

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv přídatku nízkodenzitního lipoproteinů na
kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího
ejakulátu – Optidyl vs. Bioxcell**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Barbora Kadlecová

Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Ondřej Šimoník

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv přídatku nízkodenzitního lipoproteinu na kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího ejakulátu – Optidyl vs. Bioxcell" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. MVDr. Radku Ramjonovi, PhD. za vedení práce a Ing. Ondřejovi Šimoníkovi za vedení v laboratoři při experimentu.

Vliv přídatku nízkodenzitního lipoproteinů na kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího ejakulátu – Optidyl vs. Bioxcell

Souhrn

Umělá inseminace kryokonzervovaným spermatem je biotechnologická metoda používaná po celém světě. Problémem kryokonzervace je redukovaná kvalita spermií po rozmrazení, až 50 % spermií ztratí integritu membrány a motilitu. To se dá ovlivnit pomocí ředidel s obsahem kryoprotektantu. Jedním z nejpoužívanějších kryoprotektantů je žloutek ze slepičího vejce. Mechanismus jeho kryoprotektivity je stále nejasný. Obsahuje i faktory, které spermiím škodí. Jeho kryoprotektivní frakcí je nízkodenzitní lipoprotein (LDL – low density lipoprotein), který je v plazmě žloutku. Jeho funkcí by měla být stabilizace membrány, nahrazení fosfolipidů nebo vyvazování škodlivých proteinů ze spermatické membrány. Cílem této studie bylo zjistit, zda přídatok LDL do komerčních ředidel sojového ředidla Bioxcell® a žloutkového ředidla Optidyl®, zlepšuje kvalitu spermií po rozmrazení. Sperma bylo odebráno býkům (n=8) a naředěno podle návodu od výrobce, následně byl přidán LDL v různé procentuální koncentraci (Optidyl®=0 %, 6 %, 8 %, 10 %, Bioxcell®=0 %, 4 %, 6 %, 8 %). Viabilita se hodnotila pomocí barvení fluorescenčními sondami dle Harrison et Vickers (1990) a kinematické parametry pomocí automatizovaného počítačového systému CASA. Analýza se prováděla po rozmrazení a po dvou hodinách inkubace. Viabilita byla na hladině významnosti ($p < 0,05$) nejvyšší u přídatku 8 % LDL do ředidla Bioxcell® (0h=73,4 %, 2h=53,2 %). U ředidla Optidyl® byl nejefektivnější přídatok 8 % LDL (0h=48,2 %, 2h=46,5 %). Procenta motilních spermií (VAP>15) po rozmrazení byla vyšší u ředidla Optidyl® (0h=41,55 %, 2h=33,41 %), než u ředidla Bioxcell® (0h=33,88 %, 2h=27,42 %). Kinematické parametry motility byly nejvyšší na hladině významnosti ($p < 10^{-3}$) u přídatku 8 % LDL do ředidla Optidyl®. U ředidla Bioxcell® nelze udělat závěr, zda byla nejlepší koncentrace pro kinematické parametry 4 % nebo 8 % přídatku LDL. Pro kryokonzervaci býčího semene lze doporučit jako vhodnější 8% koncentraci přídatku LDL do ředidla Optidyl®.

Klíčová slova: býk, sperma, LDL, motilita, ředidla, kryokonzervace

Low-density lipoprotein supplementation effects on cryoprotective properties of selected bull semen extenders – Optidyl vs. Bioxcell

Summary

Artificial insemination with cryopreserved sperm is a biotechnological advancement used worldwide to aid the reproduction of cattle. The main problem of cryopreservation is a reduction in the quality of sperm after thawing. Around 50 % of sperm specimens show that there is membrane loss both in terms of motility and integrity. This might be reduced with careful selection of the appropriate extender supplements. One of the most popular cryoprotective supplement is the egg yolk from a hen. How best to reduce the negative effects of cryopreservation is still unclear and can, if applied incorrectly, even worsen the quality of the sperm. One known method to protect and support cryopreservation successfully is use of low density lipoprotein (LDL), which is part of the egg yolk's plasma which should stabilise the membrane, replace the phospholipids or aid the removal of harmful proteins from the sperm's membrane. The main purpose of this study is to establish whether the addition of LDL to commercial extenders soya lecithin based Bioxcell® and hen's egg yolk based Optidyl® will improve sperm quality after thawing. Sperm has been collected from eight bulls and diluted with extenders following the instructions of the producer. LDL was added with varying percentage concentration levels (Optidyl®=0 %, 6 %, 8 %, 10 %, Bioxcell®=0 %, 4 %, 6 %, 8 %). The viability of the bull semen was then evaluated with the use of fluorescent probes in accordance with the recommendation of Harrison et Vickers (1990) and with kinematic parameters in accordance with the automatic computer programme, CASA. The analysis of the results was performed after thawing and following two hours of incubation. Viability was significant ($p < 0,05$), with the most successful results obtained with the use of 8 % LDL to Bioxcell® (0h=73,5 %, 2h=53,2 %). Optidyl® was most successful with an 8 % supplement of LDL (0h=48,2 %, 2h=46,5 %). Sperm motility after thawing (VAP>15) was greater with the use of Optidyl® (0h=41,55%, 2h=33,41%), than Bioxcell® (0h=33,88 %, 2h=27,42 %). Kinematic parameters were ($p < 10^{-3}$) highest with the addition of 8 % of LDL into Optidyl®. Unfortunately we are unable to confirm if an addition of concentration 4 % or 8 % LDL is better for Bioxcell®. What we can recommend is the addition of an 8 % LDL concentration into Optidyl® extender.

Keywords: bull, sperm, LDL, motility, extender, cryopreservation

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Historie	3
3.2 Ejakulát	6
3.3 Hodnocení kvality ejakulátu	8
3.4 Funkční testy spermií	11
3.5 Kryokonzervace	14
3.6 Kryokonzervační ředidla	19
3.7 Současný stav komerčních ředidel	32
4 Materiál a metody	33
5 Výsledky	36
6 Diskuze	51
7 Závěr	54
8 Seznam literatury	55
9 Seznam použitých zkratek	61

1 Úvod

Umělá inseminace je nejpoužívanější biotechnologie na světě (Vera-Munoz et al, 2009). Rozvoj výzkumu kryokonzervace začal roku 1949 objevem kryoprotektivních vlastností glycerolu (Celeghini et al, 2007). Výzkum je stále vyvíjen zeměmi celého světa. Přínos kryokonzervace tkví v použití na farmách, kde přináší možnost použití několika málo elitních býků s nejlepší prověřenou genetikou na široké spektrum krav. V porovnání s přirozenou plemenitbou umožňuje kryokonzervované sperma mnohem větší a rychlejší šlechtitelský pokrok (Vera-Munoz et al, 2009). Slabostí mraženého spermatu je, že oproti čerstvému spermatu má nižší hodnoty oplozeníschopnosti, což vede k potřebě neustálého vývoje nových technologií kryokonzervace (Tuncer et al, 2010). Až 40-50 % živých spermií ztratí během procesu kryokonzervace funkci a integritu. Tato čísla mohou být redukována pomocí výzkumu a vývoje optimálního zchlazování a ředidel (Hu et al, 2010). Od roku 1949 nebyl zaznamenán příliš velký pokrok ve vývoji ředidel (Holt, 2000). Významného zlepšení lze dosáhnout použitím ředidel, která interagují se spermatem a poskytují mu během procesu kryokonzervace ochranu. Žloutek z vejce slepice je nyní široce používán jako kryoprotektant v ředidlech spermatu. Jeho výhoda tkví v nízkodenzitním lipoproteinu (LDL-low density lipoprotein), který obsahuje. Pace a Graham (1974) zjistili, že frakce LDL vykazuje kryoprotektivní vlastnosti. To bylo potvrzeno i mnoha dalšími studiemi. Vývoj používání LDL ředidla místo konvenčního celožloutkového je tedy aktuální. Jeho výhodou je lepší chemická definice. Vlastnosti LDL ale nejsou ještě zcela prozkoumány (Tuncer et al, 2010).

2 Cíl práce

LDL izolovaný z vaječného žloutku je odpovědný za kryoprotektivní účinky vaječného žloutku v ředidlech ejakulátu. Cílem této práce je ověřit hypotézy, že přidavek LDL do vybraných ředidel (Optidyl®, Bioxcell®) zlepší parametry kvality kryokonzervovaných býčích spermií, a že tento efekt bude výraznější v případě bezžloutkového ředidla Bioxcell®.

Dílními cíli řešení bude v inseminačních dávkách býků ředěných žloutkovým ředidlem Optidyl® nebo bezžloutkovým ředidlem Bioxcell® s rozdílným přídatkem LDL stanovit po rozmrazení:

- a) parametry motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermatu (CASA),
- b) parametry přežitelnosti spermií metodou fluorescenčního barvení

a zhodnotit efekty použitého ředidla a přídatku LDL na základě statistické analýzy.

3 Literární rešerše

Kryokonzervace semene je pokročilá technika používaná po celém světě, která prodlužuje životaschopnost spermiím pomocí redukce jejich metabolické aktivity a produkce toxinů (Kaka et al, 2014). Její problematika je řešena již delší dobu, nicméně výsledky stagnují. Od prvních pokusů o kryokonzervaci až po dnešní dny se stále vypořádáváme se zhoršenou motilitou spermií po rozmrazení (Walters et al, 2009). Přes pokroky ve vývoji ředidel jako je určení správného zchlazování a mražení, kryokonzervace stále způsobuje poškození velkému množství buněčných struktur (Celeghini et al, 2007). Toto poškození můžeme ovlivnit pomocí vývoje nových protokolů a použití správných kryoprotektantů (Kaka et al, 2014).

Výsledná kvalita je ovlivněna už kvalitou výchozího zpracování. Vedle biologie samce je důležitý i odběr. Je tedy důležité použít správnou techniku odběru spermatu (Barszcz, 2012).

3.1 Historie

Kryokonzervace je ve veterinární medicíně blízce spojena s vývojem umělé inseminace (Walters et al, 2004). Má se za to, že první úspěšnou umělou inseminaci provedl Lazzaro Spallanzani v roce 1780 v Itálii. Inseminoval hárající fenu pomocí jehly, kterou inseminoval semeno přímo do dělohy. Za 62 dnů se narodila tři štěňata, která odpovídala feně i dárci semene. První zmínky o pokusu provedení kryokonzervace semene jsou právě od Spallanzaniho, který zkoušel zamrazit semeno pomocí sněhu (Pesch et Hofmann, 2007). V roce 1799 John Hunter pokračoval v jeho práci a podařilo se mu dosáhnout těhotenství u ženy pomocí umělé inseminace (Walters et al, 2009). O sto let později Repiquet (1885) publikoval studii „O teoretických možnostech praktického využití umělé inseminace“ a postuloval úspěšnou aplikaci umělého oplodnění jako nástroje pro možnosti šlechtění zvířat. Výzkum vývoje umělé inseminace a kryokonzervace semene byl publikován okolo 20. století (Pesch et Hoffmann, 2007).

V roce 1880 byl objeven potenciál umělého oplodnění u zvířat, díky kterému se dá dosáhnout zvýšení plodnosti a zvýšení počtu potomků, které může býk produkovat během života. Anglický šlechtitel psů mezi lety 1884 a 1896 použil umělou inseminaci na šlechtění několika fen pomocí jednoho ejakulátu. Okolo té samé doby francouzský veterinář potvrdil efektivitu umělé inseminace jako cestu pro řešení plodnosti u koní. Tyto výsledky započaly používání efektivnosti umělé inseminace. Zaměstnanci center koňské reprodukce začali cestovat po celé Evropě, odebírat semeno a šlechtit klisny. V Moskvě Ivanov (1907, 1912) zahájil výzkum umělého oplození na ovcích a Milovanov (1927);(citováno Maxwell et Salomon, 2000) pokračoval v jeho práci. Od roku 1927 bylo umělé oplodnění široce používáno v šlechtitelském programu u skotu (Pesch et Hoffmann, 2007). Výzkumy techniky umělého oplodnění, tréninku techniků a zlepšování metod odběru semene a jeho ředění pokračovaly a v roce 1938 bylo oznámeno, že v Rusku bylo uměle oplodněno 40 000 klisen, 1,2 milionů krav a 15 milionů ovcí (Walters et al, 2009).

Na začátku 19. století většina výzkumu umělé inseminace probíhala na území Evropy nebo Ruska, ale i v USA byly úspěšné pokusy na koních a skotu. V roce 1907 se narodilo tele po použití umělé inseminace L. L. Lewisem v Oklahomské experimentální stanici. Po tomto úspěšném pokusu u skotu se zvýšil zájem o použití umělého oplodnění v USA. V roce 1937 začal jeho výzkum na Univerzitě v Missouri a později i na ostatních zemědělských univerzitách jako Cornell, Minnesota, Nebraska, Wisconsin a Tennessee. V roce 1939 byla na vývoj protokolů pro odběr, hodnocení a konzervaci spermatu domácích zvířat, hlavně býků, výzkumnými týmy z několika univerzit založena Americká společnost živočišné produkce (ASAP) (Foote, 1998). Věřilo se, že s investicemi do výzkumu a vývoje umělého oplodnění začne být mlékárenský průmysl USA progresivní a bude mít šlechtitelské programy, díky kterým začne dobývat šlechtění z genetické perspektivy (Walters et al, 2009).

Výzkumné programy napříč celou USA tedy začaly zkoumat biologii spermatu, hlavně vývoj metod odběru, nástrojů a vybavení, hodnocení spermatu, morfologie, složení ředidel spermatu pro biologii spermatu a fundamentální kryokonzervaci (Foote, 1998). Vývoj protokolů na používání kryokonzervovaného semene býků, kteří mají využití v průmyslu umělého oplození a v mlékárenském průmyslu začal v 50. letech 20. století. Bratton et al, (1955), dokázali pokusem v polních podmínkách, že býčí sperma zmrazené na $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$, uchované na suchém ledu, může stále vykazovat vysokou plodnost. Poté bylo vyvíjeno několik různých ředidel, které by dokázaly zachovat vysokou úroveň motility rozmrazeného

spermatu. V anglojazyčné literatuře se po diskuzi zavedl název „extender“ jako zvětšovač objemu, namísto „diluent“ jako ředidlo (Walters et al, 2009).

Milníkem v rozvoji používání chlazeného semene bylo zjištění, že lipidy ze slepičího žloutku mohou ochraňovat býčí spermie před chladovým šokem, což je citlivost buněk na redukované teploty (Pesch et Hoffmann, 2007).

Pro vyřešení problematiky kryokonzervace se hledaly i další možné kryoprotektivní složky ředidel. Bernstein a Petropavlovsky (1937) byli první, kdo popsal použití 9,2 % glycerolu pro kryokonzervaci savčího semene. Kryoprotektivní vlastnosti glycerolu byly zaměřeny výzkumem Polga et al (1949) a Polga et Rowsona (1952);(Pesch et Hoffman, 2007). Následná práce lipidů v kombinaci s objevem kryoprotektivních vlastností glycerolu započala vývoj mrazících ředidel pro kryokonzervaci býčího semene. Součet těchto objevů vyústil v mrazící ředidlo Tris-egg yolk glycerol pro kryokonzervaci býčího spermatu, které je dnes standardně používáno (Walters et al, 2009).

Kvůli rozvoji mlékárenského průmyslu se mezi lety 1950 a 1960 zvedla poptávka po spermatu, které by bylo možno skladovat delší dobu. Tím pádem se vývoj kryokonzervace stal hlavním cílem výzkumu v zemědělství a vývoj úspěšné kryokonzervace savčích spermií byl zahájen. Je třeba zdůraznit, že i v dnešní době lze efektivně kryokonzervovat jen několik druhů savčích spermií. V těchto případech je ještě úspěch vyjádřen pouze motilitou po rozmrazení, která je často až o 50 % menší, než byla před kryokonzervací. Úspěšné kryokonzervace se vysoce liší mezidruhově, individuálně u jednoho druhu, i v ejakulátech jednotlivců. Rozdíly jsou silně spjaty s rozdíly biofyzických charakteristik napříč typy buněk (Walters et al, 2009).

3.2 Ejakulát

Výchozí kvalita čerstvého ejakulátu je důležitá pro úspěšnost kryokonzervace. Ejakulát se skládá ze dvou frakcí, spermií a seminální plazmy. Výsledné složení záleží na velikosti a vývinu přídatných pohlavních žláz, podílu sekretu z reprodukčních orgánů a objemu spermií. U býka je složení spermatu z 50 % sekret z alveolární žlázy, 25 % z bulbouretrální žlázy, 7 % z nadvarlat, 5 % z prostaty a 14 % tvoří spermie (Barszcz, 2012).

Seminální plazma se skládá z vody (90g/100ml), bílkovin (6,8g/100 ml), fruktózy (460-600 mg%), sorbitolu (10-140 mg%), kyseliny citronové (620-800 mg%), glycerofosfocholinu (350 mg%) a inositolu (60 mg%) (Barszcz et al, 2012).

Při ejakulaci je seminální plazma smíchána s epididymálním spermatem a slouží jako nosič do samičího pohlavního traktu. Pro spermie může být přínosná i škodlivá. Některé faktory seminální plazmy podporují funkce spermií jako je motilita, životnost a schopnost oplození, které usnadňují kapacitaci. Pomáhají v prevenci vzniku spontánní kapacity nebo exocytózy akrozomu, kvůli které ztratí oplozeníschopnost. Pokud sperma vysoce ředíme, ředíme i tyto přídatné benefiční složky, čímž snižujeme ochranu spermií (Vera-Munoz et al, 2009). Nicméně seminální plazma je také známá tím, že obsahuje i faktory, které škodí jejich schopnosti oplození. Je tím například dekapacitační faktor. Při kryokonzervaci mohou tyto faktory negativně ovlivňovat životaschopnost spermií (Bergeron et al., 2003).

Druhou částí ejakulátu jsou spermie. Jsou to pohyblivé samčí gamety utvářené v procesu spermiogeneze ze zárodečných buněk ve varlatech. Z varlat cestují do nadvarlat, kde probíhá jejich dozrávání. Plně zralé spermie mají hlavičku s jádrem obsahujícím haploidní počet chromozomů, bičík s aparátem pro pohyb a krček s mitochondriemi, který spojuje hlavičku s bičíkem. Celá spermie je pokrytá plazmatickou membránou, *plasmalemmou*. Na hlavičce spermie je umístěn akrozom, dvojitá struktura mezi plazmatickou membránou a *anterior portion* (Hafez et Hafez, 2000).

Spermie v samičím reprodukčním traktu procházejí sérií biochemických a fyziologických změn, souhrnně nazývaných akrozomální reakce (Ickowicz et al, 2012). Membrána akrozomu zanikne během fúze a vypuštění (Gadella et al, 2001) akrozomálních hydrolytických enzymů jako je hyaluronidáza (Hafez et Hafez, 2000), které pomáhají při navázání na *zonu pellicudu* (ZP) samičí gamety, vajíčka (Bedford, 1970). Připojení na ZP způsobí výtrysk kationtů vápníku (Ca^{2+}), které způsobí fúzi membrány na několika místech. Ty změni vnější akrozomální membránu na formu vezikulů, které dispergují na ZP a vypustí hydrolytické enzymy. Tyto enzymy pomáhají při natrávení ZP. Ztráta dvou vnějších membrán odkryje vnitřní akrozomální membránu jako novou vnější membránu a ta začne zastávat funkci jako plazmatická membrána. Vnitřní akrozomální reakce se druhotně připojí na ZP a spermie, které reagovaly správně, penetrují ZP a vstoupí do perivitelinního prostoru, kde se navážou na *oolemu* vajíčka. Po laterální navázání se membrána a *oolema* spojí a spermie je inkorporována do oocytu, který se aktivuje a zahájí efektivní blokaci polyspermie (Gadella et al, 2001).

Pro úspěšnost kryokonzervace jsou důležité další faktory. Semeno býků pod 18 měsíců věku odebírané pro potřeby umělé inseminace by mělo obsahovat minimálně 60 % spermií se správnou progresivitou. Dále by mělo obsahovat alespoň 80 % spermií bez morfologických změn a 500 000 spermií na 1 mm³. U býků nad 18 měsíců stáří je požadováno nad 70 % spermií se správnou progresivitou, ostatní požadavky jsou stejné (Barszcz et al, 2012).

Na kvalitu ejakulátu mají vliv různé typy a techniky odběru. Býci jsou vybíráni pečlivě na základě přísných kritérií z hlediska kvality, šlechtitelské ceny, zdraví a sexuálního chování (Barszcz et al, 2012).

Odběr se nejčastěji provádí pomocí umělé vagíny, která má dvojitou vrstvu vyplněnou vodou ohřátou na 42-50 °C. Důležitým faktorem pro získání kvalitního spermatu je také tlak. Pro odběr semene za pomoci umělé vagíny jsou zapotřebí dva technici. Semeno je možné odebrat i pomocí transrektální palpce. Dále je možné použít i elektroejakulaci, která stimuluje pánevní nervy sympatiku i parasympatiku pomocí pulsů nízkých voltů a ampérů, což způsobí erekci a ejakulaci (Baracaldo et al, 2007).

3.3 Hodnocení kvality ejakulátu

Hodnocení spermatu je velice důležitá součást procesu před samotnou kryokonzervací, kdy se klade důraz na výběr pouze semene odpovídajícího kritériím pro další zpracování. První částí hodnocení po odběru je makroskopická, tedy vizuální a pachová kontrola. Během hodnocení objemu spermatu se zvažuje i věk býka, protože množství odebraného semene se zvyšuje s růstem býků a s jejich věkem. Redukovaný objem také ukazuje špatný postup v přípravě býka nebo na chyby během odběru. Změna v parametrech obvykle ukazuje možnost onemocnění urogenitálního traktu (Barszcz et al, 2012).

Objem býčího ejakulátu by měl být 2-8 ml, barva bílá s charakteristickým krémovým odstínem, textura mléčná, krémově mléčná nebo krémová. Pach by měl odpovídat kravskému mléku, koncentrace $0,6-1,5 \times 10^6$ v mm^3 . Sperma by mělo mít pH 6,2-6,8 (Barszcz et al, 2012).

Vizuální kontrola může objevit změnu barvy semene, která je signálem patologických změn semene. Růžová nebo červená barva může poukazovat na obsah krve ve spermatu, což může být důsledek abraze penisu, narušení krevních cév nebo prezence močových kamenů. Zelená může poukazovat na přítomnost hnisu. Žlutá barva semene indikuje přítomnost moči. Vodovitě bílá může znamenat malý počet spermií, nebo vodu unikající z umělé vagíny. Všechny nečistoty, jako jsou chlupy, sláma nebo prach jsou nežádoucí. V ideálním semeni nejsou žádné shluky a sraženiny. Pokud se nějaké sraženiny objeví až po odběru, můžou to být shluky neživých spermií nebo zánětlivé buňky (Barszcz et al, 2012).

Morfologie

Detailnější informace o kvalitě spermií se zjišťují pomocí mikroskopu (Barszcz et al, 2012).

Pozorovaným spermiím se hodnotí morfologický tvar na základě ideálního zdravého tvaru hodnoceného druhu. Kromě zdravých jsou ve spermatu obsaženy i spermie s defektními poškozeními. Morfologické vyhodnocení ejakulátu porovnává celkový obsah spermií ve vzorku s typy a množstvím obsažených poškozených spermií. Hodnocení se také zabývá udáním množství obsažených ostatních buněk, jako jsou leukocyty, erytrocyty a epiteliální buňky (Barszcz et al, 2012).

Důvod vzniku poškozených spermií může být genetický, environmentální, nebo kombinace obojího. Abnormality spermií jsou klasifikovány jako dědičného původu (Chenoweth, 2005).

Mezi dědičné poruchy patří například: defekty akrozomu (kulatý, zmačkaný, nekompletní), defekty hlavičky (abnormální kondenzace DNA, bez hlavičky, plochá hlavička, srolovaná hlavička, jaderný výhřez), abnormality krčku (dag efekt, pseudo kapka), abnormality bičíku (Chenoweth, 2005).

Poškození se dělí na primární a sekundární. Primárním poškozením se nazývá to, které vzniklo během spermiogeneze. Poškození, která vzniknou až po spermiogenezi, se nazývají sekundární. Primární defekty ovlivňují plodnost více, než sekundární defekty. Dále se poškození hodnotí jako hlavní a vedlejší, podle jeho vlivu na plodnost. Hlavní poškození je to, které má prokázanou spojitost s poškozením plodnosti. Vedlejší poškození je to, které nepoškozuje plodnost natolik (Chenoweth, 2005).

Morfologie býčích spermií se hodnotí vizuálně pod mikroskopem nebo například pomocí automatizovaného počítačového programu Hamilton Thorne s integrovaným vizuálním systémem (IVOS) po nabarvení podle Farrelého (Boersma et al, 2001) nebo jiným barvením jako je například Rapid Panoptic, Hemacolor nebo Harriss Haematocilin. Použitý protokol barvení může mít velký vliv na přesnost počítání (García-Herreros et al, 2006). Semeno se také hodnotí spektrofotometrickou analýzou. Může se lišit podle protokolů laboratoří, například se vzorek 0,02 ml naředí 1:200 fyziologickým roztokem Natrium Chlorátum 0,9 % a umístí ho do makro kivity. Výsledek analýzy je vytištěný papír s informacemi, jako je datum analýzy, číslo vzorku, koncentrace spermií, objem ejakulátu, koncentrace spermií v jedné dávce, objem požadovaného ředidla, počet zhotovených dávek z ejakulátu (Barszcz et al, 2012).

Motilita

Motilita spermií je zčásti závislá na membránovém transportu. Větší část spermií ztratí během kryokonzervace membránovou integritu, než motilitu. Některé spermie mohou být tedy po rozmražení stále pohyblivé, ale přesto poškozené (Hu et al, 2010).

Norman et al (1962) uvádí, že motilita spermií může být poškozena i vnějšími vlivy, jako je vystavení přímému světlu (Foote, 1982).

Častější původ poškozených spermií je z vnějšího prostředí. Dále může mít na kvalitu spermií vliv i genetická variabilita, inbreední býci mají více poškozených spermií, než outcrossoví (Chenoweth, 2005).

Hodnocení pohybu spermií se liší podle protokolů laboratoře. Je možné vzorek umístit na vyhřívanou podložku na 37 °C a je zakryt krycím sklíčkem. Nejdříve se na zvětšení 50x a 200x hodnotí progresse spermií, která se nazývá také vlnění. Vyhodnocuje se procento spermií se správným požadovaným progresem a úroveň aglutinace naředěného semene. Progrese se nazývá vlnění, protože je indukována progresí jednotlivé spermie. Hustota semene odráží intenzitu této progrese. Hodnotí se na číselné škále od nuly do pěti, přičemž pět znamená nejvyšší progresi a spermie používané pro účely umělé inseminace by měly mít hodnocení alespoň tři (Barszcz et al, 2012). Dále je možné motilitu sledovat pomocí automatizovaných počítačových systémů, jako je například CASA (Computer-assisted sperm analysis) (Amann et Waberski, 2014).

CASA je schopna vytvořit objektivní a opakovatelnou analýzu pohybu spermií jako změření oplozeníschopnosti a ujištění kvality semene používaného na umělou inseminaci (Elsayed et al, 2015).

System použití CASA má tři fáze. První fází je pořízení videosekvence mikroskopického obrazu ejakulátu. Druhá část je detekce objektů založena na intenzitě pixelů nebo světelném rozptylu ve snímku. Třetí část zahrnuje aplikaci speciálního softwaru, který extrahuje požadované informace a vytvoří požadovaný výstup (Amann et Waberski, 2014). Systémy mohou sledovat mnoho hodnot pro morfologické posouzení každé sledované spermie (Boyers et al, 1989). Pokud je měřen ten samý vzorek dvěma různými systémy CASA, nebudou pravděpodobně výsledky úplně identické. Hardware a algoritmy různých systému CASA jsou totiž rozdílné, přesnost a citlivost každého výstupu záleží na systémových náležitostech softwaru. Hodnotu každého výstupu motility nebo koncentrace spermií ovlivňuje použitý ředící roztok, hloubka komůrky, hardware a nastavení individuálního nástroje (Amann et Waberski, 2014).

Hodnocení pohybu spermií pomocí CASA je založeno na kinematických parametrech individuální spermie, které jsou rekonstruovány jen z pohybu hlaviček. Obvykle CASA nedovoluje přímou analýzu pohybu samotného bičíku (Schmidt et Kamp, 2004).

Bohužel pro objektivitu studie systémy CASA měří mnoho pohybových atributů každé buňky, ale nejsou vzájemně nezávislé. Mnoho z nich může způsobit úspěch nebo selhání daného experimentu. Pravděpodobnost, že ve statistickém vyhodnocení bude chyba prvního stupně, zvyšují všechny faktory, od nánosu shluku spermií po prasknutí membrány. Proto se před experimentem nastaví různé stupně zadaných hodnot podle důležitosti biologického rozmezí pro různé podmínky a předpoklady. Tyto hodnoty mohou být nízké, střední i vysoké (Amann et Waberski, 2014).

Systém CASA zahrnuje kontrolu kvality a věrohodnosti výsledků a jejich chybovost. V centrech produkce semene je kontrola kvality velice důležitá a zahrnuje zjištění nekvalitních vzorků, které by měly být vyřazeny (Amann et Waberski, 2014).

Ujištění o kvalitě zajišťuje prevenci defektů ve výsledcích pomocí systematických kontrol, zda stroje a technika pracují správně a bezchybně (Amann et Waberski, 2014).

Úspěch asistované reprodukce by mohl být zlepšen pomocí výzkumu molekul vstupujících do buňky a interagujících s plazmatickou membránou spermií. Proto má CASA roli v mnoho studiích zahrnujících výzkum ředidel spermatu (Farrell et al, 1996).

3.4 Funkční testy spermií

Dvě hlavní kritéria pro hodnocení spermatu býka jsou motilita a morfologie (Thundathil et al, 2000). Kromě nich ale existují i další parametry hodnocení pro přesnější předpověď oplozeníschopnosti jako například index fragmentace DNA a integrita plazmatické membrány. Pro vyšší spolehlivost určení oplozeníschopnosti je lepší použít kombinaci více testů (Kasimanickam et al, 2006).

Přežitelnost

Dalším velmi důležitým parametrem hodnocení kvality spermií je viabilita (Jankovicova et al, 2008). Pro správné fungování buňky je základem integrita membrány (Harrison et Vickers, 1990). Hodnotí se intaktní membrána pomocí barvení například metodou Hoechst (Jankovicova et al, 2008) barvicí metodou eosin-nigrosin (Samplaski et al, 2015) nebo fluorescenčním hráškovým glutinem (FITC-PSA – fluorescein isothyocyanate pisum sativum agglutin) (Jankovicova et al, 2008).

Garner et al (1986) popsali použití dvou fluorescentních sond, karboxyfluorescein diacetát a propidium jodid, spermií skotu i jiných druhů. Propidium jodid, který se váže na buněčné DNA a neprostupuje skrze intaktní plazmatickou membránu, a tudíž může prostoupit a obarvit jen poškozené, propustné, buňky. Oproti tomu, pro karboxyfluorescein diacetát je intaktní membrána propustná a poté není schopen buňku opustit. Uvnitř buňky se deesterifikuje nespecifickými esterázami. Volný karboxyfluorescein neprostupuje skrze membránu a je fluorescentní, to způsobuje zelenou fluorescenci (Harrison et Vickers, 1990).

Stav membrán

Dalším funkčním testem je HOS test. Jeho principem je svinutí spermií vystavených hypotonickému prostředí. Objem spermie se zvětší díky osmotickému nasátí okolní vody, plazmatická membrána spermie tedy kvůli zachování stability zařídí svinutí bičíku. Pokud ale dosáhne kritického množství objemu, praskne a bičík se narovná. Býčí sperma s maximálně svinutým bičíkem zvětší svůj objem až 3,5-4x. Pokud koncentrace soli stoupne zpět na isotonickou, spermie vypustí vodu a narovná bičík do normálního pohybu. Svinutí tedy manifestuje redukovanou specifickou gravitaci epidydimálních býčích spermií. Svinuté spermie v ejakulátu jsou tedy z důvodu hypoosmotického otoku. Díky tomuto mechanismu je možné pomocí mikroskopu pozorovat spermie s narušenou funkcí membrány (Drevius et Eriksson, 1966). Jelikož je HOS test rychlá a jednoduchá metoda, je často používán (Revell et Mrode, 1994).

Integrita akrozomu a kapacitace

Kapacitace se indukuje v ionoforu kalcia A23187 (Larson, 1999) a biochemické změny na akrozomu se dají sledovat pomocí fluorescenčních sond jako například Coomassie Blue G-250, hráškový aglutin (FITC-PSA - fluorescein isothyocyanate pisum sativum agglutin), arašídový aglutin (FITC-PNA - fluorescein isothyocyanate peanut agglutin), Merocyanine 540 nebo chlortetracyklin (CTC), jehož fluorescence je závislá na kationtech vápníku (Rathi et al, 2001).

Aktivita mitochondrií

Membrána mitochondrií je vysoce citlivá na proces kryokonzervace. Je z 65-70 % složena z termodynamických fosfolipidů, kterým se během chlazení nevratně změní struktura z tekuté na gelovou (Bucak et al, 2015). Jejich aktivita může hodnotit podle Garnera et al (1997) kdy se barví fluoroforem nebo MitoTrackerem Green FM. Poté se použije průtokový cytometr a aktivita mitochondrií se hodnotí podle výkazu fluorescenčních barev, červené nebo zelené (Garner et al, 1997).

Integrita DNA

Test struktury chromatinu se provádí za použití akridinové oranžičky objevené a vyvinuté Evensonem et al (1980) je široce používaná v hodnocení vztahu fragmentace DNA k oplození schopnosti. Fragmentace DNA zahrnuje poškození jednovláknových i dvouvláknových DNA. Excesivní interakce napříč protaminy může vést k destabilizaci chromatinu, což má za následek paternální jadernou formaci s indukci brzkého zániku embrya. Kondenzace chromatinu a stabilita jsou hlavní faktory pro úspěšné oplození, kterých je třeba dosáhnout, pokud se hodnotí oplozovací potenciál vzorku semene (Kasimanickam et al, 2006).

Barvení používá metachromatické vlastnosti akridinové oranžičky na rozlišení mezi nízkým pH nebo teplem denaturované (červená fluorescence jednovláknové) a živé (zelená fluorescence dvojité šroubovice) DNA v chromatinu spermie. Evenson et al (1980) doložili, že býčí a lidské sperma je oplození schopnější, pokud má odolnější jádro spermatu (Evenson et al, 1998).

Teplotní denaturace DNA *in situ* záleží na struktuře chromatinu, její změny v konformaci chromatinu jsou spojeny s plodností. Průtoková cytometrie jader spermií je novým nezávislým testem pro určení samčí plodnosti (Evenson et al, 1980).

3.5 Kryokonzervace

Kryokonzervace spočívá v zchlazení, zamrazení a následném rozmrazení. Po zvýšení teploty dochází obnovení funkcí spermií (Barszcz, 2012).

Základem pro úspěšnou kryokonzervaci je správné naředění spermatu. Po kontrole parametrů spermií se tedy sperma naředí zvoleným kryoprotektantem (Barszcz et al, 2012). Sperma se ředí a konzervuje pro zvýšení objemu, prodloužení oplozovací schopnosti spermií, pro omezení pohybu, zachování oplozovací schopnosti a vyvolání reverzibilního stavu, anabiózy. Pokud nejsou spermie naředěny, ztrácí elektrický náboj, což způsobuje vysoká koncentrace elektrolytů. Tomu lze předcházet přidáním například neelektrolytických látek, které jsou i zdrojem energie, jako jsou cukry, proteiny a aminokyseliny. Přidávají se i ionty sodíku a draslíku, které jsou důležité pro osmotický tlak, ionty fosfátové s pufrovací schopností, ionty bikarbonátů pro dýchání a nastavení pH, vápník a hořčík pro enzymatické procesy a síra pro syntézu bílkovin. Ředidla zajišťují metabolismus spermií, chrání je před chladovým šokem, zajišťují vhodnou osmolaritu, zajišťují vhodný poměr v zastoupení elektrolytů a neelektrolytů, jsou v nich látky tlumící rozvoj mikroflóry, vhodné pufrů a látky minimalizující peroxidaci lipidů (Satorre et al, 2012). Většinou se semeno naředí tak, aby po rozmrazení obsahovalo 10×10^6 aktivních spermií (Foote, 1982).

Pro plnění se používají 0,25 ml polyvinilové slámky. Takto malé objemy napomáhají rovnoměrnému promrzávání. Důležitým krokem je řádná identifikace. Na slámku je natisknut symbol plemene, jméno býka a jeho číslo, číslo inseminační stanice, datum odběru a číslo skoku (Barszcz et al 2012).

Následně se semeno ekvilibruje pro vyrovnání osmotického tlaku. Poté se slámky dají postupně zchladit podle předepsaných protokolů laboratoře, používá se například chlazení během 3,5-4 hodin na teplotu 4 °C (Barszcz et al, 2012). Chladit se může i pouze 1-2 hodiny. Čas chlazení je variabilní také na základě druhu ředidla a druhu zvířete. Před zamrazením se znovu kontroluje objem ejakulátu, koncentrace, poměr živých spermií a morfologie (Foote, 1982).

Následně se dají zamrazit. I tento postup se může lišit na základě protokolů laboratoře, možné je mrazit podle naprogramované křivky zamrazování během 7 minut na teplotu -140°C , nebo za 10 min z $+5^{\circ}\text{C}$ na -100°C (Foote, 1982), nebo po naředění teplota klesá 3-4 $^{\circ}\text{C}$ za hodinu (Satorre et al, 2012). Následně se naskladní do tekutého dusíku, který má teplotu -196°C . Všechny tyto kroky jsou zátěží pro kvalitu a funkce spermií (Barszcz et al, 2012).

Důležitým krokem technologie kryokonzervace je proces rozmrazení. Skládá se ze dvou částí, rozmrazovací křivky a finální teploty rozmraženého semene. Většinou se preferuje rychlé rozmrazování, hlavně pokud bylo rychlé i mražení. Při použití rychlého rozmrazení se během rozmrazování vytvoří méně času pro zformování ledových krystalků, které poškozují spermie. Z praktických důvodů se semeno většinou rozmrazuje ve vodní lázni v tělesné teplotě. Většina organizací vlastnících výrobu inseminačních dávek má vlastní specifické instrukce pro postup rozmrazování jejich semene, aby se poškození během rozmrazování co nejvíce redukovalo. Protokoly postupu rozmrazení závisí na používaném ředidle a zamrazovací proceduře (Foote, 1982).

Rozmrazuje se například ve vodní lázni na 5 minut v teplotě 35°C (Thundathil et al, 2000). Na správnost výsledků jsou různé pohledy. Některé zdroje uvádějí, že po rozmrazení by semeno býka mělo obsahovat alespoň 50 % spermií s progresivním pohybem, 6 milionů spermií s progresivním pohybem a 80 % spermií bez morfologických změn (Barszcz et al, 2012).

Přes všechny tyto kroky je kryokonzervace semene stále spojena se změnami, které poškozují spermie a redukují životaschopnost spermií až o 50 % (Akhter et al, 2014). Hlavní ochranou roli před náhlými teplotními změnami hrají kryoprotektanty, které ochraňují před chladovým i tepelným šokem. Takové šoky mohou změnit prostředí spermatu a tudíž poškodit integritu a funkci akrozomu, jádra, mitochondrie, axony i plazmatické membrány (Sharafi et al, 2009).

Mechanismy poškození spermií během kryokonzervace

Kryokonzervaci semene komplikuje mnoho faktorů. Zchlazování, mražení a následné rozmrazování vytváří oxidativní stres poškozující spermatickou membránu. Tento stres vede ke ztrátě motility, otokům a poškození akrozomální membrány. To způsobuje protržení nebo zvýšenou propustnost plazmatické membrány spermie (Tuncer et al, 2010). Pro oplozovací kompetenci spermatu je ale potřeba, aby plazmatická membrána, akrozomální membrána, mitochondriální membrána a ostatní organely byly intaktní. Tyto membrány jsou extrémně citlivé na celou škálu poškození jako je mechanický a biochemický stres, kyslíkové volné radikály, vysoká senzitivita na osmotický tlak a jeho změny (Tuncer et al, 2010) a kryopoškození. Tudiž by stav membrán měl být indikací správné a úspěšné kryokonzervace (Kasimanickam et al, 2006).

Amann a Pickett (1987) uvádějí, že poškození plazmatické membrány akrozomu a funkce mitochondrií během mražení je způsobeno změnami teploty a osmolarity. Tyto změny způsobí morfologické změny v uspořádání lipidů a v kompozici membrány spermie (Celeghini et al, 2007)

V hypotonickém prostředí spermie nasají okolní vodu a zvětší svůj objem. Pokud dosáhne kritického množství, plazmatická membrána nevydrží tlak a praskne. Osmotický tlak má tedy velký vliv na spermie (Drevius a Eriksson, 1966).

Během zamrazování se začnou formovat ledové krystalky, které změni funkce plazmatické membrány, jako například přerozdělení fosfolipidů a proteinů držících na membráně, propustnost membrány a iontovou výměnu (Lessard et al 2000, Amann et Graham, 1993), která vyústí v redukovanou životaschopnost, redukovanou plodnost (Wingtawan et al 2006) a někdy konec spermie (Bailey et al 2003, Royere et al, 1996);(Kaka et al, 2015).

Pro správnou funkčnost membrán je důležitá nenarušená funkce cytoskeletu, o kterém je známo, že je citlivý na teplotu. Chlad ostatním buňkám způsobuje předčasnou depolymerizaci mikrofilamentů (F-aktinu). Hlavní součástí býčího cytoskeletu spermie je *perinuclear theca*, kapsule okolo jádra savčích spermií, která hraje roli při udržování stability membrány (Martinez et al, 2006).

Watson (1995) uvádí, že přestože je jádro spermie považováno za stabilní část buňky, která je méně náchylná na mráz a rozmrazování, než jsou membrány, také může být negativně zasáhnuo kryokonzervací (Celeghini et al, 2007).

Kyslík je pro buňky sice nenahraditelný, ale produkce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), může ohrozit struktury buňky, i přesto, že je fyziologickým stavem. Její metabolity kyslíku mohou poškozovat životaschopnost spermií (Hu et al, 2010). Poškození lipidového matrixu kvůli oxidativnímu stresu a produkci cytotoxických aldehydů způsobí ztrátu membránové integrity, poškodí membránu během teplotní tranzitní fáze, redukuje motilitu, indikuje ztrátu oplozeníschopnosti a poškození DNA (Tuncer et al, 2010).

Ejakulát představuje komplex redoxních systémů, který má vyvážený stav mezi antioxidačním potenciálem seminální plazmy a prooxidačními aktivitami spermatozoálního metabolismu. Je zčásti aktivní v nefyziologickém prostředí jako je například manipulace *in vitro*, což určuje spermatozoální lipidovou peroxidaci (Stradiaoli et al, 2007), na kterou je savčí sperma náchylné, protože obsahuje vysoké koncentrace polynenasycených mastných kyselin. Lipidová peroxidace ničí strukturu lipidového matrixu spermatické membrány (Tuncer et al, 2010). Peroxidace lipidů (LPO) způsobuje depleci ATP a nevratnou ztrátu motility spermií, redukuje spojení vajíčka a spermie a poškozuje DNA (Stradiaoli, et al, 2007).

Chladový šok a mražení je spojeno s chemickými reakcemi na membráně spermie. Nedávno bylo objeveno, že peroxidace spermií se uskutečňuje pouze na přežitelných buňkách a proces je lokalizován hlavně na spermatickém krčku a bičíku. Tyto objevy indikují metabolické procesy během vzniku endogenních ROS. Znamená to, že pokud je oblast s mitochondriemi peroxidovaná, pravděpodobně byl během mražení a rozmrazování poškozený elektronový transportní řetězec. To by mohl být zdroj vzniklých ROS (Stradaoli et al, 2007).

Mražení a rozmrazování spermatu je komplexní proces vystavující buňky zátěži. Všechny konvenční kryoprotektanty jsou ale pro buňky toxické, hlavně glycerol. Tato cytotoxicita vede k výzkumu jiných molekul, které jsou pro buňky méně toxické, jako jsou například sojový lecitin nebo nízkodenzitní lipoprotein (Amirat-Briandt et al, 2009).

Proces chlazení, mražení a rozmrazování způsobuje fyzický i chemický stres pro plazmatickou membránu spermií, který má vliv na přežitelnost a oplozovací schopnost (Stradaoli et al, 2007). Mechanický stres během manipulace je pro spermie také velkou zátěží (Tuncer et al, 2010).

3.6 Kryokonzervační ředidla

Spermie jsou během procesu kryokonzervace vystaveny velké zátěži, která se dá ovlivnit pomocí použití správných kryoprotektantů. Do ředidel se přidávají látky, které zvětšují objem, ale i ochraňují spermie před chladovým šokem. Časem byla rozpoznána řada látek, které mají dopad na výsledky kryoprotektantů. Pomocí nich můžeme ovlivnit oplozovací potenciál spermií a zabránit přenosu onemocnění (Ur Rehman et al, 2014).

Pufry

Hydroxymethyl aminometan (Tris) a kyselina citronová jsou běžně používané pufry v mnoha typech ředidel používaných u přežvýkavců. Ředidlo Tris, obsahující žloutek a glycerol, bylo vyvinuto v roce 1963 a stalo se populárním pro čerstvé i mražené semeno. Před ním byl používán fosfátový pufr, ale kvůli limitovanému vizuálnímu zobrazení pod mikroskopem bylo jeho použití složité. Semeno má lehce kyselé pH. Během mrazení se zvýší metabolické buněčné aktivity a začne být produkována kyselina laktózová a některé další kyseliny. Vnější buněčné prostředí začne být kyselejší, což má za následek redukci pH. Redukované pH má dopad na buněčnou aktivitu a životnost semene. Nejjednodušší používané pufry jsou bikarbonáty a sodium citráty. Nejsou ale tolik teplotně stabilní jako Tris, TES, MOPS a HEPES, které jsou více stabilní při vysokých teplotách a při jiných dalších okolnostech prostředí (Ur Rehman et al, 2014).

Antimikrobiální látky

Aby se zamezila mikrobiální kontaminace semene, používají se různé antibiotické ingredience. Čerstvé a zdravé semeno by nemělo obsahovat žádné mikroorganismy. Během odběru při použití umělé vagíny vzniká promoční faktor pro nárůst bakterií, jako jsou *E. Coli* a *Salmonella sap.*, hlavně kvůli obsahu fruktózy v ředidle a pokojové teplotě při odběru kolem 20 °C. Další potencionální hrozby jsou *Clostridium pyogenes* a *Pseudomonas aurogenosa*. Kontaminace bakteriemi redukuje obsah živin dostupných pro spermie, což vede k redukcí pH, které má efekt na motilitu a přežitelnost spermií. Plísně produkují různé druhy endotoxinů a exotoxinů, které poškozují sperma. Podle WHO 2003 (World Health Organization) by mělo všechno semeno být mikroorganismů prosté. Používají se tedy antibiotika, jako jsou například penicilin, streptomycin a polymixm-B. První recept na antibiotika do ředidel ejakulátu podle Cornella (1950) je penicilin spolu se streptomycinem v koncentraci 1 g/l. Ostatní antimikrobiální látky jako cetifur, apramycin a amonoglykosidy jako gentamycin kenamycin a neomycin se používají v koncentraci 0,2 g/l. Kombinace linco spectinu (300/600 µg) tylosinu µg a Gentamycinu 500 ukázaly dobré výsledky při redukcí mykoplazmy a jiných bakterií. Většina komerčně dostupných ředidel spermatu na bázi sojového lecitinu obsahuje gentamycin, lincomycin, tylosin a spectinomycin jako standardní antibiotika (Ur Rehman et al, 2014).

Proteiny

V roce 1969 bylo objeveno, že antarktické ryby umí přežít mráz díky specifickým proteinům známým jako antimrazící proteiny. Později se ukázalo, že tyto proteiny chrání buňky díky modifikaci ledových krystalků formujících se během procesu mrazení. Mají schopnost rekrystalizace a interagují s plazmatickou membránou při nízkých teplotách. Jejich funkce je pravděpodobně utvoření ledových krystalků ve tvaru prstu a odstrčení červených krvinek do prostoru mezi nimi a tím redukcí jejich poškození. Některé studie uvádějí, že proteiny se navážou na povrch krystalků a vytvoří formaci pyramidových struktur. Ty mohou být ostré a poškodit buňky. Existuje hypotéza, že spermie by mohly být chráněny tímto způsobem, protože jsou menší než erytrocyty. Studie Younise et al (1998) ukázala zvýšenou část spermií s intaktním akrozomem při použití těchto proteinů u šimpanzího

semene a zvýšenou přežitelnost a autozomální aktivitu u beraního semene (Prathalingam et al, 2006).

BSP, pojmenované „binder of sperm“, proteiny specificky interagují s nízkodenzitním lipoproteinem. Jsou sekreovány seminálními váčky a jmenují se BSP-A1/A2, BSP-A3 a BSP-3kDa (Vera-Munoz et al, 2009). Tyto proteiny reprezentují 65 % proteinů seminální plazmy a jejich biochemické vlastnosti byly již extenzivně popsány. Během ejakulace vážou na spermatickou membránu cholinové fosfolipidy a zahajují kapacitaci navozenou vysokodenzitními lipoproteiny a heparinem. Stimulují cholesterol a fosfolipidový odtok z membrány spermie. Stejně BSP proteiny mohou být škodlivé pro membrány spermií *in vitro*. Lipidový odtok stimulovaný BSP proteiny je časově a koncentračně závislý. Vystavuje spermie seminální plazmě, která obsahuje BSP proteiny, které mohou poškodit membránu (Bergeron et al., 2004). Jsou přínosné *in vivo*, jelikož se připojují pomocí cholinu s fosfolipidy na spermatickou membránu, čímž zvyšují oplozeníschopnost spermie. Z tohoto důvodu je spermie v *in vitro* prostředí v kontaktu s excesem BSP proteinu, který indukuje výtok fosfolipidů a cholesterolu z membrány. To způsobuje redukci odolnosti spermie na chladový šok a mrznutí (Polliet et al, 2010). Předpokládá se, že tyto proteiny drží LDL jako ochranu před poškozením spermie (Bergeron et al, 2004).

Hypotéza dočasně odejmutého BSP proteinu díky LDL předpokládá, že BSP proteinová fixace na spermie probíhá ještě předtím, než se seminální plazma odstraní (Hu et al, 2010). Všechny tyto hypotézy by mohly zčásti vysvětlit ochranu spermií během kryokonzervace sterilizovanou plazmou žloutku, která obsahuje hlavně LDL (Pillet et al, 2010).

Bovinně sérový albumin (BSA) je vysoce rozpustný protein přirozeně se vyskytující v savčím semenu, a může ochraňovat buňku před poškozujícími efekty způsobenými volnými radikály v oxidativním stresu. Proto vznikla hypotéza, že přidání BSA do média může zvýšit motilitu, membránovou integritu, životaschopnost a DNA integritu semene (Akhter et al, 2014).

Aminokyseliny

V minulých dvaceti letech byl efekt použití přídavku aminokyselin do mrazících ředidel savčích spermií subjektem mnoha studií. Ukázalo se, že mohou být přínosné, pokud jsou kombinovány s dalšími kryoprotektanty. Koskien et al (1989) ukázali, že betain v koncentraci 2,5 % zvyšuje motilitu koňského semene. Cystein, pokud byl přidán v koncentraci 0,1% do ředidla obsahujícího žloutek a glycerol, umožnil během procesu zmražení a rozmražení zaznamenané zlepšení kvality a oplození schopnosti semene zebu a buvola (Amirant-Briandt, 2009).

Při použití samotného glutaminu je zaznamenána nízká motilita rozmražených spermií. Jeho přínos je ale prokázán v kombinaci s ostatními kryoprotektanty jako jsou glycerol, dimethyl sulfoxid (DMSO) a propylen glykol přidaných do ředidel obsahujících žloutek nebo LDL.

Bylo prokázáno, že glutamin hraje kryoprotektivní roli v mražení býčího semene. Přesto ale motilita po rozmražení není tak vysoká, jako při použití žloutku nebo LDL. Nejlepší koncentrace pro mražení býčího semene byla 10 mM. Vyšší použití glutaminu znamená vyšší osmotický tlak. Vyšší, než 120 mM je už toxická koncentrace. Redukce osmotického tlaku nastala v ředidlech obsahujících glutamin a LDL ze žloutku, oproti tomu, co bylo očekáváno, jelikož cukry a soli z ředidel neabsorbují do LDL. Trimeche et al (1996) předpokládají, že redukce osmolarity je způsobena precipitací fruktózy a solí. Demonstrovali, že žloutek a glutamin se chovají synergicky, což je pravděpodobně i případ LDL a glutaminu. To by dávalo LDL zodpovědnost za kryoprotektivní efekt žloutku (Amirat-Briandt, 2009).

Bylo objeveno, že buňky rostlin jako je tabák, nebo i buňky zvířat odpovídají na vystavení nízké teplotě akumulací určitých aminokyselin jako například glutation, které jsou schopné vydržet teploty pod nulou. Tyto aminokyseliny hrají roli v prevenci strukturálních změn v buňkách během procesu kryokonzervace (Amirat-Briandt et al, 2009).

Antioxidanty

Ejakulát obsahuje vlastní přírodní obranný systém proti oxidativnímu stresu sestavený z enzymatických i neenzymatických komponentů s antioxidační aktivitou, které brání sperma před molekulami reakčních forem kyslíku (ROS) (Akhter et al, 2014). Spermie jsou částečně zodpovědné za peroxidativní poškození, hlavně během mražení, kdy může být poškozena membránová integrita, funkce, motilita a oplozeníschopnost (Hu et al, 2010). Jelikož dospívající spermie odhodí většinu své cytoplazmy během finální části spermatogeneze, mohou tím přicházet o většinu svého enzymatického obranného mechanismu (Hu et al, 2010).

Antioxidační systém se skládá z glutationu (GSH), peroxidovaného glutationu (GSH-pX), enzymu katalázy (CAT) a superoxidu dismutázy (SOD). Funguje jako ochrana funkcí buňky před lipidovou peroxidací, je tedy velmi důležitý pro motilitu a životaschopnost spermií (Hu et al, 2010).

GSH je tripeptid všudypřítomný v živých buňkách (Stradaoli et al, 2007). Hraje důležitou roli v intracelulárním ochranném mechanismu proti oxidativnímu stresu, jelikož může reagovat s mnoha ROS a jako kofaktor pro glutation peroxidázu. Ta katalizuje redukci toxických peroxidáz a hydroperoxidáz. Výsledný oxidovaný glutation (GSSG) je redukován na GSH pomocí glutation reduktázy při použití kofaktoru NADPH⁺. GSH/GSSG pak hraje důležitou roli jako redoxní senzor a ochranný agent proti poškození způsobeným ROS v mnoha buňkách. GSH je obsažen ve spermatu i seminální plazmě býků (Stradaoli et al, 2007). Gluthation může být používán jako kryoprotektant (Tuncer et al, 2010).

GSH-pX může eliminovat hydrogenperoxid.

Superoxid dismutáza (SOD) je enzym, který přeměňuje ROS. Superoxid aniont a hydroxylové radikály ochraňují savčí spermie před oxidativním poškozením (Tuncer et al, 2010).

Rolí enzymu katalázy (CAT) je kontura oxidativního stresu, který zasahuje téměř všechny parametry kvality spermie málo. Většina savčího semene ale neobsahuje CAT, nebo jen málo (Hu et al, 2010).

Mezi neenzymatické antioxidanty ve spermatu se řadí moč, kyselina askorbová, vitamin E, taurin, hypotaurin, karotenoidy, pyruvát a glutation. Proces mražení poškozuje obojí, jak seminální plazmu, tak i buněčné antioxidanty. Seminální plazma je během mražení silně naředěna a buněčné antioxidanty, které zbyly, jsou tím pádem ztraceny během mražení a rozmražení (Stradaoli et al, 2007).

Ve studii Hu et al (2010) poskytla ředidla býčího spermatu založená na LDL vyšší koncentrace motilních spermií, intaktních membrán a akrozomů. V porovnání s pouze žloutkovým ředidlem tedy antioxidantní enzymy CAT, GSH a GSHpx během procesu mražení a rozmražení poskytly větší ochranu. Ředidlo s LDL přímo nebo nepřímě ochraňuje spermie tím, že redukuje změny plazmatické membrány spermie. Nauc a Manjunath (2000) doložili, že sperma ředěné žloutkem po rozmražení obsahuje o 80 % méně BSP, než čerstvé. Ředidlo redukovalo negativní dopad ROS na spermie a 8% přídavek LDL vyšel nejlépe (Hu et al, 2010).

Glycerol

Jeden z hlavních a nejpoužívanějších kryoprotektantů pro předcházení poškození spermií je glycerol. Je klasifikován jako penetrující kryoprotektant. Byl objeven náhodou Polgem v roce 1949 během experimentování s kohoutím spermatem. Tento objev zvýšil kryoprotekci a kvalitu po rozmrazení. Při přidání do vaječného ředidla zvýšil úspěšnost o 15 %. Předchází intracelulární krystalizaci, ale má efekt na oplozovací schopnost zvýšením dočasného osmotického tlaku. Předchází ekvilibraci okolo buněčné membrány, která zvýší osmotický tlak a má efekt na parametry kvality semene. Redukce teploty z +5 na -196 °C redukuje membránovou integritu a zvyšuje propustnost. Během tohoto šoku glycerol poskytuje ochranu spolu s přídavkem žloutkového lipoproteinu. Předpokládá se, že teplotní změny ruší lipidy na proteiny asociací mimo buněčné membrány, což vede k ztrátě funkcí (Ur Rehman et al, 2014).

Mléko

Laktóza je důležitou součástí mléka, která nemůže difuzovat skrze buněčnou membránu a tím pomáhá vytvořit osmotický tlak okolo buňky. Tím předchází intracelulární krystalizaci. Navazování seminálních proteinů je redukováno pomocí kaseinu, tím se redukuje poškození lipidů v buněčné membráně a zvyšuje se spermatická motilita a přežitelnost. Série výzkumů publikovaných v polovině 20. století na ředidla obsahující mléko pro kryokonzervaci spolu s glycerolem udělala revoluci v kryokonzervaci semene (Ur Rehman et al, 2014).

Mnoho studií uvádí rozdílné výsledky ohledně používání mléka jako kryoprotektantu. Například Karabunus et al (1991) uvádějí, že vyšší procento spermií mělo zachovanou funkci mitochondrií a nepoškozenou plazmatickou membránu pokud bylo ve žlutkovém ředidlu, než to, které bylo v mléčném ředidlu. Spermie měly i chráněnější chromatin, pokud byly ve žlutkovém ředidlu (Celeghini et al, 2007).

Sojový lecitin

V minulých dvaceti letech se výzkum snažil nahradit živočišné bílkoviny pomocí rostlinných bílkovin, aby se předešlo přenosu nemocí a udržela se bioochrana. Tento koncept vedl k vývoji komerčních ředidel bez živočišných bílkovin jako je například Biocephos plus© (IMV Technologies l'Aigle, Francie) a AndroMed© (Minitube Tiefenbach, Německo), která jsou velmi populární. Hlavní náhradou za žlutkový komponent ředidel je lecitin ze sojových bobů (Ur Rehman et al, 2014).

Lecitin ze sojových bobů poskytuje ochranu plazmatické membráně díky obnově fosfolipidů, které jsou narušeny kvůli teplotě, a tím ochraňuje přežitelnost buňky. Sojový lecitin je velmi dobrá alternativa pro fosfolipidy obsahující žloutkové ředidlo. Množství 25 % u býků zvyšuje membránovou integritu, akrozomální integritu, procento živých spermií a motilitu. U býků je dobrou náhradou zdroje bílkovin v ředidlu semene obsah již 1-2 % sojového lecitinu. Ve studii Kasimanickam et al (2011) porovnávali sojové lecitinové ředidlo s mlékem obsahujícím konvenční ředidla a ukázalo se, že mitochondriální membránový potenciál se zvýšil v sojovém lecitinovém ředidlu. Navíc byla zlepšena i fragmentace DNA a motilita spermií v sojovém lecitinu porovnávaném s mléčným ředidlem (Ur Rehman et al, 2014).

Akhter et al (2012) uvádí, že 10% sojový lecitin zvyšuje parametry odolnosti a oplozeníschopnosti buvola, a může sloužit jako alternativa za žloutkové ředidlo (Akhter et al 2012)

Žloutek

Žloutek z vajec slepic je účinný kryoprotektant, který je široce používán v ředidlech na ochranu před chladovým šokem. Jeho přínos tkví v zvýšení funkcí spermií a zachování schopnosti oplození po uskladnění v tekutém nebo zmraženém stavu (Bergeron et al, 2004). Je obsažen v komerčních ředidlech jako je například Optidyl® (Tuncer et al, 2010).

Je to přírodní olejová emulze, ve které jsou uspořádány lipidy a proteiny v supramolekulární shluky s různou úrovní organizace. LDL je hlavní agent emulzifikačních vlastností, ale jeho molekulární struktura stále není zcela známá. Jeho prekurzor je VLDL (very low density lipoprotein), který je také obsažen ve žloutku (Strixner et al, 2014)

Žloutek je složen z 68 % LDL, 16 % HDL, 10 % albuminů a 4 % fosfátinů. LDL má hustotu 0,98 a z toho 83-89 % jsou lipidy a 11-17 % proteiny. Lipidy jsou ze 74 % neutrální lipidy triglyceridy a cholesterol, a z 26 % fosfolipidy (Pillet et al, 2010).

Používá se v ředidlech jako primární, levný, snadno dostupný a nepenetrující kryoprotektant. Philips (1939) byl první, kdo oznámil použití žloutku v ředidlech v poměru 1:1 spolu s fosfátovým puftrem. Tím se používání žloutku zpopularizovalo. Bylo doloženo, že 4% přídavek žloutku poskytuje dobré výsledky parametrů kvality semene po rozmrazení (Ur Rehman et al, 2014). Používají se ale různé procentuální koncentrace. Jako standart je používáno 20 % (Ur Rehman et al, 2014). Vyšší koncentrace může způsobit poškozující efekt a toxicitu, kterou způsobuje aminokyselinová oxidázová aktivita. To může vést k pozdější nižší kvalitě rozmraženého spermatu (Akhter et al, 2011a).

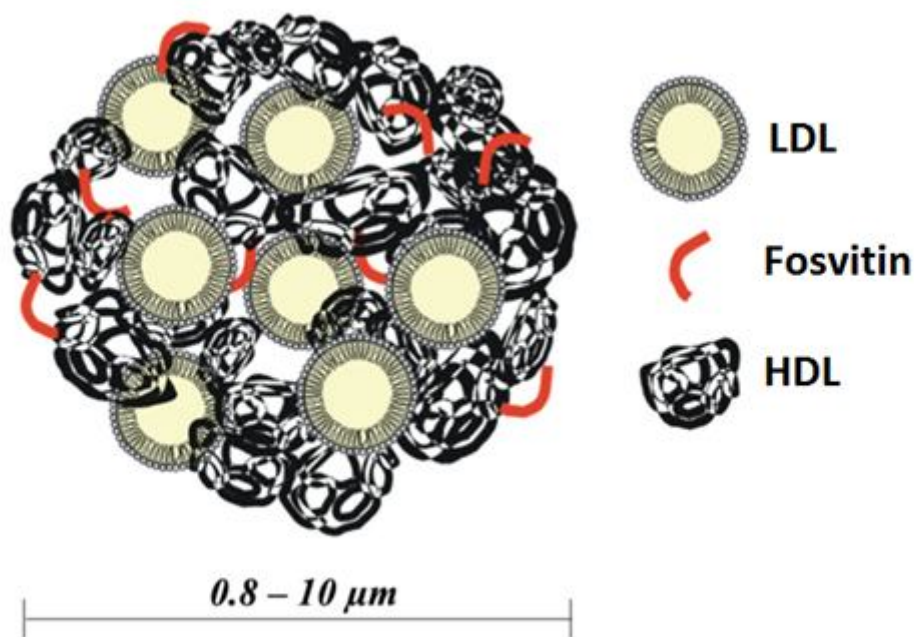
Přestože se médium obsahující vaječný žloutek používá více než 60 let, mechanismy zajišťující spermatu ochranu tímto žloutkem před skladováním, zchlazováním a zmrazováním nejsou zcela jasné. Zdá se, že za ochranu spermatu před chladovým šokem a poškozením z mražení je odpovědná nízkodenzitní lipoproteinová frakce ze žloutku. Bylo předloženo několik mechanismů ochrany spermatu těmito lipoproteinovými frakcemi. Předpokládají, že frakce poskytuje ochranu skrze asociaci s membránou spermatu. Jiné hypotézy předpokládají, že frakce předchází ztrátě membránových fosfolipidů pomocí zvýšení tolerance chladu spermii (Bergeron et al., 2004).

Vaječný žloutek je snadno dostupný, ale už ne praktický, jelikož nejde použít okamžitě. Je zapotřebí manuálně rozbít skořápku a vyjmout žloutek bez poškození, což je časově náročné. Jeho další nevýhodou je, že obsahuje granula stejně velká, jako jsou spermie, což může zkreslovat výsledky pozorování mikroskopem. Navíc je to extrémně komplexní produkt, který se může výrazně lišit vajíčko od vajíčka. Například jeho složení lipidů se liší na základě výživy slepice, což se dá standardizovat použitím vajec z jednoho chovu slepic se stejnou stravou. Některé chemické komponenty vajíčka také mohou redukovat respiraci a motilitu spermii. Amirat et al (2004) se domnívají, že může obsahovat některé poškozující složky, které mohou snižovat motilitu býčího spermatu. Rizikem samotného žloutku je kontaminace, která může představovat riziko vzniku endotoxinů. Ty mohou narušit funkce spermii (Pillet et al, 2010). Dále se přes ně mohou šířit nemoci a nepraktická je také jejich variabilita (Stradiaoli et al, 2007). Aboagla et al (2003) uvádějí, že v kozlím semeni žloutková ředidla redukovala akrozomální integritu. V přídatných pohlavních žlázách jsou obsaženy faktory, které vytvářejí poškození kvality semene. Žloutkové ředidlo obsahuje značné množství steroidů (Akhter et al, 2011b), jako jsou pregnelenon a progesteron, které

indukují akrozomální reakci. To způsobuje vysoké riziko mikrobiální kontaminace, reziduí a hormonálně aktivních substancí ve žlutkovém ředidlu (Ur Rehman et al, 2014).

Pokud vezmeme v potaz všechny nevýhody žloutku, je pochopitelné, že je potřeba nahradit celožloutková ředidla pouze jejich kryoprotektivní frakcí (Pillet et al, 2010). Proto se v posledních letech rozšiřují argumenty proti používání ředidel živočišného původu, jako jsou například žloutek a mléko. Právě proto bude preferována bezpatogenní náhražka vaječného žloutku (Stradaioli et al, 2007).

Hledání alternativních molekul jako náhradu za žloutek je ale složité, jelikož přesný mechanismus, kterým žloutek chrání spermie během zamrazování je stále neznámý. Přesto je největší podíl přisuzován LDL (Pillet et al, 2010). Jedno z ředidel, které splňuje tyto podmínky náhražky žloutku, je Bioxcell® (Stradaioli et al, 2007).



Obr. 1. Schématický model granula ze žloutku slepičího vejce při pH 6,5 (Strixner et al, 2014).

Nízkodenzitní lipoprotein

Lipidová složka v LDL je transportní forma cholesterolu, který je nepostradatelnou částí plazmatické membrány buněk, kde představuje bariéru, která funguje mezi buňkou a prostředím, moduluje propustnost a utváří „rafty“, které koncentrují signální molekuly. Cholesterol je také prekurzor pro výrobu všech steroidních hormonů, žlučových kyselin a formuje myelinové pochvy kolem axonů. V krevním řečišti je cholesterol transportován v lipoproteinových částicích. V letech 1950 až 1960 byly fyziology popsány dva hlavní lipoproteinové nosiče cholesterolu v krvi, a to nízkodenzitní lipoprotein (LDL) a vysokodenzitní lipoprotein (HDL – high density lipoprotein) (Goldstein et Brown, 2009).

Centrifugací žloutku může být separován do dvou hlavních frakcí, granulí a plazmy. Granula jsou složena převážně z HDL a albuminů (viz obr. 1.). Granula HDL mají podle Pace a Grahama (1974) a Thariena et al (1999) negativní vliv na schopnosti spermií. Plazma je složena z 85 % LDL a 15 % albuminů. LDL v plazmě žloutku je hlavním kryoprotektivem žloutku. Samotné LDL nyní nemůže být vyrobeno umělou syntézou (Pillet et al, 2010).

LDL je velká sférická částice s průměrem okolo 35 nm. Jeho jádro se skládá z triglyceridu, cholesterolu a esterů cholesterolu obklopených vrstvou apoproteinů a fosfolipidů (Pillet et al, 2010).

Plazma se získává průmyslovým zpracováním a může být přidána do ředidla spermatu připraveného k okamžitému použití (Pillet et al, 2010). Při použití frakce z plazmy můžeme zajistit co nejvíce chemicky definované ředidlo. Její sterilita může být zajištěna pomocí gama záření. Celý žloutek sterilovat nelze kvůli kompaktnosti. Gama záření je bezpečná metoda, více preferovaná, než pasterizace, protože zajišťuje úplnou sterilizaci. V porovnání s pasterizací je to studený proces, což je méně škodlivé pro fyzikálně chemické změny v ozařovaném produktu. Hypotézou je, že ozářená plazma by mohla být dobrou alternativou pro celožloutková ředidla (Pillet et al, 2010).

Existuje několik hypotéz, jak funguje kryoprotektivita samotného LDL. Zprvé se vědci domnívají, že se naváže na plazmatickou membránu spermie během mražení a poskytuje ochranu pomocí stabilizace této membrány (Pillet et al, 2010). Měla by tak zabránit odtoku lipidů z membrány (Hu et al, 2010). Byl už zmíněn i fenomén, že se LDL zformuje jako protektivní film na povrchu membrány, ale role lipidů a proteinů stále nebyly jasně vysvětleny. Navíc jsou k této hypotéze i protize stability LDL na membráně (Hu et al, 2010).

Zadruhé se uvažuje, že LDL může splynout s plazmatickou membránou a nahradit tak membránové fosfolipidy, které jsou poškozené nebo zničené během mražení. Tím, že nahradí některé lipidy, může ochraňovat sperma redukcí fáze tranzitní teploty. Ricker et al (2006) ale nedávno prokázali, že fosfodylcholin ze žloutku nebo sojových bobů asociují se spermatickou membránou, ale neinkorporují se do ní (Hu et al, 2010).

Zatřetí se uvažuje, že LDL soutěží s poškozenou seminální plazmou pomocí kationových peptidů v navázání na spermatickou membránu, a tím ochraňuje spermie (Pillet et al, 2010). LDF má vysokou kapacitu pro vyvázání BSP. Jeho navázání je rychlé, specifické a stabilní i po rozmražení. Je dokázáno, že sperma ředěno žloutkem má po rozmražení o 80 % méně BSP, než čerstvé sperma (Nauc a Manjunath, 2000);(Hu et al, 2010).

LDL se připojí na membránu a ochraňuje buňku před kyslíkem. LDL přídavek ke žloutku zvyšuje motilitu po rozmražení díky rozpuštění lipidů membrány buňky a připojení na spermie, ale tak vysoký podíl zvýší riziko mikrobiální kontaminace, která může způsobit metritidu a jiné nemoci (Ur Rehman et al, 2014).

Dále se uvádí, že LDL je odpovědné za proces gelovatění, amorfnímu tuhnutí, kdy nedochází ke krystalizaci během rozmrazování. Během tohoto procesu dochází k rozpadu LDL a to podporuje dehydrataci spermatu (Hu et al, 2010).

LDL tedy může redukovat navázání hlavních proteinů ze seminální plazmy na plazmatickou membránu, čímž by mohlo předcházet úniku lipidů z membrány. To by byl přínosný efekt. Žloutek je známý tím, že ochraňuje spermie, ale také obsahuje faktory, které inhibují spermatickou respiraci a snižují motilitu. Je tedy možné, že tyto faktory v LDL ředidlu nejsou (Vera-Munoz et al, 2009).

Witte et al (2009) uvádějí, že by vaječný žloutek mohl předcházet zvýšení spontánní kapacity. Spermie, které spontánně projdou akrozomální reakcí po ejakulaci nebo po zamrznutí nejsou schopny přichytit se na *zonu pellucidu* a nejsou tedy nadále oplozeníschopné. Ve studii Witte et al (2009) uvádí, že 8% přidavek LDL poskytuje nejlepší ochranu integrity spermií. To může být z důvodu přímé výměny nebo opravy akrozomální membrány fosfolipidů, nebo proto, že ředidlo obsahující LDL obsahuje méně progesteronu, než žloutek, díky efektu dialýzy na membráně (Hu et al, 2010).

Hu et al (2010) uvádí hypotézu, že žloutkové ředidlo zvyšuje efekt peroxidáz. Během kryokonzervace je kvalita spermií zhoršena a spermie jsou poškozeny (Hu et al, 2010).

Použití extrahovaného LDL v býčím spermatu zvýšilo motilitu a integritu membrány, přežitelnost a integritu akrozomu a DNA *in vivo* fertilitu (Akhter et al, 2011b).

Amirat et al (2004) ve své studii zjistili, že motilita spermií je větší po rozmražení s ředidlem se samotným LDL, než se žloutkovým ředidlem Optidyl®. Výsledky byly 54,4 % versus 30,2 % (Celeghini et al, 2007). Dále uvádějí, že výsledky byly lepší při použití 8 % čistého LDL namísto 20% žloutku v ředidlu Optidyl®. Na těchto výsledcích se shodli i Hu et al, 2010.

Redukci motility a integrity plazmatické membrány spermií po kryokonzervaci mohou způsobovat i některé složky ředidel. Pro zachování motility a integrity plazmatické membrány spermií při vysokých koncentracích ředění bylo v této studii efektivnější LDL ředidlo, než Triladyl® a Bioxcell® (Vera-Munoz et al, 2009).

Funkce spermií byla po rozmrazovacím procesu redukována, pokud koncentrace LDL převyšovala 10 % (Hu et al, 2010).

Studie uvádí, že nejlepší ochranu poskytuje 8% sušina LDL v koncentraci 5 a 15 milionů spermií na jednu dávku, v porovnání s ředidly Triladyl® a Bioxcell®. S těmito výsledky by se přidavek LDL do ředidla mohl používat na zlepšení vlastností spermatu místo ředidla Bioxcell® a Triladyl® na nižších spermatických koncentracích. Může být přínosný také pro sexované semeno, které potřebuje vyšší koncentrace naředění (Vera-Munoz et al, 2009).

3.7 Současný stav komerčních ředidel

V současnosti se při ředění a kryokonzervaci býčího semene používají hlavně průmyslově vyráběná ředidla. Ta mohou být založená na živočišném původu, jako jsou žloutková (Optidyl®, Triladyl®) (Vera-Munoz et al, 2009) a mléčná (Satorre et al, 2012), nebo na rostlinném původu jako ředidla na bázi lecitinu ze sojových bobů (Bioxcell®, AndroMed®). Jako další ředidla se využívá například glukóza, citrát sodný nebo Chelaton trilon komplexon (EDTA) (Satorre et al, 2012).

Optidyl® je koncentrované ředidlo určené pro přímé použití pro býčí semeno. Výrobce je BIO-VET, Francie. Jeho složení je Tris, ionizovaný vaječný žloutek, glycerol a antibiotika. Po naředění obsahuje jedna dávka 500 IU streptomycinu, 500 IU penicilinu, 150 µg linomycinu a 300 µg spectinomycinu. Vaječný žloutek je ionizován před přidáním dalších komponentů, a výsledné ředidlo se poté ionizuje podruhé (Cryo Tech, 2010).

Bioxcell® je vyroben dle receptury bez použití živočišných proteinů. Eliminuje tak zdravotní rizika spojená s použitím mléka nebo vaječného žloutku. Lze jej použít pro zmrazené inseminační dávky na -196 °C, i pro dávky chlazené na 4 °C. Semeno může být ředěno při 4 °C i při 22 °C. Zajišťuje dobrou oplozeníschopnost spermií i při nízké koncentraci v dávce. Obsahuje mix antibiotik Lincomycin, Spectinomycin, Gentamycin a Tylosin. Je sterilní. Po naředění je na rozdíl od živočišných ředidel čirý, je tedy snadnější sperma následně hodnotit mikroskopem nebo při použití analyzátoru. Může být po naředění zamrazen a následně znovu použit (Cryo Tech, 2010).

Nedávno bylo přivedeno na trh nové ředidlo obsahující sterilizovanou žloutkovou plazmu a jmenuje se INRA-Freeze®. Jeho složení je více chemicky definováno a je připraveno pro okamžité použití. Má méně rizik, než obvykle používaná ředidla (Pillet et al, 2010).

Dosavadní práce řešily náhradu žloutku v komerční skupině ředidel. Nicméně jsou i bezžloutková ředidla, kde by přídavek LDL mohl dodat výhody žloutkových ředidel bez negativních komponent žloutku. Bezžloutková ředidla ale nejsou nyní zcela jednoznačně spolehlivá jako ta žloutková. U bezžloutkových ředidel nebyla možnost ověření přídavku kryoprotektivní frakce. Navíc mohou být mikrobiálně bezpečnější. Přídavek LDL k ředidlu, kde už žloutek je by mohl zlepšit vlastnosti spermatu po rozmrazení (Sariozkan et al, 2010).

4 Materiál a metody

Sperma použité v experimentu bylo odebráno býkům (n=8) plemene Holštýn a Červenostřakaté ustájeným v Natural s.r.o., Hradištko pod Medníkem.

Odběr byl proveden při jednom skoku na fantom pomocí 30 cm dlouhé umělé vagíny, s dvojitým vnitřkem vyhřátým na tělesnou teplotu, na jednom konci vybavené igelitovým sběrným sáčkem. Ihned po odběru bylo sperma hodnoceno standardním způsobem v laboratořích na místě. Sledoval se objem, koncentrace a motilita.

Pro další zpracování byly vybrány pouze ejakuláty s koncentrací větší než $0,7 \times 10^9/\text{ml}$ a zároveň s obsahem motilních spermií vyšším než 70 %.

Semeny bylo rozděleno do stejných dílů, podle počtu testovaných variant a naředěno na finální koncentraci 120×10^6 spermií/ml. Byla použita dvě ředidla. Optidyl® (BIO-VET, Francie) na bázi žloutku a Bioxcell® (IMV Technologies, Francie) na bázi sojového lecitinu. Obě ředidla byla použita podle návodu od výrobce. Do obou skupin vzorků spermatu naředěných ředidly Optidyl® a Bioxcell® bylo přidáno LDL v různém procentuálním zastoupení.

Optidyl® s přídavkem LDL: 0%, 6%, 8%, 10% jsou označeny jako O0, O6, O8, O10

Bioxcell® s přídavkem LDL: 0%, 4%, 6%, 8% jsou označeny jako B0, B4, B6, B8

Nízkodenzitní lipoprotein (97%) dodala firma Hena s.r.o. Česká republika a vejce byla získána z chovu BIOPHARM, Česká republika. K získání LDL byl použit protokol podle Moussa et al, 2002, který byl doplněn o použití azidu sodného (0,1 %) z důvodu redukce sanitárních rizik. Před přidáním LDL byl azid sodný odstraněn pomocí extenzivní dialýzy proti PBS.

Naředěné sperma bylo naplněno do polyvinilových slávek o objemu 0,25 ml a ekvilibrováno po dobu dvou hodin na 5 °C.

Následně bylo zamraženo pomocí automatizovaného stroje DigitCool®, IMV Technologies, L'Aigle, Francie. Použita byla standardní mrazicí křivka pro býčí semeny a slámky následně vloženy do tekutého dusíku na -196 °C. Vzorky se analyzovaly nejdříve po jednom týdnu po zamrazení.

Pejety se rozmrazovaly ponořením na 30 vteřin do vodní lázně vyhřáté na 37°C. Rozmražené vzorky byly přesunuty do plastických mikroskopových typů Eppendorf o objemu 1,5 ml a naředěny fyziologickým roztokem s pH 6,8 na finální koncentraci 20-40 x 10⁶ spermií/ml podle Verstgena et al, (2002).

Analýza probíhala po 10 minutách po rozmrazení a znovu po dvou hodinách inkubace v inkubátoru (IncuCell, Medical Technology, Brno) za stálé teploty 37°C.

Značení po rozmrazení: 0h

Značení po dvou hodinách inkubace: 2h

Kinematické parametry pohybu se hodnotily po rozmrazení pomocí automatizovaného počítačového systému CASA s modulem NIS Elements Ar. 4.20 (Laboratory Imaging s.r.o., Praha, Česká republika), při použití DMK 23UM021 kamery (Imaging Source, Německo) s rychlostí zobrazení 60 snímků za sekundu, a hodnotilo se stereo mikroskopem (Nikon Eclipse E600, Japonsko) s vyhříváním stolku. K hodnocení se použilo 3 µl vzorku a hodnotilo se pomocí komůrkových Leja® (Nieuw-Venep, Nizozemsko) skel s hloubkou 20 µm. Hodnotilo se šest zorných polí v každém vzorku. Byly analyzovány trajektorie minimálně 200 spermií na jeden snímek. Byly stanoveny následující kinematické parametry:

VAP (Average velocity path) – Rychlost po střední dráze - µm/s

VCL (Curvilinear velocity) – Rychlost po skutečné dráze - µm/s

VSL (Straight line velocity) – Rychlost po přímé dráze - µm/s

ALH (Average lateral head displacement) – Průměrná výchylka hlavičky - µm

BCF (Beatcross frekvence) – Frekvence kmitání - Hz/s

LIN (Linearity) – Linearita – % (VSL/VCL*100)

STR (Straightness) – Rovnost pohybu – Bezrozměrné (VSL/VAP*100)

WOB (Wobble) – Kmitání – Bezrozměrné (VAP/VCL*100), (Nieschlag et Behre, 2000).

Od každého vzorku bylo analyzováno 41 snímků ve frekvenci 60 snímků/s.

Na základě VAP>15 byl diferencován podíl motilních spermií.

Část semene, kterému se hodnotila viabilita, bylo obarveno pomocí fluorescentních sond propidium jodid a karboxyfluorescein diacetát podle Harrison et Vickers (1990) a od každého vzorku byla zhotovena tři zafixovaná sklíčka. Pracovní postup fixace byl prováděn po rozmrazení na vyhřívané podložce a hotové vzorky byly udržovány ve tmě.

Následně se pod mikroskopem (Nikon Eclipse E600, Japonsko) hodnotila tři zorná pole na každém sklíčku pomocí hodnocení 200 živých (zelená fluoresce) a neživých (červená fluoresce) spermií. Výsledky byly zpracovány do procentuálního zastoupení.

Data byla zpracována v programu Statistica 12, StatSoft. Byla otestována na normalitu, poté byla použita metoda ANOVA a post hoc testy. Pro viabilitu byl použit LSD Fischerův test na hladině významnosti $p < 0,05$. Pro hodnocení motility byl použit Scheffého test a z důvodu množství dat byla nastavena hladina významnosti $p < 10^{-3}$. Procenta motilních spermií byla hodnocena na základě motilita= $VCL > 15 \mu\text{m/s}$.

5 Výsledky

Hodnocení viability pomocí barvení fluorescenčními sondami

Na nulté hodině u ředidla Bioxcell® přidavek LDL oproti kontrole zlepšil viabilitu. Tento efekt byl nejvýraznější a signifikantní ($p < 0,05$) při přidavku 8 % LDL. Trend přetrvává i po dvou hodinách inkubace (viz graf č. 1.).

U ředidla Optidyl® je na nulté hodině u 6 % koncentrace redukovaný počet živých spermií, i když není signifikantní. Po dvou hodinách inkubace 8% přidavek LDL signifikantně ($p < 0,05$) převyšuje ostatní koncentrace (viz graf č. 2.).

Hodnocení motility pomocí automatizovaného počítačového systému CASA

Motilita spermií ($VCL > 15$) u ředidla Bioxcell® po rozmrazení nevykazovala signifikantní rozdíly, ale koncentrace přidavku LDL 8 % na nulté hodině vykazovala nejlepší výsledky. Po dvou hodinách inkubace nastal pokles a nejlepší výsledky vykazovala 6% koncentrace přidavku LDL (viz graf č. 3).

Motilita spermií ($VCL > 15$) u ředidla Optidyl® po rozmrazení nevykazovala statisticky významné rozdíly, ale koncentrace přidavku 8 % LDL na nulté hodině vykazovala nejlepší výsledky. Po dvou hodinách inkubace nastal pokles a nebyly výrazné rozdíly mezi koncentracemi přidavku LDL (viz graf č. 4.).

Byl rozdíl mezi ředidly, kdy po rozmrazení ředidlo Optidyl® (0h=41,55%, 2h=33,41%) vykazuje více motilních spermií, než ředidlo Bioxcell® (0h=33,88 %, 2h=27,42%).

Bioxcell®

Přídavek LDL celkově zlepšil kinematické parametry spermií oproti kontrole. Na nulté hodině přídavek LDL zlepšil parametry ve všech koncentracích. Po dvou hodinách nastalo lehké zhoršení u 6 % LDL. U VCL vycházel nejlépe přídavek 4 % LDL a po dvou hodinách se projevilo lehké zhoršení u koncentrace 6 %. Stejně tak bylo i u VSL. Pohyblivost byla celkově nejlepší při koncentraci 4 %, která signifikantně ($p < 10^{-3}$) vybočuje od ostatních (viz graf č. 5).

U ředidla Bioxcell® na nulté hodině u ALH přídavek LDL převyšuje kontrolu ve všech koncentracích, a to nejvíce při 4%. Po dvou hodinách přetrvávají. U BCF kontrola a 6 % přídavek LDL po dvou hodinách vykazovaly lehké zhoršení, i když ne signifikantně (viz graf č. 6).

U hodnot LIN, STR a WOB hladina na nulté hodině výrazně nekolísala. U všech hodnot se po dvou hodinách inkubace projevuje zhoršení 6 % koncentrace přídavku LDL, u STR je oproti 6 % koncentraci signifikantně ($p < 10^{-3}$) lepší 8% koncentrace přídavku LDL (viz graf č. 7).

Optidyl®

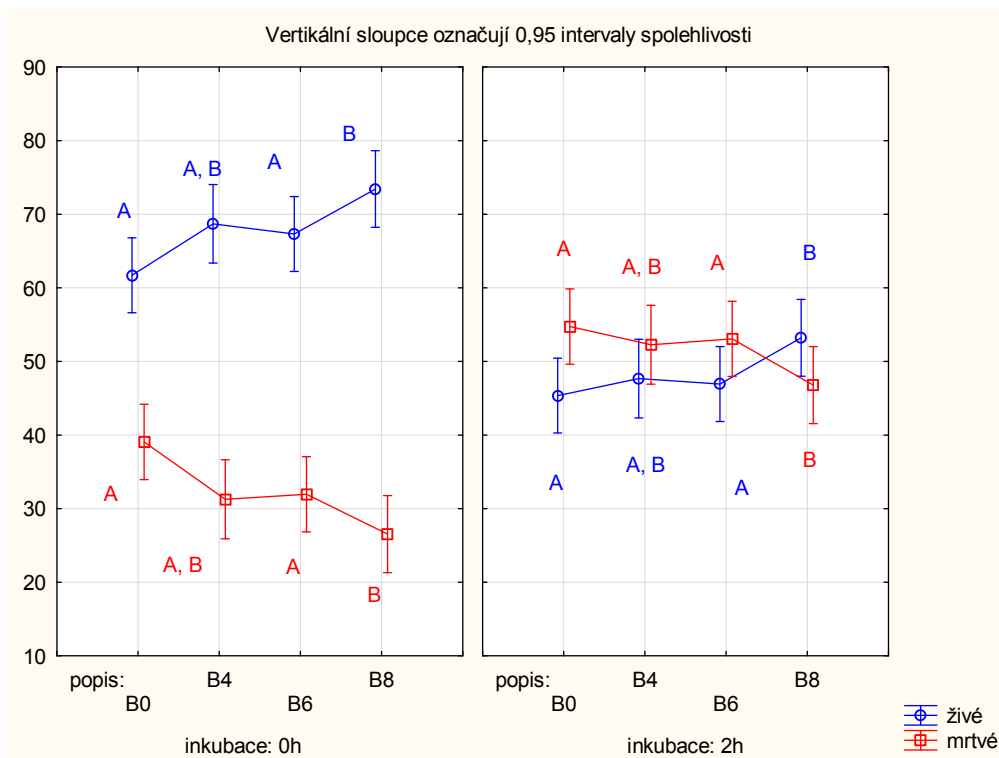
Na nulté hodině byly kinematické parametry celkově lepší při koncentraci přídavku LDL 6 % a 8 %, i když nebyly signifikantní. Po dvou hodinách tento rozdíl přetrvával a již byl signifikantní ($p < 10^{-3}$). Po dvou hodinách se signifikantně ($p < 10^{-3}$) projevilo zhoršení pohyblivosti při koncentraci přídavku LDL 10 %. Pro pohyblivost nejlépe vychází koncentrace 6 %, naopak 10 % je škodlivá (viz graf č. 8).

Na nulté hodině bylo ALH zlepšené při přídavku LDL oproti kontrole, i když ne signifikantně. Po dvou hodinách inkubace byla signifikantně ($p < 10^{-3}$) nejlepší 8% koncentrace přídavku LDL, oproti 10% koncentraci LDL, která vyšla nejhůře. U hodnocení parametru BCF byly na nulté hodině kontrola a 10 % koncentrace přídavku LDL nesignifikantně zhoršeny. Po dvou hodinách inkubace nastal signifikantní ($p < 10^{-3}$) rozdíl, kdy se opakoval trend lepší koncentrace 8 %, než 10 % (viz graf č. 9).

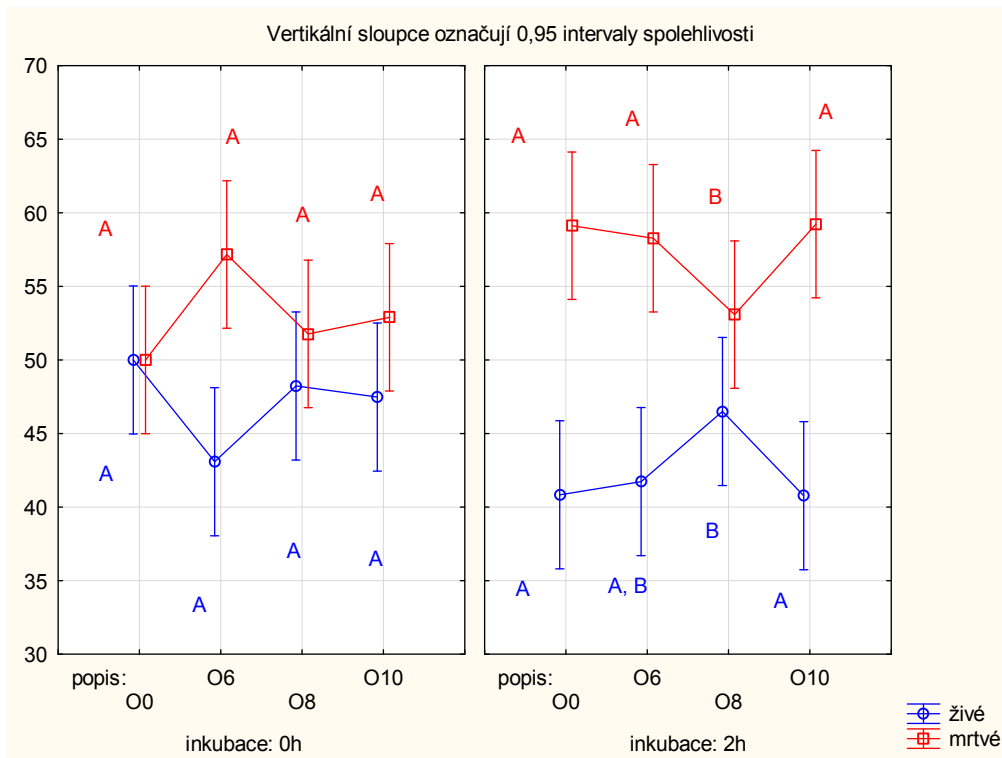
U hodnot LIN a WOB na nulté hodině hladina výrazně nekolísala. U STR byla signifikantně ($p < 10^{-3}$) horší 8% koncentrace přídavku LDL. Po dvou hodinách inkubace se u LIN a WOB signifikantně ($p < 10^{-3}$) projevila lepší koncentrace 8 % spolu se signifikantním zhoršením 10 % koncentrace přídavku LDL. U STR vyšla signifikantně ($p < 10^{-3}$) lepší 6 % a 8 % koncentrace, spolu s opakujícím se zhoršením při 10 % koncentraci 10 % přídavku LDL (viz graf č. 10).

Hodnocení viability v porovnání koncentrací 8 % obou ředidel vychází signifikantní ($p < 0,05$) rozdíl mezi ředidlem Bioxcell® na nulté hodině a ostatními hodnotami. Koncentrace 8 % ředidla Bioxcell® je tedy na nulté hodině lepší oproti ředidlu Optidyl® (viz graf č. 11).

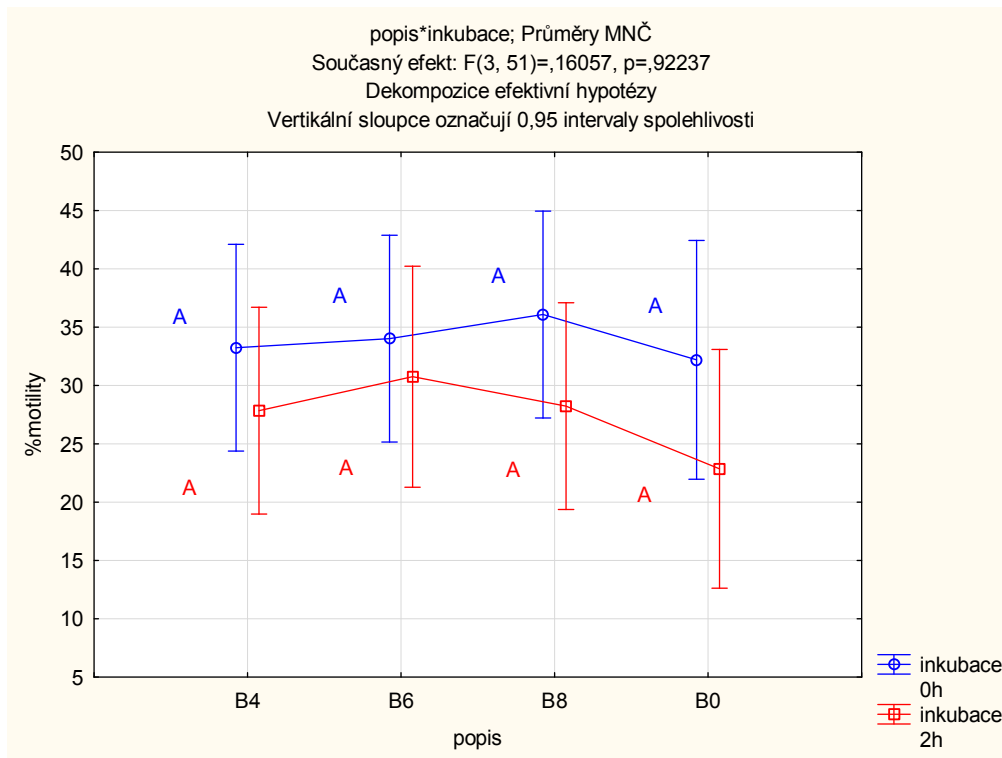
Při porovnání kontrol vychází ředidlo Bioxcell® signifikantně ($p < 0,05$) lépe (54 % živých), než ředidlo Optidyl® (45 % živých) (viz graf č. 12).



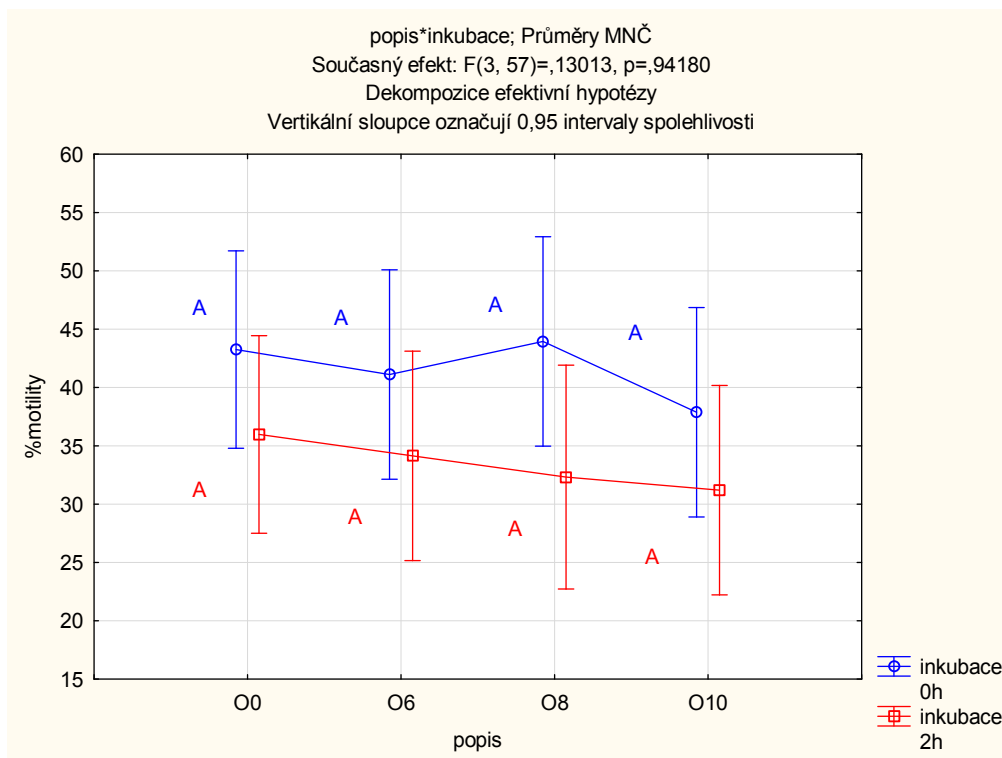
Graf č. 1. Viabilita spermií (zastoupení živých/mrtvých spermií v %) v závislosti na koncentraci přídavku LDL a délce inkubace – ředidlo Bioxcell®. Hodnoty označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 0,05$.



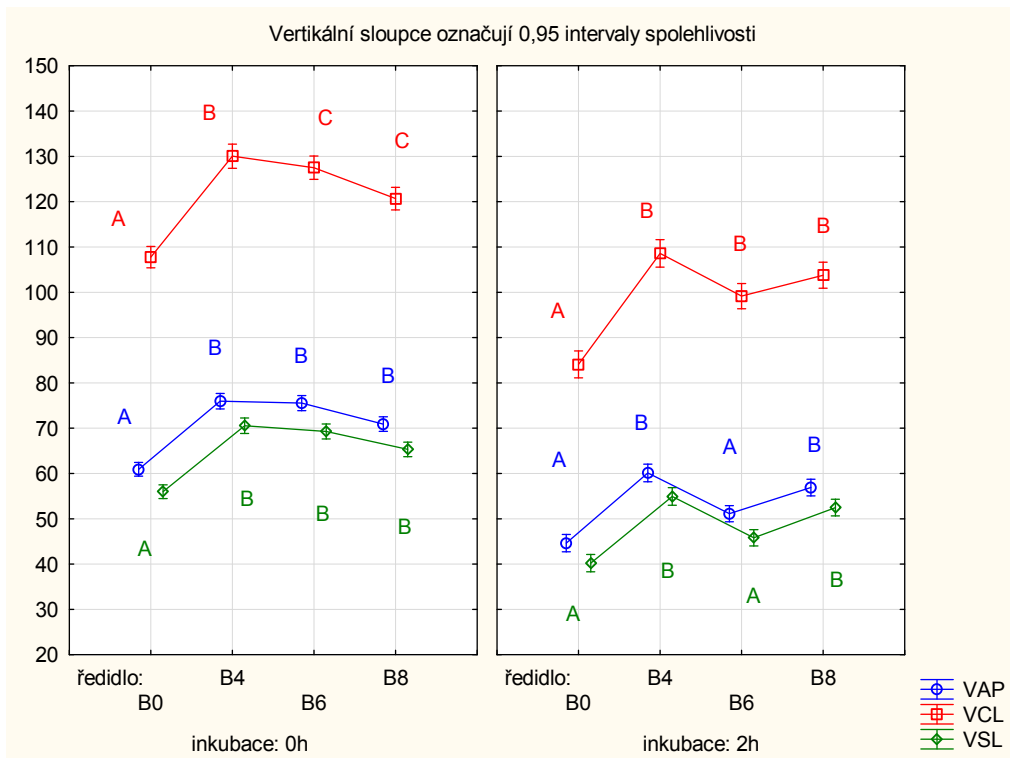
Graf č. 2. Viabilita spermií (zastoupení živých/mrtvých spermií v %) v závislosti na koncentraci přídavku LDL a délce inkubace – ředidlo Optidyl®. Hodnoty označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 0,05$.



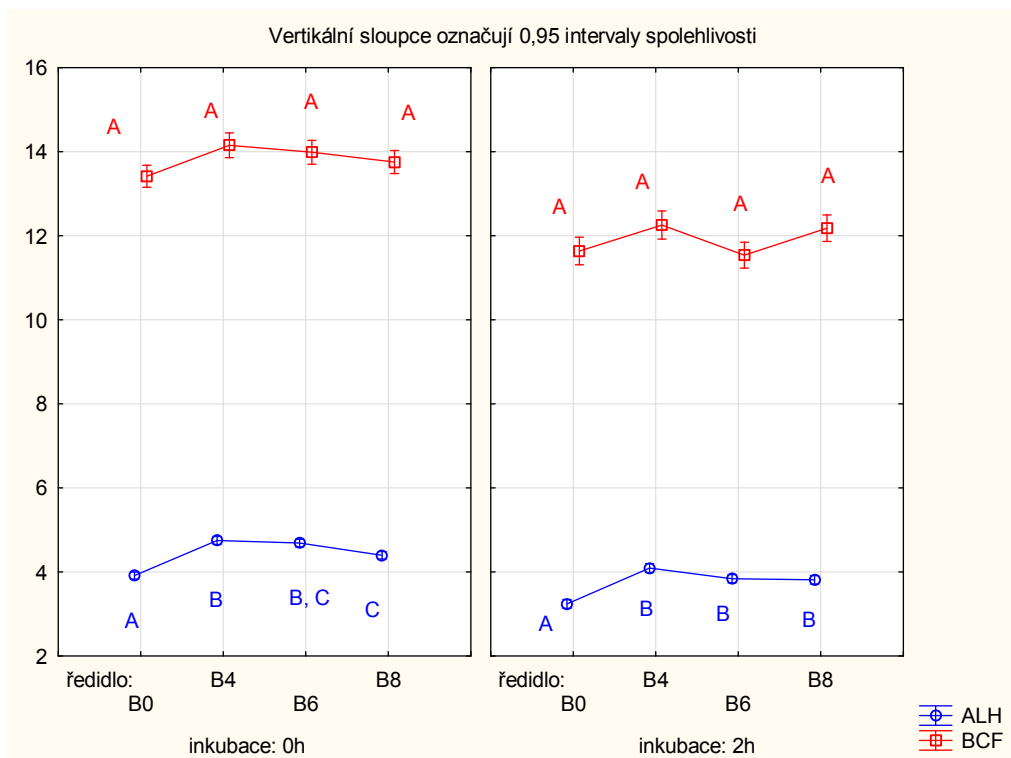
Graf č. 3. Podíl (%) pohyblivých spermií ($VCL > 15$) po rozmrazení v závislosti na koncentraci LDL a délce inkubace – ředidlo Bioxcell®. Hodnoty se od sebe neliší na hladině významnosti $p < 0,05$.



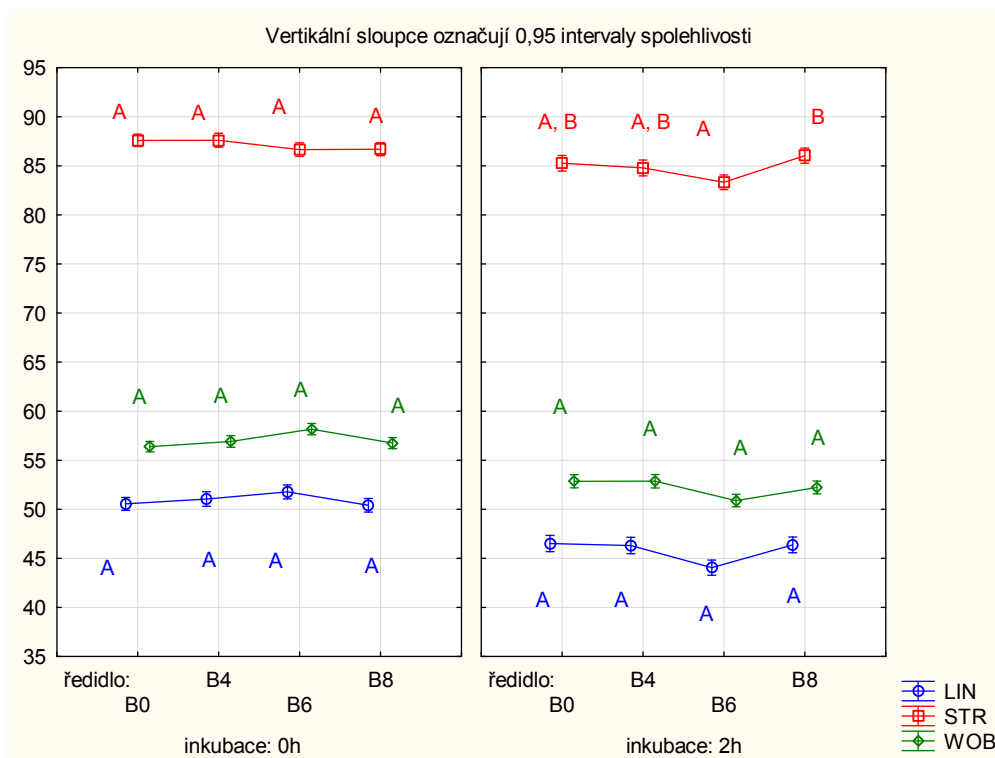
Graf č. 4. Podíl (%) pohyblivosti spermií ($VCL > 15$) po rozmrazení v závislosti na koncentraci přídatku LDL a délky inkubace – ředidlo Optidyl®. Hodnoty se od sebe neliší na hladině významnosti $p < 0,05$.



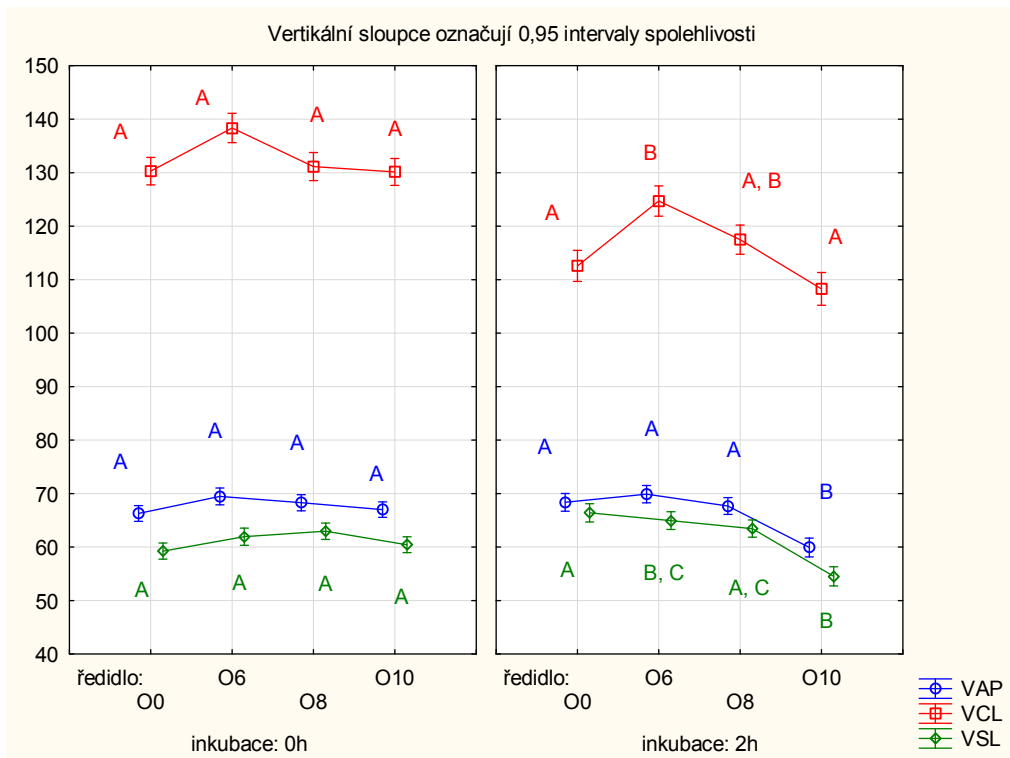
Graf č. 5. Parametry VAP, VCL a VSL v závislosti na koncentraci přídavku LDL a délce inkubace – ředitlo Bioxcell®. Hodnoty označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 10^{-3}$.



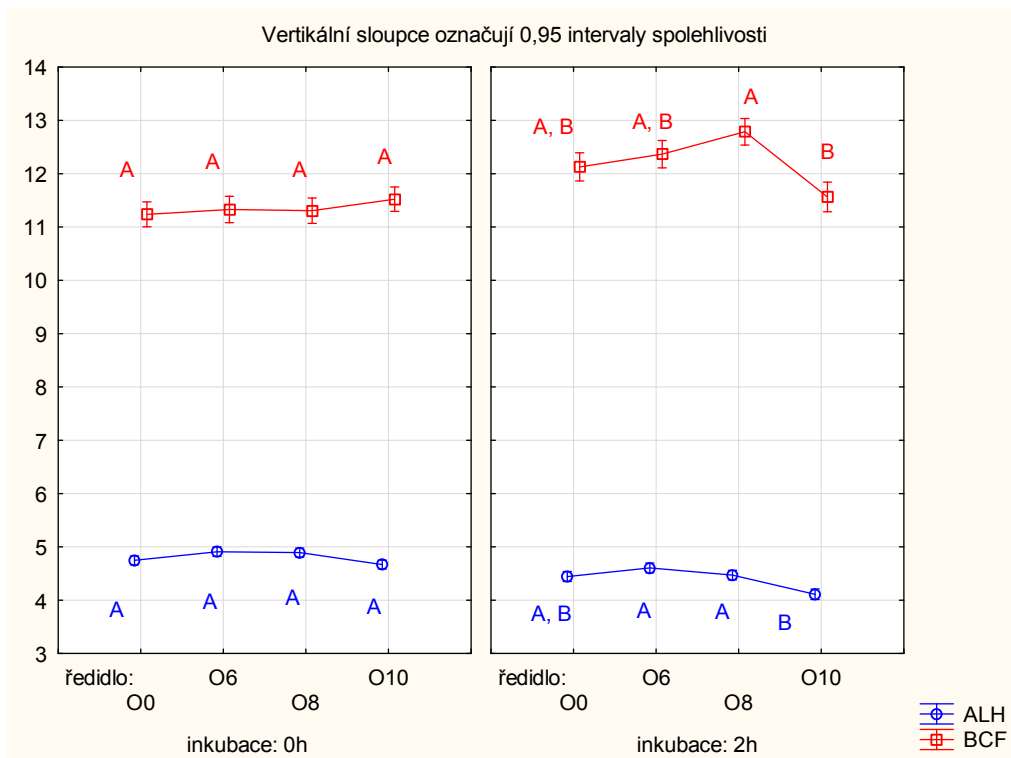
Graf č. 6. Parametry ALH a BCF v závislosti na koncentraci přídavku LDL a délce inkubace – ředitlo Bioxcell®. Hodnoty označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 10^{-3}$.



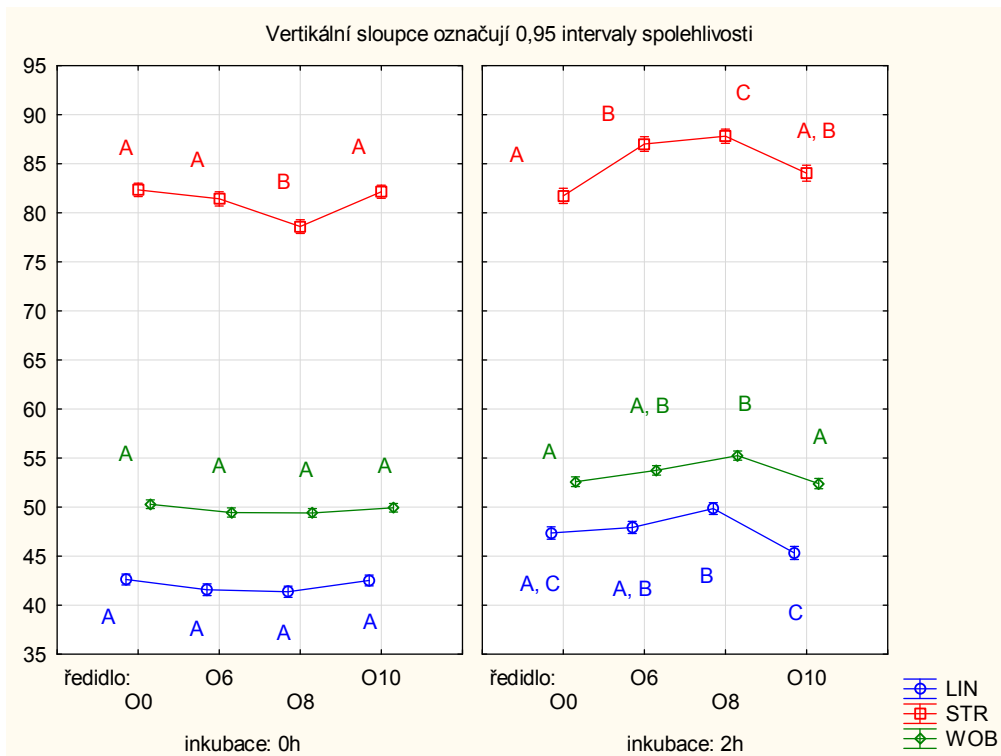
Graf č. 7. Parametry LIN, STR a WOB v závislosti na koncentraci přídavku LDL a délce inkubace – ředitel Bioxcell®. Hodnoty označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 10^{-3}$.



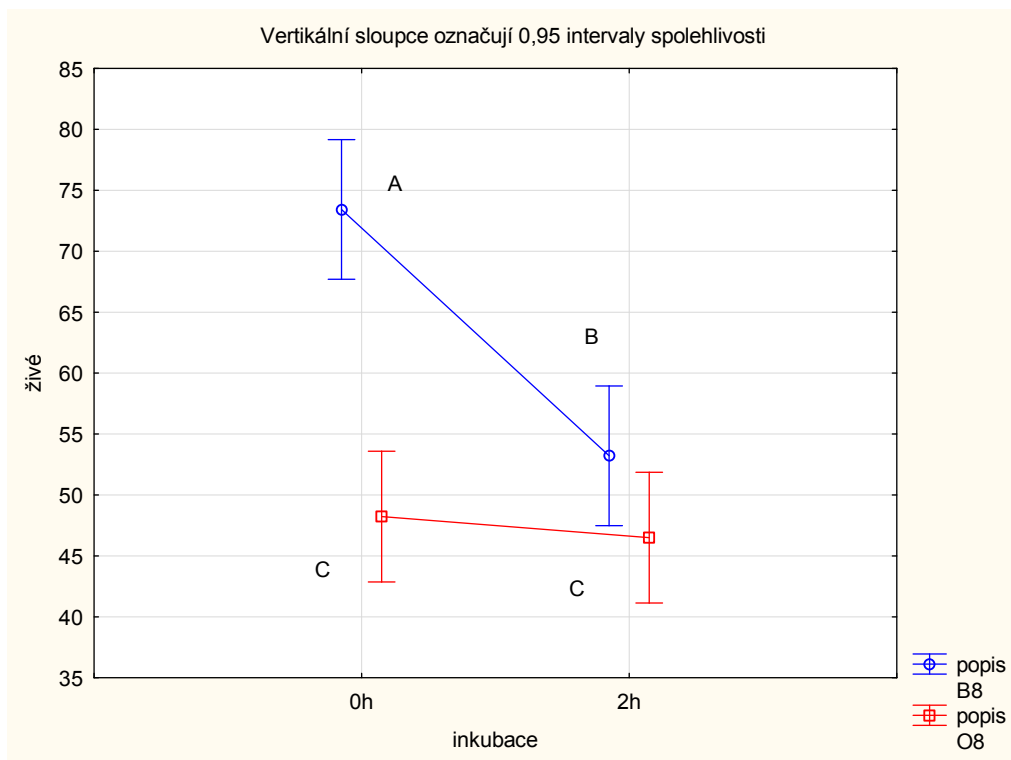
Graf č. 8. Parametry VAP, VCL a VSL v závislosti na koncentraci přídavku LDL a délce inkubace – ředitel Optidyl®. Parametry označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 10^{-3}$.



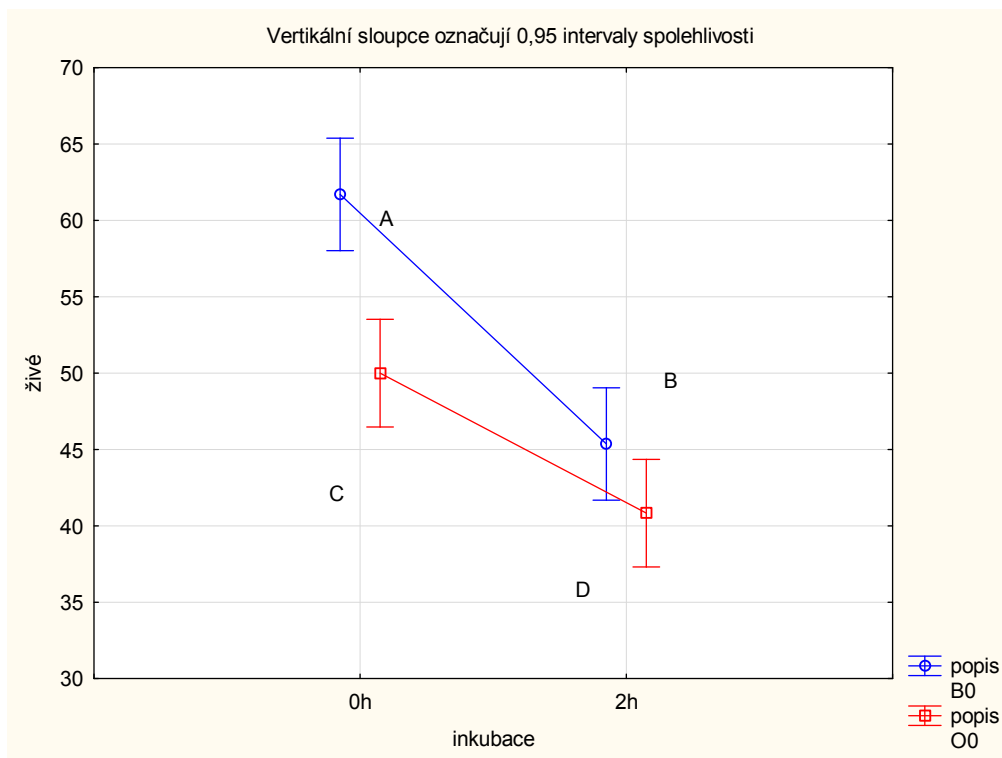
Graf č. 9. Parametry ALH a BCF v závislosti na koncentraci přídatku LDL a délce inkubace – ředitlo Optidyl®. Hodnoty označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 10^{-3}$.



Graf č. 10. Parametry LIN, STR a WOB v závislosti na koncentraci přídavku LDL a délce inkubace – ředitlo Optidyl®. Hodnoty označené rozdílnými indexy (odpovídající barvy) se liší na hladině významnosti $p < 10^{-3}$.



Graf č. 11. Viabilita spermií (zastoupení v % živých spermiích) v 8% koncentraci přídavku LDL v závislosti na inkubaci a ředidle – ředidla Bioxcell® a Optidyl®. Hodnoty označené rozdílnými indexy se liší na hladině významnosti $p > 0,05$.



Graf č. 12. Viabilita spermií (zastoupení v % živých spermiích) v závislosti na inkubaci a použitém ředidlu – Optidyl® a Bioxcell®. Hodnoty označené rozdílnými indexy se liší na hladině významnosti $p > 0,05$.

6 Diskuze

Jedním ze základních parametrů hodnocení spermatu je hodnocení viability. V této studii vyšel podíl viabilních spermií po rozmrazení s přidavkem LDL vyšší u ředidla Bioxcell®, než u ředidla Optidyl®. Při analýze kontrol bez přidavku LDL vyšelo signifikantně lépe ředidlo Bioxcell®. Sariozkan et al (2010) uvádějí, že kvalitnější spermie byly po použití ředidla Optidyl®, než ředidla Bioxcell® a Tris.

Výsledky této studie uvádějí, kromě 10% přidavku LDL do ředidla Optidyl®, celkové zlepšení viability a kinematických parametrů spermií po přidavku LDL, oproti kontrole. Akhter et al (2011b) uvádějí, že přidavek LDL do býčího spermatu zlepšil jeho motilitu, integritu membrány, viabilitu, integritu akrozomu a DNA a *in vivo* fertilitu.

Další důležitý parametr je motilita spermií (VCL>15), která byla v tomto experimentu po rozmrazení bez signifikantních ($p < 0,05$) rozdílů mezi koncentracemi, ale byla vyšší u ředidla Optidyl®. Amirat et al (2004) uvádějí, že v jejich studii byla motilita po rozmrazení větší, pokud se použilo samotné LDL, než komerční ředidlo Optidyl®. V této studii bylo získáno větší množství živých spermií po rozmrazení, pokud se použilo ředidlo Bioxcell®, ale více motilních spermií po rozmrazení bylo získáno, pokud se použilo ředidlo Optidyl®. To poukazuje na to, že při použití ředidla Bioxcell® je po rozmrazení sice více živých spermií, ale jsou nepohyblivé. Je možné, že mají poškozenou mitochondriální aktivitu. Celeghini et al (2008) uvádějí, že v jejich studii, kde sledovali redukovanou motilitu, poškození plazmy a membrány, a redukovanou mitochondriální aktivitu ředidlo Bioxcell® vyšlo hůře, než ředidlo Botu-Bov®. Na toto téma je zapotřebí udělat více studií. Podle Stradaoli et al (2007) mělo ředidlo Bioxcell® lepší výsledky oproti Tris citrátovému ředidlu se žloutkem ze slepičího vejce, pokud šlo o prezervaci obsahu GSH, motilitu, nekapacitované spermie a redukovaný obsah spermií, které již prošly akrozomální reakcí po rozmrazení.

V této studii přidavek 8 % LDL do již žloutkového ředidla Optidyl® zlepšil jeho parametry. Amirat et al (2004) uvádějí, že lepší výsledky byly dosaženy, pokud se místo ředidla s obsahem 20 % žloutku použilo 8 % přídavku samotného LDL. V tomto experimentu vycházela koncentrace 10 % přídavku LDL do ředidla Optidyl® nejhůře oproti ostatním koncentracím i oproti kontrole. To potvrzují i výsledky Hu et al (2010), které uvádějí, že pokud koncentrace přídavku LDL převyšovala 10 %, funkčnost spermií byla redukována. V této studii 4% a 8% koncentrace přídavku LDL do ředidla Bioxcell® vyšla lépe, než kontrola a 6% přídavek LDL. Vera-Munoz et al (2009) uvádějí, že nejlepší ochranu spermií po rozmrazení poskytuje 8% přídavek LDL v porovnání se samotným ředidlem Triladyl® a ředidlem Bioxcell®.

Hodnocení progresivního pohybu pomocí automatizovaného počítačového systému CASA. V této studii vychází procento progresivního pohybu po dvou hodinách inkubace celkově lépe u ředidla Optidyl®, než u ředidla Bioxcell®. To potvrzují i Sariozkan et al (2010), kteří uvádějí, že procento progresivní motility spermií u parametrů rychlost po střední dráze (VAP), rychlost po přímé dráze (VSL) a linearity (LIN) bylo vyšší po použití ředidla Optidyl®, než u ředidla Bioxcell® a Tris. Uvádějí, že nejvyšší hodnota průměrné výchylky hlavičky (ALH) byla získána od ředidla Optidyl®. Podle Liu (1991) jsou u lidského spermatu nejdůležitější kinematické parametry linearita, rychlost po přímé dráze a procento rychlých spermií. Podle Nagy et al (2015), kteří se zaměřili na studii, který parametr CASA je nejužitečnější pro predikci fertility, je to rychlost po střední dráze (VAP). V této studii vychází u parametru VAP a VSL nejlépe koncentrace 4 % přídavku LDL v ředidle Bioxcell®, po dvou hodinách je u obou parametrů patrné zhoršení u koncentrace 6% přídavku LDL. U ředidla Optidyl® je nejlepší koncentrace pro parametr VAP a VSL 6 % přídavku LDL. Po dvou hodinách inkubace je patrné signifikantní ($p < 10^{-3}$) zhoršení 10% koncentrace přídavku LDL. Parametr linearity je u ředidla Bioxcell® po dvou hodinách inkubace nesignifikantně zhoršený u koncentrace 6 % přídavku LDL. U ředidla Optidyl® je po dvou hodinách signifikantní ($p < 10^{-3}$) zlepšení u koncentrace 8 % přídavku LDL, a signifikantní zhoršení u přídavku 10 % LDL.

Amirat-Briandt et al (2010) uvádějí, že při použití samotného LDL, namísto komerčně dostupných ředidel, přínos LDL přetrvává i po inseminaci, jelikož došlo k úspěšným gestacím, i přesto, že nedošlo k signifikantním rozdílům při porovnání s kontrolou (Tris s 20% obsahem žloutku).

7 Závěr

Viabilita spermií je u přidavku LDL do ředidla Bioxcell® oproti kontrole lepší. U ředidla Optidyl® se přínos projeví až po dvou hodinách inkubace. Pro viabilitu býčích spermií vychází nejlépe přidavek 8 % LDL do ředidla Bioxcell®, kdy je přežitelnost na 0h v průměru 73,43 % a na 2h 53,21 %. U ředidla Optidyl® je průměrná viabilita na 0h při použití 0 % přidavku LDL 50% spermií. Při použití přidavku 8 % LDL je průměrná viabilita spermií 48,23 %. Po dvou hodinách je s 0 % LDL 40,8 % spermií a s 8 % LDL 46,5 % živých. Při porovnání kontrol vychází lépe bezžloutkový Bioxcell® s 53 % živých spermií, než Optidyl® s 45 % živých spermií. Motilita po rozmrazení je u ředidla Optidyl® vyšší, než u ředidla Bioxcell®. Hodnocení jednotlivých parametrů je velmi sporné. U ředidla Bioxcell® je sice viabilita nejlepší při koncentraci 8 %, ale z hlediska kinematických parametrů se zejména po dvou hodinách inkubace zdá nejlepší 4% koncentrace. Nejhůře vychází kontrola a po dvou hodinách vychází špatně také 6% koncentrace. Nelze udělat závěr, zda je u ředidla Bioxcell® lepší přidavek LDL v 4% nebo 8% koncentraci. U ředidla Optidyl® nebyly u kinematických parametrů na nulté hodině příliš významné rozdíly. V obou časech byla pohyblivost vyšší při 6% koncentraci přidavku LDL. Naopak při koncentraci 10 % přidavku LDL se po dvou hodinách projevuje zpomalení. Celkově se u parametrů opakoval trend zlepšení po přidavku LDL 8 %, spolu se zhoršením, které nastalo u koncentrace přidavku LDL 10 %. Podíl živých spermií je sice na koncentracích 6 % a 10 % stejný, ale z hlediska pohybu je 10 % koncentrace LDL horší. U ředidla Optidyl® nejlépe vychází přidavek 8 % LDL. Hypotéza, že přidavek LDL zlepší parametry kvality spermií, a že tento přidavek bude mít větší efekt v bezžloutkovém ředidle Bioxcell® je potvrzena pouze u viability spermií. U hodnocení kinematických parametrů jsou výsledky sporné.

Celkově je viabilita spermií po rozmrazení vyšší při použití ředidla Bioxcell®, ale parametry pohyblivosti jsou vyšší u ředidla Optidyl®. Motilita spermií po rozmrazení je vyšší při použití ředidla Optidyl® (průměrné hodnoty: Bioxcell® 0h=33,88%, 2h=27,42%, Optidyl® 0h=41,55%, 2h=33,41%). Z tohoto důvodu se dá doporučit k použití ředidlo Optidyl® s přidavkem 8 % LDL, namísto ředidla Bioxcell®. Je zapotřebí více studií na toto téma, jako například kontrola aktivity mitochondrií po rozmrazení spermií v ředidle Bioxcell®.

8 Seznam literary

- Akhter, S., Ansari, B. A., Rakha, Andrabi, S. M. H., Andrabi, Khalid, M., Ullah, N. 2011a. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology* 76 (4). 759-764.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Andrabi, S. M. H., Khalid, M. 2011b. *In vitro* Evaluation of Liquid-stored Buffalo Semen at 5°C Diluted in Soya Lecithin Based Extender (Bioxcell), Tris-Citric Egg Yolk, Skim Milk and Egg Yolk-Citrate Extenders. *Reproduction of Domestic Animals* 46. 45-49.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., Rakha, B. A., Ullah, N., Khalid, M. 2012. Soya-lecithin in Extender Improves the Freezability and Fertility of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reproduction of Domestic Animals* 47 (5). 815-819.
- Akhter S., Rakha B. A., Iqbal, R., Ansari, M. A. 2014. Effect of Bovine Serum Albumin on Motility, Plasmalemma, Viability and Chromatin Integrity of Buffalo Bull Spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology* 46(1). 115-120.
- Amann, R. P., Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81 (5-17).
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., Courtens, J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*. 129. 535-543.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., G rared, O., Courtens, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61. (895-907).
- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., Tainturier, D. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology* 71. 1209-1214.

- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., Destrumelle, S., Desherces, S., Anton, M., Jouan, M., Shmitt, E., Tainturier, D. 2010. *In vivo* fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science* 122. 282-287.
- Baracaldo, M. I., Barth, A. D., Bertrand, W. 2007. Steps for Freezing Bovine Semen: From Semen Collection to the Liquid Nitrogen Tank. *Veterinary Medicine. IVIS*.
- Barszcz, K., Wiestetek, D., Wasowicz, M., Kupczyńska, M. 2012. Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science* 4. 3.
- Bedford, J. 1970. Sperm Capacitation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction*. 3 (32)
- Bergeron, A. Crete M., Brindle, Y., Manjunath, P. 2003. Low-density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biology of Reproduction* 70 (3). 708-717.
- Boersma, A., Rasshofer, R., Stolla, R. 2001. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reproduction of Domestic Animals* 36 (5). 222-9.
- Boyers, S. P., Davis, O. R., Katz, D. F. 1989. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility* 12 (5). 165-200.
- Bucak, M. N, Ataman, M. B., Baspinar, N., Uysal, O., Taspinar, M., Bilgili, A., Ozturk, C., Gungor, S., Inanc, M. E., Akal, E. 2015. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia* 47 (5). 545-552.
- Celeghini, E. C. C., Paes de Arruda, R., Cesar de Andrade, A. F., Nascimento, J., Raphael, C. F., Rodrigues, P. H. M. 2008. Effect that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science* 104. 119-131.

- Cryo Tech s.r.o. 2010. Ředidla spermatu býků Optidyl a Bioxcell. Online [cit. 2016-03-23]. Dostupné z < <http://www.cryotech.cz/doc/dokumenty/1274179009.pdf>>.
- Elsayed, M., El-Sherry, T. M., Abdelgawad, M. 2015. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* 84. 1367-1377.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M. R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210 (4474). 1131-1133.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., Claussen, O. P. 1998. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 14 (4). 1039-1049.
- Farrell, P. B., Foote, R. H., McArdle, M. M., Trouden-Trend, V. L., Tardif, A. L. 1996. Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). *Journal of Andrology* 17 (3). 293-300.
- Foote, R. H. 1982. Cryopreservation of spermatozoa and Artificial Insemination: Past, Present, and Future. *Journal of Andrology* 3 (2). 85-100.
- Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwers, J. F. H. M., Stout, T. A. E., Colenbrander, B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* 68 (3-4). 249-265.
- García-Herreros, M., Aparicio, I. M., Barón, F. J., García-Marín, L. J., Gil, M. C. 2006. Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology* 29 (5). 553-563.
- Garner, D. L., Thomas, A. C., Joerg, H. W., DeJarnette, J. M., Marshall, C. E. 1997. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 57 (6). 1401-1406.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., 2009. History of Discovery: The LDL Receptor. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 29(4): 431-438.

- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. Reproduction in farm animals. Lippincott Williams & Wilkins. USA. ISBN 0-683-30577-8.
- Harrison, R. A. P., Vickers, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* (88). 343-352.
- Hu, J., Jiang, Z., Lv, R., Li, Q., Zhang, S., Zan, L., Li, Y., Li, X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* 62 (1). 83-87.
- Hu, J., Li, Q., Zan, L., Jiang, Z., An, J., Wang, L., Jia, Y. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science* 117 (1-2). 11-17.
- Chenoweth, P. J. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64 (3). 457-468.
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H. 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal Andrologia* 14 (6). 816-21.
- Jankovicova, J., Simon, M., Antalikova, J., Horovska, L. 2008. Acrosomal and viability status of bovine spermatozoa evaluated by two staining methods. *Acta Veterinaria Hungarica* 56 (1). 133-138.
- Kaka, A., Wahid, H., Rosina, Y., Yimer, N., Khumran, A. M., Sarsaifi, K., Behan, A. A., Kaka, U., Ebrahimi, M. 2015. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell extender can improve the quality of post-cooling and froze-thawed bovine sperm. *Animal Reproduction Science* 153. 1-7.
- Kasimanickam, R., Nebel, R. L., Peeler, I. D., Silvia, W. L., Wolf, K. T., McAllister, A. J., Cassell, B. G. 2006. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology* 66 (5). 1307-15.
- Liu, D. Y., Clarke, G. N., Baker, H. W. G. 1991. Relationship Between Sperm Motility Assessed with Hamilton-Thorn Motility Analyzer and fertility rates *In Vitro*. *Journal of Andrology* 12 (4). 231-239.
- Martinez, C. O., Juarez-Mosqueda, M. D., Hernandez, J., Valencia, J. 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology* 66 (8). 1969-1975.

- Nagy, Á., Polichronopoulos, T., Gáspárdy A., Cseh, S. 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungary*. 63 (3). 370-381.
- Nieschlag, E., Behre, H. M. 2000. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Die Deutsche Bibliothek. Německo. ISBN: 978-3-662-04491-9.
- Pesch, S., Hoffmann, B. 2007. Cryopreservation of Spermatozoa in Veterinary Medicine. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 4 (2). 101-105.
- Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumail, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 75. 105-114.
- Prathalingam, N. S., Holt, W. V., Revell, S. G., Mirczuk, S., Fleck, R. A., Watson, P. F. 2006. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology* 66 (8). 1894-1900.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. M., Gadella, B. M. 2001. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65 (2). 462-470.
- Revell, S. G., Mrode, R. A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science* 36 (1-2). 77-86.
- Samplaski, M. K., Dimitromanolakis, A., Lo, K. C., Grober, E. D., Mullen, B., Garbens, A., Jarvi, K. A. 2015. The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13. 1-6.
- Sariozkan, S., Tuncer, P. B., Bucak, N. M., Buyukleblebici, S., Kinet, H., Bilgen, A. 2010. Evaluation of post-thaw quality of Brown-Swiss and Holstein bull semen diluted with different extenders. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*. 26 (1) 51-55.
- Satorre, M. M., Breininger, E., Beconi, M. T., 2012. Cryopreservation with alpha-tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology* 78 (7). 1548-1556.
- Sharafi, M., Forouzanfar, M., Hosseini, S. M., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R., Javahei, A. R., Esfahani, M. H. N. 2009. *In Vitro*

- Comparison of soybean Lecithin Based-Extender with Commercially Available Extender for Ram Semen Cryopreservation. *International Journal of Fertility and Sterility* 3 (3). 149-152.
- Schmidt, H., Kamp, G. 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128. 171-179.
- Stradaoli, G., Noro, T., Sylla, L., Monaci, M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* 67. 1249-1255.
- Strixner, T., Sterr, J., Kulozik, U., Gebhardt, R. 2014. Structural Study on Hen-egg Yolk High Density Lipoprotein (HDL) Granules. *Food Biophysics* (9). 314-321.
- Thundathil, J., Meyer, R., Palasz, A. T., Barth, A. D., Mapletoft, R. J. 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology* 54. 921-934.
- Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Bucak, M. N., Ulutas, P. A., Akalin, P. P., Büyükleblebici, S., Canturk, F. 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* 75 (8). 1459-1465.
- Ur Rehman, F., Zhao, Ch., Ali Shah, M., Subbhan Qureshi, M., Wang, X. 2014. Semen Extenders and Artificial Insemination in Ruminants. *Veterinaria* 1 (1). 1-8.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vásquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Anton, M. Bencharif, D., Tainturier, D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl and Bioxcell. *Theriogenology* 71. 895-900.
- Walters, E. M., Benson, J. D., Woods, E. J., Critser, J. K. 2009. The history of sperm cryopreservation. *Sperm Banking: Theory and Practice*. Cambridge University Press. 978-0-521-61128-2.

9 Seznam použitých zkratek

ASAP – Americká společnost živočišné produkce

ATP – Adenosin trifosfát

BSA – Bovinní albuminové sérum

BSP – Binder of semen protein

CASA – Počítačem asistovaná analýza spermatu

CAT – Enzym kataláza

CTC – Chlor tetracyklin

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

DMSO – Dimetyl sulfoxid

EDTA – Chelaton trilon komplexon

FITC-PNA – fluorescenční arašidový aglutin (fluorescein isothyocyanat peanut agglutin)

FITC-PSA- fluorescenční hráškový aglutin (fluorescein isothyocyanat pisum sativum)

GOT – Glutamická oxaloacetová transmitáza

GSH – Glutation

GSH-px – Peroxidovaný glutation

GSSH – Oxidovaný glutation

HOS test- Hypoosmotic sweling test

IVOS – Integrovaný vizuální systém

LDF – Nízkodenzitní lipoproteinová frakce

LDL – Nízkodenzitní lipoprotein

LPO – Peroxidovaný lipid

HDL – Vysokodenzitní lipoprotein

NADPH⁺ – Nikotinamidadeninukleotidfosfát

ROS – Reaktivní formy kyslíku

SOD – Superoxid dismutáza

TRIS – Hydroxymethyl aminometan

VLDL – Very low density lipoprotein

WHO – Světová zdravotnická organizace

ZP – *Zona pellucida*