

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vliv přídavku nízkodenzitního lipoproteinu
na kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího
ejakulátu - Triladyl vs. AndroMed

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Martina Janošíková

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Liberci dne 7.4.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Ondrovi Šimoníkovi za odborné vedení a přátelský přístup při zpracování diplomové práce. Velké díky patří mému manželovi Martinovi za toleranci a podporu při studiu a mým kamarádům za pomoc při shromažďování informací a literatury.

Vliv přídatku nízkodenzitního lipoproteinu na kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího ejakulátu - Triladyl vs. Andromed

Souhrn

LDL je účinná složka vaječného žloutku odpovědná za jeho kryoprotektivní vlastnosti. Cílem práce bylo ověřit, zda přídatok LDL zlepšit kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího ejakulátu. Testována byla možnost přídatku LDL do bezžloutkového ředidla AndroMed® v koncentracích 4, 6 a 8 % a možnost náhrady vaječného žloutku v ředidle Triladyl® přídatkem LDL o koncentraci 6, 8 a 10 %. Po rozmrazení ejakulátu konzervovaného v těchto ředidlech byla hodnocena motilita spermií (parametr VAP = průměrná rychlost pohybu hlavičky spermie po napřímené dráze), podíl nepohyblivých spermií za pomoci software CASA (metoda počítačem asistované analýzy spermatu) a dále viabilita spermií (metodou fluorescenčního barvení).

Dodatek LDL do AndroMed pozitivně ovlivňoval rychlost pohybu spermií po 2 hodinové inkubaci, současně, zejména u 6% LDL snižoval podíl nepohyblivých a zvyšoval podíl živých spermií bezprostředně po rozmrazení. U Triladylu přídatok LDL výrazně zvyšuje pohyblivost spermií oproti kontrole, ovšem tento parametr byl nepochybně ovlivňován vysokou viskozitou ředidla. Trend k navýšení množství nepohyblivých spermií byl statisticky nevýznamný. V poměru živých a mrtvých spermií byly všechny varianty s ředidlem Triladyl identické.

Můžeme opatrně potvrdit hypotézu, že efekt použití LDL je výraznější v případě bezžloutkového ředidla Andromed a jako nejvhodnější koncentrace přidávaného LDL se jeví 6 %. V případě Triladylu se potvrdila možnost náhrady vaječného žloutku samotným LDL o koncentraci 8 a 10 %.

Klíčová slova: býk, inseminace, kryokonzervace, sperma, kryoprotektivum, žloutek, LDL

Low-density lipoprotein supplementation effects on cryoprotective properties of selected bull semen extenders Triladyl vs. Andromed

Summary

LDL is an active element of egg yolk that is responsible for its cryoprotective properties. Main goal of this thesis was to verify whether LDL additive improves cryoprotective properties of tested thinners of bull's ejaculate. Among tested variants there was LDL additive put in no-egg-yolk thinner AndroMed in concentrations of 4, 6 and 8% and option of replacing egg yolk in Triladyl thinner with LDL additive in concentrations of 6, 8 and 10%.

After defrosting of ejaculate conserved in these thinners there was motility of sperm measured (VAP parameter – average speed of head movement of sperm on a straight trajectory) using CASA software (Computer Aided Sperm Analysis) and sperm life sustainability (viability) using method of fluorescent colouring.

Additive of LDL in AndroMed significantly improved speed of sperm motion after two hours of incubation and, at the same time, particularly for 6% LDL solution, it caused decrease in ratio of non moving sperm and increase in number of live sperm just after defrosting. If LDL used with Triladyl it improves mobility of sperm compared to examination. Although, this parameter was influenced by high viscosity of the thinner. A track of trend showing growth in number of immobile sperm proved to be statistically insignificant. There was same ratio of live sperm and dead sperm in all variants with Triladyl thinner.

We can carefully confirm hypothesis claiming that effects of use of LDL is more significant if used with no-egg-yolk thinner Andromed and as most appropriate concentration of added LDL was matched 6% solution. For Triladyl a possibility of replacement an egg yolk with LDL itself in concentrations of 8 or 10% was confirmed.

Keywords:

Bull, insemination, cryopreservation, sperm, cryoprotective, egg yolk, LDL

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární přehled	11
3.1	Kryokonzervace	11
3.2	Ejakulát.	12
3.3	Spermie.....	13
3.3.1	Struktura samčí pohlavní buňky.....	13
3.3.2	Metabolismus spermie	15
3.4	Pohyb spermií (motilita).....	16
3.5	Konzervace ejakulátu.....	17
3.6	Posuzování vhodnosti ejakulátu.....	18
3.6.1	Základní test přežitelnosti	19
3.6.2	Krátkodobý tepelný test přežitelnosti	19
3.6.3	Dlouhodobý chladový test přežitelnosti.....	19
3.6.4	Hodnocení integrity membrán.....	19
3.6.5	Hodnocení motility	20
3.7	Ředění a ředidla býčího ejakulátu.....	21
3.7.1	Bezžloutková ředidla bez živočišné bílkoviny	23
3.7.2	Bezžloutkové ředidlo s živočišnou bílkovinou	24
3.8	Ředidla s vaječným žloutkem.....	24
3.8.1	Ředidla na bázi lipoproteinů o nízké hustotě (LDL)	25
3.9	Nejnovější poznatky z užití LDL	26
4	Metodika.....	29
4.1	Zpracování ejakulátu	29
4.2	Příprava ředidel.....	29
4.2.1	AndroMed	29
4.2.2	Triladyl	30

4.2.3	LDL	30
4.3	Hodnocení kvalitativních parametrů ejakulátu po rozmrazení	31
4.3.1	Hodnocení motility spermií.....	31
4.3.2	Hodnocení výskytu nepohyblivých spermií	32
4.3.3	Hodnocení viability spermií	32
4.3.4	Statistické zpracování.....	32
4.4	Design experimentu	33
5	Výsledky	34
5.1	Hodnocení rychlosti pohybu	34
5.2	Hodnocení podílu nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace	36
5.3	Hodnocení viability spermií	38
6	Diskuse.....	40
7	Závěr	43
8	Literatura	44
9	Přílohy:	55

Seznam příloh:

Příloha č. 1: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro rychlost spermií na napřímené dráze (VAP) v závislosti na koncentraci LDL a délce inkubace po rozmrazení v ředidle AndroMed při použití Schéffeho testu.

Příloha č. 2: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro rychlost spermií na napřímené dráze (VAP) v závislosti na koncentraci LDL a délce inkubace po rozmrazení v ředidle Triladyl při použití Schéffeho testu.

Příloha č. 3: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro procento nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci a době inkubace v ředidle AndroMed při použití Schéffeho testu.

Příloha č. 4: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro procento nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci a době inkubace v ředidle Triladyl při použití Schéffeho testu.

1 Úvod

Chov zvířat dnes předpokládá ovládnutí řady postupů a biotechnologických metod, které umožňují dále navyšovat jeho kvalitu a výslednou užitkovost hospodářských zvířat. Jedním z široce využívaných postupů je umělá inseminace. Ta napomáhá maximalizovat plemenný potenciál vybraných jedinců býků.

Aby byla kvalita ejakulátu vybraného pro oplození udržena, je nutno jej správně, krátkodobě i dlouhodobě, uchovávat. Vhodné prostředí vytváří ředidla spermatu. V současné praxi inseminačních stanic jsou s různým úspěchem užívána komerčně vyráběná ředidla různého složení. Snahou výzkumu je další vylepšování složení ředidel tak, aby se dále navýšily jejich pozitivní vlastnosti, zejména kryoprotektivita. V této souvislosti se stále častěji setkáváme s termínem LDL (lipoproteiny o nízké hustotě). LDL jsou účinnou složkou vaječného žloutku odpovědnou právě za jeho kryoprotektivní vlastnosti. Recentní studie upozorňují na pozorované vylepšení různých parametrů přežití a pohyblivosti spermií uchovaných v komerčních ředidlech s přídavkem LDL.

Cílem této práce je přispět k dalšímu poznání této problematiky a ověřit, zda přídavek LDL zlepší kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího ejakulátu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo ověřit platnost následujících hypotéz:

- přídavek LDL zlepší kryoprotektivní vlastnosti vybraných ředidel býčího ejakulátu (Triladyl, AndroMed)

- efekt bude výraznější v případě bezžloutkového ředidla AndroMed.

Dílčími cíli řešení bylo v inseminačních dávkách býků ředěných žloutkovým ředidlem Triladyl nebo bezžloutkovým ředidlem Andromed s rozdílným přídavkem LDL po rozmrazení stanovit:

a) parametry motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermatu (CASA),

b) parametry přežitelnosti spermií metodou fluorescenčního barvení
a na základě statistické analýzy získaných dat zhodnotit efekty testovaných variant ředění.

3 Literární přehled

3.1 Kryokonzervace

Kryokonzervací nejčastěji rozumíme zmražení buněk v tekutém dusíku na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Užít je však možno i jiná mrazicí média. Celý proces sestává z několika kroků. Prvním krokem je naředění dávky, pak následuje přidání kryoprotektiva, schlazení, zmražení, poté dlouhodobé či krátkodobé uchování a rozmrazení. Díky speciálním kryokonzervačním technikám je možné zmrazit spermie, vajíčka i embrya a přechovat je téměř nekonečně dlouho v kryobance (Řežábek 2000). Běžně je ve zmraženém stavu uchováváno sperma hospodářských zvířat; při splnění přísných podmínek zákona v České republice je umožněno i přechování humánních buněk.

Skladování jakýchkoliv buněk ve zmrzlém stavu znamená zastavení jejich životních pochodů a vývoje (Vishwanath et Shannon 2000). Přestože jsou při kryokonzervaci buňky ohroženy změnou koncentrace prostředí a vytvořením krystalků ledu, které mohou buňku nevratně poškodit a zabít (Thurston et al. 2002), jsou výhody kryokonzervace nesporné. V humánní medicíně umožňuje zmrazování řešit mnoho problémů spojených s reprodukcí nebo s riziky vyplývajícími z plánované terapie, apod. V chovatelské praxi spočívají hlavní výhody kryokonzervace a následné umělé inseminace v eliminaci přenosu pohlavních nákaz zvířat, možnosti ovlivnění výběru zvířat do plemenitby a zvýšení počtu potomků vybraných samců, kteří byli otestováni po genetické stránce. V neposlední řadě je to i možnost transportu mraženého spermatu téměř po celém světě (Bailey et al. 2000). Dále je velkou předností možnost realizace koncepcí chovů a plemenářských programů (Kliment et al. 1983). Zavedením, byť rozmraženého semene, na nejvhodnější místo pro oplození se také zvyšuje plodnost, je možno přesně určit dobu oplození, apod. (Gamčík et Kozumplík 1984).

Experimentálně bylo zamrazování spermatu ověřováno již v 19. století, Prevostem v roce 1840 a de Quatrefagesem v roce 1853. Ve čtyřicátých letech 20. století bylo prokázáno, že spermie zamražené 40 dnů teplotou tuhého oxidu uhličitého, tekutého dusíku a tekutého hélia po rozmrazení alespoň zčásti ožijou

(Jahnel 1938). V padesátých letech bylo dále objeveno, že procento přeživších spermií lze výrazně zvýšit přidáním určitých ředidel k zamražovanému ejakulátu. První takovou látkou byl glycerol. Později bylo potvrzeno působení i jiných neutrálních látek s nízkou molekulární hmotností (Lovelock et Polge 1954). Vhodné složení ředidel je dodnes velmi intenzivně zkoumanou problematikou.

Kryokonzervační techniky se zdokonalují. Od pomalého mražení (technika Planner), kdy až 50 % buněk bylo zničeno krystalky ledu, se přešlo k rychlému zmražení, (technika vitrifikace). Vitrifikace umožňuje bezpečně zmrazit až 75 % buněk. Užívána je pro velice malý objem vzorku (0,1 μ l) u oocytů (neoplozených vajíček) či embryí (stadium blastocysty) a spočívá ve velmi rychlém ochlazení kapičky kryoprotektiva (roztoku obsahujícího velkou koncentraci například sacharózy, dimethylsulfoxidu) s embryem na teplotu kapalného dusíku (-196°C). Kapalina s embryem se změní ve vysoce viskózní až sklovitou hmotu (podobnou svými vlastnostmi například pečetnímu vosku), která je nadále uchovávána v tekutém dusíku v zataveném pouzderku. Před použitím se kapka rychle ohřeje na tělesnou teplotu (devitifikace) a kryoprotektivum se vymyje kultivačním médiem (Roy et al. 2014).

Nejnovější technika (Cryotop) se jeví jako nejšetrnější a skutečně po rozmrazení přežívá bez jakéhokoliv poškození nejvíce buněk (Hajarian et al. 2011).

Standardní postup mražení spermatu hospodářských zvířat je nejčastěji následující: konvenční, kdy je rychlost chlazení asi -0,55 °C/min a rychlost mražení -19,1 °C/min a automatizovaný s chlazením o -0,23 °C/min a mražením -15 °C/min (Louda et al. 2001). Dokladem toho je, že ejakulát lze rozmrazit a zamrazit opakovaně (Arav et al. 2003, Saragustya et al. 2009).

3.2 Ejakulát.

Ejakulát je tvořen složkou buněčnou a nebuněčnou. Plazmu dodávají přídatné pohlavní žlázy ve druhově specifickém množství (Louda et al. 2001) a rozdílném pH, které může kolísat mezi 6,2 až 7,5. (Jelínek et al. 2003). Plazma vytváří pro spermie vhodné prostředí fyziologickou hodnotou osmotického tlaku a pufracími schopnostmi, díky ní jsou spermie schopny transportu, a jsou jí

vyživovány. Plazmu tvoří mimo jiné minerální látky, bílkoviny, cukry, kyselina citronová a askorbová, enzymy a biologicky aktivní složky: prostaglandiny, estrogyeny, androgeny (Jelínek et al. 2003). Marvan et al. (2011) konstatují značné rozdíly v poměru plazmy a spermií u různých taxonů. Podle nich např. všežravci, šelmy a lichokopytníci mají velký objem ejakulátu, ale nižší koncentraci spermií, zatímco přežvýkavci mají poměr opačný, konkrétně skot asi 2 – 10 ml, přičemž v jednom ml je asi 0,2 až 2 miliony spermií. Konkrétně u přežvýkavců, kteří jsou experimentálními živočichy ve zde předkládané práci, odchází sperma jednorázově na konci aktu, předtím však je vyloučen sekret bulbouretrálních žláz, který upraví pH močové trubice. Kvalitní ejakulát obsahuje 10 miliard spermií (Marvan et al., 2011).

3.3 Spermie

Spermie se tvoří v semenotvorných kanálcích varlat. Zde je řada typů vyvíjejících se buněk, které procházejí procesem spermatocytogeneze (vznik haploidních buněk) a spermiogeneze, kdy teprve v poslední fázi vznikají samčí gamety, které postupným průchodem nadvarletem zrají (Sharpe 1994). Během zrání spermií se mění jejich náboj, zralé spermie je mají záporný (Nicolson et al. 1977). Velikost a tvar spermií je druhově rozdílný (Marvan et al. 2011). Plně vyvinuté spermie jsou většinou protáhlé buňky sestávající z hlavičky obsahující jádro, dále z krčku a bičíku, který obsahuje aparát nutný k pohybu (Hafez et Hafez 2000). Spermie mají cílenou funkci, kterou je přenos genetické informace uchované v jádře. Spermie býka, se kterými je proveden experiment této práce, jsou 68,9 – 73,9 μm dlouhé, s oválnou a zploštělou hlavičkou. Ta je 9,11 μm dlouhá a 5,05 μm široká, bičík se skládá z 14,8 μm dlouhé spojovací a 45 - 50 μm dlouhé hlavní části (Věžník et al, 2004).

3.3.1 Struktura samčí pohlavní buňky

Hlavička spermie představuje nadpoloviční hmotnost celé buňky. Skládá se z nukleoplazmy (jádro), struktur nukleárního původu, z akrozomálního systému a postakrozomální čepičky. V jádře je vysoce kondenzovaný chromatin, který je tvořen deoxyribonukleovou kyselinou a komplexem proteinů označovaných jako spermatické protaminy. Struktura jaderné membrány je oproti somatickým buňkám

zjednodušená, v průběhu spermatogeneze se vytrácí komplexy jaderných pórů (Ho et Suarez 2003), celé jádro je obaleno perinukleální thékou tvořenou proteiny s velkým počtem disulfidických můstků (Okó 1995). Počet chromozomů je haploidní (Hafez et Hafez 2000). Na přední části jádra je tzv. čepička (akrozom), která je kryta cytoplazmatickou membránou a pod ní se nachází vnější a vnitřní membrána akrozomální. Molekulární složení akrozomu podrobně popisují Miyazaki et al. (1990) a Tulsiani et al. (1998). Zadní oblast akrozomu je pak označována jako ekvatoriální segment. Tato oblast nese specifické receptory pro oolemu a spermatická membrána v tomto místě splývá s vajíčkem. Distálně od ekvatoriálního segmentu po bázi hlavičky je postakrozomální čapka či oblast (Olson et al. 1983, Gamčík et Kozumplík 1984).

Druhou strukturou spermie po hlavičce je krček, který zajišťuje její propojení s bičíkem. Struktura krčku je velmi podrobně popisována v knize Jonge et Barratt (2006).

Poslední částí spermie je bičík, skládající se z koncové a střední části navazující na krček. Vnitřní strukturu bičíku tvoří axonema a hladké chordy. Část, kde se bičík napojuje, sestává z mitochondriálních obalů, které jsou uspořádány do pravotočivé šroubovice. Mitochondrie zde vytvářejí ca 70 – 80 závitů a jejich povrch je kryt membránou, která se však liší od membrány hlavičky a tvoří se během spermiogeneze později. Podrobněji k vnitřním strukturám a pohybům bičíku například: Bozkurt et Wooley (1993), Inaba (2003), Okó et Clermont (1990), Smith et Yang (2004). Hlavní bičíková část je kryta vazivovou pochvou, která funkčně podporuje stavbu bičíku a jeho pružnost při pohybu (Hafez et Hafez 2000, Věžník et al. 2004).

Pro funkčnost spermie má zásadní význam neporušenost, soudržnost a funkceschopnost (integrita) plazmatické membrány. Povrchová membrána spermie je složena z dvojvrstvy fosfolipidů a její vnější část je kryta glykokalixem. Cytoplazmatická membrána zajišťuje odolnost buňky a je okolo celé hlavičky (Gamčík et Kozumplík 1984, Věžník et al. 2004).

Konkrétní fosfolipidy jsou asymetricky rozloženy na vnitřním a vnějším listu membrány, udržované ATP-dependentními translokázami (Muller et al. 1994). Změna jejich rozložení ukazuje na změnu fyziologického stavu. Známkou počínající apoptózy je u spermie např. přítomnost fosfatidylserinu na vnějším listu

plazmatické membrány (Anzar et al. 2002).

V nefyziologických podmínkách dochází tedy k prostupu vody a extracelulárních iontů membránou, buňka zvyšuje objem. U spermií je citlivá právě membrána a oblast akrozomu, potom mitochondriální struktury a bičík. Testy integrity a testy sloužící k rozlišení živých a mrtvých spermií jsou většinou založeny na vystavení jiné koncentraci roztoku a užití vitálních barviv pronikajících do spermií díky změnám propustnosti membrán (Věžník et al. 2004, viz kapitola 1.6 tohoto přehledu).

3.3.2 Metabolismus spermie

Metabolismus spermií je založen na přítomnosti mitochondrií, které oxidativními procesy energii uvolňují (reakce ATP – ADP). Jako zdroj pro uvolnění metabolické energie se uplatňuje fruktóza, kyselina mléčná, intercelulární plazmalogen a jiné látky z plazmy (Gamčík et Kozumplík 1984). Nosičem energetických zdrojů spermie je skupina 13 proteinů zajišťujících přepravu cukrů a označovaných jako GLUT (Bucci et al. 2011).

Vlastní energie spermií je uvolňována na základě respirace nebo glykolýzy (Věžník et al. 2004). Respirace funguje za přítomnosti kyslíku. Uplatňuje se při kyselina pyrohroznová nebo mléčná, které vstupují do Krebsova cyklu a jejich přeměnou vznikají CO_2 a H_2O . Oxidace za přítomnosti kyslíku je výrazně energeticky účinnější, díky až 38 novým makroergním fosfátovým vazbám získá spermie asi 60 % celkové volné energie spálených cukrů (Gamčík et Kozumplík 1984).

Glykolýza probíhá při nedostatku kyslíku (anaerobně) po vyčerpání vnějších zásob dostupných cukrů pro respiraci (Coronel et al. 2005). Tento proces je důležitý pro přežití spermií v pohlavních cestách samice. Spermie začne rozkládat glukózu, fruktózu či manozu na kyselinu mléčnou či pyrohroznovou (pyruvát) (Vodrážka 2007). Při tvorbě pyruvátu vznikají přenašečové molekuly ATP a NADH. Pyrohroznová kyselina vstupuje do mitochondrií, kde dále reaguje známým biochemickým postupem a vstupuje do Krebsova cyklu (Alberts et al. 1998) a produktem jsou opět CO_2 a H_2O . Předpokládá se, že energie uvolněná po rozštěpení ATP přechází do kontraktilních vláken bičíku spermie a výsledkem je změna molekulového uspořádání tubulinu a následný pohyb (Věžník et al. 2004).

Pokračují-li anaerobní podmínky po delší dobu, vzniká glyko- resp. fruktolýzou větší množství kyseliny mléčné, která se nahromadí a způsobí změnu pH a glykolýzu zastaví – tím je částečně vysvětlována ztráta pohyblivosti spermií.

Konkrétně býčí spermie jsou schopny metabolizovat oběma způsoby a jejich rychlost je velice podobná (Turner 2003).

3.4 Pohyb spermií (motilita)

Významným parametrem kvality spermií je motilita, čili schopnost spermií se pohybovat. K zajištění tohoto pohybu využívá spermie většinu energie získané při metabolických procesech popsaných výše. Uvolněná energie adenosintrifosfátu je transformována do bílkovin kontraktálních vláken bičíku a během procesu dochází k prodlužování a zkracování molekulárního uspořádání, čímž vzniká pohyb (srov. Brokaw et Kamiya 1987, Jonge et Barratt 2006).

Souosý dopředný pohyb zralých spermií určuje bičík, který tlačí spermie za hlavičkou. V ejakulátu, v kapce či nádobě je pohyb spermií nahodilý a neorientovaný, takzvaně vířivý (Věžník et al., 2004). Při ejakulaci je tento pohyb změněn a usměrněn taxí spermií. Ty reagují chemotakticky na vajíčka a kumulární buňky a reotakticky vůči směru proudění tekutiny. Při progresivní orientované fázi pohybu se spermie otáčí kolem své dlouhé osy s frekvencí 3 – 15 otáček za sekundu (Ishijima et al., 1992).

Pohyb spermií je ovlivněn různými faktory: exogenními a endogenními. V případě endogenních faktorů se jedná zejména o věk jedince, celkovou dobu pobytu spermií v nadvarleti, dobu mezi uvolněním (ejakulací) a hodnocením, způsob zrání spermatu, membránový transport, pohyb bičíku, schopnosti receptorů a přítomnost chemických látek. Exogenní faktory zahrnují hydrodynamiku, viskozitu, osmolaritu, pH, teplotu, kvalitu ředidla, atd. Významné je, že motilitu spermií lze záměrně stimulovat, či inhibovat za pomoci různých typů záření či různých chemických látek, například chinonů, sloučenin těžkých kovů nebo anorganických iontů (Věžník et. al. 2004) a velmi jí prostřednictvím poškození pohybového aparátu ovlivňuje koncentrace roztoku, ve kterém se nacházejí (Liu et al. 1998).

Při hodnocení ejakulátu je krom obecného hodnocení pohyblivosti posuzována též rychlost pohybu spermií, protože její snižování indikuje společně

s dalšími ukazateli pokles kvality ejakulátu (Věžník et al. 2004).

3.5 Konzervace ejakulátu.

Ve všech případech, kdy uchováváme ejakulát po delší dobu, je hlavním cílem snaha o udržení jeho životaschopnosti a schopnosti oplození (Louda et al. 2001). Současně usilujeme o získání maximálního množství inseminačních dávek z jednoho odběru, ovšem s takovým počtem spermií, které odpovídá potřebě oplození. Louda et al. (2001) uvádějí, že v inseminační dávce (ID) má být obsaženo asi 10 milionů aktivních spermií. Při předpokládané 30% motilitě po rozmrazení se tak dávky standardně ředí na 30 milionů.

Při jakékoliv konzervaci se projevuje vliv vnějšího prostředí, jemuž jsou spermie vystaveny, účelem konzervace je proto omezit metabolické pochody v co nejkratší době na minimum a uchovat co nejdéle energetický potenciál a elektrický náboj spermií (Kliment et al. 1983). Toho lze dosáhnout například zchlazením. Při nízkých teplotách však spermie savců za běžných podmínek hynou (chladový šok). Toto hynutí souvisí se změnami lipidových struktur membrány. Pozitivní vliv v tomto případě má vyšší podíl cholesterolu. Například u skotu je podíl cholesterolu nízký, a proto jsou spermie býků na nižší teploty choulostivější (Drobnis et al. 1993).

Vlastnosti spermií skladovaných v chladírenských teplotách (4°C) mohou ovlivnit vhodná ředidla, která k nim přidáváme. Při krátkodobé konzervaci spermatu stačí ejakulát uchovat v chladničce mezi 2 až 4°C, kde vydrží 2 dny, úpravou jeho chemického prostředí se použitelnost prodlouží na 4 dny (Louda et al. 2001).

Dlouhodobé hluboké zamražení pak představuje velmi riskantní zákrok pro všechny živé buňky, přesto právě v případě spermatu je tato technologie velmi rozpracována. Jako médium ke zmrazení se užívá tekutý dusík, který udržuje teplotu -196°C a vzorky jsou ukládány v dvouplášťových biokontejnerech z austenické oceli s vnitřní vakuovou izolací.

Jak již bylo uvedeno výše, má kryokonzervace řadu výhod, ale i úskalí. Nevýhodou samozřejmě zůstává úhyn buněk či ztráta některých vlastností (Watson 2000). Ztrátu integrity nebo funkce spermií potvrzuje řada autorů (např. Vera - Munoz et al 2009), i optimální postupy nemusí zajistit vyšší než 50%

úspěšnost (Gordon 2004). Kritická je zejména fáze vlastního zmrazování a rozmrazování. Poškození nastává v důsledku zvýšené koncentrace solí, která roste s tuhnutím vody a vzniká hypertonický roztok, kterému jsou spermie vystaveny, což velmi zatěžuje membránu. Během zmrazování jsou dva kritické momenty, které označujeme jako „solution effects“, Prvním je dehydratace spermie při pomalém zchlazování a druhým tvorba krystalů ledu při zmražení šokovém (Forero – Gonzalez et al. 2012, Louda et al. 2001). Ochlazení proto musí být tak rychlé, aby nedošlo k dehydrataci, ale zase ne tak rychlé, aby uvnitř buňky krystalizoval led. Dalším rizikem může být přechodné zvýšení skladovací teploty. Zde může při teplotách nad -130°C dojít k rekrystalizaci (větší krystalky ledu rostou na úkor drobných a drtí vnitřní struktury buněk).

Nejčastěji postiženou strukturou je plazmatická membrána (Hammerstedt et al. 1990), a to na hlavičce spermie, akrozomu, nebo v místě napojení bičíku (Amann et Picket 1987, Holt et North 1994). V praxi je problém mortality a poškození spermií při a po kryokonzervaci řešen tím, že jsou k inseminaci užívány dávky s mnohonásobně vyšším počtem spermií, než je potřebný (Watson 2000). Tím ovšem nastává problém s efektivitou výroby vysoce kvalitních dávek (Rodriguez – Martinez 1998). Nově byla testována i možnost opakovaného zmrazení po předchozím rozmrazení, a to zřejmě za účelem dalšího rozdělení zamraženého velkého objemu ejakulátu do menších dávek (Arav et al. 2003, Saragusty et al. 2009).

3.6 Posuzování vhodnosti ejakulátu

Pro užití ejakulátu pro kryokonzervaci a následné rozmrazení a oplození je rozhodující jeho kvalita. Nejprve se provádí makroskopické hodnocení (množství, konzistence, objem, pach, eventuálně stanovení koncentrace spermií), poté se hodnotí mikroskopicky (posouzení morfologie spermií, primární a sekundární poškození, zralost spermií).

Při hodnocení ejakulátu z hlediska vhodnosti jeho použití pro kryokonzervaci a předpokladu úspěšné fertilizace po rozmrazení se posuzuje především morfologie spermií a motilita (Hafez et Hafez 2000). Takové hodnocení v širším slova smyslu označujeme nejčastěji jako biologickou zkoušku vhodnosti resp. testy přežitelnosti (srov. Bacinoglu et al. 2008). Nicméně jejich výsledky nejsou zdaleka

směrodatné, např. Louda et al. (2001) upozorňují na pozorované rozdílné výsledky mezi výsledkem testů a skutečnou schopností oplození.

Nejčastěji užívané testy jsou následující:

3.6.1 Základní test přežitelnosti

Nejčastější a nepoužívanější vyšetření spočívá v hodnocení aktivity spermií, procenta živých spermií, stanovení rychlosti pohybu, morfologickém posouzení a posouzení rezistence spermií, jakož i aktivity reduktáz ve výchozím čase 0 a po 2 hodinách (Věžník et al. 2004). Za velmi dobrý je považován ejakulát, který nevykáže rozdíl mezi časy 0 a 2 hodiny, uspokojivý (dobrý) je ejakulát s rozdílem do 10 % v uvedeném čase.

3.6.2 Krátkodobý tepelný test přežitelnosti

Test vychází z faktu, že spermie při vyšších teplotách rychle ztrácejí aktivitu v důsledku spotřebování dostupné metabolické energie. Test není delší než 6 hodin. Ejakulát se zahřeje na 38°C ve vodní lázni a každou hodinu (počínaje výchozím stavem 0) je ze vzorku posouzena aktivita spermií. Louda et al. (2001) doporučují výsledek zapisovat zlomkem, kdy v čitateli je čas od začátku posuzování a ve jmenovateli procentuální údaj o spermatické aktivitě. Za nejlepší jsou posuzovány ejakuláty s větší absolutní délkou životnosti.

3.6.3 Dlouhodobý chladový test přežitelnosti

Test vychází z opačného předpokladu než test předchozí. Po startovním posouzení aktivity se ejakulát uloží do chladničky při 1 – 3°C a následující dny ve stejný čas je na vyhřívací destičce pod mikroskopem opět hodnocena aktivita. Louda et al. (2001) považuje za kritérium použitelnosti udržení alespoň 50% aktivity po dobu 96 hodin.

3.6.4 Hodnocení integrity membrán

Tato vyšetření jsou založena na průniku barviva do buňky, které je velmi závislé na stupni poškození membrán. Stanovován je poměr živých a mrtvých spermií. Plazmatická membrána živé spermie vykazuje polarizovanou a stranově odlišnou stavbu. Projevem životaschopnosti spermie je udržování homeostázy.

Pokud je spermie poškozená, nekrotizuje, či se nachází v apoptóze (programované buněčné smrti), do buňky se dostávají látky, které by jinak membrána nepropustila. Jinými slovy – narušené spermie ochotněji přijímají barvivo, zatímco živé a nepoškozené se nebarví (Věžník et al. 2004). Používaným barvivem je například eosin (Louda et al. 2001) nebo tropanová modř Giemsa (Tartaglione et Ritta 2004, Akhter et al. 2011). Vyhodnocení se provádí po roztěru na sklíčko (Louda et al. 2001).

Jinou variantou ověření funkční integrity membrán vůči prostředí o jiné hustotě je tzv. hypoosmotický bobtnací test HOS (hypoosmotic swelling = test rezistence vůči hypoosmotickému prostředí) a test propidiumjodidem (PI). Pokud je buňka s neporušenou membránou umístěna do hypoosmotického prostředí o odpovídající koncentraci, začne vyrovnávat osmotickou nerovnováhu a zbavovat se vody. To se projeví především na bičíku, který se zkroutí (Jeyendran et al. 1984). Věžník et al. (2004) mimo jiné ověřili korelaci stočených bičíků k počtu živých spermií a určili signifikantní korelační index o hodnotě $r = 0,7819$.

Obecně platí, že plazmatická membrána spermie je vůči osmotickému poškození odolnější než mechanismy odpovědné za pohyb spermií (Liu et al. 1998).

3.6.5 Hodnocení motility

Schopnost spermií se pohybovat je rovněž důležitým kritériem pro hodnocení. Může být posuzována různým způsobem, subjektivně i objektivně, a to opticky (Sozanska et al. 2005), laser-Doppler spektroskopii (Boyers et al. 1989), turbidimetrií (Budworth et al. 1987), fotometrickými metodami (Barros et al. 1973) nebo fotomikrografií propojenou s vyhodnocením za pomoci computeru.

Objektivní hodnocení motility je nejčastěji prováděno za pomoci přístrojového vybavení a různých programů: CASA - Computer-assisted sperm analysis (Mortimer et Mortimer 2013), Hamilton-Thorne sperm analysis a software CEROS 12 (Bencharif et al. 2008, Vera-Munoz et al. 2009). Tyto postupy jsou založeny na opakované časové fotomikrografii spojené s rekonstrukcí spermatické stopy, program algoritmicky zpracovává nejlepší pohybové ukazatele jednotlivých spermií vzhledem k pohybu v mikroskopickém poli a to podle trajektorie hlavičky (Verstegen et al. 2002). Hodnoceny jsou následující parametry pohybu, například

křivočará rychlost (VCL = velocity curvi linear) tj. průměrná rychlost spermie na skutečné dráze od bodu k bodu, rychlost na přímé dráze (VSL = velocity straight linear) tj. rychlost spermie po přímé dráze mezi dvěma body mezi začátkem a koncem měření, vše v μm za s (Verstegen et al. 2002). Z těchto veličin je dále spočtena linearita (VSL/VCL), která se uvádí v %. Index přímocharosti pohybu (STR, straightness index) vyjadřuje v procentech hodnotu poměru VSL/VAP, kde VAP představuje průměrnou rychlost hlavičky spermie na napřímené dráze (average path velocity). Systém CASA dokáže dále hodnotit BCF (beat cross frequency), určující, kolikrát skutečná dráha spermie protla pomyslnou přímou dráhu

z výchozího do koncového bodu měření (Amann et Katz, 2004). Při hodnocení je však nutno mít na paměti, že pohyblivost sama o sobě není dostatečným ukazatelem fyzické schopnosti oplození (Vera-Munoz et al. 2009, Moustacas et al. 2011).

3.7 Ředění a ředidla býčího ejakulátu.

Přežití a uchování spermií v potřebné kvalitě velmi napomáhají různá vícesložková ředidla (obsahují extenderxy protektory a implementory), která jsou do ejakulátu přidávána (Medeiros et al. 2002) a jak již bylo výše zmíněno i různé modifikace postupu procesu zchlazení a zmrazení při užití různého ředění (Vishwanath et Shannon 2000). Například životnost zchlazeného spermatu lze prodloužit snížením pH za pomoci citrátu sodného (žloutkovo citrátové ředidlo). Využívají se i žloutko – mléčná ředidla a dokonce ředidla s využitím sušeného mléka (sunaru).

Funkce jednotlivých komponent jsou definovány takto: Extender zvětšuje objem a chrání, protektor zvyšuje ochranu a zajišťuje vhodnou výživu a implementory jsou saturovány látkami, které působí na pohlavní orgány samic a vylepšují průchodnost spermií (Gamčík et Kozumplík 1992).

Pokud je ejakulát po vyhodnocení uznán vhodným, do 15 min následuje jeho ředění při stejné fyziologické teplotě prostředí i použitých pomůcek. Vhodné ředidlo musí mít pufrální kapacitu, musí udržet osmotický tlak tj. mít optimum solí k vyrovnání osmolarity (Courtens et Re'ity 2001) a navíc musí pufrovat kvůli pH (Anton et Gandemer 1999), působit inhibičně vůči bakteriím (Ball et Peters 2004)

i mít viskozitu vhodnou pro zvolený protokol zamražení a obsahovat kryoprotektivní složky (Amirat et al. 2005). Většinou jde o vodný roztok vhodných látek.

K vytvoření roztoku všech látek slouží destilovaná voda. Pufrační látky jsou citrát sodný, fosfát, Tris – hydroxymethylaminomethan, který se v ředidlech užívá jako Tris-kyselina citrónová (TCA), Tris-Tes (TEST) a Tris-Hepes (HEPEST). Podle Rasula et al. (2000) největší pozitivní efekt na kvalitu spermií má TCA. Pufry mají za úkol udržet pH v rozmezí asi 6,4 – 6,8 (Gamčík et Kozumplík 1984, Ball et Peters 2004). Rovněž se užívají pufry obsahující ionty (zwitterion), které se mohou v různých podmínkách dle prostředí chovat jako kyselina i zásada (Tuli et Hertz 1992).

Soli, které jsou součástí ředidla, musí vyrovnávat osmotické tlaky, tak aby tlak odpovídal nitrobuňčinnému (Amirat et al. 2005). Jde většinou o látky na bázi NaCl (0,9% roztok v poměru 5 : 1).

Významnou složkou jsou látky, které spermie zásobují. Jde o jednoduché cukry (glukóza, fruktóza, manóza, arabinóza). Cukry se velmi liší v možnostech jejich využití spermiemi (Parkinson et al. 2001). Zároveň slouží jako nepenetrující kryoprotektivní látky. Penetrující kryoprotektivní složku představují glycerol či DMSO (dimethylsulfoxid) (Tasdemir et al. 2012).

Na ochranu ejakulátu před infekcemi je ředidlo obohaceno antibiotiky nebo sulfonamidy (Bousseau et al. 1998). Legislativa EU kontroluje, aby užití látky nebyly pro spermie toxické nebo mutagenní.

Glycerol a lipoproteiny či vysokomolekulární látky, jako jsou vaječný žloutek, mléko či rostlinné lipidy pak v ředidlech fungují na ochranu proti tvorbě ledových krystalů (kryoprotektiva), jinými možnými kryoprotektivy jsou etylenglykol či dimethylformamid. Při použití glycerolu spermie vykazují vyšší motilitu, integritu plazmatické membrány i akrozomu, přesto v některých případech až 85 % spermií s glycerolem může vykazovat určitý stupeň abnormalit membrán (Forero-Gonzalez et al. 2012). Účinnou látkou mléka jsou kaseinové micely (Bergeron et Manjunath 2006) eventuálně laktóza (Bergeron et al. 2007). Z rostlinných lipidů se používá sojový lecitin. Výhodou rostlinných komponentů je omezení mikrobiální kontaminace (Aires et al. 2003).

Jako přídavek nebo samostatně jsou v současnosti do ředidel ejakulátu

ověřovány i další alternativní látky, nejenom vysokomolekulární látky vaječného žloutku. Tak Amirat-Briand et al. (2009) či Bencharif et al. (2009) užíli u skotu glutamin a z jejich studií vyplývá velký význam výběru správné koncentrace látek. S glutaminem a cukry u býků dále experimentovali Tuncer et al. (2011). Opakovaně prověřován je vliv trehalózy, například u prasat (Hu et al., 2009), beranů (Tonieto et al. 2010), nebo v kombinaci s taurinem u buvolů (Reddy et al. 2010). U býků byl testován též iodoxanol (Saragusty et al. 2009). Je možné, že kombinace těchto sloučenin s LDL po otestování vhodných dávek a ředění umožní další pokrok v kryokonzervačních technologiích, nicméně jde dosud o málo známou problematiku.

Pro hlubokou kryokonzervaci je dostupno mnoho komerčně vyráběných ředidel. Komerční ředidla ejakulátu užívaná ke kryokonzervaci se vyznačují tím, že obsahují bílkoviny a glycerol. Jde například o extrakty ze soji (AndroMed®, Biociphos®, Bioxcell® a Biladyl®) nebo z odstředěného mléka (Laciphos®) či z vaječného žloutku (Biladyl®, Triladyl®, Optidyl®, Tris). Stále více rozšířené oproti ostatním je dnes použití ředidel na bázi vaječného žloutku (Aires et al. 2003).

3.7.1 Bežloutková ředidla bez živočišné bílkoviny

Používána byla před rozpracováním využití vaječného žloutku a používána jsou v některých případech nadále, protože vaječný žloutek vždy představuje riziko mikrobiální kontaminace, která poškozují oplozovací schopnosti (Bousseau et al. 1998, Van Wagendonk-de Leeuw et al. 2000). Obecnou výhodou bezžloutkových ředidel je čírost, takže je spermie možno dobře studovat pod mikroskopem.

První komerční ředidla bez vaječného žloutku byla Biociphos Plus a AndroMed (viz. Bousseau et Brillard 1994, Hinsch et al. 1997, Müller-Schlosser et al. 1995). V podstatě se jedná o glycerol doplněný sojovou bílkovinou (sojový lecitin) a různými antibiotiky, blíže ke složení AndroMed např. Minitübe (2012), složení Biociphos je neveřejné. Dalším typem komerčního bezžloutkového ředidla je Bioxcell. Navíc jej lze používat jak pro zchlazené, tak pro hluboce zmrazené spermie. Složení je opět firemním tajemstvím, nicméně je na základě předpisů EU potvrzena přítomnost antibiotik Lyncomycinu, Spectinomycinu, Gentamycinu a Tylosinu (Cryo tech 2010).

Nicméně nově jak Beran et al. (2012) tak dříve Muino et al. (2007) potvrzují, že bezžloutková ředidla vykazují horší výsledky než ředidla se žloutkem.

3.7.2 Bezžloutkové ředidlo s živočišnou bílkovinou

Takovým preparátem je Laciphos vyráběný firmou IMV ve Francii. Nevýhodou tohoto preparátu je jak možnost mikrobiální kontaminace, tak zhoršené vyživování spermii, vzhledem k obtížnější metabolizaci laktózy (Parkinson et al. 2001).

3.8 Ředidla s vaječným žloutkem

Výhodou žloutku je jeho velmi dobrá ochranná schopnost proti chladovému šoku (Demianowicz et Strzezek 1996) nevýhodou již zmíněné riziko kontaminace (van Wagtendonk-de Leeuw et al. 2000). Bylo potvrzeno, že mikrobiální riziko užití žloutkového ředidla je totožné s kontaminací žloutku a to i přes obsah antibiotik (Bousseau et al. 1998). Navíc složení vaječného žloutku je nestálé, protože je mimo jiné ovlivněno plemenem a výživou slepic (Hu et al. 2010). Testováno bylo užití žloutku různých druhů ptáků, přičemž nejlepší kryokonzervační vlastnosti pro spermie býka vykázal žloutek holubí (Su et al. 2008), pro buvoly nejlepší výsledky vykázal žloutek kachní (Andrabi et al. 2008). Z praktických důvodů se používá žloutek slepičí.

Příkladem ředidel tohoto typu jsou komerční preparáty Tris, Triladyl nebo Optidyl. Asi komerčně nejúspěšnějším přípravkem je Triladyl, distribuovaný již téměř 35 let s obsahem Tris-kyseliny citrónové, pufru, glycerolu, vody a antibiotik. Před použitím se do roztoku vaječný žloutek přidává. Optidyl se mírně liší složením, na rozdíl od Triladylu obsahuje místo Tylosinu a Gentamicinu Penicilin a Streptomycin, navíc je vaječný žloutek ionizovaný (Cryo tech 2010, Minitübe, 2012).

Tris koncentrát má dvě složky. Obě obsahují vaječný žloutek, první navíc destilovanou vodu a druhá glycerol a antibiotika. Hlavní složkou je tris-hydroxymethylaminomethan, kyselina citrónová a fruktóza.

3.8.1 Ředidla na bázi lipoproteinů o nízké hustotě (LDL)

V sedmdesátých letech Pace et Graham (1974) upozornili, že kryoprotektivita vaječného žloutku je odvislá od přítomnosti lipoproteinů o nízké hustotě (LDL). To je dále ověřováno v novějších studiích, například Moussa et al. (2002) nebo Amirat et al. (2004, 2005), kteří ultracentrifugovali vaječný žloutek a kryokonzervační účinek LDL potvrdili. Vzhledem k tomu, že izolované lipoproteiny vykazují vhodné vlastnosti a lze je sterilizovat např. gama zářením (Pillet et al. 2011), je snaha nahradit jimi užití celého čerstvého žloutku (Sousa et al. 2007).

Lipoproteiny jsou krom živin a fosvitinů hlavní složky žloutku, převládají v plazmě (asi 80 %) a tvoří asi 2/3 sušiny. Hustota LDL je asi 0,982 g/ml (Moussa et al. 2002). Jde o sférické (= kulovité) částice mezi 17 až 60 nm v průměru s jádrem z lipidů neutrálních (triglyceridy, cholesterol). Toto jádro je obklopeno fosfolipidy a apoproteinem (specifickou bílkovinou). Fosfolipidy díky hydrofobní povaze vazeb stabilizují strukturu LDL (Burley 1975), cholesterol pak zvyšuje pevnost.

Obdobně Anton et al. (2003) popisují LDL podrobněji jako sférické útvary s průměrem asi 35 nm, které z 12 % tvoří bílkoviny a z 87 % fosfolipidy, přičemž jádro útvaru je z triglyceridů, cholesterolu a esterů cholesterolu obaleného vrstvou apoproteinů a fosfolipidů. Podle uvedených autorů obsahují LDL pět hlavních apoproteinů z nichž apoprotein 15kDa je považován za nejvíce povrchově aktivní.

Mechanismy působení LDL při kryokonzervaci jsou různé. Popsána je schopnost tvorby komplexů s proteiny semenné plazmy, které blokují vazbu proteinů na membrány spermií a tím pádem omezují vylučování lipidů, které by vedlo ke snížení integrity membrán (Graham et Foote 1987, Parks et Graham 1992). Negativní důsledky odstranění lipidů (zejména cholesterolu) z membrány fluiditu byly zaznamenány řadou předchozích autorů (např. Darin-Bennet et White 1977, White 1993). Narušení membránové integrity (destabilizace membrán) zvyšuje citlivost buněk spermií na chladový šok a následně omezuje motilitu po rozmrazení (Manjunath et al. 2002). Lusignan et al. (2011) testovali popsané vazby a prokázali, že LDL velmi intenzivně váže zejména protein označovaný jako BSP 1. Nauc et Manjunath (2000) již předtím stanovili, že protein BSP 1 je nejdůležitější složkou bílkovin semenné plazmy, kde tvoří 80 % celkového

množství. Wagtendonk – de Leeuw et al. (2000) potvrdili, že interakce LDL a bílkovin semenné plazmy je zprostředkována fosfatidylcholinem, ale zároveň vyvrátili předpoklad, že stejnou ochranu poskytne spermiím každé ředidlo s tímto fosfolipidem. Ukázali, že sojový fosfatidylcholin váže proteiny BSP hůře než ředidla na bázi žloutku.

Jiným mechanismem působení LDL je samotná přilnavost k membráně spermií, kde LDL tvoří ochrannou vrstvu, která sama o sobě chrání buňku v procesu kryokonzervace (Bergeron et al. 2004), navíc dalšími mechanismy ovlivňuje (tj. zvyšuje) koncentrace fosfolipidů a cholesterolu v plazmatické membráně.

Naposledy je nutno připomenout, že LDL ovlivňuje činnost enzymů. Vzhledem k obsahu polynenasycených mastných kyselin v membráně spermií, jsou tyto citlivé na oxidativní stres (Hu et al. 2011). K tomu při kryokonzervaci nutně dochází v důsledku mortality buněk, při kterém se uvolňují volné kyslíkové radikály, které mají tendenci oxidovat mastné kyseliny membrán dosud neporušených spermií. Výsledkem je výrazné omezení až zastavení pohyblivosti spermií (Bilodeau et al. 2001). Uvedení autoři doložili účinek LDL na antioxidantní aktivitu enzymů katalázy, glutathion peroxidázy a redukovaného glutathionu, které oxidaci omezují. Vliv ochranných enzymů byl potvrzen již dříve při hodnocení fertility (Lamirande et al. 1998). Hu et al. (2010) se zabývali i optimalizací množství LDL v ředidle a uvádějí, že 8% obsah LDL je nejefektivnější z hlediska ochrany buněk ve srovnání se 7% a 9%. Již dříve bylo indikováno, že použití LDL ve vyšší koncentraci sice poskytuje vyšší ochranu membránám, ale zároveň vede k významnému snížení motility (Moussa et al. 2002).

3.9 Nejnovější poznatky z užití LDL

Recentně je tedy řadou autorů užití LDL hodnoceno jako vhodné řešení při konzervaci spermatu zmražením. Praktickému ověřování postupů a podmínek pro různé živočichy se věnuje řada studií realizovaných in vitro i in vivo.

Pravděpodobně nejčastěji testovanými jsou turovití, a to jak buvolí, tak turdomácí (Andrabi et al. 2008, Akther et al. 2011, Amirat et al. 2004, 2005, Vera – Munoz et al. 2009, Amirat-Briand et al. 2010, Hu et al. 2010, 2011, Moussa et al. 2002 a další). Testování probíhá též u koní resp. hřebců (Pillet et al. 2011, 2012,

Pojprasath et al. 2011), ovcí resp. beranů (Watson 1981, Moustacas et al. 2011), kozlů (Ali et al. 2008), kanců (Jiang et al. 2007, Hu et al. 2008), psů (Bencharif et al. 2008), makaků (Dong et al. 2011). Lze očekávat testy i u dalších druhů zvířat, například koček, u kterých již byla testována pouze ředidla s obsahem žloutku (Hermansson et Axner 2007).

Amirat et al. (2004) laboratorně ověřili, že LDL lépe uchovávají kvalitu ejakulátu býků i oplodňovací schopnost po zmražení a rozmrazení lépe než komerční extender Optidyl 1. Dále Amirat et al. (2005) zjistili, že LDL chrání spermie býků při hlubokém zamražení lépe než Triladyl a Biociphos a LDL je rovněž možno doporučit pro krátkodobé uchování čerstvého spermatu (testovány byly časy 1, 4 a 24 hodiny). Vera-Munoz et al. (2009) srovnávali vliv ředidel Triladyl, Bioxcell a LDL na vzorky býčího ejakulátu o nízké koncentraci spermií a potvrdili při užití LDL lepší zachování integrity membrán spermií než u obou komerčních preparátů. Amirat-Briand et al. (2009) testovali kombinaci glutaminu a LDL s cílem ověřit pozitivní vliv glutaminu a najít optimální ředění. Prokázali kryokonzervační účinek glutaminu, ale pouze při vhodné koncentraci. V koncentraci vyšší nebo nižší než optimum vede jeho užití s LDL k zhoršení parametrů motility. Amirat-Briand et al. (2010) pak dále testovali LDL přímo v terénu při umělých inseminacích krav a nezjistili žádné významné rozdíly mezi mírou úspěšnosti při jejich využití a při aplikaci standardního Tris vaječného ředidla. Vhodnost LDL pro kryokonzervaci spermatu beranů potvrdili Moustacas et al. (2011), ale ti zároveň zjistili, že se musí jednat o LDL přírodní a nikoliv konzervované lyofilizací, která narušuje jejich ochranné schopnosti. Obdobně Pillet et al. (2011) hlásí, že plazma vaječného žloutku (tedy v podstatě LDL) má potenciál nahradit žloutek v ředidlech spermatu hřebců a zároveň potvrzují možnost její předchozí sterilizace gama zářením. Plodnost klisen na jeden cyklus v rámci jejich experimentu byla 60 % po inseminaci s ředidlem na bázi vaječného žloutku a 69 % s ředidlem na bázi sterilizované žloutkové plazmy (= LDL). V další studii se Pillet et al. (2012) věnují ověření použití liposomů z fosfolipidů vaječného žloutku a potvrzují je jako alternativu k nahrazení celého žloutku v mrazících ředidlech ejakulátu koňovitých.

Akhter et al. (2011) testovali LDL v různé koncentraci pro kryokonzervaci spermatu buvolů, Hu et al. (2010, 2011) pak hledali optimální koncentraci LDL pro

skot. Při 10% koncentraci LDL v ředidle prokázali Akhter et al. (2011) vylepšení úspěšnosti zamražení a následné plodnosti a tuto koncentraci považují za optimální pro buvola. Na druhé straně Hu et al. (2011) optimalizovali koncentraci LDL pro skot na 8 %. Jiang et al. (2007) realizovali pilotní studii u kanců a krom toho, že prokázali vliv plemene na rozdíly v postižení spermií při kryokonzervaci s LDL, stanovili optimální koncentraci na 9 %. Bencharif et al. (2008) testovali různé koncentrace LDL u psů a potvrdili jeho pozitivní vliv v porovnání s klasickými médii. Nicméně jako optimální koncentraci stanovili médium s 6 % LDL. Pillet et al. (2012) u hřebců navrhuje 4 %. Pro různé živočišné druhy jsou rozdílné optimální koncentrace a před užitím LDL je toto pro každý druh zvláště nutno otestovat.

Poněkud v rozporu s pozitivními výsledky užití LDL stojí Dong et al. (2011), kteří v případě makaků nezjistili výrazný rozdíl v úspěšnosti užití LDL vůči kompletnímu vaječnému žloutku a naznačují, že pro ředidla opičího spermatu může být nadále výhodné u žloutku setrvat.

4 Metodika

4.1 Zpracování ejakulátu

Celkem bylo pro experiment použito 8 býků. Ejakulát pro vlastní práci byl získán na inseminační stanici Natural s. r. o., Hradištko pod Medníkem. Veškeré postupy týkající se manipulace a procesu kryokonzervace byly prováděny na základě standardů inseminační stanice. K následnému hodnocení byl použit pouze ejakulát s aktivitou vyšší než 70 % a hustotou vyšší než $0,7 \times 10^9$ ml. Mimo tyto ukazatele byla rovněž provedena senzorická kontrola ejakulátu - přítomnost cizorodých přímísenin, zápach.

Ejakulát byl naředěn příslušným ředidlem v takovém poměru, aby výsledná koncentrace byla $30 \times 10^6/0,25$ ml a 10 minut homogenizován. Takto připravené vzorky byly na automatickém plnicím zařízení plněny do pejet o objemu 0,25 ml. Poté proběhla ekvilibrace při 4 °C po standardní dobu 2 h. Po uplynutí doby ekvilibrace byly vzorky zmrazeny v počítačem řízeném mrazícím přístroji Mini-Digitcool (IMV Technologies, Francie). Pro zmrazovací proces byla použita standardní mrazicí křivka. Po dosažení teploty – 140 °C byly pejety vloženy přímo do tekutého dusíku. Vlastní experiment byl poté realizován v laboratoři Katedry veterinárních disciplín ve spolupráci s Katedrou speciální zootechniky FAPPZ.

4.2 Příprava ředidel

V rámci experimentu byla užitá dvě komerčně vyráběná ředidla, běžně dostupná na českém trhu, jedno bez obsahu vaječného žloutku, druhé s jeho obsahem. Konkrétně se jednalo o Triladyl, který se bezprostředně před ředěním obohatí o vaječný žloutek a AndroMed, který je na bázi sojového lecitinu.

Příprava ředidel probíhala dle návodů jednotlivých výrobců v den odběru ejakulátu. Ředidla byla připravena bezprostředně před začátkem experimentu. Před samotným ředěním došlo k zahřátí ředidel na teplotu 38 ± 1 °C.

4.2.1 AndroMed

Toto bezžloutkové ředidlo vyrábí společnost Minitube International. V uvedeném ředidle není živočišná složka. Je dodáváno ve dvou variantách

v lahvičkách o objemu 200 ml a 100 ml. V experimentu byla užitá jednostupňová varianta (200 ml) již obsahující antibiotika (100 ml balení je má dodávána zvlášť). AndroMed umožňuje jak krátkodobé uložení čerstvého spermatu tak i dlouhodobě konzervovat jeho potřebné inseminační dávky. Jeho příprava proběhla smíšením dodaného množství přípravku s 800 ml redestilované vody. Hlavní složky tohoto ředidla tvoří rostlinné fosfolipidy, Tris, kyselina citronová, cukry, antioxidanty, pufrý, redestilovaná voda a antibiotika (Tylosin, Gentamycin, Spectinomycin, Lincomycin; množství antibiotik je v souladu s nařízením EC 88/407). Pro zjištění účinku LDL byla do standardně připraveného ředidla tato sloučenina přidána v koncentracích 4, 6, 8 %.

4.2.2 Triladyl

Triladyl obsahuje vaječný žloutek a dodává jej společnost Minitübe (Německo). Barva je čirá a objem balení 0,5 l lahvičky, doporučené podmínky skladování od výrobce jsou 5 °C. Složkami ředidla jsou Tris, glycerol a antibiotická složka - streptomycin, penicilin, lincomycin a spectinomycin.

Vlastní ředidlo je připraveno k použití smísením dodávaného objemu s třičtvrtě litrem redestilované vody a přefiltrovaného vaječného žloutku (20 % objemu), který byl získán mechanickým oddělením od bílku. Pro ředění kontrolních vzorků bylo použito standardně připravené ředidlo s obsahem vaječného žloutku. V experimentálních variantách byl žloutek nahrazen 6, 8, 10 % LDL.

4.2.3 LDL (low - density lipoprotein)

LDL byly připraveny firmou Hena s. r. o. dle metodiky Moussa et al. (2002) z vajec pocházejících od společnosti Biopharm. V rámci této metody byl vaječný žloutek nejprve zbaven albuminu, a to ručně, koulením na filtračním papíru za účelem oddělení endospermu a chalaze. Vitelinní membrána byla narušena skalpelem a vaječné žloutky byly uloženy do kádinky a udržovány zchlazené v ledničce při 4°C. Dále byla plazma vaječného žloutku zředěna 0,17 M roztokem chloridu sodného a pak při 4°C mixována po dobu jedné hodiny. Po centrifugaci při 10,000 x g po dobu 45 minut při 4°C byl odstraněn supernatant a postup byl opakován. Hlavním cílem tohoto odstředění bylo oddělit granule vaječného žloutku od plazmy. Separovaná plazma byla skladována při teplotě 4 °C. K odstranění

livetinu bylo přidáno 20,5 g síranu amonného do 100 ml plazmy, a tato směs míchána po dobu jedné hodiny při pH 8,7 a teplotě 4 °C. Livetiny byly následně odděleny rovněž centrifugací při 10,000 x g po dobu 45 minut. Supernatant bohatý na LDL byl dialyzován 10 hodin za účelem odstranění síranu amonného a selektivní koagulace LDL. Na konci dialýzy byla směs opět centrifugována při stejných parametrech centrifugace a výsledný sediment, který obsahoval LDL s 97% čistotou ve formě pelet byl uložen a skladován při 4°C.

4.3 Hodnocení kvalitativních parametrů ejakulátu po rozmrazení

4.3.1 Hodnocení rychlosti pohybu spermií

Kryokonzervované inseminační dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni (37 °C) po dobu 30 s a přidány k 500 µl vytemperovaného fyziologického roztoku. Po pěti minutách v 37°C, nutných pro disperzi spermií v roztoku, byly ze vzorků odebrány 3 µl a podvrstveny na vytemperovanou počítací komůrku sklíčka Leja®. Hloubka komůrky je 20 µm v 6 polích na jeden vzorek – tzv. kalibrované počítání na vyhřevné desce stereomikroskopu. Vzorky ve fyziologickém roztoku se dále ponechaly v 37°C po dobu dvou hodin a po jemném promíchání se z nich opět odebraly 3 µl a provedlo se hodnocení motility.

Parametry motility hodnocené systémem CASA (Computer assisted sperm analysis) byly VAP (µm/s), tedy průměrná rychlost hlavičky na napřímené dráze, sloužící k plynulejšímu vyjádření pohybu, VCL (µm/s) tedy rychlost hlavičky spermie na skutečné dráze, a VSL (µm/s), průměrná rychlost měřená přímkou od začátku do konce jedné stopy. U každého vzorku bylo snímáno 6 obrazů, které pak byly algoritmicky zpracovány.

Hodnoty se zapisovaly do tabulky a následně byly statisticky vyhodnoceny. Motilita spermií byla na KVD posuzována s využitím software CASA (NIS Elements Ar 3. 2.) za použití kamery Imaging Source a stereo mikroskopu (Nikon Eclipse E600) na vyhřívané podložce (Tokai Hit). Parametry motility hodnocené systémem CASA (Computer assisted sperm analysis) byly VAP (µm/s), tedy průměrná rychlost hlavičky na napřímené dráze, sloužící k plynulejšímu vyjádření pohybu, VCL (µm/s), tedy rychlost hlavičky spermie na skutečné dráze, a VSL (µm/s), průměrná rychlost měřená přímkou od začátku do konce jedné stopy. U každého

vzorku bylo snímáno 6 obrazů, které pak byly algoritmicky zpracovány.

4.3.2 Hodnocení výskytu nepohyblivých spermií

Na základě parametrů motility vyhodnocených pomocí CASA bylo stanoveno procento nepohyblivých spermií, jinými slovy tedy procento motilních spermií v jednotlivých vzorcích. Jako ukazatel rovněž významný z hlediska kvality spermií po rozmrazení doplňuje parametry rychlosti vypočítané softwarem CASA.

Po exportu výsledků z CASA do MS Excel byly spermie s parametrem motility VAP nižším než 10 $\mu\text{m/s}$ vyfiltrovány jako nepohyblivé a bylo vypočítáno jejich procento z celkového počtu ve vzorku.

4.3.3 Hodnocení viability spermií

Pro hodnocení podílu živých a mrtvých spermií (viabilita) byla použita metoda dle Harrison et Vickers (1990). Byly použity fluorochromy propidium iodid (PI) a karboxy-fluoresceindiacetat (CFDA). PI se jako interkalační činidlo váže na volné báze DNA a značí tak mrtvé spermie červenou barvu. CFDA je po prostoupení membránou do živé spermie aktivováno pomocí enzymů esteráz a buňky tak emitují zelené fluorescenční záření. Pro fixaci spermií byl použit 0,3 % roztok formaldehydu ve fyziologickém roztoku. Nafixovaný vzorek s fluorochromy byl inkubován po dobu 10 min při 37°C za nepřístupu světla, řádně homogenizován a 8 μl bylo přeneseno na podložní sklíčko a zamontováno. Vzorky byly hodnoceny v tripletech, přičemž v každém vzorku bylo hodnoeno 200 spermií. Hodnocení probíhalo pomocí fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse E600).

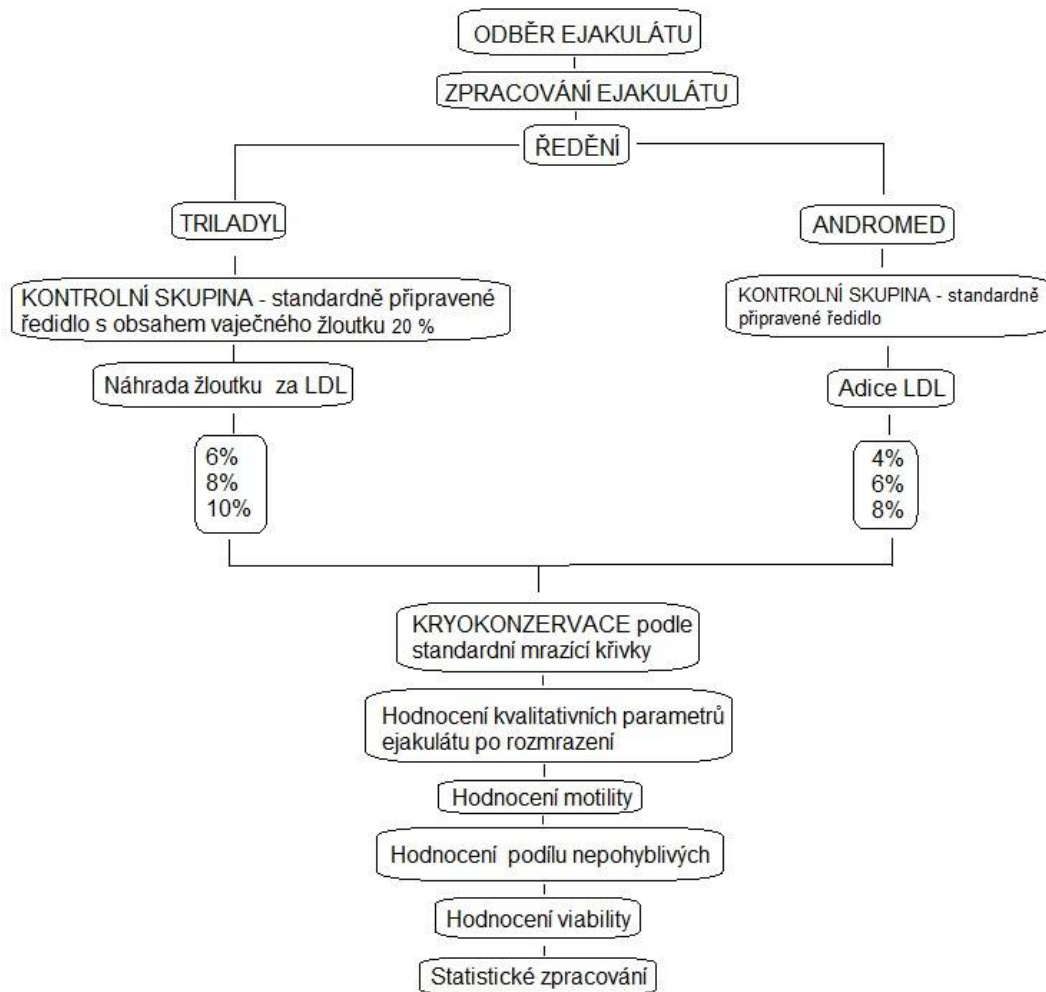
4.3.4 Statistické zpracování

Získané hodnoty parametrů motility byly přeneseny z CASA programu do programu MMS Excel, utříděny a zkontrolovány pro svou úplnost. Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistika CZ 12. Pro zhodnocení dat byla použita vícefaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s Schéffeho post-hoc testem. Jako kontinuální závislé proměnné byly hodnoceny hodnoty VAP, procento nepohyblivých spermií a podíl živých spermií v závislosti na faktoriálních nezávislých proměnných ředidla (AndroMed a Triladyl s různou koncentrací LDL)

a času (inkubace v hodině 0 a 2). Analýza probíhala na hladině významnosti $p < 0,05$.

4.4 Design experimentu

Design experimentu ukazuje schema na obrázku č. 1.



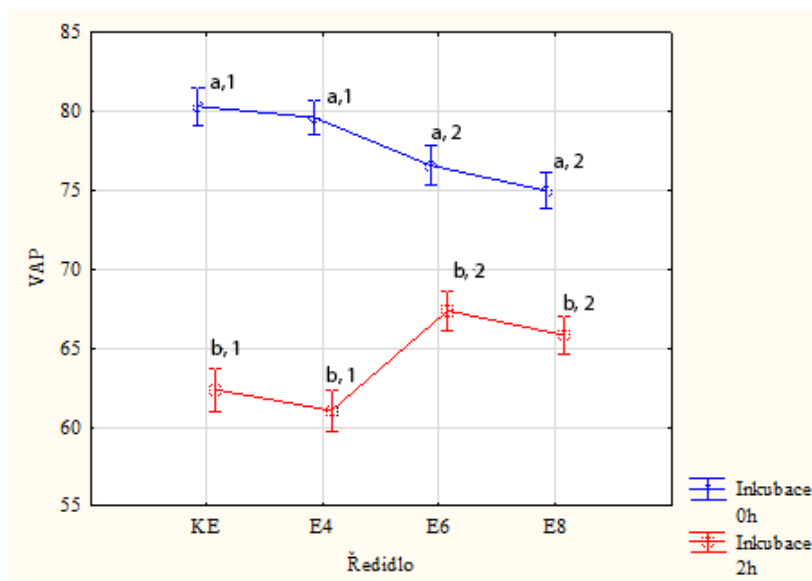
Obrázek č.1: Schéma experimentu diplomové práce.

5 Výsledky

5.1 Hodnocení rychlosti pohybu spermií

Výsledek analýzy VAP pro AndroMed ukazuje graf č. 1. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla zamítnuta nulová hypotéza, která zněla, že neexistují statisticky významné rozdíly v rychlosti spermií na napřímené dráze (VAP) v závislosti na délce inkubace po rozmrazení a % přidaného LDL do ředidla AndroMed. Byla tedy přijata alternativní hypotéza, která tvrdí, že statisticky významné rozdíly existují. Přídavek LDL tedy ovlivnil vlastnosti ředidla a jeho působení na spermie.

Graf č. 1: Rychlost pohybu spermií na napřímené dráze (VAP v $\mu\text{m/s}$) v závislosti na % přidaného LDL v ředidle AndroMed a délce inkubace po rozmrazení. (KE – kontrolní vzorek, ředidlo bez LDL, E4 – ředidlo s 4 % LDL, E6 – ředidlo s 6 % LDL, E8 – ředidlo s 8 % LDL).



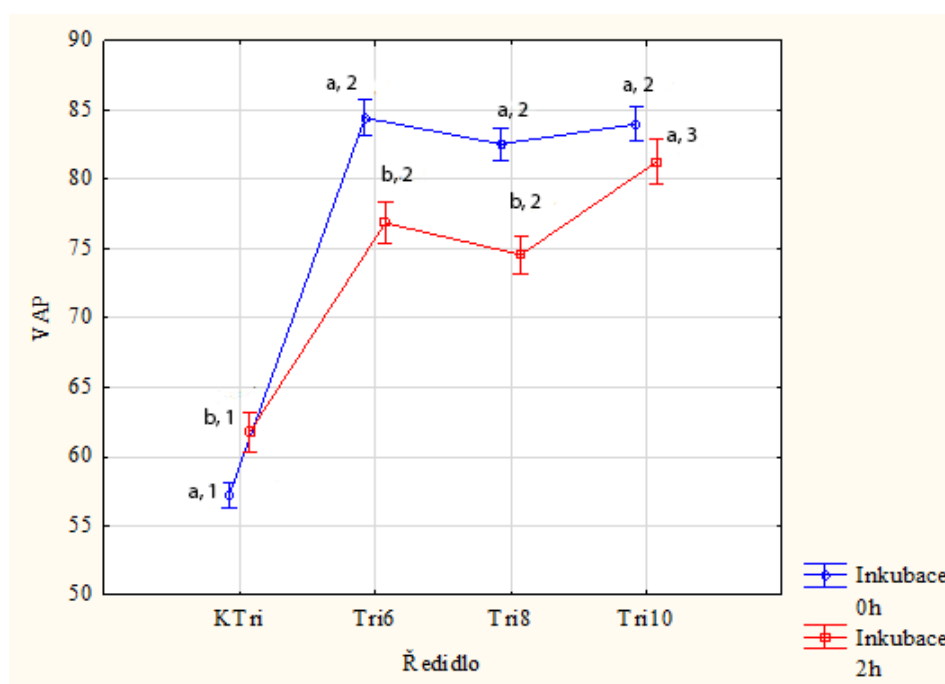
Vertikální úsečky vyznačují 0,95% intervaly spolehlivosti

a; b – hodnoty označené shodným indexem se pro daný typ ředidla a rozdílnou délku inkubace statisticky významně neliší (ANOVA, $p < 0,05$)

1, 2 – hodnoty označené shodným indexem se pro danou délku inkubace mezi jednotlivými typy ředidla statisticky významně neliší (ANOVA, $p < 0,05$)

Pomocí Schéffeho testu byl prokázán významný pokles rychlosti pohybu spermií po 2 hodinách inkubace ve všech variantách ředění. Současně ředidla se 6 a 8% přídavkem vykazovala výrazně pomalejší pohyb po rozmrazení, ale současně významně vyšší rychlost pohybu po 2 hodinách inkubace oproti kontrole a variantě se 4 % LDL. Po rozmrazení vykazovala nejvyšší hodnoty kontrola, avšak po uplynutí 2 hodin inkubace vykazovala nejrychlejší pohyb varianta s koncentrací 6 % LDL. Příslušné tabulky statistických výstupů jsou součástí příloh (příloha 1 - 4).

Graf č. 2: Rychlost pohybu spermií na napřímené dráze (VAP v $\mu\text{m/s}$) v závislosti na % přidaného LDL v ředidle Triladyl a délce inkubace po rozmrazení. (KTri – kontrolní vzorek, ředidlo bez LDL, Tri6 – ředidlo s 6 % LDL, Tri8 – ředidlo s 8 % LDL, Tri10 – ředidlo s 10 % LDL.



Vertikální úsečky vyznačují 0,95% intervaly spolehlivosti

a; b – hodnoty označené shodným indexem se pro daný typ ředidla a rozdílnou délku inkubace statisticky významně neliší (ANOVA, $p < 0, 05$)

1, 2 – hodnoty označené shodným indexem se pro danou délku inkubace mezi jednotlivými typy ředidla statisticky významně neliší (ANOVA, $p < 0, 05$)

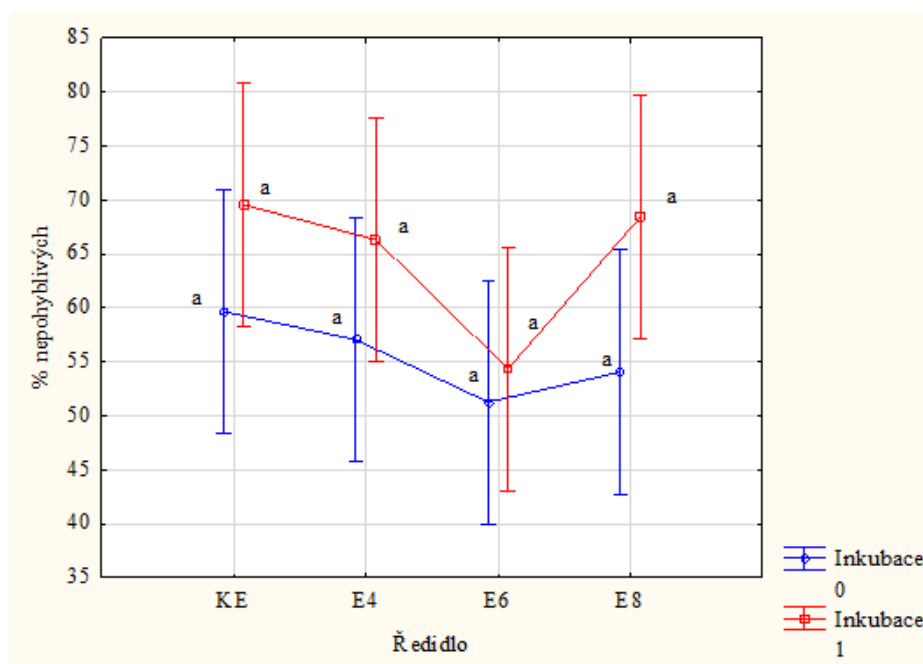
Výsledek analýzy VAP pro Triladyl ukazuje graf č. 2. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla zamítnuta nulová hypotéza, která zněla, že neexistují statisticky významné rozdíly v rychlosti spermií na napřímené dráze (VAP) v závislosti na délce inkubace po rozmrazení a % přidaného LDL do ředidla Triladyl. Byla přijata alternativní hypotéza, která tvrdí, že statisticky významné rozdíly existují.

Rychlost pohybu se u kontroly po 2 hodinách inkubace zvýšila, zatímco u experimentálních variant došlo k poklesu hodnot. Kromě varianty s 10% LDL byla tato změna statisticky významná. Hodnoty VAP kontrolních vzorků byly vysoce signifikantně nižší oproti experimentálním variantám. Hodnoty VAP se po rozmrazení významně nelišily, po 2 hodinové inkubaci vykazovala varianta s 10 % LDL významně vyšší hodnoty oproti variantám s 6 a 8 %.

5.2 Hodnocení podílu nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace

Zastoupení nepohyblivých spermií při použití ředidla AndroMed ukazuje graf č. 3. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla zamítnuta nulová hypotéza, která zněla, že neexistují statisticky významné rozdíly % nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace. Nicméně následný Shéffeho test nepotvrdil významnost rozdílu mezi jednotlivými hodnocenými variantami. Z výsledků je patrný trend k nižšímu podílu nepohyblivých spermií u varianty s 6 % LDL oproti ostatním variantám včetně kontroly, zejména po 2 hodinové inkubaci.

Graf č. 3: Procento nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace v ředidle AndroMed. (KE – kontrolní vzorek, ředidlo bez LDL, E4 – ředidlo s 4% LDL, E6 – ředidlo s 6% LDL, E8 – ředidlo s 8% LDL).

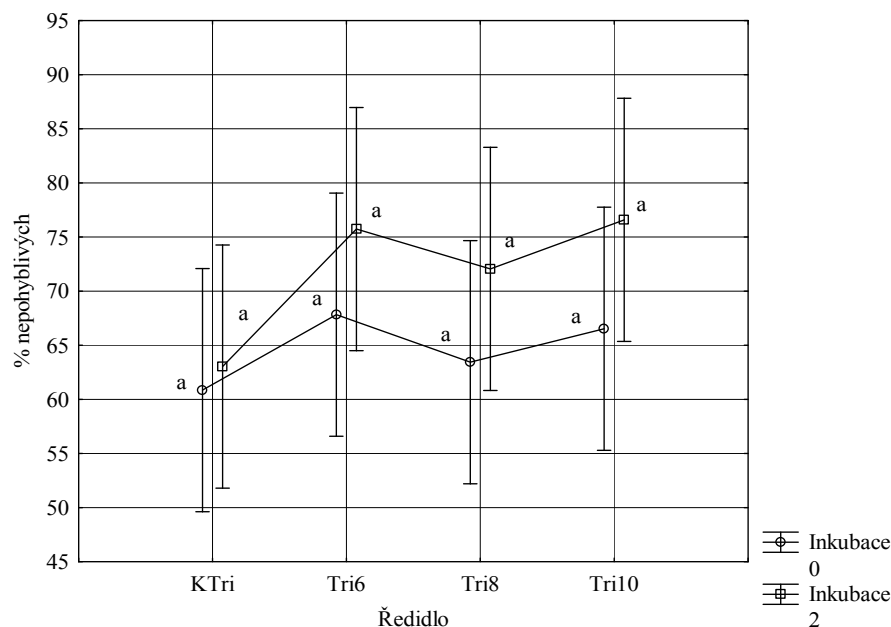


Vertikální úsečky vyznačují 0,95% intervaly spolehlivosti

a; b – hodnoty označené shodným indexem se statisticky významně neliší (ANOVA, $p < 0,05$)

Zastoupení nepohyblivých spermií při použití ředidla Triladyl ukazuje graf č. 4. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla přijata nulová hypotéza, která zněla, že neexistují statisticky významné rozdíly v % nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace. Z výsledků je patrný nevýrazný trend k nižšímu podílu nepohyblivých spermií u kontroly, případně u varianty s 8% LDL oproti ostatním variantám, zejména po 2 hodinové inkubaci.

Graf č. 4: Procento nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace v ředidle Triladyl. (KTri – kontrolní vzorek, ředidlo bez LDL, Tri6 – ředidlo s 6% LDL, Tri8 – ředidlo s 8% LDL, Tri10 – ředidlo s 10% LDL).



Vertikální úsečky vyznačují 0,95% intervaly spolehlivosti

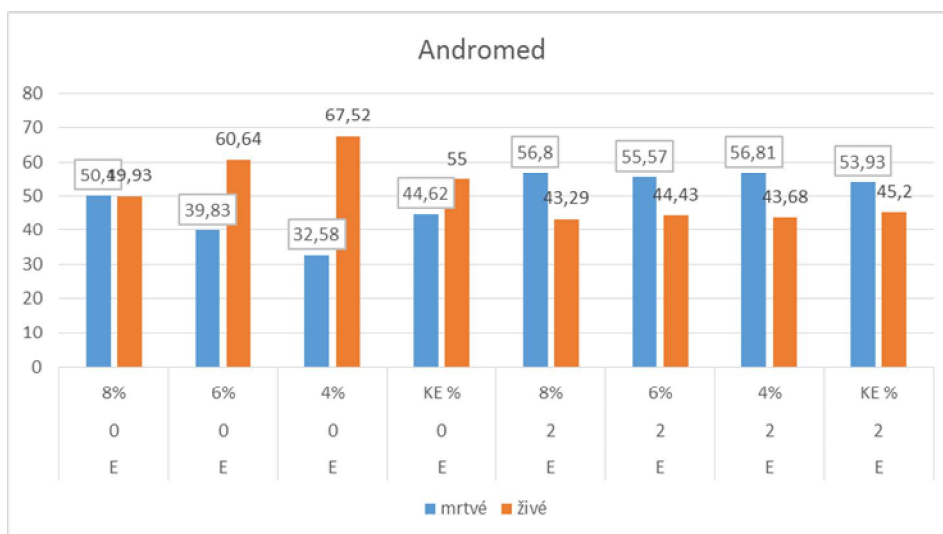
a; b – hodnoty označené shodným indexem se pro daný typ ředidla a rozdílnou délku inkubace statisticky významně neliší (ANOVA, $p < 0,05$)

5.3 Hodnocení viability spermií

Poměr živých a mrtvých spermií při použití ředidla AndroMed ukazuje graf č. 5. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla zamítnuta nulová hypotéza, která zněla, že neexistují statisticky významné rozdíly v poměru živých a mrtvých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace.

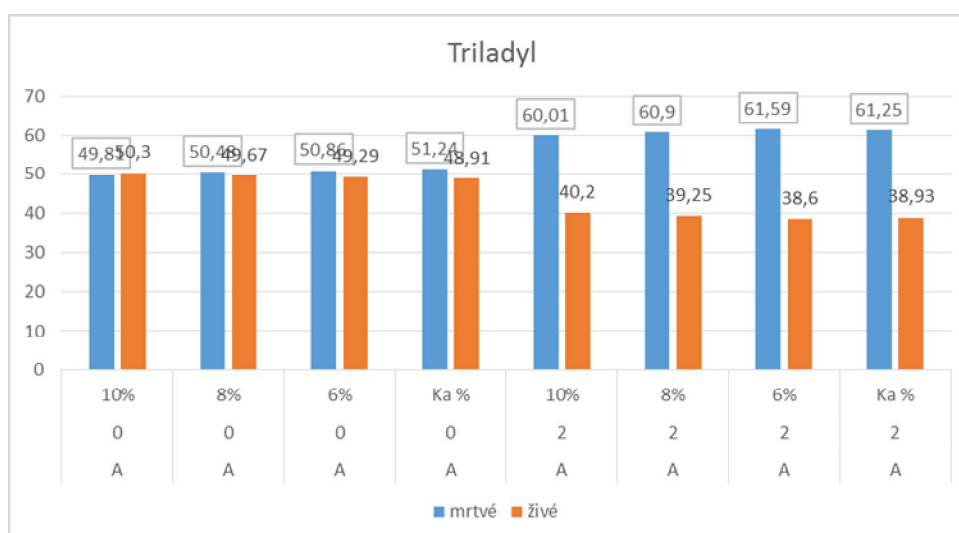
Po rozmrazení je patrný signifikantně vyšší podíl živých spermií ve variantách s přidavkem LDL oproti kontrole, přičemž varianta se 4% LDL vykazovala průkazně vyšší hodnotu než zbývající experimentální varianty. Po 2 hodinách inkubace podíl živých spermií významně poklesl ve všech variantách ředidel. Hodnoty kontroly i všech experimentálních skupin byly prakticky identické.

Graf č. 5. Poměr živých a mrtvých spermií v závislosti na koncentraci LDL (4, 6, 8%) a době inkubace (0 a 2 h) v ředidle AndroMed.



Poměr živých a mrtvých spermií při použití ředidla Tril ukazuje graf č. 6. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ byla zamítnuta nulová hypotéza, která zněla, že neexistují statisticky významné rozdíly v poměru živých a mrtvých spermií v závislosti na koncentraci LDL a době inkubace.

Graf č. 6. Poměr živých a mrtvých spermií v závislosti na koncentraci LDL (6, 8, 10%) a době inkubace (0 a 2 h) v ředidle Triladyl.



Zastoupení živých a mrtvých spermií je v jednotlivých časech inkubace vyrovnané, po 2 hodinách inkubace došlo k průkaznému poklesu podílu živých spermií ve všech experimentálních variantách i kontrole.

6 Diskuse

Přídavek LDL s předpokládaným vlivem na kryoprotektivní vlastnosti ředidel ověřovalo v nedávné době množství autorů (např. Amirat et al. 2004; Hu et al. 2010; 2011; Moussa et al. 2002). V těchto a dalších studiích je velká pozornost věnována vhodné koncentraci použitého LDL dodatku. Konkrétně Amirat et al. (2004, 2005), Hu et al. (2010, 2011), Moussa et al. (2002) a Vera-Munoz et al. (2009) uvádějí jako nejlepší koncentraci dodaných LDL 8% (případně 10%). Tyto koncentrace vykazují nejvyšší motilitu a membránovou integritu spermií po rozmrazení. Jenže pouze Amirat et al. (2005), Moussa et al. (2002) a Vera-Munoz et al. (2009) použili pro test bezžloutkové ředidlo, jmenovitě se jednalo o Bioxcell. AndroMed na vliv přídavku LDL zatím nikdy testován nebyl.

Experiment realizovaný v rámci této studie měl rozšířit naše znalosti o vlivu LDL a zpřesnit podmínky pro jeho použití s dvěma různými ředidly, bezžloutkovým AndroMedem a ředidlem s přídavkem žloutku, Triladylem. Výsledek více méně potvrzuje předpoklad, že účinek LDL je patrný spíše u ředidla, které v původní receptuře vaječnou složku nemá, tedy v Andro Med, který je více autory považován za jedno z nejlepších ředidel býčích inseminačních dávek vůbec (Jannet et al. 2005; Stradaoli et al. 2007), byť je také jedním z nejdéle užívaných (Bousseau et Brillard 1994, Hinsch et al. 1997, Müller-Schlosser et al. 2001). V našem pokusu vykázal AndroMed vysokou hodnotu parametru VAP, především v čase 0. Po 2 hodinách vykazoval tento parametr při všech rozdílných koncentracích výrazně nižší hodnotu, přičemž 6% dodatek LDL udržel nejvyšší hodnotu tohoto parametru. To dobře koresponduje s výsledkem stanovení procenta nepohyblivých spermií v dalším sledování této studie, kdy v čase 0 i 2 h bylo nejméně nepohyblivých spermií právě při 6% LDL. Toto pozorování by bylo možno jinými slovy opsat, že v AndroMed s přidanými 6% LDL si schopnost pohybu uchovává nejvíce spermií, avšak hýbou se pomaleji. Mohlo by se jednat o optimální rychlost pohybu. Být se předpokládá, že snižování rychlosti pohybu indikuje pokles kvality ejakulátu (Věžník et al. 2004), nelze hodnotit jen pohyb. Otázkou totiž je, zda vysoká hodnota kritéria VAP sama o sobě může být dobrým indikátorem oplození. Jak vyplývá ze závěrů Vera-Munoz et al. (2009) či Moustacas et al. (2011) tomu tak skutečně není. Navíc pozorováním z jiné oblasti přírodních věd (testy toxicity) lze doložit, že aktivita drobných organismů na

buněčné úrovni se výrazně zvyšuje (běhají rychleji) v nevyhovujících podmínkách prostředí (Svobodová et al. 1987, Vrabec pers. comm.). Po tomto vzepětí následuje postižení nebo úhyn. Pokud přistoupíme na tento předpoklad, pak nápadně vysoké hodnoty VAP mohou indikovat právě blízkou buněčnou smrt. Je třeba si rovněž připomenout, že rychlejší pohyb znamená vyšší hladinu metabolismu a tím dřívější vyčerpání dostupných zásob nebo kyslíku (Coronel et al. 2005). Anaerobní metabolismus zvyšuje koncentraci kyseliny mléčné a ta ovlivní pH, což je uváděno jako jeden z důvodů ztráty pohyblivosti spermií (Věžník et al. 2004).

Z tohoto důvodu je nápadné výrazné zvýšení VAP při jakékoliv koncentraci přidaných LDL, které bylo pozorováno u Triladylu, v čase 0 i po 2 hodinách. Po 2 hodinách byla nejvyšší hodnota VAP v Triladylu s 10% LDL (graf č. 2), ale zároveň při této koncentraci a čase bylo také nejvyšší procento nepohyblivých spermií (graf č. 4). To by svědčilo pro výše navržený výklad: Poslední hýbající se spermie se pohybují velmi rychle a roste procento nepohyblivých, čili přídavek LDL zde nemusí být pozitivní z hlediska kvality inseminační dávky. Triladyl navíc vykázal nejnižší procento nepohyblivých spermií v čase 0 i po 2 h u kontroly bez LDL. Jakýkoliv přídavek LDL procento nepohyblivých spermií zvýšil. Tento jev však nemusí být charakteristický a na základě několika málo jedinců býků užitých v pokusu jej nelze generalizovat. Dosud známé údaje o parametrech motility potvrzují, že u žlutkových ředidel je motilita obecně vyšší (Moussa et al., 2002; Vera-Munoz et al., 2009; Hu et al., 2010). Na druhé straně však musíme upozornit na možnou metodickou chybu. V připravovaném Triladylu byl výrobcem doporučený celý žloutek v případě přidaných LDL těmito substituován místo, aby LDL byla dodána do ředidla, ve kterém již žloutek byl. Použitý postup mohl mít vliv na dosažený výsledek a pravděpodobně bude třeba další série pokusů k ověření. Taktéž nemůžeme zcela vyloučit vliv exogenních i endogenních faktorů.

Faktorem, který má vliv na zjištěnou motilitu je nízká koncentrace spermií v inseminační dávce (Vera-Munoz et al. 2009). Amirat et al. (2005), Hu et al. (2010) a Moussa et al. (2002); použili ředění spermatu na koncentraci 120×10^6 spermií/ml, kdežto v této studii je ejakulát ředěn na 30×10^6 spermií/ml. Jde o čtyřnásobný rozdíl. K variabilitě výsledku mohlo také dojít v důsledku plemenné příslušnosti či individuální variability býků, od kterých byl získán ejakulát. Vliv také

mohlo mít plemeno slepic, od kterého byly získány žloutky pro přípravu LDL (Bathgate et al., 2006). Samotné zhodnocení motility je sice významným nástrojem v posouzení kvality ejakulátu (Verstegen et al. 2002), ale oplozovací schopnost spermií je dána i jinými vlastnostmi, které vypisuje Amann (1989). Motilita tak nesmí být užitá jako jediné kritérium kvality ejakulátu.

Zajímavé je pozorování účinku přídatku LDL po 2 hodinách inkubace, kde v případě AndroMed již výše zmíněná 6% koncentrace ukázala nižší procento nepohyblivých spermií než kontrola v čase 0. Na tomto příkladě lze ilustrovat další úkol pro navazující výzkum, který by mohl zpřesnit inseminační postupy, a to je stanovení přesného postupu časového – tj vymezení optimální časové periody pro to které ředění LDL pro provedení inseminace, protože i zde může být vliv na oplozovací schopnost značný. Teoreticky jde např. u Triladylu o vystihnutí fáze, kdy je nejvyšší vhodná motilita, ale ještě je přijatelné procento nepohyblivých spermií, tak aby se zvýšila pravděpodobnost oplození a zabřeznutí.

7 Závěr

Přídavek LDL výrazně zlepšil kryoprotektivní vlastnosti AndroMedu, zvláště pokud šlo o procento nepohyblivých spermií. V případě Triladylu se potvrdila možnost náhrady vaječného žloutku samotným LDL. Hypotézu, že LDL zlepšuje všechna ředidla spermatu tak pravděpodobně bude nutno při dalším experimentu modifikovat. V případě Triladylu bylo pozorováno navýšení procenta nepohyblivých spermií po přídavku LDL.

Můžeme opatrně potvrdit hypotézu, že efekt použití LDL je výraznější v případě bezžloutkového ředidla Andromed, a jako nejvhodnější koncentrace dodatku LDL, bude-li k AndroMed dodáváno, se prozatím dle našeho výsledku jeví 6%. V případě Triladylu vykazuje 8 a 10% přídavek LDL shodné efekty jako originální receptura se žloutkem.

Pokud se zaměříme na jeden z parametrů motility spermií metodou počítačem asistované analýzy spermatu (CASA), konkrétně na VAP (průměrná rychlost hlavičky spermie na napřímené dráze), pak u Triladylu přídavek LDL výrazně zvyšuje pohyblivost spermií, otázkou je zda VAP sama o sobě je vhodným kritériem pro posouzení plodnosti, když se zároveň ukazuje, že současně se zvýšením rychlosti pohyblivých spermií stoupá procento zcela nepohyblivých.

Parametry přežitelnosti spermií hodnocené metodou fluorescenčního barvení vycházejí ve prospěch přídavku LDL do AndroMed, naopak trend u druhého ředidla nasvědčuje tomu, že přídavek LDL do Triladylu navyšuje množství nepohyblivých spermií.

8 Literatura

- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60. 269-279.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A, Andrabi, S. M. H., Khalidb, M., Ullaha, N. 2011. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*. 76. 759–764.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie - úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing. p. 630 ISBN. 80-902906-2-0.
- Ali, A., Chatagnon, G., Amirat-Briand, L., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M., Fieni, F. 2008. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (6). 768-768.
- Amann, R. P., Katz, D. F. 2004. Reflections to CASA After 25 Years. *Journal of Andrology*. 25 (3). 317-325.
- Amann, R. P., Pickett, B. W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. 7. 145-173
- Amirat, L., Tainturiera, D., Jeanneau, L., Thorina, C., Ge´rardb, O., Courtensc, J. L., Antond, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL. a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61. 895–907.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D, Chatagnon, G., Battut, I., Courtens, J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders. Biociphos, low density lipoprotein and Trilady1, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*. 129. 535–543.
- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., Tainturier, D. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender. Preliminary results. *Theriogenology*. 71. 1209–1214.
- Amirat-Briand, L., Bencharifa, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorina, C., Destrumelle, S., Deshercesb, S., Antonc, M., Jouand, M., Shmittb, E., Tainturiera, D. 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender. Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction*

Science. 122. 282–287.

- 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. *Animal Reproduction Science*. 104. 427–433.
- 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. 175–183.
- Anton, M., Gandemer, G. 1999. Effect of pH on interface composition and on quality of oil-in-water emulsions made with hen egg yolk. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*. 12. 351–358.
- Anzar, M., He, L., Buhr, M. M., Kroetsch, T. G., Pauls, K. P. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*. 66. 354–360.
- Arav, A., Zeron, Y., Shturman, H., Gacitua, H. 2003. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. *Reprod. Nutr. Dev.* 42. 583–586.
- Bacinoglu, S., Tas, M., Cirit, U., Ozdas, O., Ak, K. 2008. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Animal Reproduction Science*. 104. 38-46.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 21 (1). 1-7.
- Ball, P. J. H., Peters, A. R. 2004. *Reproduction in Cattle*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, Ames, Carlton, 250 pp. ISBN 1-4051-1545-9
- Barros, C., Berrios, M., Herrera, E. 1973. Capacitation in vitro of guinea pig spermatozoa in a saline solution. *J. Reprod. Fertil.* 34. 547-549.
- Bathgate, R., Maxwell, W. M., Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction of Domestic Animals*. 41. 68-73
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barriè`re, P., Larrat, M., Tainturier, D. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70. 1478–1488.

- Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj, A. H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., Tainturier, D. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender. Preliminary results. *Theriogenology*. 71. 1209-1214.
- Beran, J., Stadnik, L., Bezdicek, J., Louda, F., Citek, J., Duchacek, J. 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archiv fur tierzucht-Archives of animal breeding*. 3. 207-218
- Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y., Manjunath, P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 708-717.
- Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., Manjunath, P. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biology of Reproduction*. 77. 120-126
- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction Development*. 73. 1228-1244
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., Sirard, M. A. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 56 (2). 275-286.
- Bousseau, S, Brillard, J. P., Guienne, M., Guerin, B., Camus, A., Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and then in vitro fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50. 669-706.
- Boyers, S. P., Davis, R. O., Katz, D. F. 1989. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility*. 12. 165-200.
- Bozkurt, H., Woolley, D. M. 1993. Morphology of nexin links in relation to interdouplet sliding in the sperm flagellum. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 19. 275-281.
- Brokaw, C. J., Kamiya, R. 1987. Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella IV. Mutants with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function. *Cell motility and Cytoskeleton*. 8. 68-75.
- Bucci, D., Rodriguez-Gil, J. E., Vallorani, C., Spinaci, M., Galeati, G., Tamanini, C. 2011. GLUTs and Mammalian Review Sperm Metabolism. *Journal of Andrology*. 32 (4). 348-355.

- Budworth, P. R., Ammann, R. P., Hamerstedt, R. H. 1987. A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *Journal of Dairy Science*. 70. 1927-1936.
- Burley, R. W. 1975. Recent advances in the chemistry of egg yolk. *CSIRO Food Research Quarterly*. 35. 1-5.
- Coronel, C. E., Burgos, C., Genes De Burgos, N. M., Rovai, L. E., Blanco, A. 2005. Catalytic properties of the sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH x or C4) from different species. *Journal of Experimental Zoology*. 225. 379-385.
- Courtens, J. L., Re'ity, J. M. 2001. Numerical simulation for freezing and thawing mammalian spermatozoa. Evaluation of cell injuries at different depths in bags or straws during all steps of the technique. *Genetic Selection Evolution*. 33 (Suppl 1). 85-104.
- Cryo Tech., Optidyl, Bioxcell [online]. 2010. [cit. 2015- 03-03]. Dostupné z <http://www.cryotech.cz/doc/dokumenty/1274179009.pdf>
- Darin-Bennett, A., White, I. G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold shock. *Cryobiology*. 14. 466-470.
- De Lamirande, E., Harakat, A., Gagnon, C. 1998. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH and NADPH is associated with the production of superoxide anion. *Journal of Andrology*. 19. 215-225.
- Demianowicz, W., Strzezek, J. 1996. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reproduction in Domestic Animals*. 31 (1). 279-280.
- Dong, Q.-X., Rodenburg, S. E., Hill, D., VandeVoort, C. A. 2011. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian Journal of Andrology*. 13. 459-464. doi.10.1038/aja.2010.145
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes - a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*. 265 (4). 432-437.
- Forero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., Arruda, R. P. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 1. 154-159

- Gamčík, P., Kozumplík, J. (eds.). 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. SZN. Praha. p. 344 ISBN. 6402884.
- Gordon, I. 2004. *Reproductive technologies in farm animals*. Wallingford. CABI Publishing. p. 323. ISBN 0-85199-862-3.
- Graham, J. K., Foote, R. H. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*. 24.42-52
- Hafez, B., Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. 509 p. ISBN. 0-683-30577-8
- Hajarian, H., Wahid, H., Rosnina, Y., Daliri, M., Dashtizad, M., Karamishabankareh, H., Abas Mazni, O. 2011. Cryotop and development of vitrified immature bovine oocytes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 63 (1). 67-73.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm - what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11 (1). 73-88.
- Harrison, R. A. P., Vickers, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88 (1). 343-352.
- Hermansson, U., Axner, E. 2007. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology*. 67. 1239–1248.
- Hinsch, E., Hinsch, K. D., Boehm, J. G., Schill, W. B., Mueller-Schloesser, F. 1997. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. *Reprod. Dom. Anim*. 32. 143-149.
- Ho, H. C., Suarez, S. S., 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of Reproduction*. 68. 1590-1596.
- Holt, W. V., North, R. D. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma-membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 51 (3) 414-424.
- Hu, J. - H., Jiang, Z.-L., Lv, R.-K., Li, Q.-W., Zhang, S.-S., Zan, L.-S, Li Y.-K., Li X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62. 83–87.
- Hu, J. H., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, W. Y. 2008. Effects of different extenders on

- DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*. 57 (3). 257-262.
- Hu, J. H., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Yang, H., Zhang, S. S., Zhao, H. W. 2009. The Cryoprotective Effect of Trehalose Supplementation on Boar Spermatozoa Quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (4). 571-575.
- Hu, J. - H., Li, Q.-W., Zan, L.- S., Jiang, Z.-L., An, J.-H., Wang, L.-Q., Ji, Y.-H. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing – thawing. *Animal Reproduction Science*. 117. 11–17.
- Inaba, K. 2003. Molecular architecture of the sperm flagella. molecules for motility and signaling. *Zoological Science*. 20. 1043-1056.
- Ishijima, S., Hamaguchi, M. S., Naruse, M., Ishijima, S. A., Hamaguchi, Y. 1992. Rotational movement of a spermatozoon around its long axis. *The Journal of Experimental Biology*. 163. 15-31.
- Jahne, I. F. 1938. Ueber die widerstandsfähigkeit von menschlichen spermatozoen gegenüber starker kälte. *Klinische Wochenschrift*. 37. 88–89.
- Jannet, F., Keo, S., Bollwein, H., Hassig, M., Thun, R. 2005. Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Archiv Tierheilk.* 147. 62–62
- Jiang, Z.-L., Li, Q.-W., Hu, J.-H., Li, W.-Y., Zhao, H.-W., Zhang, S.-S. 2007. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 54. 301–304.
- Jelínek, P., Koudela, K. (eds.). 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Grafos. Brno. 414 s.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Palaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70. 219-228.
- Jonge, C., Barratt C., 2006. *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 499.
- Kliment, J. 1983. *Reprodukcia hospodářských zvierat*. Príroda. Bratislava. p. 369 pp.
- Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Cagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*. 2. 48 - 54.

- Liu, Z., Foote, R. H. 1998. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *Journal of Dairy Science*. 81(7). 1868–1873.
- Louda, F., Čeřovský, J., Jeřková, A., Stádník, L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita v Praze. 225 pp.
- Lovelock, J. E., Polge, C. 1954. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem. J.* 58(Suppl). 1-618.
- Lusignan, M. - F., Manjunath, P., Lafleur, M. 2011. Thermodynamics of the interaction between bovine binder of sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk. *Thermochimica Acta*. 516. 88–90.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Menard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*. 67 (4). 1250-1258.
- Marvan, F. (ed.). 2011. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda, Praha. 304 pp.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation. why isn't it better? *Theriogenology*. 57 (1). 327-344.
- Minitübe., Triladyl® & Biladyl® Media for Bovine Semen Freezing [online]. 2012a. [cit. 2015-03-03]. Dostupné z <http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13500-0004_BiladylTriladyl_en_120814.pdf>
- Minitübe., Andromed® Egg yolk free medium for bovine semen [online]. 2012b. [cit. 2015- 03-03]. Dostupné z <http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13503-0200_AndroMed_en_120814.pdf>
- Mortimer, D., Mortimer, S. T. 2013. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods of Molecular Biology*. 927. 77-87.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method. cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57 (6). 1695-1706.
- Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Loaiza-Eccheverri, A. M., Varago, F. C., Neves, M. M., Heneine, L. G. D., Arruda, R. P., Henry, M. 2011. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 75. 300–307.

- Muino, R., Fernández, M., Pena, A. I. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk- based or two egg-yolk-free extenders af-ter an equilibration period of 18h. *Reprod. Dom. Anim.* 42, s. 305-31.
- Müller, K., Pomorski, T., Muller, P., Zachowski, A., Herrmann, A. 1994. Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochemistry.* 33. 9968-9974.
- Müller-Schlösser, F., Hinsch, E., Böhm, J., Schill, W. - B., Hinsch, K. D. 1995. Untersuchungen an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für die Tiefgefrier-Konservierung von Bullensperma. *Tierärztl Prax.* 23. 363-366.
- Miyazaki, R., Fukuda, M., Takeuchi, H. 1990. Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Archives of Andrology.* 25. 243–251.
- 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. *Biology of Reproduction.* 63 (4). 1058-1066.
- Nicolson, G. L., Birdwell, C. R., Brunson, K. W, Robbins, J. C., Beattie, L., Fidler, I. J. 1977. Cell interactions in the metastatic process. Some cell surface properties associated with successful blood borne tumor spread. In. Lash, W, Burger, MM (eds.) 1977. *Cell and Tissue Interactions.* Raven Press. New York. p. 225-241.
- Oko, R. J., 1995. Occurence and formativ of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Reproduction Fertility Development.* 7. 777-797.
- Oko, R., and Clermont, Y. 1990. Mammalian spermatozoa. structure and assembly of the tail. In. Gagnon C. (ed.) 1990. *Controls of Sperm Motility. Biological and Clinical Aspects.* CRC Press. Boca Raton. p. 3–27.
- Olson, G. E., Noland, T. D., Winfrey, V. P., Garbers, D. L. 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *Journal of Ultrastructure Research.* 85. 204-218.
- Pace, M. M., Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science.* 39. 1144 – 1149
- Parkinson, T. J., Noakes, D. E., England, G. C. W., Arthur, G. H. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics.* W. B. Saunders. p. 849. ISBN. 0-7020-2556-9.
- Parks, J. E, Graham, J. K. 1992b. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38. 209-222

- Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrinia, M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*. 75. 105-114.
- Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*. 77. 268–279.
- Pojprasath, T., Lohachit, C., Techakumphu, M., Stout, T., Tharasanit, T. 2011. Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. *Theriogenology*. 75. 1742–1749.
- Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N. 2000. Effect of buffering system on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 59. 31-41.
- Reddy, N. S. S., Mohanarao, G. J., Atreja, S. K. 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 119 (3-4). 183-190.
- Rodriguez-Martinez, H. 1998. Optimization of Sperm Quality in A1 Bulls. *Reprod Dom. Anim.* Blackwell Wissenschafts-Verlag. Berlin. p. 233-237. ISSN 0936-6768.
- Roy, T. K., Bradley, C. K., Bowman, M. C., McArthur, S. J. 2014. Single-embryo transfer of vitrified-warmed blastocysts yields equivalent live-birth rates and improved neonatal outcomes compared with fresh transfers. *Fertil Steril*. 2014 Feb 27. pii. S0015-0282(14)00094-6. doi. 10.1016/j.fertnstert.2014.01.046.
- Řežábek, K. 2000. Kryokonzervace spermií a embryí. *Postgraduální medicína* [online]. 2000, roč. -, vol. 4, s. 498-500, dostupné také z <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/kryokonzervace-spermii-a-embryi-134352>>. ISSN 1214-7664.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Zeron, Y., Rozenboim, I., Arav, A. 2009. Double freezing of bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 115. 10–17.
- Sharpe, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E., Neill, J. D. (eds) 1994. *The physiology of reproduction*, Raven Press, New York. p. 1363-1434.
- Smith, E. F., Yang, P. 2004. The radial spokes and central apparatus. mechano-chemical transducers that regulate flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 5. 8-17.

- Sousa, R. de C. S., Coimbra, J. S. R., Rojas, E. E. G., Minim, L. A., Oliveira, F. C., Minim, V. P. R. 2007. Effect of pH and salt concentration on the solubility and density of egg yolk and plasma egg yolk. *LWT*. 40. 1253–1258.
- Sozańska, A., Kolwas, K., Jacek, G., Blocki, N., Adam, C. 2005. Simple optical method of qualitative assessment of sperm motility. preliminary results. *Proceedings of the SPIE* 59. 59. 176-184.
- Stradaioli, G., Noro, T., Sylla, L., Monaci, M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation. comparison between two extenders. *Theriogenology*. 67. 1249–1255
- Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X., Tang, X. 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.
- Svobodová, Z. (ed.) 1987. *Toxikologie vodních živočichů. Mze ČSR a Český rybářský svaz v SZN, Praha, 232 pp.*
- Tartaglione, C. M., Ritta, M. N. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen, *Theriogenology*. 62. 1245–1252.
- Tasdemir, U., Buyukleblebici, S., Tuncer, P. B., Coskun, E., Ozgurtas, T., Aydin, F. N., Buyukleblebici, O., Gurcan, I. S. 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*. 66. 38-42.
- Thurston, L. M., Watson, P. F., Holt, W. V. 2002. Semen cryopreservation. a genetic explanation for species and individual variation?. *Cryo Letters*. 23. 255-262.
- Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C., Lucia, T. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*. 93 (2-3). 206-209.
- Tuli, R. K., Holtz, W. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boergoat spermatozoa. *Theriogenology*. 42. 547-555.
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., Pereira, B. M. 1998. The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Experimental Cell Research*. 240. 151-164.

- Tuncer, P. B., Sariozkan, S., Bucak, M. N., Ulutas, P. A., Akalin, P. P., Buyukleblebici, S., Canturk, F. 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*. 75 (8). 1459-1465.
- Turner, R. M. 2003. Tales from the tail. what do we really know about sperm motility?. *The Journal of Andrology*. 24. 790-803.
- Van Wagtendonk-de Leeuw, A. M., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L., den Daas, J. H. G. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*. 54 (1). 57-67.
- 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.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57. 149–179.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. Repetitorium - spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. VÚVeL, Brno. 87 pp.
- Vodrážka, Z. 2007. *Biochemie*. Academia. Praha. p. 508. ISBN. 9788020006004.
- Vishwanath, R., Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3). 23-53.
- Watson, P. F. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 - degrees-C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*. 62 (2). 483-492.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 61. 481–49.

9 Přílohy:

Příloha č. 1: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro rychlost spermií na napřímené dráze (VAP) v závislosti na koncentraci LDL a délce inkubace po rozmrazení v ředidle AndroMed při použití Schéffeho testu.

Číslo buňky	Schéffeho test; proměnná VAP (AndroMed)									
	Ředidlo	Inkubace	1	2	3	4	5	6	7	8
			80,335	62,385	79,627	61,06	76,602	67,384	74,982	65,834
1	KE	0h		0	0,997846	0	0,0097	0	0	0
2	KE	2h	0		0	0,96445	0	0,000173	0	0,054572
3	E4	0h	0,997846	0		0	0,06891	0	0,000013	0
4	E4	2h	0	0,964452	0		0	0	0	0,000299
5	E6	0h	0,009699	0	0,06891	0		0	0,814676	0
6	E6	2h	0	0,000173	0	0	0		0	0,882306
7	E8	0h	0	0	0,000013	0	0,81468	0		0
8	E8	2h	0	0,054572	0	0,0003	0	0,882306	0	

Příloha č. 2: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro rychlost spermií na napřímené dráze (VAP) v závislosti na koncentraci LDL a délce inkubace po rozmrazení v ředidle Triladyl při použití Schéffeho testu.

Číslo buňky	Schéffeho test; proměnná VAP (Triladyl)									
	Ředidlo	Inkubace	1	2	3	4	5	6	7	8
			57,257	61,763	84,441	76,852	82,545	74,567	83,982	81,266
1	KTri	0h		0,00034	0	0	0	0	0	0
2	KTri	2h	0,000336		0	0	0	0	0	0
3	Tri6	0h	0	0		0	0,70573	0	0,999943	0,247718
4	Tri6	2h	0	0	0		0,000019	0,691553	0	0,035232
5	Tri8	0h	0	0	0,705733	0,000019		0	0,90859	0,979496
6	Tri8	2h	0	0	0	0,69155	0		0	0,000003
7	Tri10	0h	0	0	0,999943	0	0,90859	0		0,453316
8	Tri10	2h	0	0	0,247718	0,03523	0,9795	0,000003	0,453316	

Příloha č. 3: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro procento nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci a době inkubace v ředidle AndroMed při použití Schéffeho testu.

Číslo buňky	Schéffeho test; proměnná % nepohyblivých (%nepohyblivých Andromed) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,02544, sv = 56,000									
	Ředidlo	Inkubace	1	2	3	4	5	6	7	8
			0,59668	0,69571	0,57059	0,66332	0,51281	0,54355	0,54072	0,68419
1	KE	0		0,97911	0,999997	0,99814	0,99217	0,999576	0,999402	0,989882
2	KE	1	0,979109		0,926005	0,99999	0,62983	0,815663	0,800815	1
3	E4	0	0,999997	0,92601		0,98574	0,99926	0,999996	0,999991	0,955233
4	E4	1	0,998141	0,99999	0,985737		0,82403	0,940832	0,933266	0,999999
5	E6	0	0,99217	0,62983	0,999262	0,82403		0,99999	0,999995	0,704748
6	E6	1	0,999576	0,81566	0,999996	0,94083	0,99999		1	0,869854
7	E8	0	0,999402	0,80082	0,999991	0,93327	1	1		0,857501
8	E8	1	0,989882	1	0,955233	1	0,70475	0,869854	0,857501	

Příloha č. 4: Vyhodnocení analýzy rozptylu pro procento nepohyblivých spermií v závislosti na koncentraci a době inkubace v ředidle Triladyl při použití Schéffeho testu.

Číslo buňky	Schéffeho test; proměnná % nepohyblivých (% nepohyblivých Triladyl) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 251,58, sv = 56,000									
	Ředidlo	Inkubace	1	2	3	4	5	6	7	8
			60,857	63,036	67,828	75,74	63,441	72,056	66,525	76,586
1	KA	0		1	0,997432	0,82827	1	0,957278	0,999326	0,783447
2	KA	2	0,999999		0,999778	0,91786	1	0,987474	0,999974	0,887715
3	Aa6	0	0,997432	0,99978		0,99433	0,99988	0,999904	1	0,989493
4	Aa6	2	0,82827	0,91786	0,994331		0,93019	0,999962	0,985786	1
5	Aa8	0	0,999997	1	0,999877	0,93019		0,990475	0,999989	0,902869
6	Aa8	2	0,957278	0,98747	0,999904	0,99996	0,99048		0,999425	0,999848
7	Aa10	0	0,999326	0,99997	1	0,98579	0,99999	0,999425		0,976386
8	Aa10	2	0,783447	0,88772	0,989493	1	0,90287	0,999848	0,976386	