

immunologiczna, dwa istotne mechanizmy obronne w zakażeniu. Materiały wykładów dla studentów Biotechnologii AR w Szczecinie. **5. Furowicz A.J.**, 2007 – Immunologia ciąży oraz noworodka. Materiały wykładów dla studentów Biotechnologii AR w Szczecinie. **6. Furowicz A.J.**, 2009 – Ptasie immunoglobuliny IgY w leczeniu i zapobieganiu chorób zwierząt i człowieka. Materiały wykładów dla studentów Biotechnologii AR w Szczecinie. **7. Furowicz A.J.**, 2010 – Immunologia ciąży i noworodka. Materiały wykładu wygłoszonego w ramach sesji naukowej PTMiTTI, Szczecin. **8. Gołąb J., Kozar-**

**-Kamińska K.**, 2007 – Immunologia rozrodu. W: Immunologia (pod red. J. Gołąb, J. Jakóbsiak, W. Lasek, T. Stokłosa). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. **9. Jakóbsiak M., Gołąb J.**, 2007 – Prezentacja antygenów limfocytom T. W: Immunologia (pod red. J. Gołąb, J. Jakóbsiak, W. Lasek, T. Stokłosa). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. **10. Lasek W., Jakóbsiak M.**, 2007 – Populacje i subpopulacje limfocytów. W: Immunologia (pod red. J. Gołąb, J. Jakóbsiak, W. Lasek, T. Stokłosa). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

---

## Rozcieńczalniki do przechowywania nasienia knura

**Joanna Jaroszevska**

Studium Doktoranckie Instytutu Zootechniki PIB,  
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt

Inseminacja jest metodą biotechnologiczną szeroko stosowaną w hodowli zwierząt. W ciągu roku na świecie wykonuje się około 100 mln takich zabiegów u bydła [55]. W Europie około 90% loch i loszek jest zapładnianych tą metodą. Warto jednak zaznaczyć, że ponad 99% zabiegów u trzody chlewnej wykonywanych jest z użyciem nasienia przechowywanego w stanie płynnym w temperaturze 15-20°C, w dniu jego pobrania od knura lub dnia następnego. Inseminację z użyciem mrożonego materiału wykonuje się najczęściej w przypadku, gdy nasienie pochodzi z importu [31]. Stosowanie inseminacji umożliwia szeroki dostęp do nasienia wybitnych reproduktorów oraz eliminację genów warunkujących wady rozwojowe. Inseminacja przyspiesza postęp hodowlany, ułatwia handel i międzynarodową wymianę materiału biologicznego oraz zmniejsza ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych. Głównym jej celem jest zachowanie ciągłości genetycznej oraz zapobieganie lub wyeliminowanie chorób przenoszonych drogą płciową [16].

Rutynowo wykonywane zabiegi inseminacji wymuszają przygotowanie ogromnej ilości porcji nasienia. Knury mają stosunkowo krótki cykl spermatogenezy, dzięki czemu są największymi producentami nasienia wśród zwierząt gospodarskich [17]. Każda dawka inseminacyjna zawiera około  $2,5-3,0 \times 10^9$  plemników w 80-100 ml rozcieńczalnika. Dąży się do ciągłego zmniejszania ilości plemników w takiej dawce. Jednak aby mogło dojść do zapłodnienia, w układzie rozrodczym samicy musi się znaleźć – biorąc pod uwagę straty nasienia związane z wpływem nasienia z dróg rodnych, fagocytozą plemników w drogach rodnych, a także rozległością powierzchni macicy – odpowiednia ilość zdolnych do zapłodnienia plemników [7, 42].

Wykazano, że wielkość dawki jest proporcjonalna do liczby piasięt urodzonych w miocie, zatem zmniejszanie liczby plemników w dawce może negatywnie wpłynąć na rozród, przy zastosowaniu standardowej inseminacji do szyjki macicy. W przypadku, gdy nasienie wprowadzane jest do rogu macicy zmniejszanie dawek inseminacyjnych może być ekonomicznie wydajne [10].

Jakość nasienia używanego w inseminacji zależy od wielu czynników, takich jak: zastosowany rozcieńczalnik i sposób przechowywania nasienia oraz rasa i wiek knura, sposób jego żywienia, utrzymania i użytkowania [35, 37, 58], a także od czynników sezonowych [5, 38]. Wszystkie te elementy odgrywają dużą rolę, jednak szczególnie istotny, ze względu na wieloskładnikowość, wydaje się być rozcieńczalnik.

Rozcieńczalnikiem do nasienia jest wodny roztwór substancji zwiększający objętość dawki nasienia i stanowiący źródło niezbędnych składników odżywczych dla plemników, mających wysokie wymagania metaboliczne podczas przechowywania oraz transportu w układzie rozrodczym samicy [20].

Każdy rozcieńczalnik zawiera składniki zapewniające źródło energii, właściwe pH, ciśnienie osmotyczne, ale także substancje chroniące przed szokiem termicznym oraz hamujące wzrost bakterii [51]. Każda dawka inseminacyjna musi spełniać określone normy sanitarno-weterynaryjne, zapewniając tym samym bezpieczeństwo epizootyczne [55]. Stosowane do rozrzedzania lub konserwacji preparaty, produkowane na bazie substancji pochodzenia zwierzęcego (mleko, żółtko jaj, krew, surowica, osocze), powinny pochodzić ze źródeł, które nie stanowią zagrożenia dla zdrowia zwierząt [46]. Natomiast w przypadku substytutów roślinnych (białko soi, mleko kokosowe, cukry złożone i inne) powinny być pozyskane na terenach niezapowietrzonych, tj. nieobjętych chorobą [55].

Od czasu opisanego pierwszych rozcieńczalników (glukoza – siarczan, glukoza – winian) przez Milovanova w roku 1962, powstało wiele receptur przygotowania podłoża dla nasienia różnych gatunków zwierząt [31]. Każdy rozcieńczalnik musi zapewniać optymalne warunki, w celu utrzymania gamet w dobrej kondycji. Plemniki pozyskują energię z procesu glikolizy przeprowadzanej w mitochondriach, a substratem reakcji tego procesu jest glukoza, która stanowi źródło energii i tym samym jest podstawowym składnikiem każdego rozcieńczalnika [20].

Świeże nasienie knura ma pH w granicach 7,2-7,5, poniżej tych wartości ruchliwość i metabolizm plemników gwałtownie spadają. W celu regulacji i stabilizacji pH nasienia do rozcieńczalników dodaje się bufor, np. cytrynian sodu i/lub dwuwęglan sodu, TES, HEPES. TES i HEPES spełniają również funkcję wychwytywania metali ciężkich [31]. Badania wykazały, że pH rozcieńczalnika pozostaje niestabilne nawet do 90 minut od momentu jego przygotowania, a wpływ tych zmian na nasienie nie jest znany [43]. W latach sześćdziesiątych nowością było wprowadzenie EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy), który chelatując jony metali dwuwartościowych (głównie Ca<sup>2+</sup>) zapobiega procesowi kapacytacji [20]. Wśród związków jonowych wchodzących w skład rozcieńczalnika znajduje się również chlorek sodu, którego zadaniem jest utrzymanie działania pompy sodowo-potasowej Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> [31].

Plemniki knura tolerują ciśnienie osmotyczne w granicach 240-380 mOsm, tj. w niewielkim zakresie ciśnienia panującego wewnątrz gamety. Stwierdzono, że rozcieńczalniki izotoniczne lub lekko hipertoniczne zapewniają najlepsze warunki przechowywania nasienia [20].

Ze względu na swoją funkcję odżywczą rozcieńczalnik stanowi sprzyjające środowisko do wzrostu drobnoustrojów [11], pochodzących z dróg moczopłciowych knura, zanieczyszczeń podczas jego pobierania, badania lub przechowywania [9, 41]. Drobnoustroje najczęściej spotykane w nasieniu to [23]:

- chorobotwórcze – *Brucella suis*, *Leptospira* spp., *Mycoplasma* spp.;

- warunkowo chorobotwórcze – *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus hemolyticus*, *Corynebacterium pyogenes* oraz grzyby: *Aspergillus*, *Candida*, *Trichosporum*;

- saprofityczne – *Proteus* spp., *Streptococcus faecalis* i inne. Odnotowano również obecność: *Micrococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., a także innych szczepów wyżej wymienionych rodzajów bakterii [3]. Zaobserwowano predyspozycje do występowania pewnych rodzajów bakterii tylko w określonym sezonie [4].

Występowanie w nasieniu licznych bakterii wymusza suplementację rozcieńczalników substancjami antydnobnoustrojowymi. Obecność bakterii skutkuje spadkiem ruchliwości plemników, a także powoduje aglutynację komórek bakteryjnych do plemników i pomiędzy plemnikami, co prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej gamety. Identyfikacja i wykonanie antybiogramów jest długotrwałe i kosztowne, dlatego zamiast celowanego stosowania danego leku wobec konkretnego drobnoustroju stosuje się skojarzoną chemioterapię o możliwie najszerszym spektrum działania [56]. Najczęściej stosuje się antybiotyki z rodzaju aminoglikozydaz, β-laktamy i linkozamidy [3]. Jest to kombinacja antybiotyków: streptomycyny z penicyliną (SP) oraz linkomycyny ze spektynomycyną (LS). Stosunkowo nową mieszaniną antybiotyków dodawaną do rozcieńczalnika jest GTLS, zawierający: gentamycynę, tyrozynę, linkomycynę oraz spektynomycynę [1]. Rozporządzenie MRiRW w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych mających zastosowanie

do nasienia świń, jasno określa sposób zabezpieczenia nasienia przed drobnoustrojami, podając rodzaj i ilość antybiotyku, która musi znajdować się w końcowym rozcieńczeniu (500 IU w ml streptomycyny i penicyliny, 150 µg w ml linkomycyny, 300 µg w ml spektynomycyny). Mieszanina antybiotyków może być inna, jeśli zapewni równie skuteczne przeciwdziałanie mętwikowi, leptospirom i mykoplazmom [46].

Badania nad zastosowaniem antybiotyków, jako składników porcji nasienia, pokazują narastającą lekooporność szczepów patogennych [15, 16, 26, 52, 54]. Stwierdzono ponadto, że antybiotyki, oprócz hamowania wzrostu drobnoustrojów patogennych, nie pozostają bez wpływu na plemniki. Wykazano, że obecność antybiotyków negatywnie oddziałuje na ruchliwość, powoduje zmiany w morfologii plemników [2], zakłóca prawidłowy ruch plemników [53], długowieczność plemników i integralność ich błon [1]. Problemy związane z wykorzystaniem antybiotyków zmuszają do poszukiwania alternatywnych i równie skutecznych rozwiązań w eliminacji drobnoustrojów patogennych z nasienia. Dubiel i wsp. [15] wykazali pozytywny wpływ stosowania terapii bakteriofagowej u knurów zakażonych *Pseudomonas aeruginosa*. Zahamowanie wzrostu bakterii występujących w nasieniu knura (*E. coli*, *Aerobacter* sp., *Proteus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. i *Bordetella* sp.) zaobserwowano również po dodaniu do rozcieńczalnika polimiksyny b [54]. W ostatnim czasie zwraca się uwagę również na właściwości antibakteryjne peptydów (AMP), takich jak cykliczne heksapeptydy i pochodne magaininy, które mogą hamować wzrost drobnoustrojów, m.in. *E. coli* i *Bacillus subtilis*, w nasieniu knura [47].

Wśród dodatków do rozcieńczalnika sprzyjających procesowi zapłodnienia wymienia się również glutation. Spełnia on ważną rolę w mechanizmie obrony komórek przeciwko stresowi oksydacyjnemu [40]. Badania pokazały, że dodanie glutationu do rozcieńczalnika podczas rozmrażania nasienia powoduje wzrost zdolności plemników do zapłodnienia komórki jajowej [22]. Działanie to tłumaczy się polepszeniem parametrów ruchu plemników, wzrostem liczby żywych plemników, u których nie rozpoczął się proces kapacytacji oraz spadkiem liczby plemników, u których wystąpiły zmiany w białkach błonowych [21].

Właściwości antyoksydacyjne wykazuje również fumaran magnezu, którego dodatek wydłuża czas życia plemników, jednak powoduje uszkodzenie ich chromatyny. Lepszy okazał się hydrochlorek L-cysteiny, prekursor wewnątrzkomórkowej biosyntezy glutationu, który w określonej ilości chronił przed uszkodzeniami nasienie podczas przechowywania w 15°C [51], a także w -196°C [34].

W literaturze pojawiły się również informacje dotyczące suplementu w postaci preparatu homeopatycznego *Avena sativa* 6CH, który korzystnie wpływa na wskaźniki rozrodu [48]. Większa liczba porodów i mniej loch z problemami związanymi z zapłodnieniem w badanej grupie związana była ze zwiększeniem aktywności metabolicznej poprzez zwiększenie ruchliwości i żywotności komórek spermy [49].

Z praktycznego punktu widzenia wyróżnia się rozcieńczalniki do krótkoterminowego (1-3 dni) oraz długoterminowego przechowywania nasienia (4-10 dni). Rozcieńczalniki długoterminowe pozwalają transportować nasienie na większe odległości, a także umożliwiają przeprowadzenie testów diagnostycznych nasienia przed jego zastosowaniem [20].

Na rynku obecnych jest wiele rozcieńczalników krótkoterminowych, jednym z nich jest BTS (Beltsville Thawing Solution), który został opracowany do rozmrażania nasienia, ale później zmodyfikowano go do przechowywania nasienia w stanie płynnym [29, 31, 36]. Zawiera on, oprócz głównych składników, tj. glukozy, EDTA, cytrynianu i dwuwęglanu sodu, także niewielką ilość potasu, dzięki czemu utrzymuje wewnątrzkomórkową równowagę jonową. Obecność EDTA charakteryzuje nie tylko BTS, ale także rozcieńczalnik KIEV [29, 31]. Komercyjne krótkoterminowe rozcieńczalniki to również: IVT, PIGPEL-5 [12, 20], MR-A 3 days® (Kubus, Hiszpania), DZNB (Multidesign, Bułgaria) [13], X-cell™ (IMV Technologies, Francja) [28, 39], Kortowo-3 (UWM Olsztyn) [18]. Oprócz rozcieńczalników komercyjnych stosuje się również rozcieńczalniki oparte na składnikach naturalnych, jak żółtko i mleko, zawierających różne dodatki, np.: żółtko-glukoza-dwuwęglan [44], bufor Tris-żółtko [30], laktoza-żółtko [22, 45], mleko-żółtko, mleko-cytrynian, mleko-żółtko-glicerol [24].

Z upływem czasu maleje zdolność plemników do zapłodnienia komórki jajowej. Dlatego też do dłuższego przechowania nasienia stosuje się rozcieńczalniki o bogatszym składzie: ZORLESCO (zawierający oprócz podstawowych składników bufor TRIS, kwas cytrynowy, BSA i cysteinę) oraz znacznie częściej stosowany ANDROHEP (zawierający bufor HEPES i BSA) [29, 31, 39], ANDROHEP PLUS [14]. Znane są również liczne modyfikacje rozcieńczalnika Zorlesco, np. MODENA (większa ilość glukozy, bez BSA), ZORPVA i Reading (zawierają alkohol poliwinylowy PVA). A także rozcieńczalnik MR-A, którego skład nie został ujawniony, jednak podczas długotrwałego przechowywania daje dobre efekty [20]. Stosowane są również: BIOSOLWENS (przechowywanie 3-5 dni, Biocheffa, Polska) [25, 51], BIOSOLWENS PLUS (przechowywanie 7-10 dni, Biocheffa Polska) [32], Androstar (Minitub, Niemcy), Androstar Plus (Minitub, Niemcy), M III (Minitub, Niemcy) [19], NUTRIXcell® (IMV Technologies, Francja), VITASEM LD (przechowywanie 7-8 dni, Magapor, Hiszpania), Duragen (przechowywanie 12-15 dni, Magapor, Hiszpania), Dofu gold™ (Dofu AI Technology Co., Chiny) [33].

Większość nasienia knurów stosowanego w inseminacji jest przechowywana w temperaturze 15-17°C. Związane jest to z dużą wrażliwością błony plemników na uszkodzenia podczas zamrażania, które powoduje serię uszkodzeń gamet, prowadząc do nieefektywnej inseminacji [6]. Taka temperatura nie hamuje jednak wzrostu komórek bakteryjnych, dla których rozcieńczalnik stanowi bogate podłoże do wzrostu. Correa i wsp. [12] przeprowadzili badania wykazujące, że przechowywanie nasienia w temperaturze 5°C w odpowiednim rozcieńczalniku (PIGPEL-5) zapewnia zachowanie jego wysokiej jakości oraz zapobiega wzrostowi drobnoustrojów. Podobne rezultaty w ba-

daniach nad przechowywaniem nasienia w tej temperaturze uzyskali Pursell i wsp. [44].

Przechowywanie nasienia w niskich temperaturach pozwala na transportowanie go na duże odległości, a także umożliwia tworzenie rezerw genetycznych. Po licznych niepowodzeniach, pierwszy udany zabieg inseminacji z użyciem mrożonego nasienia knura wykonano w roku 1970. W praktyce zamrażania nasienia stosuje się metodę kulkową, dużych słomek lub makrotub [8]. Obserwuje się dużą zmienność podczas mrożenia nasienia knurów zarówno pomiędzy rasami, ale także osobnikami, a nawet ejakulatami danego knura [8, 45]. Plemniki knura charakteryzują się dużą wrażliwością na zabiegi związane z zamrażaniem i rozmrażaniem. Skutkiem tych procedur są uszkodzenia błony komórkowej oraz organelli wewnątrzkomórkowych, co powoduje stres osmotyczny i szok związany ze spadkiem temperatury, a to w konsekwencji prowadzi do zaniżenia parametrów rozrodu [27]. Największą podatność na uszkodzenia plemniki wykazują podczas obniżania temperatury z 15°C do 5°C. Aby temu zapobiec, stosuje się na przykład dodatek żółtka jaja kurzego do rozcieńczalnika oraz powolne, z prędkością 1°C na minutę, ochładzanie nasienia [57].

Rozcieńczalniki stosowane w mrożeniu nasienia można podzielić na nie zawierające buforu (żółtko-glukoza, żółtko-laktoza, żółtko-sacharoza-EDTA-sole Mg i Ca) oraz zawierające bufor (glicyna-fosforan i glukoza-fosforan, żółtko-glukoza-cytrynian, Beltsville F3 i F5, Tris-fruktoza-EDTA-żółtko, Tris-glukoza-EDTA-żółtko) [31].

Rozcieńczalniki stosowane do zamrażania nasienia, oprócz składników występujących w mediach do przechowywania nasienia w stanie płynnym, posiadają krioprotektant zapobiegający uszkodzeniom podczas mrożenia. Substancje ochronne można podzielić na takie, które nie wnikają do wnętrza komórki (mleko, żółtko jaja kurzego, trehaloza, aminokwasy, dekstryny) oraz penetrujące komórkę (glicerol, glikol etylenowy, dimetylo-sulfotlenek – DMSO). Krioprotektanty nie wnikające do wnętrza komórek chronią plemnik modyfikując jego błonę komórkową lub obniżając temperaturę zamrażania rozcieńczalnika, ograniczając tym samym formowanie zewnątrzkomórkowych kryształków lodu. Krioprotektanty wnikające do komórki rozpuszczają cukry i sole będące składnikami rozcieńczalnika. Ten rodzaj substancji ochronnych zmienia ustawienie lipidów i białek wchodzących w skład membrany komórkowej, powodując zwiększenie jej płynności, obniżenie uwodnienia komórki prowadzące do ograniczenia formowania kryształów lodu w komórce [6]. Wśród najczęściej pojawiających się w literaturze dodatków do rozcieńczalników do mrożenia nasienia wymienia się glicerol i Orvus ES Paste, mające na celu zachowanie zdolności plemników do zapłodnienia komórki jajowej [8, 31]. Współdziałając z żółtkiem jaja kurzego Orvus ES Paste (OEP), będący syntetycznym detergentem, działa ochronnie podczas mrożenia nasienia [31]. Najnowsze wyniki badań pokazują, że dodatek lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia afrykańskiego jest skutecznym krioprotektantem dodawanym do rozcieńczalnika [50].

Nasienie knurów zamraża się dopiero po 18-24 h od pobrania, podczas gdy nasienie innych gatunków zwierząt już po 6 h. Przedłużenie tego okresu powoduje uzyskanie pewnej odporności na powstawanie wad podczas procesu zamrażania [6, 31]. Po pozyskaniu nasienia rozcieńcza się je w podstawowym rozcieńczalniku (najczęściej BTS), poddaje się ocenie, a następnie zamraża w rozcieńczalniku zawierającym np. LEY-Glycerol-Orvus ES Paste [6, 21].

W zależności od sposobu przechowywania nasienia – w rozcieńczalniku w stanie ciekłym czy stałym, wykorzystuje się podłoża o odpowiednim składzie. Na wybór rozrzedzalnika ma również wpływ długość okresu przechowywania nasienia, jeśli do 3 dni – rozcieńczalnik do przechowywania krótkoterminowego, jeśli ponad 3 dni – do długoterminowego. Przy tak szerokiej gamie rozcieńczalników należy wybrać ten, przy którego zastosowaniu uzyska się najlepsze wskaźniki rozrodu w określonych warunkach.

**Literatura:** 1. Akhter S., Ansari M.S., Andrabi S.M., Ullah N., Qayyum M., 2008 – *Reprod. of Domestic Animals* 43 (3), 272-278. 2. Alavi-Shoushtari S.M., Ahmadi M., Shahvarpour S., Kolahian S., 2007 – *Pakistan J. Biol. Sci.* 10 (18), 3200-3204. 3. Althouse G.C., Lu K.G., 2005 – *Theriogenology* 63, 573-584. 4. Althouse G.C., Pierdon M.S., Lu K.G., 2008 – *Theriogenology* 70, 1317-1323. 5. Banaszewska D., Kondracki S., Wysokińska A., 2007 – *Acta Scientiarum Polonorum, Zootechnica* 6 (2), 3-14. 6. Barbas J.P., Mascarenhas R.D., 2009 – *Cell Tissue Bank* 10, 49-62. 7. Bielański W., 1977 – *Rozród zwierząt. PWRiL, Warszawa*. 8. Bielas W., 2002 – *Acta Scientiarum Polonorum, Medicina Veterinaria* 1(2), 13-22. 9. Bronicka A., Dembiński Z., 1999 – *Med. Wet.* 55 (7). 10. Buhr M., 2001 – *Emerging tools in artificial insemination. London Swine Conference – The pork industry and public issues*. 11. Ciornei S.G., Runcanu L., Drugociu D., Rosca P., 2008 – *Bulletin UASVM, Veterinary Med.* 65(2), 114-118. 12. Correa M.N., Lucia T. Jr., Bianchi I., Schmitt E., Bordignon J., Rech D.C., Peruzzo I.A., Deschamps J.C., 2006 – *Anim. Reprod.* 3(1), 41-48. 13. Dimitrov S., Atanasov V., Dichlyanova E., Petrova R., 2009 – *Trakia J. Sci.* 7(1), 58-62. 14. Dube Ch., Beaulieu M., Reyes-Moreno C., Guillemette Ch., Bailey J.L., 2004 – *Theriogenology* 62, 874-886. 15. Dubiel A., Kozdrowski R., Bielas W., Siemieniuch M., Weber-Dąbrowska B., Mulczyk M., 2005 – *Acta Scientiarum Polonorum, Medicina Veterinaria* 4(2), 33-40. 16. Eaglesome M.D., Garcia M.M., 1997 – *Revue Scientifique et Technique* 16(1), 215-225. 17. Foote R.H., 1999 – *Artificial insemination from the origins up to today. Proc. of the Spallanzani Int. Symp., Regio Emilia, Italy*, 23-67. 18. Fraser L., Gorszczaruk K., Strzeżek J., 2001 – *Reprod. in Domestic Animals* 36, 325-329. 19. Frydrychova S., Cerovsky J., Lustykova A., Rozkot M., 2010 – *Czech J. Anim. Sci.* 55(4), 160-166. 20. Gadea J., 2003 – *Spanish J. Agric. Res.* 1(2), 17-27. 21. Gadea J., Garcia-Vazquez F., Matas C., Gardon J.C., Canovas S., Gumbao D., 2005 – *J. Androl.* 26(3), 396-404. 22. Gadea J., Selles E., Marco M.A., Coy P., Matas C., Romar R., Ruiz S., 2004 – *Theriogenology* 62, 690-701. 23. Gasiński M., 2009 – *Trzoda Chlewna* 5. 24. Głód W., 1976 – *Rozród i unasiennianie bydła. PWRiL, Warszawa*. 25. Gogol P., Szczeniak-Fabiańczyk B., 2006

– *Czech J. Anim. Sci.* 51(2), 61-65. 26. Gradil C., Eaglesome M.D., Stewart B., Gracia M.M., Quimby F., 1995 – *Canadian J. Vet. Res.* 59, 183-186. 27. Guthrie H.D., Welch G.R., 2005 – *Theriogenology* 63, 396-410. 28. Haugan T., Gaustad A.H., Reksen O., Grohn Y.T., Hofmo P.O., 2007 – *Reprod. in Domestic Animals* 42, 94-99. 29. Huo L.J., Ma X.H., Yang Z.M., 2002 – *Theriogenology* 58, 1349-1360. 30. Igobeli G., 1970 – *J. Anim. Sci.* 30: 569-572. 31. Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M.C., 2000 – *Anim. Reprod. Sci.* 62, 143-172. 32. Jurkiewicz J., Lipiński D., Szczeniak-Fabiańczyk B., Słomski R., 2010 – *Annals Anim. Sci.* 10(3), 223-230. 33. Kaeoket K., Srisowanna T., Wichaidit U., Chanapiwat P., Manee-in S., 2010 – *Thai J. Vet. Med.* 40(3), 257-263. 34. Kaeoket K., Tantiparinyakul K., Kladkaew W., Chanapiwat P., Techakumphu M., 2008 – *Thai J. Agric. Sci.* 41(1-2), 1-9. 35. Kawęcka M., Pietruszka A., Jacyno E., Czarnecki R., Kamyczek M., 2008 – *Archiv Tierzucht, Dummerstorf* 51, 1, 42-54. 36. Kommisrud E., Paulenz H., Sehested E., Grevle I.S., 2002 – *Acta Vet. Scand.* 43(1), 49-55. 37. Kondracki S., Wysokińska A., 2005 – *Folia Univ. Agric. Stetinensis, Zootechnica* 243(47), 97-104. 38. Kordan W., Strzeżek J., Soliwoda D., Lecewicz M., Mogielnicka M., 2008 – *Med. Wet.* 64 (2). 39. Kuster C.E., Althouse G.C., 1999 – *Theriogenology* 52, 365-376. 40. Luberda Z., 2005 – *Reprod. Biol.* 5(1), 5-17. 41. Maes D., Nauwynck H., Rijsselaere T., Mateusen B., Vyt P., de Kruif A., Van Soom A., 2008 – *Theriogenology* 70, 1337-1345. 42. Matthijs A., Engel B., Woelders H., 2003 – *Reproduction* 125, 357-367. 43. Newth M.S., Levis D.G., 1999 – *Changes in pH of boar semen extenders. Animal Science Department, Nebraska Swine Reports*. 44. Pursel V.G., Schulman L.L., Johnson L.A., 1973 – *J. Anim. Sci.* 37(3), 785-789. 45. Roca J., Hernandez M., Carvajal G., Vazquez J.M., Martinez E.A., 2006 – *J. Anim. Sci.* 84, 2692-2699. 46. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 kwietnia 2004 r. w sprawie szczegółowych wymagań weterynaryjnych mających zastosowanie do nasienia świń (Dz.U. z 2004 r. nr 100, poz. 1017). 47. Schultze M., Junkes Ch., Speck S., Ruediger K., Jung M., Mueller P., Dathe M., Mueller K., 2010 – *Antimicrobial peptides (AMP) in boar sperm preservation. Abstract Book 22<sup>nd</sup> Annual meeting of EU-AI-Vets*. 48. Soto F.R.M., Vuaden E.R., Coelho C.P., Bonamin L.V., de Azevedo S.S., Benites N.R., Visintin J.A., de Barros F.R.O., Goissis M.D., Assumpcao M.E.O., Marques M.G., 2010 – *International Journal of High Dilution Research* 9(30), 51-57. 49. Soto F.R.M., Vuaden E.R., Coelho C.P., Bonamin L.V., de Azevedo S.S., Benites N.R., 2009 – *Veterinaria e Zootecnia* 16(2), 367-372. 50. Strzeżek J., Opiłowski T., Puchalski A., Leyland F., Strzeżek R., Wiśniewska B., Wysocki P., Zasiadczyk Ł., 2011 – *Przegląd Hod.* 1, 16-19. 51. Szczeniak-Fabiańczyk B., Bochenek M., Smoraż Z., Ryszka F., 2003 – *Reprod. Biology* 3(1), 81-87. 52. Truscot R.B., Ruhnke H.L., 1984 – *Canadian J. Comparative Med.* 48, 171-174. 53. Varner D.D., Scanlan C.M., Thompson J.A., Brumbaugh G.W., Blanchard T.J., Carlton C.M., Johnson L., 1998 – *Theriogenology* 50(4), 559-73. 54. Waltz F.A., Foley C.W., Herschler R.C., Tiffany L.W., Liska B.J., 1968 – *J. Anim. Sci.* 27, 1357-1362. 55. Wieczorek J., 2008 – *Wiad. Zoot., R. XLVI*, 4, 65-73. 56. Wieczorek J., 2009 – *Wiad. Zoot., R. XLVII*, 1, 11-24. 57. Woelders H., Matthijs A., Zuidberg C.A., Chaveiro A.E.N., 2005 – *Theriogenology* 63, 383-395. 58. Wrona Z., Klimont M., Krakowski L., 2009 – *Med. Wet.* 65(3), 194-197.