

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



**Zvýšení kryoprotektivního účinku bezžloutkových ředidel
semene přídatkem nízkodenzitního lipoproteinu**

Diplomová práce

Autor práce: Petra Skalová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Zvýšení kryoprotektivního účinku bezžloutkových ředidel semene přidavkem nízkodenzitního lipoproteinu" 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 10.4.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. MVDr. Radko Rajmonovi Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a trpělivost při zpracování diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Ing. Ondrovi Šimoníkovi za poskytnuté rady při zpracování dat, práci v laboratoři, ochotu a vstřícný přístup.

Velké poděkování patří také celé mé rodině a přátelům za podporu, trpělivost a povzbuzování po dobu mého studia.

Zvýšení kryoprotektivního účinku bezžloutkových ředidel semene přídavkem nízkodenzitního lipoproteinu

Souhrn

Nízkodenzitní lipoproteiny (LDL) jsou funkční složkou vaječného žloutku, která zajišťuje rezistenci vůči chladovému šoku při mrazení a rozmrazování a zlepšuje motilitu po rozmrazení. V dnešní době je intenzivně zkoumáno použití extrahovaného LDL. Došlo by ke zkvalitnění inseminačních dávek a zamezení rizika kontaminace při používání vaječného žloutku. Cílem práce bylo ověřit hypotézu, zda přídavek LDL zlepší kryoprotektivní vlastnosti vybraných bezžloutkových ředidel býčího ejakulátu.

Experimentální inseminační dávky byly získány od osmi býků plemene Holštýnský skot a Český strakatý skot na inseminační stanici Natural s.r.o. v Hradištku pod Medníkem ve čtyřech odběrových dnech. Byla použita bezžloutková ředidla AndroMed® a Bioxcell® se čtyřmi typy ředění - kontrolní vzorek bez přídavku LDL, 4%, 6% a 8% přídavkem LDL. Dávky byly konzervovány standardním způsobem a uchovány v tekutém dusíku. Po rozmražení byly pomocí CASA modulu hodnoceny tři parametry rychlosti motility - VAP, VSL, VCL a tři parametry dráhy - LIN, STR a WOB. Dále byly stanoveny parametry přežitelnosti spermií pomocí fluorescenčního barvení. U ředidla AndroMed® dosahovaly nejlepších výsledků kontrolní vzorek a vzorek s 4% přídavkem LDL, po dvou inkubace dosahovaly nejlepších výsledků vzorky s 6% a 8% přídavkem LDL. Ihned po rozmražení bylo ve všech vzorcích s přidaným LDL více živých spermií než v kontrolním vzorku. Po dvou hodinách inkubace nebyly rozdíly v podílech průkazné. U ředidla Bioxcell® dosahovaly ihned po rozmražení nejlepších výsledků vzorky s 6% a 8% přídavkem LDL, po dvou hodinách inkubace dosahovaly nejlepších výsledků vzorky s 4% a 8% přídavkem LDL. Ihned po rozmražení i po dvou hodinách inkubace obsahovaly všechny vzorky s přidaným LDL více živých spermií než kontrolní vzorek. Lepší efekt přídavku LDL byl pozorován u ředidla Bioxcell® v obou časech inkubace. Parametry přežitelnosti spermií byly přídavkem LDL zlepšeny u obou použitých ředidel.

Klíčová slova: býk, spermie, LDL, motilita, přežitelnost

Increase of non-yolk semen diluter cryoprotective effects by low-density lipoprotein addition

Summary

Low density lipoprotein (LDL) is a functional component of the egg yolk, which confers resistance against cold shock during freezing and thawing and enhances motility after thawing. Nowadays, it is intensively studied using of the extracted LDL. This would lead to the improvement of insemination doses and reduce the risk of contamination when using egg yolk. The object was to test the hypothesis, whether the addition of LDL would improve the cryoprotective attributes of selected non-yolk thinners for bull semen.

Experimental insemination doses were obtained from eight bulls of Holstein breed and Czech fleckvieh breed at semen collection center Natural s.r.o. in Hradištko pod Medníkem in four sampling days. Non-yolk extenders AndroMed® and Bioxcell® were used on four types of dilution - a control sample without the addition of LDL, 4%, 6% and 8% addition of LDL. Doses were conserved in a standard manner and stored in liquid nitrogen. Then, after thawing, were evaluated three parameters of speed motility using CASA module - VAP, VSL, VCL and three parameters of velocity - LIN, STR and WOB. Further, the parameters of the sperm viability were determined using fluorescent staining. Using extender AndroMed® the best results were achieved by the control sample and sample with 4% addition of LDL. After two hours incubations, samples with 6% and 8% addition of LDL reached the best results. Immediately after thawing all samples with added LDL had more live sperm count than in the control sample. No significant differences in the evidence was observed after two hours of incubation. For Bioxcell® extender, the best results were reached immediately after thawing in samples with 4% and 8% addition of LDL. All samples with added LDL contained more live sperm count than the control sample after two hours of incubation. Improved effect of the addition of LDL was observed in Bioxcell® extender on both times of incubation. The parameters of sperm viability were improved with both extenders by the addition of LDL.

Key words: bull, sperm, LDL, motility, viability

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Spermie	3
3.1.1 Morfologie spermie	4
3.1.2 Metabolismus spermie.....	6
3.2 Semenná plazma	7
3.3 Způsoby hodnocení kvality ejakulátu	8
3.3.1 Makroskopické hodnocení ejakulátu.....	9
3.3.2 Mikroskopické hodnocení ejakulátu.....	9
3.4 Konzervace ejakulátu	13
3.4.1 Krátkodobá konzervace	14
3.4.2 Dlouhodobá konzervace.....	14
3.5 Ředění ejakulátu	15
3.6 LDL - Low density lipoprotein	18
4 Materiál a metody	20
4.1 Experiment 1 - Stanovení parametrů motility spermíí metodou počítačem asistované analýzy spermatu (CASA)	21
4.2 Experiment 2 - Stanovení parametrů přežitelnosti spermíí metodou fluorescenčního barvení	22
5 Výsledky	24
5.1 Experiment 1 - Stanovení parametrů motility spermíí metodou počítačem asistované analýzy spermatu (CASA)	24
5.1.1 Andromed	24
5.1.2 Bioxcell	29
5.2 Experiment 2 - Stanovení parametrů přežitelnosti spermíí metodou fluorescenčního barvení	34
5.2.1 Andromed	34
5.2.2 Bioxcell	35
6 Diskuze	36
7 Závěr	40
8 Seznam použité literatury	41

1 Úvod

Jedním z významných odvětví zemědělství u nás je reprodukce skotu. V dnešní době se využívají dva základní způsoby plemenitby, přirozená plemenitba a inseminace. Reprodukce je závislá na úspěšném zabřeznutí, které přímo souvisí s kvalitou inseminačních dávek. Hlavním impulzem k rozvoji metod konzervace ejakulátu a metod inseminace byla snaha o efektivní využití vynikajících býků a ekonomická výhodnost. V dnešní době je nejdůležitějším nástrojem managementu chovu hospodářských zvířat konzervace ejakulátu. Důkladné porozumění biologických dějů přes fyziologii a morfologii spermií až k interakci spermií s přídatnými látkami je zásadní pro úspěšnou optimalizaci protokolů.

U býků je nejčastěji využívána dlouhodobá konzervace ejakulátu, kdy jsou inseminační dávky uchovávány v pejetách v tekutém dusíku. Při konzervaci ejakulátu je veliký důraz kladen na ředidlo ejakulátu a jeho složení aby bylo zamezeno poškození membrán, ztrátě pohyblivosti a snížené přežitelnosti spermií. Ředidlo využívané pro dlouhodobou konzervaci musí sloužit jako pufr, dodávat spermiím energii, nesmí být toxické a především musí mít kryoprotektivní účinek. Proto se hledalo takové kryoprotektivum, které bude mít tyto účinky a zároveň bude ekonomicky dostupné. V roce 1939 byly objeveny účinky vaječného žloutku na ochranu spermií. Podle některých studií jsou ale přes přidaná antibiotika ředidla s přidaným žloutkem výrazně kontaminována. K dalšímu průlomu přišlo v roce 1974, kdy byla objevena LDL frakce vaječného žloutku (low density lipoprotein), která zajišťuje rezistenci vůči chladovému šoku při mrazení a rozmrazování, zlepšuje motilitu po rozmrazení a nehrozí u ní kontaminace ředidla. Výměnou vaječného žloutku za aktivní frakci LDL můžeme zabránit mikrobiologickému znečištění inseminačních dávek. Teprve v roce 2002 byla publikována metoda, která umožňuje ekonomické získávání LDL. Pro uvedení LDL do praxe je nutné zhodnotit vhodné koncentrace a přesný vliv LDL na spermiie ve vztahu k použitému ředidlu.

2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit platnost hypotézy, že přípravek LDL zlepší kryoprotektivní vlastnosti vybraných bezžloutkových ředidel býčího ejakulátu. Dílčími cíli řešení bude v inseminačních dávkách býků ředěných bezžloutkovým ředidlem Andromed® nebo Bioxcell® s rozdílným přídatkem LDL stanovit po rozmražení

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

a na základě statistické analýzy získaných dat zhodnotit efekty testovaných variant ředění.

3 Literární rešerše

Býčí ejakulát je tvořen z buněčné složky (spermie) a tekuté složky (semenná plazma). Přežvýkavci se vyznačují malým objemem ejakulátu s vysokou koncentrací spermií. Je ejakulován ve dvou frakcích. První tvoří sekret bulbouretrálních žláz, upravující pH uretry, druhá již obsahuje spermie a další složky semenné plazmy. Objem býčího ejakulátu se pohybuje mezi 2 až 10 ml, kde množství spermií v 1 μ l se pohybuje obvykle mezi 0,2 - 2 miliony. V ejakulátu je 4 - 10 miliard spermií (Marvan et al., 2011).

3.1 Spermie

Spermie tvoří nejdůležitější složku ejakulátu a jejich hlavní funkcí je přenos genetické informace do vajíčka, který je podmíněn motilitou a oplozovací schopností spermií. Funkčnost buňky je dána jejím vývojem, schopností interakce s prostředím a funkční morfologií.

Spermie se tvoří v semenotvorných kanálcích varlat ze spermatogenních buněk semenného epitelu semenotvorných kanálků, které v konečné fázi tvoří samčí gamety. Tento proces se nazývá spermatogeneze, tedy postupná proliferace buněk a jejich transformace za vzniku zralé spermií. Spermatogenezi můžeme rozdělit na dva procesy: spermatocytogenezi, při které vznikají haploidní buňky, a spermiogenezi, při které tyto haploidní buňky získávají svoji vnitřní strukturu a tvar. Plně vyvinuté spermie jsou protáhlé buňky skládající se ze zploštělé hlavičky nesoucí jádro s genetickou informací a z bičíku obsahující aparát nezbytný k buněčnému pohybu (Hafez et Hafez, 2000). Do lumen semenotvorných kanálků jsou uvolňovány nezralé spermie. Některé ještě nesou protoplazmatickou kapku, která se při průchodu nadvarletem posouvá po bičíku až do úplné ztráty, signalizující její zralost. Oplození schopnost získává spermie při průchodu nadvarletem. Nadvarle rozdělujeme na tři části s odlišnými funkcemi. V hlavě nadvarlete dochází k resorpci tekutiny, která vyplavuje spermie z varlete. V těle nadvarlete jsou spermie promíchány se sekrety nadvarlete, které díky vysokému podílu tuků zvyšují odolnost povrchových membrán spermií. Nakonec se spermie koncentrují v ocasu nadvarlete, kde dozrávají a zůstávají ve stavu anabiózy až do ejakulace (Ho et Suarez, 2003).

3.1.1 Morfologie spermie

Hlavní funkcí spermie je pohyb v samičím reprodukčním traktu a přenos genetické informace do vajíčka. Těmto funkcím je plně adaptován tvar a utváření vnitřních i vnějších struktur spermatické buňky. Tyto specializované buňky lze rozdělit na hlavičku, spojovací část bičíku a terminální část bičíku. Oválná a zploštělá hlavička je dlouhá 9,11 μm a široká 5,05 μm . Spojovací část bičíku je dlouhá 14,8 μm a terminální část 45 - 50 μm . Délka celé spermie býka je 68,9 - 73,9 μm (Věžník et al., 2004).

Hlavička tvoří základ býčí spermie. Tvar je geneticky kódován a je relativně konstantní. Hlavička spermie nese genetickou informaci a umožňuje enzymatický průchod do vajíčka. Haploidní DNA je uloženo v jádře v kondenzovaném stavu ve spojení s vysoce bazickými komplexy proteinů, známé jako protaminy. Struktura jaderné membrány je zjednodušená, v průběhu spermatogeneze se vytrácí komplexy jaderných pórů (Ho et Suarez, 2003). Haploidní spermatická buňka je výsledkem meiotického dělení, ke kterému dochází při formování spermie (Hafez et Hafez, 2000). Zásadní strukturou hlavičky je akrozom, vzniklý jako derivát Golgiho aparátu. U býčích spermií pokrývá asi 52 % hlavičky. Můžeme ho rozdělit na matrix, vnitřní a vnější akrozomální membránu (Tulsiani et al., 1998). Pro průnik obaly vajíčka je akrozom vybavený širokým spektrem molekul jako jsou glykohydrolázy (hyaluronidáza) a proteázy (akrozin). Při akrozomální reakci splývá vnější membrána s plazmatickou membránou, čímž se vystavují hydrolytické enzymy a membránové receptory. Toto místo se označuje jako ekvatoriální segment a spermatická membrána v tomto místě splývá s vajíčkem (Wu et al., 2007).

Bičík je ústřední orgán pro pohyb neboli motilitu spermie. Vzniká při spermiogenezi a umožňuje spermiu pohyb v samičím pohlavním traktu. Hlavní strukturou bičíku je axonema, svazek mikrotubulů tvořený jedním centrálním párem a devíti páry mikrotubulů po obvodu bičíku (Fawcett, 1975). Páry mikrotubulů jsou navzájem propojeny nexinovými spojkami s centrálním párem středovými paprsky. S nimi jsou asociované dyneinové ATPázy využívající energii z ATP a fungující jako mikrotubulární motory. Vlastní pohyb je dán střídavým klouzáním jednotlivých mikrotubulů, ohýbáním axonemy a relaxací (Cosson, 1996).

Bičík lze rozdělit na čtyři části, a to na část spojovací bičík s hlavičkou, střední část, hlavní část a koncovou část. Všechny mají společnou vnitřní mikrotubulární strukturu.

Spojovací část je často nazývána jako krček. Jedná se o spojující část hlavičky a bičíku, z níž v místě původní centrioly vychází axonema do celého bičíku.

Střední část zaujímá asi čtvrtinu délky bičíku a je vymezen annulem na pomezí s hlavní částí bičíku. Je to hlavní energetické centrum spermie – je zde lokalizována helikální mitochondriální pochva, ovinutá okolo axonemy. Pochvu tvoří desítky mitochondrií, generující energii pro pohyb bičíku (Bennetts et Aitken, 2005).

Hlavní část bičíku tvoří dvě třetiny délky a od střední části je oddělen Jensenovým prstenem. Axonema je v této části kryta fibrózním pouzdem ovinutým okolo mikrotubulů formou helixu. Fibrózní pouzdro slouží také jako zásobárna glykolytických enzymů a složek signálních drah (Krisfalusi et al., 2006).

Koncová část je nejkratší část bičíku tvořená pouze končícím fibrózním pouzdem a axonemou obalenou plazmatickou membránou (Fawcett, 1975).

Pro správné fungování buňky je zcela zásadní funkční plazmatická membrána. Obecně lze říci, že lipidová složka plazmatické membrány je zodpovědná za motilitu spermie, její životaschopnost i chladovou senzibilitu (Parks et Lynch, 1992). Při průchodu nadvarletem získává fosfolipidová membrána povrchový glykokalyx. Tato struktura hraje důležitou roli v přežití spermie, v regulaci kapacitace, ve stabilizaci spermatické membrány ale i v umožnění penetrace cervikálního hlenu (Tollner et al., 2008). Membrána spermie je výrazně polarizovaná a na různých částech membrány i v různých fázích oplozovacího procesu funguje rozdílný antigenní profil. To je dáno asymetrickým rozložením fosfolipidů na vnitřním i vnějším listu membrány, které udržují ATP dependentní translokázy (Müller et al., 1994). Změny v tomto rozložení mohou být ukazatelem začínající apoptózy spermie, jejíž nejvýznamnějším markrem je přítomnost fosfatidylserinu na vnějším listu plazmatické membrány (Anzar et al., 2002). Důležitá je pro funkčnost membrány také její fluidita, která je ovlivněna poměrem cholesterolu k fosfolipidům (Parks et Lynch, 1992).

3.1.2 Metabolismus spermie

Pro buněčné děje a pro pohyb je pro spermii důležitá energie. Energie je uvolňována mitochondriemi, které svou energii uvolňují při oxidativních procesech. Energie je převáděna na pohyb a nejvíce je využita pro pohyb bičíku spermie (Alberts et al., 1998). Pro udržení oplozovací schopnosti a základních životních funkcí potřebují spermie nosiče energetických zdrojů. Ve zralých spermích jsou to proteiny s označením GLUT. Je to skupina třinácti proteinů usnadňujících přenos cukrů (Bucci et al., 2011). Nejdůležitějším nosičem je však adenosin trifosfát (ATP). ATP je tvořen adeninem, ribózou a třemi zbytky kyseliny fosforečné. Je pomocí enzymu ATPázy, který je obsažen v raménkách dubletových filament v bičíku spermie, štěpen na adenosin difosfát (ADP) a fosfát za uvolnění velikého množství energie. ATP hraje významnou roli i v membránovém transportu a v udržování membránového potenciálu. Spermie získávají energii v podobě ATP dvěma hlavními procesy. Glykolýzou a respirací (Alberts et al., 1998).

Glykolýza je proces probíhající při nedostatku kyslíku. Spermie rozkládají cukry (fruktózu, glukózu nebo manózu) na kyselinu mléčnou a to umožňuje spermím přežít v anaerobních podmínkách (Hafez et Hafez, 2000). Glykolýza je metabolická dráha přeměny glukózy na dvě molekuly pyruvátu (kyselina pyrohroznová) za výtěžku dvou molekul ATP a dvou molekul NADH. Tento proces probíhá v cytosolu buněk a kyselina pyrohroznová přechází do mitochondrií a přes acetyl - CoA se dostává do Krebsova cyklu, který je energeticky výhodný (Alberts et al., 1998). Postupnou dekarboxylací a oxidací šestiuhlíkaté kyseliny citrónové se uvolňují redukční ekvivalenty, které slouží k syntéze ATP, hlavního energetického zdroje buňky (Turner, 2003). Při hydrolýze ATP se glykolytické enzymy vážou na fibrózní pochvu spermie a mění se tak uspořádání molekul tubulinu v dubletových strukturách. To zajišťuje přísun energie pro pohyb bičíku a pohyb spermie vpřed (Miki et al., 2002).

Respirace je naopak proces probíhající za přítomnosti kyslíku. Tato metabolická dráha je mnohem účinnější při výrobě ATP než glykolýza. Z vazeb kyseliny pyrohroznové je uvolňována chemická energie za vzniku pohotové energie ATP. Jako odpadní produkty štěpení vzniká CO_2 a voda. Nejvíce energie ATP je využíváno ve spermích k udržení aktivních transportních procesů na membránách (Hafez et Hafez, 2000).

3.2 Semenná plazma

Semenná plazma je nebuněčná složka suspenze ejakulátu a vytváří vhodné prostředí pro přežití spermií v pohlavním ústrojí samice, které pufrací systémy udržují v osmotickém optimu a zabraňují tak předčasné kapacitaci (Schoneck et al., 1996). Semenná plazma je produkována z výměšků varlat, nadvarlat a přídatných pohlavních žláz - Cowperovy žlázy, prostata, semenné vajíčky, uretrální žlázy a ampule chámovodu. Ampule chámovodu u býka produkuje sekret s vysokou hladinou fruktózy, kyseliny citrónové, Ca, Na a K. Semenná plazma představuje asi 90% objemu ejakulátu a jsou zde přítomny lipidy, aminokyseliny, sacharidy, nukleotidy, anorganické ionty, organické kyseliny a vitamíny (Hafez et Hafez, 2000).

V bovinní semenné plazmě se ve vysokých koncentracích vyskytuje Ca^{2+} , dále také Mg^{2+} , Cl^- , Na^+ a K^+ . Z aminokyselin především glutamová kyselina a L-arginin, které slouží jako možné zdroje energie (Patel et al., 1998). Z lipidů se zde nejčastěji vyskytují fosfolipidy, cholesterol nebo diglyceridy. Pro aerobní metabolismus je důležitý epididymický glycerol foforylcholin. Organický iont HCO_3^- produkovaný semennými vajíčky je hlavním pufracím prostředkem. Dále v semenné plazmě najdeme inositol. Pod vlivem testosteronu je v semenných vajíčkách syntetizována z krevní plazmy fruktóza, která slouží jako hlavní energetický zdroj spermií. V semenných vajíčkách vzniká také sorbitol (Kumar et Farooq, 1994). Z enzymů obsažených v semenné plazmě hraje významnou roli v procesu nástupu kapacitace a v ochraně spermií v reprodukčním traktu samice acetylhydroláza destičkového aktivačního faktoru (PAF; Hafez et Hafez, 2000).

Semenná plazma i spermie obsahují enzymy ochraňující proti oxidativnímu stresu. Jsou to například superoxid dismutáza (SOD), glutatonin reduktáza (GR), glutatonin peroxidáza (GPx) a kataláza (CAT). Vyskytuje se zde ale také mnoho dalších enzymů, například alaninaminotransferáza (ALT), alkalická fosfatáza (ALP), asparátaminotransferáza (AST), gama-glutamyl transpeptidáza (GGT) nebo laktát dehydrogenáza (LDH). U některých enzymů zatím není známá jejich přesná funkce (Juyena et Stelletta, 2012). V semenné plazmě můžeme také prokázat přítomnost některých hormonů, včetně androgenů, prostaglandinů, estrogenů, FSH a LH, inzulín, glukagon, růstový hormon nebo také prolaktin a relaxin. Složku semenné plazmy tvoří také imunoglobuliny třídy IgA (Hafez et Hafez, 2000).

V oplozovacím procesu hrají důležitou roli proteiny a peptidy, které tvoří základní složku semenné plazmy. Jejich schopnost specifické vazby na různé ligandy (polysacharidy, fosfolipidy či lipoproteiny) je spojena i s mechanismem jejich účinku. Nejvýznamnější je vazba proteinů semenné plazmy na membránu spermie, která zabraňuje aglutinaci spermie, předčasné akrozomální reakci a fagocytóze v samičím pohlavním traktu (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2011). Proteiny patří do vysokomolekulární organické složky semenné plazmy a jsou produkovány semennými vajíčky a prostatou. Nejdůležitějšími proteiny v semenné plazmě jsou BSP proteiny (Binders of sperm). Do této skupiny patří tři proteiny, BSP-1, BSP-3 a BSP-5 (Manjunath et al., 2009). Tyto proteiny tvoří až 57 % veškerých proteinů semenné plazmy a jsou produkovány ampulí chámovodu a semennými vajíčky. V *in vivo* podmínkách brání BSP proteiny kapacitaci tím, že se na spermatické membráně váží na fosfolipidy, tím se imobilizují lipidy a spermatická membrána se destabilizuje (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2011). Dlouhodobé vystavování proteinům BSP snižuje rezistenci vůči chladovému šoku a proto je nežádoucí u chlazených a mražených inseminačních dávek. Předností využití vaječného žloutku pro výrobu inseminačních dávek je, že se BSP proteiny přednostně váží na molekuly LDL (Lusignan et al., 2011). Pro regulaci kapacity a akrozomální reakce jsou důležité heparin vazebné proteiny (HBPs), které pomocí vazby na heparin regulují jejich nástup (Revah et al., 2000). Dále se v semenné plazmě nachází transferin, albumin, prostaglandin D-syntáza (PGDS) a nukleobindin (Souza et al., 2011).

3.3 Způsoby hodnocení kvality ejakulátu

V provozu inseminačních stanic je nutná pravidelná kontrola kvality ejakulátu na odborné úrovni, jelikož je na ní závislý úspěch inseminací. Speciální vyšetřovací metody jsou používány ke kontrole zdravotního stavu býka, při odchylkách základních ukazatelů kvality ejakulátu, při poklesu plodnosti býka nebo při exportu a importu spermatu. Tyto metody se rozdělují na metody vyšetření čerstvého spermatu po odběru a na vyšetření zmrazeného spermatu (Kliment et al., 1983). Vzorky bývají odebírány od zkušených býků pomocí umělé vagíny, která je udržována při teplotě 39 - 41 °C. Odběry probíhají nejčastěji v ranních hodinách před kmením a každý denní odběr je složen ze dvou odebraných dávek s minimálním intervalem 30 minut. Kvalita ejakulátu musí odpovídat požadavkům stanoveným normou. Zpracování odebraných ejakulátů se provádí ve sterilované a vyhřáté laboratoři (Vale, 1994).

3.3.1 Makroskopické hodnocení ejakulátu

Barva závisí na kolísání koncentrace spermií v ejakulátu. Barva býčího spermatu se obecně pohybuje od mléčné k béžové barvě, ojediněle s nádechy modré. Barva ejakulátu se posuzuje proti světlu (Kumar et Farooq, 1994).

Objem býčího ejakulátu bývá měřen ihned po odběru. Liší se v závislosti na plemeni a věku býka. U mladých býků se pohybuje objem vzorku od 1 do 3 ml, zatímco u starších býků je to okolo 6 ml (Jelínek, 2003). Zjišťuje se měřením v kalibrovaném válci nebo vážením na laboratorní automatické váze (Louda et al., 2001).

Hodnota pH býčího ejakulátu se pohybuje v rozmezí od 6,4 do 7,0 (Kumar et Farooq, 1994).

Pach se posuzuje čichem ve sběrači. Dobré sperma má slabý specifický pach připomínající pach kravského mléka (Louda et al., 2001).

Koncentrace se dá přesně vyjádřit pomocí spektrofotometru nebo hemocytometru. Jedná se o vyšetření hodnotící stupeň zákalu, který vznikne po standardním naředění ejakulátu. 0.1 ml býčího ejakulátu se doplní do objemu 10 ml fyziologickým roztokem a důkladně se homogenizuje. Měření je prováděno při vlnové délce 500 nm (Věžník, 2004). Koncentrace je dána funkční aktivitou semenotvorného epitelu varlat ale také zdravotním stavem pleménika nebo technikou odběru (Fabbrocini et al., 1995). Jelínek (2003) uvádí průměrnou koncentraci spermií $1 - 2 \times 10^6$ v mm^3 .

3.3.2 Mikroskopické hodnocení ejakulátu

Mezi základní metody mikroskopického hodnocení spermií patří zhodnocení morfologické. Tato metoda může přispět ke zjištění příčin neplodnosti pleménika.

Morfologicky abnormální spermie mohou mít veliký vliv na plodnost býků například omezeným pohybem spermií nebo blokováním fertilizace zdravou spermií (Gamčík et al., 1992). Při vyšetření jsou sledovány odchylky od normální struktury na všech částech spermie. Při posuzování roztěrů je hodnocen procentuální poměr abnormálních spermií a jejich kvalitativní změny (Věžník et al., 2000). K hodnocení jsou používány různé způsoby barvení a mikroskopická technika. Morfologické změny lze dělit podle místa vzniku na primární a

sekundární. Primární změny vznikají v průběhu spermiogeneze (změny v nukleoplazmě, změny na akrozomu), zatímco sekundární vznikají již na zformované spermii - například během vývodu pohlavními cestami nebo při samotném zpracování ejakulátu (změny hlavičky, torze bičíku a další vývojové anomálie). Mikroskopicky se také hodnotí procento nezralých spermií s protoplazmatickou kapkou (Věžník et al. 2004).

Další a zároveň nejvyužívanější biologické metody jsou testy přežitelnosti a mikroskopická hodnocení aktivity spermií. Testy přežitelnosti jsou důležité pro posouzení oplozovací schopnosti spermií a posouzení jejich biologické aktivity (Bacinoglu et al., 2008). U těchto testů záleží především na stavu cytoplazmatické membrány spermie. Používá se metoda funkčního vyšetření spermií a hodnotí se funkční a morfologická rezistence spermií na základě několika hodnot po uplynutí určitého času. Ve funkčním vyšetření se využívá hodnocení aktivity spermií, procenta živých a mrtvých spermií, rychlost pohybu a aktivity reductáz (Louda et al., 2001).

Dlouhodobý chladový test přežitelnosti probíhá v chladícím boxe při teplotě 1 – 3 °C. U takto posuzovaných vzorků se nejprve hodnotí aktivita spermií a následně se vloží do chladničky. Vzorek hodnotíme každý den ve stejnou dobu a sledujeme pod mikroskopem na vyhřívané destičce aktivitu spermií. Ejakuláty s dobrou biologickou hodnotou si zachovávají po 96h alespoň 50% aktivitu (Louda et al., 2001).

Krátkodobý tepelný test přežitelnosti posuzuje rychlost, s kterou spermie ztrácí aktivitu v teplém prostředí kvůli vyšší energetické spotřebě. Tento test nebývá delší než 6 hodin. Ejakulát se ve vodní lázni ohřeje na 38°C. Po dosažení této teploty se v hodinových intervalech odebírá vzorek a posuzuje se aktivita spermií. Aktivita se zaznamenává do zlomků, kdy na místo čitatele je uveden čas a na místo jmenovatele aktivita spermií v procentech. Za dobrý ejakulát je považován ten, kde rozdíl mezi 0. a 2. hodinou je menší než 10 % (Věžník et al., 2004). Vyšší oplozovací schopnost by měli mít ejakuláty s větší absolutní délkou životnosti (Louda et al., 2001).

Motilita spermií je považována za jednu z nejdůležitějších vlastností pro vyhodnocení kvality ejakulátu. Pro pohyb v samičím pohlavním traktu a penetraci vaječných obalů a membrány je pro spermii nezbytný progresivní pohyb vpřed, který je nejvýznamnějším ukazatelem fertilizační schopnosti ejakulátu. Při tomto pohybu se spermie otáčí kolem vlastní osy zhruba 3 - 15 krát za vteřinu (Louda et al., 2001). Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují motilitu a látkovou výměnu spermií. Patří mezi ně mnoho endogenních faktorů, jako například věk plemeníka, doba, kterou strávily spermie v nadvarleti, doba po ejakulaci, zrání spermií ale také veškeré tekutiny, se kterými přijde spermie do styku (semenná plazma a tekutiny samičího pohlavního traktu). Podstatná je také energetická zásoba ATP, pohyb bičíku, transport na membráně, membránová integrita, aglutinační faktory, vazebné proteiny, protilátky, detergenty a aktivita receptorů. Z exogenních faktorů jsou to například osmolalita, pH prostředí, teplota a iontové složení kontaktních tekutin, viskozita a hydrodynamika. Důležitou roli hrají také anorganické ionty Cu, Zn, Cd, Mn, Hg (Věžník et al., 2004).

Pohyb zralých spermií v ejakulátu je definován aktivitou bičíku. Ten orientuje pohyb vpřed za hlavičkou a označujeme ho jako pohyb souosý dopředný. Ve stojícím ejakulátu se spermie pohybují neorientovaně a nahodile, u přežvýkavců se tento pohyb nazývá vířivý (Věžník et al., 2004). Po kapacitaci a hyperaktivaci v samičím traktu se tento pohyb usměřňuje chemotaxí za faktory vylučovanými vajíčkem a kumulárními buňkami a reotaxí spermie, tedy směrem opačným ke směru proudění tekutiny (Ishijima et al., 1992). Motilitu lze ji hodnotit mnoha metodami. Běžně je posuzována vizuálním odhadem procenta pohyblivých buněk. Hodnocení pohyblivosti se provádí v ejakulátu naředěném fyziologickým roztokem pufovaným fosfátovým pufrem (PB) na pH 6,8. Malá kapka ejakulátu je umístěna na sklíčko při teplotě 37°C a zkoumá se pod mikroskopem při zvětšení 200x - 400x (Věžník, 2004). Dále pro hodnocení můžeme využít turbidimetrii (Budworth et al., 1987), fotometrické metody, Doppler spektroskopii (Boyers et al., 1989) nebo metodu počítačem asistované analýzy propojenou s fotomikrografií označovanou CASA (computer assisted sperm analysis).

CASA metoda vyhodnocuje i parametry jako je rychlost, směr a rytmus pohybů (Fabbrocini et al., 1995). Princip je v pořizování videosnímku pomocí digitální kamery a analyzování pohybových vlastností spermií pomocí algoritmického zpracování nejlepších pohybových ukazatelů jednotlivých spermií vzhledem k jejich pohybu v mikroskopickém poli (Verstegen et al., 2002). K hodnoceným parametrům rychlosti patří rychlost hlavičky na průměrné dráze - VAP (average path velocity), průměrná rychlost hlavičky po přímé dráze mezi počátečním a

koncovým bodem měření - VSL (straight line velocity), průměrná rychlost spermie na skutečné dráze od bodu k bodu - VCL (curvilinear velocity). Všechny tyto pohyby se uvádějí v mikrometrech za sekundu [$\mu\text{m/s}$]. Další z hodnocených pohybů jsou parametry dráhy, ke kterým řadíme index přímočarosti pohybu - STR (straightness), který vyjadřuje hodnotu poměru VSL/VAP v procentech, linearitu dráhy - LIN (linearity), která je průměrnou hodnotou poměru VSL/VCK a vyjadřuje se také v procentech, a stupeň oscilace - WOB (wobble), který vyjadřuje hodnotu poměru VAP/VCL $\times 100$. Všechny tyto parametry umožňují přesnější analýzu pohybu spermie, porovnání změn před a po kapacitaci, nebo rozdíl mezi přímočarým aktivovaným a hyperaktivovaným pohybem spermie (Mortimer et al., 2013; Verstegen et al., 2002; Věžník et al., 2004).

Hodnocení integrity membrán je dalším ukazatelem fertilizační schopnosti spermie. Spermiu pokrývá dvojitá fosfolipidová membrána, ve které jsou začleněny strukturální proteiny. Membrána je z vnější strany chráněna vrstvou složenou z polysacharidů, tzv. glykokalix. Ten napomáhá k udržení povrchového napětí, pH a selektivně ovlivňuje rychlost difúze (Věžník et al., 2004). Pro fertilizační schopnost spermie je velice důležitá správná integrita membrán. Podstatou je asymetrické rozdělení fosfolipidů. Na vnější straně membrány především cholin, fosfatidylcholin a sfingomyelin a na vnitřní straně aminofosfolipidy. Pokud dojde ke zhoršení podmínek, spermie začne procházet biologickými i morfologickými změnami a následně začne nekrobiotický proces. Ten se projevuje pronikáním vody a mimobuněčných iontů do buňky. V těchto případech nastávají změny především v oblasti akrozomu, mitochondrií, povrchové membrány a bičíku. Testování integrity membrán tedy poukazuje na kvalitu spermatu (Věžník et al., 2004).

Mikroskopický test stanovení živých a mrtvých spermií využívá rozdílu propustnosti plazmatické membrány u živých a nekrotizujících spermií. U funkční spermie vykazuje membrána silně polarizovanou a stranově odlišnou stavbu. Ta udržuje elektrochemický náboj na membráně a správnost transmembránového transportu. Živá a funkční spermie je schopná udržet vysoce charakterizovanou vnitřní homeostázu. Tu ovládá vlastnostmi polopropustné membrány a transportními systémy membrány. U buňky poškozené nebo nekrotizující se vlastnosti membrány radikálně liší a buňka již vnitřní prostředí neudrží. Do buňky se tak dostávají látky, které by za normálních okolností membrána nepropustila. K rozlišení živých a mrtvých spermií využíváme barvení eozinem, který proniká do mrtvých spermií a na roztěru je možné je rozlišit od funkčně zdravých spermií (Louda et al., 2001).

Test rezistence vůči hypoosmotickému prostředí (HOS test - Hypoosmotic swelling test) také využívá rozdílných parametrů propustnosti poškozených membrán a často se kombinuje s předešlým testem stanovení živých a mrtvých spermií. Pokud je buňka s neporušenou membránou umístěna do hypoosmotického prostředí, snaží se vyrovnat osmotickou nerovnováhu a propouští přes membránu molekuly vody. To se mikroskopicky projeví na bičíku, který se při změně objemu zkroutí (Jeyendran et al., 1984).

3.4 Konzervace ejakulátu

První poznatky týkající se konzervace spermií za nízkých teplot sahají až do roku 1776, kdy italský fyziolog Spallanzani poznamenal, že spermie ochlazená sněhem se inaktivovala a může být po ohřátí znovu aktivována (Watson, 1975). V roce 1949 přišel s jedním z nejdůležitějších vývojů Polge et al., kteří použili glycerol jako kryoprotektivum pro konzervaci spermií (Polge et al., 1949). První pokusy s glycerolem byly prováděny na drůbežím ejakulátu a později následoval i ejakulát býčí. Technologie kryokonzervace semene přinesla revoluční změnu v dlouhodobém uchovávání a otevřela prostor pro nové a účinnější formy šlechtění (Shannon, 1978).

Cílem konzervace ejakulátu je zachování dobré oplozovací schopnosti a životaschopnosti spermií. Dále výroba maximálního počtu inseminačních dávek s takovým počtem aktivních spermií, který odpovídá biologickým požadavkům pro zajištění úspěšné koncepce (Louda et al., 2001). Inseminační dávky se uskladňují a balí dvojím způsobem. První způsob, kdy se ejakulát mrazí do pelech o objemu $0,1 \text{ cm}^3$ a skladuje se v papírových krabičkách popsanych registrem býka, nazýváme japonská metoda. Druhý způsob je dnes nejrozšířenější metodou dlouhodobé konzervace a nazývá se francouzská metoda. Semeno je uskladňováno v pejetách o objemu $0,25 - 0,5 \text{ cm}^3$ a každá pejeta je značena přesnými identifikačními údaji o býkovi, zemi původu a datu odběru (Jedlička, 2010). Podle způsobu konzervace využíváme na přípravu inseminačních dávek odpovídající ředidlo a způsob uchování, krátkodobou nebo dlouhodobou konzervaci. Obojí má významný vliv na vitalitu a oplozovací schopnost spermií (Gamčík et al., 1992).

3.4.1 Krátkodobá konzervace

Inseminační dávky určené pro krátkodobou konzervaci uchováváme v chladícím boxe při teplotě 2 - 4 °C a využíváme je k inseminaci maximálně 2 dny. Tuto dobu můžeme prodloužit použitím citrátu sodného, kdy snížíme pH na 6,15. Pro krátkodobou konzervaci využíváme několik typů ředidel. Jsou to například žloutko-citrátové, žloutko-mléčné nebo ředidlo ze sušeného mléka. Ředidlo se musí připravovat vždy čerstvé a je důležité zachovat jeho sterilitu. Vaječné žloutky by měli být čerstvé a pocházet z chovů prostých TBC a dalších nálezů. Mléko používané do ředidel by mělo být sušené nebo převařené. Citrát sodný se skladuje ve tmě a chladu, s koncentrací 2,98 - 3,28 % a pH 6,7 - 6,85 (Louda et al., 2001).

3.4.2 Dlouhodobá konzervace

U skotu se k přípravě inseminačních dávek nejčastěji využívá dlouhodobá konzervace. Inseminační dávka je uložena v pejetách a uchovávána při teplotě -196 °C v tekutém dusíku v dvouplášťových kontejnerech. Inseminační dávky jsou připravovány nejčastěji v pejetách o objemu 0,25 ml a po rozmrazení musí obsahovat minimálně 10 milionů aktivních spermií. Proto ředění ejakulátu k přípravě inseminačních dávek musí odpovídat aktivitě spermií v ejakulátu a předpokládané aktivitě po rozmrazení (Věžník et al., 2000).

Proces kryokonzervace můžeme popsat v několika po sobě jdoucích krocích. Je to ředění spermatu, přidání kryoprotektantů, ekvilibrace, mražení, uchovávání a rozmražení. Každý z těchto kroků v sobě nese riziko poškození buňky (Thurston et al., 2002). Při nesprávném ochlazení spermií může dojít k chladovému šoku spermie, poškození buněčných struktur a biochemickému poškození spermie. Bývá poškozena zejména membrána, která ztrácí svou selektivní propustnost a uvolňuje mnohé buněčné složky, včetně lipidů, proteinů a iontů (Salisbury et al., 1978). Membrána se tak stává více propustná především pro Ca²⁺ ionty (Bailey et al., 2000). Při kryokonzervaci může docházet k osmotickému stresu, který můžeme vyvolat dvěma způsoby - přidáním kryoprotektiv do fyziologicky izotonického média nebo zmrazením extracelulární vody (Johnston et al., 2006). Při pomalém mražení je voda z buňky vytlačována a zvyšuje se koncentrace solí v buňce a dochází k dehydrataci, tento jev se nazývá solution effect. Tento osmotický stres lze snížit rychlým zmrazením, ale to může vyvolat vznik intracelulárních krystalů, které poškodí vnitřní struktury buňky (Hamadeh et al., 2001).

Pro dlouhodobou konzervaci používáme dvě mrazící techniky. Konvenční, kdy je rychlost chlazení $-0,55\text{ °C/min}$ a rychlost mražení $-19,1\text{ °C/min}$. Druhá technika je automatizovaná s rychlostí chlazení $-0,23\text{ °C/min}$ a rychlost mražení -15 °C/min . Při hlubokém mražení je nutné hlídat přechod skladovací teploty nad -130 °C , kdy může dojít k rekrystalizaci. K ní dochází, pokud větší krystaly rostou na úkor menších a narušují tak vnitřní strukturu buňky (Louda et al., 2001).

3.5 Ředění ejakulátu

Důležitým faktorem pro skladování zmražených spermií je užití vhodného ředidla. Především pro podporu přežití spermií v *in vitro* podmínkách, navození vhodného prostředí a zvětšení objemu. V čerstvě ejakulovaném býčím spermatu je koncentrace spermií velmi vysoká. Při ředění je tedy nutné stanovit vhodný objem ejakulátu, který bude obsahovat dostatečné množství buněk a nebude snížena jeho oplozovací schopnost (Coulter, 1992). Po odběru proběhne makroskopické i mikroskopické zhodnocení ejakulátu, a pokud je kvalitní, do 15 minut proběhne ředění. U býků se obvykle požaduje, aby inseminační dávka po rozmražení obsahovala 10 milionů aktivních spermií při minimálně 30% aktivitě. U některých, zvláště cenných býků s výjimečně dobrou plodností, lze počet spermií v inseminační dávce snížit za předpokladu, že bude dosahováno dobrého zabřezávání po první inseminaci (Louda et al., 2001).

Jednotlivé složky ředidel lze rozdělit podle účinnosti na - extendory, protektory a implementory. Extendory v ředidlech zvyšují objem semene a přidávají se k čerstvému spermatu. Protektory zajišťují výživu a ochranu spermií v prostředí mimo organismus a implementory ještě navíc obsahují látky, které ovlivňují průchod spermií samičím pohlavním traktem a příznivě působí na proces oplodnění (Gamčík et al., 1992). Použitá ředidla musí obsahovat energetický zdroj pro spermie, dále zajišťovat odpovídající pH a osmotický tlak. Ředidlo by mělo být sterilní a netoxické a jeho teplota by měla být přibližně stejná jako teplota ejakulátu $\pm 1\text{ °C}$ (Louda et al., 2001).

Do ředidel přidáváme antibiotika zajišťující ochranu před infekcemi. Využívají se pouze taková antibiotika, která nepůsobí na spermie toxicky - sulfonamidy (Bousseau et al., 1998).

Pro zachování vhodného osmotického tlaku přidáváme do ředidla soli. Tlak musí odpovídat nitrobuňčenskému tlaku spermií. Využívá se především 0,9% roztok NaCl, který se přidává ke spermatu v poměru 5:1 (Amirat et al., 2005).

Pufrační vlastnosti ředidla zajišťuje citrát sodný, fosfát nebo tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS). Ty udržují hladinu pH v rozmezí 6,4 - 6,8 a zabraňují aglutinaci. Dané pH musí odpovídat biologickým vlastnostem spermie a je také důležité při vzniku nežádoucích zplodin metabolismu spermií - kyseliny mléčné. Nejlépe redukuje spotřebu kyslíku spermiemi a tlumí oxidaci kyseliny mléčné fosfátový pufr. TRIS můžeme v ředidle použít jako TRIS-kyselina citrónová (TCA), TRIS-Tes (TEST) nebo TRIS-Hepes (HEPEST) a podle studií má nejlepší vliv na kvalitu spermií po rozmražení TCA (Rasul et al., 2000). Některá ředidla využívají pro stabilizaci pH vlastností zwitterionu. Zwitterion je iont chovající se podle prostředí současně jako kyselina i jako zásada. Tato ředidla se musí před použitím ředit citrátem sodným pro lepší pufrační kapacitu (Tuli et Hertz, 1994).

Jako energetický zdroj pro spermie slouží jednoduché cukry jako je fruktóza, glukóza, manóza či arabióza. U těchto cukrů se liší rychlost, kterou jsou tyto cukry metabolizovány. Laktóza, obsažená v mléčných ředidlech, je metabolizována jen omezeně (Parkinson et al., 2001). Cukry v ředidle slouží zároveň jako nepenetrující kryoprotektivní látky.

Penetrující kryoprotektivum je glycerol nebo dimethylsulfoxid (DMSO; Tasdemir et al., 2012). Kryoprotektiva přidáváme do ředidel pro ochranu před tepelným nebo chladovým šokem, chrání buňku před tvorbou ledových krystalů při procesu mražení. Většinou takto využíváme výše zmíněný glycerol, při jehož použití spermie vykazují lepší motilitu, akrozomální a mitochondriální integritu membrány i integritu plazmy. Při jeho užití ale asi 85 % spermií vykazuje určitý stupeň poranění na membránách (Forero-Gonzalez et al., 2012). Dále se využívá vaječný žloutek, ten ale může ředidlo kontaminovat bakteriemi nebo mykoplasma. Jako náhradu můžeme využít z rostlinných lipidů sójový lecitin (Aires et al., 2003). Existuje mnoho výzkumů, ve kterých se pokoušeli zjistit, která složka ve vaječném žloutku má tak významné kryoprotektivní účinky. Pace a Graham (1974) ve svých studiích centrifugovali žloutek a zjistili, že složka, která zajišťuje rezistenci vůči chladovému šoku při mražení a rozmrazování a zlepšuje motilitu po rozmražení je low-density frakce vaječného žloutku (LDF) složená především z nízkodenzitních lipoproteinů LDL a nehrozí u něj žádná kontaminace ředidla.

Žloutková ředidla využívají žloutek na základě jeho kryoprotektivních účinků. K zásadnímu průlomů v ředění a mražení přišel jako první Phillips (1939) s užitím vaječného žloutku. V dalších letech se vaječný žloutek stal nedílnou součástí ředidel pro uchování býčích spermií k umělé inseminaci (Salisbury et al., 1978). Byly prováděny studie zjišťující nezbytný objem přidaného žloutku pro zmrazení inseminační dávky býka. Bylo zjištěno, že ideální je 20% koncentrace vaječného žloutku, jelikož zvyšující koncentrace žloutku v ředidle má za následek snížení pH a tím zhoršuje motilitu spermií (Shannon, 1978). Dnes je vaječný žloutek využíván v koncentracích – 16 %, 20 % a 24 % (Vishwanath et Shannon, 2000). Nejvyužívanější žloutkové ředidlo je Triladyl®, který obsahuje TRIS, kyselinu citrónovou, glycerol, cukr, pufrý a antibiotika. Dosahuje dobrých výsledků i při vysokém stupni ředění a po rozmražení zůstává pohyblivá asi jedna třetina spermií (Amirat et al., 2005).

Bezžloutková ředidla jsou využívána hlavně kvůli zabránění kontaminace ejakulátu z živočišných látek. Další výhodou je čírost po naředění, a tím usnadněné mikroskopické hodnocení spermií. Jak už bylo výše zmíněno, žloutek může být nahrazen sójovým extraktem, jako to využívá ředidlo Biociphos-Plus (Thun et al., 2002). Můžeme využít také látky na bázi mléka, jako například u ředidla Laiciphos (Bousseau et al., 1998). Nejpoužívanější komerční bezžloutková ředidla jsou například AndroMed® a Bioxcell®. Tato komerční ředidla obsahují kyselinu citrónovou, glycerol, antibiotika, fosfolipidy a antioxidanty. Na přípravu jsou jednoduché a využívají se pro dlouhodobou i krátkodobou konzervaci semene (Beran et al., 2012).

Mnoho studií dokazuje, že žloutková ředidla oproti bezžloutkovým mají lepší účinnost ochrany spermií před poškozením a chladovým šokem (Beran et al., 2012, Akhter et al., 2010, Thun et al., 2002). Objevují se ale také studie, kde bezžloutková ředidla vykazují stejné nebo lepší výsledky membránové integrity a motility spermií než žloutková ředidla (Moussa et al., 2002, Gil et al., 2000). To může být ale způsobeno rozdílnými podmínkami, za kterých se pokusy prováděly - například teplota a doba inkubace (Gil et al., 2000). Důležitou roli hraje také individualita pleménika, nejen mezi býky, ale i mezi jednotlivými odběry (Beran et al., 2012).

3.6 LDL - Low density lipoprotein

Vaječný žloutek se skládá převážně z 80 % lipoproteinů, které jsou tvořeny frakcemi různé hustoty (VLDL, LDL, HDL), 16 % livetinu – čisté proteiny a 4 % fosfovitinů, které patří mezi glykoproteiny (McCully et al., 1962).

Předpokládá se, že nízkodenzitní lipoprotein (LDL) obsažený ve vaječném žloutku snižuje poškození spermií při procesu kryokonzervace (Moussa et al., 2002), zvyšuje přežitelnost spermií (Amirat et al., 2005), přispívá k zachování vysoké hladiny oplození schopnosti (Akhter et al., 2011) a zvyšuje hladiny motility a mitochondriální aktivity (Hu et al., 2010). Hustota LDL je 0,982 g/ml. Jsou to kulovité molekuly veliké v průměru 17-60 nm obsažené v plazmě vaječného žloutku. Jádro je tvořeno triglyceridy, cholesterolem a jeho estery a obal je tvořen apoproteiny a fosfolipidy (Anton et al., 2003). LDL obsahuje 83 - 89% tuků a 11 - 17% bílkovin. Lipidy LDL jsou složeny přibližně z 69% triglyceridů, 26% fosfolipidů a 5% cholesterolu (Moussa et al., 2002). Přítomné hydrofobní fosfolipidy stabilizují struktury LDL. Proteiny tvoří fázové rozhraní, snižují povrchové napětí a tvoří mechanickou bariéru (Anton et al., 2003).

Složky obsažené ve vaječném žloutku mají schopnost vytvářet filmy, díky schopnosti absorpce na fázovém rozhraní oleje a vody (Moussa et al., 2002). LDL může hrát významnou roli při tvorbě a stabilizaci emulgačních vlastností žloutku. Podstatná emulgační schopnost proteinů je snižování povrchového napětí, a tím udržení buněčné membrány v neporušeném stavu během mražení a rozmrazování. Při mražení a rozmrazování se mění lipidová organizace a chemické složení plazmatické membrány (Graham et Foote, 1987). Podle některých studií se chladem rozruší tvar fosfolipidové frakce LDL a na povrchu spermie se vytvoří ochranný film (Quinn et al., 1980), může ale také nahrazovat poškozené či chybějící fosfolipidy na membráně po kryokonzervaci (Graham et Foote, 1987). Vishwanath et al. (1992) ve své studii uvádí přímý vztah lipoproteinů vaječného žloutku s proteiny seminální plazmy, které se podle něj váží na spermatickou membránu. Na základě těchto hypotéz vzniklo mnoho studií, které uvádí, že LDL frakce vytváří silné a stabilní vazby s hlavními bíčými plasmatickými proteiny BSP, a tím chrání plazmatickou membránu před odchodem cholesterolu a fosfolipidů (Bergeron et al., 2004; Manjunath et al., 2002).

Výměnou vaječného žloutku za aktivní frakci LDL můžeme zabránit mikrobiologickému znečištění inseminačních dávek. Výsledky studie Bouseau et al. (1998) ukázaly, že i přes přidaná antibiotika do komerčně vyráběných žloutkových ředidel byla významně kontaminována. LDL lze ze žloutku extrahovat v čisté formě biochemickou separační metodou zvanou ultracentrifugace. Tato metoda je časově náročná a výtěžnost LDL je velmi malá, proto se v současnosti pro komerční využití nepoužívá (Moussa et al., 2002). Dále můžeme LDL extrahovat pomocí precipitace, která je založená na rychlém zkoncentrování izolovaného materiálu srážením. Srážení se provádí změnou pH, pomocí neutrálních solí, organických rozpouštědel nebo změnou teploty (Bathgate et al., 2006).

Mnoho prací se zabývalo porovnáváním ředidel, kde byl žloutek nahrazen frakcí LDL. Ředidla s přídavkem LDL autoři porovnávali se žloutkovými ředidly (Amirat et al., 2004; Hu et al., 2010, Akhter et al., 2011; Hu et al., 2011), nebo používali jako kontrolní vzorky ředidlo se žloutkem a ředidlo s rostlinnými fosfolipidy (Amirat et al., 2005; Moussa et al., 2002; Vera-Munoz et al., 2009). LDL izolovali dle Moussy et al., (2002), přidávali v různých koncentracích k ejakulátu a standardním postupem zamrazili. Po rozmražení vzorky inkubovali při 37 °C po dobu 10 minut a hodnotili motilitu, membránovou a akrozomální integritu (Akhter et al., 2011; Amirat et al., 2004; Amirat et al., 2005; Hu et al., 2010, Hu et al., 2011; Moussa et al., 2002). Všichni autoři došli k závěru, že LDL lépe chrání spermie před chladovým šokem než žloutková a bezžloutková ředidla. Nejideálnější koncentrace LDL frakce přidávané do mražených inseminačních dávek je podle několika provedených studií 8 % (Hu et al., 2010; Hu et al., 2011; Moussa et al., 2002). Akhter et al., (2011) má ve svých studiích nejlepší výsledky s koncentrací 10 %. Při použitých koncentracích nad 10 % byla pozorována snížená motilita, z důvodu agregace lipoproteinů a vznikem granul (Moussa et al., 2002; Hu et al., 2006). Ve všech studiích byla frakce LDL přidávána pouze do žloutkových ředidel, studie hodnotící vliv přídavku LDL k bezžloutkovým ředidlům na parametry motility zatím testován nebyl.

4 Materiál a metody

Ejakulát byl odebírán od osmi chovných býků plemene Český strakatý a Holštýnský skot na inseminační stanici Natural s.r.o. v Hradištku pod Medníkem ve čtyřech odběrových dnech. V rámci jednoho experimentu byli odebráni dva býci a byla použita bezžloutková ředidla Andromed® (Minitübe, Germany) a Bioxcell® (IMV technologies, France) s rozdílným podílem LDL (0 %, 4 %, 6 % a 8 %). Odebrané vzorky byly orientačně posouzeny a naředěny na koncentraci 30×10^6 spermií/ml. Ředidla byla připravena dle pokynů výrobce den před odběry a mražením ejakulátu a skladována také při teplotě 4 °C. Vyrobené inseminační dávky byly zamrazeny v pejetách standardním způsobem a uchovány v tekutém dusíku při teplotě 196 °C. Všechny předměty, které přišly do styku s rozmraženým ejakulátem, byly temperovány na teplotu 38°C.

Andromed® je dodáván ve dvou variantách. K pokusu byla použita jednostupňová varianta (200 ml) s ATB složkou. Výrobce deklaruje možnost konzervace inseminačních dávek, ale také uchovávání čerstvého spermatu, minimální mikrobiální kontaminaci a rychlou a snadnou přípravu. Při přípravě byl smíchán obsah lahvičky s 800 ml redestilované vody. Složení: fosfolipidy rostlinného původu, Tris, kyselinu citronovou, cukry, antioxidanty, pufrý, redestilovanou vodu a antibiotika (Tylosin, Gentamycin, Spectinomycin, Lincomycin).

Bioxcell® lze použít pro dávky mražené i pro dávky chlazené (4°C). Ředidlo zajišťuje dobrou oplozovací schopnost i při nízké koncentraci v dávce. Pro přípravu bylo smícháno 250 ml Bioxcellu s 1000 ml redestilované vody. Ředidlo může být po naředění zamrazeno na teplotu -20°C a následovně opět použito. Složení: nebylo možné zjistit bližší složení, firma neposkytuje informace ani na internetových stránkách, ani v příbalových informacích. Poskytuje pouze informace o použití antibiotik (Lincomycin, Spectinomycin, Gentamycin, Tylosin).

V každém pokusu byl použit kontrolní vzorek ředidla bez přidaného LDL. LDL bylo získáváno ze žloutků slepičích vajec metodou dle Moussy et al. (2002). Výroba byla zajištěna společností Hena s.r.o. Vaječný žloutek byl nejprve ručně oddělen od bílku na filtračním papíře, aby byl odstraněn endosperm a chalázová poutka. Poté byla skalpelem rozříznuta vitelinní membrána a žloutky byly shromážděny v kádince v chladu při teplotě 4 °C. Následně byly žloutky hodinu homogenizovány s 0,17 M roztokem chloridu sodného při 4 °C. Poté byla směs 45 minut centrifugována při 4 °C a 10 000 x g. Hlavním účelem centrifugace bylo oddělení žloutkových granul od plazmy. Pro odstranění livetinů bylo do 100 ml plazmy přidáno 20,5 g síranu amonného a směs byla homogenizována 1 hodinu při 4 °C a při pH 8,7. Vyloučené livetiny byly následně odstraněny centrifugací při 10 000 x g po dobu 45 minut. Supernatant bohatý na LDL byl dalších 10 hodin dialyzován za účelem eliminace síranu amonného. Na konci této dialýzy byla provedena poslední centrifugace při 10 000 x g po dobu 45 minut a výsledný sediment LDL s čistotou nejméně 97 % byl skladován při teplotě 4 °C.

4.1 Experiment 1 - Stanovení parametřů motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermatu (CASA)

V experimentu byly použity mražené inseminační dávky s přídavkem LDL. Vzorky byly rozmrazeny ve vodní lázni (Grant, SUB6) o teplotě 37 °C po dobu 30 s. Po vyjmutí z vodní lázně byla pejeta osušena buničinou, konce byly odstříhány a obsah byl umístěn do mikrozkušavky typu Eppendorf. Do mikrozkušavky bylo přidáno 500 µl fyziologického roztoku, který byl vytemperován na 39 °C, vypufrován pomocí Sørensenova pufru na pH 6,8 a změřen pH metrem (inoLab, Level 1). Po pěti minutách inkubace ve vodní lázni, nutných pro disperzi spermií v roztoku, byl vzorek homogenizován a byly odebrány 3 µl pomocí automatické pipety (Brand) a bylo provedeno hodnocení motility na vytemperovaném Leja® sklíčku (hloubka 20 µm), stejně byly hodnoceny vzorky po 2 hodinách inkubace při 37 °C.

Motilita spermií byla hodnocena pomocí CASA modulu (NIS Elements Ar 3.2) s kamerou (Jenoptik, ProgRes CT1) a stereomikroskopem (Nikon, Eclipse E600) s vyhřívanou destičkou (Tokai Hit). U každého vzorku bylo snímáno 6 různých polí, které byly následně algoritmicky zpracovány. Sledovány byly následující parametry pohybu - VAP [µm/s] průměrná rychlost hlavičky na napřímené dráze, VSL [µm/s] průměrná rychlost měřená po přímce od začátku do konce jedné stopy, VCL [µm/s] rychlost hlavičky spermie na skutečné dráze, LIN [%]

linearita, STR [%] index přímočarosti pohybu a WOB [%] stupeň oscilace. Získané hodnoty jednotlivých parametrů motility byly přeneseny z CASA modulu do programu MS Excel, kde byly zkontrolovány a utříděny. Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistika 12. Pro zhodnocení dat byla použita vícefaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s Scheffého post-hoc testem. Jako kontinuální závislé proměnné byly hodnoceny hodnoty VSL, VCL a VAP nebo LIN, STR a WOB v závislosti na faktoriálních nezávislých proměnných - ředidlo (AndroMed® a Bioxcell® s různou koncentrací LDL) a čas inkubace (0 hodin a 2 hodiny). Analýza probíhala na hladině významnosti $p < 0,05$.

4.2 Experiment 2 - Stanovení parametrů přežitelnosti spermií metodou fluorescenčního barvení

Ke stanovení živých a mrtvých spermií bylo použito fluorescenční barvení dle Harrison et Vickers (1990) s použitím carboxyfluorescein diacetátu (CFDA), dimethyl sulfoxidu (DMSO) a propidium jodidu (PI). CFDA byl rozpuštěn v DMSO v poměru 0,46 mg CFDA / 1 ml DMSO. PI byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku (pH 6,8) v poměru 500 µg PI / 1 ml fyziologického roztoku viz tabulka číslo 1.

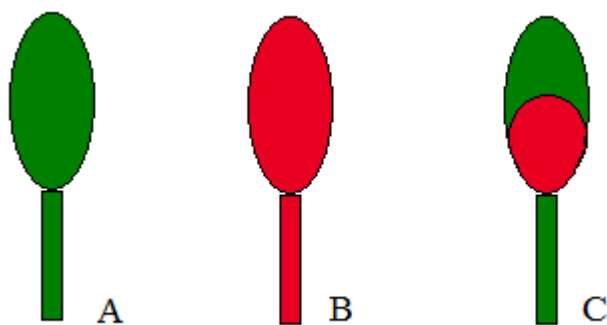
KOMPONENTY	POUŽITÉ MNOŽSTVÍ
0,3 % roztok formaldehydu ve fyziologickém roztoku	1 µl
0,46 mg CFDA / 1 ml DMSO	2,1 µl
500 µg PI / 1 ml fyziologického roztoku	2,1 µl

Tabulka č. 1: Složení fluorochromů dle Harris et Vickers (1990).

Fluorochromy byly smíchány těsně před použitím v mikrozkuhavce typu Eppendorf v pořadí 1 μl 0,3% roztoku formalínu, 2,1 μl CFDA a 2,1 μl PI. Při pipetování (Biohit 0,5 - 10 μl) bylo důležité, aby barvy neulpívaly na stěně mikrozkuhavky a byly na dně smíchány. Takto připravené fluorochromy byly uchovávány za nepřístupu světla v inkubátoru při 37 °C. Do každé mikrozkuhavky s fluorochromy bylo přidáno 100 μl roztoku semene a inkubováno po dobu 10 minut. Po inkubaci byl vzorek homogenizován lehkým poklepáním na špičku mikrozkuhavky. Poté bylo ze vzorku odebráno 8 μl na podložní sklíčko a překryto krycím sklíčkem. To bylo důkladně zafixováno bezbarvým lakem na nehty. Takto byla od každého vzorku připravena tři sklíčka, která se skladovala na vyhřevné desce (Vezas, VD1) přikrytá kartonovým víkem. Skla byla hodnocena na fluorescenčním mikroskopu.

Rozlišovaly se živé, mrtvé a umírající spermie s intaktním akrozomem a porušenou plazmatickou membránou. Rozdílné barvení spermií dokumentuje obrázek č. 1. Každé sklo bylo hodnoceno minimálně do počtu 200 spermií a výsledek byl vyjádřen procentuálním zastoupením jednotlivých kategorií spermií.

Získané hodnoty parametrů přežitelnosti byly přeneseny do programu MS Excel, kde byly zkontrolovány a utříděny. Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistika 12. Pro hodnocení dat byl použit test rozdílů mezi dvěma poměry.



Obrázek č. 1: Barvení A) živých, B) mrtvých a C) umírajících spermií.

5 Výsledky

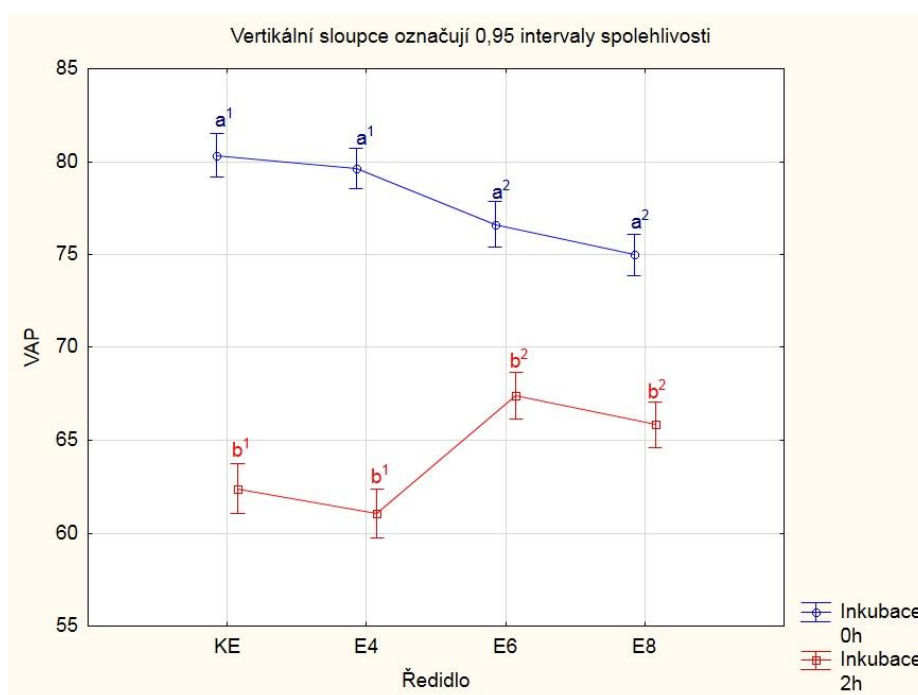
5.1 Experiment 1 - Stanovení parametrů motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermatu (CASA)

5.1.1 Andromed

Charakteristiky pohybu spermií VAP, VSL, VCL, LIN, STR A WOB u konzervovaného ejakulátu ředidlem AndroMed® v závislosti na délce inkubace ejakulátu (0 hodin a 2 hodiny) a na % přidaného LDL uvádějí grafy č. 1 - 4. U většiny parametrů docházelo na počátku inkubace ke statisticky významnému poklesu motility s rostoucí koncentrací přidaného LDL oproti kontrolním vzorkům. Po dvou hodinách inkubace byl trend opačný a s rostoucí koncentrací LDL se motilita zvyšovala.

Graf č. 1: Ředidlo AndroMed® – Rychlost spermií na průměrné dráze – VAP [$\mu\text{m/s}$] v závislosti na % přidaného LDL a na délce inkubace ejakulátu.

KE – ředidlo s 0 % LDL, E4 - ředidlo s 4 % LDL, E6 - ředidlo s 6 % LDL, E8 - ředidlo s 8 % LDL.



^{1,2} Hodnoty označené stejným indexem se v daném čase neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

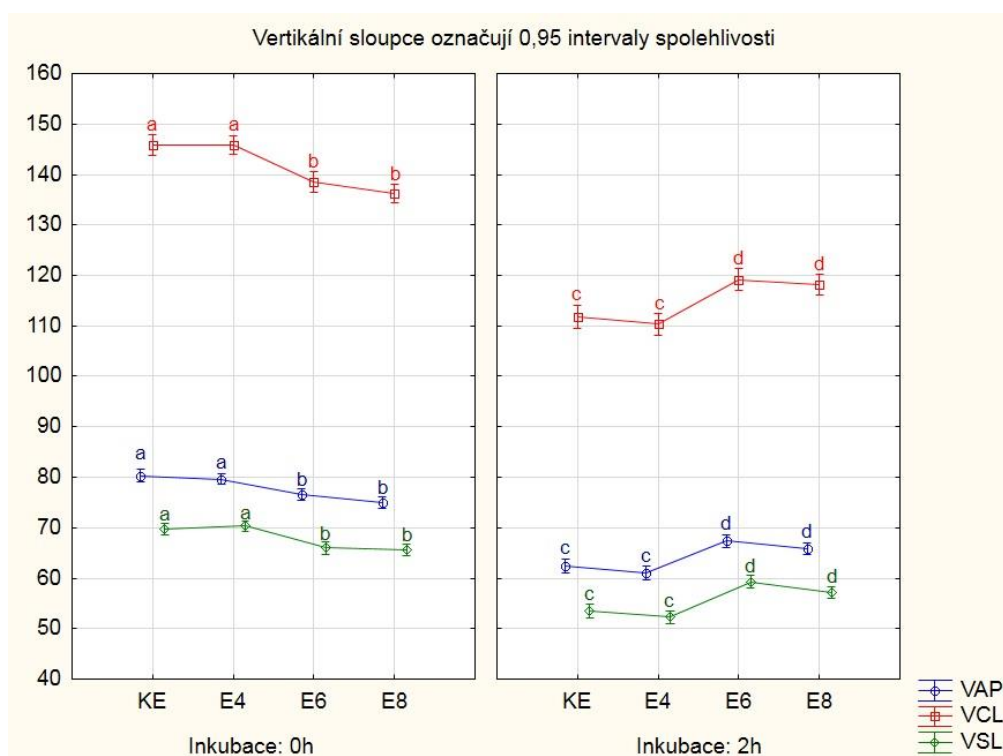
^{a, b, c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Na grafu číslo 1 můžeme pozorovat, že parametr rychlosti spermií na průměrné dráze (VAP) zaznamenal na počátku inkubace výrazný pokles motility s rostoucí koncentrací přidaného LDL. Statisticky významný pokles motility vykazovaly vzorky s 6 % a 8 % přídavkem LDL oproti kontrolnímu vzorku a vzorku s 4% přídavkem LDL. Po dvou hodinách inkubace byl u těchto koncentrací zaznamenán naopak nárůst motility, tyto koncentrace vykazovaly statisticky významný rozdíl od kontrolního vzorku a od 4 % přídavku LDL. Na počátku inkubace dosahoval nejlepších výsledků motility kontrolní vzorek a vzorek s 4% přídavkem LDL. Ve druhé hodině inkubace dosahovala nejlepších výsledků motility 6 % koncentrace přidaného LDL.

Na grafu číslo 2 můžeme pozorovat, že obdobný trend vykazovala i průměrná rychlost spermií po přímce (VSL) a rychlost na skutečné dráze (VCL).

Graf č. 2: Ředidlo AndroMed® – Vztah mezi hodnotami VAP, VCL a VSL [$\mu\text{m/s}$] na počátku a po dvou hodinách inkubace.

KE – ředidlo s 0 % LDL, E4 - ředidlo s 4 % LDL, E6 - ředidlo s 6 % LDL, E8 - ředidlo s 8 % LDL.

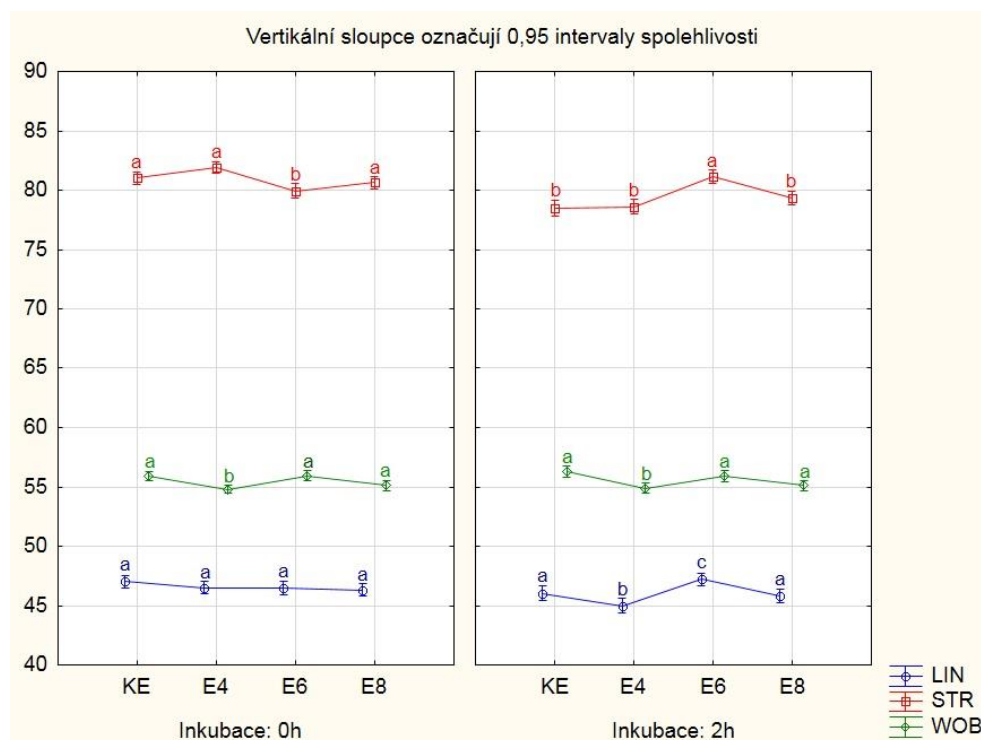


a, b, c Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Graf číslo 3 dokumentuje parametry pohyblivosti. Linearita (LIN) dosahovala v 0. i ve 2. hodině inkubace stejných výsledků motility, pouze ve 2. hodině inkubace vykazoval od ostatních vzorků statisticky významný nárůst motility vzorek s 4% přídavkem LDL. Index přímočarosti (STR) dosahoval v 0. i ve 2. hodině inkubace také stejných výsledků motility. Na počátku inkubace zaznamenal statisticky významný pokles motility vzorek s 6% přídavkem LDL, ale po dvou hodinách inkubace tato koncentrace zaznamenala naopak statisticky významný nárůst motility oproti ostatním vzorkům. Stupeň oscilace spermií (WOB) dosahoval v 0. i ve 2. hodině inkubace vyrovnaných výsledků, pouze vzorek s 4% přídavkem LDL zaznamenal statisticky významný pokles oproti ostatním vzorkům.

Graf č. 3: Ředidlo AndroMed® – Vztah mezi hodnotami LIN, STR a WOB [%] na počátku a po dvou hodinách inkubace.

KE – ředidlo s 0 % LDL, E4 - ředidlo s 4 % LDL, E6 - ředidlo s 6 % LDL, E8 - ředidlo s 8 % LDL.

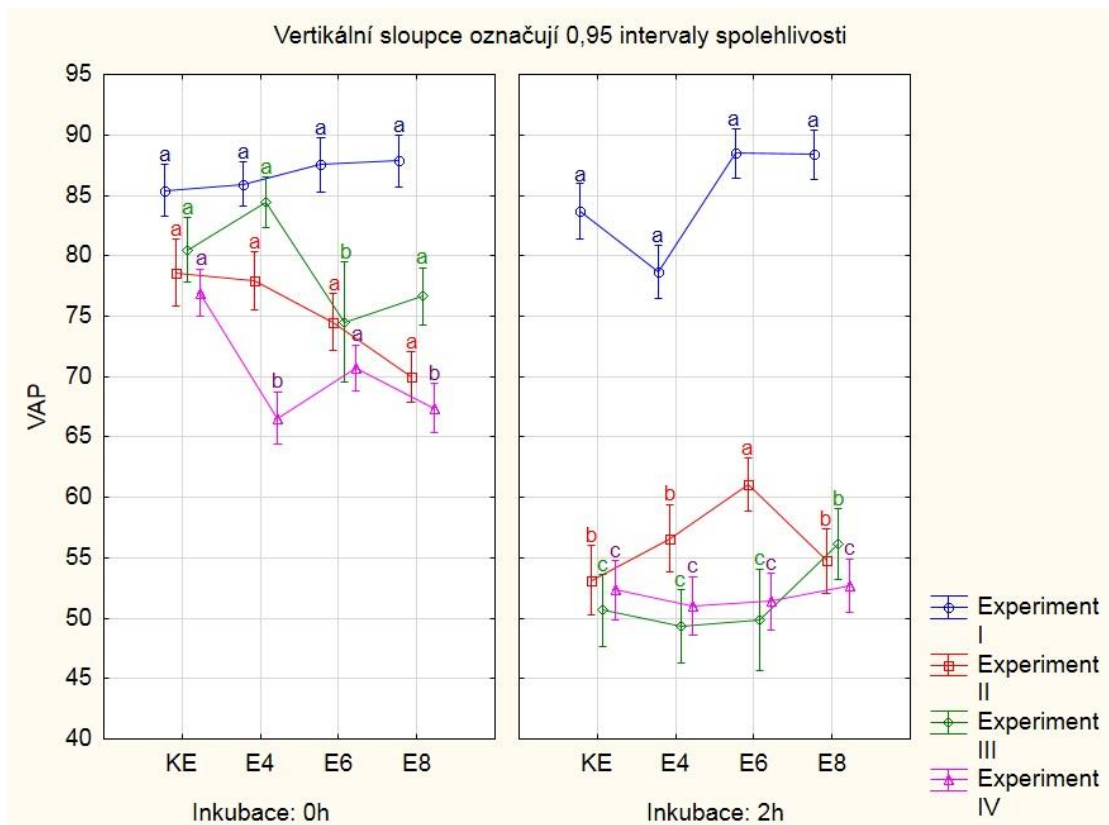


a, b, c Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Graf číslo 4. dokumentuje rychlost spermií na průměrné dráze (VAP) v jednotlivých odběrových dnech. Z grafu je patrné, že všechny experimenty v 0. hodině inkubace dosahovaly vcelku obdobných výsledků motility. Po dvou hodinách inkubace došlo k výraznému poklesu motility, pouze u prvního odběrového dne se výsledky pohybovaly ve stejných hodnotách jako na počátku inkubace. Čtvrtý odběrový den zaznamenal v 0. hodině inkubace výrazný pokles motility u vzorků s přidaným LDL oproti kontrolnímu vzorku.

Graf č. 4: Ředidlo AndroMed® – Rychlost spermií na průměrné dráze – VAP [$\mu\text{m/s}$] v jednotlivých odběrových dnech na počátku a po dvou hodinách inkubace.

KE – ředidlo s 0 % LDL, E4 - ředidlo s 4 % LDL, E6 - ředidlo s 6 % LDL, E8 - ředidlo s 8 % LDL.

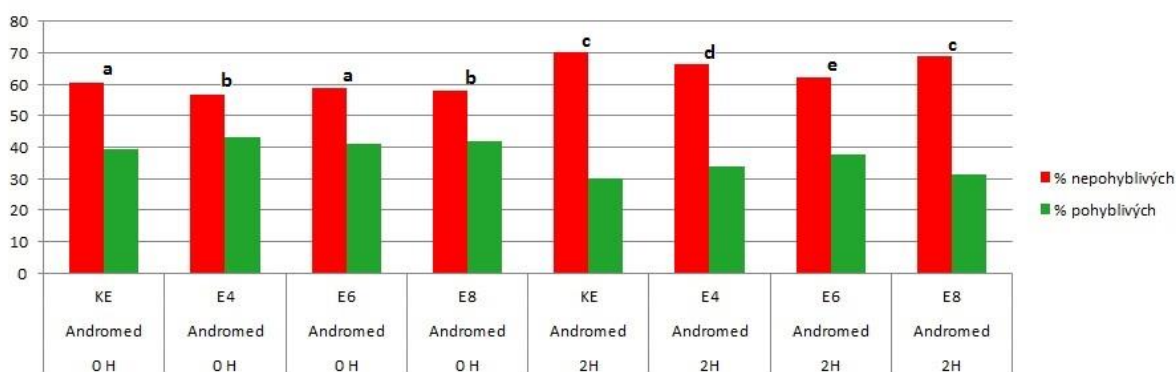


^{a, b, c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Graf číslo 5 dokumentuje procentuální zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií. Na počátku inkubace bylo zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií v jednotlivých vzorcích vyrovnané. Statisticky významných rozdílů v procentuálním zastoupení pohyblivých spermií oproti kontrolnímu vzorku dosahovaly vzorky s 4% a 8% přídavkem LDL. Po dvou hodinách inkubace dosahoval nejhorších výsledků v procentuálním zastoupení pohyblivých spermií kontrolní vzorek a vzorek s 8% přídavkem LDL. Největší podíl pohyblivých spermií obsahoval vzorek s 6% přídavkem LDL.

Graf č. 5: Ředidlo AndroMed® – Procentuální zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií.

KE – ředidlo s 0 % LDL, E4 - ředidlo s 4 % LDL, E6 - ředidlo s 6 % LDL, E8 - ředidlo s 8 % LDL.



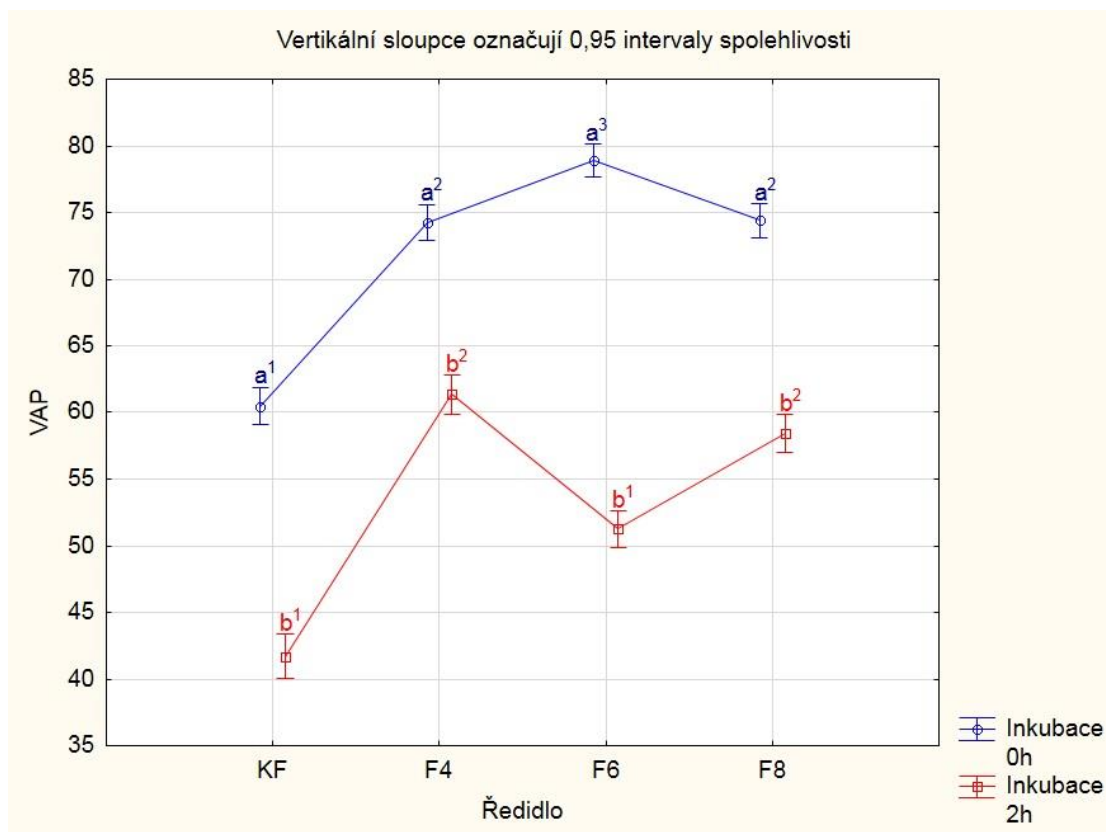
a, b, c Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

5.1.2 Bioxcell

Charakteristiky pohybu spermií VAP, VSL, VCL, LIN, STR A WOB u konzervovaného ejakulátu ředidlem Bioxcell® v závislosti na délce inkubace ejakulátu (0 hodin a 2 hodiny) a na % přidaného LDL uvádějí grafy č. 6 - 9. U většiny parametrů docházelo v 0. i ve 2. hodině inkubace ke statisticky významnému nárůstu motility s rostoucí koncentrací přidaného LDL oproti kontrolním vzorkům. Po dvou hodinách inkubace byl u některých vzorků zaznamenán statisticky významný pokles motility oproti kontrolnímu vzorku.

Graf č. 6: Ředidlo Bioxcell® – Rychlost spermií na průměrné dráze – VAP [$\mu\text{m/s}$] v závislosti na % přidaného LDL a na délce inkubace ejakulátu.

KF – ředidlo s 0 % LDL, F4 - ředidlo s 4 % LDL, F6 - ředidlo s 6 % LDL, F8 - ředidlo s 8 % LDL.



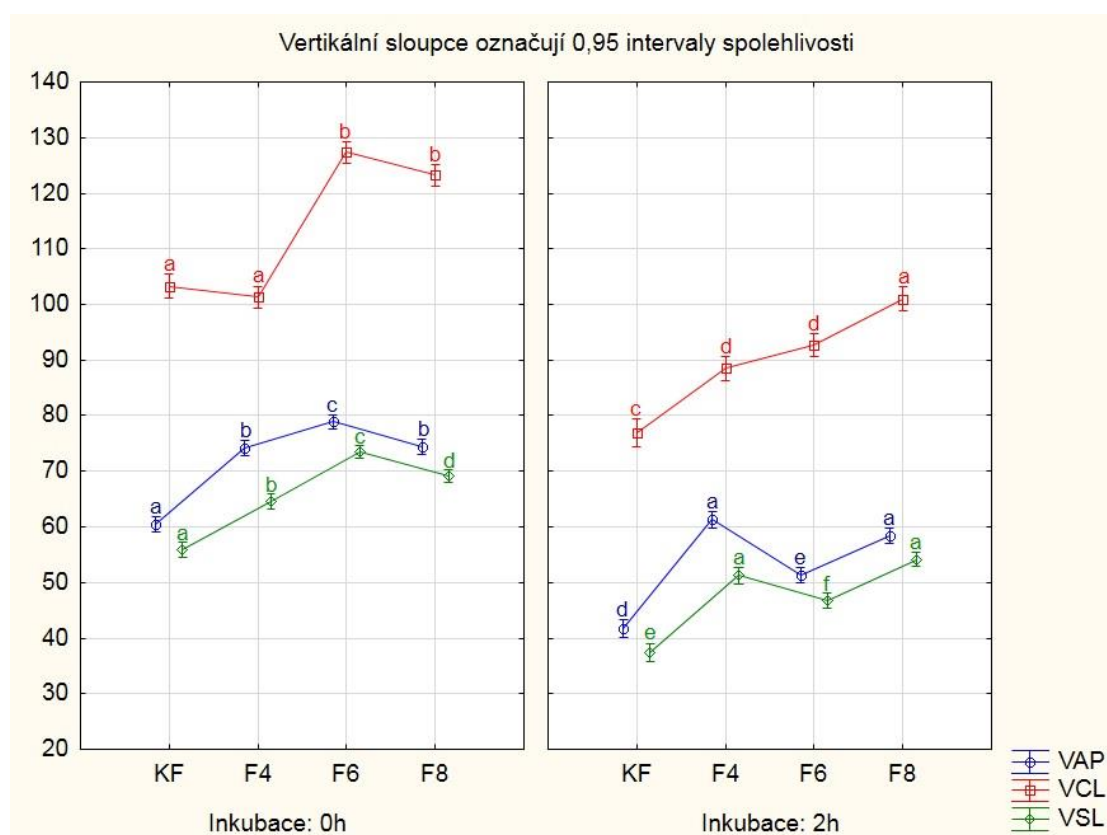
^{1,2} Hodnoty označené stejným indexem se v daném čase neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

^{a, b, c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Graf číslo 6 dokumentuje rychlost spermií na průměrné dráze (VAP). V 0. hodině inkubace byl zaznamenán výrazný nárůst motility s rostoucí koncentrací přidaného LDL. Statisticky významné nárůst motility vykazovaly vzorky s 4% a 8% přídavkem LDL oproti kontrolnímu vzorku a vzorek s 6% přídavkem LDL dosahoval statisticky vyšších hodnot motility i oproti vzorkům s 4% a 8% přídavkem LDL. Po dvou hodinách inkubace byl u této koncentrace zaznamenán naopak pokles motility. Ostatní vzorky vykazovaly obdobný trend jako na počátku inkubace, pouze s nižší rychlostí.

Graf č. 7: Ředidlo Bioxcell® – Vztah mezi hodnotami VAP, VCL a VSL [$\mu\text{m/s}$] na počátku a po dvou hodinách inkubace.

KF – ředidlo s 0 % LDL, F4 - ředidlo s 4 % LDL, F6 - ředidlo s 6 % LDL, F8 - ředidlo s 8 % LDL.

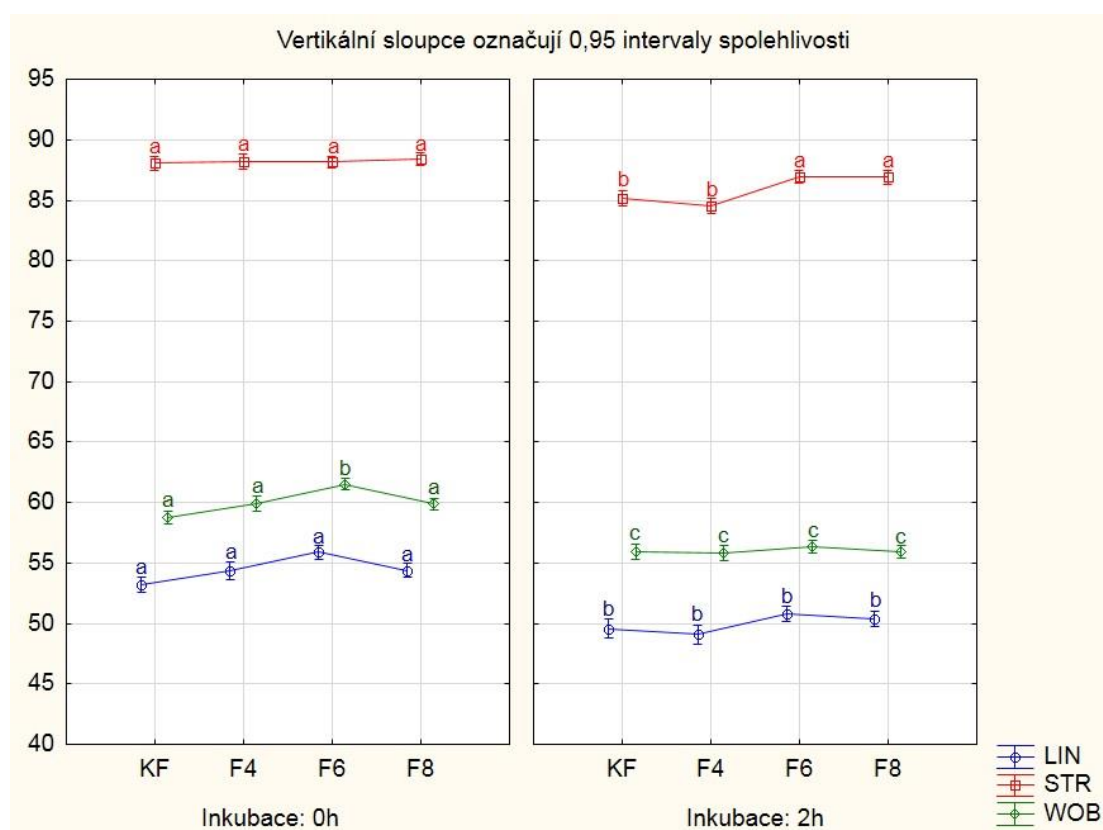


^{a, b, c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Na grafu číslo 7 můžeme pozorovat, že obdobný trend vykazovala i průměrná rychlost spermií po přímce (VSL). V 0. hodině inkubace dosahoval nejlepších výsledků vzorek s 6% přídavkem LDL, ve druhé hodině vzorky s 4% a 8% přídavkem LDL. U parametru rychlosti na skutečné dráze (VCL) docházelo na počátku inkubace ke statisticky významnému nárůstu motility s rostoucí koncentrací přidaného LDL, pouze vzorek s 4% přídavkem LDL nevykazoval statisticky významný rozdíl oproti kontrole. Nejlepších výsledků motility dosahoval vzorek s 6% přídavkem LDL. Po dvou hodinách inkubace docházelo statisticky významnému nárůstu motility s rostoucí koncentrací přidaného LDL oproti kontrolnímu vzorku. Nejlepších výsledků motility dosahoval vzorek s 8% přídavkem LDL.

Graf č. 8: Ředidlo Bioxcell® – Vztah mezi hodnotami LIN, STR a WOB [%] na počátku a po dvou hodinách inkubace.

KF – ředidlo s 0 % LDL, F4 - ředidlo s 4 % LDL, F6 - ředidlo s 6 % LDL, F8 - ředidlo s 8 % LDL.

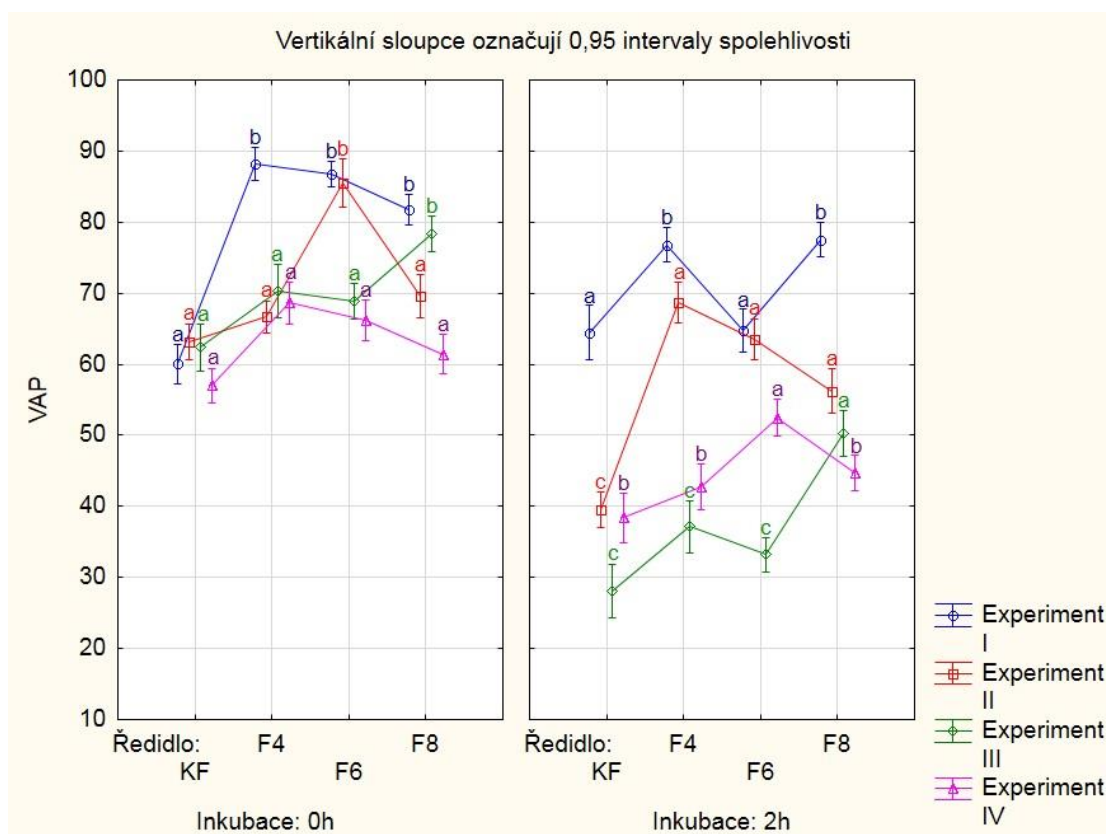


a, b, c Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Graf číslo 8 dokumentuje parametry pohyblivosti. (LIN) dosahovala v 0. i ve 2. hodině inkubace stejných výsledků motility bez statisticky významných rozdílů. Index přímočarosti (STR) dosahoval v 0. i ve 2. hodině inkubace také stejných výsledků motility, pouze ve 2. hodině vykazoval od ostatních vzorků statisticky významný nárůst motility vzorek s 6% a 8% přídavkem LDL. Stupeň oscilace spermií (WOB) dosahoval v 0. i ve 2. hodině inkubace vyrovnaných výsledků, na počátku inkubace vykazoval vzorek s 6% přídavkem LDL statisticky významný nárůst oproti ostatním vzorkům.

Graf č. 9: Ředidlo Bioxcell® – Rychlost spermií na průměrné dráze – VAP [$\mu\text{m/s}$] v jednotlivých odběrových dnech na počátku a po dvou hodinách inkubace.

KF – ředidlo s 0 % LDL, F4 - ředidlo s 4 % LDL, F6 - ředidlo s 6 % LDL, F8 - ředidlo s 8 % LDL.



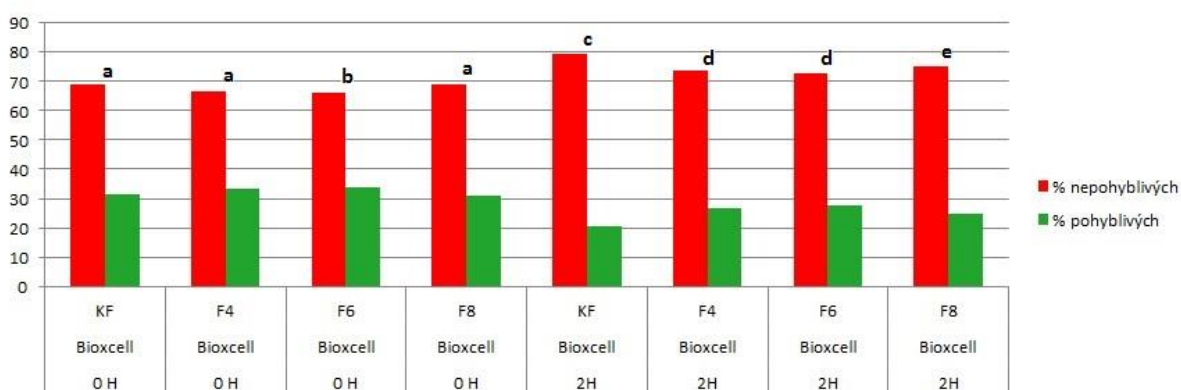
^{a, b, c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

Graf číslo 9 dokumentuje rychlost spermií na průměrné dráze (VAP) v jednotlivých odběrových dnech. Z grafu je patrné, že všechny experimenty na počátku inkubace dosahovaly vcelku obdobných výsledků motility. Po dvou hodinách inkubace došlo k výraznému poklesu motility u třetího a čtvrtého odběrového dne. U prvního a druhého odběrového dne se výsledky pohybovaly ve stejných hodnotách jako v 0. hodině inkubace. Ve všech odběrových dnech dosahovaly vzorky s přidaným LDL po dvou hodinách inkubace lepších výsledků motility než kontrolní vzorky, pouze u prvního odběrového dne vzorek s 6% přídavkem LDL dosahoval podobných hodnot jako kontrolní vzorek.

Graf číslo 10 dokumentuje procentuální zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií. Na počátku inkubace bylo zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií v jednotlivých vzorcích vyrovnané. Statisticky významných rozdílů v procentuálním zastoupení pohyblivých spermií oproti kontrolnímu vzorku dosahoval vzorek s 8% přídavkem LDL. Oproti tomuto vzorku dosahoval statisticky významných rozdílů v procentuálním zastoupení pohyblivých spermií vzorek s 6% přídavkem LDL. Po dvou hodinách inkubace dosahoval nejhorších výsledků v procentuálním zastoupení pohyblivých spermií kontrolní vzorek. Největší podíl pohyblivých spermií obsahoval vzorek s 8% přídavkem LDL.

Graf č. 10: Ředidlo Bioxcell® – Procentuální zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií.

KF – ředidlo s 0 % LDL, F4 - ředidlo s 4 % LDL, F6 - ředidlo s 6 % LDL, F8 - ředidlo s 8 % LDL.



a, b, c Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

5.2 Experiment 2 - Stanovení parametrů přežitelnosti spermií metodou fluorescenčního barvení

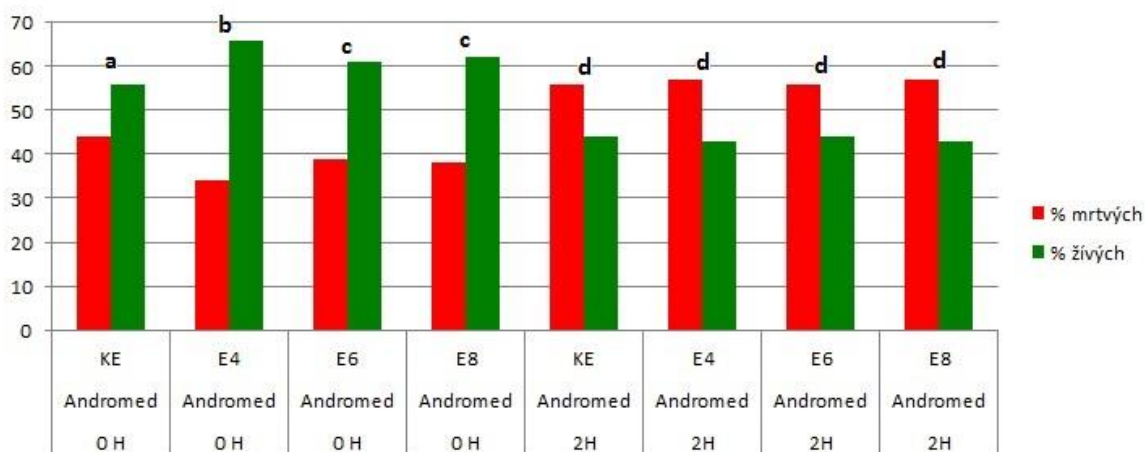
Procentuální zastoupení živých a mrtvých spermií v jednotlivých ředidlech dokumentují grafy číslo 11 a 12.

5.2.1 Andromed

Z grafu číslo 11 můžeme vyčíst, že u experimentů s použitým ředidlem AndroMed® byl na počátku inkubace zaznamenán statisticky významný nárůst počtu živých spermií s rostoucí koncentrací přidaného LDL oproti kontrolnímu vzorkům. Největší podíl živých spermií dosahoval vzorek s 4 % přidaného LDL. Po dvou hodinách inkubace byl podíl živých spermií ve všech vzorcích vyrovnaný a nedocházelo k žádným statisticky významným rozdílům.

Graf č. 11: Ředidlo AndroMed® – Procentuální zastoupení živých a mrtvých spermií.

KE – ředidlo s 0 % LDL, E4 - ředidlo s 4 % LDL, E6 - ředidlo s 6 % LDL, E8 - ředidlo s 8 % LDL.



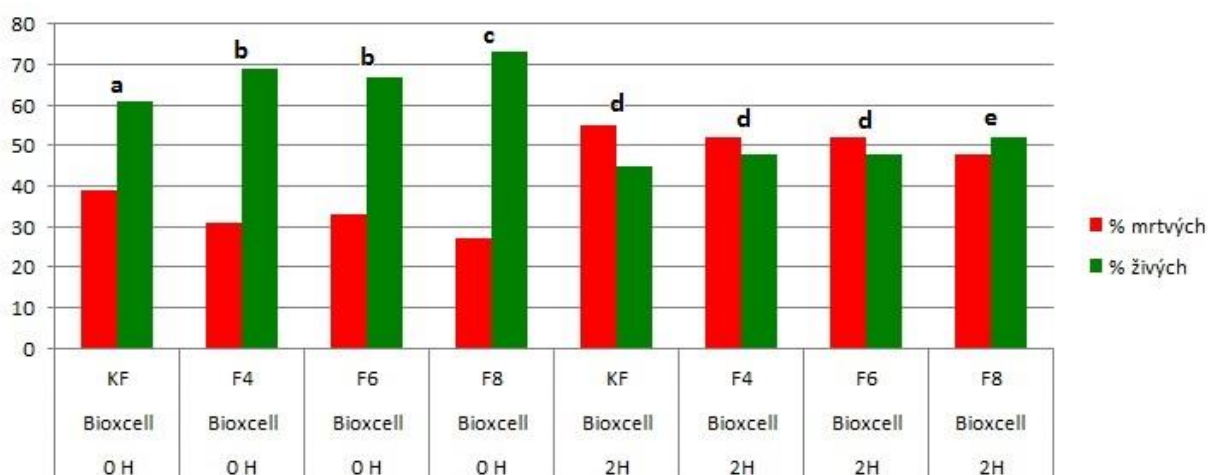
^{a, b, c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

5.2.2 Bioxcell

Z grafu číslo 12 můžeme vyčíst, že u experimentů s použitým ředidlem Bioxcell® byl na počátku inkubace zaznamenán statisticky významný nárůst počtu živých spermií s rostoucí koncentrací přidaného LDL oproti kontrolnímu vzorkům. Největší podíl živých spermií dosahoval vzorek s 8 % přidaného LDL. Po dvou hodinách inkubace byl podíl živých spermií ve všech vzorcích vyrovnán. Statisticky významný nárůst počtu živých spermií oproti ostatním vzorkům byl zaznamenán pouze u vzorku s 8 % přidaného LDL.

Graf č. 12: Ředidlo Bioxcell® – Procentuální zastoupení živých a mrtvých spermií.

KF – ředidlo s 0 % LDL, F4 - ředidlo s 4 % LDL, F6 - ředidlo s 6 % LDL, F8 - ředidlo s 8 % LDL.



^{a, b, c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p = 0,05$

6 Diskuze

V posledních letech je možnost náhrady vaječného žloutku za jeho účinnou frakci LDL intenzivně studována (Amirat et al., 2004; Hu et al., 2010; Hu et al., 2011; Moussa et al., 2002). Přesný princip ochranného účinku na spermie je stále předmětem studií. Předpokládá se, že v něm hraje roli mechanická ochrana spermatické membrány (Moussa et al., 2002; Pace et Graham, 1974) a oddělování plazmatických proteinů BSP (Bergeron et al., 2004; Manjunath et al., 2002). Pokud je tedy LDL onou ochrannou složkou ve žloutkových ředidlech, jak potvrzuje mnoho studií (Akhter et al., 2011; Amirat et al., 2004; Amirat et al., 2005; Bergeron et al., 2004; Hu et al., 2010; Hu et al., 2011; Moussa et al., 2002, Pace et Graham, 1974), je na místě otázka, zda přídavek LDL k bezžloutkovým ředidlům bude mít také pozitivní vliv na pohyblivost a přežitelnost spermií. Pro zařazení do praxe je důležitým předpokladem optimalizace koncentrací přidaného LDL.

V této studii byly pomocí parametrů motility a přežitelnosti spermií porovnávány různé koncentrace přidaného LDL ve dvou bezžloutkových ředidlech, AndroMed® a Bioxcell®. Optimální koncentrace LDL frakce přidávaná do dlouhodobě uchovávaných inseminačních dávek s použitými žloutkovými ředidly je podle několika provedených studií 8 % (Hu et al., 2010; Hu et al., 2011; Moussa et al., 2002). Akhter et al., (2011) má ve svých studiích nejlepší výsledky s koncentrací 10 %. Při použitých koncentracích nad 10 % byla pozorována snížená motilita (Moussa et al., 2002; Hu et al., 2006). Vliv přídavku LDL v bezžloutkových ředidlech testován v žádných studiích nebyl. Obecně jsou hodnoty parametrů motility nižší, než u žloutkových ředidel (Hu et al., 2010; Moussa et al., 2002; Vera-Munoz et al., 2009). K posouzení motility byl v této studii využit program CASA (computer assisted sperm analysis), který hodnotí několik parametrů pohybu spermie podle trajektorie hlavičky (Verstegen et al., 2002).

U ředidla AndroMed® dosahovaly vzorky s 6% a 8% přídavkem LDL u všech hodnocených parametrů rychlosti (VAP, VSL a VCL) po rozmražení výrazně horších výsledků. Kontrolní vzorek bez přidaného LDL a vzorek s 4% přídavkem LDL dosahovaly vyšších hodnot motility. Po dvou hodinách inkubace se trend obrátil a vzorky s 6% a 8% přídavkem LDL dosahovaly výrazně lepších výsledků oproti kontrolnímu vzorku a vzorku s 4% přidaného LDL ve všech hodnocených parametrech. U parametrů pohyblivosti (LIN, STR a WOB) byly hodnoty motility celkem vyrovnané. Po dvou hodinách inkubace u parametru linearity a indexu přímočarosti dosahoval nejlepších výsledků vzorek s 6% přídavkem LDL.

Odlišná situace nastala u ředidla Bioxcell®, kde všechny hodnocené parametry rychlosti (VAP, VSL a VCL) dosahovaly po rozmražení výrazně lepších výsledků u vzorků s přídavkem LDL oproti kontrolnímu vzorku bez přidaného LDL. Nejlepších výsledků dosahoval vzorek s 6% přídavkem LDL. Po dvou hodinách inkubace zůstal trend stejný ale u vzorku s 6% přídavkem LDL nastal výrazný pokles motility. To může být důsledek vyčerpání hyperaktivovaných spermií. Pouze rychlost po skutečné dráze (VCL) měla po dvou hodinách inkubace stoupající tendenci s rostoucí koncentrací přidaného LDL oproti kontrolnímu vzorku. Ihned po rozmražení dosahovaly tedy nejlepších výsledků vzorky s 6% přídavkem LDL, po dvou hodinách inkubace to byly vzorky s 4% a 8% přídavkem LDL. U parametrů pohyblivosti (LIN, STR a WOB) byly hodnoty motility celkem vyrovnané.

V provedených studiích vycházeli nejlepších výsledků hodnoty s 8% (Hu et al., 2010; Hu et al., 2011; Moussa et al., 2002) nebo 10% přídavkem LDL (Akhter et al., 2011). Tyto studie však hodnotily efekt náhrady vaječného žloutku za aktivní frakci LDL. V některých studiích byla použita bezžloutková ředidla bez přídavku LDL pouze pro srovnání s dalšími ředidly (Amirat et al., 2005; Moussa et al., 2002; Vera-Munoz et al., 2009). Amirat et al., (2005) ve své studii uvádí, že mezi žloutkovým a bezžloutkovým ředidlem docházelo k výrazným rozdílům v hodnotách motility, zatímco použité bezžloutkové ředidlo dosahovalo podobných hodnot jako žloutkové ředidlo s nahrazeným žloutkem za frakci LDL. V naší studii byla frakce LDL přidávána již k hotovým ředidlům. Efekt přídavku LDL v naší studii byl prokázán. Přidání LDL k ředidlu AndroMed® má kladný dopad na motilitu spermií. Ze získaných dat můžeme předpokládat, že optimální koncentrací pro ředidlo AndroMed® je 6 % přidaného LDL. Přidání LDL k ředidlu Bioxcell® má také kladný dopad na motilitu spermií. Nejlepší koncentrací pro ředidlo Bioxcell® je 6 % a 8 % přidaného LDL.

S přihlédnutím na procentuální zastoupení pohyblivých a nepohyblivých spermií s použitým ředidlem AndroMed® je z našich výsledků patrné, že na počátku inkubace bylo nejvíce pohyblivých spermií obsaženo ve vzorcích s 4% a 8% přídatkem LDL. Po dvou hodinách inkubace obsahoval nejvíce pohyblivých spermií vzorek s 6% přídatkem LDL. U ředidla Bioxcell® je procentuální zastoupení pohyblivých spermií ve všech vzorcích horší než u předchozího ředidla. Nejvíce pohyblivých spermií ihned po rozmražení obsahoval vzorek s 6% přídatkem LDL, dále pak vzorek s 8% přídatkem LDL. Po dvou hodinách inkubace obsahovaly všechny vzorky s přidaným LDL více pohyblivých spermií než kontrolní vzorek bez přidaného LDL, nejvyšší podíl pohyblivých spermií obsahoval vzorek s 8% přídatkem LDL. Můžeme tedy tvrdit, že užití inseminačních dávek s přídatkem LDL může mít vliv na úspěšnost zabřeznutí u krav, protože ejakulát po době strávené v pohlavním ústrojí samice bude více pohyblivý než i ředidla bez přidaného LDL.

Vzorky s přídatkem LDL k ředidlu AndroMed® ihned po rozmražení obsahovaly také vyšší počet živých spermií než kontrolní vzorek. Nejvíce živých spermií po rozmražení obsahoval vzorek s 4% přídatkem LDL ale i ostatní vzorky s přidaným LDL obsahovaly 60 % živých spermií v inseminační dávce. Po dvou hodinách inkubace byl podíl živých spermií ve všech vzorcích vyrovnaný a u všech vzorků se podíl snížil na zhruba 40 %. U ředidla Bioxcell® obsahovaly ihned po rozmražení všechny vzorky s přidaným LDL více živých spermií než kontrolní vzorek. Nejvíce živých spermií obsahoval vzorek s 8% přidaného LDL. Po dvou hodinách inkubace bylo zastoupení živých spermií v jednotlivých vzorcích vyrovnané, podíl živých spermií u všech vzorků snížil zhruba na 40 %, vzorek s 8% přídatkem LDL obsahoval zhruba 50 % živých spermií. Z našich výsledků je tedy patrné, že přídatek LDL k bezžloutkovým ředidlům přispívá k zlepšení přežitelnosti spermií v inseminačních dávkách. Ve studiích, kde autoři srovnávaly bezžloutkové ředidlo bez přidaného LDL se žloutkovými ředidly s nahrazeným žloutkem za LDL frakci dosahovaly bezžloutková ředidla lepších výsledků přežitelnosti než žloutková ředidla s přidaným vaječným žloutkem a podobných výsledků jako ředidla s nahrazeným žloutkem za frakci LDL (Amirat et al., 2005; Vera-Munoz et al., 2009). Podobných výsledků ve svých studiích dosáhli i další autoři (Moussa et al., 2002; Gil et al., 2000).

Pokud hodnotíme parametr rychlosti na průměrné dráze (VAP) u ředidla AndroMed® v jednotlivých odběrových dnech, můžeme pozorovat, že trend je rozdílný s porovnáním celkových výsledků. U většiny případů po dvou hodinách inkubace dosahovala motilita horších výsledků. Pouze první odběrový den byly výsledky shodné v 0. i ve 2. hodině inkubace. Dokonce vzorky s 6% a 8% přídavkem LDL dosahovaly lepších výsledků než v 0. hodině. U ředidla Bioxcell® dosahovaly všechny experimenty na počátku inkubace obdobných výsledků motility. Po dvou hodinách inkubace došlo k výraznému poklesu motility u třetího a čtvrtého odběrového dne. Ve všech odběrových dnech dosahovaly vzorky s přidaným LDL po dvou hodinách inkubace lepších výsledků motility než kontrolní vzorky bez přidaného LDL. Tady můžeme vidět, že naměřené hodnoty jsou ovlivňovány mnoha faktory. Jedním z faktorů může být použití býků různých plemen (v našem případě Holštýnský skot a Český strakatý skot) s individuálními rozdíly ale také tím, že byly odebíráni pokaždé různí býci. Otázkou tedy zůstává, jak dalece jsou efekty univerzální a zda by nebylo vhodné se v dalších studiích zaměřit na individualitu býka.

Získané výsledky prokázaly, že přídavek LDL k bezžloutkovým ředidlům má pozitivní vliv na pohyblivost a přežitelnost spermií po rozmrazení. Oplození schopnost ejakulátu není ale daná pouze parametry motility a přežitelnosti. Pro komplexní posouzení je třeba kombinovat tyto testy s testy integrity membrán a akrozomu, s testy metabolického stavu spermie, s testováním enzymatické odolnosti spermií a nejlépe také s výsledky zabřezávání krav nebo daty o *in vitro* oplození.

7 Závěr

Cílem práce bylo zjistit, zda přídavek LDL v kryokonzervovaných inseminačních dávkách zlepší kryoprotektivní vlastnosti bezžloutkových ředidel AndroMed® a Bioxcell®. Jednalo se o kvalitativní parametry, především motilitu a přežitelnost spermií. Dále nás zajímalo, zda bude tento efekt rozdílný při použití různých ředidel a při různých koncentracích přídavku LDL.

U ředidla AndroMed® byl naplněn předpoklad. Ihned po rozmražení vykazovaly vzorky s přídavkem LDL horších výsledků než kontrolní vzorek bez přidaného LDL ale po dvou hodinách inkubace se trend výrazně změnil a vzorky s přídavkem LDL dosahovaly lepších výsledků motility než kontrolní vzorek. Při celkové analýze pohyblivých a nepohyblivých obsahovaly všechny vzorky s přídavkem LDL v 0. i ve 2. hodině více pohyblivých spermií než kontrolní vzorek. Ihned po rozmražení bylo ve všech vzorcích s přidaným LDL více živých spermií než v kontrolním vzorku. Po dvou hodinách inkubace nebyly rozdíly v podílech průkazné.

Oproti tomu u ředidla Bioxcell® byl splněn předpoklad a všechny použité koncentrace LDL dosahovaly lepších hodnot motility oproti kontrolnímu vzorku v 0. i ve 2. hodině. Ihned po rozmražení i po dvou hodinách inkubace byl podíl pohyblivých spermií u vzorků s přidaným LDL vyšší nebo stejný jako u kontrolního vzorku. S přihlédnutím k procentuálnímu zastoupení živých a mrtvých spermií můžeme konstatovat, že ihned po rozmražení i po dvou hodinách inkubace obsahovaly všechny vzorky s přidaným LDL více živých spermií než kontrolní vzorek.

Celkově lze tvrdit, že přídavek LDL k ředidlu Andromed® i Bioxcell® má příznivý vliv na pohyblivost i přežitelnost spermií a je tedy vhodné přidávat ho do inseminačních dávek.

8 Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie - úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing. 630 s. ISBN: 80- 902906-2-0.
- Akhter, S., Ansari, M.S., Rakha, B.A., Andrabi, S.M.H., Iqbal, S., Ullah, N. 2010. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell extender. *Theriogenology*. 74. 951-952.
- Akhter, S., Ansari, M.S., Rakha, B.A., Anrabi, S.M.H., Khalid, M., Ullah, N. 2011. Effect of lowdensity lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*. 4. 759-764.
- Amirat, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., Destrumelle, S. 2004. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) ex-tender: Preliminary results of artificial insemination. *Anim Re- prod Sci*. 122. 282–7.
- 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*. 4. 535-543.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarroondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Rabesona, H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food chemismy*. 83. 175-183.
- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G., Pauls, K.P. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*. 66. 354–360.

- Bacinoglu, S., Tas, M., Cirit, U., Ozdas, O., Ak, K. 2008. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal Reproduction Science*. 104. 38-46.

- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 21. 1-7.

- Bathgate, R., Maxwell, W. M., Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction of Domestic Animals*. 41. 68-73.

- Bennetts, L. E., Aitken, R. J. 2005. A comparative study of oxidative damage in mammalian spermatozoa. *Molecular Reproduction Development*. 71. 77-87.

- Beran, J., Stadnik, L., Bezdicek, J., Louda, F., Citek, J., Duchacek, J. 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archives of animal breeding*. 3. 207-218.

- Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y., Manjunath, P. 2004. 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. 708-717.

- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction Development*. 73. 1228-1244

- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A., Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 5. 699-706.
- Boyers, S. P., Davis, R.O., Katz, D.F. 1989. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics. Gynecology and Fertility*. 12. 165-200.
- Bucci, D., Gil, J., Vallorani, C., Spinaci, M., Galeati, G., Tamanini, C. 2011. GLUTs and Mammalian Sperm Metabolism. *Journal of andrology*. 4. 348-355.
- Budworth, P.R., Ammann, R.P., Hamerstedt, R.H. 1987. A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *Journal of Dairy Science*. 70. 1927-1936.
- Cosson, J. 1996. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biol. Int*. 20. 83-94.
- Coulter, G.H. 1992. Bovine spermatozoa in vitro: a review of storage, fertility estimation and manipulation. *Theriogenology*. 38. 197-207.
- Fabbrocini, A., Del Sorbo, C., Fasano, G., Martusciello, M.R., Sansone, G. 1995. Effect of cryoprotectant addition mode on freeze-thawed *Bubalus bubalis* semen. *Reproduction and Animal Breeding: Advance and Strategy*. 373-374.
- Fawcett, D.W. 1975. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*. 44. 394-436.
- Forero-Gonzalez, R.A., Celeghini, E.C.C., Raphael, C.F., Andrade, A.F.C., Bressan, F.F., Arruda, R.P. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 1. 154-159.

- Gamčík, P., Kozumplík, J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. SZN. Praha. 344 s. ISBN: 6402884.

- Gil, J., Januskauskas, A., Haard, M. C., Haard, M.G.M., Johanisson, A., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in biociphos-Plus (R) and Triladyl (R). *Reproduction in Domestic Animals*. 2.

- Graham, J.K., Foote, R.H. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*. 24. 42-52.

- Hafez, B., Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 0-683-30577-8.

- Hammadeh, M.E., Szarvasy, D., Zeginiadou, T., Rosenbaum, P., Georg, T., Schmidt, W. 2001. Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 18. 364-370.

- Ho, H.C., Suarez, S.S. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of Reproduction*. 68. 1590-1596

- Hu, J.H., Jiang, Z.L., Lv, R.K., Li, Q.W., Zhang, S.S., Zan, L.S., Li, Y.K., Li, X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 1. 83-87.

- Hu, J.H., Li, Q.W., Zan, L.S., Jiang, Z.L., An, J.H., Wang, L.Q., Jia, Y.H. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal reproduction science* .1-2. 11-17.

- Hu, J.H., Li, Q.W., Gang, L.I., Chen, X.Y., Hai Y., Zhang, S.S., Wang, L.Q. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian- Australasian journal of animal science*. 19. 486-494.
- Ishijima, S., Hamaguchi, M.S., Naruse, M., Ishijima, S.A., Hamaguchi, Y. 1992. Rotational movement of a spermatozoon around its long axis. *The Journal of Experimental Biology*. 163. 15-31.
- Jelínek, P., Koudelka, K., Doskočil, J., Illek, J., Kotrbáček, V., Kovářů, F., Kroupová, V., Kučera, M., Kudláč, E., Trávníček, J., Valent, M. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 1. vyd. 414 s.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Palaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70. 219-228.
- Johnston, S.D., MacCallum, C., Blyde, D., McClean, R., Lisle, A., Holt, W.V. 2006. An investigation into the similarities and differences governing the cryopreservation success of koala (*Phascolarctos cinereus*: goldfuss) and common wombat (*Vombatus ursinus*: shaw) spermatozoa. *Cryobiology*. 53. 218-228.
- Juyena, N.S., Stelletta C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa, *Journal of Andrology*. 33. 536-515.
- Kliment, J. 1983. *Reprodukcia hospodářských zvierat*, Bratislava, Príroda
- Krisfalusi, M., Miki, K., Magyar, P. L., O'Brien, D. A. 2006. Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 75. 270-278.

- Kumar, A., Farooq, A. 1994. Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. *Life Science*. 55. 19–24.
- Louda, F., Čeřovský, J., Jeřková, A., Stádník, L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita v Praze-AF. ISBN: 80-213- 0702-1.
- Lusignan, M.F., Manjunath, P., Lafleur, M. 2011. Thermodynamics of the interaction between bovine binder of sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk. *Thermochimica acta*. 1-2. 88-90.
- Manjunath, P., Lefebvre, J., Jois, P.S., Fan, J., Wright, M.W. 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biology of Reproduction*. 80. 394-7.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Menard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of reproduction*. 67. 1250–1258.
- Marvan, F. 2011. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda. Praha. 304 s. ISBN: 9788021321885.
- McCully, K.A., Mok, C.C., Common, R.H. 1962. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 40. 937-952.
- Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H., Gulcher, K.D., Eddy, E.M. 2002. Targeted disruption of the *Akap4* gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Developmental Biology*. 248. 331-341.
- Mogielnicka-Brzozowska, M., Kordan, W. 2011. Characteristics of selected seminalplasmaproteins and their application inthe improvement ofthe reproductive processes in mammals. *Polish journal of veterinary sciences*. 3. 489-499.

- Mortimer, D., Mortimer, S.T. 2013. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods of Molecular Biology*. 927. 77-87.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen- thawed bull semen. *Theriogenology*. 6. 1695-1706.
- Muller, K., Pomorski, T., Muller, P., Zachowski, A., Herrmann, A. 1994. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry*. 33. 9968-9974.
- Pace, M.M., Graham, E.F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*. 39. 1144–1149.
- Parkinson, T.J., Noakes, D.E., England, G.C.W., Arthur, G.H. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. W.B. Saunders. 849 p. ISBN: 0-7020-2556-9.
- Parks, J.E., Lynch, D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29. 255-266.
- Patel, A.B., Srivastava, S., Phadke, R.S., Govil, G. 1998. Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: An NMR study. *Biophysical Journal*. 75.1522-1528.
- Phillips, P.H. 1939. The preservation of bull semen. *J. Biol. Chem.* 130. 415.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164. 666.

- Quinn, P.J., Chow, P.Y., White, I.G. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60. 403-407.
- Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N. 2000. Effect of buffering system on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction. Science*. 59: 31-41.
- Revah I., Gadella B.M., Flesch F.M., Colenbrander B., Suárez S.S. 2000. Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biology of Reproduction* 62. 1010-5
- Salisbury, G.W., VanDemark, N.L., Lodge, J.R. 1978. Extenders and extension of unfrozen semen. In: *Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle*. W.H. Freeman and Co. 442-493.
- Schöneck, C., Braun, J., Einspanier, R. 1996. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*. 45. 633-42.
- Shannon, P. 1978. Factors affecting semen preservation and conception rates in cattle. *J Reprod Fertil*. 54. 519-527.
- Souza, C.E.A., Moura, A.A., Lima-Souza, A.C., Killijan, G.J. 2011 Binding patterns of seminal plasma proteins on bovine epididymal and ejaculated sperm membrane. *Arquivo brasileiro de medicina veterinaria e zootecnia*. 3. 535-543.
- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus (R) and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 3. 1087-1094.

- Thurston, L.M., Watson, P.F., Holt, W.V. 2002. Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation. *Cryo Letters*. 23. 255-262.
- Tollner, T.L., Yudin, A.I., Treece, C.A., Overstreet, J.W., Cherr, G.N. 2008. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Human Reproduction*. 23. 2523–2534.
- Tuli, R.K., Holtz, W. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boergoat spermatozoa. *Theriogenology*. 42. 547-555.
- Tulsiani, D.R., Abou-Haila, A., Loeser, C.R., Pereira, B.M. 1998. The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Experimental Cell Research*. 240. 151-164.
- Turner, R.M. 2003. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility. *The Journal of Andrology*. 24. 790-803.
- Vale, W.G. 1994. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen of buffalo semen. *Buffalo J.* 2. 65–72.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vasquez, 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 (R) and Bioxcell (R). *Theriogenology*. 6. 895-900.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57. 149–179.

- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. Repetitorium - spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. VÚVeL. Brno. 87 s. ISBN: 80-86895-01-7.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Bendová, J., Faldíková, L., Zralý, Z., Netolická, S., Pospíšil, L., Diblíková, I., Zudová, D., Matoušková, O. 2000. Hodnocení semene pro asistovanou reprodukci a výběr plemenů. VÚVeL. Brno. 141 s.
- Vishwanath, R., Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 62. 23-53.
- Vishwanath, R., Shannon, P., Curson, B. 1992. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Animal Reproduction Science*. 29. 185-194.
- Watson, P.F. 1975. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *Journal of Reproduction and Fertility*. 42. 105-111.
- Wu, A.T., Sutovsky, P., Manandhar, G., Xu, W., Katayama, M., Day, B.N., Park, K.W., Yi, Y.J., Xi, Y.W., Prather, R.S., Oko, R. 2007. PAWP, a Sperm-specific WW Domain-binding Protein, Promotes Meiotic Resumption and Pronuclear Development during Fertilization. *The Journal of Biological Chemistry*. 282. 12164-12175.