprod.*, 4: 73–82.
- Fernández-Gago R., Álvarez-Rodríguez M., Alonso M.E., González J.R., Alegre B., Domínguez J.C., Martínez-Pastor F. (2016). Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations. *Reprod. Fertil. Dev.*; doi: 10.1071/RD15530.
- Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells. Analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.*, 207: 202–205.
- Großfeld R., Sieg B., Struckmann C., Frenzel A., Maxwell W.M.C., Rath D. (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, 7: 1225–1233.
- Hernández M., Roca J., Calvete J.J., Sanz L., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez J.A., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2007). Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl.*, 28: 689–689.
- Hess E.A., Teague H.S., Ludwick T.M., Martig R.C. (1957). Swine can be bred with frozen semen. *Ohio Fm. Home Res.*, 42: 100.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 143–172.
- Kroemer G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.*, 3: 614–620.
- Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R. (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.*, 71: 28–37.
- Martin G., Cagnon N., Sabido O., Sion B., Grizard G., Durand P., Levy R. (2007). Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 22: 380–388.
- Maxwell W.M.C., Johnson L.A. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 46: 408–418.
- Nizański W. (2006). Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology*, 66: 470–483.
- O’Connel M., McClure N., Lewis S.E. (2002). The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.*, 17: 704–709.
- Ozkavukcu S., Erdemli E., Isik A., Oztuna D., Karahuseyinoglu S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 25: 403–411.
- Partyka A., Nizański W., Łukaszewicz E. (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*, 74: 1019–1027.
- Polge C. (1957). Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 147: 498–508.
- Polge C., Rowson L.E.A. (1952). Results with bull semen stored at -79°C. *Vet. Rec.*, 64: 851–853.
- Pursel V.G., Johanson L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40: 99–102.
- Roca J., Hernández M., Carvajal G., Vázquez J.M., Martínez E.A. (2006). Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, 84: 2692–2699.
- Rodríguez-Martínez H., Ekwall H., Linde Forsberg C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 279–285.
- Ron-El R., Nachum H., Herman A., Golan A., Caspi E., Soffer Y. (1991). Delayed fertilization and poor embryonic

- development associated with impaired semen quality. *Fertil. Steril.*, 55: 338–344.
- Silva P.F., Gadella B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm. *Theriogenology*, 65: 958–978.
- Trzcińska M., Bryła M. (2015). Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18: 473–480.
- Trzcińska M., Bryła M., Smoraż Z. (2008). Effect of liquid storage on membrane integrity and mitochondrial activity: a new diagnostic method of evaluating boar sperm quality. *J. Anim. Feed Sci.*, 17: 372–380.
- Trzcińska M., Bryła M., Gajda B., Gogol P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 83: 307–313.
- Westendorf P., Richter L., Treu H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailetten-Verfahren. *Dtsch Tierärztl Wschr.*, 82: 261–267.

## SELECTED METHODS OF ASSESSMENT OF CRYOPRESERVED BOAR SEMEN

### Summary

The processes of cooling, freezing, and thawing produce physical and chemical stress on the sperm membrane and reduce sperm viability. Moreover, a cryopreservation protocol produced cold shock which decreased sperm survival and freezing ability leading to the death of the sperm. The main damage to sperm due to cryo-injury occurs at the level of the plasma membrane and appears to be more closely related to fertility than sperm motility. The presence of population of spermatozoa with the apoptotic changes could explain reduced life span of the surviving population after freezing and thawing.

**Key words:** boar semen, cryopreservation, apoptotic-like changes



Knur rasy puławskiej – *Puławska breed boar* (fot. M. Szyndler-Nędza)