

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Možnost náhrady vaječného žloutku v ředidlech býčího
semene přídatkem nízkodenzitního lipoproteinu**

Diplomová práce

Autor práce: Kristýna Zimová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnost náhrady vaječného žloutku v ředidlech býčího semene přídatkem 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2015 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za poskytnutí odborných rad, věcné připomínky, ochotu a vstřícný přístup během zpracování této práce, a svému školiteli Ing. Onřejovi Šimoníkovi za praktické rady při zpracovávání dat a práci v laboratoři, za veškerý čas, který mi věnovali, a především za trpělivost.

Velké DÍKY patří mé rodině a přátelům za podporu a povzbuzení po celou dobu mého studia.

Možnost náhrady vaječného žloutku v ředidlech býčího semene přídavkem nízkodenzitního lipoproteinu

Souhrn

Slepičí vaječný žloutek se běžně používá jako kryokonzervační medium ředidla chránící býčí spermie během kryokonzervace. Jeho účinek zřejmě díky přítomnosti lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) ve vaječném žloutku chrání spermie před tepelným šokem a zlepšuje jejich kvalitativní parametry po rozmrazení. Cílem této práce bylo ověřit možnost náhrady vaječného žloutku samotným LDL u dvou komerčních žloutkových ředidel Triladyl® a BULLXcell™ a ohodnotit vliv LDL na parametry motility a viabilitu spermií po rozmrazení a je-li míra tohoto účinku odlišná podle použitého ředidla.

Pokusné inseminační dávky byly získány od 8 býků různého věku a plemene (Holštýn a ČESRT) v inseminační stanici býků Hradištko pod Medníkem Natural, spol. s r. o. Pro experimenty byla použita žloutková ředidla Triladyl® a BULLXcell™. Pro každé ředidlo byly připraveny 4 experimentální skupiny – kontrolní vzorek standardně připravené ředidlo s vaječným žloutkem a modifikované vzorky s 6 %, 8 % a 10 % koncentrací LDL. Jednotlivé dávky byly standardním způsobem kryokonzervovány v tekutém dusíku.

Po rozmrazení a po dvouhodinové inkubaci v 37 °C byly vzorky pomocí metody počítačové analýzy semene CASA (NIS Elements Ar 3. 2.) hodnoceny parametry motility spermií (VAP, VCL, VSL, LIN, STR a WOB), viabilita spermií byla s použitím fluorochromů PI a CFDA hodnocena fluorescenční mikroskopií. Výsledky této práce ukázaly, že všechny koncentrace s LDL byly rychlejší u parametrů rychlosti VAP, VCL a VSL oproti kontrolnímu vzorku. Tento trend se nezměnil ani po dvouhodinové inkubaci, žádný významný rozdíl mezi ředidly nebyl pozorován. Výrazný pokles u pohyblivých a živých spermií byl pozorován u 6 % koncentrace LDL u obou ředidel, ostatní vzorky, které dopadly lépe, neměly mezi sebou statisticky významný rozdíl.

Na závěr, naše výsledky ukazují, že koncentrace s LDL extrahovaného z vaječného žloutku mají pozitivní efekt na parametry motility, i po dvouhodinové inkubaci je trend zachován pouze s mírným poklesem rychlosti. Vliv LDL si vedl lépe u rychlostí než u podílu pohyblivých a živých spermií. Proto nelze podceňovat fyzikální vlastnosti vzorků s ohledem na ohodnocení všech parametrů. Optimální koncentrace LDL se pohybují mezi 8 – 10 %. LDL se jeví jako plnohodnotná náhrada vaječného žloutku.

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

The possibility to substitute egg yolk in bull semen extenders with low-density lipoprotein supplement

Summary

Hen egg yolk is routinely used as a preservation medium extender protecting bull sperm during cryopreservation. Its effect probably due to the presence of low density lipoproteins (LDL) in egg yolk protects sperm before cold shock and improves their quality parameters after thawing. The objectives of the present study was to verify the possibility of substituting egg yolk LDL alone with two commercial yolk extenders Triladyl® and BULLXcell™ and evaluate the effect of LDL on the parameters of motility and viability of sperm after thawing and if the degree of this effect differs according to extender.

Experimental insemination doses were obtained from 8 bulls of different ages and breeds (Holstein and Czech fleckvieh) at the insemination center bulls Hradištko pod Medníkem Natural, spol. s. r. o. was used for the experiments yolk extenders Triladyl® and BULLXcell™. For each extender were prepared four experimental groups - a control sample prepared in standard extender with egg yolk and modified samples with 6%, 8% and 10% concentrations of LDL. The insemination doses were standard manner cryopreserved in liquid nitrogen.

After thawing and after a two hour of incubation at 37 ° C samples were using computer methods semen analysis CASA (NIS Elements Ar 3. 2.) evaluated parameters of sperm motility (VAP, VCL, VSL, LIN, STR and WOB), the viability of the sperm using PI fluorochromes and CFDA evaluated by fluorescence microscopy. The results of this study showed that all concentrations of LDL were faster in speed parameters VAP, VSL and VCL compared to the control sample. This trend did not change even after two hours of incubation, no significant difference was observed between the thinners. A significant decrease in moving and live sperm was observed in 6 % LDL concentration in both solvents, other samples, which fared better, not each other statistically significant difference.

In conclusion, our results show that the concentration of LDL extracted from egg yolk has a positive effect on motility parameters, even after two-hour incubation, the trend is maintained with only a slight decrease in speed. Effect of LDL did better at speed than the proportion of motile and live sperms. Therefore, physical properties can not be underestimated samples with regard to the evaluation of all parameters. Optimal concentrations of LDL are between 8-10%. LDL appears to be a full replacement for egg yolk.

Keywords: bull, CASA, LDL, motility, sperm

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	1
3 Přehled literatury	2
3.1 Ejakulát	2
3.1.1 Spermie býka	2
3.1.2 Semenná plazma	5
3.2 Metody hodnocení spermatu	6
3.2.1 Makroskopické hodnocení	6
3.2.2 Mikroskopické hodnocení.....	7
3.3 Kryokonzervace	18
3.3.1 Kryoprotektanty	21
3.4 Ředidla pro kryokonzervaci spermií	26
3.4.1 Vaječný žloutek	27
3.4.2 Nízkodenzitní lipoprotein (LDL - low density lipoprotein)	30
4 Materiál a metodika	34
4.1 Příprava ředidel	34
4.2 Příprava inseminačních dávek.....	35
4.3 Experimenty.....	37
4.4 Statistická analýza dat	39
5 Výsledky	40
5.1 Experiment 1 – hodnocení parametrů motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermií (CASA).....	40
5.2 Experiment 2 – hodnocení parametrů přežitelnosti spermií metodou fluorescenčního barvení.....	50
6 Diskuze	52
7 Závěr	56
8 Seznam literatury	57

1 Úvod

Umělá inseminace (AI) je biotechnologickým postupem, který je široce používán především kvůli zlepšení genetického potenciálu skotu, zejména mléčného. Kryokonzervace spermatu býka hraje zásadní roli v tomto procesu. Úspěch kryokonzervace závisí nejen na zachování motility spermií, ale také na udržování jejich metabolické funkce (Hu et al., 2010). Nicméně, genetický vliv jednotlivých býků v AI průmyslu je omezen efektivností výroby inseminačních dávek (ID), vysoké procento spermií ztrácí svou integritu, nebo funkci, když se podrobí kryokonzervaci. Přibližně 40 - 50 % populace spermií nepřežije proces kryokonzervace ani s optimalizovanými protokoly. V důsledku toho je účelem protokolů kryokonzervace spermií, včetně použitých ředidel, zabránit smrtící tvorbě vnitrobuněčných ledových krystalů a snížit poškození membrány během a po kryokonzervaci (Vera Munoz, 2009).

Jedním z faktorů ovlivňujících výsledek kryokonzervace a posléze rozmrazení spermatu je přidání kryoprotektantů do ředidel. Jedním z nejpoužívanějších aditiv s kryoprotektivní funkcí pro komerční ředidla je slepičí vaječný žloutek, ale vyskytují se tvrzení o přítomnosti kryokonzervačních antagonistů ve vaječném žloutku, které mají negativní vliv na respiraci a motilitu spermií a dalším potenciálním rizikem je i kontaminace ID bakteriemi. Ochranný účinek žloutku je z velké části připisován na lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL), proto se v laboratorních testech účinek LDL, aby mohl sloužit jako náhrada vaječného žloutku v komerčních ředidlech. Pro uvedení do praxe je nutné zhodnotit vhodné koncentrace a přesný vliv LDL na spermie ve vztahu k použitému ředidlu.

2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit platnost hypotézy, že náhrada vaječného žloutku při přípravě vybraných ředidel býčího ejakulátu přidávkem LDL neovlivní negativně kryoprotektivní vlastnosti použitého ředidla. Dílčími cíli řešení bude pozorování inseminačních dávek býků ředěných standardním složením žloutkových ředidel Triladyl® nebo BullXcell™ s nahrazením žloutku v různých koncentracích LDL (6 %, 8 % a 10 %) po rozmrazení:

- 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 Přehled literatury

3.1 Ejakulát

3.1.1 Spermie býka

Spermie savců se skládá z hlavičky, bičíku a je zcela obklopena plazmatickou membránou. Hlavičku od bičíku odděluje takzvaný zadní prstenec (Amann et Graham, 1993). Délka spermie býka je přibližně 80 μm (Scanes, 2010). Délka hlavičky je 8 - 10 μm , šířka 4 - 4,5 μm a tloušťka 1 - 1,5 μm . Hlavička je složena z jaderného materiálu a akrozomu (Hopper, 2014). Bičík je přibližně dlouhý 44 - 53 μm a dělí se na krček spermie, spojovací, hlavní a koncový oddíl bičíku (Louda et al., 2001).

Plazmatická membrána

Spermie je zcela obklopena plazmatickou membránou. Plazmatická membrána spermií, v závislosti na funkci membrány, může být rozdělena do několika membránových domén a subdomén. Domény hlavičky spermie jsou akrozomální a postakrozomální oblast. Plazmatickou membránu akrozomálního regionu lze rozdělit na akrozomální čapku, což je speciální váček, obsahující glykolipidy a hydrolytické enzymy, a subdoménu nazývanou jako ekvatoriální segment (Gadella et al., 2001).

Souběžně s akrozomální membránou má plazmatická membrána spermií vliv na tvar a objem hlavičky spermií. Dále ovlivňuje pohyblivost, tvorbu energie, permeabilitu, kapacitaci a akrozomální reakci, a interakci s oocytom (He et al., 2001). Membrána spermie mění své lipidové složení a umístění lipidových domén při fyziologických událostí, než dojde k oplodnění (Buhr et al., 1994).

Plazmatická membrána spermie se skládá z dvojvrstvy fosfolipidů (hydrofilní a hydrofobní řetězce), cholesterolu, komplexních sacharidů a proteinů typických pro plazmatické membrány (Samper, 2009). Sacharidové struktury jsou vázány na proteiny nebo specifické lipidy na vnější straně plazmatické membrány (Gadella et al., 2001). Fosfolipidy se v plazmatické membráně spermií liší mezi jednotlivými druhy savců, ale obecně zahrnují fosfatidylethanolamin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin, fosfatidylcholin, sfingomyelin, lysofosfatidylcholin a kardiolipin (He et al., 2001). Na rozdíl od jiných druhů, sperma býků má vysoký podíl fosfatidylethanolaminu a fosfatidylcholinu. Bílkoviny tvoří asi 50 %

z celkové hmotnosti membrány a podle spojení s membránou jsou buď periferní, nebo integrální (Samper, 2009).

Podle Singera (1972) buněčnou membránu tvoří takzvaný model fluidní mozaiky. Patří, jsem lipidy (fosfolipidy a steroly) s určitými funkcemi. Lipidy a proteiny jsou mobilní a jsou schopny se pohybovat laterálně v rovině membrány. Při pokojové teplotě jsou membránové lipidy obecně ve fluidní fázi, ale některé domény obsahují lipidy i v gelové fázi. V gelové fázi jsou lipidy více seskupené a méně mobilní. Stupeň fluidity závisí na typu a množství přítomných lipidů. Například lipidy s dlouhým řetězcem, jakož i menší množství cholesterolu, zvyšuje tekutost membrány při pokojové teplotě (Flesch et Gadella, 2000).

Energetický metabolismus spermií

Energetický metabolismus spermií je klíčovým prvkem, který podporuje funkci spermií. Udržení pohyblivosti spermií a aktivní proteinové modifikace, jako je fosforylace, může být důvodem, proč spermie vyžadují mimořádně více adenosintrifosfát (ATP) než ostatní buňky. Během spermatogeneze v prvních stádiích jsou pro spermie výhodnými substráty laktát a pyruvát a využití glukózy je omezen. Avšak během zrání spermií v nadvarleti je již přítomna glykolýza. Pohyblivost spermií je podporována relativně na nízkých úrovních ATP. Dosažení vysokých hladin ATP, jsou nezbytné pro fosforylaci tyrosinu v souvislosti s hyperaktivací, zatímco akrozomová reakce vyžaduje laktát nebo pyruvát pro produkci ATP v oxidativní fosforylaci. Každý jednotlivý proces vyžaduje jiný substrát a metabolickou dráhu. Při analýze genového knockoutu u myši bylo zjištěno, že glykolýza je nezbytná pro funkci myších spermií a že oxidační fosforylace není nezbytná pro samčí plodnost. To naznačuje, že glykolýza by mohla kompenzovat nedostatek oxidativní fosforylace a obnovit většinu funkcí spermií (Miki, 2007).

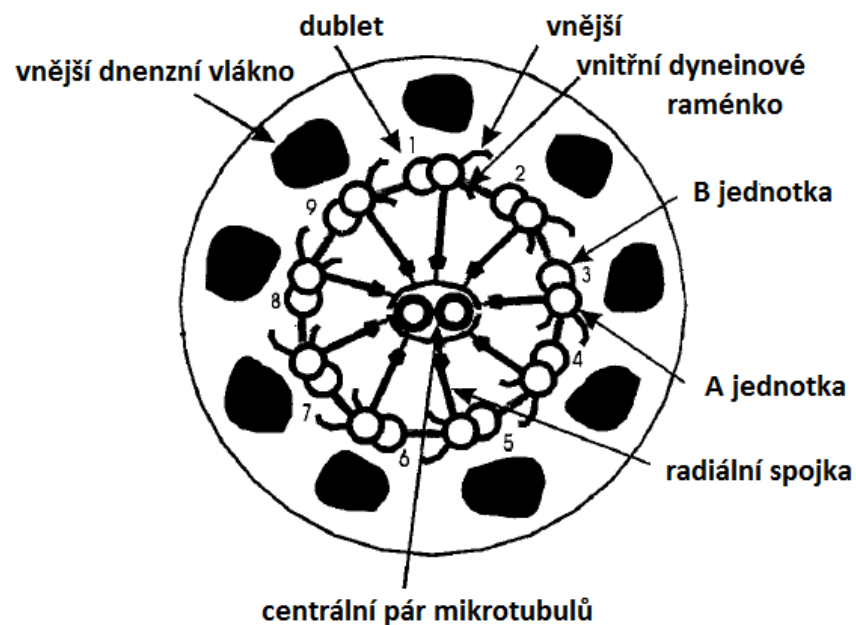
Pohyb spermie

K dispozici je velké množství pohybových vzorců spermií, v závislosti na různých vnějších i vnitřních faktorech. Také by bylo velmi neobvyklé, aby všechny spermie v každé populaci spermií, ukázaly stejné pohybové vzory v jednom okamžiku. Z nejjednoduššího hlediska se spermie skládá z hlavičky, spojovacího oddílu a bičíku. Hlavička obsahuje chromatin, který zůstává nedotčen, dokud nedojde k oplodnění. Membrány hlavičky jsou vysoce specializované a podstupují řadu změn během průchodu samičím reprodukčním ústrojím. Spojovací oddíl obsahuje spirálovitě uspořádané mitochondrie, které produkují

energii potřebnou pro pohyb spermií a bičík, který šíří pulzní vlny zahájených ve spojovacím oddíle (Mortimer, 2000).

Bičík obsahuje 9 dublet (mikrotubulový pár; A, B jednotka) uspořádaných kolem centrální dvojice mikrotubulů (obr. 1.). Od každého dubletu k dalšímu dubletu jsou rozprostřeny řady ramének složených z dyneinu (ATPázy). Pod vlivem ATP se raménka dyneinu pohybují a dotýkají dalších mikrotubulů dublet v kruhu a pohybuje tak prvním dubletem ve směru k hlavičce. Raménka s dynein pak uvolní druhý dublet. Na druhé straně, dynein druhého dubletu se natáhne a dotkne třetího dubletu v řadě, což druhý dublet posune kupředu. Tento cyklus pokračuje, dokud nebude odeslána vlna šroubovitým směrem podél bičíku. Vlna je viděna jako sloučený spirálovitý úder bičíku. Jak se vlna pohybuje podél bičíku, spermie je poháněna dopředu a hlavička spermie je nucena se otáčet v ose směru cesty (Mortimer, 2000).

Hlavička nemá žádný vliv na směr pohybu, pouze naviguje bičík. Je prokázáno, že pohybový vzor spermií je ovlivněn jejich vnějším prostředím. Například, spermie v semenné plazmě mají nižší progresivní rychlost a nižší boční pohyb hlavičky než spermie od stejného ejakulátu, které byly inkubovány ve fertilizačních podmínkách (Serres et al, 1984).



Obrázek 1. Schematické znázornění průřezu hlavního oddílu bičíku savčí spermie (Zdroj: Mortimer, 2000)

Charakteristika motility spermií

Specifické aspekty pohybu spermií, jako je např. rychlost progresu a vlastnosti pohybu, prokazují, že úzce souvisí s průnikem spermií do hlenu děložního krčku. Objektívni a kvantitativní měření pohybových vlastností jednotlivých spermií zjišťuje funkční schopnosti a potenciální schopnosti fertilizace. V důsledku toho, je zvýšená pozornost věnována především hodnocení motility spermií než stanovení hrubého podílu pohyblivých spermií (Mortimer, 1997).

3.1.2 Semenná plazma

Semenná plazma je složená z nejrůznějších molekul produkovaných přídatnými pohlavními žlázami, které se smísí se spermiemi během ejakulace (Boisvert et al., 2004). Semenná plazma býků je z 90 % tvořena sekrety semenných váčků (Manjunath, et al., 1994). Z hlavní části se podílí na objemu a složení ejakulátu (Moura et al., 2006). Semenná plazma je velmi důležitá pro metabolismus, funkci, přežití a transport spermií do samičího pohlavního ústrojí (Hamameh et Gatti, 1998).

Je dobře známo, že semenná plazma obsahuje různé složky (bílkoviny, enzymy, lipidy, organické kyseliny, minerální látky) a každá složka má důležitou úlohu při funkci spermií (Chacur, 2012). Studie ukázaly, že faktory v semenné plazmě (jako jsou např. proteiny) mohou, jak pozitivně tak i negativně, ovlivnit parametry fertility spermií (Kumar et al., 2009), příkladem je životaschopnost a motilita. Killian et al., (1993) při analýze semenné plazmy holštýnských býků s různou plodností, našli čtyři proteiny, které souvisejí s býčí fertilitou a zjistili, že dva z těchto čtyř proteinů (26 - kDa, 55 - kDa) semenné plazmy pozitivně korelují s fertilitou.

Některé bílkoviny v semenné plazmě býků se adsorbují na povrchu spermií během ejakulace kvůli udržení stability plazmatické membrány před kapacitací, ke které dochází v samičím pohlavním ústrojí (Manjunath et al., 2002). Podmínkou fertilizační schopnosti spermií je navození kapacity a akrozomální reakce spermií (Nixon et al., 2007). Tři proteiny, typu BSP - A1 / - A2, BSP - A3, a BSP - 30 kDa, souhrnně nazývané BSP proteiny, představují hlavní proteiny býčí semenné plazmy (Nauc et Manjunath, 2000). Tyto spermadhesiny jsou typické vysokou afinitou k heparinu, HDL lipoproteinům a cholinovým

fosfolipidům. Uplatňují se zejména při kapacitaci spermií (Manjunath, et al., 1994). Složení proteinů savců v semenné plazmě se liší mezi druhy (Boisvert et al., 2004), v sezóně a v metodě odběru semene (Giuliano et al., 2008).

3.2 Metody hodnocení spermatu

Analýza semene je nejběžnějším používaným postupem hodnocení samčího fertilizačního potenciálu. Pro hodnocení kvality semene jsou běžně zkoumány parametry, jako je pohyblivost, koncentrace a morfologie spermií (Contri et al., 2013).

Po odběru ejakulátu se hodnotí vlastnosti spermií vztahující se k množství a kvalitě. Metody hodnocení spermatu poskytují velké množství informací o spermiích, jejich morfologii a funkci. Přesnost hodnocení musí být potvrzena velkým počtem samců. Metody se dělí na základní (makroskopické, mikroskopické a biochemické) a specializované. Korelace samčí plodnosti s jednotlivými charakteristikami ejakulátu je stále nesměrodatná (Juhász et al., 2000).

3.2.1 Makroskopické hodnocení

Makroskopické vyšetření ejakulátu hodnotí objem (hmotnost) a celkový vzhled. Objem ejakulátu je závislý na druhu, plemeni, věku, a na prostředí. Mezi faktory, které ovlivňují objem ejakulátu, patří krmění, zdravotní stav, ustájení, způsob a četnost odběru spermatu a roční období. Správné měření objemu pomůže stanovit množství dávek pro umělou inseminaci (AI) (Samper, 2009).

Makroskopický vzhled ejakulátu závisí na jeho hustotě, která je určena koncentrací spermií, složením semenné plazmy, a fyziologickými (epiteliální buňky) nebo patologickými (moč, krev) složkami. Hodnotí se barva, konzistence, tekutost a pach. Barva spermatu by měla být mléčně bílá. Jakékoliv růžové nebo červené zbarvení může naznačovat hemospermii (krev v ejakulátu), což by mohlo mít nepříznivý dopad na plodnost. Konzistence se mění se snižující koncentrací spermií z mléčné až na vodnatou, která může indikovat snížený počet spermií (oligospermie) nebo absolutní absenci spermií (azoospermie). Barva a konzistence ejakulátu poskytují důležité údaje o vhodnostech ejakulátu pro použití v AI (Samper, 2009).

3.2.2 Mikroskopické hodnocení

Základní mikroskopické vyšetření ejakulátu hodnotí pohyblivost, koncentraci a morfologii spermií.

Hodnocení **pohyblivosti** je jedním z nejpoužívanějších parametrů pro hodnocení kvality spermií jak v čerstvém nebo kryokonzervovaném spermatu (Contri et al., 2013). Hodnocení se provádí vizuálně laborantem, proto jsou výsledky subjektivní a dobrá zkušenost referenta je nutná pro provedení spolehlivého hodnocení. Z tohoto důvodu se vytvořily techniky založené na počítačové analýze (např. CASA), které dokáží hodnotit pohyblivost spermií podle daných kritérií objektivně (Juhász et al., 2000). Motilita spermií se vyjadřuje procentickým odhadem spermií, které se pohybují progresivně a připočítá se před za hlavičkou spermie (minimálně 70 % spermií). Pozorují se také abnormální pohyby, ke kterým patří, pohyb dokruhu, kolébavý pohyb na místě, trhavý nepravidelný pohyb a zpětný a vířivý pohyb (Věžník et al., 2004).

Koncentrace spermií představuje počet spermií na jednotku objemu. Může být měřena pomocí hemacytometru nebo spektrofotometru, kde je odhad založený na hustotě roztoku (Samper, 2009). Stanovení koncentrace spermií v ejakulátu je důležitým parametrem pro výrobu správně naředěné inseminační dávky, nebo pro výpočet objemu spermií ve vzorku pro různé testy (Juhász et al., 2000).

Pro hodnocení **morfologie** spermií se používá celá řada metod a klasifikačních systémů. Morfologické vlastnosti spermatu mohou být hodnoceny nebarevným zkoumáním, pufrům solné fixní suspenze nebo obarvením. Nejčastěji používané techniky barvení jsou eosin - nigrosin, eosin - anilin modř, Spermac a Giemsa. Neobarvené vzorky mohou být analyzovány pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu nebo fázovým kontrastem mikroskopie při 1 000× zvětšení, zatímco v případě obarvených vzorků je vhodné pouze jediné světelné pole mikroskopu. Podrobnější analýzu lze provést pomocí elektronové mikroskopie (Juhász et al., 2000).

Hodnotí se procento morfologicky abnormálních spermií, přičemž se odlišují primární a sekundární změny. Primární změny vznikají při spermatogenezi jako vývojové anomálie

(změny tvaru hlavičky či akrozomu, zdvojení struktur či degenerativní formy spermií). Kdežto sekundární změny spermií vznikají při průchodu vývodními cestami a při ejakulaci, špatné manipulaci či nesprávné přípravě preparátu. Mikroskopicky se také hodnotí procento nezralých spermií s protoplazmickou kapkou (Věžník et al., 2004).

Biochemické hodnocení ejakulátu běžně hodnotí pH semene a měří se správně kalibrovaným pH metrem. Roční sezóna, frekvence ejakulace a koncentrace spermií může mít vliv na pH semene. K dispozici je počet zaznamenaných negativních korelací mezi objemem a pH a mezi počtem spermií v ejakulátu a pH. Jak počet spermií v ejakulátu klesá, pH se zvyšuje. Abnormálně vysoké pH spermatu může být spojeno s infekcí vnitřního pohlavního ústrojí nebo urospermií (McKinnon et al, 2011).

Tabulka 1. Požadavky na kvalitu ID býka: (Příloha č. 5 k vyhlášce č. 471/2000 Sb; Věžník et al., 2004)

Býk	Objem	Hustota v 1 mm ³	Aktivita	Morf. změny	Primární změny	Nezralé spermie	pH
Čerstvé sperma	> 4 ml	> 700 000	> 70 %	< 20 %	< 10 %	< 2 %	6,9
Dlouhodobě uchovávané sperma		> 700 000	> 30 %				

Specializované metody slouží k hodnocení funkčnosti a viability spermií. Tyto metody dokáží hodnotit integritu plazmatické membrány, akrozomu a chromatinu, dále funkčnost mitochondrií nebo akrozomu, aj. Jsou technicky náročnější, proto je zapotřebí disponovat vyspělejšími technologiemi (fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie) (Rodríguez - Martínez, 2013).

Hodnocení viability

Existuje řada postupů, které jsou navrženy pro posouzení viability spermií, ať jsou čerstvé, skladované nebo po kryokonzervaci. Nejběžněji se používají kolorimetrické metody, buď s jednou, nebo s dvěma barvami. Barvicí postupy jsou jednotné (eosin / nigrosin). Používají se k hodnocení životaschopnosti, mortality a morfologie. Tento postup je založen na stupni propustnosti membrány mrtvých spermií, kdy se hlavičky spermií zbarví růžově (eozinofilní). Zatímco nízká propustnost živých spermií vylučuje eosin, a proto udržuje bělavou barvu hlaviček spermií. Přítomnost nigrosinu nejen zajišťuje odpovídající kontrast preparátu, ale také usnadňuje detekci morfologických abnormalit způsobené skladováním *in vitro* (Chalah et Brillard, 1998).

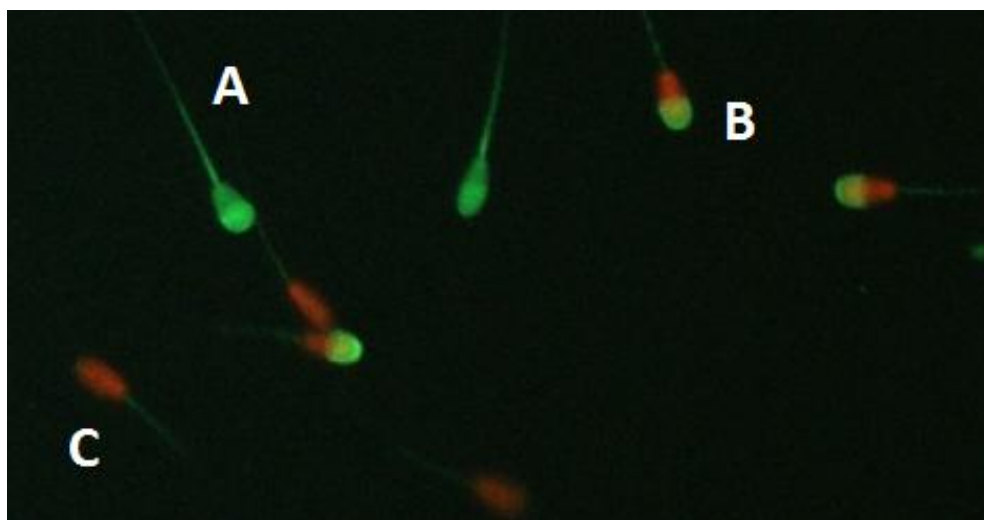
Spermie označené navázanými fluorochromy mohou být buď posuzované podle fluorescenční mikroskopie nebo průtokovou cytometrií. Fluorescenční mikroskopie je subjektivní oproti průtokové cytometrii, ale detekce emitovaných fluorescencí snižuje výskyt chyb pocházejících od pozorovatele (Nagy et al., 2003).

V posledních letech bylo navrženo několik fluorescenčních sond, které se používají samostatně nebo v kombinacích. Pomáhají určit kvalitu spermií tj, životaschopnost a integritu membrány u čerstvého nebo kryokonzervovaného ejakulátu u různých druhů zvířat. Používají se sondy jako je karboxyfluorescein diacetát (CFDA) nebo také kalcein (AM) pro vyhodnocení integrity plazmatické membrány (Ericsson et al., 1993). Tyto barvy mají schopnost pronikat přes plazmatickou membránu a jsou deesterifikované esterázami u životaschopných spermií, tato fluorescenční sloučenina je uchycena v cytoplazmě. Pokud jsou vystaveny příslušné vlnové délce světla, způsobuje to zelenou fluorescenci (excitace: 485 nm; emise: 520 nm). Z tohoto důvodu, pouze živé buňky s oběma aktivními intracelulárními esterázami a neporušenými plazmatickými membránami fluoreskují s těmito markery (Arruda et al., 2002).

K určení integrity membrány u býků je navrženo duální barvení pomocí SYBR-14 plus propidium jodidu (PI). SYBR-14 je permeabilní barva pro nukleové kyseliny (excitace: 488 nm, emise: 516nm), obarví pouze DNA životaschopných buněk. SYBR-14 emituje zelenou fluorescenci v závislosti na excitaci. Barvení DNA spermií je výhodné, protože barvení je uniformní a stabilní (Love et al., 2003).

Propidium jodid (PI) je opačným typem fluorescenční sondy, barví jádra červeně (excitace: 530 nm; emise: 617 nm). PI je interkalární fluorescenční barvivo, které se používá k označení nukleové kyseliny bez preference na sekvence. Jedna molekula barviva se naváže na 4 - 5 párů bází. Barvivo neprojde neporušenými membránami živých buněk, a pokud mají buňky cytoplazmatickou membránu porušenou, barvivo volně proudí do buněk. PI se používá pro detekci poškozené membrány (Nieminen, 1995).

Při metodě barvení **CFDA / PI** se hodnotí tři populace spermií; zelená (živá), červená (mrtvá), a duální (umírající) viz obr. níže. Umírající spermie jsou charakterizovány zeleným (CFDA) intaktním akrozomem a červenou (PI) postakrozomální oblastí. Poškozené spermie také ukazují různé stupně zelené fluorescence na spojovací části bičíku, což může naznačovat intaktní mitochondrie (Brito et al., 2003).



Obrázek 2. Hodnocení viability. A-živá (CFDA), B-umírající, C-mrtvá (PI). Zdroj: K. Zimová, lab. KVD

Počítačem asistovaná analýza spermií (CASA)

V roce 1950 a 1960 byl pozorován významný pokrok ve studiu pohybu spermií. Začátkem roku 1970 pokroky v oblasti výpočetní techniky a softwaru položily základy pro analýzu spermatu za pomoci počítačového systému (CASA) (Amann et Katz, 2004). První systém, který přenášel data přímo z mikroskopu do počítače a zpracovával a analyzoval data

automaticky, se vyvinul až roku 1980 (Katz et al., 1985). Tento systém tvořil základ pro komerční nástroje CASA, dnes široce používaný jak klinicky tak i ve výzkumných laboratořích (Amann et Katz, 2004).

Počítačem asistovanou analýzou spermatu se rozumí počítačové vyhodnocení mikroskopických snímků pomocí specifického softwaru, který je schopen tyto snímky analyzovat. V zásadě je mikroskopický obraz, převeden na černo bílý obraz pomocí jednoduché čipové videokamery do počítače (Allahbadia, 2005). Přestože je tento systém analýzy poměrně nákladný, nabízí rychlé hodnocení, vyšší stupeň opakovatelnosti a menší subjektivitu než u tradičních vizuálních odhadů pohyblivosti (McKinnon et al., 2011).

V současné době je snaha o větší využití tohoto systému i ve veterinární medicíně. Je však nutné zohlednit mezidruhové rozdíly ejakulátu, respektive pohybové charakteristiky spermií. To vyžaduje správné nastavení parametrů pro vyšetření na různých typech přístrojů (mezi nejpoužívanější patří CellSoft a HTM / IVOS). Systém CASA byl použit u několika druhů zvířat včetně býků. Další oblastí, kde je CASA stále více využívána, je reprodukční toxikologie (Věžník, 2004).

Některé studie naznačují, že odhady koncentrace a pohybových charakteristik spermií pomocí CASA výrazně souvisí s fertilizační schopností *in vitro* a *in vivo*, a že hodnocení pohyblivosti spermií pomocí CASA opravdu má prediktivní hodnotu pro plodnost (Larsen et al., 2000).

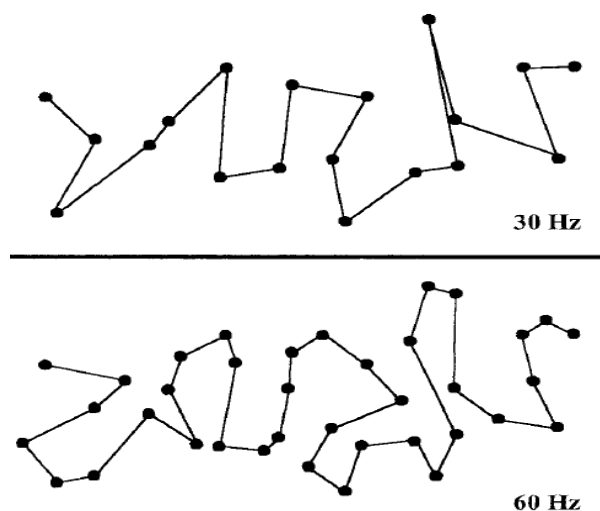
Mnoho faktorů ovlivňuje účinnost CASA systémů, například příprava vzorků, počet snímků za sekundu, koncentrace spermií a hloubka počítačové komory. Nicméně, spolehlivé výsledky lze získat v případě, pokud jsou dodržovány postupy (Mortimer, 1994).

Existuje několik výrobců, kteří vyrábějí CASA systémy. Tyto systémy jsou schopny měřit pohyblivost spermií a jejich kinematiku. Některé dokonce mohou být použity k odhadu koncentrace spermií. Jen některé moduly dokáží vyhodnotit morfologii spermií. CASA, včetně posouzení motility, koncentrace a morfologie, má dvě výhody oproti manuálním metodám. Je to vysoká přesnost a také poskytuje kvantitativní údaje kinematických parametrů spermií jako je progresivní pohyb, hyperaktivace a kapacitace spermií (Mortimer et al., 1995).

Princip CASA

Běžnou součástí CASA je počítač, kamera a paměťová karta, na kterou se uloží videozáznam. Počítačový software slouží k identifikaci a sledování všech spermií na snímaném poli a provádí veškeré výpočty dat (Mortimer, 2000). Nejdříve se musí obraz z mikroskopového pole odeslat z kamery a následně převést na digitální obraz. Obraz z videokamery se skládá z pravoúhlého pole obrazových elementů neboli pixelů. Síla signálu z daného pixelu je úměrná jeho jasů nebo intenzitě. Během tvoření videosnímku digitální kamerou, se nejprve skenují sudé řádky v tomto poli a pak liché řádky. Každé skenované pole (nebo videosnímek) tvoří jen polovinu obrazu. Sekvenční dvojice prokládaných obrazových snímků posléze vytvoří celý videosnímek (Katz et al., 1985).

V severoamerických systémech NTSC (National Television Standards Committee) jsou pole videa generované každou 1 / 60 sekundy, je tam tedy 30 snímků za sekundu. To znamená, že kmitočet snímků je 30 Hz. Každý videosnímek je složen z 525 řádků. V evropských a australských systémech PAL (Phase Alternativ Line) a SECAM (Sequential Couleur Avec Memoire) jsou videosnímky generované každou 1 / 50 sekundy tedy frekvencí 25 Hz. Proto má každý snímek 625 řádků. Rozdíl mezi systémem PAL a SECAM a jejich variantami, je v kódování barevné informace, v chrominanci, nebo v signálu (Mortimer, 1994). Tvar trajektorie se výrazně mění počtem snímků pořízených za sekundu. Takže rekonstruovaná stejná trať při 30 a 60 Hz (obr. 3.) dokazuje efekt, že se změní kinematické hodnoty trajektorie (Mortimer et Swan 1999).



Obrázek 3. Stejná trajektorie rekonstruovaná při 30Hz a 60 Hz (Zdroj: Mortimer, 2000)

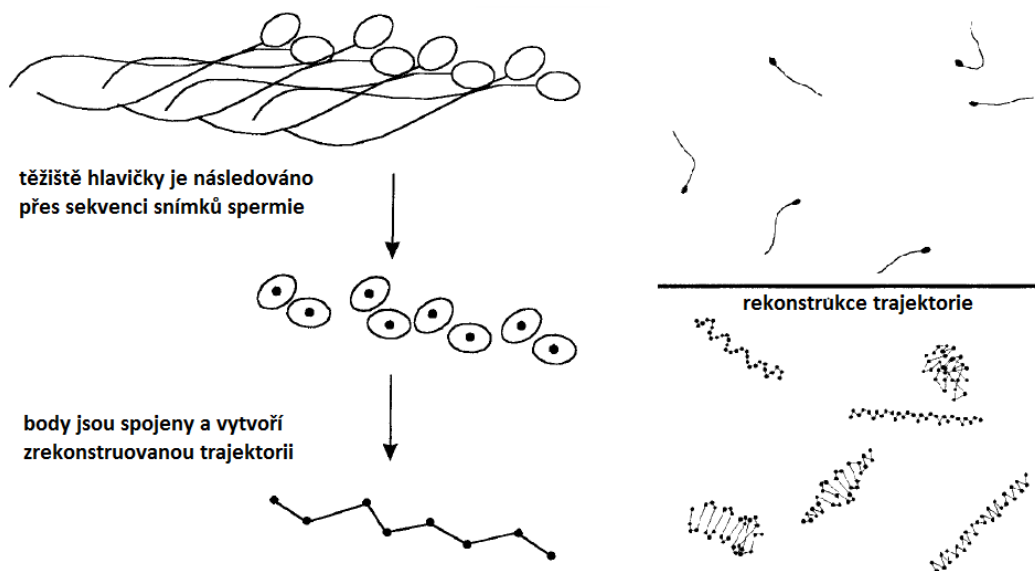
Nejjednodušším způsobem jak zobrazit spermie v počítači je buď použitím temného pole, nebo pomocí negativního fázového kontrastu, který zobrazuje bílé spermie na tmavém pozadí. Při sledování hlavičky spermie zůstává jas hlavičky poměrně konzistentní i při pohybu, tudíž její rotace nemění intenzitu bílé barvy. Snímek každé hlavičky spermií je pak digitalizován a počítač určí počet obrazových prvků (pixelů) každé detekované hlavičky spermie (obr.4.) K dispozici je celá řada čísel neboli pixelů, které jsou přiřazené pro jednotlivé hlavičky spermií. Počítač rozpozná objekt, tedy hlavičku, díky zadání minimální a maximální velikosti pro konkrétní druh, tak že se započítají do očekávaného rozsahu jen ty objekty, které splňují konkrétní velikost (Wijchman et al, 1995).

Dříve CASA neuměla rozlišovat hlavičku spermie od kousků úlomků a jiných fragmentů podobných velikostí hlavičky, to bylo zdrojem chyb. Aby se zabránilo těmto chybám, vytvářely se novější a schopnější systémy. Třeba Stromberg-Mika CASA systém řeší tento problém tak, že požaduje připojení bičíku, aby hlavičky spermií byly identifikovány pozitivně (Wijchman et al, 1995). V alternativním přístupu, systém Hamilton Thorne nyní používá IDENT systém, v němž se Hoechst barvivo váže na DNA spermií, které fluoreskuje a počítač tuto fluoreskující spermii označí jako pozitivní. Poté, co se identifikuje hlavička spermii, je zadána do polohy (x, y) souřadnic v poli mikroskopu a počítač jí pak jednoduše spočítá a určí polohu. Tento bod se určí buď ve středu hlavičky nazývaný jako těžiště, nebo v nejjasnějším místě na hlavičce spermií nazývaný jako referenční bod (Mortimer, 2000).

Poté, co se všechny hlavičky spermií identifikují a zaznamenají jako počítačová data v jednom poli nebo snímku, se následně analyzuje další pole nebo snímek, a digitalizované hlavičky jsou sledovány počítačem. Počítač vyhledává po sobě jdoucí obraz hlavičky spermií v pásmu pravděpodobnosti, což je kruh konkrétního poloměru kolem hlavičky spermie. Poloměr je určen maximální vzdáleností spermie od očekávané cesty v rámci časové periody. Tato vzdálenost je často nastavena uživatelem a liší se v závislosti na tom, zda jsou spermie v ejakulátu nebo v kultivačním médiu (Mortimer, 2000).

Pro každou spermii je díky referenčnímu bodu rekonstruována trajektorie a je vypočtena řada kinematických hodnot. Kinematika se používá k rozlišení vzorů pohybu spermií. Při použití CASA, všechny spermie v zorném poli mají své trajektorie rekonstruovány současně. To znamená, že všechny spermie v poli jsou identifikovány před analýzou dalších snímků v posloupnosti. Z toho vyplývá, že pokud je v zorném poli příliš mnoho spermií, nemusí přístroj rekonstruovat tyto trajektorie přesně. Pokud spermie kolidují

navzájem, jejich kinematika se na okamžik změní, a to může mít vliv na jejich klasifikaci pohybu. Také v případě trajektorií dvou nebo více spermií, které se nacházejí ve stejné zóně pravděpodobnosti, může CASA trajektorie odmítnout z analýzy, nebo je může zahrnout do analýzy, ale s rizikem nesprávné rekonstrukce trati. Proto se doporučuje používat koncentraci spermií $< 40 \times 10^6 / \text{ml}$ (Mortimer et al, 1995).



Obrázek 4. Digitalizace a rekonstrukce trajektorie (Zdroj: Mortimer, 2000)

Kinematické vlastnosti spermií

I když bičík spermie tvoří pohyb spermie, moderní systém CASA stále nemůže analyzovat spermii pomocí bičíku. Proto se stále sleduje hlavička spermie, která je základem pro všechny kinematické parametry. Analýzy pohybu spermií odvozené od sledování hlavičky může poskytnout velké množství užitečných informací o pohybu spermií v ejakulátu (Serres et al., 1984).

CASA poskytuje objektivní údaje o rychlosti. Kromě určení podílu pohyblivých spermií, tyto systémy umožňují měření kinematických parametrů jako je rychlost spermií, linearita, amplituda bočního posunu hlavičky a frekvence křížení. I když hodnoty jsou závislé na nastavení stroje. Korelace s březostí po *in vivo* nebo *in vitro* fertilizaci (IVF) ukázala, že hodnocení pohyblivosti spermií pomocí CASA opravdu má prediktivní hodnotu pro plodnost (Irvine et al., 1994; Garrett et al., 2003), ale s tím nesouhlasí Stalhammar et al. (1994) a Comizzoli et al. (2001) a další.

Terminologie CASA

V průběhu let se objevuje nepřehledné množství terminologie popisující různé pohybové vlastnosti pohyblivých spermií. Některé termíny jsou synonymní a popisují stejné vlastnosti, ale někdy se stejný termín používá k popisu různých vlastností. K této matoucí a nepřijatelné situaci došlo na semináři Automatizované analýzy spermií, který se konal pod záštitou Americké andrologické společnosti na výročním zasedání v Houstonu (Texas, USA) v průběhu března 1988. Byly proto dohodnuty terminologie a zkratky (a odpovídající numerické přesnosti) pro měření tří základních rychlostí a trajektorií. Tato terminologie byla následně přijata na mezinárodním sympoziu „Human Sperm Movement and Its Evaluation“ pořádaná federací CECOS v Montpellieru (Francie) v dubnu 1988. Pohybové vlastnosti uvedené v tomto ASA CECOS souladu, jsou odvozeny od analýzy těžiště hlavy a mají zvláště aktuální význam, protože poskytují základ pro terminologii současné generaci CASA systémům (Mortimer, 1994).

Křivočará rychlost (VCL) se vypočítá jako součet lineární spojnice sekvenční polohy hlavičky spermie podél trati spermie. VCL je v podstatě dvojrozměrná projekce skutečné trojrozměrné šroubovité cesty spermie, jak je zřejmé z časového rozlišení (tj. snímků za sekundu) na zobrazovací použité metodě. Hodnoty VCL jsou uvedeny v mikrometrech za sekundu na jedno desetinné místo. Rychlost VCL je někdy označována jako „traťová rychlost“. Udává tedy míru buněčné vitality. (Mortimer et al., 1988; Björndahl et al., 2010).

Střední dráhová rychlost (VAP) je rychlost podélné průměrné dráhy spermie. Vzhledem k tomu, že průměrná dráha může být odvozena mnoha různými algoritmy, včetně vizuální interpolací různých matematických vyhlazovacích technik, nebo geometrickou konstrukcí, používá se přesná odvozovací metodika, která je u každého systému CASA uvedena. Tudíž se tyto algoritmy liší mezi nástroji, takže hodnoty nemusí být srovnatelné mezi systémy (Björndahl et Kvist, 2003). Také VAP hodnoty jsou uvedeny v mikrometrech za sekundu na jedno desetinné místo (Björndahl et al., 2010).

Lineární rychlost (VSL) je lineární (přímočará), nebo progresivní rychlost spermie. Ta se vypočte z lineární vzdálenosti mezi začátkem a koncem sledované dráhy. Je důležité poznamenat, že mnoho CASA systémů stále používá lineární rychlosti odkazované na VCL, což je významným zdrojem chyb pro méně zkušené uživatele CASA. VSL hodnoty jsou uvedeny v mikrometrech za sekundu na jedno desetinné místo (Björndahl et al., 2010).

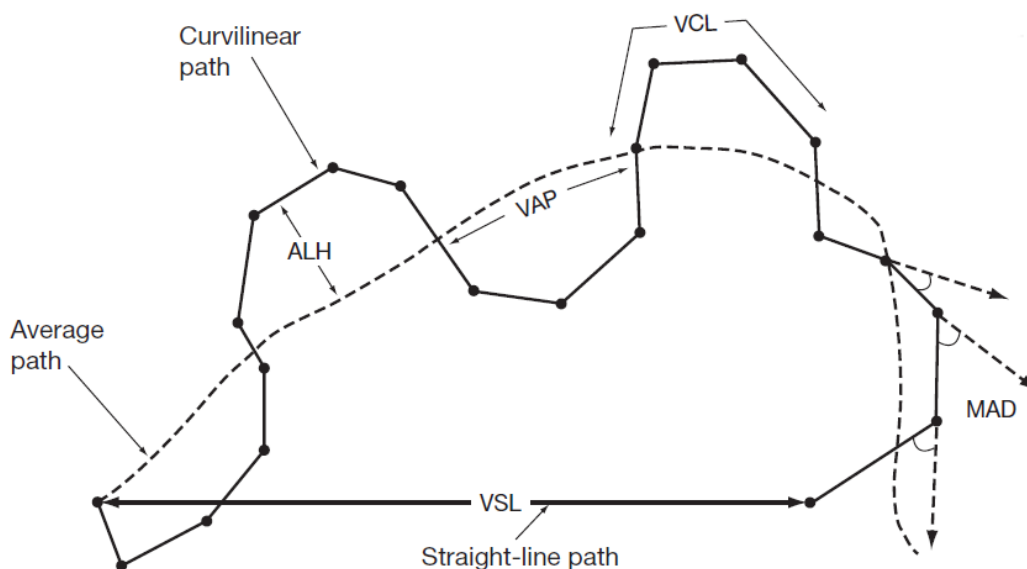
Tvar trajektorie ovlivňuje hodnoty rychlosti. Lze vypočítat měření rychlosti spermie díky třem poměrům progresu jako je linearita (LIN), přímost (STR), a kymácivost (WOB), odvozeny jsou následovně:

$$\text{Linearita LIN} = \text{VSL} / \text{VCL} \times 100$$

$$\text{Přímost STR} = \text{VSL} / \text{VAP} \times 100$$

$$\text{Kymácivost WOB} = \text{VAP} / \text{VCL} \times 100$$

Tyto procentuální hodnoty jsou vyjádřeny jako celá čísla (Mortimer, 1990).



Obrázek 5. Schematické znázornění parametrů motility (Zdroj: WHO, 2010)

Amplituda bočního posunu hlavy (ALH) se vypočte z amplitud bočního posunu hlavičky spermii kolem osy progresu (průměrné dráhy). Různé programy CASA používají buď průměrnou hodnotu (ALH průměr) vypočtenou z nejméně tří měření na různých místech podél trati (manuální analýza), nebo maximální hodnotu (ALH max) všech měření provedených podél trati. Tradičně je měření ALH vyjádřeno jako šířka přes celou stopu (tj. dvojnásobek průměrného nebo maximálního měření) v mikrometrech na jedno desetinné místo. Použitý typ ALH musí být v každé studii uveden (Serres, et al., 1984; Björndahl et al., 2010).

Frekvence křížení (BCF) je počet opakování křížení trajektorie, které vykoná spermie ve směru pohybu za jednotku času (Serres et al, 1984). Vyjadřuje se v hertzích na jedno desetinné místo. Ve skutečnosti je BCF odvozena od frekvence skutečného úderu bičíků a frekvence otáčení (ROF) hlavičky. Ačkoli to nemůže být analyzováno automatizovanými systémy CASA, platí, že ROF je počet opakování točících se hlav spermií o 360° za jednotku času. Např. lidské spermie plují v semenné plazmě obvykle (ale ne vždy) a otáčí se o 180° na vrcholu každé boční vychýlené hlavičky kolem osy progresu. BCF je také užitečná hodnota pro odhad hrubých změn v bičíkatém úderu, ale to může být omezeno počtem pozorování, které mohou být CASA provedeny za sekundu. Pokud existuje více úderů než poloviční počet pořízených snímků za sekundu, je to považováno za nedůvěryhodné (Mortimer et Swan, 1999).

Hyperaktivace je obvykle považována za součást a projev procesu kapacitace, která je vidět u všech studovaných savců. Avšak regulační dráha, která nakonec vede ke zvýšení bičíkových úderů díky vápníkovým iontům spouštěcí hyperaktivaci, může pracovat i nezávisle na kapacitaci (Suarez, 2008).

Hyperaktivace se vyznačuje vysokou amplitudou (spíše v proximální, než distální oblasti Mortimer, 2000) a asymetrickým bičíkovým ohýbáním. Pro posouzení hyperaktivace potřebujeme znát parametry měřených pomocí CASA. Kromě podporování průchodu *zonou pellucida*, hyperaktivace může také usnadnit uvolňování spermií z ovidukálních rezervoárcích krypt v istmu a může pohánět spermie proti hlenu ve vejcovodu (Björndahl et al., 2010). Kinematika hyperaktivovaných spermií je velmi odlišná od spermií v semenné plazmě a od spermií nekapacitovaných (Mortimer, 2000).

3.3 Kryokonzervace

Kryokonzervace je metoda zmrazení a uchovávání buněk a tkání ve speciálním médiu po mnoho let. Pro dosažení velmi nízkých teplot se nejčastěji používá kapalný dusík - 196 °C (Chian, 2010). Pro uchování se používají speciální dvouplášťové kontejnery z oceli, jejichž bezpečné uskladnění vyžaduje speciální místnost a pravidelnou kontrolu (Louda et al., 2001).

Důležitým nástrojem pro distribuci genetického potenciálu samců je zmrazení spermií (Amirat et al., 2004). Prvně byla kryokonzervace spermií využita v umělé inseminaci (AI) zvířat, až pak se teprve mrazili lidské spermie (Shehata et Chian, 2010). Ochrana volně žijících živočichů otevřela cestu k vytvoření genových bank (Wildt et al., 1997) a k prodloužení reprodukčního života již nemocných zvířat jako prostředek zabránění ztrátě důležitých jedinců v genofondu (Saragusty et al., 2006). U domácích zvířat kryokonzervace spermatu umožnila zahájení rozsáhlých šlechtitelských programů (Saragusty et al., 2009).

Kryokonzervace spermií popisuje složitý vícestupňový proces konzervování samčích pohlavních buněk. Tento proces zahrnuje odběr spermatu, ředění a přidání kryoprotektantů, postupné ochlazování, ekvilibraci, mrazení a následné skladování vzorku v kapalném dusíku pro budoucí použití. Zmrazování spermatu se provádí v automatických zmrazovačích, kdy rychlost a průběh zmrazovací křivky je řízen počítačem. Končí rozmrazením spermií a následným použitím v AI (Anger et al., 2003).

Metabolické procesy jsou ovlivněny teplotou. Když teplota klesne, buňky mohou zpomalit nebo zastavit všechny metabolické procesy. Ale při extrémně nízké teplotě může způsobit buněčnou smrt (Chian, 2010). Existuje několik teorií a mechanismů poškození buněk během kryokonzervace, ale žádný přesně nevysvětluje podstatu tohoto jevu (Fahy et al., 2004).

Hlavní **nevýhodou** procesu kryokonzervace je velká ztráta přežitelnosti a funkčnosti spermií, 40 - 50 % životaschopných spermií ztrácí svou integritu nebo funkci během zmrazování a rozmrazování (Holt, 2000). Proces zmrazení vystavuje spermie k tepelnému šoku, což vede k poškození plazmatické membrány a akrozomu (Celeghini et al., 2007). Dále mohou být při zmrazování a rozmrazování poškozeny tyto oddíly spermie jako jsou mitochondrie, axonema a jádro. Chlad, šok, osmotický stres, vznik ledových krystalů nebo

oxidační stres jsou hlavními zdroji poškození spermií během kryokonzervace (Amirat et al., 2004; Li et al., 2005).

Při fyzikálním procesu zmrazování, má voda tendenci krystalizovat v čistou formu. Zatímco rozpuštěné nebo suspendované látky se koncentrují ve zbývající tekutině. V živé buňce je tento proces velmi destruktivní. V procesu poměrně pomalého zmrazení se led nejprve začne tvořit v tekutině obklopující buňky, a koncentrace rozpuštěných látek ve zbylé tekutině se zvyšuje. Koncentrační gradient je usazen přes buněčnou stěnu a voda se pohybuje ven z buňky účinkem osmotických sil. Jak pokračuje zmrazení, buňka se stává relativně dehydratovaná. Soli se mohou soustředit na velmi vysoké úrovni. Dehydratace může mít vliv na celkovou organizaci buňky a na molekulární vazby, z nichž některé jsou závislé na přítomnosti vody v určitých místech (Chian, 2010).

Buněčný stres, v důsledku ztráty vody, může způsobit kontakt s intracelulárními komponenty, které jsou normálně odděleny, aby se zabránilo jakékoli destruktivní interakci. Jak ledové krystaly rostou, mohou být jimi protrženy buněčné membrány. Také mohou být protrženy vysokým koncentračním gradientem na membráně. Aby se zabránilo dehydrataci, musí být učiněna opatření k zastavení separace vody ve formu čistého ledu tak, aby všechna tekutina ztuhla najednou (Chian, 2010).

Oxidační stres vede ke ztrátě pohyblivosti, narušení a otoku akrozomální membrány, nebo zvyšuje propustnost plazmatické membrány spermií. Je dobře známo, že savčí spermie obsahují vysoké koncentrace polynenasycených mastných kyselin. Proto jsou velmi citlivé na oxidační stres, který je zodpovědný za tvorbu reaktivních forem kyslíku (Tuncer et al., 2011).

Plazmatická membrána spermií je drasticky změněna během kryokonzervace. Existuje několik mechanismů, které vedou k poškození spermií při kryokonzervaci. V průběhu procesu ochlazování lipidové složky plazmatické membrány, zejména fosfolipidy a steroly, podstupují reorganizaci, která vede k destabilizaci membrány. Dochází k agregaci dvojvrstvy lipidů, která vede k vytvoření nových spojů mezi lipidy a proteiny. Z tohoto důvodu se fluidita plazmatické membrány při kryokonzervaci snižuje (Hammerstedt et al., 1990).

Další negativní vliv, který působí na plazmatické membrány spermií, je peroxidace membránových lipidů v důsledku tvorby reaktivních forem kyslíku. V důsledku peroxidace membrány spermií dochází k nevratným ztrátám pohyblivosti, poruchám metabolismu,

poškození membrány, úniku intracelulárních enzymů a snížení fertilizačních schopností spermií. Proto se spermie stávají náchylnější k předčasné akrozomální reakci (White, 1993).

Dále jsou ovlivněny funkční proteiny, jako jsou proteiny iontových kanálů, kdy během kryokonzervace dochází ke ztrátám iontů a enzymů. Proto dochází ke snížení pohyblivosti a metabolismu. Kvůli ovlivnění vápníkových kanálů při procesu kryokonzervace se zvyšuje intracelulární hladina vápníku. To vede k velkým ztrátám, poněvadž dochází ke kapacitačním změnám už během kryokonzervace a tyto částečně kapacitované spermie ztrácejí svoji životaschopnost (Bailey et al., 2000).

Proto je účelem protokolů kryokonzervace spermatu, zamezit tvorbě smrtících intracelulárních ledových krystalů, a tím snížit poškození membrány během a po kryokonzervaci (Amirat et al., 2004). Poškození spermií během kryokonzervace může být minimalizováno pomocí optimalizace rychlosti ochlazování (Holt, 2000). V případě, že je teplota snížena na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ v řádu sekund, je možné zabránit tvorbě ledových krystalů, tento moderní proces je znám jako vitifikace (Zachariassen et Kristiansen, 2000).

Cílem kryokonzervace spermií je zachovat jejich životaschopnost a dobrou fertilizační schopnost. Odpovídajícím ředěním vyrobit maximální počet inseminačních dávek (ID), které odpovídají požadavkům úspěšného oplození. Obvyklý požadavek na ID bylů je 10 miliónů aktivních spermií a minimálně 30 % spermií s progresivním pohybem pohybem. Nejrozšířenější metodou dlouhodobé konzervace spermatu je metoda francouzská. Semeno se mrazí a uchovává ve speciálních dutinkách neboli pejetách o objemu 0,25 nebo 0,5 cm³ (Louda et al, 2001).

Ekvilibrace buněčná permeabilita

Změnou extracelulárního osmotického tlaku se vytvoří situace, v níž se buňka pokusí dosáhnout rovnováhy buď přírůstkem, nebo úbytkem vody. Rovnováha je dosažena pouze po určitý čas. Kinetika pohybu vody z buňky je dána fyzickou strukturou membrány. Zmrazování a rozmrazování buněk může vést z hlediska osmotického tlaku k bobtnání a smršťování buněk. Proto je důležité znát toleranci osmotického tlaku každého typu buněk a reakci působení nízkých teplot (Chian, 2010).

Mnoho buněk, zejména eukaryotické buňky, jsou citlivé na osmotický stres. Z tohoto důvodu se prostupující kryoprotektant přidává postupně do zmrazeného roztoku, aby se minimalizoval osmotický stres. To znamená, že buňky potřebují čas, aby dosáhly rovnováhy a přizpůsobily se osmotickému šoku. Různé typy buněk vyžadují různý ekvilibrační čas. Za normálních okolností nižší teploty vyžadují delší dobu ekvilibrace a vyšší teploty potřebují naopak dobu kratší (Chian, 2010).

Protokoly kryokonzervace býčích spermií obvykle zahrnují pomalé chlazení při teplotě 4 - 5 ° C. Při této teplotě se snižuje metabolická aktivita spermií. Doba pro dosažení rovnovážného stavu před mrazením trvá několik hodin (4-18 h) (Muiño et al., 2007). Podle Loudy et al., (2001) ekvilibrace probíhá po dobu 2 – 3 hodin, kdy se může doba ekvilibrace lišit u jednotlivých ředil a býků.

3.3.1 Kryoprotektanty

Účinek kryoprotektantů je popsán tak, že snižují bod tuhnutí a snižují tvorbu ledových krystalů ve vodném roztoku. Kryoprotektanty jsou obvykle rozděleny do dvou velkých tříd na základě jejich schopnosti difundovat přes buněčné membrány. Penetrační kryoprotektanty mají schopnost se pohybovat přes buněčné membrány a nazývají se jako permeabilní. Zatímco ty co nepenetrují přes buněčné membrány, se nazývají nepermeabilní (Chian, 2010).

Dříve se považovalo za příznivé přežití zmrazených buněk i bez ochranného prostředku. Ale zjistilo se, že použitím vhodného ochranného kryoprotektantu se obvykle zvýšila míra přežitelnosti. V literatuře se uvádí, že Polge et al. (1949) jako první prohlásili, že glycerol má kryokonzervační účinky pro zlepšení přežívání buněk po rozmražení. Pokusy prováděli na kuřecích spermiích. Přesto, kryokonzervační vliv glycerolu byl objeven už mnohem dříve, než se uvádí (Keith, 1913).

Polge a jeho kolegové (1949) uchovávali slepičí sperma při - 70 °C a používali ovocný cukr jako kryoprotektant. Když náhodou zjistili, že přidáním glycerolu místo ovocného cukru, více ochrání zmrazené sperma, se od té doby začal používat glycerol jako kryoprotektant. Tato metoda je označována jako klasická a v některých kryokonzervačních zařízeních se používá v podstatě do dnes (Shehata et Chian, 2010).

Objev glycerolu a později dimethylsulfoxidu, který chrání eukaryotické buňky před kryopoškozením, odstartoval moderní kryobiologii. V současné době se v polních podmínkách nejčastěji používá glycerol, dimethylsulfoxid, ethylenglykol, propylenglykol. Kryokonzervační působení každého typu kryokonzervačního činidla musí být podobný. Jelikož hypotézy, které byly navrženy, nevysvětlují mechanismus jejich účinku, je stále nejasné jakou roli v zmrazení vlastně hrají (Chian, 2010).

Zmrazení spermií s glycerolem vedlo k revoluci kryokonzervační techniky a vydláždil cestu pro ukládání vzorků spermií až po několik let. V současné době jsou techniky kryokonzervace spermií různé a každá technika je testována na efekt ochrany spermií před poškozením a na procento živých spermií po rozmrazení. Doposud není žádný zlatý standard kryokonzervačního protokolu, tudíž se všechny techniky neustále hodnotí a optimalizují kvůli lepším výsledkům (Leffler et Walters, 1996).

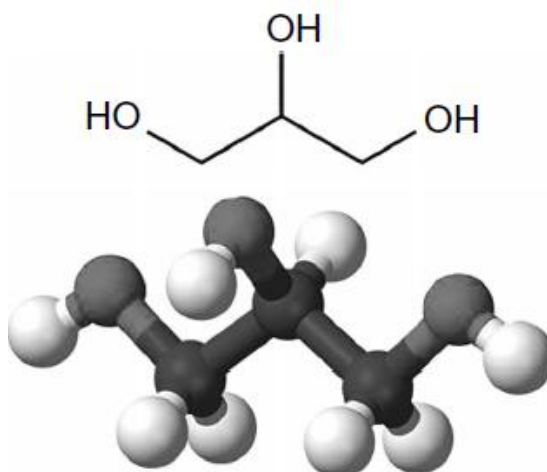
Permeabilní kryoprotektivum

Různé kryoprotektanty se úspěšně používají v *in vitro* fertilizaci (IVF) pro zachování spermií, embryí a vajíček. Úspěch každého typu prostupujícího kryoprotektantu závisí částečně na rychlosti, při které mohou přejít přes buněčné membrány. Tato rychlost je dána různými faktory, jako je například viskozita. Nicméně, propustnost je závislá nejen na kryoprotektantu samotném, ale také na vlastnostech buněčné membrány, které se liší u různých typů buněk (Pedro et al., 2005).

Penetrace kryoprotektantů je obecně nízká u neiontových sloučenin s vysokou rozpustností ve vodě při nízkých teplotách. Doba, kdy mohou tyto chemické sloučeniny difundovat přes buněčné membrány, prostupovat do buňky a ekvilibrovat se v cytoplazmě, nahrazuje většinu intracelulární vody, aniž by v průběhu buňku dehydratovala. Prostupující kryoprotektanty tuhnou při nižších teplotách než voda. Tím se sníží množství tvorby intracelulárního ledu při dané teplotě a snižuje se množství tvorby ledových krystalů uvnitř organel a membrán (Wildt, 2000). Kromě toho se propustnost membrán může lišit u spermií i mezi jednotlivci některých druhů, jako je např. skot a myš (Chaveiro et al., 2006).

Glycerol

Glycerol, také známý jako glycerin, je cukerný alkohol. Je bezbarvý, bez zápachu, viskózní, sladce chutnající kapalina, která je rozpustná ve vodě a má nízkou toxicitu. Každá molekula glycerolu má tři-uhlíkový řetězec, s hydroxylovou skupinou (OH) připojenou ke každému atomu uhlíku (obrázek 1.). Hydroxylová skupina je zodpovědná za vytváření hygroskopických vlastností a látky velmi dobře rozpustné ve vodě. Hygroskopická látka je taková, která přitahuje molekuly vody z okolního prostředí. Mírně se rozpouští v organických rozpouštědlech, jako je ethylacetát a diethylether. Jeho teplota tání je při 18 °C a jeho bod varu je při 290 °C. Glycerol je základním prvkem mnoha lipidů. Je součástí ředidla pro enzymatická činidla skladovaných při teplotách pod 0 °C, protože přítomnost glycerolu deprimuje teplotu tuhnutí roztoku. Glycerol je kompatibilní s ostatními biochemickými materiály v živých buňkách, proto je často používán v konzervaci buněk k snížení tvorbě ledových krystalů (Chian, 2010).



Obrázek 6. Struktura glycerolu (Zdroj: Chian, 2010)

Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid, také známý jako methylsulfoxid, je čirá a bezbarvá kapalina. Centrum síry v dimethylsulfoxidu je nukleofilní k nealkoholickým elektrofilům a kyslík je nukleofilní k pevným elektrofilům. Methylové skupiny jsou poněkud kyselé povahy z důvodu stabilizace výslednice karbanion u S (O) R skupiny, a tak se deprotonuje se silnými bázemi, jako je například lithiumdiisopropylamid a hydrid sodný. Dimethylsulfoxid je důležitý jako

polární aprotické rozpouštědlo, které rozpouští jak polární tak nepochární sloučeniny. Rozpouští různé organické látky, včetně sacharidů, polymerů a peptidů, stejně jako mnoha anorganických solí a plynů. Jeho teplota tání je 18,5 °C a bod varu je 189 °C. Má výraznou penetrační vlastnost. Jeho chuť je podobná česneku. Má nežádoucí účinky, jako jsou žaludeční nevolnost, citlivost na světlo, poruchy vidění a bolest hlavy (Balakin et al., 2006).

Nepermeabilní kryoprotektivum

Nepermeabilní kryoprotektiva jsou obecně polymery s dlouhým řetězcem, příliš velké, aby difundovali do buněk přes buněčnou membránu. Tyto sloučeniny působí tak, že zvyšují osmolaritu extracelulárního prostoru, což vede k buněčné dehydrataci a tím se snižuje možnost tvorby intracelulárních ledových krystalů. Předpokládá se, že některé neprostupující kryoprotektanty mohou být absorbovány na povrch membrány. Tak inhibují tvorbu ledových krystalů v bezprostřední blízkosti buňky tím, že drží led v amorfním stavu. Navíc se často používají v médiích pro rozmrazování buněk, aby se zabránilo osmotickému šoku. Osmotický šok popisuje jev, ke kterému dochází, když je osmotický tlak v intracelulárním prostoru větší než v extracelulárním prostoru, v důsledku toho dochází k buněčné dehydrataci (Swain et al., 2010).

Cukry

Neprostupujícími kryoprotektanty jsou běžně mono, oligo a polysacharidy. Monosacharidy se rozpustí v roztoku snadněji než disacharidy. Protože jsou monosacharidy náchylnější ke glykosylaci, která má za následek proteinové interakce, proto se v mnoha kryokonzervačních protokolech používají di a polysacharidy. Je důležité si uvědomit, že různé cukry poskytují různou úroveň ochrany během kryokonzervace (Fernandez - Santos et al., 2007).

Toxicita kryoprotektantů

Toxicita kryoprotektantů se týká alespoň dvou efektů. Prvním je chemická reakce s buňkami před kryokonzervací a druhá je chemicky způsobená změnami osmózy roztoku při zmražení. V kryobiologii se používají relativně nízké koncentrace kryoprotektantů a proto samotné chemikálie nemusí být velkým problémem z hlediska toxicity. Ale pozor, koncentrace kryoprotektantů v rychlém mražení může být relativně vysoká. Pro posouzení toxicity kryoprotektantů je nutné zvážit koligativní vlastnosti roztoku (i při zmražení), které mohou být závislé na jeho buněčné propustnosti pro každý kryoprotektant. To může způsobovat osmotický stres v buňkách před zmrazením a po rozmrazení. Prostupující rychlost kryoprotektantů souvisí přímo v závislosti na teplotě. V důsledku toho hlavními faktory, které je třeba zvážit při hodnocení toxicity kryoprotektantů, jsou jejich koncentrace, expoziční teplota, a uplynulý čas ve vodném roztoku během zmrazení (Chian, 2010).

Kryoprotektanty mohou na sebe vzájemně působit ve směsích, nebo s klíčovými molekulami buněk, čímž se vytváří jiné než ty, které by se vyskytovali s individuálními kryoprotektantními účinky. Zda toxicita kryoprotektantů může být snížena, nebo ne, smícháním dvou nebo více kryoprotektantů (v systému, kde je snížena koncentrace každého kryoprotektantu) ve vodném roztoku musí být dále zkoumána (Chian, 2010). Amann et Pickett (1987) se domnívají, že začleněním kryoprotektantů do ředidel může snížit několik forem buněčných lézí, způsobené zmrazováním a rozmrazováním.

Zmrazování a rozmrazování spermií je složitý proces, který způsobuje několik forem buněčných lézí. Tyto léze mohou být sníženy začleněním kryoprotektantů do ředidel (Amann et Pickett, 1987). Nicméně, všechny konvenční kryoprotektanty vykazují toxicitu, zejména glycerol. To vedlo k výzkumu najít jiné molekuly, které jsou méně toxické pro buňky. Je prokázáno, že vystavením nízkých teplot některé rostliny, jako je kukuřice, nebo zvířata se hromadí aminokyseliny, které jsou schopny přežít při teplotách pod bodem mrazu. Tyto aminokyseliny (glutamin) hrají roli v prevenci strukturálních lézí buněk během procesu zmrazování a rozmrazování (Amirat - Briand et al., 2009).

3.4 Ředidla pro kryokonzervaci spermií

Ředění ejakulátu přispívá k přežití spermií mimo organismus. Ředění musí být zahájeno do 15 minut po odběru. Teplota ředidla i ředěného ejakulátu musí být stejná ± 1 °C. Ředidlo se vždy přidává do ejakulátu postupně za stálého míchání. Používané sklo musí být sterilní a předeřáté. Nesmí být toxické, musí být sterilní a ekonomicky dostupné (Louda et al., 2001).

Ředidla zvyšují objem ejakulátu a chrání ho před negativními faktory během a po kryokonzervaci. Ředidla chrání spermie proti šoku z chladu a zabraňují aglutinaci spermií, udržují stabilní hodnotu pH a osmotického tlaku (Pileckas et al., 2014).

Semenná plazma chrání spermie před poškozením během kryokonzervace poněkud v omezené míře. V důsledku toho byla vyvinuta celá řada ředidel na základě pH pufrů (Tris-kyselina citrónová, HEPES); nízkomolekulárních sacharidů (fruktóza, glukóza); membránu chránící činidla (vaječný žloutek, odtučněné mléko, glykoproteiny); kryoprotektiv (glycerol a jiné polyalkoholy, DMSO, aminokyseliny) (Aisen et al., 2000). Dále by mělo obsahovat dostatečné množství solí, k vyrovnání osmolarity před zmrazením a vyhnout se i vysoké koncentraci solí, aby se zabránilo poškození buněk (Courtens et Re'ty 2001).

Bezžloutková ředidla neobsahují produkty živočišného původu, eliminují tak riziko zavlečení infekčních agens spojená s použitím mléka nebo vaječného žloutku (Nöthling et al., 2007). Používají se komerční ředidla jako AndroMed® a Bioxcell®, která jsou na bázi sojového lecitinu. Jsou to sterilní, chemicky definované koncentráty. Podle výrobců obsahují fosfolipidy, TRIS, kyselinu citrónovou, sacharidy, antioxidanty, pufrů, čistou vodu, glycerol, a antibiotika (tylosin, gentamicin, spektinomycin, a linkomycinu) a pro dlouhodobou konzervaci se uchovávají při teplotě -20 °C (Khalifa et al., 2013).

Dříve se především používalo pro kryokonzervaci spermatu homogenizované plnotučné, čerstvé nebo rekonstituované odstředěné mléko, nebo kokosové mléko (Celeghini et al., 2007). Nyní jsou nejpoužívanějším ředidlem v inseminačních stanicích býků **ředidla žloutková**. Nejčastěji se používá slepičí žloutek, zřejmě kvůli jeho snadné dostupnosti (Bathgate et al., 2006; Andrabi et al., 2008).

3.4.1 Vaječný žloutek

Jako první ředidlo býčího spermátu s příznivým účinkem při nízkoteplotním skladování se používá **slepičí vaječný žloutek**. Vaječný žloutek pomáhá spermii odolat chladovému šoku ve spojení s dalšími komponenty (Bogart et Mayer, 1950). Přesný mechanismus, kterým vaječný žloutek zachovává býčí spermie celistvé při zmrazování a rozmrazování je zatím neznámý (Bathgate et al., 2006). Nyní se komerčně používá jako Triladyl® obsahující Tris, kyselinu citrónovou, sacharidy, glycerol, pufrý a směs antibiotik v souladu s evropskými předpisy 88/407/EHS (Tylosin, Gentamicin, Spektinomycin, Linkomicin), nebo jemu podobný BULLXcell™. Tyto ředidla neobsahují žádnou látku živočišného původu před přidáním vaječného žloutku. Optidyl® obsahuje ionizovaný vaječný žloutek. Tyto ředidla jsou celkem oblíbená, bez ohledu na skutečnost, že v důsledku přídavku čerstvého vaječného žloutku, mají proměnlivé složení. Jejich použití bylo podporováno, a to díky vynikající ochraně, kterou zajišťují býčím spermii (Amirat et al., 2004).

Na rozdíl od savců, embrya ptáků nejsou vyživována matkou během jejich vývoje a nemají možnost odstranění metabolického odpadu. V důsledku toho, vaječný žloutek poskytuje důležité živiny (bílkoviny, lipidy, vitamíny a minerální látky), které jsou velmi dobře metabolizovány v kuřecím embryu. Vaječný žloutek je také velmi atraktivním zdrojem živin pro člověka: jeho koeficient trávení je srovnatelný s mlékem, a biologické hodnoty bílkovin ve vejci jsou dokonce lepší než u mléčných proteinů (Bourgeois - Adragna 1994).

Každá složka žloutku má zvláštní fyzikální a chemické charakteristiky odpovědné za své vlastní funkční vlastnosti. Vaječný žloutek může ovlivnit a regulovat funkční vlastnosti jako je pH, iontová síla, zahřívání, zmrazení a sušení. Dále žloutek obsahuje mnoho složek nezbytných pro život. Proto žloutek představuje významný zdroj účinných látek použitelných v lékařství, farmacii, kosmetice, potravinových doplňků a biotechnologickém průmyslu. Zvláště přispívá k vytváření a stabilitě těchto emulzí při tvorbě mezifázového filmu mezi olejem a vodou. Přesto se žloutek stále používá empiricky. Fyzikální vlastnosti žloutkových emulzí nejsou zcela kontrolovány, protože žloutek je složitá směs více lipoproteinů a proteinů, které nejsou dobře pochopeny (Anton et al., 2003).

Složení žloutku

Lipidy žloutku, které jsou výlučně spojeny s lipoproteiny, se skládají z 62 % z triglyceridů, z 33 % z fosfolipidů, a méně než z 5 % z cholesterolu. Karotenoidy představují méně než 1 % z lipidů žloutku a dávají mu jeho barvu. Proteiny jsou přítomny jako volné proteiny nebo apoproteiny (zahrnuté do lipoproteinů). Interakce mezi lipidy a proteiny vedou k tvorbě lipoproteinů s nízkou a vysokou hustotou, které představují hlavní složky žloutku. Na základě jeho sušiny je žloutek tvořen pěti hlavními složkami. Mezi ně patří 68 % lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), 16 % lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL), 10 % globulárních proteinů, 4 % fosfoproteinů a 2% menší proteiny (Huopalahti et al., 2007).

Cholesterol je sterol obsažený ve vaječném žloutku. Vyplývá to jednak ze slepičího krmiva a částečně ze syntézy v játrech při zpracování lipoproteinů. To představuje přibližně 5 % celkových lipidů ve volné (85 - 90 %), nebo v esterifikované formě (10 – 15 %). Bez cholesterolu se podílí na struktuře LDL. Estery cholesterolu jsou přítomny v lipidovém jádře LDL a obsahují 35% kyseliny olejové, 33 % kyseliny palmitové, 12 % kyseliny linolové a 11 % kyseliny stearové (Kuksis, 1992).

Žloutek je komplexní systém několika částic v suspenzi v jasně žluté tekutině, která obsahuje proteiny. Hlavními druhy částic jsou kuličky, profily, a granule. Kuličky jsou menší komponenty (1 % ze sušiny žloutku) a mají průměr mezi 4 - 150 μm . Objevují se jako zhutněné kapičky lipidů a lipoproteinů. Profily jsou kulaté částice o průměru 12 - 48 nm a jsou považovány za lipoproteiny s nízkou hustotou. Granule spočívají v kruhových komplexech v rozmezí o průměru od 0,3 - 2 μm . V důsledku toho, žloutek lze snadno rozdělit na dvě frakce po zředění (dvakrát) s 0,3 M NaCl a odstředěním při 10000 g (30 min) v závislosti na způsobu. Tmavě oranžový supernatant je označován jako plazma a světlé granule jsou zvané jako separační. Ředěný žloutek pomáhá snižovat jeho viskozitu, což umožňuje pohyb a oddělování částic (Huopalahti et al., 2007).

Granule představují 19 až 23 % z celkové sušiny žloutku, což představuje asi 50 % bílkovin a 7 % lipidů v žloutku. Obsah sušiny granulí je 44 %, a obsahují asi 64 % bílkovin, 31 % tuků a 5 % popela (Anton et Gandemer, 1997). Lipidy granulí tvoří 60% triglyceridů, 35 % fosfolipidů a 5 % cholesterolu. Jsou tvořeny hlavně HDL (70 %) a fosvitinem (16 %) (Saari et al., 1964).

Žloutky různých druhů ptáků

Ředidla obsahující žloutek z vajec různých druhů ptáků jiných než domácích slepic vedlo k vyšší motilitě a lepší přežitelnosti spermií u kance, osela nebo hřebce. Vaječný žloutek kachny, křepelky nebo slepice obsahuje různé komponenty mastných kyselin, fosfolipidů a cholesterolu (Trimeche et al., 1997).

Kachní vaječný žloutek má více mononenasycených mastných kyselin, než slepičí vaječný žloutek, který má zas více mononenasycených mastných kyselin, než křepelčí vaječný žloutek (Bathgate et al., 2006). Křepelčí žloutek obsahuje více fosfatidylcholinu a méně fosfatidylethanolaminu, a méně polynenasycených a nasycených mastných kyselin než slepičí vaječný žloutek (Trimeche et al., 1997). Tyto chemické rozdíly mohou vysvětlit rozdíly v motilitě a integritě spermií po zmrazení v ředidlech obsahující různé ptačí žloutky (Bathgate et al., 2006).

Trimeche et al., (1997) zjistili lepší ochranu zmrazených spermií osla v ředidle obsahující křepelčí vaječný žloutek ve srovnání se slepičím žloutkem. Kryokonzervace spermatu hřebce s kachním žloutkem také mělo lepší výsledky, především ve vyšším zastoupení spermií s progresivním pohybem. Náhrada slepičího žloutku zlepšila celkovou pohyblivost, především progresivní pohyb spermií v rozmraženém spermatu hřebce. Nicméně, kachní ani křepelčí žloutek neposkytl lepší ochranu u kančích spermií během kryokonzervace než slepičí žloutek (Bathgate et al., 2006).

Následující experimenty Lei et al. (2008) porovnávali kryokonzervační účinky 20% vaječného žloutku různých druhů ptáků (slepice, husa, kachna, křepelka a holub) v ředidlech pro býčí spermie. Jejich výsledky ukazují, že holubí žloutek má lepší kryokonzervační účinky na býčí spermie oproti ostatním ptačím žloutkům během procesu zmrazování a rozmrazování. Býčí spermie v ředidlu s holubími žloutky měly lepší progresivní motilitu i lepší přežitelnost. Tyto výsledky naznačují, že by do budoucna mohl být holubí žloutek dobrou náhradou slepičího žloutku. Ale ještě nebyl proveden inseminační test po kryokonzervaci. Proto je zapotřebí další studie k objasnění různých složek ptačích žloutků (Li et al., 2005).

Vaječný žloutek má tři hlavní nevýhody. Je součástí živočišného původu a představuje potenciální riziko kontaminace ID bakteriemi. Taková kontaminace je možným zdrojem endotoxinů schopné poškodit potenciál plodnosti spermií. Dále je vaječný žloutek nepraktický, protože není možné ho ihned použít, ale nejprve musí uživatel vejce ručně rozbít a pečlivě izolovat žloutek a odstranit stopy bílku, což chce zručnost a je to časově náročné. Vaječný žloutek je nepraktický taky tím, že obsahuje granulovaný materiál o stejné velikosti a tvaru jako spermie. A za třetí je vaječný žloutek velmi složitý produkt, jehož složení může být velmi variabilní a může se lišit mezi šaržemi. Jeho lipidové složení se může měnit i s dietou slepic. Navíc žloutek mohou obsahovat složky, které mají prospěšné, jakož i škodlivé účinky na spermie (Pillet et al., 2011).

Přítomnost některých látek ve žloutku inhibují dýchání spermií nebo snižují jejich motilitu, proto se zvyšují nároky nahradit celý žloutek od kryokonzervační frakce. Z těchto důvodů, mnoho odborníků čeká na ředidlo s definovaným složením. Alespoň omezit rizika výše uvedené a udržet ochranu spermií na vysoké úrovni. Velice perspektivní je například nízkodenzitní lipoprotein, dále jen LDL (Pace et Graham, 1974). Pozitivní výsledky LDL byly potvrzeny mnoha výzkumníky a schopnost LDL jak chrání spermie během kryokonzervace je stále intenzivně zkoumáno (Demianowicz et Strezek 1996; Moussa et al., 2002, Amirat et al., 2004).

3.4.2 Nízkodenzitní lipoprotein (LDL - low density lipoprotein)

Nízkodenzitní lipoprotein LDL je hlavní složkou široce používaného vaječného žloutku. Protože dnešní technologie umožňuje snadné a přiměřeně bezpečné extrakce, zahájili Amirat et al. (2005) sérii pokusů získat lepší znalosti o událostech v průběhu konzervace spermií a vymyslet vyhovující ředidlo s definovaným složením. Začlenění LDL do ředidel býčího spermatu dává lepší výsledky motility v porovnání s ředidly obsahující vaječný žloutek (Moussa et al, 2002; Amirat et al, 2004; Vera Munoz et al, 2009).

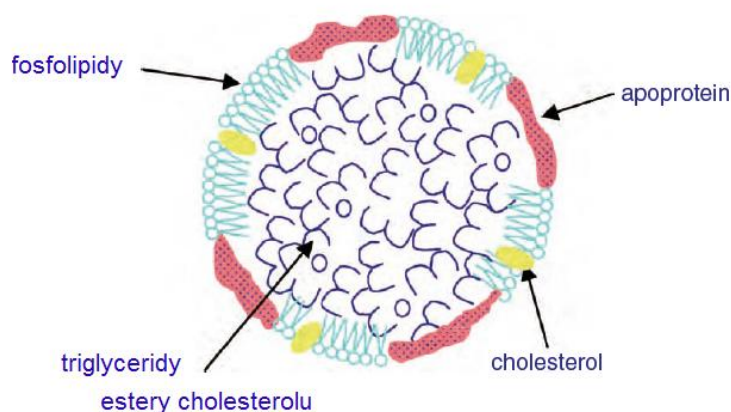
LDL obsažený ve vaječném žloutku je z velké části zodpovědný za ochranu spermií v průběhu kryokonzervace (Pace et Graham, 1974). První hypotéza navrhuje, že LDL poskytuje ochranu spermií stabilizací membrány. Druhá hypotéza naznačuje, že fosfolipidy přítomné v

LDL chrání spermie tak, že tvoří ochranný film na povrchu spermií, nebo nahradí membránové fosfolipidy, které jsou ztraceny nebo poškozeny během procesu kryokonzervace. Třetím hypotetickým mechanismem ochrany je navázání LDL na škodlivé bílkoviny přítomné v býčí seminenné plazmě a tak se zlepší mrazící schopnost spermií (Manjunath et al, 2002).

LDL struktura

Nízkodenzitní lipoprotein je hlavní složkou žloutku, tvoří ho asi dvě třetiny z celkové žloutkové sušiny. Nachází se hlavně v plazmě, ale malý podíl je zahrnut i v granulích (LDLg). LDL žloutku je velice podobný LDL kuřecí krve, který je syntetizovaný v játrech nosnice. Je transportován krví do vaječníku, kde je převeden do žloutku bez větších změn ve struktuře a složení (Huopalahti et al., 2007).

LDL tvoří asi 2/3 lipidů přítomných v slepičím žloutku. LDL je sférická částice (17 - 60 nm v průměru, s průměrem asi 35 nm) s lipidovým jádrem v kapalném stavu (triglyceridy a estery cholesterolu), obklopen monofilmem z fosfolipidů a proteinů (Obr. 8). LDL je rozpustný ve vodném roztoku (bez ohledu na pH a iontové podmínky) v důsledku jeho nízké hustoty (0,982). Fosfolipidy jsou neodmyslitelnou součástí ve stabilitě struktury LDL, protože asociační síly jsou v podstatě hydrofobní. Některé cholesteroly jsou obsaženy ve fosfolipidovém filmu a zvyšují jeho tuhost (Burley, 1975).



Obrázek 7. Schematické znázornění vaječného žloutku (Zdroj: Huopalahti et al., 2007)

LDL je složen z bílkovin (11 – 17 %) a lipidů (83 – 89 %; 74 % neutrální lipidy a 26% fosfolipidy). Jejich populace se skládá ze dvou podskupin a to z LDL1 (10×10^6 Da) a LDL2 (3×10^6 Da). LDL1 představují 20 % celkového LDL a obsahují dvojnásobné množství proteinů než LDL2 (Huopalahti et al., 2007). Chemické složení obou frakcí LDL jsou podobné, ale proporce mezi apoproteiny a změnami lipidů a velikostí se zvyšuje s obsahem lipidů. Z funkčního hlediska se ukázalo, že LDL je hlavním přispěvatelem emulgačních vlastností vaječného žloutku. Tato schopnost je jednoznačně způsobena strukturou LDL, interakcí mezi amfifilními apoproteiny a fosfolipidy. Tato sestava z fosfolipidů a apoproteinů umožňuje transport těchto nerozpustných amfifilních částic prostřednictvím vodné fáze. Mezifázové filmy LDL jsou tvořeny směsí apoproteinů a fosfolipidů, které zajišťují jak snížení mezifázového napětí tak odolnost proti roztržení. Je tedy dovolena tvorba a stabilita potravinářských emulzí vyrobených ze žloutku (Anton et al., 2003).

Struktura LDL je citlivá na technologické procedury (Anton et al., 2003). Pokud se LDL zahřívá po dobu 10 minut při teplotě 75 °C, denaturuje. Wakamatu et al. (1982) tvrdí, že LDL tvoří během zmrazování a rozmrazování gel kvůli změně interakce mezi fosfolipidy a apoproteiny na jejich povrchu. Uvolněním apoproteinů LDL agreguje a vytvoří gel (Huopalahti et al., 2007).

LDL v ředidlech

Škodlivé účinky žloutku na buněčné struktury byly neočekávané. Po mnoho let byl vaječný žloutek prohlašovaný, že je vynikajícím ředidlem pro býčí sperma (Bogart et Mayer 1950). Provedlo se mnoho pokusů, aby se zjistilo, která složka ve vaječném žloutku poskytuje spermiím ochranu v průběhu procesu zmrazování a rozmrazování s cílem připravit chemicky definované ředidlo. Pace a Graham (1974) pomocí ultracentrifugace vyčistili žloutek a získali frakci LDL. LDL extrakty mají mít funkce ochranné, zatímco HDL je považováno za toxické (Courstens et Re'ty 2001).

Ve zmrazeném stavu organická část ředidla, většinou LDL, nevytváří dostatečné vrstvy k ochraně spermií před kontaktem s velkými ledovými krystaly. Větší vrstvy by mohly být pravděpodobně získány s ředidlem, které obsahuje více LDL. Předchozí studie (Moussa a kol. 2002) toto vyvracejí, protože zjistili významný pokles pohyblivosti spermatu při použití LDL ve vysoké koncentraci v ředidlu.

Demianowicz et Strezek (1996) potvrdili, že LDL má kryokonzervací účinky. Moussa et al. (2002) získali lepší výsledky z hlediska motility a pohybových vlastností spermií při výměně celého vaječného žloutku 8 % LDL. Amirat et al. (2010) se domnívají, že použitím extrahovaného LDL v býčím ředidle zlepší motilitu spermií, jejich životaschopnost a integritu membrány a DNA, a také zlepší oplozovací schopnost spermií v *in vivo* podmínkách. Objev antikryokonzervačních faktorů a nekonzistentního složení LDL v celém vaječném žloutku zvýšil zájem využití vyčištěného LDL v kryokonzervaci býčích spermií (Akhter et al., 2008).

Ve studii Amirat et al., (2005) je LDL mnohem méně agresivní pro spermie inkubovaných až po dobu 4 h, po dobu kompatibilní s většinou klasických protokolů mrazení. Žádné změny na plazmatických membránách nebyly pozorované, ale na akrozomech velmi málo změn sledovaných bylo. Pouze 7 % spermií vylilo obsah akrosomu po 4 hodinách inkubace. To mohlo odpovídat odumřelým spermii, které začly autolyzovat. Avšak pozorování byla provedena ve větších pejetách, než se používají v polních podmínkách. Tudíž se domnívají, že dochází k rozdílům v přenosu tepla v malých a velkých pejetách. Proto je možné, že relativní frakce čistých ledových krystalů a okolní vrstvy ředidla se liší v různých velikostech pejet (Amirat et al., 2005).

Většina studií uvádí výsledky účinku LDL na pohyblivost býčích spermií, ale ne na hodnocení oplozovací schopnosti spermatu po zmrazení s LDL. Fertilizační schopnost spermií po kryokonzervaci je důležitým faktorem míry zabřeznutí u skotu po AI (De Leeuw et al., 1993). Kromě toho, žádná korelace mezi motilitou a plodností spermatu savců zatím nebyla stanovena (Stalhammar et al., 1994). V důsledku toho je míra motility spermií nedostatečným prediktorem oplodnění *in vitro* a *in vivo* u mnoha druhů (Comizzoli et al., 2001). Parametry jako oplodnění *in vitro*, hypoosmotický test (HOS), test na integritu akrosomu, by mohly být spojeny s výsledky motility (Amirat et al., 2004). Aby bylo možné rozšířit používání tohoto nového LDL ředidla do inseminačních stanic, je nezbytné provést další studie fertility. Plodnost může být buď zhodnocena v laboratoři pomocí testů *in vitro* nebo AI. Tyto testy poskytují nejspolehlivější způsob hodnocení fertilizace spermatu po zmrazování a rozmrazování (Larsson et Rodriguez - Martinez, 2000).

4 Materiál a metodika

V rámci experimentů byla používána ředidla **Triladyl®** (Minitube, Germany) a **BULLXcell™** (IMV technologies France) vyrobená v souladu s pokyny výrobce před ředěním ejakulátu a jeho kryokonzervací.

LDL bylo vyrobeno dle Moussa et al. (2002), výroba v Biopharm a. s. (Jílové u Prahy). Poté bylo LDL konzervováno v Hena s.r.o., odkud bylo odebíráno po dialýze konzervačních látek.

Všechno vybavení, které přišlo do kontaktu s ejakulátem, bylo temperováno na teplotu 37 ± 1 °C.

4.1 Příprava ředidel

Příprava ředidel probíhala v laboratoři inseminační stanice býků (ISB) v Hradištku pod Medníkem Natural, spol. s r. o. dle návodů jednotlivých výrobců v den odběru.

Před samotným ředěním se ředidla zahřála na teplotu 38 ± 1 °C.

Triladyl®

K přípravě ředidla potřebujeme koncentrovaný Triladyl, redestilovanou vodu a vaječný žloutek v poměru 1 : 3 : 1. Koncentrovaný Triladyl (250 g) se rozpustil v redestilované vodě (750 ml) a do ředidla se nakonec přidal čerstvý vaječný žloutek (250 g) ze známých zdrojů.

BULLXcell™

K přípravě ředidla potřebujeme koncentrovaný BULLXcell, redestilovanou vodu a vaječný žloutek v poměru 1 : 3 : 1. Láhev s ředidlem je uváděna do oběhu jako koncentrát o objemu 250 ml a připraví se z něj konečný roztok o objemu 1 250 ml. Koncentrovaný BULLXcell™ (250 ml) se vložil do vodní lázně při teplotě 32 - 34 °C po dobu 10 minut. Erlenmeyerova baňka se naplnila redestilovanou vodou (750 ml) a nechala se temperovat ve vodní lázni při teplotě 32 - 34 °C po dobu 10 minut. Celý obsah láhve BULLXcell™ se nalil do Erlenmeyerovy baňky a přidalo se 250g vaječného žloutku.

Příprava vaječného žloutku

Vaječný žloutek byl získán se tak, že se ručně rozbil a oddělil bílek od žloutku. Pomocí filtračního papíru se odstranila chaláza a skalpelem se rozrušila vitelinní membrána a žloutková plazma se sbírala v kádince.

Příprava LDL

Jako první se oddělil vaječný žloutek od bílku. Ručně pomocí filtračního papíru se odstranil endosperm a chalázy prostřednictvím skalpelu byla rozrušena vitelinní membrána. Samotné žloutky se shromáždily v kádince při teplotě 4 °C. Tímto způsobem získaný vaječný žloutek se zředil 0,17 M roztokem chloridu sodného a mísil se 1 h při teplotě 4 °C. Následovala centrifugace 10 000x g po dobu 45 minut při teplotě 4 °C za účelem odstranění žloutkových granulí. Po odstranění supernatantu se postup opakoval.

Do 100 ml žloutkové plazmy byl přidán síran amonný (0,5 g), aby se ze žloutku vyloučil livetin a míchalo se to po dobu 1 hodiny při 8,7 pH a teplotě 4 °C. Díky centrifugaci při 10 000x g / 45 min se livetin oddělil. Získal se supernatant bohatý na LDL, který byl dialyzován dalších 10 h za účelem eliminace síranu amonného a koagulace LDL. Na konci této dialýzy se směs centrifugovala 10 000x g / 45 min. Výsledný sediment reprezentuje LDL s čistotou nejméně 97 %, který se skladuje při teplotě 4 °C.

4.2 Příprava inseminačních dávek

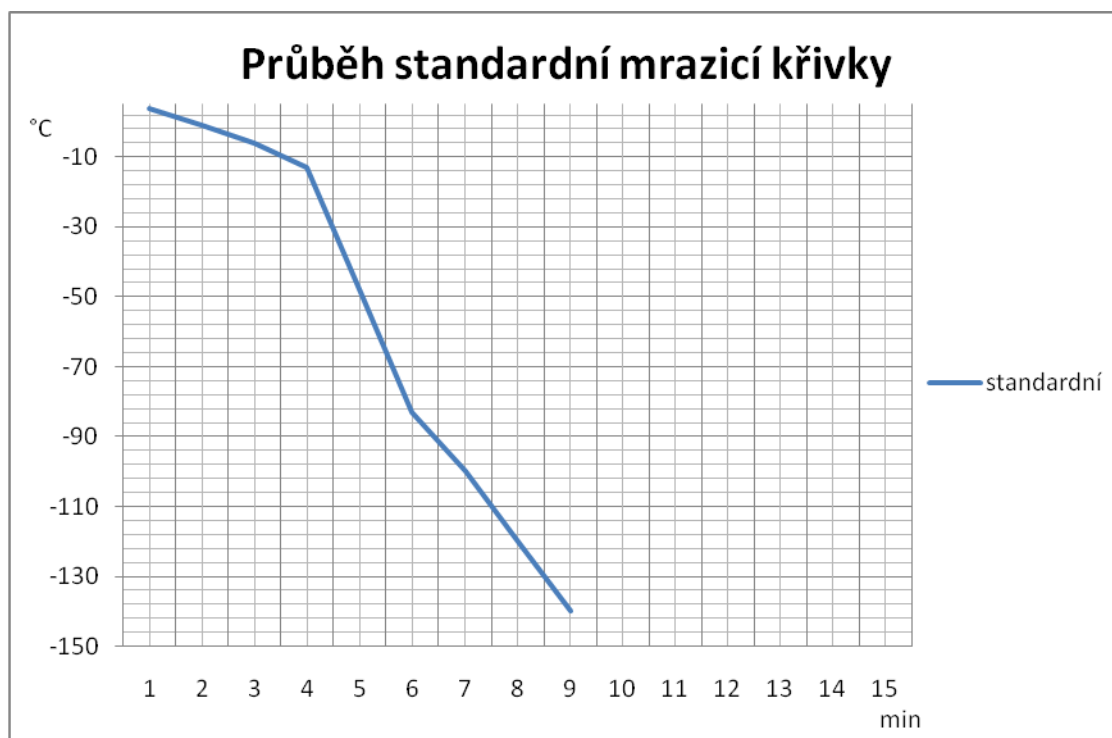
Ejakulát byl získán v prostorách ISB Hradištko pod Medníkem Natural, spol. s r. o. ve čtyřech experimentálních dnech, od 8 býků různých plemen (Hoštýn a ČESTR) a věku standardním způsobem do umělé vagíny. Odebraný ejakulát musel projít standardním hodnocením laborantkou na ISB a splňovat parametry nativního ejakulátu (objem, koncentrace a pohyblivost spermií). Pokud je nespĺňoval, nebyl tento ejakulát do experimentu použit. Vzorky s aktivitou vyšší než 70 % a s koncentrací vyšší než $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^3$ byly následně naředěny jedním z ředidel (Triladyl® - Minitube, Germany, nebo BULLXcell™ - IMV technologies France) s různou koncentrací izolovaného LDL v množství z celkového objemu ředidla (6 %, 8 % a 10 %). Standardní složení ředidel sloužilo jako kontrola.

Naředěný ejakulát se nechal po dobu 10 minut promíchávat na oscilačním stolku. Takto připravené sperma se automatizovaně plnilo do předem připravených pejet o objemu 0,25 ml a poté se ihned zchladil na 4 °C. Pejety se nechaly ekvilibrovat 2 hodiny při teplotě 4

°C. Následovalo zmrazení standardní mrazicí křivkou pro býčí ejakulát, které bylo řízeno počítačem ze 4 °C na - 140 °C. Poté byly pejety vloženy do kontejneru s tekutým dusíkem pro dlouhodobé uchování při teplotě - 196 °C.

Tabulka 2. Průběh standardní mrazicí křivky (ISB Hradištko).

Charakteristika mrazicí křivky	STANDARD	
	Teplota °C	Rychlost °C / min
	4	15
1. fáze	- 10	5
2. fáze	- 100	35
3. fáze	- 140	20
Délka mrazení	7 minut 22 sekund	



4.3 Experimenty

Experimenty proběhly na KVD v Laboratoři analýzy obrazu.

Experiment 1 – hodnocení parametrů motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermií (CASA)

V experimentu byly použity kryokonzervované inseminační dávky, které byly vyrobeny standardními postupy v inseminační stanici v Hradištku pod Medníkem Natural s.r.o. za použití ředidel: **Triladyl®** (Minitube, Germany) a **BULLXcell™** (IMV technologies France).

ID byly rozmrazeny ve vodní lázni (SUB6, Grant) 37 °C po dobu 30 s. Následně byly přidány do mikrozkuhavky typu Eppendorf s a pomalu byl přidáván vytemperovaný fyziologický roztok (500 µl). Po 5 minutovém temperování v 37 °C (nutný pro disperzi spermií) byly odebrány automatickou pipetou (Brand, Tranferpette®) 3 µl vzorku a následně byly hodnoceny mikroskopické parametry motility spermií v kalibrované počítači komůrce Leja® (Products B. V., Nizozemsko) o hloubce 20 µm v 6 daných oblastech na jeden vzorek, které byly algoritmicky zpracovány pomocí CASA. Vzorky byly hodnoceny po rozmrazení a po 2 hodinové inkubaci, kdy následovala homogenizace vzorku a znovu se odebral vzorek o objemu 3 µl a pokračovalo se v hodnocení vzorku.

Pohyblivost spermií byla hodnocena modulem CASA (NIS Elements Ar 3. 2.), pomocí monochromatické kamery (DMK 23UM021, IMAGINGSOURCE®, Německo, snímá frekvencí 60 snímků za sekundu) a stereo mikroskopem Nikon (Eclipse E600, Nikon Corporation, Japonsko) s vyhřívanou deskou (Tokai Hit MATS - U505S, Getner optics). Byly hodnoceny všechny parametry motility, pro samotné hodnocení byly použity parametry motility VCL, VAP, VSL a LIN, STR a WOB (µm / s).

Experiment 2 – hodnocení parametrů přežitelnosti spermií metodou fluorescenčního barvení

Cílem druhého experimentu bylo zhodnotit viabilitu spermií metodou fluorescenčního barvení dle Harrison et Vickers (1990).

Pro přípravu fluorochromů byly potřebné tyto: 5(6) karboxyfluorescein diacetát (CFDA, C-8166, SIGMA-ALDRICH[®]), dimethylsulfoxid (DMSO, D-5879, SIGMA-ALDRICH[®]), propidium jodid (PI, P-4170 SIGMA-ALDRICH[®]) a roztok 0,3 % formaldehydu s fyziologickým roztokem. Připravené roztoky se musely uchovávat za nepřístupu světla a při teplotě - 20 °C.

CFDA se připravil tak, že se rozpustil v DMSO v poměru 0,46 mg CFDA / ml DMSO. PI se rozpustil ve fyziologickém roztoku (pH býk 6,8) v poměru 500 µg PI / ml fyziologického roztoku.

Příprava:	Rozpustí v:	V poměru:
CFDA	DMSO	0,46 mg CFDA / ml DMSO
PI	Fyziol. roztok (pH 6,8)	500 µg PI / ml fyziol. roztok

Před samotným experimentem se roztoky nechaly rozmrazit v inkubátoru (Incucell 55, BMT Medical Technology s. r. o.). Poté byly důkladně homogenizovány vortexem a podle protokolu se napipetovaly na dno mikroskopické kumavky typu Eppendorf (0,5 ml). Postup protokolu byl následující:

- 2,1 µl roztoku CFDA + 2,1 µl roztoku PI + 1 µl 0,3 % formaldehydu

Připravené eppendorfky se vložily do inkubátoru 37 °C a poté se do nich pipetovalo 100 µl suspenze spermií (o koncentraci $10^6 - 10^7$ sp./ml), Eppendorfky se lehce homogenizovaly a nechaly se inkubovat po dobu 10 minut v inkubátoru při 37 °C bez přístupu světla. Stejný proces se opakoval po dvouhodinové inkubaci.

Po inkubaci byl vzorek homogenizován a napipetovalo se 8 µl suspenze na podložní sklíčko. Na tuto kapku se přiložilo krycí sklíčko a fixovalo se lakem na nehty. Podložní sklíčko se nechalo zaschnout v temnu pod krytem a po zaschnutí následovalo samotné

vyhodnocení v temné místnosti pod mikroskopem pomocí fluorescenčního filtru. Hodnotilo se 200 spermií na sklíčko (každému ejakulátu se hodnotily 3 vzorky).

Spermie emitující zelenou fluorescenci zobrazují živé spermie, oproti tomu červená fluorescence zobrazuje mrtvou spermii. Pokud spermie emituje zelenočerveně, jedná se o umírající spermii s nenarušeným akrozomem a intaktní plasmatickou membránou. Výsledek se vyjádřil jako procentuální podíl jednotlivých kategorií spermií.

Podíl živých mrtvých spermií byl hodnocen stereo mikroskopem značky Nikon (Eclipse E600, Nikon Corporation, Japonsko) s rtuťovou výbojkou (C-SHG1, Nikon corp.) a lampou (LH-M100C-1, Nikon corp.). Pro hodnocení se používalo zvětšení 400x a filtr G-2A a B-2A.

4.4 Statistická analýza dat

Z výstupu počítačové analýzy spermatu (CASA) byla data přenesena do programu MS Excel, která byla utříděna a zkontrolována pro svou úplnost. Statistická analýza byla zpracována pomocí programu Statistika 12, metodou vícefaktorové analýzy rozptylu ANOVA s Schéffeho post-hoc testem. Jako kontinuální závislé proměnné byly hodnoceny hodnoty VSL, VCL a VAP a LIN STR a WOB v závislosti na faktoriálních nezávislých proměnných inkubace (v hodině 0 a 2) a ředidlu (Triladyl® a BULLXcell™ s rozdílnou koncentrací LDL). Analýza probíhala na hladině významnosti $p < 10^{-6}$.

Pro viabilitu a pohyblivé spermie se data utřídila v MS Excel, v kterém byly také vytvořeny grafy. Statistická významnost se zjišťovala v programu Statistika metodou testů rozdílů mezi dvěma poměry.

Design experimentu

Úkolem předkládané práce bylo zjistit vliv koncentrace LDL přidaného k těmto dvěma ředidlům na parametry motility spermií, na vliv životaschopnosti spermií po nulté a dvou hodinové inkubaci. LDL bylo k ředidlům přidáváno v koncentracích 6 %, 8 % a 10%. Vždy byl použit kontrolní vzorek ředidla bez přidaného LDL.

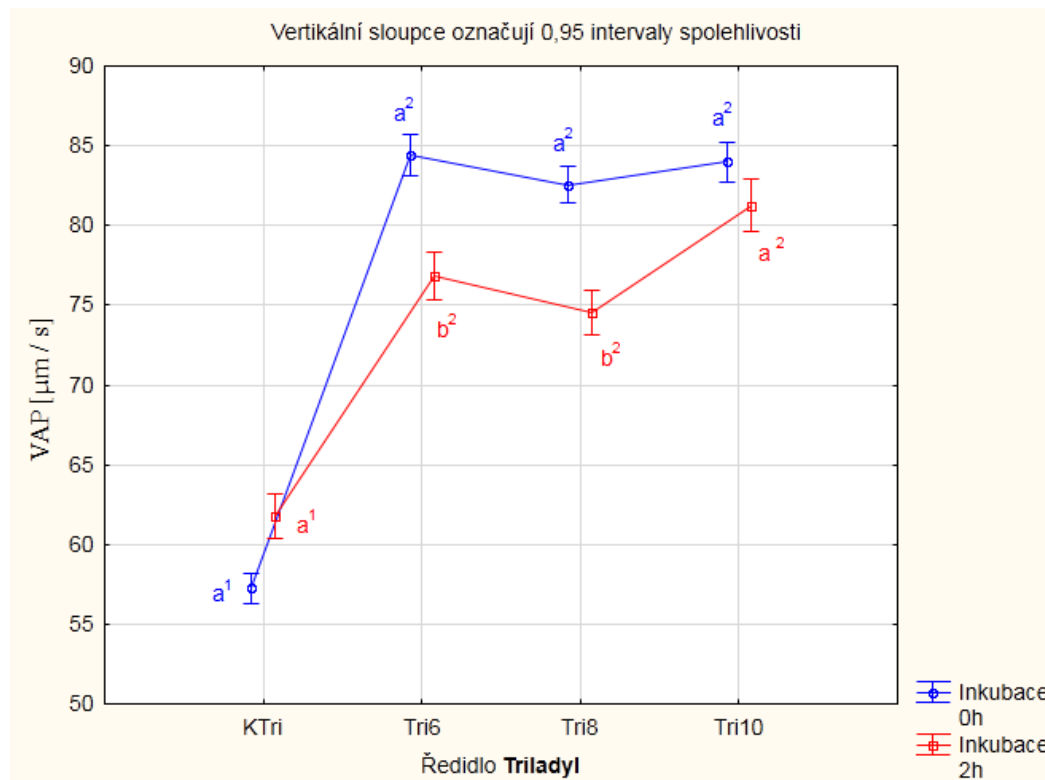
5 Výsledky

5.1 Experiment 1 – hodnocení parametrů motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermií (CASA)

Triladyl®

Výsledky parametrů motility u rozmrazených ID ředěných v Triladylu® dokumentují grafy č. 1. – 5. Rychlost spermií v případě parametru VAP v grafu č. 1 byla u všech koncentrací oproti kontrole vyšší a statisticky odlišná. Ve všech koncentracích 6, 8 a 10 % nebyly od sebe rychlosti statisticky rozdílné. Toto platilo i po dvouhodinové inkubaci. Ale co se týče celkové inkubace byl statisticky významný rozdíl v rychlostech mezi počáteční a dvouhodinovou inkubací pouze u vzorku s koncentrací LDL 6 % a 8 %.

Graf 1. Ředidlo Triladyl® - rychlost spermií na průměrné dráze (VAP) v závislosti na délce inkubace po rozmrazení a % přidaného LDL. KTri – ředidlo s 0 % LDL, Tri6 – ředidlo s 6 % LDL, Tri8 – ředidlo s 8 % LDL, Tri10 – ředidlo s 10 % LDL.

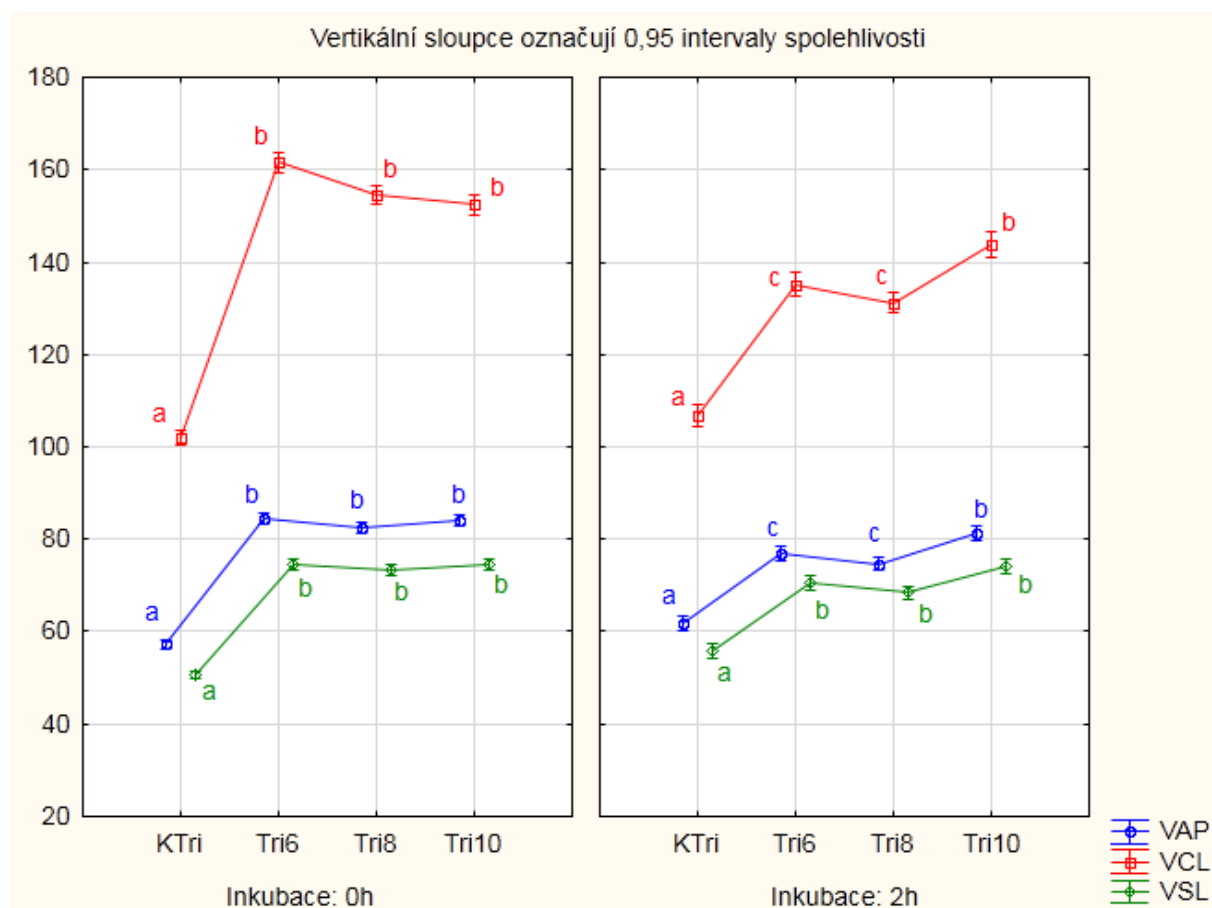


^{1,2}Hodnoty označené stejným indexem se v daném čase neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

^{a,b} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

Rychlosti parametrů VAP, VCL a VSL byly výrazně nižší u kontrol se statisticky významným rozdílem, po 2 hodinové inkubaci parametr VCL vykazoval nejvyšší rychlost u 10 %, jinak trendy parametrů jsou si velice podobné viz graf č. 2. Po dvouhodinové inkubaci u parametrů VAP a VCL u kontrol a 10 % koncentrace k významnému rozdílu rychlosti nedocházelo a také parametr VSL nevykazoval v žádné koncentraci statisticky výrazný pokles rychlosti. Zatímco u parametru VAP v 6 % a 8 % koncentraci, u parametru VCL 6 % a 8 % koncentraci docházelo ke statisticky významnému snížení rychlosti.

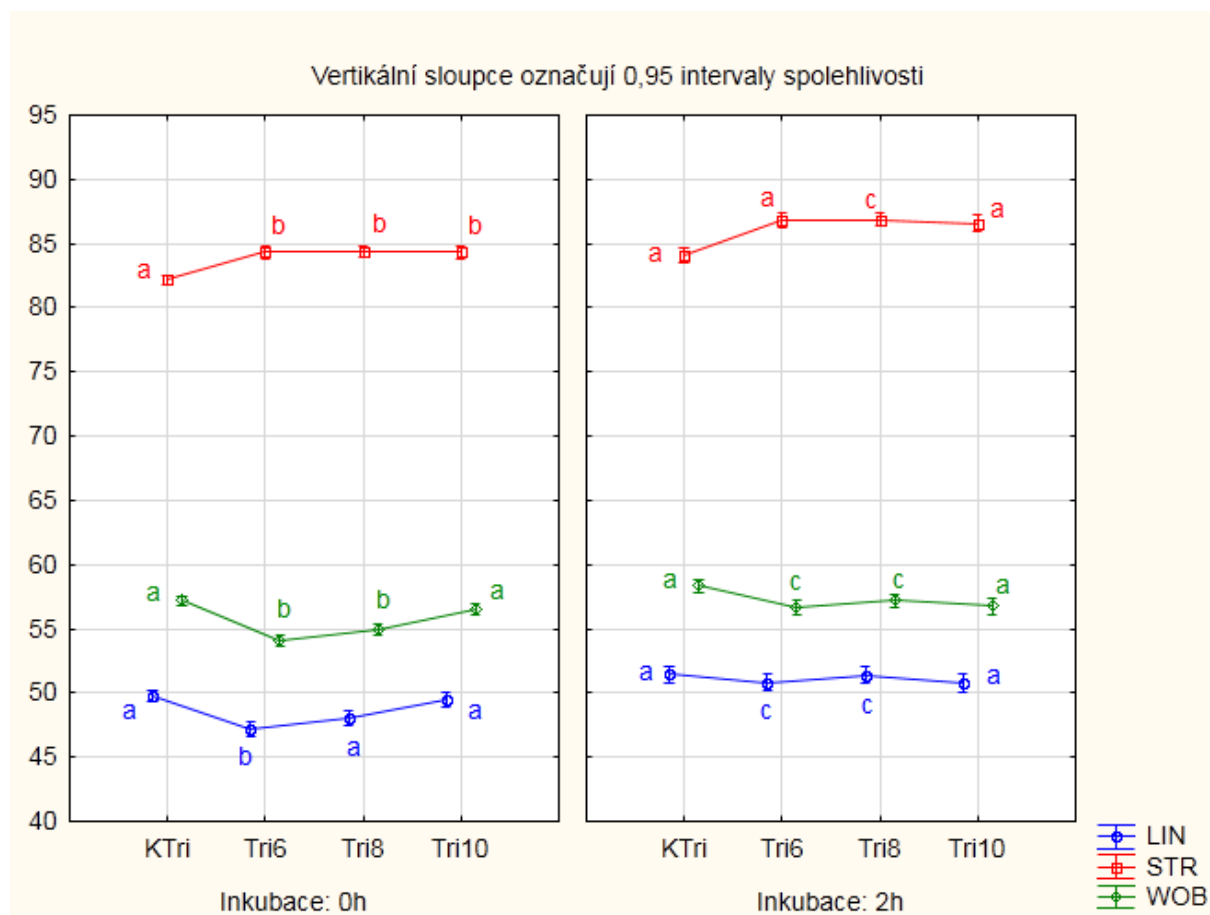
Graf 2. Ředidlo Triladyl® – vztah mezi hodnotami VAP, VCL a VSL [v $\mu\text{m} / \text{s}$] v čase 0 a 2 hodiny. KTri – ředidlo s 0 % LDL, Tri6 – ředidlo s 6 % LDL, Tri8 – ředidlo s 8 % LDL, Tri10 – ředidlo s 10 % LDL.



^{a,b} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

U parametrů LIN a WOB vyšla kontrola lépe než u koncentrací s významným statistickým rozdílem. Oproti tomu parametru STR vyšla kontrola hůře než u koncentrací. Po 2 hodinové inkubaci, až na parametr STR v 8 % koncentraci, nebyl mezi kontrolou a koncentracemi žádný statistický rozdíl. U parametru LIN v 6 % a 8 % koncentrace, u parametru STR u 8 % koncentrace a u parametru WOB 6 % a 8 % koncentrace docházelo ke statisticky významnému zvýšení rychlosti. Parametry mají také značně podobný trend.

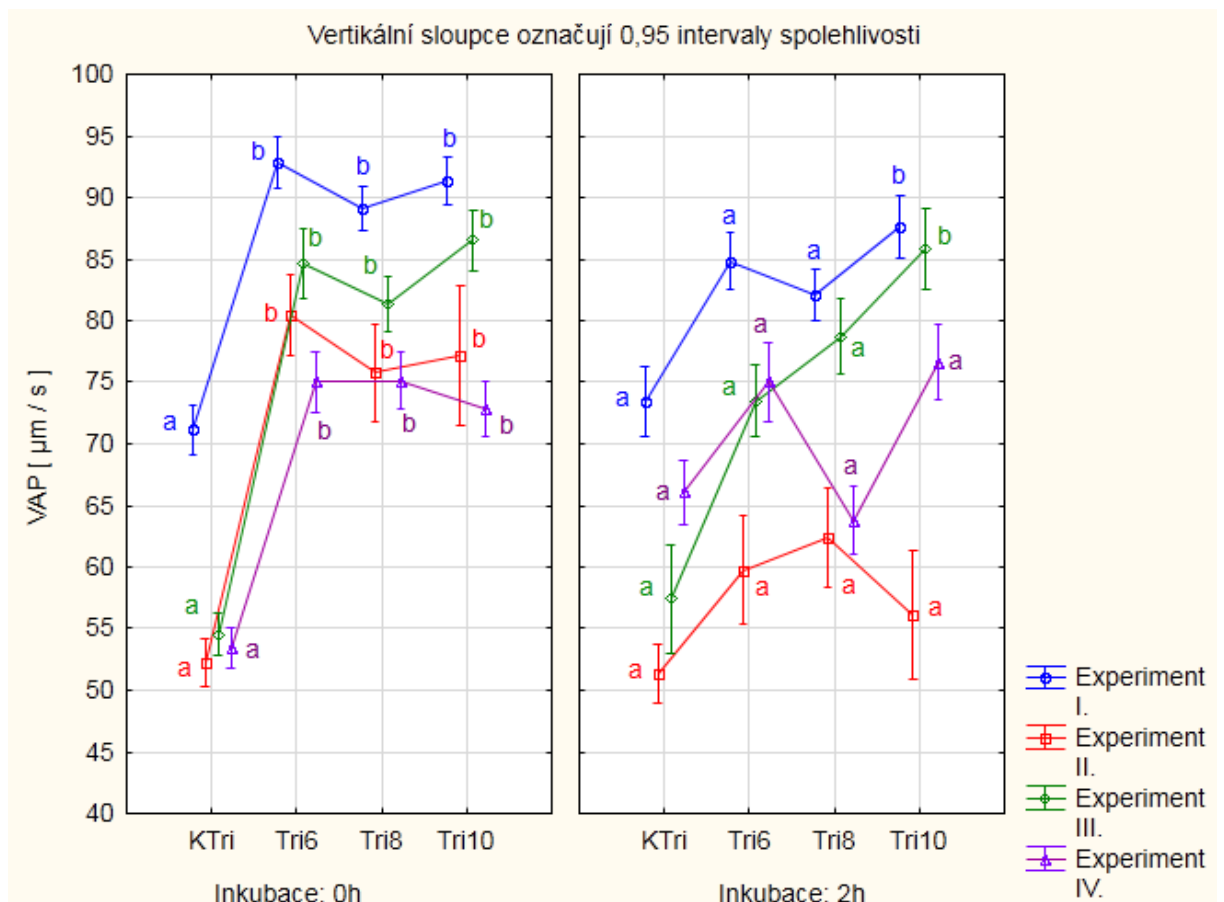
Graf 3. Ředidlo Triladyl® – vztah mezi hodnotami LIN, STR a WOB [%] v čase 0 a 2 hodiny. KTri – ředidlo s 0 % LDL, Tri6 – ředidlo s 6 % LDL, Tri8 – ředidlo s 8 % LDL, Tri10 – ředidlo s 10 % LDL.



^{a,b} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

Na grafu č. 4. je vidět variabilita parametru VAP mezi jednotlivými experimentálními dny. V porovnání s kontrolami jsou všechny koncentrace signifikantně odlišné. V počáteční inkubaci byla statisticky nejrychlejší rychlost u experimentu I. oproti dalším experimentům. Tudíž měl experiment I. i nejrychlejší koncentrace s LDL. Statisticky významný největší pokles rychlosti v koncentracích byl mezi experimentem I. a IV. Po dvouhodinové inkubaci si opět vedl nejlépe experiment číslo I., ale největší a statisticky významný pokles rychlosti byl tentokrát s experimentem číslo II. Po 2 hodinové inkubaci však k statistickým rozdílům u většiny experimentů nedocházelo kromě experimentu III. u 10 % koncentrace. V rámci inkubace experimenty neměly statisticky významný pokles rychlosti.

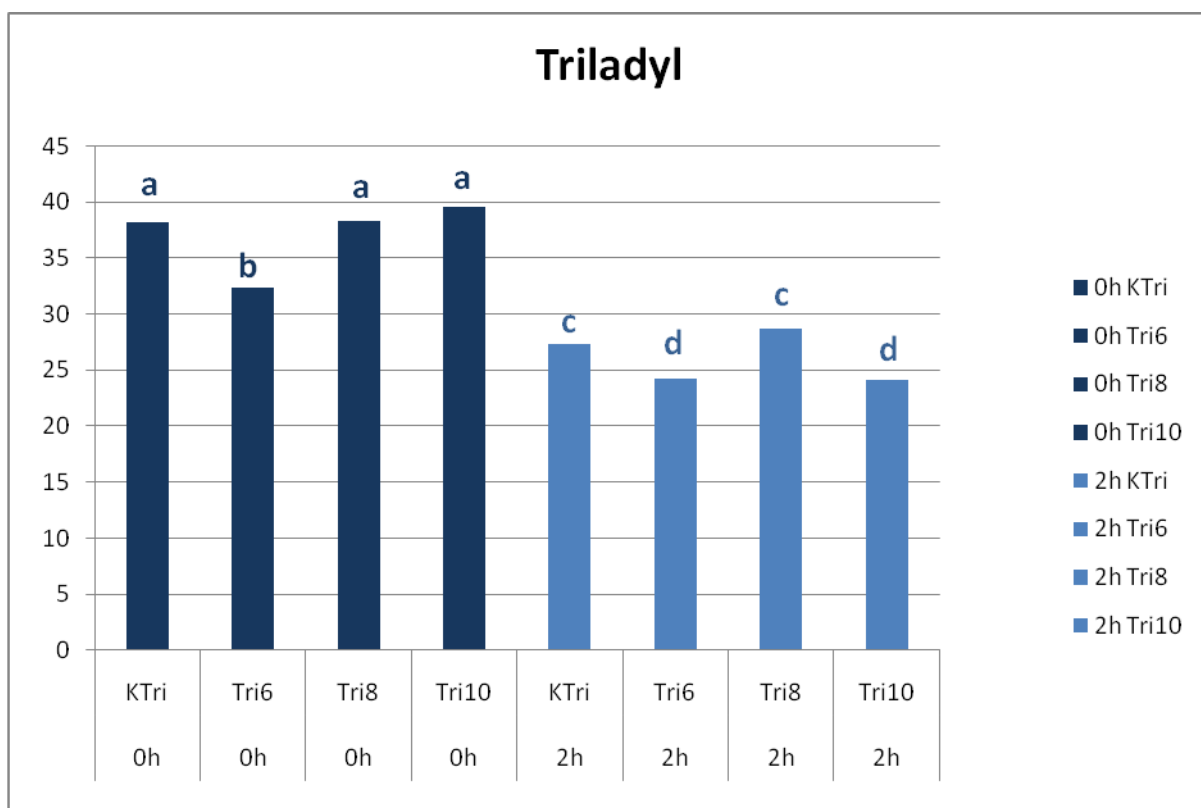
Graf 4. Ředidlo Triladyl® - rychlost spermií na průměrné dráze (VAP) v jednotlivých odběrových dnech v čase 0 a 2 hodiny. KTri – ředidlo S 0 % LDL, Tri6 – ředidlo s 6 % LDL, Tri8 – ředidlo s 8 % LDL, Tri10 – ředidlo s 10 % LDL.



^{a,b} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

Podíl pohyblivých spermií viz. graf č. 5. vykazoval u vzorku s 6 % koncentrací nejméně pohyblivé spermie, jak v počáteční a dvouhodinové inkubaci. Počet pohyblivých spermií se po 2 hodinové inkubaci snížil nejvíce u 10 % ředidla. V počáteční inkubaci byl statisticky významný rozdíl u 6 % koncentrace mezi kontrolou, 8 % a 10 % koncentrací. Mezi vzorky kontroly, 8 % a 10 % koncentrace statisticky významný rozdíl nebyl. Kdežto po dvouhodinové inkubaci byl statisticky významný rozdíl mezi kontrolou s 6 % a 10 % koncentrací, a mezi 8 % koncentrací s 6 % a 10 % koncentrací. U vzorků mezi kontrolou a 8 % koncentrací a mezi 6 % a 10 % koncentrací po dvouhodinové inkubaci nebyl statisticky významný rozdíl. Po 2 hodinové inkubaci se u všech ředidel se statistickým podstatným rozdílem snížil počet pohyblivých spermií.

Graf 5. Ředidlo Triladyl® - procentuální zastoupení pohyblivých spermií v čase 0 a 2 hodiny. KTri – ředidlo s 0 % LDL, Tri6 – ředidlo s 6 % LDL, Tri8 – ředidlo s 8 % LDL, Tri10 – ředidlo s 10 % LDL.

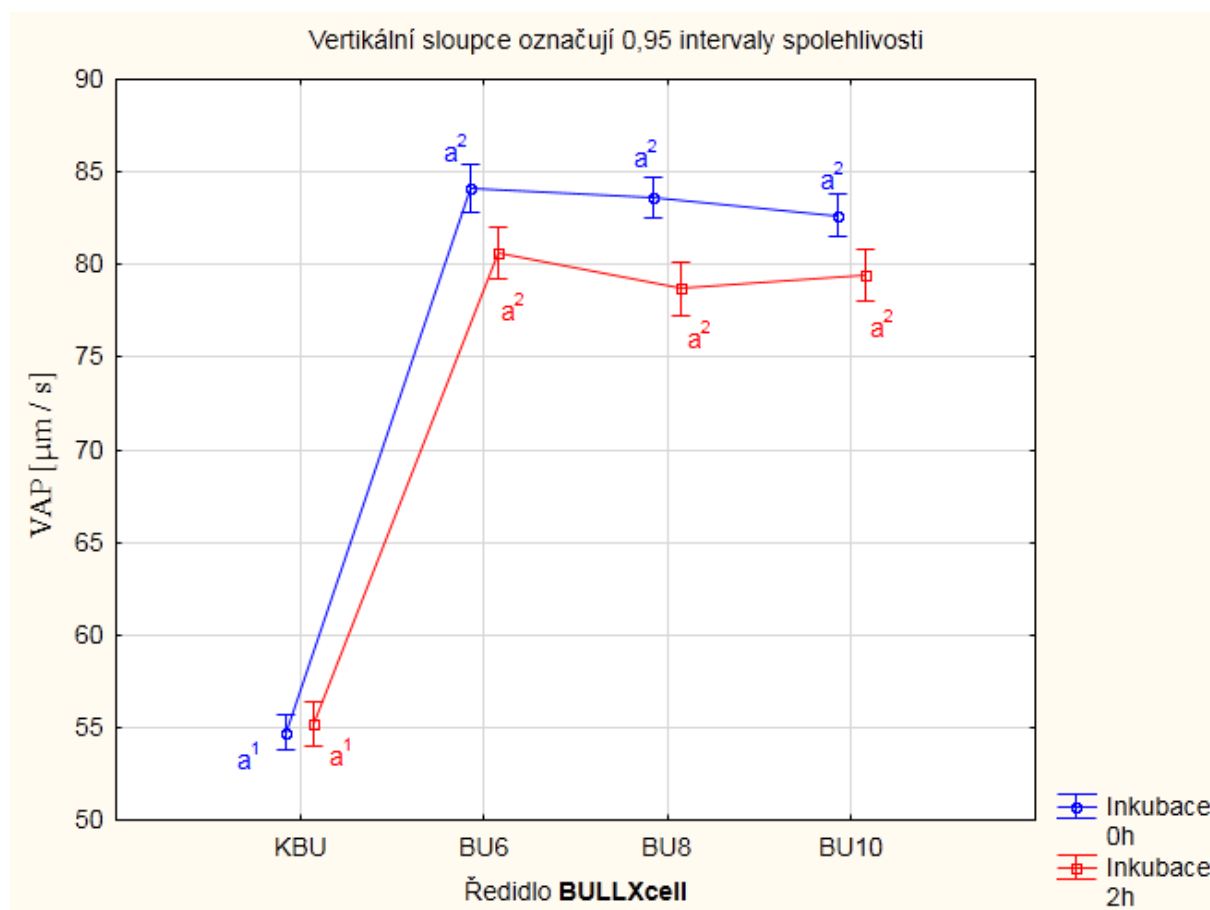


^{a,b,c,d} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

BULLXcell™

Výsledky parametrů motility u rozmrazených ID ředěných v BULLXcell™ dokumentují grafy č. 6. – 10. V případě parametru VAP z grafu č. 6. byla rychlost spermií u všech koncentrací oproti kontrole vyšší a statisticky rozdílná. Koncentrace ředidel mezi sebou nebyly v rychlosti statisticky rozdílné ani po dvouhodinové inkubaci. Co se týče celkové inkubace nebyl statisticky významný rozdíl v jednotlivých ředidlech. Modifikované ředidlo s LDL vykazovalo lepší rychlost spermií nežli kontrola.

Graf 6. Ředidlo BULLXcell™ - rychlost spermií na průměrné dráze (VAP) v závislosti na délce inkubace po rozmrazení a % přidaného LDL.. KBU – ředidlo s 0 % LDL, BU6 – ředidlo s 6 % LDL, BU8 – ředidlo s 8 % LDL, BU10 – ředidlo s 10 % LDL.



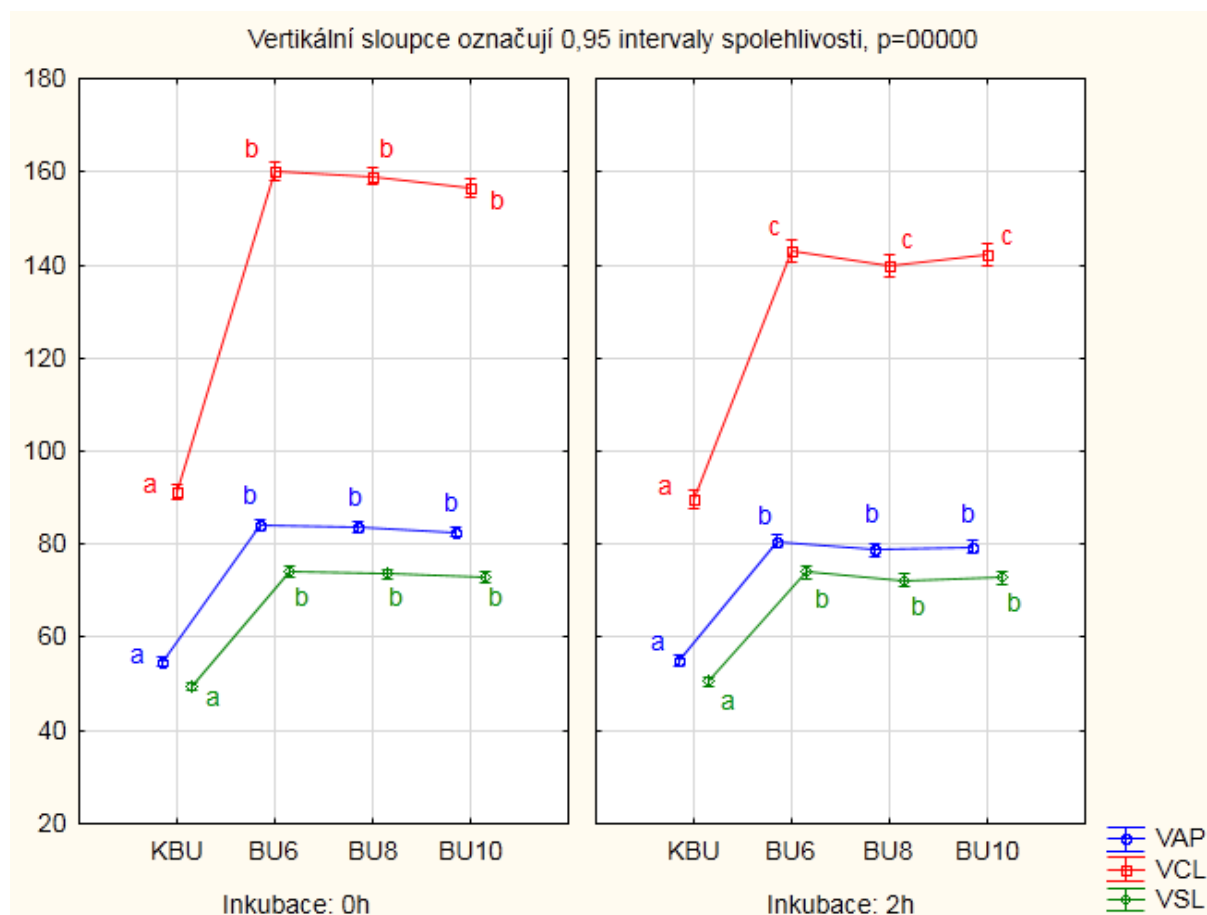
^{1,2}Hodnoty označené stejným indexem se v daném čase neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

^{a,b} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

Rychlosti parametrů VAP, VCL a VSL byly výrazně nižší u kontrol a rozdíl byl statisticky významný i po dvouhodinové inkubaci, proto si jsou trendy velmi podobné viz graf č. 7. U parametrů VAP a VSL nedocházelo k významnému poklesu rychlosti po dvouhodinové inkubaci u kontrol ani u koncentrací. Parametr VCL vykazoval po dvouhodinové inkubaci statisticky průkazný rozdíl snížení rychlosti u všech koncentrací.

Graf 7. Ředidlo BULLXcell™ - vztah mezi hodnotami VAP, VCL a VSL [μm / s]

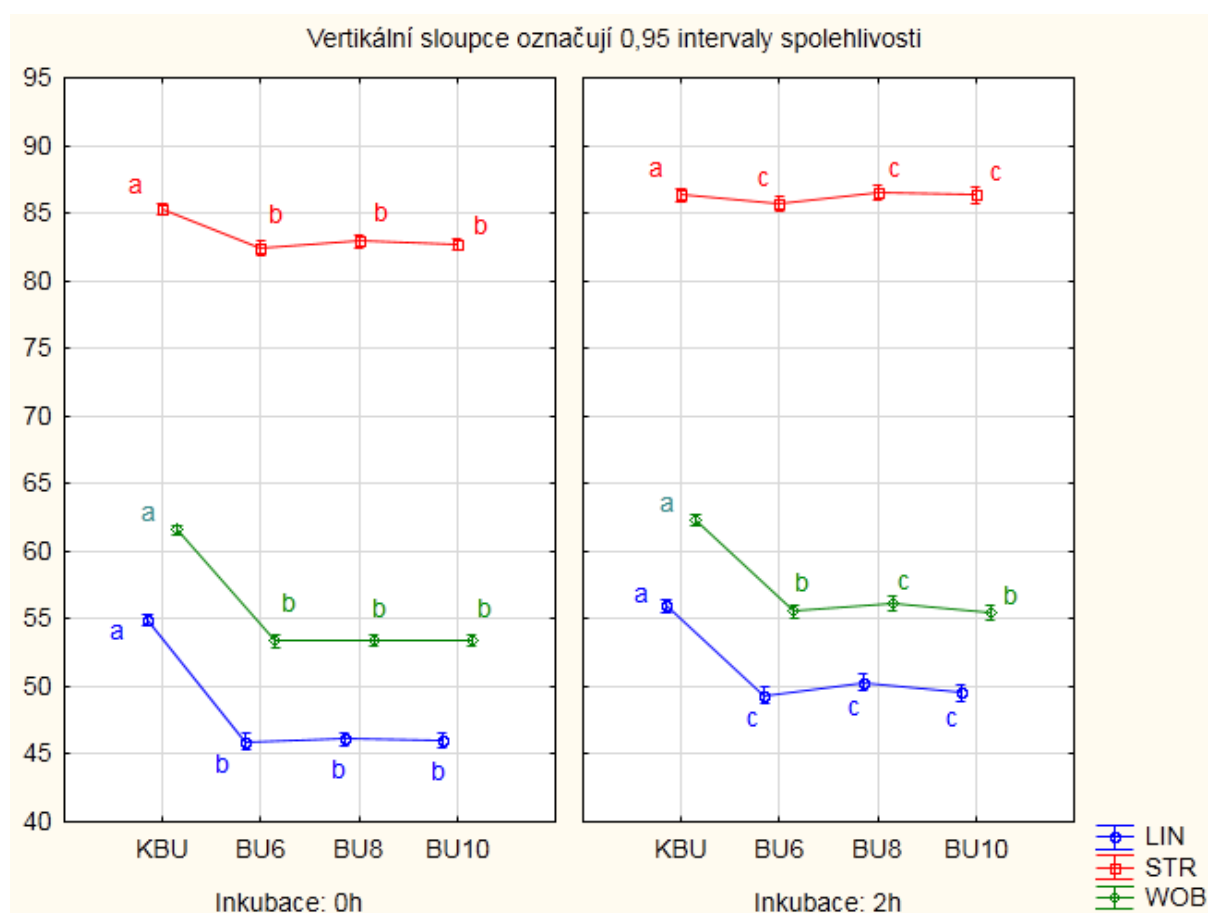
v čase 0 a 2 hodiny. KBU – ředidlo s 0 % LDL, BU6 – ředidlo s 6 % LDL, BU8 – ředidlo s 8 % LDL, BU10 – ředidlo s 10 % LDL.



^{a,b,c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

Parametry LIN, STR a WOB měly vyšší trend kontrol oproti koncentrací s významným statistickým rozdílem, pouze u parametru STR po druhé inkubaci mezi kontrolou a koncentracemi nebyl statisticky výrazný rozdíl. Ke statisticky významnému zvýšení hodnot po dvouhodinové inkubaci docházelo u parametru LIN a STR v 6, 8 a 10 % koncentraci a u parametru WOB v 8 % koncentraci.

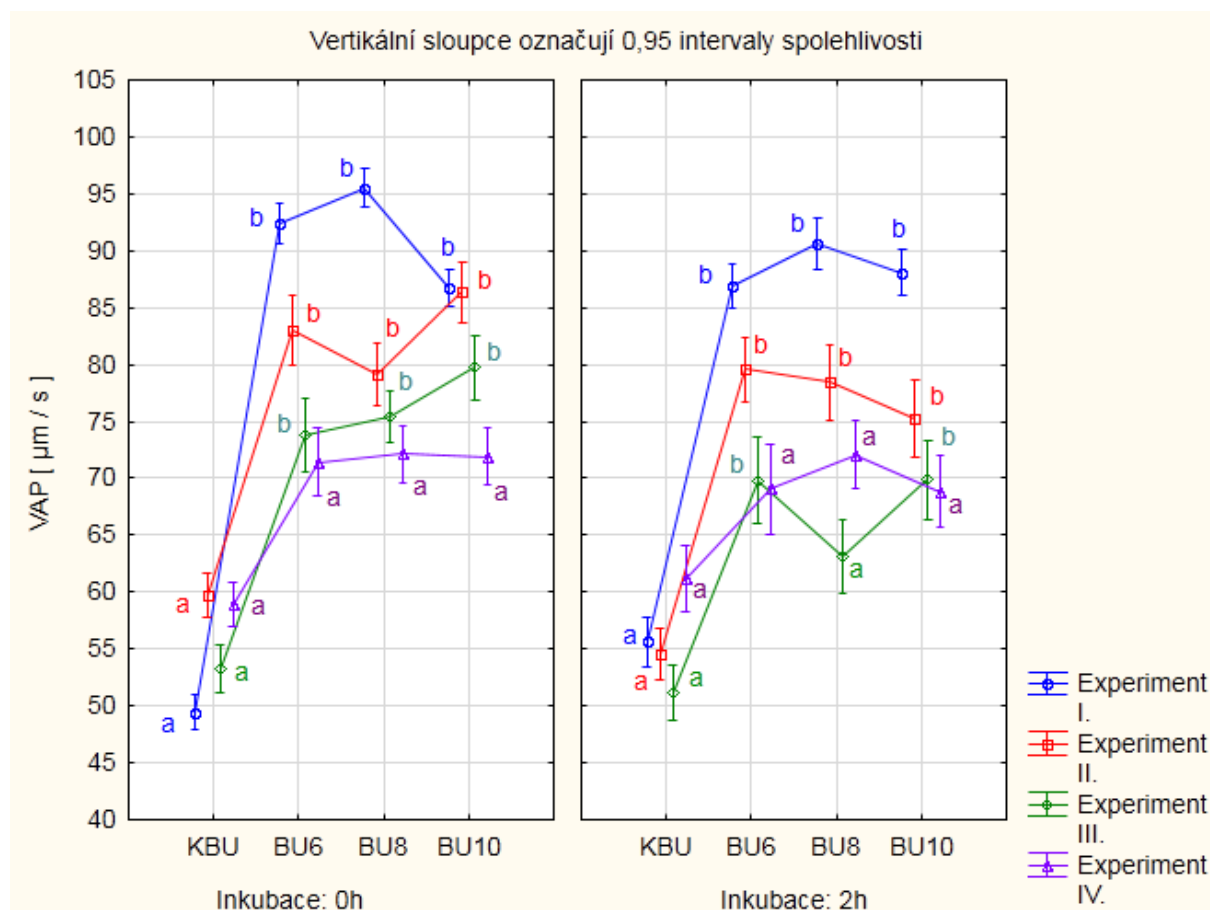
Graf 8. Ředidlo BULLXcell™ – vztah mezi hodnotami LIN, STR a WOB [%] v čase 0 a 2 hodiny. KBU – ředidlo s 0 % LDL, BU6 – ředidlo s 6 % LDL, BU8 – ředidlo s 8 % LDL, BU10 – ředidlo s 10 % LDL.



^{a,b,c} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

Na grafu č. 9. je vidět variabilita parametru VAP mezi jednotlivými experimentálními dny. V porovnání s kontrolami jsou všechny koncentrace signifikantně odlišné. V počáteční inkubaci byla statisticky nejrychlejší rychlost koncentrací u experimentu I., koncentrace se pohybovaly na podobné hladině rychlosti. Statisticky významný největší pokles rychlosti v koncentracích byl mezi experimentem I. a IV. Po dvouhodinové inkubaci si zase vedl nejlépe experiment číslo I., ale největší a statisticky významný pokles rychlosti byl tentokrát s experimentem číslo III. a IV. Po 2 hodinové inkubaci k statistickým rozdílům docházelo u experimentů I. a II. V rámci inkubace experimenty neměly statisticky významný pokles rychlosti.

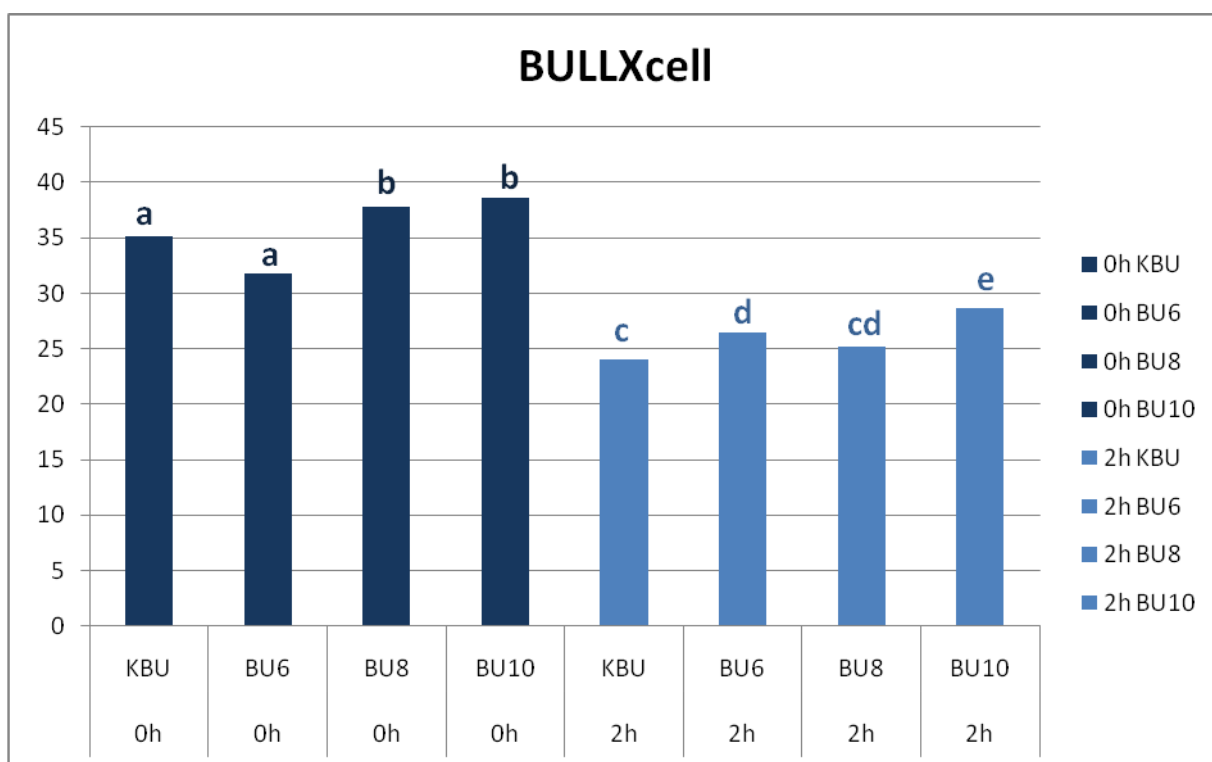
Graf 9. Ředidlo BULLXcell™ - rychlost spermií na průměrné dráze (VAP) v jednotlivých odběrových dnech v čase 0 a 2 hodiny. KBU – ředidlo s 0 % LDL, BU6 – ředidlo s 6 % LDL, BU8 – ředidlo s 8 % LDL, BU10 – ředidlo s 10 % LDL.



^{a,b} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

Procento pohyblivých spermií viz graf č. 10. byl u vzorku s 10 % koncentrací nejpohyblivější v počáteční i dvouhodinové inkubaci. Počet pohyblivých spermií se po 2 hodinové inkubaci nejvíce snížil u kontroly. V počáteční inkubaci byl statisticky významný rozdíl mezi všemi variantami kromě 8 % a 10 % inkubace, kde nebyl statisticky výrazný pokles. Po 2 hodinové inkubaci se u všech ředidel se statistickým podstatným rozdílem snížil počet pohyblivých spermií. U vzorků mezi 8 % a 10 % koncentrací, mezi kontrolou a 6 % koncentrací, mezi kontrolou a 10 % koncentrací a mezi 6 % a 10 % koncentrací po dvouhodinové inkubaci nebyl statisticky významný rozdíl. Po dvouhodinové inkubaci byl statisticky významný rozdíl mezi kontrolou s 6 % a 10 % koncentrací, a mezi 8 % koncentrací s 6 % a 10 % koncentrací.

Graf 10. Ředidlo BULLXcell™ - procentuální zastoupení pohyblivých spermií v čase 0 a 2 hodiny. KBU – ředidlo s 0 % LDL, BU6 – ředidlo s 6 % LDL, BU8 – ředidlo s 8 % LDL, BU10 – ředidlo s 10 % LDL.



a,b,c,d Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

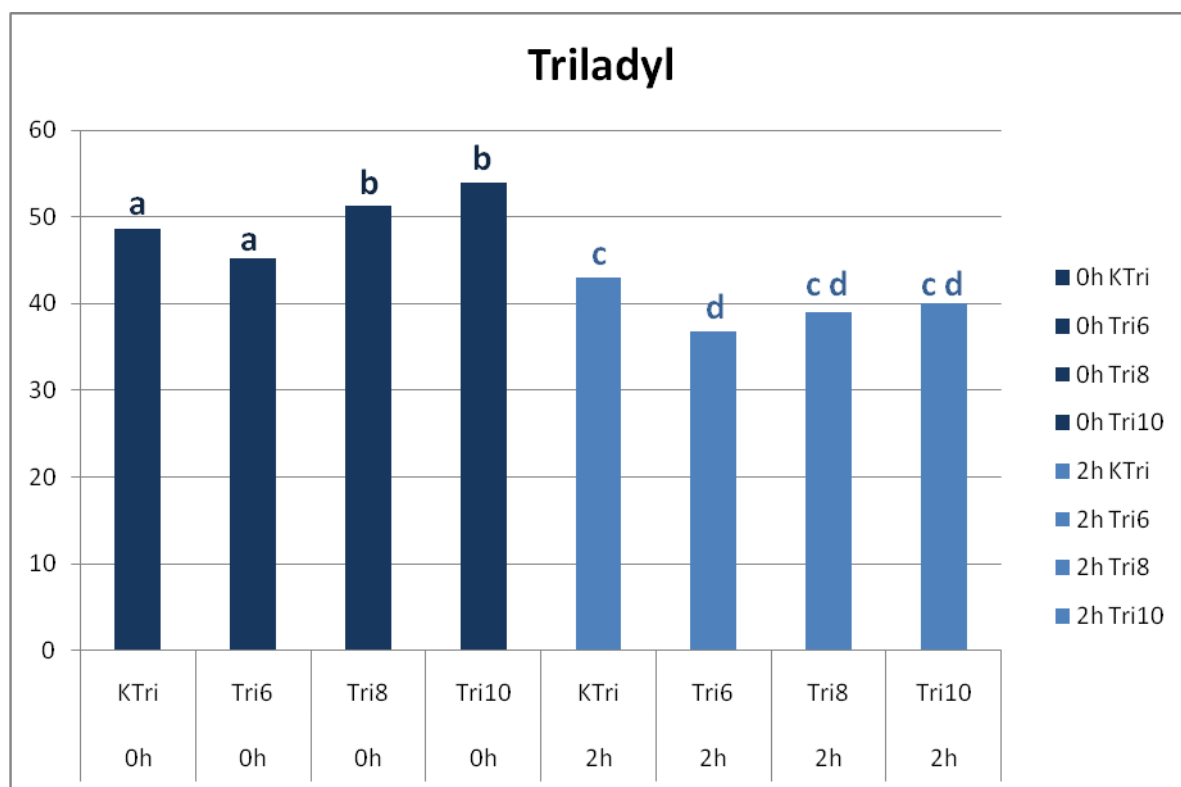
5.2 Experiment 2 – hodnocení parametrů přežitelnosti spermií metodou fluorescenčního barvení

Triladyl®

V počáteční inkubaci vykazovala nejlepší přežitelnost spermií 10 % koncentrace s LDL, ale po dvouhodinové inkubaci se procento živých spermií u 10 % koncentrace s LDL rapidně snížilo a kontrola vyšla nejlépe. V počáteční inkubaci byla 6 % koncentrace s přídavkem LDL statisticky významně nižší oproti koncentracím 8 % a 10 %. Rozdíly mezi kontrolou a koncentracemi v počáteční inkubaci nebyla statisticky rozdílná. Po 2 hodinové inkubaci se ve všech ředidlech s významným rozdílem snížil počet živých spermií. Po dvouhodinové inkubaci měla opět nejnižší počet spermií 6 % koncentrace, ale tentokrát měla statisticky významný rozdíl pouze s kontrolou viz graf č. 11.

Graf 11. Ředidlo Triladyl® - procentuální zastoupení živých spermií v čase 0 a 2 hodiny.

KTri – ředidlo s 0 % LDL, Tri6 – ředidlo s 6 % LDL, Tri8 – ředidlo s 8 % LDL, Tri10 – ředidlo s 10 % LDL.



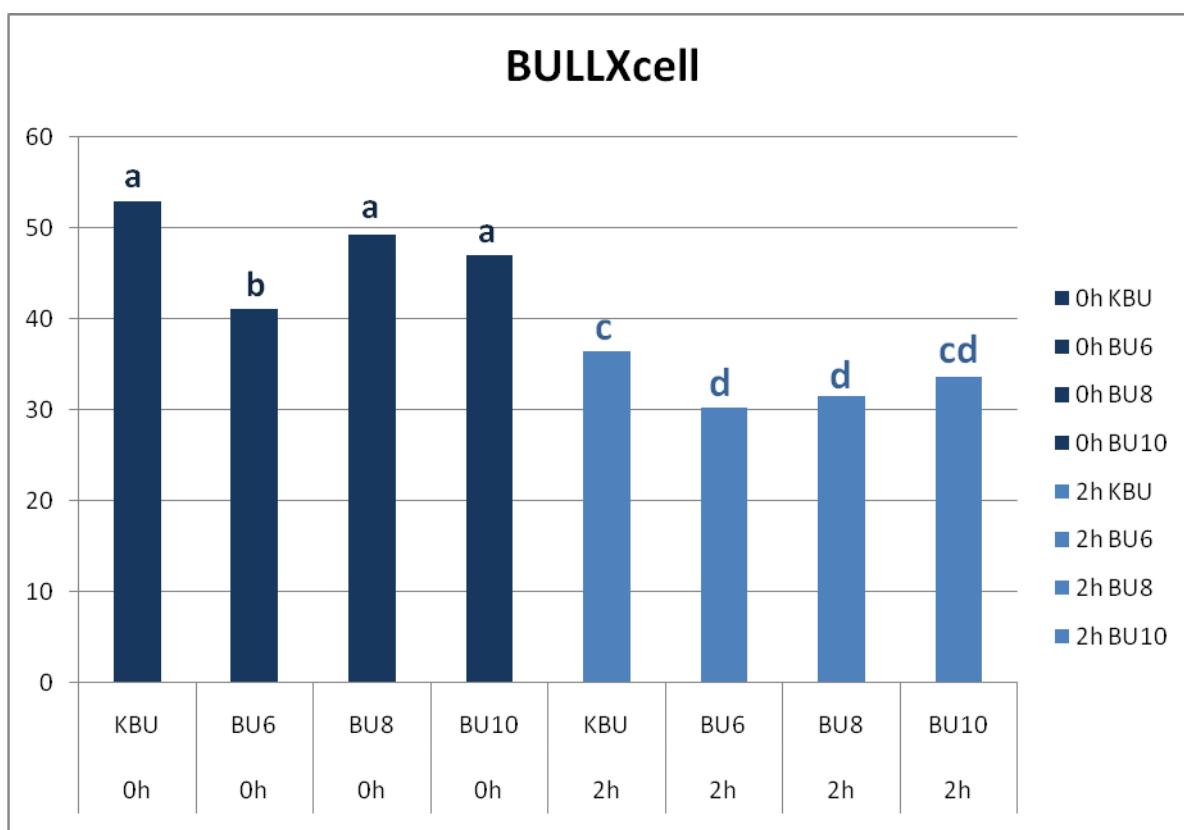
^{a,b,c,d} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

BULLXcell™

V počáteční i po dvouhodinové inkubaci vykazovala nejlepší přežitelnost spermií kontrola bez LDL. Nejhůře dopadla u obou inkubací 6 % koncentrace. V počáteční inkubaci byla 6 % koncentrace s přidavkem LDL statisticky významně nižší oproti kontrole, 8 % a 10 % koncentraci, ale po dvouhodinové inkubaci byl statisticky značný rozdíl jen s kontrolou. Po 2 hodinové inkubaci se u všech ředidel se statisticky podstatným rozdílem snížil počet živých spermií. Dalším statisticky významným rozdílem byl v druhé inkubaci mezi kontrolou a 8 % koncentrací viz graf č. 12.

12. Ředidlo BULLXcell™ - procentuální zastoupení živých spermií v čase 0 a 2 hodiny.

KBU – ředidlo s 0 % LDL, BU6 – ředidlo s 6 % LDL, BU8 – ředidlo s 8 % LDL, BU10 – ředidlo s 10 % LDL.



^{a,b,c,d} Hodnoty pro daný typ ředidla označené stejným indexem se v čase 0 a 2 hodiny neliší na hladině významnosti $p < 10^{-6}$

6 Diskuze

Cílem protokolů kryokonzervace spermií, včetně použitých ředidel, je zabránit smrtící tvorbě vnitrobuněčných ledových krystalů a snížit poškození membrány během a po kryokonzervaci. Vaječný žloutek pomáhá ochránit spermie proti tepelnému šoku, ve spolupráci s dalšími složkami v ředidle (Celeghini et al., 2007). Vaječný žloutek má i několik nevýhod. Je složkou živočišného původu a představuje případné riziko kontaminace ID bakteriemi. (Pillet et al., 2011). Obsahuje faktory, které inhibují respiraci, a snižují motilitu spermií (Moussa et al., 2002). Všeobecně je vaječný žloutek velice komplexní produkt, jehož lipidové složení se může měnit s dietou slepic.

Kromě toho, vaječný žloutek obsahuje mnoho komponentů, jako je lecitin, fosfolipidy a lipoproteiny, které mohou tvořit žloutková granula, která narušují mikroskopické hodnocení a omezují pohyb spermií (Thun et al., 2002, Pillet et al., 2011). Z tohoto důvodu je účelem najít vyhovující ředidlo s definovaným složením. Ochranný účinek LDL spermií během kryokonzervace je znám především na plazmatické membráně spermií (Moussa et al., 2002). Možnost zastoupení vaječného žloutku pomocí LDL v ředidlech kryokonzervovaných ID je v posledních letech intenzivně studovaná. Začleněním LDL do ředidel býčího spermatu dostáváme lepší výsledky motility v porovnání s ředidly obsahující vaječný žloutek (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Vera Munoz et al., 2009, Hu et al., 2010).

V této studii byly pomocí motility a viability porovnávány úspěšnosti různých koncentrací přidaného LDL ve dvou žloutkových ředidlech Triladyl®, nejběžněji používané komerční ředidlo, a BULLXcell™, u kterého nebyl zkoumán účinek přídavku LDL. Ve studii Amirat et al. (2005) ředidlo Triladyl obsahující žloutek, mělo více negativní účinek pro býčí spermie než LDL nebo bezžloutkové ředidlo Biociphos, u kterého byl žloutek nahrazen sterilním sojovým extraktem, tyto výsledky jsou shodné s výsledky získanými Moussa et al., (2002).

Kryokonzervace ovlivňuje lipidovou organizaci a chemické složení plazmatické membrány spermií. Předpokládá se, že LDL přímo nebo nepřímo snižuje tyto membránové modifikace spermií. Manjunath et al., 2002 navrhli, že hlavní mechanismus, kterým LDL chrání spermie je, že se LDL specificky interaguje s BSP proteiny (BSP hlavní proteiny býčí semenné plazmy: BSP-A1 / A2, BSP-A3 a BSP- 30-kDa - v semenné plazmě se naváží na povrch spermií při ejakulaci a stimulují cholesterol a fosfolipidy k uvolnění z membrány spermie, tím dochází k předčasné kapacitaci). LDL snižuje navázání hlavních proteinů ze

semenné plazmy na plazmatické membrány spermií a tím brání vyplavení lipidů z membrány spermií, tak se vysvětluje jeho příznivý účinek (Vera Munoz et al., 2009).

K hodnocení motility v této práci byl použit program CASA, který posuzuje různé parametry pohyblivosti spermií podle trajektorie hlavičky (Mortimer, 2000). Všechny naměřené hodnoty jsou ovlivňovány mnoha faktory, které mohou snížit motilitu a propustnost membrán, může to být nízká koncentrace spermií v ID, poněvadž je motilita přímo úměrná se snižující se koncentrací spermií (Moussa et al. 2002; Amirat et al., 2005; Vera Munoz et al., 2009), nebo také pH výrazně ovlivňuje pohyblivost býčích spermií (Contri et al., 2013).

V naší studii probíhal odběr vzorků ve čtyřech experimentálních dnech. Variabilitu mezi jednotlivými experimentálními dny jsme ukázali u parametru motility VAP. Nejlépe u obou ředidel dopadl parametr VAP u experimentálního dne číslo I. i po dvouhodinové inkubaci. Jinak žádný experiment nebyl nikterak extrémně vybočující, ale minimální variabilita se zaznamenala, to lze odůvodnit individualitou jednotlivého býka, která je ovlivněna např. plemenem, ředěním nebo frekvencí odběru semene (Khalifa et al., 2008). Pouze u experimentu číslo II. u ředidla Triladyl® po dvouhodinové inkubaci se koncentrace výrazně zhoršily, u ředidla BULLXcell™ žádný takový pokles nebyl zaznamenán, to může být vysvětleno špatnou manipulací se vzorkem a dlouhou expozicí vzorku mimo vytemperované prostředí.

U obou testovaných ředidel hodnocené parametry motility (VAP, VCL a VSL) po rozmrazení byly významně lepší u modifikovaných ředidel s LDL v počáteční i po dvouhodinové inkubaci ve všech tří koncentrací 6, 8 a 10 % než klasické složení ředidel tedy kontrolní vzorky bez LDL u obou ředidel Triladyl® a BULLXcell™. V jiné studii se rychlost a vizualizace spermií výrazně zlepšila u ředidla Biophos-Plus®, tato pozorování je přičítáno nízké viskozitě bezžloutkových ředidel (Thun et al., 2002). Pokles rychlosti pohybu po dvouhodinové inkubaci je v podstatě nižší než v případě bezžloutkových ředidel (Amirat et al., 2005; Vera Munoz et al., 2009). Rychlosti spermií u ředidel u parametru VAP a VSL se pohybovaly v rozpětí $55 - 80 \pm 5 \mu\text{m} / \text{s}$. Parametr VCL měl oproti VAP a VSL mnohem rychlejší hodnoty, které se pohybovaly v rozmezí $90 - 160 \mu\text{m} / \text{s}$, kdy na nejnižších hodnotách se vždy pohybovaly kontroly. Z těchto dat se nedá určit nejlepší koncentrace pro ředidlo Triladyl® ani pro BULLXcell™. Proto je potřeba dalších experimentů pro optimalizaci vhodné koncentrace LDL do komerčních ředidel.

U býků parametry motility LIN a VSL zřejmě korelují s fertilitou (podle Budworth et al. 1988; Farrel et al., 1998), VAP, VCL, a frekvence pohybů bičíkem (FTM- frequency of tail movements) (podle Farrel et al., 1998) a (podle Liu et al., 1991) parametry motility LIN,

VSL, a procento rychlých spermií, uvádí ve své studii Amirat-Briant et al. (2010). Nicméně Amirat et al. (2004) tvrdí, že žádná korelace mezi motilitou a plodností spermatu savců zatím nebyla zjištěna. Parametry jako oplodnění *in vitro*, hypoosmotický test (HOS), test na integritu akrozomu by mohly být spojeny s výsledky motility. Aby bylo možné zavést do inseminačních stanic LDL, je nezbytné provést další studie fertility (Amirat et al., 2004). Proto jsme se v této studii zaměřili na vícero parametrů motility a zjistili jsme, že pohybový trend je u obou ředidel velmi podobný a všechny koncentrace byly signifikantně rozdílné od kontroly. Proto jsme parametry motility chtěli ještě ověřit procentem pohyblivých a živých spermií.

Co se týče podílu pohyblivých spermií, tam jsme získali konkrétnější výsledky oproti měření parametrů motility VAP, VCL, VSL. Po rozmrazení na počátku inkubace měly obě ředidla v kontrole i koncentracích nad 30 % pohyblivých spermií, požadavek ID po rozmrazení je u býčích spermií minimálně 30 % (Louda et al., 202). Bylo tedy splněno minimální procento pohyblivých spermií po rozmrazení. Ve studii Amirat et al. (2005) pouze 31,8 % spermií bylo pohyblivých po rozmrazení v ředidle Triladyl. Domníval se, že je to následkem poškození spermií již před kryokonzervací spermií (Amirat et al., 2005). Po dvouhodinové inkubaci žádné ředidlo nemělo nad 30 % pohyblivých spermií, ale pod 20 % se pohyblivost nepropadla. V tomto testu si nejlépe vedla v počáteční inkubaci 10 % koncentrace LDL, ale u ředidla Triladyl® a nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl s kontrolou ani 8 % koncentrací, u ředidla BULLXcell™ nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl pouze s 8 % koncentrací. Po dvouhodinové inkubaci nejlépe a se statistickou významností dopadla 8 % koncentrace LDL a kontrola u ředidla Triladyl® a u ředidla BULLXcell™ se statistickou významností 10 % koncentrace LDL. V počáteční inkubaci měla 6 % koncentrace s LDL největší propad v hodnotách pohyblivosti, signifikantně odlišný od ostatních vzorků u obou ředidel, což může být následkem rozdílností viskozity vzorků. Po dvouhodinové inkubaci měli obě ředidla významný propad u všech ředidel.

V druhém experimentu podíl živých spermií vykazoval u některých vzorků i nad 50 % živých spermií po rozmrazení u ředidla Triladyl 8 a 10 % koncentrace a u BULLXcell kontrola, po dvouhodinové inkubaci se všechny vzorky pohybovaly nad 30 % živých spermií. V tomto experimentu u ředidla Triladyl® nejlépe dopadly koncentrace 10 % a 8 % signifikantně odlišné od koncentrace 6 %, kde bylo pozorováno nejméně živých spermií i po dvouhodinové inkubaci, ale významný rozdíl byl tentokrát s kontrolou, která měla nejvíce živých spermií. U ředidla BULLXcell™ po rozmrazení nejlépe dopadla kontrola a 8 % koncentrace signifikantně odlišné opět od 6 % koncentrace s nejnižším procentem živých

spermií. Po dvouhodinové inkubaci měla znovu kontrola největší procento živých spermií a 6 % koncentrace statisticky nejméně živých spermií. V rámci počáteční inkubace u obou ředidel se hodnoty živých spermií signifikantně propadly po dvouhodinové inkubaci u všech vzorků. Ve studiích u bezžloutkových ředidel měly koncentrace s LDL také lepší výsledky v životaschopnosti spermií než u ředidla Triladyl se žloutkem (Moussa et al., 2002; Vera Munoz et al., 2009).

Studie zabývající se nejlepší koncentrací LDL v ředidlech uvedli 8 % koncentraci LDL (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Amirat et al., 2005; Vera-Munoz et al., 2009), a 10 % koncentraci LDL (Akhter et al., 2011) jako optimální koncentraci pro dosažení nejlepších výsledků, naše práce se s jejich výsledky shoduje. Zvýšení koncentrace LDL v ředidlu nad 10 % vede ke snížení pohyblivosti spermií po zmrazení a rozmrazení. Zřejmě to souvisí s osmotickým tlakem ředidla, který se při vysoké koncentraci LDL snižuje. Hypoteticky ke snížení osmotického tlaku dochází v důsledku účinku srážení fruktózy a solí obsažených v ředidlech s LDL. Další možností by mohla být zvýšená koncentrace LDL, která vede k agregaci LDL a inaktivaci účinku agregovaného LDL (Moussa et al., 2002).

V této studii výsledky jednoznačně ukazují pozitivní vliv přidaného LDL u obou ředidel Triladyl® a BULLXcellTM na parametry motility spermií oproti kontrole obsahující vaječný žloutek. Hodnocení podílu pohyblivých a živých spermií mělo podobný trend a největší propad byl pozorován u 6 % koncentrace oproti ostatním vzorkům kontrol a koncentracemi 8 % a 10 %, které neměly mezi sebou jednoznačný statistický rozdíl. Proto by motilita neměla být jediným faktorem v hodnocení fertilizační schopnosti spermií. Hodnocení spermií by mělo zahrnout kromě hodnocení motility a další hodnocení spermií.

7 Závěr

Cílem této studie bylo ověřit hypotézu, že vhodná koncentrace LDL umožní nahradit vaječný žloutek ve žloutkových ředidlech Triladyl® a BULLXcell™, eventuálně zlepši pohybovou aktivitu a viabilitu spermií. U ředidla Triladyl® i u ředidla BULLXcell™ se splnil předpoklad, že všechny koncentrace s LDL 6 %, 8 % a 10 % vykazovaly průkazně lepší hodnoty parametrů motility VAP, VCL a VSL po rozmrazení i po dvouhodinové inkubaci oproti kontrolnímu vzorku bez LDL. Naše experimenty se shodovaly s výsledky různých autorů, že LDL zlepšuje pohybové vlastnosti spermií. Jako optimální a nejefektivnější koncentrace modifikovaného ředidla s LDL se v dostupné literatuře uvádí 8 %, v naší studii všechny koncentrace vyšly na stejných hodnotách.

Ředidla u testu viability a podílu pohyblivých spermií vykazovaly největší propad u 6 % koncentrace LDL. Trend pohyblivých spermií v počáteční inkubaci byl obdobný u obou ředidel, avšak po dvouhodinové inkubaci u ředidla Triladyl® si nejlépe vedla 8 % koncentrace, u ředidla BULLXcell™ 10 % koncentrace. Nicméně, co se týče živých spermií u ředidla BULLXcell™ si vedla nejlépe kontrola i po 2 hodinové inkubaci, kdežto u ředidla Triladyl® 10 % koncentrace a kontrola, a po 2 hodinové inkubaci především kontrola. V tomto výsledku musíme zohlednit různou viskozitu ředidel, protože díky žloutku je kontrolní ředidlo viskóznější. Z biologického hlediska jsme kritérium významnosti nastavili na $p < 10^{-6}$ a proto jsme dostali přesnější výsledky, proto nedocházelo ke statisticky významným rozdílům mezi kontrolou a 8 a 10 % koncentracemi u obou ředidel.

Na závěr, Moussa et al. (2002) vyvinuli snadný způsob extrahování LDL ze žloutku slepičích vajec. Tato metoda produkuje LDL s 97 % čistotou a výtěžkem 67 %. LDL má významné kryokonzervační vlastnosti pro býčí spermie. Prozatím se LDL stále používá pouze v rámci experimentů. Podle naší studie a výše uvedených použití LDL místo vaječného žloutku dosáhneme vyšší rychlosti motility a lepších pohybových vlastností spermií. I po dvouhodinové inkubaci se rychlosti s minimálním poklesem zachovaly, což zdaleka není pravidlem u bezžloutkových ředidel. Tento výsledek potvrdil kvalitu žloutkových ředidel, byť u podílu pohyblivých a živých spermií tento trend není zcela průkazný. LDL se jeví jako plnohodnotná náhrada vaječného žloutku v žloutkových ředidlech. Ale je zapotřebí dalších výzkumů, vyhodnotit a pochopit příslušnou roli lipidů a apoproteinů v LDL, optimalizovat metody pro ředění, kryokonzervaci a různá ředidla. Pak se teprve může uvažovat o náhradě vaječného žloutku LDL a jeho používáním v komerčních ředidlech v praxi.

8 Seznam literary

- Aisen, E. G., Alvarez, H. L., Venturino, A., Garde, J. J. 2000. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53 (5). 1053-1061.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Andrabi, S. M. H., Ullah, N., Qayyum, M. 2008. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Reprod. Domest. Anim.* 43. 272– 8.
- 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*. 76 (4). 759- 764.
- Allahbadia, G., N., (ed.). 2005. Intrauterine Insemination. Taylor & Francis. p. 480. ISBN:1-84214-3220.
- Amann, R., Pickett, 1987. B. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine. Vet. Sci.* 7.145–73. In: Chian, R. Ch. Cryobiology: an overview. In: Chian, R. Ch., Quinn, P. (eds). 2010. Fertility Cryopreservation. Cambridge University Press. 271. ISBN: 978-0-521-51778-2.
- Amann, R. P., Graham, J. K. 1993. Spermatozoal function. In: Mckinnon, A. O., Voss, J. L. *Equine Reproduction*. Lea & Febiger. Philadelphia. 715-745.
- Amann, R. P., Katz, D. F. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*. 25. 317–325.
- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Ali, H. B. H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., Tainturier, D. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology*. 71 (8). 1209–1214.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., Ge´rard, O., Courtens J. L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61. 895–907.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, Luc Courtens, J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*. 129. 535–543.
- Amirat, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., Destrumelle, S., et al. 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 122. 282–7.

- Andrabi, S. M. H., Ansari, M. S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A., Akhter, S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 104. 427–33.
- Andrabi, S. M. H. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 44. 552– 69.
- Anger, J. T., Gilbert, B. R., Goldstein, M. 2003. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J. Urol.* 170. 1079 –1084.
- Anton, M., Gandemer, G. 1997. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of hen egg yolk. *J. Food. Sci.* 62. 484–487.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Rabesona, H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry.* 83 (2). 175–183.
- Arruda, R. P., Souza, N. L., Marques, A., et al. 2002. Evaluation of techniques using CFDA/PI, H258/FITC-PSA and Trypan blue/Giemsa for assessment of the viability and acrosomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology.* 57. 477.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 21 (1). 1-7.
- Balakin, K. V., Savchuk, N. P., Tetko, I. V. 2006. In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of druglike compounds: trends, problems and solutions. *Curr. Med. Chem.* 13. 223 –241.
- Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., 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. *Reprod Domest Anim.* 41. 68 –73.
- Björndahl, L, Kvist, U. 2003. Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *RBM Online.* 7. 440–8.
- Björndahl, L., Mortimer, D., Barratt, Ch. L. R., Castilla, J. A., Menkveld, R., Kvist, U., Alvarez, J. G., Haugen, T. B. 2010. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology.* Cambridge University Press. p. 336. ISBN 978-0-521-73590-2.
- Bogart, R., Mayer, D. T. 1950. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoa viability. *J Anim Sci.* 9. 143. In: Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., Ge´rard, O., Courtens J. L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology.* 61. 895–907.
- Boisvert, M., Bergeron, A., Lazure, C., Manjunath, P. 2004. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biol. Reprod.* 1 (1). 656–661.

- Bourgeois-Adragna, O. 1994. Valeur nutritionnelle de l'oeuf. In: Thapon JL, Bourgeois WG (eds) L'oeuf et les ovoproduits. Lavoisier. Paris. 6–26.
- Brito, L. F., Barth, A. D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P. L., Kastelic, J. P. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*. 60 (8). 1539-1551.
- Buhr, M. M., Curtis, E. F., Kakuda, N. S. 1994. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. 31. 224-38.
- Burley, R. W. 1975. Recent advances in the chemistry of egg yolk. *CSIRO Food Res Quarterly*. 35.1–5. In: Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., Schade, R., (eds.). 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer Science & Business Media. p. 318. ISBN-13: 978-3-540-37883-9.
- Celeghini, E. C. C., Arruda, R. P., Andrade, A. F. C., Nascimento, J., Raphael, C. F., Rodrigues, P. H. M. 2007. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim. Reprod. Sci.* 100. 1–13.
- Comizzoli, P., Mauget, R., Mermillod, P. 2001. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology*. 56. 261–74.
- Contri, A., Gloriaa, A., Robbe D., Valorz, C., Wegher, L., Carluccio, A. 2013. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal Reproduction Science*. 136 (4). 252–259.
- Courtens, J. L., Re'ty, J. M. 2001. Numerical simulation for freezing and thawing mammalian spermatozoa Evaluation of cell injuries at different depth in bags or straws during all steps of the technique. *Genet Sel Evol*. 33 (1). 85–104.
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Collenbrander, B., Verkleij, A. J. 1993. Effects of variol cryoprotectants agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30. 32–44.
- Demianowicz, W., Strezek, J. 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reproduction in Domestic Animals*. 31. 279–280.
- Ericsson, S. A., Garner, D. L., Thomas, C. A., Downing, T. W., Marshall, C. E. 1993. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 39. 1009-1024.
- Fahy, G. M., Wowk, B., Wu, J., *et al.* 2004. Improved vitrification solutions based on predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*. 48. 22 –35.

- Fernandez-Santos, M. R., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., et al. 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 67. 738–53.
- Flesch, F. M., Gadella, B. M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 1469. 197-235.
- Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwer, J. F. H. M., Stout, T. A. E., Colenbrander, B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci*. 68. 249-65.
- Garrett, C., Liu, D. Y., Clarke, G. N. et al. 2003. Automated semen analysis: ‘zona pellucida preferred’ sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum. Reprod*. 18. 1643–1649.
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., Miragaya, M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci*. 104 (2-4). 359–369.
- Hamameh, S., Gatti, J-L. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum. Reprod. Suppl*.4. 20-30.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl*. 1990. 11 (1). 73-88.
- Harrison, R. A. P. and Vickers, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert*. 88. 343-352.
- He, L., Bailey, J. L., Buhr, M. M. 2001. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biol Reprod*. 64. 69-79.
- Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of the species and individual differences. *Theriogenology*. 53 (1). 47–58.
- Hopper, R. M. (ed.). 2014. *Bovine Reproduction*. Wiley-Blackwell. 1rd. pp. 816. SBN-13: 978-1-1184-7083-1.
- 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*. 117 (1-2). 11-17.
- Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., Schade, R., (eds.). 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer Science & Business Media. P. 318. ISBN-13: 978-3-540-37883-9.
- Chacur, M. G. M. 2012. Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in Zebu Bulls (*Bos taurus-indicus*). *Electrophoresis*. (INTCH). 173–193.
- Chalah, T. and Brillard, J. P. 1998. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (sybr-14/pi). *Theriogenology*. 50 (3). 487-493.

- Chaveiro, A., Liu, J., Engel, B., Critser, J. K., Woelders, H. 2006. Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*. 53. 349–359.
- Chian, R. Ch. *Cryobiology: an overview*. In: Chian, R. Ch., Quinn, P. (eds). 2010. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press. 271. ISBN 978-0-521-51778-2.
- Irvine, D. S., Macleod, I. C., Templeton, A. A., Masterton, A., Taylor, A. 1994. A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Hum Reprod*. 9. 2324–2334.
- Johnston, L. A., Lacy, R. C. 1995. Genome resource banking for species conservation: selection of sperm donors. *Cryobiology*. 32. 68–77.
- Juhász, J., Nagy, P., Kulcsár, M., Huszenicza, Gy. 2000. Review article methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion. *Acta vet. Brno*. 69. 247-259.
- Katz, D. F., Davis, R. O., Delandmeter, B. A., and Overstreet, J. W. 1985. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Comput. Meth. Prog. Biomed*. 21 (3). 173-82.
- Keith, S. C. 1913. Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water. *Science*. 37. 877–879. In: Chian, R. Ch. *Cryobiology: an overview*. In: Chian, R. Ch., Quinn, P. (eds). 2010. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press. 271. ISBN 978-0-521-51778-2.
- Khalifa, T. A. A., Rekkas, C. A., Lymberopoulos, A. G., Sioga, A., Dimitriadis, I., Papanikolaou, Th. (2008). Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104. 143–163.
- Khalifa, T., Lymberopoulos, A., Theodosiadou, E. 2013. Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology*. 79 (3). 517-527.
- Killian, G., Chapman, D., Rogowski, L. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Reprod*. 49. 1202–1207.
- Kuksis, A. 1992. Yolk lipids. *Biochim Biophys Acta*. 1124. 205–222.
- Kumar, V., Hassan, M. I., Tomar, A. K., Kashav, T., Nautiyal, J., Singh, S., Yadav, S. 2009. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *J. Biosci.*, 34 (6). 899–908.
- Larsen, L. et al. 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human. Reproduction*. 15. 1562-1567.

- Larsson, B., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict fertility? *Anim. Reprod Sci.* 60/61. 327–386.
- Leffler, K. S., Walters, C. A. 1996. A comparison of time, temperature, and refreezing variables on frozen sperm motility recovery. *Fertil Steril.* 65. 272–274.
- Lei Su, Xilong Li, Jiexia Quanc, Shihua Yang, Yahui Li, Xiechao He, Xianghui Tang. 2008. A comparison of the protective action of addend egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science.* 104. 212–219.
- Li, Y. H., Cai, K. J., Su, L., Guan, M., He, X. C., Wang, H., Kovacs, A., Ji, W. Z. 2005. Cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa in a chemically defined extender. *Asian J. Androl.* 7. 139–144.
- 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.
- Love, C. C., Thompson, J. A., Brinsko, S. P., et al. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology.* 60. 1127.
- Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E., Desnoyers, L. 1994. The Major Proteins of Bovine Seminal Vesicles Bind to Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50 (1). 27-37.
- 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. *Biol. Reprod.* 67. 1250–1258.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). 2011. *Equine Reproduction.* 2nd ed. Wiley-Blackwell. p. 3132. ISBN: 978- 8138-1971-6.
- Miki, K. 2007. Energy metabolism and sperm function. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65. 309-25.
- Mortimer D. Objective analysis of sperm motility and kinematics. 1990. In: Keel BA, Webster BW, ed. *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility.* Boca Raton, Fla: CRC Press. 97– 133.
- Mortimer, D. (eds.). 1994. *Practical Laboratory Andrology.* Oxford University Press. p. 393. ISBN:0-19-506595-6.
- Mortimer, D., Aitken, R. J., Mortimer, S. T., Pacey, A. A. 1995. Workshop report: clinical CASA-the quest for consensus. *Rep. Fer. Dev.* 7. 951–959.
- Mortimer, S. T., Schoeřvaeřrt, D., Swan, M. A., Mortimer, D. 1997. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. *Hum Reprod.* 12. 1006–1012.

- Mortimer, S. T., Swan, M. A. 1999. Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 14. 997–1004.
- Mortimer, S. T. 2000. CASA-Practical Aspects. *Journal of Andrology.* 21 (4). 515-24.
- Moura, A. A., Chapman, D. A., Koc, H., Killian, G. J. 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J. Androl.* 27 (4). 534–541.
- 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.* 57. 1695–1706.
- Muiño R., Fernández, M., Peña, A. I. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod. Domest. Anim.* 42 (3). 305-11.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., Gadella, B. M. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod.* 68. 1828–1835.
- Nauc, V., Manjunath, P. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.* 63 (4). 1058-66.
- Nieminen, A. L., Saylor, A. K., Tesfai, S. A., Herman, B., Lemasters, J. J. 1995. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J.* 307 (Pt 1). 99–106.
- Nixon, B., Aitken, R. J., McLaughlin, E. A. 2007. New insights into the molecular mechanisms of sperm – egg interaction. *Cell. Mol. Life Sci.* 64. 1805–1823.
- Nöthling, J. O., Gerber, D., Colenbrander, B., Maaikje Dijkstra, Tynke Bakker, De Cramer, K. 2007. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. *Theriogenology.* 67 (2). 264–275.
- Pace, M. M., Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci.* 39. 1144–1149.
- Pedro, P. B., Yokoyama, E., Zhu, S. E., et al. 2005. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *J Reprod Dev.* 51. 235 – 246.
- Pileckas, V., Riškevičienė, V., Jomantas, Z. 2014. Comparative evaluation of bovine semen cryopreservation methods and extenders. *Vet Med Zoot.* 68 (90). 1392-2130.

- Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*. 75 (1). 105-114.
- Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S. 1949. Revival os spermatozoa aft er vitrifi cation and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164. 666. In: Chian, R. Ch. *Cryobiology: an overview*. In: Chian, R. Ch., Quinn, P. (eds). 2010. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press. p. 271. ISBN 978-0-521-51778-2.
- Rodríguez-Martínez, H. 2013. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim.Reprod*. 10. 148-159.
- Saari, A., Powrie, W. D., Fennema, O. 1964. Isolation and characterization of low-density lipoproteins in native egg yolk plasma. *J Food, Sci*. 29.307–315. In: Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., Schade, R., (eds.). 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer Science & Business Media. p. 318. ISBN-13: 978-3-540-37883-9.
- Samper, J. C. (ed.). 2009. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination E-Book*. Elsevier Health Science. Copyright. USA. p. 310. ISBN: 978-1-4160-5234-0.
- Saragusty, J., Gacitua, H., King, R., Arav, A. 2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology*. 66. 775–784.
- Saragusty, J., Gacituaa, H., Zeronc, Y., Rozenboimb, I., Arava, A. 2009. Double freezing of bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 115. 10–17.
- Scanes, C. 2010. *Fundamentals of Animal Science*. Cengage Learning. p. 448. ISBN: 1428361278.
- Serres, C., Feneux, D., Jouannet, P., David, G. 1984. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res*. 9. 183–195.
- Shehata, F., Chian, R. Ch. *Cryopreservation of sperm: an overview*. In: Chian, R. Ch., Quinn, P. (eds). 2010. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press. 271. ISBN 978-0-521-51778-2.
- Singer, S. J. 1972. A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure. *Ann N Y Acad Sci*. 195. 16-23.
- Stalhammar, E. M., Janson, L., Philipsson, J. 1994. The impact of sperm motility on non return rate in preselected dairy bulls. *Reprod Nutr Dev*. 34 (1). 37–45.
- Suarez, S. S. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update*. 14. 647–57.
- Swain, J. E., and Smith, G. D. *Cryoprotectants*. In: Chian, R. Ch., Quinn, P. (eds). 2010. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press. p. 271. ISBN 978-0-521-51778-2.

- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., Tainturier, D. 1997. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*. 34. 385–393.
- Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Bucak, M. N., et al. 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*. 75 (8). 1459–1465.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Va'squez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Anton, M., Bencharif, D., Tainturier, D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. *Theriogenology*. 71. 895–900.
- Věžník, Z. 2004. Repetitorium: spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. Brno. Výzkumný ústav veterinárního lékařství. ISBN: 80-86895-01-7.
- Wakamatu, T., Sato, Y., Saito, Y. 1982. Identification of the component responsible for the gelation of egg yolk during freezing. *Agric Biol Chem*. 46. 1495–1503. In: Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., Schade, R., (eds.). 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer Science & Business Media. p. 318. ISBN-13: 978-3-540-37883-9.
- Wall, R. J., Foote, R. H. 1999. Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk-Tris-glycerol extender. *J Dairy Sci*. 82. 817–21.
- WHO. 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. 5th edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK. p. 138. ISBN: 978 92 4 154778 9.
- White, I. G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*. 5 (6). 639-58.
- Wildt, D. E., Rall, W. F., Critser, J. K., Monfort, S. L., Seal, U. S. 1997. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. *Bioscience*. 47. 689–698.
- Wildt, D. E. 2000. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation . *ILAR. J*. 41. 228 –234.
- Wijchman, J. G., De Wolf, B. T. H. M., Jager, S. 1995. Evaluation of a computer-aided semen analysis system with sperm tail detection. *Hum Reprod*. 10. 2090–2095.
- Zachariassen, K. E., Kristiansen, E. 2000. Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*. 41. 257 –279.

