

Współczesne poglądy na komputerową analizę jakości nasienia

AGNIESZKA ANTOŃCZYK, WOJCIECH NIŻAŃSKI, JAN TWARDOŃ,
ROLAND KOZDROWSKI, MAŁGORZATA OCHOTA, KAROLINA BŁASIAK,
NATALIA MIKOŁAJEWSKA, EWA STAŃCZYK

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 49, 51-366 Wrocław

Antończyk A., Niżański W., Twardoń J., Kozdrowski R., Ochota M., Błasiak K., Mikołajewska N., Stańczyk E.

Current views on computer assisted sperm analysis

Summary

Until recently, assessment of sperm quality was based on subjective evaluation of parameters such as semen concentration, motility and morphological abnormalities. These methods are influenced by many factors: temperature, evaluator skills and experience, the number of evaluated spermatozoa, difference in sample preparation, etc. Consequently high variations were reported in the estimation of semen quality of the same ejaculate assessed by different observers. Computer assisted semen analysis (CASA), based on individual spermatozoon assessment, offer an accurate and rapid calculation of different semen parameters, such as total motility, progressive motility, linearity, several velocity parameters and morphology. The development and problems related to using CASA technology are raised in this review.

Keywords: semen, computer assisted sperm analysis

Standardowo przeprowadzane badanie nasienia opiera się na mikroskopowej ocenie koncentracji, ruchliwości, morfologii nasienia oraz określeniu odsetka plemników żywych i martwych. Uzyskane wyniki charakteryzują się znacząco rozbieżnością, sięgającą 30-60% (8, 10), jeśli te same próbki oceniają różne osoby i laboratoria. Dysproporcje te wynikają między innymi z zastosowania różnej temperatury badania, odmiennego przygotowania badanego materiału, rodzaju wykorzystanego utrwalenia, techniki barwienia, procedury przygotowania preparatu oraz z jakości sprzętu (10, 16, 17). Poważny problem stanowi także niewielka ilość ocenianych plemników mikroskopowymi metodami konwencjonalnymi. Jednak największe znaczenie zarówno w przypadku oceny ruchliwości, jak i oceny morfologicznej mają doświadczenie i umiejętności osoby oceniającej (16). Ponadto stwierdzono, że korelacja między wynikami subiektywnej mikroskopowej metody oceny nasienia a faktyczną płodnością uzyskaną w wyniku unasienniania samic różnych gatunków zwierząt jest niewielka (10, 11). Fakty te już od dawna przemawiają za koniecznością wprowadzenia bardziej obiektywnej metody oceny jakości nasienia, którą możemy uzyskać poprzez zastosowanie komputerowo wspomaganą analizy – CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Automatyczne systemy komputerowe wykorzystywane są od ponad 30 lat (5) zarówno w ludzkich, jak

i weterynaryjnych ośrodkach diagnostyki i leczenia niepłodności. Umożliwiają one szybką i obiektywną ocenę odsetka plemników ruchliwych, odsetka plemników o ruchu progresywnym, określenie populacji plemników o ruchu szybkim, umiarkowanym czy wolnym. Ponadto dają możliwość wizualizacji toru ruchu indywidualnych gamet, co umożliwia szczegółowy opis parametrów związanych z prędkością i rodzajem ruchu plemników. Komputerowo wspomaganą analizę nasienia pozwala także na morfologiczną i morfometryczną ocenę plemników.

System CASA przetwarza obraz mikroskopowy rejestrowany kamerą video oraz analizuje go na zasadzie przekształcania poszczególnych pikseli będących składowymi częściami obrazu. Zarejestrowane pozycje obiektów na kolejnych „klatkach” (frame), umożliwiają wykreślenie drogi przebytej przez ruchome obiekty, jej pomiar oraz określenie przemieszczeń kolejnych plemników. Skomplikowane procedury algorytmowe pozwalają szczegółowo scharakteryzować rodzaj ruchu i prędkość poszczególnych plemników.

Ustawienia wstępne

Główną zaletą automatycznych systemów analizy nasienia jest ich obiektywność oraz możliwość porównywania wyników między laboratoriami. Jednak aby otrzymane rezultaty były wiarygodne i porównywal-

ne, system wymaga adaptacji i wstępnego ustawienia do oceny jakości nasienia danego gatunku zwierzęcia.

Każdy z dostępnych systemów wymaga od użytkownika określenia niektórych parametrów i wartości krytycznych opisujących obiekty i ich ruchliwość. Zdefiniować należy częstotliwość odświeżania obrazu, liczbę analizowanych obrazów, wielkość główki plemnika, kolor obiektów w zależności od używanego kontrastu oraz jego intensywność, wartości graniczne VAP (Average Path Velocity) – „wygładzonej” drogi przebytej przez plemnik w jednostce czasu uzyskanej poprzez uśrednienie kolejnych zarejestrowanych pozycji i VSL (Straight Line Velocity) – drogi przebytej przez plemnik ruchem prostoliniowym w jednostce czasu. Określenie tych parametrów umożliwia identyfikację plemnika oraz rekonstrukcję toru ruchu poszczególnych gamet.

Do warunków wstępnych, które także wymagają standaryzacji, należy zaliczyć między innymi temperaturę, w której przeprowadzana jest analiza. Davis i Katz (7) donoszą, że zmiana temperatury o 5°C prowadzi do różnic w wartości VCL rzędu 12% (Track Speed Velocity – całkowita droga przebyta przez plemnik w jednostce czasu). Kraemer i wsp. (12) z kolei twierdzą, że wraz ze wzrostem temperatury rosną wszystkie parametry opisujące kinetykę plemników. Inne warunki techniczne, które mają wpływ na otrzymywane wyniki, to: rodzaj użytej komory i jej głębokość, typ oświetlenia w mikroskopie, zastosowane powiększenie, rozrzedzenie badanej próby, liczba ocenianych gamet oraz wielkość pola widzenia.

Wielu autorów zaobserwowało znaczny wpływ wykorzystanej komory na parametry opisujące ruchliwość plemników (11, 27). Głębokość komory musi być wystarczająca, aby zapewnić swobodny, niewymuszony ruch gamet. Spełnienie tego warunku wymaga zastosowania różnej grubości komór do oceny nasienia różnych gatunków zwierząt (8). Równie istotna wydaje się wielkość oraz liczba pól poddawanych analizie, a tym samym liczba badanych plemników. Według Verstegea i wsp. (27), wraz ze wzrostem liczby ocenionych komórek rośnie precyzyjność uzyskiwanych wyników. Z kolei Rijsselaere i wsp. (18) twierdzą, że większa liczba analizowanych pól i plemników znacząco wpływa jedynie na wyniki dotyczące liniowości ruchu plemników oraz koncentracji plemników w jednostce objętości. Niemniej przyjmuje się, że minimalna liczba komórek poddanych analizie nie powinna być mniejsza niż 100. Zgodnie z wytycznymi Eshre Andrology Special Interest Group (4), powiększenie wykorzystane do badania ruchliwości plemników musi zapewnić obserwację plemników w polu widzenia w sposób ciągły przez 0,5 sekundy.

Koncentracja plemników w jednostce objętości

Doniesienia naukowe dotyczące nasienia zarówno zwierząt, jak i ludzi wskazują, że ocena koncentracji plemników za pomocą systemu CASA wiąże się z pew-

nyimi nieścisłościami (15, 22). Dotyczą one zwłaszcza nasienia o wysokiej koncentracji. Wyniki uzyskane za pomocą automatycznych systemów komputerowych przewyższają rezultaty osiągnięte konwencjonalną metodą. To przeszacowanie wyników przypisywane jest kolizjom poszczególnych plemników i przecinaniu się torów ruchu. Zderzenie gamet powoduje, że system traktuje je jako dwa nowe obiekty, co prowadzi do zawyżania rzeczywistych rezultatów (27). Fakt ten ogranicza wykorzystanie CASA do rutynowej analizy nasienia. Rozwiązanie problemu stanowi rozcieńczenie badanej próbki nasienia. Spiropoulos (21) w swoich badaniach przeprowadzonych na 46 ejakulatach wykazał, że różnice w wynikach koncentracji nasienia uzyskanych za pomocą metody manualnej i komputerowej analizy były statystycznie istotne w przypadku nasienia nierozcieńczonego, zaś badanie próbek rozcieńczonych nie wykazało znaczących różnic. Według tego autora, koncentracja 80×10^6 plemników/ml uniemożliwia wiarygodną ocenę tego parametru i wymaga zastosowania rozrzedzalnika. Na podstawie stopnia rozrzedzenia próbki system automatycznie przelicza koncentrację plemników, podając wartość oryginalną (koncentrację nasienia nierozrzedzonego). Według innych autorów (6, 17, 27), rozrzedzanie badanych próbek pozostaje dyskusyjne z uwagi na duży wpływ dodawanych substancji na gamety. Rozrzedzenie nasienia w stosunku 1 : 1 homologiczną plazmą nasienia czy zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej powoduje spadek odsetka plemników ruchliwych o 5-10% (7). Słuszna wydaje się więc propozycja Verstegea i wsp. (27), zgodnie z którą pomiar koncentracji najlepiej wykonywać na nasieniu nieruchliwym. Dodatek np. 9% NaCl powoduje szok osmotyczny i unieruchomienie plemników.

Na wyniki koncentracji nasienia uzyskane metodą komputerową wywierać może także wpływ obecność innych komórek czy cząstek o wymiarach i kształcie podobnym do plemników (leukocyty, fragmenty komórek nabłonkowych, cytoplazmy itp.). Dotyczy to zwłaszcza nasienia o niskiej koncentracji oraz nasienia rozmrożonego. Elementy rozrzedzalników wykorzystanych w procesach biotechnologicznych (cząsteczki żółtka jaja kurzego itp.) rozpoznawane mogą być przez system jako plemniki, co prowadzi do przeszacowania uzyskanych rezultatów. Sposobem na otrzymanie bardziej wiarygodnych wyników jest zastosowanie systemu barwienia fluorescencyjnego. W tym zakresie zastosowanie znalazł penetrujący przez nieuszkodzoną błonę komórkową barwnik fluorescencyjny Hoechst 33342 o silnym powinowactwie do skondensowanego DNA męskich gamet oraz wykazujący fluorescencję w świetle UV. Umożliwia to odróżnienie plemników od innych elementów niekomórkowych, a także od większych komórek diploidalnych, których iluminacja jest znacznie słabsza. Badania potwierdzające skuteczność tej metody przeprowadzili Zinaman i wsp. (30). Wykazali oni, że liczba elemen-

tów niekomórkowych zakwalifikowanych do analizy była znacznie mniejsza w badaniu przeprowadzonym z wykorzystaniem barwienia o nazwie firmowej IDENT (Hoechst 33342) niż bez niego, zaś wyniki koncentracji nasienia porównywalne z rezultatami osiągniętymi konwencjonalną metodą.

System CASA umożliwia również określenie odsetka plemników żywych i martwych. W tym celu wykorzystuje się barwienie z użyciem barwnika Hoechst 33258. Barwnik ten ma zdolność przenikania tylko do komórek z uszkodzoną błoną komórkową, co pozwala na identyfikację komórek martwych. Za pomocą wiązki światła widzialnego (dioda emitująca niebieskie światło) określana jest liczba komórek oraz ich ruchliwość, zaś odsetek plemników żywych i martwych oceniany jest w świetle UV. Wessel i Althouse (28) porównali skuteczność barwników Hoechst 33258 i SYBR-14/PI. Żywotność plemników określona za pomocą systemu CASA i barwienia o nazwie firmowej VIADENT była porównywalna z wynikami badań z mikroskopu fluorescencyjnego z wykorzystaniem barwnika SYBR-14/PI.

Ruchliwość plemników

Dzięki wizualizacji toru ruchu indywidualnych gamet analiza ruchliwości za pomocą systemu CASA daje możliwość szybkiej i obiektywnej oceny parametrów charakteryzujących ruch poszczególnych plemników. Część z nich ma charakter pierwszorzędowy i są pozyskiwane z bezpośrednich pomiarów. Należą do nich: 1) VCL (Track Speed Velocity) – szybkość komórki względem zarejestrowanego toru, 2) VAP (Average Path Velocity) – „wygładzona” droga przebyta przez plemnik w jednostce czasu uzyskana poprzez uśrednienie kolejnych zarejestrowanych pozycji, 3) VSL (Straight Line Velocity) – droga przebyta przez plemnik ruchem prostoliniowym w jednostce czasu, 4) LIN (Linearity) liniowość ruchu plemnika wyrażona stosunkiem VSL/VCL w %, 5) STR (Straightness) – prostota ruchu plemnika wyrażona stosunkiem VSL/VAP w % oraz 6) ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement) i 7) BCF (Beat Cross Frequency), czyli, odpowiednio, amplituda bocznych wychyleń główki oraz częstotliwość bocznych odchyleń główki. Zastosowanie CASA umożliwiło również precyzyjne wyznaczenie pojęć, które do tej pory miały charakter opisowy, jak określenie odsetka plemników o ruchu progresywnym (PMOT) oraz podział na subpopulacje męskich gamet w zależności od właściwości ruchowych. Stwierdzono, że na podstawie parametrów prędkości plemników można podzielić je na subpopulacje – o ruchu szybkim (RAPID), umiarkowanym (MODERATE) i wolnym (SLOW) – których liczba zmienia się w nasieniu świeżym i poddanym kriokonserwacji. Wskazuje to na fakt, że ocena struktury subpopulacji plemników może być skuteczna w określeniu przydatności nasienia do kriokonserwacji (16).

Badania przeprowadzone przez Aitkena i wsp. (2, 3) dowodzą większej przydatności do oceny zdolności zapładniającej parametrów ruchu uzyskanych z zastosowaniem CASA w porównaniu do wyników badania standardowego. Właściwościami o szczególnej użyteczności okazały się: wartość boczno odchylenia główki plemnika (ALH), szybkość komórki względem zarejestrowanego toru (VCL) oraz liniowości (STR). W opracowaniach naukowych udowodniono korelacje wyników uzyskanych za pomocą systemu CASA z płodnością samców (14). Yuki Hirano i wsp. (10) wykazali, że wartość VCL, VSL oraz ALH są wysoko skorelowane ze wskaźnikami płodności. ALH i BCF umożliwiają ocenę zdolności plemnika do penetracji osłonki przejrzystej (*zona pellucida*).

Wzrost wartości ALH i obniżenie odsetka plemników o ruchu progresywnym oraz ich korelacja z płodnością samców związana jest z hiperaktywacją plemników. Zjawisko to, rozpatrywane przez naukowców przez przeszło 40 lat, jest częścią procesu kapacytacji, niezbędnego do zapłodnienia. Polega ono na zmianie ruchu plemników – utracie jego postępowego charakteru, gwałtownych zmianach kierunku, dużej amplitudzie wychyleń główki oraz porównywalną z biczem pracą witki. Ten asymetryczny rodzaj ruchu powoduje poruszanie hiperaktywowanych plemników po okręgu lub po torze przypominającym ósemkę (22). Hiperaktywacja umożliwia plemnikom pokonanie światła jajowodu i zalegającego w nim, gęstego śluzu. Ponadto jest niezbędnym warunkiem umożliwiającym penetrację osłonki przejrzystej oraz pokonanie komórek wzgórkaja jajoosnego i wieńca promienistego (22, 26). Znalazło to potwierdzenie w badaniach, które wykazały, że zdolność plemników do tego specyficznego rodzaju ruchu pozytywnie koreluje z ich wiązaniem z osłonką przejrzystą i penetracją do ooplazmy chomika (22).

Pierwsze próby zdefiniowania zjawiska hiperaktywacji polegały na ręcznym wykreślaniu trajektorii plemników. Z czasem zaczęto wykorzystywać komputerowe analizatory do charakterystyki tego zjawiska. Istnieją jednak poważne rozbieżności dotyczące przyjęcia jednolitych kryteriów oraz zakresów wartości poszczególnych parametrów, co znacznie utrudnia identyfikację plemników hiperaktywowanych (26). Zaproponowano wiele różnych definicji charakteryzujących ten rodzaj ruchu (tab. 1). Problem oceny plemników hiperaktywowanych wynika też z faktu, iż jest to zjawisko dynamiczne, ulegające zmianom w czasie. Ten osobliwy sposób poruszania się gamet, określany także jako „star-spin” charakteryzuje się utratą ruchu postępowego, dużą amplitudą wychyleń główki. Odkryto także ruch określanej jako „przejściowy” – w tym przypadku wartość ALH jest mniejsza, praca witki zachowuje odpowiednią synchronizację fali skurczowej, co umożliwia zachowanie prostoliniowego toru ruchu. Pojawiły się sugestie, że ruch „przejściowy” jest pierwszym etapem ruchu plemników hiperakty-

Tab. 1. Czynniki wpływające na wyniki analizy nasienia za pomocą systemu CASA

Czynnik	Efekt
Optyka i źródło światła	Precyzja pomiaru – identyfikacja gamet, śledzenie trajektorii
Rodzaj komory (typ, głębokość)	Ruch plemników – precyzja liczenia komórek, odsetek plemników ruchliwych
Temperatura analizy	Ruch plemników – odsetek plemników ruchliwych, VCL
Koncentracja próbki	Koncentracja, % plemników ruchliwych, parametry kinetyki
Obecność elementów niekomórkowych	Koncentracja, % plemników ruchliwych, parametry opisujące kinetykę
Rozrzedzalniki i rozrzedzenie próbki	Parametry opisujące kinetykę gamet
Częstotliwość odświeżania obrazu	Precyzja wykonania wszystkich pomiarów, zwłaszcza VCL
Liczba rejestrowanych klatek	Precyzja wykonania wszystkich pomiarów
Liczba analizowanych plemników	Precyzja wykonania wszystkich pomiarów
Metoda analizy statystycznej	Precyzja wykonania wszystkich pomiarów

Objaśnienie: VCL (Track Speed Velocity) – szybkość komórki względem zarejestrowanego toru

Tab. 2. Kryteria umożliwiające identyfikację plemników hiperaktywowanych człowieka (wg V. J. Kay, L. Robertson, 1998)

Autorzy	Parametry ruchliwości		
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	LIN %	ALH (μm)
Robertson i wsp. (1988)	> 80	319	–
Mortimer i Mortimer (1990)	100	< 50	5
Grunert i wsp. (1990)	> 91,5	< 33,1	> 9,9
Burkman (1991)	100	365	7,5
Zhu i wsp. (1994b)	90	380	5
Sukcharoen i wsp.	> 90	< 20	–

Objaśnienia: VCL (Track Speed Velocity) – szybkość komórki względem zarejestrowanego toru; LIN (Linearity) – liniowość ruchu plemnika wyrażona stosunkiem VSL/VCL; ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement) – amplituda bocznych wychyleń główki; VSL (Straight Line Velocity) – droga przebyta przez plemnik ruchem prostoliniowym w jednostce czasu

wowanych (29), niekoniecznym jednak do zaistnienia ruchu „star-spin”. Badania Sukcharoena (23) wykazały, że zaproponowane przez niego wartości parametrów charakteryzujących poszczególne rodzaje ruchów (tab. 2) pozwoliły uzyskać 90% skuteczność w identyfikacji plemników hiperaktywowanych.

Morfologia

Komputerowa analiza morfometryczna nasienia umożliwia wykonywanie oceny morfologicznej pozbawionej subiektywności. Dzięki CASA wyeliminowanych zostaje wiele czynników wpływających na rozbieżność wyników uzyskanych metodą konwencjonalną. Ponadto oprogramowanie komputerowe umożliwia identyfikację subtelnych zmian plemników, któ-

rych nie sposób wykryć tradycyjną techniką. Odsetek plemników o prawidłowej morfologii jest skorelowany z płodnością samców, zarówno mężczyzn, ogierów, buhajów, knurów, jak i psów (11, 27). Z uwagi na różne kształty główki plemników ważnym elementem jest adaptacja i dostosowanie systemu do oceny gamet danego gatunku zwierząt. W ostatnich latach coraz liczniej podejmowane są próby walidacji systemów oraz wykonywania komputerowych pomiarów i morfologicznej klasyfikacji plemników u ludzi, buhajów, koni, psów czy knurów (4, 5, 9, 17). Klasyfikacja gamet opiera się na porównaniu wymiarów badanych komórek z wcześniej określonymi wartościami maksymalnymi i minimalnymi takich parametrów, jak: długość główki plemnika w μm (Major Axis), szerokość główki plemnika w μm (Minor Axis), współczynnik Minor Axis/Major Axis $\times 100$ (%) (Elongation), obwód główki w μm (Peri), długość witki w μm (Tale), powierzchnia główki plemnika w μm^2 – Major Axis \times Minor Axis (Area). Na tej podstawie

plemniki klasyfikowane są jako prawidłowe, nieprawidłowe bądź niepoddane analizie, co pozwala określić odsetek plemników o prawidłowej morfologii. W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest informacji na temat wykorzystania komputerowej analizy morfologicznej. Rijsselaere i wsp. (18), porównując wymiary morfometryczne plemników świeżych i rozmrożonych w preparatach barwionych metodą Diff-Quik, zaobserwowali znaczne zmiany. Autorzy sugerują, że mogą one wynikać z zastosowanej procedury mrożenia. Nie udzielają jednak jednoznacznej odpowiedzi, pozostawiając ten problem nierozwiązanym.

Istnieje przypuszczenie, że na podstawie wymiarów morfometrycznych gamet można przewidzieć przydatność plemników do procesu konserwacji w niskich temperaturach (freezability) (1, 17). Problem ten wymaga jednak dogłębnych badań.

Zastosowanie komputerowo wspomaganego analizy morfologicznej i analizy ruchliwości plemników znacznie ułatwia wykonywanie wyżej wymienionych badań oraz eliminuje błędy wynikające z subiektywnej oceny osoby oceniającej. To z kolei daje możliwość obiektywnej interpretacji uzyskanych wyników oraz ich porównywania między różnymi laboratoriami. Ponadto, wykorzystanie komputerowo wspomaganego analizy, dzięki powtarzalności uzyskiwanych wyników, umożliwia miarodajną ocenę nasienia podanego różnorodnym procedurom biotechnologicznym. Jednak najważniejszą zaletą systemu CASA jest możliwość bardziej wnikliwej analizy indywidualnych gamet, zmierzającej do lepszego poznania ich struktury, mechanizmu funkcjonowania oraz panujących między nimi zależności. Tylko nieliczne plemniki docierają do miejsca zapłodnienia, a w warunkach fizjologicznych tylko jeden z nich łączy się z komórką

jajową. Dlatego precyzyjna analiza poszczególnych komórek, którą umożliwia zastosowanie komputerowych analizatorów nasienia, jest tak bardzo istotna, zarówno w diagnostyce, jak i leczeniu niepłodności u samców.

Piśmiennictwo

1. *Abaigar T., Holt W. V., Harrison R. A. P., Barrio G.*: Sperm Subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 1999, 60, 32-41.
2. *Aitken R. J., Best F. M., Richardson D. W., Djahanbakhch O., Less M. M.*: The correlates of fertilizing capacity in normal fertile man. *Fertil. Steril.* 1982, 38, 68-76.
3. *Aitken R. J., Sutton M., Warner P., Richardson D. W.*: Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1985, 73, 441-449.
4. *Anon.*: Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reprod.* 1998, 13, 142-145.
5. *Davis R. O., Gravance C. G., Casey P. J.*: Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 1993, 54, 1808-1811.
6. *Davis R. O., Katz D. F.*: Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 1993, 14, 385-394.
7. *Davis R. O., Katz D. F.*: Standardization and comparability of CASA instruments. *J. Androl.* 1992, 13, 81-86.
8. *Günzel-Apel A. R., Gunther C., Terhaer P., Bader H.*: Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 47 (Suppl), 271-278.
9. *Hirai M., Boersma A., Hoeflich A., Wolf E., Foll J., Aumuller R., Braun J.*: Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J. Androl.* 2001, 22, 104-110.
10. *Hirano Y., Shibahara H., Obara H., Suzuki T., Takamizawa S., Yamaguchi C., Tsunoda H., Sato I.*: Relationship between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rate In Vitro. *J. of Assisted Reprod. And Gen.* 2001, 18, 213-218.
11. *Iguer-Ouada M., Versteegen J. P.*: Evaluation of Hamilton-Thorne computer based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology* 2001, 55, 733-749.
12. *Kraemer M., Fillion C., Martin-Pont B., Auger J.*: Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted spermanalysis system. *Hum. Reprod.* 1998, 13, 611-619.
13. *Liu D. Y., Du Plessi Y. P., Nayudu P. L., Johnston W. I. H., Baker H. W. G.*: The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. *Fertil. Steril.* 1988, 49, 272-277.
14. *Mortimer D., Pandya I. J., Sawers R. S.*: Relationship between human motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1986, 78, 93-102.
15. *Niżański W., Twardoń J., Klimowicz M.*: Komputerowo wspomaganą analizą jakości nasienia – zasady i możliwości. *Życie Wet.* 2006, 81, 121-125.
16. *Nunez-Martinez I., Morgan J. M., Pena F. J.*: A Three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulation in canine ejaculated: changes after cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.* 2006, 41, 408-415.
17. *Nunez-Martinez I., Morgan J. M., Pena F. J.*: Sperm index obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Inter. J. Androl.* 2007, 30, 182-189.
18. *Rijsselaere T., Van Soom A., Hoflack G., Meas D., de Kruif A.*: Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 2004, 62, 1292-1306.
19. *Rijsselaere T., Van Soom A., Meas D., de Kruif A.*: Effect of technical setting on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology* 2003, 60, 1553-1568.
20. *Root Kustritz M. V.*: The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology* 2007, 68, 329-337.
21. *Spiropoulos J.*: Computerized Semen Analysis (CASA) Effect of Semen Concentration and Chamber Depth on Measurement. *Arch. Androl.* 2001, 46, 37-42.
22. *Suarez S. S.*: Control of hyperactivation in sperm. *Human Reprod. Update* 2008, 14, 647-657.
23. *Sukcharoen N.*: Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated human spermatozoa at 25HZ using in vitro fertilization as functional end point. *Hum. Reprod.* 1995, 10, 2928-2937.
24. *Takagi H., Kurihara A., Inoue T., Nakamura I., Kiura M.*: Investigation of usefulness of sperm analyses in dogs for male fertility study. *J. Toxic. Sci.* 2001, 26, 313-321.
25. *Thurston L. M., Watson P. F., Mileham A. J., Holt W. V.*: Morphological sperm subpopulation defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 2001, 22, 382-394.
26. *Turner R. M.*: Tales from the tail: what do we really know review about sperm motility? *J. Androl.* 2003, 24, 790-803.
27. *Versteegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K.*: Computer assisted semen analyzers in andrology research veterinary practice. *Theriogenology* 2002, 57, 149-179.
28. *Wessel M. T., Althouse G. C.*: Validation of an objective approach for simultaneous assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2006, 94, 21-22.
29. *Zhu J. J., Pacey A. A., Barratt C. R. L.*: Computer-assisted measurement of hyperactivation in human spermatozoa: differences between European and American versions of the Hamilton-Thorn motility analyser. *Hum. Reprod.* 1994, 9, 456-462.
30. *Zinaman M. J., Uhler M. L., Vertuno E., Fisher S. G., Clegg E. D.*: Evaluation of Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J. Androl.* 1996, 17, 288-292.

Adres autora: lek. wet. Agnieszka Antończyk, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław; e-mail: tamtara@wp.pl