

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Možnost ovlivnění strukturálně funkčních charakteristik  
kryokonzervovaných býčích spermií přídatkem  
nizkodenzitního lipoproteinu**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Lucie Tůmová**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

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

**Odborný konzultant: Ing. Ondřej Šimoník**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnost ovlivnění strukturálně funkčních charakteristik kryokonzervovaných býčích spermií přídatkem nízkodenzitního lipoproteinu“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2017

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky a vstřícný přístup. Také bych ráda poděkovala svému konzultantovi Ing. Ondřeji Šimoníkovi za odborné rady, pomoc při práci v laboratoři, statistickém zpracování a za jeho ochotu i přátelský přístup. V neposlední řadě velké díky patří také mé rodině a příteli za jejich trpělivost a podporu během studií.

# Možnost ovlivnění strukturálně funkčních charakteristik kryokonzervovaných býčích spermií přidavkem nízkodenzitního lipoproteinu

## Souhrn

Nízkodenzitní lipoprotein (LDL) tvoří účinnou složku vaječného žloutku a má významné kryoprotektivní vlastnosti. Chrání spermie vůči chladovému šoku a napomáhá udržet permeabilitu plazmatické membrány v průběhu kryokonzervace, čímž přispívá k zachování fertilizační schopnosti spermií po rozmrazení. Cílem práce bylo zjistit, zda může přidavek LDL do bezžloutkových ředidel býčího ejakulátu pozitivně ovlivnit kvalitu inseminačních dávek po kryokonzervaci.

Ejakulát byl odebírán osmi býkům standardním způsobem. K naředění ejakulátu byly použity dva typy bezžloutkových ředidel s obsahem sojového lecitinu AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> se způsoby ředění – kontrolní vzorek bez LDL a experimentální vzorek s 6% přidavkem LDL. Poté byl naředěný ejakulát plněn do PVC pejet, kryokonzervován standardním postupem a uchován v tekutém dusíku. Pejety byly před každým vyhodnocováním rozmrazeny standardním způsobem. S využitím CASA byl hodnocen podíl spermií s progresivním pohybem a zastoupení spermií v subpopulacích s pomalým, středně rychlým a rychlým pohybem pomocí clusterové (shlukové) analýzy. Viabilita spermií byla vyhodnocena průtokovým cytometrem a akrozomální integrita technikou fluorescenční mikroskopie. Získané údaje byly následně statisticky zpracovány.

Podíl zhruba 50 % progresivně motilních spermií svědčí o kvalitě hodnocených vzorků. Rozdíly hodnot nebyly zjištěny v závislosti na přidavku LDL nebo použitém ředidle v zastoupení spermií u viability ani u progresivní motility, naopak v zastoupení subpopulací LDL navýšil podíl rychlejších a snížil podíl pomalých spermií. Podobně i v ředidle Bioxcell<sup>®</sup> byl vyšší podíl spermií oproti ředidlu AndroMed<sup>®</sup>. Integrita akrozomálního váčku byla pozitivně ovlivněna LDL pouze u ředidla Bioxcell<sup>®</sup>.

Hypotéza byla potvrzena částečně, neboť biologický význam prokázaných rozdílů není úplně jednoznačný. Je tedy otázkou, zda by byl efekt LDL vyšší, kdyby došlo k větší zátěži spermií během zpracování ejakulátu nebo u ejakulátu problematických plemenů s horší mrazitelností.

**Klíčová slova:** spermie, plazmatická membrána, kryokonzervace, permeabilita, LDL

# **The possibility to affect structure-functional characteristics of the bull cryopreserved sperms by means of low-density-lipoprotein addition**

## **Summary**

Low-density-lipoprotein (LDL) form the active component of the egg yolk and have significant cryoprotective features. They protect sperm against the cold shock and help to maintain the permeability of the plasma membrane during cryopreservation, and thereby contribute to keep fertilizing ability after thawing. The aim of this study was to find out if adding of the LDL to bull semen extenders without yolk can positively influence the quality of insemination doses after cryopreservation.

The ejaculate was taken from eight bulls in standard way. Two extenders without yolks containing soybean lecithin AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> were used to dilute the ejaculate. Dilution methods – control sample without LDL and experimental sample with 6% addition of LDL. Diluted semen was then filled into PVC straws, cryopreserved by standard procedures and stored in liquid nitrogen. Straws were thawed before each evaluation in standard way. Using CASA the proportion of spermatozoa with progressive motility and presence of sperm subpopulation of slow, medium, and fast motion were evaluated by the cluster analyses. Sperm viability was measured by flow cytometry and acrosome integrity techniques of fluorescence microscopy. Finally, data were statistically analyzed.

Share of approximately 50% progressively motile sperm testified the quality of evaluated samples. There was not found a difference in depending on the addition of LDL or used extender presence viability of sperm neither at progressive motility, vice versa among subpopulations LDL raised the share of fast and lowered the amount of slow sperms. Similarly, in extender Bioxcell<sup>®</sup> was the share of the sperm higher compared to extender AndroMed<sup>®</sup>. Integrity of acrosomal vesicle was positively influence of LDL only in extender Bioxcell<sup>®</sup>.

The hypothesis was confirmed partly because the biological value of proved differences is not completely clear. It is therefore question whether the effect of LDL has been higher if there has been added strain in sperm during processing ejaculate or problematic stallion with worse freezing ejaculate.

**Keywords:** spermatozoon, plasma membrane, cryopreservation, permeability, LDL

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce a vědecká hypotéza .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Přehled literatury.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Spermie.....</b>	<b>4</b>
3.1.1 Spermatogeneze .....	4
3.1.2 Struktura spermie .....	5
3.1.3 Plazmatická membrána spermie .....	7
<b>3.2 Nejvýznamnější fyziologické procesy u spermii .....</b>	<b>9</b>
3.2.1 Motilita spermii.....	9
3.2.2 Kapacitace spermii .....	11
3.2.3 Akrozomální reakce .....	12
<b>3.3 Kryokonzervace .....</b>	<b>13</b>
3.3.1 Nežádoucí účinky kryokonzervace .....	14
3.3.2 Motilita spermii.....	16
3.3.3 Plazmatická membrána.....	17
3.3.4 Akrozom.....	17
<b>3.4 Ředidla jako protektivní nástroj kryokonzervace .....</b>	<b>18</b>
3.4.1 Žloutková ředidla .....	19
3.4.2 Bezžloutková ředidla.....	20
3.4.3 Nízkodenzitní lipoprotein - LDL .....	21
<b>4 Materiál a metody.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Extrakce LDL a příprava ředidel.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Odběr a zpracování ejakulátu .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3 Hodnocení ejakulátu po kryokonzervaci.....</b>	<b>24</b>
4.3.1 Hodnocení motility spermii .....	24
4.3.2 Hodnocení viability spermii .....	25
4.3.3 Hodnocení akrozomální integrity spermii .....	26
<b>4.4 Statistické vyhodnocení dat.....</b>	<b>27</b>
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Vliv LDL v ředidlech s obsahem sojového lecitinu na motilitu spermii ....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Vliv LDL v ředidlech s obsahem sojového lecitinu na viabilitu spermii ...</b>	<b>33</b>
<b>5.3 Vliv LDL v ředidlech s obsahem sojového lecitinu na akrozomální integritu spermii.....</b>	<b>34</b>
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>35</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>8 Seznam literatury.....</b>	<b>40</b>
<b>9 Seznam obrázků, tabulek a grafů.....</b>	<b>52</b>
<b>10 Přílohy .....</b>	<b>53</b>

# 1 Úvod

V dnešní době je umělá inseminace ve spojení s kryokonzervací nejvíce využívanou biotechnologickou metodou v reprodukci u skotu. Kryokonzervace spočívá v zamrazování pohlavních buněk a umožňuje uchovávání spermií po neomezenou dobu. Hlavním důvodem k rozvoji kryokonzervace byla nejen snaha o efektivní využití plemenných býků, ale také příznivý vliv na ekonomickou stránku chovu.

I přes to, že v posledních desetiletích docházelo u procesu kryokonzervace k určitým pokrokům, doprovází jej mnoho nežádoucích vlivů, které mají negativní dopad na přežitelnost a fertilizační schopnost spermií. Extrémní změny teplot způsobují biochemické a morfologické přeměny spermií, jež ovlivňují vlastnosti jejich strukturálně funkčních charakteristik. Proto je během kryokonzervace nesmírně důležitá úloha ředidel přidávaných k ejakulátu. Ředidla zvětšují objem ejakulátu, slouží jako pufr, zajišťují spermiím zdroj energie, vytváří jim vhodné podmínky mimo pohlavní soustavu a mají kryoprotektivní účinky.

Již od počátků kryokonzervace je za důležitou kryoprotektivní látku považován vaječný žloutek. Žloutek ale může obsahovat škodlivé mikrobiální komponenty, a tím představuje pro ejakulát riziko kontaminace. Aby byly nežádoucí látky obsažené ve žloutku eliminovány, docházelo k nahrazování žloutku bezžloutkovými ředidly na bázi sojového lecitinu. Ovšem jejich přínos ke kvalitě ejakulátu, a zda představují posun vpřed, není jednoznačný.

Za ochrannou funkci žloutku pravděpodobně zodpovídá nízkodenzitní lipoprotein (LDL) v něm obsažen. LDL má zřejmě příznivý vliv na motilitu spermií, integritu plazmatické membrány i akrozomu po rozmrazení, a tak může být vhodnou náhradou žloutku v ředidlech. Je tedy otázkou, zda by LDL mohl zlepšit vlastnosti strukturálně funkčních parametrů spermií po kryokonzervaci i po přidání do bezžloutkových ředidel s obsahem sojového lecitinu.

## 2 Cíl práce a vědecká hypotéza

Cílem práce bylo potvrdit platnost hypotézy, že přidavek nízkodenzitního lipoproteinu (LDL) do bezžloutkového ředidla pozitivně ovlivňuje integritu akrozomální a plazmatické membrány a motilitu býčích spermií po kryokonzervaci.

Pro ověření hypotézy byly stanoveny dílčí cíle:

- zhodnotit vliv LDL na motilitu s využitím CASA a clusterové analýzy
- zhodnotit vliv LDL na integritu plazmatické membrány metodou průtokové cytometrie
- zhodnotit vliv LDL na akrozomální integritu technikou fluorescenční mikroskopie.



### 3 Přehled literatury

Rozmnožování u savců patří k základním biologickým vlastnostem organismu, kdy jedinec vzniká splynutím samčích a samičích pohlavních buněk (Jelínek et al., 2003). Jedním z předpokladů pro plnohodnotné rozmnožování samců je správná funkce pohlavního ústrojí, především produkce plnohodnotných a oplození schopných spermií (Berndtson, 2014). Samci deponují spermie do samičího ústrojí během sexuálního aktu. Sexuální akt patří k projevům pohlavní aktivity, kterou můžeme u samců pozorovat od období pohlavního dospívání a vrcholí ejakulací čili výronem ejakulátu (Trojan et al., 2003; Louda et al., 2007).

Ejakulát je viskózní bělavá tekutina (Lüllmann-Rauch, 2012), druhově specifická, co se barvy, konzistence a pachu týče. U býků se vyznačuje malým objemem a velkou koncentrací spermií (Marvan et al., 2007). Jelínek et al. (2003) ve své publikaci uvádějí průměrnou koncentraci spermií za fyziologických podmínek  $1 - 2 \times 10^6$  v  $\text{mm}^3$ . Spermie představují buněčnou složku ejakulátu a jsou velmi citlivé na změny okolního prostředí (Manjunath et Thérein, 2002; Gwathmey et al., 2006; Lüllmann-Rauch, 2012). Tekuté prostředí ejakulátu představuje semenná plazma, která vytváří stabilní prostředí pro spermie (Lüllmann-Rauch, 2012)

Semenná plazma je tvořena především sekrety z přídatných pohlavních žláz (Manjunath et Thérein, 2002; Lüllmann-Rauch, 2012; Setchell, 2014). Obsahuje anorganické látky, lipidy, sacharidy (Marvan et al., 2007) a proteiny (Gwathmey et al., 2006). Malé množství zaujímá i tekutina pocházející z varlete, nadvarlete, chámovodu a močové trubice (Manjunath et Thérein, 2002; Gwathmey et al., 2006). Semenná plazma chrání spermie před nepříznivými vlivy okolí (Lüllmann-Rauch, 2012), vytváří jim vhodné prostředí v samičím reprodukčním traktu a funguje coby přirozené ředidlo (Jelínek et al., 2003; Lüllmann-Rauch, 2012). Dále slouží jako zdroj výživy (Marvan et al., 2007) a spermie se stávají životaschopnějšími (Maxwell et al., 1998; Bergeron et al., 2004). Komponenty semenné plazmy stabilizují plazmatickou membránu (Maxwell et al., 1998) a proteiny podporují motilitu a viabilitu spermií (Bergeron et al., 2004). Napomáhají zabránit samovolné kapacitaci (Maxwell et al., 1998; Medeiros et al., 2002; Vera-Munoz et al., 2009) nebo akrosomové exocytóze, které by jinak vedly k jejich neplodnosti (Vera-Munoz et al., 2009). Semenná plazma představuje hlavní podíl ejakulátu, u býka činí 90 až 95 % z celkového objemu ejakulátu, zbylých 5 až 10 % tvoří spermie (Marvan et al., 2007).

## 3.1 Spermie

Spermie neboli zralé pohlavní buňky samců představují významnou složku ejakulátu (Jelínek et al., 2003; Chenoweth et Kastelic, 2007). Tvorbu pohlavních buněk ovlivňuje věk samce a produkce se postupně zvyšuje od období puberty (Berndtson, 2014). Spermie jsou konečným produktem spermatogeneze (Eddy, 2006) a mají za úkol díky své schopnosti samostatného pohybu aktivně vyhledávat a oplodnit vajíčko - pohlavní buňku samice (Marvan et al., 2007).

### 3.1.1 Spermatogeneze

Celý průběh vzniku a vývoje spermií je nazýván spermatogeneze. Jde o velmi složitý proces, při němž dochází k mnoha buněčným přeměnám (Garner et Hafez, 2000; Chenoweth et Kastelic, 2007), zahrnující mitotická i meiotická dělení (Berndtson, 2014). Tyto buněčné přeměny se odehrávají v několika fázích: rozmnožování, růstu, zrání a přeměny (Louda et al., 2007). Spermatogeneze probíhá ve stěnách semenotvorných kanálků varlat (Kaya et al., 2014) a během tohoto komplikovaného procesu mohou vznikat abnormální spermie (Aitken et Baker, 2013). U býka trvá jeden spermatogenní cyklus kolem 54 dnů (Jelínek et al., 2003).

Spermatocytogeneze patří k prvnímu vývojovému stádiu spermatogeneze, kdy dochází k dělení buněk od těch nejméně diferencovaných (Berndtson, 2014). Zahrnuje fázi rozmnožování, růstu a zrání (Jelínek et al., 2003).

Počet buněk zárodečného epitelu, nazývané spermatogonie, se až do období pohlavního dospívání nemění (Marvan et al., 2007; Berndtson, 2014). Během fáze množení dochází u těchto buněk k několika mitotickým dělením (Trojan et al., 2003; Marvan et al., 2007; Berndtson, 2014) a spermatogonie se mění na spermatocyty prvního řádu. Následuje fáze růstu, kterou doprovází redukční (meiotické) dělení (Trojan et al., 2003; Berndtson, 2014), kdy u spermatocytů prvního řádu dochází k přeměně na spermatocyty druhého řádu, nazývané též prespermatidy. Pro fázi zrání je charakteristické další meiotické dělení, po němž se vytvoří spermatidy (Garner et Hafez, 2000; Trojan et al., 2003; Berndtson, 2014).

Fáze přeměny, nazývaná též spermiogeneze nebo spermiogenezise, patří k druhému vývojovému stádiu spermatogeneze (Jelínek et al., 2003). Spermiogenezise je proces, kdy dochází k metamorfóze nepohyblivé spermatidy ve zralou pohyblivou spermii (Garner et Hafez, 2000; Jelínek et al., 2003; Berndtson, 2014). Má několik samostatných fází, během nichž dochází k řadě změn, které spermii postihují (Marvan et al., 2007).

Golgiho stádium zodpovídá za formaci akrozomálního váčku (Marvan et al., 2007) a buňka získává základ bičíku (Garner et Hafez, 2000). Další fází je stádium akrozomové čapky (Garner et Hafez, 2000). Akrozomální váček se postupně zvětšuje a přiléhá na povrch jádra. Díky postupnému hromadění hydrolytických enzymů dochází k jeho přeměně na akrozom (Marvan et al., 2007). Následuje stádium kaudální manžety, kde dochází k dokončení tvarování jádra. V posledním stádiu zrání je dovršen vývoj bičíku a akrozomu (Garner et Hafez, 2000).

Zralé pohlavní buňky se vyvíjejí průběžně u pohlavně dospělého samce až do vysokého věku (Vacek, 2006; Louda et al., 2007; Berndtson, 2014). Pouze řádně vyvinuté spermie mohou plnit svou fyziologickou roli (Marvan et al., 2007).

### **3.1.2 Struktura spermie**

Spermie patří mezi vysoce specializované buňky složené ze strukturních a funkčních částí (Eddy, 2006). Existují mezidruhové rozdíly ve tvaru a velikosti spermií (Jelínek et al., 2003), například u býka dosahuje délky 75-80  $\mu\text{m}$ , u hřebce 60  $\mu\text{m}$ , u kance 50-60  $\mu\text{m}$  (Marvan et al., 2007). Zralá pohlavní buňka samců se skládá z hlavičky a bičíku spojené krčkem (Mann et Lutwak-Mann, 1981; Trojan et al., 2003; Eddy, 2006; Abou-haila et Tulsiani, 2009) - spojovacím oddílem (Eddy, 2006).

#### **Hlavička**

Hlavička spermie vzniká z jádra spermatidy a má oválně zploštělý tvar (Vacek, 2006; Garner et Hafez, 2000). Významnou část hlavičky tvoří jádro se značně z kondenzovaným chromatinem (Eddy, 2006; Sutovsky et Manandhar, 2006). Jádro je pokryto jadernou membránou (Marvan et al., 2007). Uvnitř jádra jsou nahromaděny chromosomy (Trojan et al., 2003; Sutovsky et Manandhar, 2006) obsahující genetickou výbavu spermie (Vacek, 2006) s polovičním množstvím DNA (Garner et Hafez, 2000; Barbas et Mascarenhas, 2008). Celý povrch hlavičky pokrývá plazmatická membrána (Sutovsky et Manandhar, 2006; Marvan et al., 2007). Tvar hlavičky je variabilní a proteiny, které se vyskytují na jejím povrchu, mohou migrovat (Eddy, 2006). U býka je hlavička spermie zhruba 10  $\mu\text{m}$  dlouhá, 5  $\mu\text{m}$  široká a 1,5  $\mu\text{m}$  tlustá (Marvan et al., 2007).

Spermie obsahuje velký sekreční váček neboli akrozom (Florman et Ducibella, 2006). Akrozom vznikl jako produkt Golgiho aparátu (Garner et Hafez, 2000) během rané fáze spermatogeneze (Kaya et al., 2014). Je to membránový útvar připomínající čepičku, jenž může měnit svoji velikost a hraje důležitou roli z hlediska oplozovací funkce díky navázaným

enzymům. Membrána akrozomu je jedinečná svým rozdělením na dvě vrstvy (Eddy, 2006). Vnější membrána akrozomu přiléhá k cytoplazmatické membráně a vnitřní membrána nasedá na membránu jadernou (Eddy, 2006; Marvan et al., 2007). Akrozom pokrývá přední část jádra (Florman et Ducibella, 2006) a ze dvou třetin tvoří vnější část hlavičky spermie (Trojan et al., 2003; Eddy, 2006; Setchell, 2014). Uvnitř akrozomu je řada peptidů, proteinů (Florman et Ducibella, 2006) a zejména hydrolytické enzymy hyaluronidáza, akrosin a některé další (Trojan et al., 2003; Vacek, 2006; Kaya et al., 2014). Během akrozomové reakce dochází k rozpadu akrozomální čepičky a vylití hydrolytických enzymů v místě vazby spermie a vajíčka, což vede k následnému narušení obalů oocyty. Hyaluronidáza s akrosinem se podílí na proniknutí spermie do vajíčka (Trojan et al., 2003; Eddy, 2006; Garner et Hafez, 2000).

### **Bičik**

Členění bičíku je autory ve světě popisováno odlišně. Eddy (2006) a Toshimori (2009) ve své publikaci uvádí rozdělení bičíku do čtyř základních oddílů - krček, střední oddíl, hlavní oddíl a koncová část. Zatímco Jelínek et al. (2003) jej postupně dělí na spojovací, hlavní a koncovou část. Vacek (2006) popisuje střední oddíl bičíku, jako složený z krčku a spojovacího oddílu.

Počátek bičíku vystupuje od jádra spermie a základ vyúsťuje na rozhraní krčku a spojovacího oddílu (Eddy, 2006). Bičik poskytuje spermii zdroj energie a řídí její motilitu v tekutém prostředí, kterou potřebuje k dosažení vajíčka (Eddy, 2006; Sutovsky et Manandhar, 2006). Pohyb spermii neumožňuje pouze jeho charakteristická stavba, která je řízena unikátním uspořádáním mikrotubulů (Sutovsky et Manandhar, 2006), ale také přítomnost krčku (Vacek, 2006; Marvan et al., 2007).

Celou délkou bičíku probíhá komplex 9+2 mikrotubulů (Trojan et al., 2003; Eddy, 2006; Setchell, 2014), které tvoří axonema (Eddy, 2006). Jinými slovy, axonema se skládá z centrálního páru mikrotubulů a devíti menších párů uspořádaných v kruhu kolem centrálního (Sutovsky et Manandhar, 2006). Je obklopená vnější vrstvou hustých vláken vystupujících z krčku, až do hlavního oddílu (Eddy, 2006). Mikrotubuly se po celé délce bičíku dokáží posouvat, díky čemuž nabývá ohebnosti (Gadella, 2014). Dále se v bičíku nacházejí mitochondrie a cytoskeletární struktury. Zmíněné útvary jsou z vnější strany složeny z hustých vláken a vláknité pochvy (Toshimori, 2009). Celý povrch bičíku je pokryt plazmatickou membránou (Sutovsky et Manandhar, 2006). Plazmatická membrána bičíku je rozdělena na střední, hlavní a distální část. Střední a hlavní oddíl membrány je oddělen mezikružím zvaným prstenec. Tento vláknitý prstenec je součástí cytoskeletu bičíku (Eddy,

2006). Bičík spermie je zhruba 50 - 70  $\mu\text{m}$  dlouhý (Jelínek et al., 2003) a obecně býčí ejakulát obsahuje nadměrné množství spermií s deformovanými bičíky (Mann et Lutwak-Mann, 1981).

Krček spermie spojuje hlavičku s bičíkem, je krátký 2-3  $\mu\text{m}$  (Jelínek et al., 2003). Je to strukturní komplex tvořen z bazální membrány (Toshimori, 2009). Obsahuje mitochondrie, které vytvářejí nezbytnou energii (Medeiros et al., 2002; Trojan et al., 2003; Marvan et al., 2007) potřebnou pro mikrotubuly (Trojan et al., 2003; Marvan et al., 2007) a nezbytnou pro pohyb bičíku (Gürler et al., 2016). Krček spermie tvoří spojovací oddíl, který zahrnuje hlavičku, centrozom (zajišťující vznik dělicího vřeténka) a segmentované chordy. Centrozom zahrnuje proximální centriol a hlavní proteiny pericentriolární matrix, které se podílejí na tvorbě mikrotubulů v momentě, kdy spermie dosáhne oocyty (Toshimori, 2009). V krčku spermie můžeme nalézt velice propracovanou strukturu, která se vyvíjí v průběhu spermatogeneze a má za úkol následné spuštění pokračování meiosis II po splnutí obou pohlavních buněk (Toshimori, 2009).

Střední oddíl, nazývaný též mitochondriální část, je nejsilnějším oddílem bičíku (Eddy, 2006). Tento oddíl bičíku je pokryt mitochondriálním pláštěm (Eddy, 2006; Sutovsky et Manandhar, 2006) ve tvaru šroubovice (Sutovsky et Manandhar, 2006; Setchell, 2014) a je charakterizován značným počtem mitochondrií (Jelínek et al., 2003). Obsahuje kolem 75 – 100 mitochondrií, které vytvářejí energii pro spermie (Sutovsky et Manandhar, 2006). Spojovací díl je složen z husté vláknité struktury, z devíti příčně pruhovaných nebo segmentovaných sloupců (Eddy, 2006; Sutovsky et Manandhar, 2006).

Hlavní část bičíku je nejdelší okolo 40 - 50  $\mu\text{m}$  (Jelínek et al., 2003; Marvan et al., 2007), přičemž průměr se zmenšuje (Kaya et al., 2014). Povrch má pokryt fibrózní pochvou (Sutovsky et Manandhar, 2006; Marvan et al., 2007) a mitochondriální plášť obklopují vnější hustá vlákna (Eddy, 2006; Sutovsky et Manandhar, 2006). Tento oddíl bičíku má za úkol udržovat soudržnost osových vláken, jejich pevnost a pružnost při kmitání (Jelínek et al., 2003; Eddy, 2006).

Koncová část bičíku měří zhruba 4  $\mu\text{m}$  (Jelínek et al., 2003), je pokryta membránou (Garner et Hafez, 2000) a tvoří ji pouze osová vlákna bez chord a fibrózní pochvy (Jelínek et al., 2003).

### **3.1.3 Plazmatická membrána spermie**

Celý povrch hlavičky a bičíku pokrývá dvouvrstvá plazmatická membrána (Sutovsky et Manandhar, 2006; Vacek, 2006). Patří mezi klíčové struktury (Tapia et al., 2012) a v porovnání od jiných somatických buněk, je plazmatická membrána spermií odlišná (Flesch

et Gadella, 2000; Tapia et al., 2012). Je acidorezistentní, vysoce permeabilní a senzitivní na změny osmotického tlaku (Jelínek et al., 2003).

Plazmatická membrána představuje pro spermii základní ochranu před vlivy extracelulárního prostředí (Jelínek et al., 2003; Tapia et al., 2012). Membránová integrita a normální funkceschopnost plazmatické membrány spermie jsou důležitým předpokladem pro úspěšné oplození (Glander et Schaller, 1999, Flesch et Gadella, 2000), neboť intaktní membrána s akrozomem (Gürler et al., 2016) jsou nezbytné pro průběh kapacitace spermii, akrozomové reakce a nakonec splynutí s oocytom (Věžník et al., 2009; Tapia et al., 2012; Gürler et al., 2016). Propustnost membrány umožňuje spermii látkovou výměnu (Jelínek et al., 2003). Látková výměna je spojena s buněčným metabolismem (Cross et Hanks, 1991; Glander et Schaller, 1999). Téměř celá membrána je vytvořena v průběhu spermatogeneze během přeměny spermatidy ve zralou spermii (Eddy, 2006).

Flesch et Gadella (2000) uvádí, že jde o vysoce dynamickou strukturu. Uspořádání a složení plazmatické membrány se v jednotlivých oddílech spermie liší (Eddy, 2006). Podstatný úsek membrány hlavičky spermie tvoří oblast akrozomu a postakrozomální část. Plazmatická membrána akrozomální části je rozdělena na okrajovou část (apikální část), hlavní (přední) a ekvatoriální (zadní) část. Apikální a přední oddíl představují akrozomální čepičku. Postakrozomální část membrány vytváří plazmatickou membránu mezi zadní částí akrozomu a spojovacím oddílem spermie. (Eddy, 2006) Plazmatická membrána je tedy strukturou s různými kompartmenty, které se mohou lišit svým složením (Tapia et al., 2012).

Plazmatická membrána pohlavní buňky samce je složena z fosfolipidů, glykolipidů a sfingolipidů (Jones, 1998; Manjunath et Thérien, 2002; Tapia et al., 2012). Fosfolipidy určují základní strukturní organizaci membrány (Tapia et al., 2012). Živé spermie mají asymetrické rozložení fosfolipidů mezi vnitřní a vnější membránou (Věžník et al., 2009) a poměr těchto lipidů se mezidruhově liší (Eddy, 2006). Patří k nim například fosfatidylglycerol, fosfatidylcholin a fosfatidylethanolanin (Manjunath et Thérien, 2002; Tapia et al., 2012). Jednou z nejdůležitějších složek plazmatické membrány je cholesterol. Udržuje membránu ve stabilním stavu (Aksoy et al., 2010) a představuje 25 % až 50 % z celkového zastoupení lipidů (Mocé et al., 2010). Další složkou plazmatické membrány spermie jsou nenasycené mastné kyseliny. Mastné kyseliny ovlivňují její fluiditu, a díky tomu membrána odolává změnám objemu (Tapia et al., 2012). Povrch membrány je pokryt proteiny a glykoproteiny, které jsou antigenní povahy (Vacek, 2006). Proteiny obsažené v membráně plní specifické funkce. Rozeznáváme transmembránové, které jsou přímo integrované na lipidovou dvojvrstvu a fungují jako iontové kanály či receptory. Jsou často zapojeny do regulace signálních procesů,

což umožňuje buňce reagovat na vnější signály a mohou mít významný vliv na strukturu membrány. Druhou skupinou jsou periferní proteiny připojené k lipidům a proteinům membrány (Tapia et al., 2012). Hrají klíčovou roli v buňce při rozpoznávání buněk, což znamená, že mají významnou úlohu pro oplozovací schopnost spermií. Tyto proteiny zabraňují předčasnému uvolnění hydrolytických enzymů z akrozomálního váčku, stabilizují jeho membránu a zamezují aglutinaci spermií v ejakulátu (Vacek, 2006). Na vnějším povrchu membrány se nachází i vrstva polysacharidů -glykokalyx. Glykokalyx má ochrannou funkci, ovlivňuje rychlost difúze látek, udržuje pH a povrchové napětí membrány, účastní se fertilizace a jako ostatní proteiny plazmatickou membránu stabilizuje (Věžník et al., 2009).

### **3.2 Nejvýznamnější fyziologické procesy u spermií**

K dramatickým funkčním změnám dochází u spermií v průběhu ejakulace, ale stále nemají předpoklady pro úspěšné oplození (Visconti et Kopf, 1998; Abou-haila et Tulsiani, 2009). Oplození schopnými se stávají až poté, co v samičím pohlavním aparátu dojde k celé řadě změn na mnoha úrovních spermie, procesy souhrnně nazývané kapacitace a akrozomální reakce. (Wolf et al., 1986; de Lamirande et al., 1997; Breitbart, 2002; Gadella et Visconti, 2006; Abou-haila et Tulsiani, 2009; Gadella, 2014; Kunkitti et al., 2015). Aby však mohlo u spermií k výše jmenovaným dějům dojít, je pro ně stěžejní v co nejvyšší míře zachovaná motilita (Sutovsky et Manandhar, 2006).

#### **3.2.1 Motilita spermií**

Nejnápadnějším funkčním projevem spermie je její pohyb (Utt, 2016). Motilita spermií hraje důležitou roli při cestě samičím pohlavním aparátem za účelem dosažení oocyty (Eddy, 2006; Sutovsky et Manandhar, 2006). Aby spermie úspěšně dosáhla oocyty, měla by vykazovat charakteristický pohyb přímo vpřed za hlavičkou, známý jako progresivní (Zeron et al., 2016).

Kompetence spermií k pohybu se v průběhu vývoje mění (Visconti et Kopf, 1998; Eddy, 2006). Při opuštění varlete jsou morfologicky diferencované, ale zatím nezpůsobivé pohybu ani oplození schopnosti (Visconti et Kopf, 1998). Ani během zrání v nadvarletí nejsou pro pohyb plně uzpůsobené (Eddy, 2006). Schopnost k pohybu spermie získají až po opuštění nadvarlete vlivem změn okolního prostředí a především díky semenné plazmě (Lüllmann-Rauch, 2012; Kunkitti et al., 2015). V pohlavní soustavě samice se pohyb spermií mění v důsledku působení sekretů samičího aparátu (Věžník et al., 2004; Suarez et Pacey, 2006).

Aby došlo k oplození, je zapotřebí, aby byla motilita spermií v co největší míře fyziologicky zachována, dokud nedojde k proniknutí přes zónu pellucidu oocytu (Mann et Lutwak-Mann, 1981). Při jejich vazbě na řasnatý epitel vejcovodu se vytváří oviduktální rezervoár spermií (Bailey et al., 2000). Během navázání dochází k interakci povrchových proteinů membrány, při které hraje důležitou roli glykokalyx. Oviduktální rezervoár prodlužuje životaschopnost spermií a snižuje progresivitu buněk (Pollard et al., 1991). Během nastávající hyperaktivace se pohyblivost spermií opět zrychluje a vede k uvolnění z oviduktálního rezervoáru (Gagnon et de Lamirande, 2006). Motilita spermií není tedy stálá a v ejakulátu se vyskytují i spermie, které progresivní pohyb nevykazují (Utt, 2016). Za fyziologických podmínek se v ejakulátu zdravého samce vyskytuje určitý podíl spermií s progresivním pohybem (Holt et al., 2007).

Motilita spermií patří k základním ukazatelům při hodnocení kvality spermatu (Utt, 2016). Lze ji posoudit subjektivně při podrobnější analýze pomocí mikroskopu při různém rozlišení a s větší objektivitou pomocí CASA (Celeghini et al., 2008; Martínez-Pastor et al., 2011). CASA (Computer Aided Sperm Analysis) je počítačově asistovaná analýza spermií (Celeghini et al., 2008; Utt, 2016). Tato metoda dovede analyzovat ukazatele, jako je celková motilita v procentech i procentuální zastoupení progresivních spermií. Dále CASA hodnotí kinematické parametry motility, kdy je sledován rozsah a směr kmitů hlavičky (Zeron et al., 2016). Posuzuje křivočarou (VCL), průměrnou (VAP) a přímočarou (VSL) rychlost pohybu, dále linearitu (LIN), amplitudu laterálního vybočení hlavičky (ALH), přímost (STR) a počet křížení trajektorie (BCF). Každý vzorek spermií se vyznačuje heterogenitou (Holt et al., 2007). To znamená, že v jednom ejakulátu koexistují spermie s odlišným stupněm motility a vyskytují se v něm současně i různé subpopulace spermií (Holt et al., 2007; Martínez-Pastor et al., 2011). Na základě pokročilých statistických metod lze tyto subpopulace vyhodnotit, což umožňuje detailnější pohled na kvalitu vzorku ve vztahu k oplozovací schopnosti spermií (Martínez-Pastor et al., 2011).

Motilita spermií je ovlivňována mnoha faktory. Patří k nim především věk jedince, doba, kterou spermie trávily v nadvarletí a zrání pohlavních buněk (Věžník et al., 2004). Dále stav membránových struktur a metabolické procesy, jež jsou efektivními zdroji energie ve formě ATP (Büyükleblebici et al., 2014; Layek et al., 2016). ATP je produkován mitochondriemi ve spojovací části bičíku a napomáhá pohybu mikrotubulů (Gadella, 2014). Zdroj energie mají schopnost vytvářet i sacharidy (Büyükleblebici et al., 2014) a glykoproteiny (Jeyendran, 2000) obsažené ve spermiích. Jsou nezbytné pro jejich podporu a správnou pohyblivost (Büyükleblebici et al., 2014). Nedostatek glykoproteinů v semeni může ovlivnit



motilitu spermií (Jeyendran, 2000). Dále osmolarita, viskozita a pH (Věžník et al., 2004). Motilitu spermií ovlivňuje i prostředí, které je obklopuje, jak bylo zmíněno výše například výměšky semenné plasmy (Lüllmann-Rauch, 2012) a sekrety, s nimiž jdou do kontaktu při průchodu samičím reprodukčním traktem (Suarez et Pacey, 2006). Na pohyb spermií mohou mít vliv i další látky, se kterými mohou přijít do styku během biotechnického zpracování (Louda et al., 2008).

### **3.2.2 Kapacitace spermií**

Samčí pohlavní buňky nemají schopnost oplodnit vajíčko ihned po ejakulaci (Wolf et al., 1986; Breitbart, 2003; Gadella et Visconti, 2006). Spermie se po kopulaci zdržují v reprodukčním aparátu samice (Mann et Lutwak-Mann, 1981; Suarez et Pacey, 2006). Během této doby procházejí procesem kapacitace (Breitbart, 2003).

Kapacitací rozumíme řadu biologických (Kunkitty et al., 2015) a fyziologických přeměn, ke kterým dochází u spermií při průchodu samičí pohlavní soustavou (Wolf et al., 1986; de Lamirande et al., 1997; Florman et Ducibell, 2006; Gagnon et de Lamirande, 2006). Tento proces je nezbytný k tomu, aby spermie získaly oplozovací schopnost (Cooper, 1986; Wolf et al., 1986; Breitbart, 2003; Gadella et Visconti, 2006). Podle Flormana et Ducibella (2006) je kapacitace definována jako proces přeměn reakcí, díky které akrozom spermie získá schopnost reagovat na zonu pellucidu oocytu. Autoři uvádějí různá místa v samičím reprodukčním aparátu, kde za fyziologických podmínek dochází ke kapacitaci. Starší literatura uvádí jako místo, kde probíhá děložní krček. (Mann et Lutwak-Mann, 1981). Novější publikace tvrdí, že nastává ve vejcovodu nebo děloze (Viscontiho et Kopfa, 1998; Parrish, 2014). Autoři se vzájemně nevylučují, neboť děložní krček zajišťuje postupné uvolňování spermií do vejcovodu (Suarez et Pacey, 2006).

Kapacitace se odehrává na úrovni buňky (de Lamirande et al., 1997; Flesch et Gadella, 2000), kdy rozsáhlé změny postihují celou spermii, hlavičku i bičík (de Lamirande et al., 1997; Florman et Ducibella, 2006). Dochází také k malým změnám na úrovni organel, jako jsou cytosol a cytoskelet buňky (de Lamirande et al., 1997). Kapacitace probíhá i na úrovni plazmatické membrány. Mění se vlastnosti membrány spermie, její membránový potenciál, složení lipidů, transmembránových fosfolipidů (Wolf et al., 1986; de Lamirande et al., 1997; Florman et Ducibella, 2006) a proteinů (Wolf et al., 1986; de Lamirande et al., 1997). Nastávají tedy změny struktury plazmatické membrány (Cooper, 1986; Flesch et Gadella, 2000), bez nichž spermie nezíská oplozovací schopnost (Flesch et Gadella, 2000).

Jedním z prvních kroků během procesu kapacitace je vyplavení cholesterolu z plazmatické membrány spermie (Manjunath et Thérien, 2002; Breitbart, 2003; Purdy et Graham, 2004). V důsledku vyplavení cholesterolu dochází ke zvýšené propustnosti membrány pro vápník, draslík a hydrogenuhličitany (Visconti et Kopf, 1998; Breitbart, 2002; Purdy et Graham, 2004). Nejprve se zvýší hladina intracelulárního vápníku (Breitbart, 2002; Flora et Ducibella, 2006; Gadella et Visconti, 2006), což vede k hyperpolarizaci membránového potenciálu (Florman et Ducibella, 2006) a stejně tak vzroste hladina hydrogenuhličitanu (Breitbart, 2002), který je strukturně podobný sekretu v samičí pohlavní soustavě, a proto hraje nezbytnou roli v průběhu kapacitace při regulaci pH (Florman et Ducibella, 2006). Vyšší koncentrace těchto iontů, především vápníku, vedou v membráně spermie k zahájení akrozomální reakce (Meyers et Rosenberger, 1997; Purdy et Graham, 2004). Pokud je koncentrace kteréhokoliv z iontů nízká, průběh kapacitace a akrozomální reakce může být zpomalen. Visconti et Kopf (1998) ve své studii uvádějí, že absence vápenatých kationtů může zmíněné děje zcela pozastavit (Visconti et Kopf, 1998).

Spermie se v důsledku procesu kapacitace stávají hyperaktivními (Flesch et Gadella, 2000; Florman et Ducibella, 2006; Gagnon et de Lamirande, 2006). K zahájení dochází ve vejcovodu samice (Marquez et Suarez, 2004) a spočívá ve změně amplitudy výkyvu hlavičky, která vede k odlišnému charakteru pohybu spermii. Pohyb je označován jako hyperaktivní (Visconti et Kopf, 1998; Gadella et Visconti, 2006; Gagnon et de Lamirande, 2006) a je charakteristický vyšší frekvencí i amplitudou vlnění bičíku, přičemž otáčivý pohyb spermie kolem své osy zaniká (Visconti et Kopf, 1998; Gadella et Visconti, 2006). Tento pohyb slouží k uvolnění spermii z oviduktálního rezervoáru (Pollard et al., 1991) a napomáhá spermii při průniku přes zonu pellucidu oocyty (Marquez et Suarez, 2004). Hyperaktivace spermii není spojena s celým průběhem kapacitace, je považována pouze za součást tohoto děje. (Marquez et Suarez, 2004).

### **3.2.3 Akrozomální reakce**

Řádně proběhlá kapacitace je podmínkou pro další děj – akrozomální reakci (Breitbart, 2003), neboť kapacitací se aktivují mechanismy nepostradatelné pro její zahájení. Akrozomální reakci rozumíme proces, který umožňuje spermii proniknout do vajíčka skrz zonu pellucidu (de Lamirande et al., 1997; Breitbart, 2002; Breitbart, 2003; Gadella et Visconti, 2006; Gadella, 2014).

V průběhu akrozomální reakce dochází ke spojení plazmatické membrány spermie spolu s vnější akrozomální membránou (Wolf et al., 1986; Eddy, 2006) a dochází k tvorbě

váčeků mezi nimi (Eddy, 2006). Začíná se rozpadat plazmatická membrána akrozomální čepičky (Wolf et al., 1986; Čech et al., 2006), což má za následek vylití obsahu akrozomu (Eddy, 2006; Gadella, 2014). Uvolňovány jsou adhezní proteiny, tak i hydrolytické enzymy, jako je hyaluronidáza, akrosin, trypsin a další (Wolf et al., 1986; Breitbart, 2003; Čech et al., 2006). Hyaluronidáza uvolňovaná z akrozomu rozvolňuje buňky corona radiata, následně vede k expanzi kumulárních buňek (Florman et Ducibella, 2006) a usnadňuje spermii průchod přes zonu pellucidu (Meyers et Rosenberger, 1991; Florman et Ducibella, 2006). Po vazbě s oocytom dochází k otevření vápenatých kanálů na membráně spermie. Spermie při průchodu obalem vajíčka váže na své receptory progesteron. Spustí se signální kaskáda, nastává zvýšení koncentrace vápníkových iontů a dojde k disbalanci pH v buňce (Abou-haila et Tulsiani, 2009). Vše výše zmíněné je pro proces oplození nesmírně důležité (Breitbart, 2003). Ovšem akrozom může být negativně ovlivněn podmínkami v průběhu kyokonzervace, kdy narušení jeho integrity vede ke snížení fertilizační schopnosti spermií (Celeghini et al., 2008).

### 3.3 Kryokonzervace

V současné době je v reprodukci skotu nejvíce rozšířenou biotechnologickou metodou umělá inseminace (Layek et al., 2016) ve spojení s kryokonzervací (Bailey et al., 2000). Vedle chovatelského hlediska nachází využití i při řešení reprodukčních poruch (Al-Makhzoomi et al., 2008).

Kryokonzervace umožňuje oplození bez přímého kontaktu mezi jedinci opačného pohlaví (Al-Makhzoomi et al., 2008), čímž lze s jistotou zabránit šíření pohlavních nemocí (Cross et Hanks, 1991; Bailey et al., 2000; Al-Makhzoomi et al., 2008). Dále přispívá ke zlepšení genetického materiálu, a tím lze, co nejefektivněji získat přednosti jedince pro další využití v chovech (Bailey et al., 2000; Medeiros et al., 2002; Koonjaenak et al., 2007; Al-Makhzoomi et al., 2008; Layek et al., 2016).

Kryokonzervace umožňuje zamrazení a dlouhodobé uchovávání spermií (Cross et Hanks, 1991; Bailey et al., 2000; Barbas et Mascarenhas, 2008; Gürler et al., 2016; Layek et al., 2016), v současné době nejčastěji v PVC pejetách. Výhoda zamrazování spočívá v zachování viability a oplozovací schopnosti alespoň u části spermií (Gürler et al., 2016; Layek et al., 2016) po neomezenou dobu (Layek et al., 2016).

Zmrazováním jsou pozastaveny metabolické funkce spermií. Pokles teploty pod 4 °C zpomaluje metabolickou aktivitu buňky, ovšem aby se metabolické funkce spermie zastavily úplně, musí dojít k zamrazení alespoň na -130 °C (Medeiros et al., 2002). Existuje několik možných technik a rychlostí zchlazování (Justice et Christensen, 2013).

Kryokonzervace zahrnuje několik standardních kroků. Nejprve je ejakulát zchlazen k teplotám blízkým nule. Pomalým chlazením lze předejít chladovému šoku buněk. Současně probíhá ekvibrace nutná pro vytvoření rovnováhy, kdy se spermie adaptují na zpomalený metabolismus (Medeiros et al., 2002) a dochází k prostupu glycerolu do buňky. Glycerol modifikuje proces zmrznutí a je důležitou složkou ředidel (Lessard et al., 2000; Purdy, 2006). Má schopnost nahradit molekuly vody, což napomáhá ke stabilizaci plazmatické membrány během mrazení (Woelders et al., 1997; Bailey et al., 2000). Zmrazování spermatu probíhá podle různých mrazících křivek v mrazících boxech v parách dusíku. Připravené zamrazené pejetý jsou skladovány ponořením do tekutého dusíku při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , až do doby rozmrazení. (Medeiros et al., 2002; Benson et al., 2012).

Výsledkem úspěšné kryokonzervace jsou do určité míry zachované metabolické i buněčné funkce v praxi nejčastěji hodnocené na základě ukazatele motility spermií (Mann et Lutwak-Mann, 1981; Watson, 2000; Büyükleblebici et al., 2014). Existují mezidruhové rozdíly v citlivosti buněk (Parks, 1997) a široké využití má především u skotu (Medeiros et al., 2002). I když v posledních desetiletích docházelo k určitým pokrokům v této biotechnologické metodě, výsledky přežitelnosti spermií nejsou nijak závratné (Layek et al., 2016).

### **3.3.1 Nežádoucí účinky kryokonzervace**

I přes to, že se kryokonzervace v dnešní době hodně využívá, je doprovázena mnoha nežádoucími vlivy. Pohlavní buňky samců jsou velmi citlivé na nízké teploty (Medeiros et al., 2002; Gürler et al., 2016), proto mají kryokonzervované spermie nižší oplozovací schopnost než ty, které procesem neprošly (Watson, 2000; Medeiros et al., 2002). Negativní dopady na funkci a plodnost spermií způsobené kryokonzervací byly popsány u mnoha druhů zvířat, nejvíce však u býka (Layek et al., 2016). Býčí spermie jsou díky nižšímu obsahu cholesterolu citlivější vůči chladovému šoku, oproti třeba spermiím lidským (Bailey et al., 2000). Životaschopnost spermií se snižuje až o 50 % (Gravance et al., 1998; Holt, 2000; Layek et al., 2016).

Extrémní výkyvy teplot, kterým jsou spermie vystaveny, způsobují jejich biochemické a morfologické přeměny (Věžník et al., 2009; Jindal et Sharma, 2010). Během kryokonzervace je zasaženo mnoho strukturálně funkčních parametrů spermií (Martin et al., 2004; Jindal et Sharma, 2010), které významně mění jejich morfologii a fyziologii (Lessard et al., 2000). Poškození buňky je vyvoláno v jednotlivých fázích kryokonzervace odlišnými mechanismy (Medeiros et al., 2002).

Následkem rychlého zchlazení je tzv. chladový šok (Medeiros et al., 2002; Isachenko, 2003). Chladový šok negativně působí na cytoplazmu, cytoskelet a genom některých spermií (Isachenko, 2003). Dochází k odlišnému seskupení membránových fosfolipidů, a tím k narušení permeability membrány (Lessard et al., 2000; Medeiros et al., 2002). Mimo jiné způsobuje poškození regulačních mechanismů, které mohou vést ke špatnému načasování kapacitace i akrozomální reakce, a tím ke snížení fertilizační schopnosti spermií po rozmrazení (Bailey and Buhr, 1994). Chladovému šoku je možné zabránit použitím vhodného ředidla, dodržáním správného postupu, při zachování náležitě rychlosti během zmrazování a rozmrazování, což jistým způsobem zamezuje i vzniku intracelulárním a extracelulárním krystalům (Medeiros et al., 2002; Purdy, 2006; Benson et al., 2012).

Určitá populace spermií může díky negativnímu působení kryokonzervace prodělat kapacitační změny předčasně. Jedná se o jev nazývaný kryokapacitace. Dochází k narušení plazmatické membrány a spermie prodělá podobné změny jako při kapacitaci (Bailey et al., 2000; Kaneto et al., 2002), avšak většina doprovázejících změn není kompletně dokončena, a proto může mít na fyziologickou kapacitaci neblahý dopad (Kaneto et al., 2002). Dochází ke ztrátě oplozovací schopnosti ještě před tvorbou oviduktálního rezervoáru a dosažením místa fertilizace (Bailey et al., 2000).

Během kryokonzervace se vytvářejí extracelulární a intracelulární ledové krystaly (Benson et al., 2012). Extracelulární ledové krystaly se tvoří během procesu mrazení z extracelulární vody. Tyto ledové krystaly zvyšují koncentraci rozpuštěných látek v ředidle, vytváří osmotický gradient na membráně a dochází k buněčné dehydrataci (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 2000; Layek et al., 2016). Díky tomu dochází k osmotickému stresu, který způsobuje poškození spermií (Koshimoto et al., 2000). Čím pomalejší je průběh procesu mrazení, tím dochází k vyšší buněčné dehydrataci (Hammerstedt et al., 1990; Layek et al., 2016). Vzniku osmotického stresu a následné dehydrataci lze předejít vyšší rychlostí, při které lépe tuhne intracelulární tekutina (Layek et al., 2016). Mohou se však začít tvořit intracelulární krystaly (Hammerstedt et al., 1990; Tapia et al., 2012), při nichž dochází k zamrznutí vnitrobuněčné tekutiny. Intracelulární krystaly mohou narušovat buněčné struktury (Gao et al., 1997; Barbas et Mascarenhas, 2008; Gürler et al., 2016) a způsobují poškození pro spermie většinou smrtelné (Hammerstedt et al., 1990). Mrazící křivka by tedy měla mít tvar obráceného „U“, kdy je důležitá rychlost zchlazování i úprava použitého ředidla. Zchlazování má probíhat dostatečně rychle, tím pádem spermie nejsou na dlouhou dobu vystaveny rozdílným osmotickým podmínkám, ale na druhou stranu ne příliš rychle, neboť tím hrozí tvorba intracelulárních krystalů (Benson et al., 2012).

U poškozených spermií dochází nejprve ke změně a ztrátě pohybu, poté k poškození dalších funkcí (Thun et al., 2002; Gürler et al., 2016). Relativně stabilní organelou je jádro (Celeghini et al., 2008), jeho integritu proces kryokonzervace narušuje málo (Gürler et al., 2016). K nejvýznamnějším strukturám, jež jsou v průběhu mrazení a rozmrazování ohrožené, patří plazmatická membrána (Medeiros et al., 2002; Glander et Schaller, 1999; Layek et al., 2016), dále akrozom (Thun et al., 2002; Věžník et al., 2009) zejména jeho vnější akrozomální membrána (Medeiros et al., 2002; Layek et al., 2016) a v neposlední řadě mitochondriální struktury mající vliv na motilitu spermií (Thun et al., 2002; Věžník et al., 2009).

### **3.3.2 Motilita spermií**

Motilita spermií je v praxi na inseminačních stanicích býků nejčastěji hodnoceným parametrem (Louda et al., 2008). Bývá ovlivněna při vystavení jak nízkým, tak vysokým teplotám (Jeyendran, 2000) a dokáže způsobit výrazné změny ve vlastnostech pohybu (Gravance et al., 1998; Jeyendran, 2000; Rasul et al., 2001; Celeghini et al., 2008). U čerstvého ejakulátu je prokazatelně vyšší výskyt pohyblivých buněk (Celeghini et al., 2008), přičemž u býka se běžně požaduje alespoň 10 milionů aktivních spermií po rozmrazení v jedné pejetě s minimální aktivitou 30 % (Louda et al., 2008). Crespilho et al. (2012) ve své publikaci uvádí, že mezinárodní normy požadují alespoň 50 % motilních spermií.

S motilitou spermií úzce souvisí i mitochondriální aktivita. Mitochondrie jsou z funkčního hlediska velmi důležité orgány a během procesu mrazení velmi senzitivní k různým defektům. Integrita mitochondrií patří k významným strukturálně funkčním parametrům, které může průběh kryokonzervace poškodit, neboť jsou spojeny s produkcí ATP, která tvoří nezbytnou energii potřebnou k pohybu (Tapia et al., 2012). Spermie postihují změny ve struktuře bičíku právě v oddílech, kde se mitochondrie vyskytují (Celeghini et al., 2008). Defekty mitochondrií způsobují sníženou produkci ATP, a tím i sníženou motilitu (Thomas et al., 1998). Pouze funkční mitochondrie umožňují spermiím fyziologický pohyb, který vede ke správné fertilizační schopnosti (Gadea, 2005).

Kromě poškození mitochondrií dochází ke snížení motility i díky ředidlům přidávaným k ejakulátu. Viskozita a složení ředícího média mohou vést ke změně v amplitudě bičíku a horší motilitě spermií (Celeghini et al., 2008). S motilitou spermií mimo jiné úzce souvisí i integrita plazmatické membrány a akrozomu (Thun et al., 2002; Gürler et al., 2016)

### **3.3.3 Plazmatická membrána**

Jednou z nejvíce ohrožených struktur během kryokonzervace je plazmatická membrána spermie (Celeghini et al., 2008; Tapia et al., 2012) a to na úrovni jak hlavičky, tak i středního a hlavního oddílu bičíku (Bailey et al., 2000). V důsledku výrazných výkyvů teplot dochází ke změnám osmotického tlaku (Barbas et Mascarenhas, 2008; Celeghini et al., 2008; Tapia et al., 2012), buňky mohou zvětšovat nebo zmenšovat svůj objem (Gravance et al., 1998; Tapia et al., 2012), což způsobuje velké mechanické namáhání (Hammerstedt et al., 1990; Bailey et al., 2000), mohou se tvořit ledové krystaly (Benson et al., 2012), a to vše má na permeabilitu i pevnost membrány významný vliv (Parks, 1997; Gravance et al., 1998; Jindal et Sharma, 2010; Tapia et al., 2012).

Osmotický stres způsobuje dehydrataci spermií (Barbas et Mascarenhas, 2008; Celeghini et al., 2008; Tapia et al., 2012) a má vliv na zastoupení a organizaci fosfolipidů v plazmatické membráně (Celeghini et al., 2008; Vera-Munoz et al., 2009; Tapia et al., 2012). Odlišné seskupení membránových fosfolipidů v důsledku změn teplot, může ovlivňovat aktivitu proteinů, která vede k celkové změně permeability membrány (Medeiros et al., 2002). Membrána může být náchylná k poškození i díky obsahu nasycených mastných kyselin. Při porušení membrány dochází k úniku kationtů a enzymů ze spermie. (Bailey et al., 2000). K poškození membrány může dojít i při nežádoucím vzestupu koncentrace vápníku během rozmrazování (Tapia et al., 2012). V případě úplné ztráty permeability dochází k narušení regulačních systémů vápníku, a to má za následek zahájení kapacitace a akrozomové reakce v nesprávném čase (Bailey et Buhr, 1994; Bailey et al., 2000).

Neporušená a plně funkční plazmatická membrána hraje důležitou roli v oplozovací funkci spermie (Glander et Schaller, 1999, Flesch et Gadella, 2000). Narušení či dokonce ztráta integrity membrány během kryokonzervace zhoršuje funkce (Celeghini et al., 2008; Layek et al., 2016) a snižuje fertilizační schopnost spermie (Bailey et Buhr, 1994; Bailey et al., 2000; Jelínek et al., 2003). Aby došlo k úspěšnému oplození, je zachování plazmatické membrány spermie po rozmrazení nesmírně důležité (Glander et Schaller, 1999, Flesch et Gadella, 2000; Věžník et al., 2009).

### **3.3.4 Akrozom**

Přítomnost akrozomálního váčku u kryokonzervovaných spermií hraje důležitou roli během oplození (Rasul et al., 2001). Při poškození akrozomu může docházet k narušení vazby

spermie s oocytem (Bailey et al., 2000), a proto je zachování akrozomální integrity po rozmrazení nesmírně důležité (Layek et al., 2016).

Výrazné změny teplot mohou vést k vyššímu výskytu akrozomálních defektů (Celeghini et al., 2008; Fukuda et al., 2016). Defekty jsou po rozmrazení nejčastěji nalezeny na vnější membráně akrozomu. Objevují se rozsáhlé puchýřky nebo výrazné výstupky a dochází k narušení či dokonce až ke ztrátě plazmatické membrány akrozomu (Krogenaes et al., 1994). V plazmatické membráně akrozomu je řada povrchových proteinů podílejících se na vazbě se zonou pellucidou (Lessard et al., 2000; Eddy, 2006; Fukuda et al., 2016). V důsledku kryokonzervace může dojít k segregaci membránových proteinů nebo dokonce k jejich ztrátě (Lessard et al., 2000). Zhoršená oplození schopnost spermií po rozmrazení může nastat i při inaktivaci enzymů vázaných na membránu akrozomu (Lessard et al., 2000), či po vyplavení obsahu akrozomu spolu s hyaluronidázou a jinými enzymy, jež jsou pro vazbu s oocytem a následným průchodem spermie kumulárními buňkami důležité (Fukuda et al., 2016).

### **3.4 Ředidla jako protektivní nástroj kryokonzervace**

K omezení nežádoucích účinků, postihujících spermie během kryokonzervace, do jisté míry slouží ředidla přidávaná k ejakulátu (Parks, 1997; Layek et al., 2016). Ředidla mají za úkol zvětšovat objem spermatu (Mutalik et al., 2014), vytvářet vhodné podmínky a napomáhat spermiím přežít mimo pohlavní soustavu (Benson et al., 2012; Mutalik et al., 2014). Mají stálé pH a osmotický tlak, co nejvíce podobný fyziologickému (Justice et Christensen, 2013). Zajišťují spermiím zdroj energie a stabilizují jejich plazmatickou membránu tím, že do určité míry zabraňují změnám ve složení fosfolipidů v membráně během kryokonzervace (Justice et Christensen, 2013; Mutalik et al., 2014).

Kryokonzervační ředidla obsahují organické pufrы (Layek et al., 2016). Dále sacharidy, které zajišťují energii (Purdy, 2006; Justice et Christensen, 2013) a spolu s lipidy a proteiny zvyšují odolnost jejich plazmatické membrány před morfologickými změnami (Woelders et al., 1997; Holt et Penfold, 2014). Antibiotika zpomalují vývoj možných infekcí nebo zabraňují množení bakterií (Varner et al., 1998). Látky obsažené v ředidlech, které výrazně napomáhají spermiím vyrovnat se s procesem zmrazování a bez nichž není možné buňky kryokonzervovat, označujeme jako kryoprotektiva. Napomáhají spermiím přežít mimo pohlavní aparát (Holt et Penfold, 2014) a značně ovlivňují jejich fyziologický stav po rozmrazení (Büyükleblebici et al., 2014). Kryoprotektiva ovlivňují membránu, ale i děje uvnitř buňky (Ciani et al., 2012; Büyükleblebici et al., 2014). Napomáhají spermiím bránit vzniku ledových krystalů,



neboť interagují s molekulami vody a tím potlačují následné vytváření vodíkových vazeb nezbytných pro jejich tvorbu (Holt et Penfold, 2014).

Podle mechanismu účinku jsou kryoprotektiva dělena na dvě skupiny, látky permeabilní a nepermeabilní (Holt, 1997; Ciani et al., 2012; Layek et al., 2016). Permeabilní látky procházejí do spermie skrze plazmatickou membránu a ovlivňují buňku ze vnitř i z vnějšku (Ciani et al., 2012). Dochází ke zvýšení membránové fluidity díky přeskupení lipidů a proteinů (Holt, 1997). Nevýhodou těchto kryoprotektivních látek je negativní působení na plazmatickou membránu spermie. Může docházet k její destabilizaci a následné denaturaci proteinů (Ciani et al., 2012). Druhou skupinou kryoprotektiv jsou látky nepermeabilní, které neprocházejí skrze membránu a působí pouze extracelulárně. (Holt, 1997). I přes to, že neprocházejí do buňky, stabilizují vnitřní prostředí spermie (Ciani et al., 2012).

Nejběžněji používaným kryoprotektantem u inseminačních dávek býků je glycerol (Justice et Christensen, 2013; Büyükleblebici et al., 2014). Glycerol patří do skupiny látek permeabilních (Holt, 2000; Ciani et al., 2012; Layek et al., 2016). Chrání spermie, napomáhá stabilizovat plazmatickou membránu a omezuje tvorbu ledových krystalů během kryokonzervace (Watson, 1995; Lessard et al., 2000; Purdy, 2006). V průběhu kryokonzervace může glycerol působit i negativně, když ovlivňuje osmotický stres, možné změny v organizaci membrány, poruchy v propustnosti a fluiditě (Watson, 1995) a mimo jiné nechrání mitochondrie před poškozením (Thomas et al., 1998). Ke kompenzaci těchto negativních účinků se používají i další kryoprotektiva působící pravděpodobně pouze extracelulárně (Holt, 2000; Ciani et al., 2012; Layek et al., 2016), a to vaječný žloutek. (Thun et al., 2002; Justice et Christensen, 2013) a sojový lecitin (Amirat et al., 2004).

Proto se v praxi pro zpracování ejakulátu býků používají nejčastěji ředidla žloutková a bezžloutková především na bázi sójového lecitinu (Amirat et al., 2004). V současné době je středem zájmu objasnit, zda může nízkodenzitní lipoprotein v ředidle poskytnout spermii ochranu (Bergeron et al., 2004) a vést ke zvýšení efektivnosti po rozmrazení (Shahverdi et al., 2015)

### **3.4.1 Žloutková ředidla**

Vaječný žloutek je důležitou složkou ředidel býčího ejakulátu již od počátků kryokonzervace (Layek et al., 2016). Pomáhá spermii odolávat chladovému šoku (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004) a chrání plazmatickou membránu během zmrazování a rozmrazování (Thun et al., 2002; Amirat et al., 2004). Vaječný žloutek se skládá hlavně

z lipoproteinů, z nichž 68 % představují lipoproteiny s nízkou denzitou a zbylých 16 % lipoproteiny s vysokou hustotou (Anton et al., 2003).

Ochranný účinek žloutku se přisuzuje nízkodenzitnímu lipoproteinu (LDL), který je v něm obsažen (Moussa et al., 2002). Vaječný žloutek však obsahuje i další složky, než ty pozitivně působící (Wall et Foote, 1999) a mohou přinášet i nežádoucí následky (Layek et al., 2016). Například vysokodenzitní lipoprotein (HDL) a přítomnost granul ve žloutku, které mohou zpomalovat fyziologické procesy spermií po rozmrazení (Wall et Foote, 1999). Žloutek může inhibovat respiraci spermií, a tím může dojít ke snížení jejich motility (Vera-Munoz et al., 2009). Problémem žloutku může být i mikrobiální kontaminace (Wall et Foote, 1999). Vaječný žloutek se doporučuje používat v koncentraci maximálně do 20% (Amirat et al., 2004; Bencharif et al., 2008), vyšší koncentrace může mít na spermie negativní vliv. Příkladem komerčně vyráběných žloutkových ředidel jsou Triladyl® a Optidyl®. (Amirat et al., 2004)

### **3.4.2 Bezžloutková ředidla**

V poslední době dochází k nahrazování vaječných ředidel bezžloutkovými, neboť látky obsažené ve žloutku představují riziko mikrobiální kontaminace ejakulátu (Holt, 2000; Layek et al., 2016). V rámci bezžloutkových ředidel se u skotu používají především ředidla na bázi sojového lecitinu, kdy je vaječný žloutek nahrazen sojovým extraktem (Thun et al., 2002). Sojový extrakt pochází ze sojových bobů a obsahuje lecitin (Layek et al., 2016).

Sojový lecitin je složen z fosfolipidů, konkrétně fosfatidylcholinu a mastných kyselin (Vishwanath et Shannon, 2000), proto může nahrazovat lipoproteiny a fosfolipidy obsažené ve vaječném žloutku (Thun et al., 2002), díky čemuž se považuje za jeho vhodnou náhradu (Layek et al., 2016). Vzhledem k tomu, že je sojový lecitin rostlinného původu, eliminuje možná rizika kontaminace ejakulátu spojená s použitím žloutku jakožto živočišného materiálu (Thun et al., 2002). V současné době jsou komerčně vyráběná bezžloutková ředidla na bázi sojového lecitinu ke kryokonzervaci spermií běžně používaná (Layek et al., 2016).

Porovnáním účinnosti žloutkových a bezžloutkových ředidel s obsahem sojového lecitinu se zabývali například Bousseau et al. (1998), Thun et al. (2002), Amirat et al. (2004) nebo Crespilho et al. (2012). Výsledky těchto studií se rozcházejí. Efektivita bezžloutkových ředidel není úplně jednoznačná a testuje se, zda je možné ji zvýšit přidáním LDL (Šimoník et al., 2016).

### 3.4.3 Nízkodenzitní lipoprotein - LDL

Nízkodenzitní lipoprotein (LDL) je tvořen kulovitými molekulami o průměru okolo 35 nm (Anton et al., 2003). Jádru se skládá z triglyceridů, cholesterolu a esterů cholesterolu, které obklopuje vrstva apoproteinů a fosfolipidů (Anton et al., 2003). LDL je tedy složen z lipidů a proteinů, přičemž lipidy představují až 87 % z celku (Anton et al., 2003), z nichž přibližně 69 % tvoří triglyceridy, 26 % fosfolipidy a 5 % cholesterol (Moussa et al., 2002). Fosfolipidy hrají důležitou roli ve stabilitě struktury LDL (Moussa et al., 2002) a díky malé hustotě je velmi dobře rozpustný (Anton et al., 2003).

LDL tvoří zhruba dvě třetiny celkového množství pevných částic žloutku (Moussa et al., 2002) a je považován za ochrannou komponentu žloutkových ředidel (Moussa et al., 2002; Hu et al., 2010). U žloutkových ředidel dochází ke snížení motility, což se nepozoruje u ředidel s přidavkem LDL, a to pravděpodobně díky méně složitému chemickému složení LDL oproti žloutku (Vera-Munoz et al., 2009). Nicméně přesný mechanismus, jak vaječný žloutek napomáhá k ochraně spermií během procesu kryokonzervace, není jasně objasněn (Bergeron et al., 2004; Hu et al., 2010).

Jednou z hypotéz je, že LDL chrání a pravděpodobně příznivě působí na spermie (Moussa et al., 2002; Moraes et al., 2010) díky obsahu fosfolipidů (Thun et al. 2002; Shahverdi et al., 2015), které jsou během kryokonzervace uvolňovány do ředicího média a mohou tvořit ochranný tenký film na povrchu plazmatické membrány spermie (Manjunath et al., 2002; Moussa et al., 2002; Bergeron et al., 2004; Hu et al., 2010; Hu et al., 2011; Shahverdi et al., 2015) Tato vrstva umožňuje membráně odolat tvorbě ledových krystalů (Shahverdi et al., 2015) a ztrátě membránových fosfolipidů v průběhu kryokonzervace (Thun et al., 2002), čímž udržuje integritu membrány po rozmrazení (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Bergeron et al., 2004; Vera-Munoz et al., 2009; Hu et al., 2010; Hu et al., 2011).

V citovaných publikacích je uváděna i druhá možnost, jak může LDL pravděpodobně ochránit spermie, a to díky interakci proteinů obsažených v semenné plazmě býků (Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004). Proteiny semenné plazmy se vážou na povrch spermií při ejakulaci (Bencharif et al., 2008) a modifikují plazmatickou membránu vylučováním cholesterolu a fosfolipidů (Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004). LDL v ředidle působí na proteiny semenné plazmy specificky. Zabraňuje kontaktu proteinů semenné plazmy se spermiemi a dokáže snížit jejich nepříznivý vliv na membránu, a tím brání i následnému poškození plazmatické membrány (Bergeron et al., 2004). Lipidy obsažené v LDL jsou schopny rychlé vazby na proteiny semenné plazmy, která je stabilní i po rozmrazení (Hu

et al., 2011), což může vysvětlit příznivý účinek LDL na motilitu (Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004; Vera-Munoz et al., 2009) a viabilitu spermií během skladování (Manjunath et al., 2002).

At' je ochranný mechanismus LDL jakýkoliv je zřejmé, že zodpovídá za odolnost proti chladovému šoku (Moussa et al., 2002), tím i vůči stresu, jenž pohlavní buňky během mrazení doprovází (Amirat et al., 2004). Předpokládá se, že snižuje výskyt možných modifikací na membráně (Moussa et al., 2002; Manjunath et al., 2002; Bergeron a kol., 2004; Vera-Munoz et al., 2009; Moraes et al., 2010; Hu et al., 2011) a má příznivý vliv i na akrozomální integritu (Amirat et al., 2004; Amirat-Briand et al., 2010; Hu et al., 2010), což se pozitivně odráží na pohyblivosti spermií a některé kinematické parametry motility (Moussa et al., 2002; Vera-Munoz et al., 2009; Amirat-Briand et al., 2010; Hu et al., 2010; Šimoník et al., 2016). Amirat et al. (2004) publikovali výsledky, kdy byla až dvojnásobně vyšší pohyblivost spermií po rozmrazení u ředidel s nahrazeným žloutkem právě LDL, tudíž prokazatelně zlepšuje motilitu spermií a Hu et al. (2010) s ní spojuje i lepší mitochondriální aktivitu.

LDL je účinná komponenta žloutku a vzhledem k tomu, že má zřejmě vliv na motilitu a viabilitu, může sloužit jako jeho vhodná náhrada (Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004; Vera-Munoz et al., 2009). Řada autorů například Moussa et al. (2002) a Vera-Munoz et al. (2009) se shodují v optimální koncentraci LDL v pejetách býků 8 %. Bezžloutková ředidla nemají nijak závažné výsledky a je zde otázkou, zda se výsledkylepší s přidavkem LDL. Jelikož není přesně známý efekt přidavku LDL k bezžloutkovým ředidlům s obsahem sojového lecitinu na strukturálně funkční parametry spermií po kryokonzervaci, zabývala se naše studie právě touto problematikou.

## 4 Materiál a metody

Experiment spočíval v testování účinku LDL po jeho přidání k bezžloutkovým ředidlům s obsahem sojového lecitinu. Na základě dřívějších výsledků byla testována 6% koncentrace LDL. Účinky LDL byly ověřovány prostřednictvím vyhodnocování strukturálně funkčních charakteristik býčích spermií po rozmrazení v podmínkách *in vitro*.

### 4.1 Extrakce LDL a příprava ředidel

K izolaci LDL byla použita vejce, která pocházela z kontrolovaného chovu nosnic BIOPHARM a. s. a LDL byl extrahován podle metodiky Moussa et al. (2002).

Nejprve byl vaječný žloutek oddělen od bílku a filtračním papírem byly odstraněny zbytky bílku a chalázová poutka. Dále byla za použití skalpelu rozříznuta vitelinní membrána a žloutky byly přelity do kádinky udržované při 4 °C. Žloutky byly naředěny roztokem NaCl (0,17 M) a homogenizovány po dobu jedné hodiny při stejné teplotě. Po uplynutí doby byla suspenze centrifugována 10 000 x g po dobu 45 minut při 4 °C, čímž byla oddělena plazma od žloutkových granul. K plazmě bylo přidáno 20,5 g síranu amonného (Sigma-Aldrich, Německo) a opětovnou centrifugací byly vyloučeny livetiny. Výsledný supernatant bohatý na LDL byl následně na 10 hodin dialyzován. Dialýzou došlo k eliminaci síranu sodného. Poté byla provedena poslední centrifugace opět při 10 000 x g po 45 minut a finálním sedimentem byl LDL o čistotě nejméně 97 %. LDL byl následně konzervován v azidu sodném (0,1 %), který zajišťoval mikrobiální nezávadnost. Před použitím byl azid sodný z LDL dialýzou odstraněn.

K experimentu byla použita ředidla na bázi sojového lecitinu AndroMed® (Minitube, Tiefenbach, Německo) a Bioxcell® (IMV Technologie). Tato ředidla byla připravena standardním postupem v souladu s pokyny výrobce. K ředidlům byl přidán LDL o koncentraci 6 % a ředidla bez LDL sloužila jako kontrola.

Pro testování efektu LDL byly vyhotoveny čtyři varianty: AndroMed® bez přídavku LDL, Bioxcell® bez přídavku LDL, AndroMed® s přídavkem 6% LDL, Bioxcell® s přídavkem 6% LDL.

Všechna ředidla byla připravena vždy těsně před začátkem experimentu (tzn. pokaždé čerstvě připravována).

## 4.2 Odběr a zpracování ejakulátu

Ejakulát byl odebírán osmi býkům standardním způsobem na inseminační stanici (Natural s.r.o., Hradištko pod Medníkem, Česká republika). Každý ejakulát byl podroben základnímu posouzení školeným laborantem. Byly hodnoceny tyto parametry: objem ejakulátu, koncentrace spermií a procento pohyblivých spermií. K experimentu byl použit pouze ejakulát, který odpovídal limitu pro koncentraci spermií ( $\geq 0.7 \times 10^9$  / ml) a procentu pohyblivých spermií ( $\geq 70$  %).

Poté byl ejakulát rozdělen na objemově shodné díly a naředěn příslušnou variantou ředidla na konečnou koncentraci  $120 \times 10^6$  spermií / ml. Naředěný ejakulát byl plněn do PVC pejet o objemu 0,25 ml a ekvilibrován při teplotě 5 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí této doby byly pejety kryokonzervovány pomocí počítačem řízeného mrazícího zařízení (DigitCool<sup>®</sup>, IMV Technologie, Francie) za použití běžné mrazící křivky pro býčí ejakulát a poté ponořeny přímo do kapalného dusíku (-196 °C).

## 4.3 Hodnocení ejakulátu po kryokonzervaci

Pejety byly analyzovány minimálně jeden týden po kryokonzervaci. Před každým vyhodnocováním byly pejety rozmrazeny standardním způsobem ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 30 vteřin.

### 4.3.1 Hodnocení motility spermií

Motilita spermií byla hodnocena pomocí stereo mikroskopu Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokyo, Japonsko) s vyhřívaným stolkem (TokaiHeat, Japonsko) a kamerou DMK 23UM021 (Imaging Source, Brémy, Německo). Celý systém CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) pracoval na základě softwaru - NIS Elements Ar 4.50 (Laboratory Imaging, s.r.o. - Praha, Česká republika).

Pro vyhodnocení motility pomocí CASA byla nezbytná optimální konečná koncentrace  $20 - 40 \times 10^6$  spermií / ml (Verstegen et al., 2002). Rozmrazené vzorky byly naředěny a přeneseny do mikrozkuvek o objemu 1,5 ml a naředěny médiem Sperm-TALP (složení 6 mg / ml BSA - bovinní sérový albumin, 1 mM Na Pyruvate, 50 µg / ml Gentamicine, Sperm-TL-Stock - složení 114 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 10 mM Na Lactate, 2 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>). Po 10 minutách inkubace při teplotě 37 °C a šetrné homogenizaci byly 4 µl vzorku přeneseny do komůrky typu Makler<sup>®</sup> (SefiMedical, Haifa, Izrael) o hloubce 20 µm. Pohyb spermií byl snímán objektivem

10 × s negativním fázovým kontrastem v šesti různých zorných polích na vzorek. Záznam byl ukládán frekvencí kamery 60 snímků za sekundu o délce 41 snímků, tzn., že délka expozice kamery byla 0,61 s.

Z trajektorie spermií byly hodnoceny kinematické parametry motility. Posouzena byla křivočará rychlost (VCL,  $\mu\text{m} / \text{s}$ ), průměrná rychlost (VAP,  $\mu\text{m} / \text{s}$ ), přímočará rychlost (VSL,  $\mu\text{m} / \text{s}$ ), linearita (LIN, %), amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH,  $\mu\text{m}$ ), přímost - STR (%) a počet křížení trajektorie - BCF (Hz). Poté byly stanoveny parametry celková motilita (total motility - TM) na základě minimální hranice pohyblivých spermií VAP > 30  $\mu\text{m} / \text{s}$ , progresivní motilita na základě prahových hodnot parametrů VAP > 30  $\mu\text{m}$  a STR > 70 % a podíl spermií s pomalým, středně rychlým a rychlým typem pohybu viz clusterová analýza podkapitola 4.4. Parametry celková a progresivní motilita byly hodnoceny alespoň u 200 spermií v jednom vzorku

#### **4.3.2 Hodnocení viability spermií**

Pro vyhodnocení viability spermií byl použit průtokový cytometr BD LSRII (BD Biosciences, USA) s laserem emitujícím záření o vlnové délce 488 nm a Viability kit (ThermoFisher, USA) obsahující pro stanovení integrity plazmatické membrány spermií reagensie SYBR14 a Propidium jodid.

Nejprve byly připraveny chemikálie. Zásobní roztok SYBR 14 byl naředěn 50 x v HEPES buffer saline (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 % BSA, pH 7,4) na výslednou koncentraci 100 nM. Propidium jodid byl používán neředěný tedy o koncentraci 2,4 mM. Pejety byly rozmrazeny standardním způsobem. Z rozmrazeného objemu 0,25 ml bylo odpipetováno 8  $\mu\text{l}$  a přeneseno do připravené prázdné mikrozkušavky. Vzorky spermií byly naředěny 1 ml média spTALP na konečnou koncentraci  $1 \times 10^6$  spermií / ml. K této suspenzi bylo dále napipetováno 5  $\mu\text{l}$  ředěného SYBR14 (finální koncentrace 0,5 nM) a 5  $\mu\text{l}$  propidium jodidu (finální koncentrace 0,012 mM). Po přidání chemikálií byly vzorky řádně a šetrně homogenizovány a poté inkubovány po dobu 10 minut při teplotě 37 °C bez přístupu světla. Po vyjmutí z inkubátoru byly vzorky opět homogenizovány a následně měřeny pomocí průtokového cytometru. Bylo hodnoceno 15 - 20 000 spermií v každém vzorku. Odlišení nebuněčných frakcí vzorků například částí zcela destruovaných buněk nebo shluků proteinových komponent ředidla bylo provedeno tzv. gatováním. Při tomto procesu byly spermie odlišeny jak na základě velikosti získané přímým rozptylem světelného záření procházejícím vzorkem (Front Side Scatter – FSC) viz příloha 1, tak na základě heterogenity cytoplazmy, o níž podával informaci rozptyl záření dopadajícího na částice kolmo ve smyslu

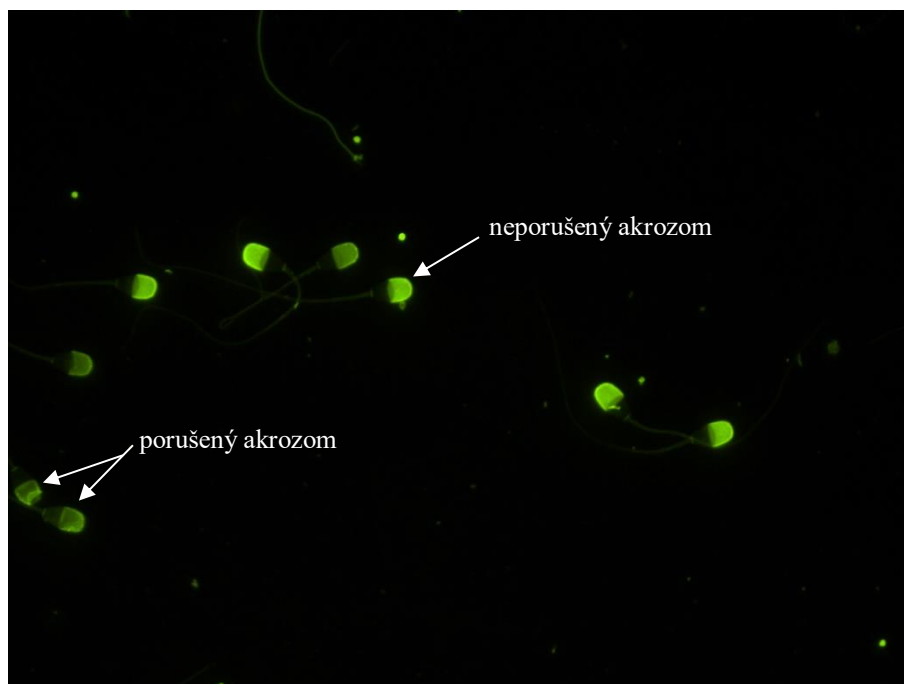
dráhy paprsku FSC tzv. Side Scatter (SSC) viz příloha 2. Fluorescenční spektrum fluorochromů bylo detekováno pomocí filtrů 505 - 545 a 605 - 635 nm. Na základě značení fluorochromy byla odlišena populace spermií: SYBR14 pozitivní (živé) od PI negativní (mrtvé) – podávající informaci o procentu živých spermií (ilustrativní hodnota v příloze č. 3). Následné zpracování surových dat probíhalo v softwaru FlowJo.

### 4.3.3 Hodnocení akrozomální integrity spermií

Akrozomální integrita spermií byla hodnocena metodou fluorescenčního barvení akrozomů podle metodiky Hu et al. (2011) s využitím fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E6000 (Nikon, Tokyo, Japonsko), objektiv 40 × Plan Fluor.

K rozmrazenému vzorku bylo přidáno 900  $\mu$ l média spTALP. Po řádné a šetrné homogenizaci bylo ze suspenze spermií odebráno 30  $\mu$ l a po nanesení na podložní sklíčko byl proveden roztěr. Pro každý vzorek byla vyhotovena dvě podložní sklíčka s roztěrem. Roztěry osychaly při pokojové teplotě a fixace probíhala v barvicí nádobě typu Hellendahl v metanolu po dobu 10 minut. Po vyjmutí a oschnutí byla doprostřed sklíčka pomocí PAP Pen liquid rocker (Sigma Aldrich, Německo) vymezena plocha o velikosti krycího skla. Do této plochy bylo pipetou aplikováno 30  $\mu$ l připraveného roztoku lektinu získaného z *Pisum Sativa* konjugovaného s fluorescein isothiokyanátem (PSA - FITC), následně bylo sklíčko vloženo do připravené vlhké komory, zakryto alobalem a inkubováno 30 minut při teplotě 37 °C bez přístupu světla. Po vyjmutí z inkubátoru byla sklíčka třikrát řádně opláchnuta PBS. Po oschnutí byla na sklíčka nanесena kapka Vectashield/DAPI (Vector Laboratories, USA) a zamontována pod krycí sklíčko za použití laku na nehty. Bylo hodnoceno 200 spermií na jedno podložní sklíčko, čili 400 spermií na vzorek. Intaktní akrozomy vykazovaly fluorescenci po celé ploše akrozomu bez viditelných vad či zbobtnání viz obrázek 1.





**Obrázek 1:** Ilustrační fotografie z fluorescenčního mikroskopu

#### 4.4 Statistické vyhodnocení dat

Získaná data byla statisticky analyzována pomocí softwaru STATISTICA 12.0.

Procentuální zastoupení progresivně motilních spermií, viabilních spermií a spermií s intaktním akrozomem bylo vyhodnoceno vícefaktorovou analýzou rozptylu – ANOVA s následným Sheffého post-hoc testem na hladině významnosti  $p = 0,05$ .

Jako závislé byly hodnoceny parametry procentuální zastoupení progresivně motilních spermií, viabilních spermií a intaktních akrozomů. Jako nezávisle proměnná figuroval typ bezžloutkového ředidla na bázi sójového lecitinu AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> bez přídavku LDL a s 6% koncentrací LDL.

K hodnocení podílu spermií s rozdílným typem pohybu byla použita clusterová shluková analýza. Ze všech vzorků byly hodnoceny pouze spermie motilní (Martínez-Pastor et al., 2011). Zvolen byl typ shlukové analýzy pracující na základě  $k$ -průměrů a Euklidovských vzdáleností. Jako proměnné pro výpočet blízkosti objektů právě na základě Euklidovských vzdáleností byly vybrány parametry motility spermií ALH, BCF, VAP, VSL, STR (Holt et al., 2007). Nejprve byly stanoveny shluky (subpopulace) spermií a následně byly spermie zaříděny do jednotlivých subpopulací. Stanovený počet subpopulací v experimentu byl 3 a byly

hodnoceny v rámci jednotlivých vzorků (González-Abreu et al., 2017). Subpopulaci 1 náležely spermie s pomalým pohybem, subpopulaci 2 se středně rychlým pohybem a subpopulaci 3 s rychlým pohybem. Rozdíly v podílu spermií byly u každé subpopulace následně hodnoceny analýzou rozptylu – ANOVA obdobně viz výše.

## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv LDL v ředidlech s obsahem sojového lecitinu na motilitu spermií

Motilita spermií byla vyhodnocena na základě podílu progresivně a celkově motilních spermií a dále s ohledem na procentuální zastoupení u jednotlivých subpopulací spermií.

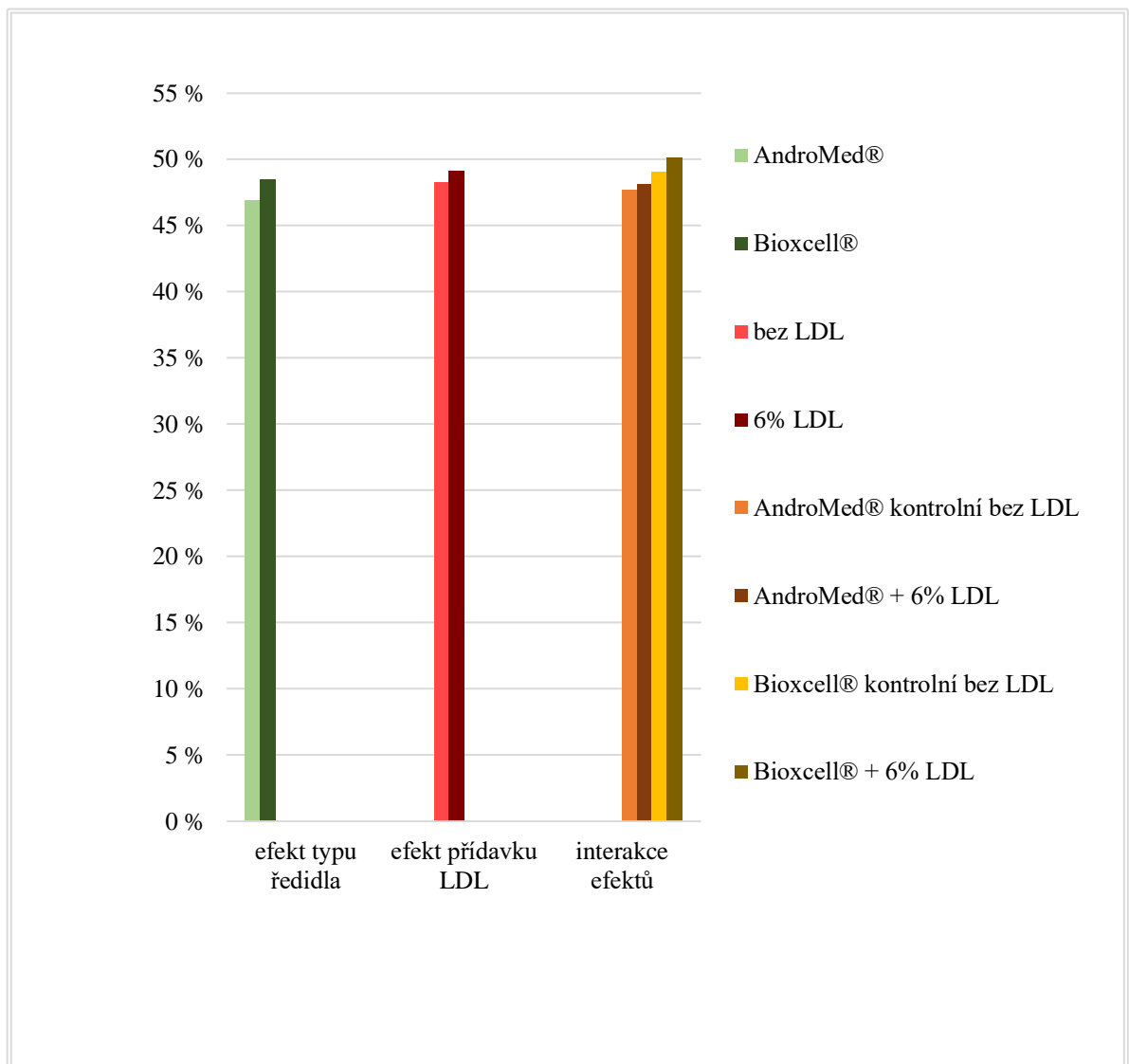
#### Vliv LDL na procentuální zastoupení motilních spermií

Podíl progresivně motilních spermií velmi těsně kopíroval celkové procentuální zastoupení motilních spermií. Zároveň mezi těmito parametry nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (ANOVA,  $p > 0,05$ ). S ohledem na výsledky analýzy byly dále prezentovány pouze výsledky progresivní motility spermií (viz graf 1).

Pro posouzení efektu ředidla byla hodnocena data bez ohledu na přídavek LDL. U ředidla Bioxcell® bylo nepatrně vyšší procentuální zastoupení progresivně motilních spermií po rozmrazení oproti ředidlu AndroMed®, avšak rozdíly hodnot u ředidla AndroMed® a Bioxcell® nebyly statisticky významné (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Efekt přídavku LDL byl ověřován bez ohledu na použité ředidlo. U vzorků s přídavkem 6% LDL bylo mírně vyšší procentuální zastoupení progresivně motilních spermií ve srovnání s kontrolními vzorky, ale nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Pokud jde o interakce obou efektů, byly průměrné hodnoty u obou variant s přídavkem 6 % LDL vyšší oproti odpovídajícím kontrolám. U ředidla Bioxcell® byly průměrné hodnoty u obou variant o několik procent vyšší ve srovnání s odpovídajícími variantami ředidla AndroMed®. Tyto rozdíly ovšem nebyly statisticky významné (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Graf 1:** Procentuální zastoupení progresivně motilních spermií v závislosti na použitém ředidle

Rozdíly hodnot v rámci jednotlivých efektů nebyly signifikantní (ANOVA,  $p > 0,05$ )

## Vliv LDL na zastoupení subpopulací spermií

Motilní spermie byly roztrženy clusterovou analýzou do tří shluků. Střední hodnoty vybraných kinematických parametrů pro jednotlivé subpopulace uvádí tabulka 1.

subpopulace spermií	N (%)	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	STR (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )
1 - pomalé <sup>a</sup>	12066 (22.40%)	119.60 $\pm$ 0.19	65.60 $\pm$ 0.21	72.76 $\pm$ 0.19	88.95 $\pm$ 0.14	4.55 $\pm$ 0.02
2 - středně rychlé <sup>b</sup>	19988 (37.11%)	208.94 $\pm$ 0.21	95.99 $\pm$ 0.16	104.86 $\pm$ 0.12	90.95 $\pm$ 0.08	6.32 $\pm$ 0.01
3 - rychlé <sup>c</sup>	21807 (40.49%)	255.40 $\pm$ 0.19	129.24 $\pm$ 0.15	136.27 $\pm$ 0.13	94.52 $\pm$ 0.05	7.36 $\pm$ 0.1

**Tabulka 1:** Charakteristika jednotlivých subpopulací spermií na základě vybraných kinematických parametrů (průměr  $\pm$  SEM – střední chyba průměru)

VCL – krivočará rychlost, VSL – přímočará rychlost, VAP – průměrná rychlost, STR – přímost, ALH - amplituda laterálního vybočení hlavičky

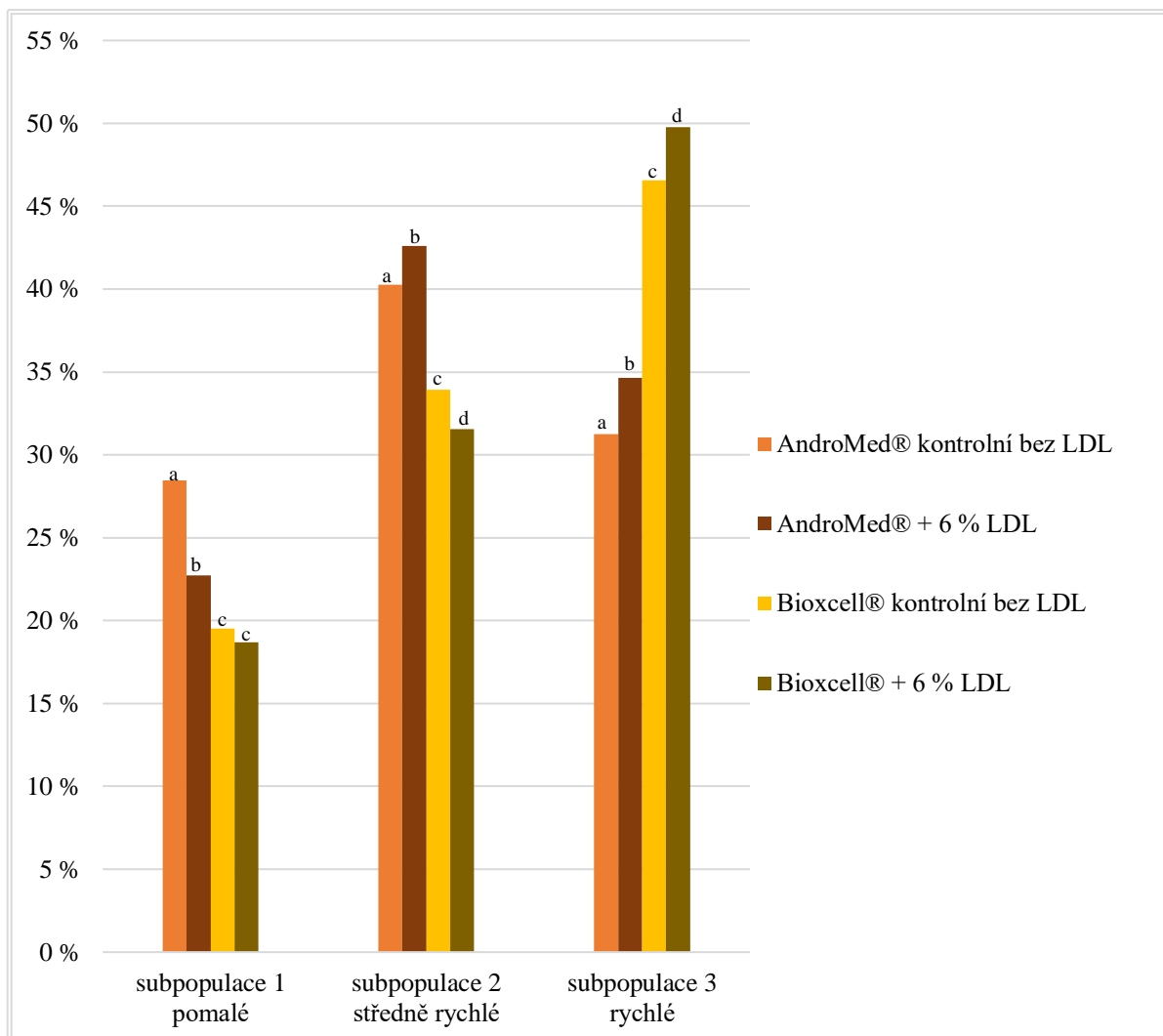
<sup>a, b, c</sup>. Subpopulace se signifikantně lišily ve všech sledovaných parametrech (ANOVA,  $p < 0, 05$ )

Zastoupení subpopulací ve vzorcích v závislosti na způsobu ředění znázorňuje graf 2.

Bylo zjištěno podstatně vyšší procentuální zastoupení spermií u subpopulace 1 s pomalým pohybem a u subpopulace 2 se středně rychlým pohybem a současně nižší podíl spermií s rychlým pohybem u subpopulace 3 při použití ředidla AndroMed<sup>®</sup> na rozdíl od ředidla Bioxcell<sup>®</sup>. Efekt ředidla byl statisticky prokázán ve všech třech testovaných subpopulacích spermií (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Po přidání 6% LDL se vyskytovalo méně spermií u subpopulace s pomalým pohybem a zároveň více spermií s rychlým pohybem oproti kontrole. U těchto subpopulací byl efekt LDL statisticky dokázán (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

V rámci jednotlivých experimentálních skupin byl u ředidla AndroMed<sup>®</sup> zjištěn výrazně nižší podíl pomalých spermií, současně vyšší procentuální zastoupení rychlých a středně rychlých spermií po přidání LDL oproti kontrole. Rozdíly hodnot mezi skupinami byly signifikantní (ANOVA,  $p < 0,05$ ). V rámci variant ředěných ředidlem Bioxcell<sup>®</sup> byl po přidání LDL významně nižší podíl středně rychlých spermií u subpopulace 2 a zároveň vyšší zastoupení rychlých spermií u subpopulace 3. Hodnoty středně rychlých a rychlých spermií byly statisticky průkazné (ANOVA,  $p < 0,05$ ) oproti subpopulaci 1, kde byl pouze o něco menší podíl spermií s pomalým pohybem po přidání LDL oproti kontrole, ovšem tento rozdíl nebyl statisticky dokázán (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Graf 2:** Procentuální zastoupení spermií u jednotlivých subpopulací v závislosti na použitém ředidle

a, b, c, d Hodnoty označené různými indexy v rámci skupiny byly statisticky významně rozdílné (ANOVA,  $p < 0,05$ )

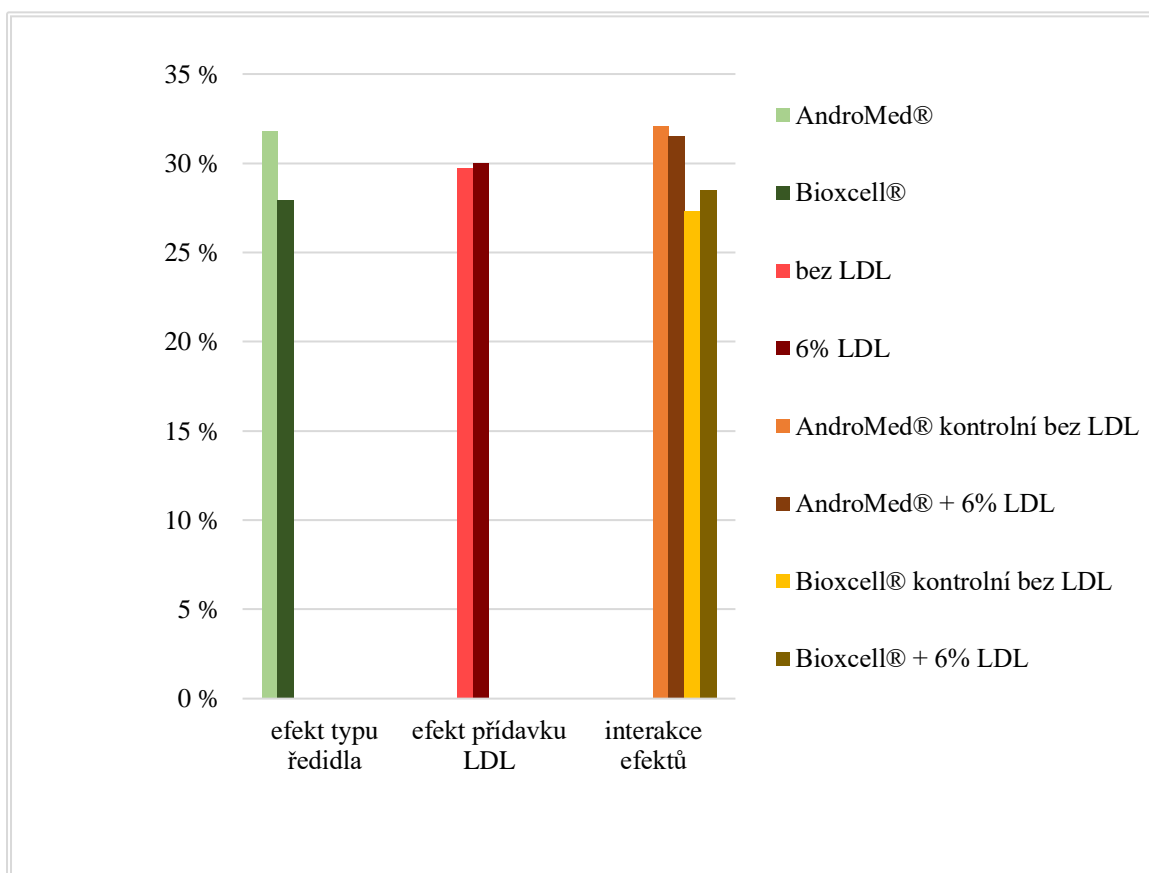
## 5.2 Vliv LDL v ředidlech s obsahem sojového lecitinu na viabilitu spermií

Procentuální zastoupení spermií u viability v závislosti na typu ředění ilustruje graf 3.

Pokud jde o efekt typu ředidla bez ohledu na koncentraci LDL, bylo u vzorků ředěnými ředidlem AndroMed® vyšší podíl viabilních spermií oproti ředidlu Bioxcell®. Tento rozdíl však nebyl statisticky průkazný (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Při hodnocení efektu LDL bez ohledu na použité ředidlo bylo procentuální zastoupení viabilních spermií u vzorků s přidavkem 6% LDL téměř vyrovnané s kontrolou. Rozdíly hodnot mezi sledovanými skupinami nebyly statisticky významné (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

V rámci hodnocení jednotlivých variant bylo procentuální zastoupení viabilních spermií u vzorků ředěných ředidlem AndroMed® v obou variantách vyšší oproti ředidlu Bioxcell®. U ředidla AndroMed® byl nepatrně nižší podíl viabilních spermií po přidání LDL oproti kontrole na rozdíl od ředidla Bioxcell®, kde bylo mírně vyšší procentuální zastoupení viabilních spermií po přidání LDL. Ovšem ani u jedné z variant nebyly rozdíly hodnot statisticky dokázané (ANOVA,  $p > 0,05$ ).



**Graf 3:** Procentuální zastoupení viabilních spermií v závislosti na použitém ředidle

Rozdíly hodnot v rámci jednotlivých efektů nebyly signifikantní (ANOVA,  $p > 0,05$ )

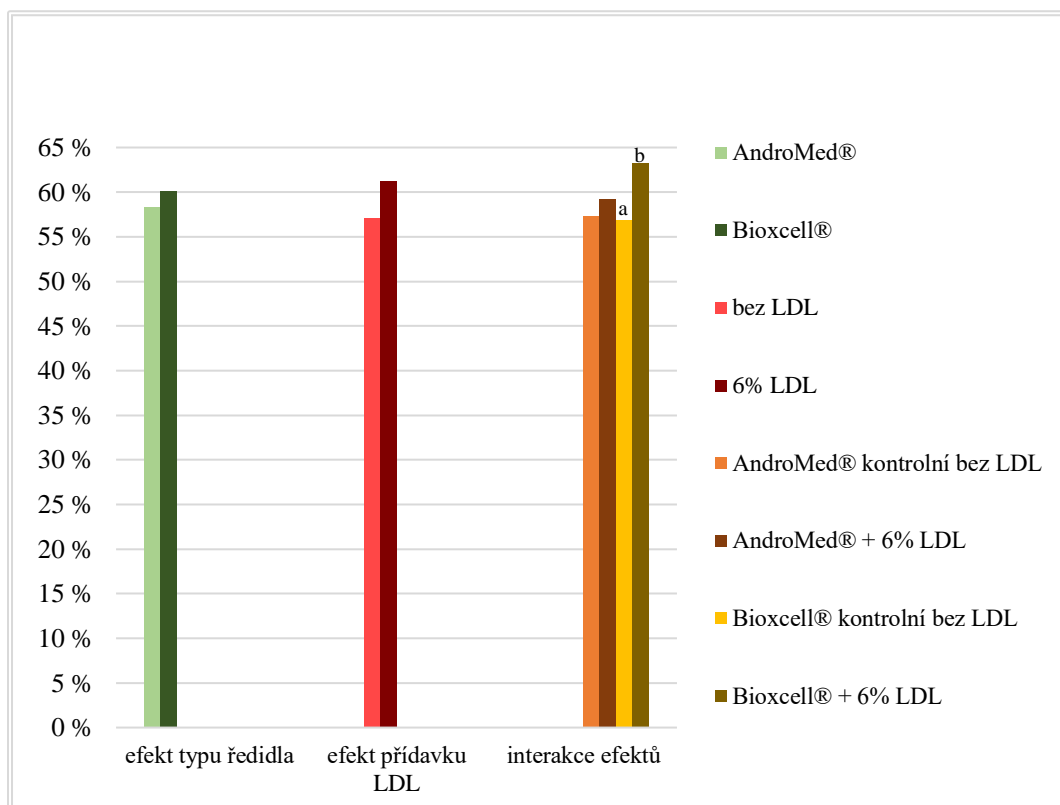
### 5.3 Vliv LDL v ředidlech s obsahem sojového lecitinu na akrozomální integritu spermií

Procentuální zastoupení spermií s intaktním akrozomem u jednotlivých testovaných variant znázorňuje graf 5.

Při hodnocení efektu ředidla bez ohledu na koncentraci LDL byl nepatrně vyšší podíl spermií s intaktním akrozomem u ředidla Bioxcell<sup>®</sup>, ovšem rozdíl hodnot není statisticky významný (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Co se efektu LDL týče, bylo o něco vyšší procentuální zastoupení u vzorků s 6% přídatkem LDL oproti kontrolám, ani tento rozdíl hodnot však nebyl statisticky průkazný (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

V rámci hodnocení jednotlivých experimentálních skupin byl u ředidla AndroMed<sup>®</sup> nepatrně vyšší podíl u vzorků s přídatkem LDL, ale statisticky významný rozdíl mezi variantami nebyl zjištěn (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Naopak tomu bylo u skupin ředěných ředidlem Bioxcell<sup>®</sup>, kdy 6% LDL výrazně zvyšoval výskyt neporušených akrozomů oproti kontrole bez LDL a po statistickém vyhodnocení byl zjištěn signifikantní rozdíl (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Graf 4:** Procentuální zastoupení intaktních akrozomů v závislosti na použitém ředidle

<sup>a, b, c, d</sup> Hodnoty označené různými indexy v rámci skupiny byly statisticky významně rozdílné (ANOVA,  $p < 0,05$ )



## 6 Diskuze

Během posledních let je zřejmý zájem o nahrazování žloutku v ředidlech býčího spermatu, neboť žloutek může obsahovat škodlivé mikrobiální komponenty, které vedou ke kontaminaci ejakulátu (Holt 2000; Layek et al., 2016). Pátrá se po možných alternativách, přičemž k nahrazování žloutku dochází především bezžloutkovými ředidly na bázi sojového lecitinu (Thun et al., 2002; Layek et al., 2016). Například Moussa et al. (2002) i Vera-Munoz et al. (2009) ověřovali možnost náhrady žloutku samotným nízkodenzitním lipoproteinem (LDL), který tvoří jeho hlavní složku (Anton et al., 2003). Řada studií označila LDL za zajímavou kryoprotektivní látku a autoři se shodují, že LDL jakožto náhrada žloutku zlepšuje motilitu, integritu plazmatické membrány a viabilitu spermií po rozmrazení (Manjunath et al., 2002; Moussa et al., 2002; Aires et al., 2003; Bergeron et al., 2004; Vera-Munoz et al., 2009; Hu et al., 2011). Porovnáním účinnosti žloutkových a bezžloutkových ředidel na bázi sojového lecitinu se zabývalo mnoho autorů, výsledky však vycházely nejednoznačně (Bousseau et al., 1998; Thun et al., 2002; Amirat et al., 2004; Crespilho et al., 2012). Je tedy otázkou, zda by LDL nemohl zlepšit vlastnosti i bezžloutkových ředidel. U žloutkových ředidel, pokud LDL sloužil jako náhrada žloutku se autoři Moussa et al. (2002), Vera-Munoz et al. (2009) i Hu et al. (2010) shodují v optimální koncentraci přidaného LDL pro býčí spermie 8 %, která má pozitivní vliv na motilitu po rozmrazení, neboť Moussa et al. (2002) narazili na horší výsledky motility při koncentracích nad 10 %. Vzhledem k výše uvedenému není přesně známa účinnost bezžloutkových ředidel s obsahem sojového lecitinu. Avšak Šimoník et al. (2016) došli ke slibným výsledkům po přidavku LDL k bezžloutkovým ředidlům na bázi sojového lecitinu o jiné koncentraci, a to 6%, neboť LDL byl v tomto případě doplněn ke kompletní receptuře ředidla. Proto byl v této studii cíleně testován efekt LDL v koncentraci 6 % u běžně používaných bezžloutkových ředidel pro kryokonzervované býčí spermie - AndroMed® a Bioxcell®.

Motilita spermií patří k významnému ukazateli, který je po rozmrazení hodnocen, neboť jakékoliv poškození spermie se odráží právě na jejím pohybu (Thun et al., 2002; Gürler et al., 2016). Vliv přidavku LDL na motilitu spermií byl v této práci hodnocen prostřednictvím počítačem asistované analýzy spermií – CASA, jež hodnotí různé kinematické parametry motility podle trajektorie hlavičky, i procento celkové motility a zastoupení spermií s progresivním pohybem (Verstegen et al., 2002). Celková motilita byla po kryokonzervaci vyšší jen o pár procent oproti progresivně motilním spermím, a jelikož mezi nimi nebyl

dokázán významný rozdíl, byla prezentována pouze progresivní motilita spermií. Progresivní motilitě se přikládá i vyšší vypovídající schopnost, co se týče predikce fertility vzorku (Sellem et al., 2015). Autoři požadují za přijatelné alespoň 30 % motilních spermií po rozmrazení. Výsledky této práce vykazovaly velice příznivé hodnoty, neboť u všech čtyř testovaných variant se pohybovaly okolo 50 % progresivně motilních spermií, a lze je považovat za kvalitní, neboť jsou prokazatelně vyšší než požadované normy (Louda et al., 2008). Mezi jednotlivými variantami nebyl však podíl progresivně motilních spermií z celkového množství ovlivněn typem ředidla ani vlivem přídavku 6% LDL.

Jelikož je progresivní motilita ukazatel velice všeobecný a jeho vypovídající hodnota není úplně ideální, využívá se kinematických parametrů z CASA k hodnocení typu pohybu spermií (Contri et al., 2010). Kvůli nevýhodám pevného třídění byla v tomto experimentu k detailnějšímu rozboru kvality vzorku použita clusterová analýza (Martínez-Pastor et al., 2011). V experimentu byla každá subpopulace spermií charakterizována určitým typem pohybu. Ze středních hodnot kinematických parametrů byly hodnoceny pomalé, středně rychlé a rychlé spermie. Přídavek 6% LDL výrazně ovlivňoval pohyb spermií na úrovni subpopulací. LDL zvyšoval podíl spermií s rychlým pohybem u obou testovaných ředidel. U ředidla AndroMed<sup>®</sup> výrazně snížil podíl pomalých spermií. Efekt LDL navýšil i podíl středně rychlých spermií u vzorků ředěných ředidlem AndroMed<sup>®</sup> naopak Bioxcell<sup>®</sup> s přídavkem LDL snižoval motilitu v této subpopulaci spermií.

Řada autorů například Moussa et al. (2002), Amirat et al. (2004) i Vera-Munoz et al. (2009) publikovali všeobecně horší výsledky motility spermií po rozmrazení při použití ředidel se žloutkem oproti ředidlům, kdy LDL sloužil jako náhrada žloutku. I proto byly většinou prováděny kontroly v podobě bezžloutkových ředidel na bázi sojového lecitinu. Ovšem výsledky není možné nijak interpretovat, neboť se jedná o různá ředidla a je obtížné porovnávat ředidla se žloutkem s ředidly bezžloutkovými s obsahem lecitinu, které vykazují odlišnou viskozitu. Žádná z těchto studií však neřešila přídavek LDL k bezžloutkovým ředidlům s obsahem sojového lecitinu. K předběžným výsledkům došli Šimoník et al. (2016), kteří se zabývali ochranným účinkem LDL po jeho přidání právě k těmto bezžloutkovým ředidlům v koncentracích 4, 6 a 8 %. Jelikož se jedná o preliminary results, řeší naše práce velice podobnou problematiku, ale s rozšířeným souborem hodnocených parametrů spermií, neboť motilita a kinematické parametry pohybu spermií úzce souvisí s viabilitou a akrozomální integritou. Šimoník et al. (2016) hodnotili vybrané kinematické parametry motility po přidání LDL u stejných ředidel, jako byla použita v této studii. Došli k závěru, že významně pozitivní vliv na motilitu má přídavek LDL při ředění ředidlem Bioxcell<sup>®</sup>, ovšem u ředidla AndroMed<sup>®</sup>

efekt LDL nebyl dokázán. Pracovali však s jiným souborem plemeniků a dosáhli nižších hodnot u motility spermií po rozmrazení oproti výsledkům této práce. Zřejmě byly rozdíly v kvalitě vzorků, a proto naše výsledky vycházely jinak. Je tedy otázkou, zda by byl efekt LDL vyšší, kdyby došlo k větší zátěži spermií během zpracování ejakulátu nebo u ejakulátu problematických plemeniků s horší mrazitelností.

Dalším významným faktorem ovlivňující funkceschopnost spermií po rozmrazení je stav plazmatické membrány. Integrita plazmatické membrány podává informaci o viabilitě spermií (Celeghini et al., 2008; Layek et al., 2016). Na viabilitu spermií mají kromě extrémních výkyvů teplot v průběhu kryokonzervace a typu použitého ředidla vliv i komponenty semenné plazmy, konkrétně proteiny v ní obsažené, jak uvádějí Maxwell et al. (1998) a Bergeron et al. (2004). Zachování integrity plazmatické membrány vede i k zachování motility. Při poškození v membráně může být narušeno iontové složení a s ním spojená signalizace v souvislosti s řízením motility spermií.

Hodnoty jsou relativně nízké v kontextu s motilitou, což mohlo být způsobeno tím, že sledování viability probíhalo odděleně od sledování motility a zároveň mohly být rezervy v nastavení metodiky. Mimo jiné mohly souviset i s použitím průtokové cytometrie, neboť u studie Šimoníka et al. (2016) byla viabilita hodnocena mikroskopem a výsledky byly srovnatelné s motilitou. V této práci se efekt 6% LDL na viabilitě spermií po rozmrazení neprojevil, což potvrzují i výsledky Šimoníka et al. (2016), také však přišli s výsledky, kdy přídavek 8% LDL v ředidle Bioxcell® a 4% LDL v ředidle AndroMed® měl na viabilitu spermií významný vliv. V tomto experimentu vzorky kryokonzervované v ředidle AndroMed® vykazovaly vyšší počet živých spermií po rozmrazení oproti ředidlu Bioxcell®, ovšem Šimoník et al. (2016) měly vyšší hodnoty u ředidla Bioxcell®. Autoři Moussa et al. (2002) a Vera-Munoz et al. (2009) ve své publikaci srovnávali bezžloutková ředidla bez LDL se žloutkovými ředidly, kdy byl žloutek nahrazen LDL a došli k závěru, že LDL se při náhradě žloutku neprojevil a současně tato ředidla dosáhla horších výsledků. Efekt LDL na viabilitu spermií po rozmrazení prokázali Šimoník et al. (2016) ovšem u horších hodnot motility oproti této studii, a proto zde pravděpodobně nebyl dokázán efekt na úrovni viability.

V tomto experimentu byl dalším sledovaným parametrem, jenž bývá v průběhu kryokonzervace často poškozen, akrozomální integrita spermií. Vyhodnocování akrozomální integrity po rozmrazení je důležité z hlediska posouzení fertilizační schopnosti (Celeghini et al.,

2008). Integrita akrozomální membrány bývá často považována za nejcitlivější strukturu spermií a LDL představuje důležitou roli ve stabilizaci akrozomální membrány (Hu et al., 2010)

Při ředění ředidlem AndroMed<sup>®</sup> neměl přídavek LDL na integritu akrozomu významný vliv. Odlišná situace nastala u ředidla Bioxcell<sup>®</sup>, kde bylo signifikantně více neporušených akrozomů u vzorků s přídavkem 6% LDL. Je zajímavé, že ve výsledcích této práce bylo u ředidla Bioxcell<sup>®</sup> i významně vyšší podíl rychlých spermií ve srovnání s ředidlem AndroMed<sup>®</sup>. Jednoznačně lepších výsledků na integritu akrozomu po přidání LDL dosáhli například Moussa et al. (2002) a Hu et al. (2010), kteří publikovali studii, kdy však LDL sloužil jako náhrada žloutku u žloutkových ředidel.

Thun et al. (2002) a Layek et al. (2016) se domnívají, že bezžloutková ředidla na bázi sojového lecitinu mohou díky obsahu fosfatidylcholinu nahrazovat lipoproteiny a fosfolipidy ve žloutku. Jelikož je lecitin rostlinného původu, nepředstavuje rizika spojená s užitím kryoprotektivních látek živočišného původu tedy žloutku, k čemuž se přiklání i Bousseau et al. (1998). Ovšem autoři Thun et al. (2002) došli k výsledkům, kdy byla ředidla s obsahem lecitinu méně účinná po kryokonzervaci oproti ředidlům žloutkovým.

Zajímavé je, že výsledky progresivní motility byly v této práci při použití bezžloutkových ředidel s obsahem sojového lecitinu velmi dobré. Mimo jiné prokázaly, že LDL i v těchto ředidlech působil v některých parametrech z hlediska pohybu, viz subpopulace spermií a také na podíl spermií s intaktním akrozomem. Otázkou zůstává, zda by LDL mohl mít vyšší efekt u problémových spermií, neboť studie s horšími výsledky v kontrolách, prokázaly vyšší efekt LDL. V této práci byly výsledky progresivní motility velmi dobré a je tedy otázkou, zda se zaměřit na horší ejakulát nebo na testování citlivější metody na časné modifikace plazmatické membrány, například hodnocením apoptotických změn (Said et al., 2010). K lepšímu pochopení rozdílů v pohybu by bylo vhodné provádět i analýzy metabolického stavu spermií.

## 7 Závěr

Práce se zabývala vlivem přídavku nízkodenzitního lipoproteinu (LDL) do bezžloutkových ředidel AndroMed® a Bioxcell® na vybrané strukturálně funkční parametry kryokonzervovaných býčích spermií. Jejich vyhodnocení může sloužit jako nástroj v posouzení kvality a oplozovací schopnosti spermií po rozmrazení.

Při hodnocení efektu ředidla AndroMed® a Bioxcell® bez ohledu na koncentraci LDL nebyly zjištěny významné rozdíly v podílu spermií u viability nebo progresivní motility ani u spermií s intaktními akrozomy. Ovšem výběr ředidla měl významný vliv na pohyb spermií vyjádřený podílem jednotlivých subpopulací. U ředidla AndroMed® bylo celkově méně rychlých spermií ve prospěch těch středně rychlých a pomalých oproti ředidlu Bioxcell®

Podobně 6% přídavek LDL bez ohledu na použité ředidlo ukázal rozdíly v subpopulacích, kdy byl výrazně vyšší podíl rychlých spermií, ale v dalších parametrech se neprojevil.

Na úrovni jednotlivých experimentálních variant se efekt přídavku LDL lišil podle toho, jaké ředidlo bylo použito. LDL snižoval podíl pomalých spermií, zvyšoval podíl rychlých a u středně rychlých spermií byl efekt rozdílný u obou ředidel. Podobně i u akrozomální integrity LDL signifikantně navýšil podíl spermií s intaktním akrozomem u ředidla Bioxcell®. Oproti tomu v ředidle AndroMed® neměl přídavek LDL na integritu akrozomu vliv.

Kvalita hodnocených vzorků byla velmi dobrá a neprojevil se zásadní rozdíl mezi variantami používaných ředidel. Celkově se efekt LDL promítl rozdílnou distribucí spermií do subpopulací s rozdílným pohybem a současně do podílu spermií s intaktním akrozomem. Hypotézu lze tedy potvrdit částečně, neboť biologický význam prokázaných rozdílů není úplně jednoznačný. To mohlo být dáno i celkově dobrou kvalitou testovaných vzorků. Je tedy otázkou, zda by byl efekt LDL vyšší, kdyby došlo k větší zátěži spermií během zpracování ejakulátu nebo u ejakulátu problematických plemenů s horší mrazitelností. K lepšímu pochopení působení LDL by bylo vhodné zařadit i další analýzy, například metabolický stav spermií nebo apoptotické změny.

## 8 Seznam literatury

- Abou-haila, A., Tulsiani, D. R. P. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysic.* 485. 72-81.
- 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.
- Aitken, R. J., Baker, M. A. 2013. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *The International Journal of Developmental Biology.* 57. 265-272.
- Aksoy, M., Akman, O., Lehimcioglu, N. C., Erdem, H. 2010. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 120. 166-172.
- Al-Makhzoomi, A., Lundeheim, N., Håård, M., Rodriguez-Martinez, H. 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology.* 70. 682-691.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., Gérard, O., Courtens, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology.* 61. 895-907.
- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., Destrumelle, S., Desherces, S., Anton, M., Jouan, M., Shmitt, E., Tainturier, D. 2010. *In vivo* fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science.* 122 (3-4). 282–287.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Habesona, H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry.* 83 (2). 175-183.
- Bailey, J., Buhr, M. 1994. Cryopreservation alters the Ca<sup>2+</sup> flux of bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science.* 74. 45–52.

- 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.
- Barbas, J. P., Mascarenhas, R. D. 2008. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*. 10 (1). 49-62.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barrière, P., Larrat, M., Tainturier, D. 2008. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70 (9). 1478-1488.
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., Critser, J. K. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*. 78 (8). 1682-1699.
- Bergeron, A., Crête, 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.
- Berndtson, W. E. 2014. Sperm production and its harvest. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (Eds). *Animal Andrology: Theories and Applications*. CAB International. London. p. 11-33. ISBN-13: 9781780643168.
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guinne, B., Guérin, B., Camus, A., Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50 (5). 699-706.
- Breitbart, H. 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 187 (1-2). 139-144.
- Breitbart, H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 49 (3). 1-7.
- Büyüköblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., Endirlik, B. Ü. 2014. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*. 150 (3-4). 77-83.

- Celeghini, E. C. C., de Arruda, P. R., de Andrade, C. A. F., Nascimento, J., Raphael, C. F., Rodrigues, P. H. M. 2008. Effect that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*. 104. 119-131.
- Ciani, F., Cocchia, N., Esposito, L., Avallone, L. 2012. Fertility cryopreservation. In: Wu, B. (Eds.). *Advances in Embryo Transfer*. InTech. Rijeka. p. 225-248. ISBN: 9789535103189.
- Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., Carluccio, A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*. 74 (3). 424-435.
- Cooper, T. G. 1986. *The epididymis, sperm maturation and fertilisation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Münster. p. 281. ISBN: 9783642714733.
- Crespilho, A. M., Sa Filho, M. F., Dell'Aqua Jr., J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Martins, A., Papa, F. O. 2012. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*. 149 (1-2). 1–6.
- Cross, N. L., Hanks, S. E. 1991. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reproduction*. 6 (9). 1279-1283.
- Čech, E., Hájek, Z., Maršál, K., Srp, B. (Eds.). 2006. *Porodnictví – 2. přepracované a doplněné vydání*. Grada Publishing a.s. Praha p.544. ISBN: 9788024713038.
- De Lamirande, E., Leclerc, P., Gagnon, C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 3 (3). 175-194.
- Eddy, E. M. 2006. The spermatozoon. In: Neill, J. D., Challis, J. R. G., Pfaff, D. W., Plant, T. M., Kretser, D. M., Richards, J. S., Wassarman, P. M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press. San Diego. p. 3-55. ISBN: 0125154003.
- Flesch, F. M., Gadella, B. M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1469. 197-235.



- Florman, H. M., Ducibella, T. 2006. Fertilization in mammals. In: Neill, J. D., Challis, J. R. G., Pfaff, D. W., Plant, T. M., Kretser, D. M., Richards, J. S., Wassarman, P. M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press. San Diego. p. 3-55. ISBN: 0125154003.
- Fukuda, M., Sakase, M., Fukushima, M., Harayama, H. 2016. Changes of IZUMO1 in bull spermatozoa during the maturation, acrosome reaction and cryopreservation. *Theriogenology*. 86 (9). 2179-2188.
- Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 63 (2). 431-444.
- Gadella, B. M. 2014. Sperm preparation and fertilization. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (Eds). *Animal adrology: Theories and Applications*. CAB International. London. p. 57-75. ISBN-13: 978 1 78064 316 8.
- Gadella, B. M., Visconti, P. E. 2006. Regulation of capacitation. In: De Jonge, Ch. J., Barratt, Ch. L. R. (Eds). *The sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press. New York. p. 1-30. ISBN-13: 9780511221231.
- Gagnon, C., de Lamirande, E. 2006. Controls of sperm motility. In: De Jonge, Ch. J., Barratt, Ch. L. R. (Eds). *The sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press. New York. p. 1-30. ISBN-13: 9780511221231.
- Gao, D., Mazur, P., Critser, J. K. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Critser JK (Eds.). *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press. San Diego. p. 263-327. ISBN: 0123997704.
- Garner, D. L., Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (Eds.). *Reproduction in Farm Animal*. 6th ed. Williams and Wilkins. Lippincott. Philadelphia. p. 96-109. ISBN: 0683305778.
- Glander, H. J., Schaller, J. 1999. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Molecular Human Reproduction*. 5 (2). 109-115.

- González-Abreu, D., García-Martínez, S., Fernández-Espín, V., Romar, R., Gadea, J. 2017. Incubation of boar spermatozoa in viscous media by addition of methylcellulose improves sperm quality and penetration rates during *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 92. 14-23.
- Gravance, C. G., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D. L., Casey, P. J. 1998. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology*. 19 (6). 704-709.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., Bollwein, H. 2016. Effect of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 86 (2). 562-671.
- Gwathmey, T. M., Igotz, G. G., Mueller, J. L., Manjunath, P., Suarez, S. S. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*. 75. 501-507.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11. 73-88.
- Holt, W. V. 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 9 (3). 309-319.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62. 3-22.
- Holt, W. V., O'Brien, J., Abaigar, T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development*. 19 (6). 709-718.
- Holt, W. V., Penfold, L. M. 2014. Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (Eds). *Animal Adrology: Theories and Applications*. CAB International. London. p. 76-99. ISBN-13: 9781780643168.
- Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., Jia, Y. H. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*. 117 (1-2). 11-17.

- 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 (1). 83–87.
- Chenoweth, P. J., Kastelic, J. P. 2007. Clinical reproductive physiology and endocrinology of bulls. In: Youngquist, R. S., Threlfall, W. R. (Eds.). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 2nd Edition. Elsevier Health Science. Saint Louis Missouri. p. 221-228. ISBN: 9780721693231.
- Isachenko, E. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*. 6 (2). 191–200.
- Jelínek, P., Koudela, K., Doskočil, J., Ilek, J., Kotrbáček, V., Kovářů, F., Kroupová, V., Kučera, M., Kudláč, E., Trávníček, J., Valent, M. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. GRAFOS. Brno. 414 s. ISBN: 8071576441.
- Jeyendran, R. S. 2000. *Interpretation of semen analysis results: a practical guide*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 100. ISBN: 0521799570.
- Jindal, S. K., Sharma, M. C. 2010. *Biotechnology in animal health and production*. New India Publishing Agency. New Delhi. p. 262. ISBN: 9789680235356.
- Jones, R. 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*. 53. 73-84.
- Justice, T., Christensen, G. 2013. Sperm cryopreservation methods. In: Carrell, D. T., Aston, K. I. (Eds.). *Spermatogenesis: Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media, LLC. Louisville. p. 209-215. ISBN: 9781627030380.
- Kaneto, M., Harayama, H., Miyake, M., Kato, S. 2002. Capacitation-like alternations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Animal Reproduction Science*. 73 (3-4). 197-209.
- Kaya, A., Birler, S., Enwall, L., Memili, E. 2014. Determinants of sperm morphology. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (Eds.). *Animal Adrology: Theories and Applications*. CAB International. London. p. 34-56. ISBN-13: 9781780643168.

- Krogenaes, A., Andersen, B. K., Hafne, A. L., Engeland, E. 1994. Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 35 (1). 17-26.
- Koonjaenak, S., Chanatinart, V., Ekwall, H., Rodriguez-Martinez, H. 2007. Morphological features of spermatozoa swamp buffalo AI bulls in thailand. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 54 (4). 169-178.
- Koshimoto, Ch., Gamliel, E., Mazur, P. 2000. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology*. 41 (3). 204-231.
- Kunkitti, P., Bergqvist, A. S., Sjunnesson, Y., Axnér, E. 2015. The ability of feline spermatozoa in different epididymal regions to undergo capacitation and acrosome reaction. *Animal Reproduction Science*. 1-11.
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., Parks, J. E. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*. 172. 1-9.
- Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., Bailey, J. L., Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology*. 21 (5). 700-707.
- Louda, F., Bjelka, M., Jěžková, A., Pozdíšek, J., Stádník, L., Bezdíček, J. 2007. *Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby*. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín. 44 s. ISBN: 978-80-87144-01-5.
- Louda, F., Vaněk, D., Jěžková, A., Stádník, L., Bjelka, M., Bezdíček, J., Pozdíšek, J. 2008. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic*. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín. 56 s. ISBN: 978-80-87144-05-3.
- Lüllmann-Rauch, R. 2012. *Histologie*. Grada Publishing a.s. Praha. 556 s. ISBN: 9788024737294.
- Manjunath, P., Thérien, I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*. 53 (1-2). 109-119.

- Mann, T., Lutwak-Mann, C. 1981. Male reproductive function and semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. p. 500. ISBN-13: 9781447113003.
- Marquez, B., Suarez, S. S. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction*. 70. 1626-1633.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*. 71. 28-37.
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E. J., Garde, J. J., Anel, L., de Paz, P. 2011. Statistical series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*. 75 (5). 782-795.
- Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2007. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda. Praha. 303 s. ISBN: 9788021316584.
- Maxwell, W. M. C., Long, C. R., Johnson, L. A., Dobrinsky, J. R., Welch, G. R. 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*. 10. 433-440.
- 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. 327-344.
- Meyers, S. A., Rosenberger, A. E. 1999. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biology of Reproduction*. 61 (2). 444-451.
- Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., Graham, J. K. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (2). 57-66.
- Moraes, E. A., Graham, J. K., Torres, C. A. A., Meyers, M., Spizziri, B. 2010. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*. 118 (2-4). 148-154.

- 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.
- Mutalik, S., Salian, S. R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A. R., Kumar, P., Kalthur, G., Adiga, S. K. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *System Biology in Reproductive Medicine*. 60 (3). 183-188.
- Parks, J. E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. In: Karow, A. M., Critser, J. K. (Eds.). *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press. San Diego. p. 229-261. ISBN: 9780123997708.
- Parrish, J. J. 2014. Bovine *In vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 81 (1). 67-73.
- Pollard, J. W., Plante, C., King, W. A., Hansen, P. J., Betteridge, K. J., Suarez, S. S. 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biology of Reproduction*. 44 (1). 102-107.
- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63. 215-225.
- Purdy, P. H., Graham, J. K. 2004. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction*. 71 (2). 522-527.
- Rasul, Z., Ahmad, N., Anzar, M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *Journal of Andrology*. 22 (2). 278-283.
- Said, T. M., Gaglani, A., Agarwal, A. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*. 21 (4). 456-462.
- Sellem, E., Broekhuijse, M. L. W. J., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., Koenen, E. P. C. 2015. Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*. 84 (9). 1447-1454.

- Setchell, B. P. 2014. Semen and its constituents. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (Eds). *Animal Adrology: Theories and Applications*. CAB International. London. p. 3-10. ISBN-13: 9781780643168.
- Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A. A., Esmaeili, V., Sharbatoghli, M., Janzamin, E., Hajnasrollahi, M., Mostafayi, F. 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*. 83 (1). 78-85.
- Suarez, S. S., Pacey, A. A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*. 12 (1). 23-37.
- Sutovsky, P., Manandhar, G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: Anatomical and compartmental analysis. In: De Jonge, Ch. J., Barratt, Ch. L. R. (Eds). *The sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press. New York. p. 1-30. ISBN-13: 9780511221231.
- Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., Šichtař, J., Beran, J., Ducháček, J., Hodek, P., Trefil, P. 2016. Effect of low-density lipoprotein addition to soybean lecithin-based extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing – preliminary results. *Czech Journal of Animal Science*. 61 (12). 560-567.
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., Aparicio, I. M. 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: Much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 (3). 65-75.
- Thomas, C. A., Garner, D. L., DeJarnette, J. M., Marshall, C. E. 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*. 58. 786-793.
- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus<sup>®</sup> and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57 (3). 1087-1094.
- Toshimori, K. 2009. Dynamics of the mammalian sperm head: Modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Japan. p. 97. ISBN: 9783540899785.

- Trojan, S., Hrachovina, V., Kittnar, O., Koudelová, J., Kuthan, V., Langmeier, M., Mareš, J., Marešová, D., Mourek, J., Pokorný, J., Sedláček, J., Schreiber, M., Trávníčková, E., Wunsch, Z. 2003. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing. Praha. 771 s. ISBN: 80247051125.
- Utt, M. D. 2016. Prediction of bull fertility. *Animal Reproduction Science*. 169. 37-44.
- Vacek, Z. 2006. *Embryologie*. Grada Publishing a.s. Praha. 255 s. ISBN: 9788024712673.
- Varner, D. D., Scanlan, C. M., Thompson, J. A., Brumbaugh, G. W., Blanchard, T. L., Carlton, C. M., Johnson, L. 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 50 (4). 559-573.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vasquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Anton, M., Bencharif, D., Tainturier, D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Trilady1® and Bioxcell®. *Theriogenology*. 71 (6). 895–900.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57. 149–179.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. *Repetitorium: spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. VÚVeL. Brno. 197 s. ISBN: 8086895017.
- Věžník, Z., Přinosilová, P., Zajícová, A. 2009. Stanovení membránové rezistence spermií kance modifikovaným testem HOS. *Research in pig breeding*. 3 (2). 44-47.
- Visconti, P. E., Kopf, G. S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. 59 (1). 1-6.
- Vishwanath, R., Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3). 23-53.
- Wall, R. J., Foote, R. H. 1999. Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-tris-glycerol extender. *Journal of Dairy Science*. 82 (4). 817-821.



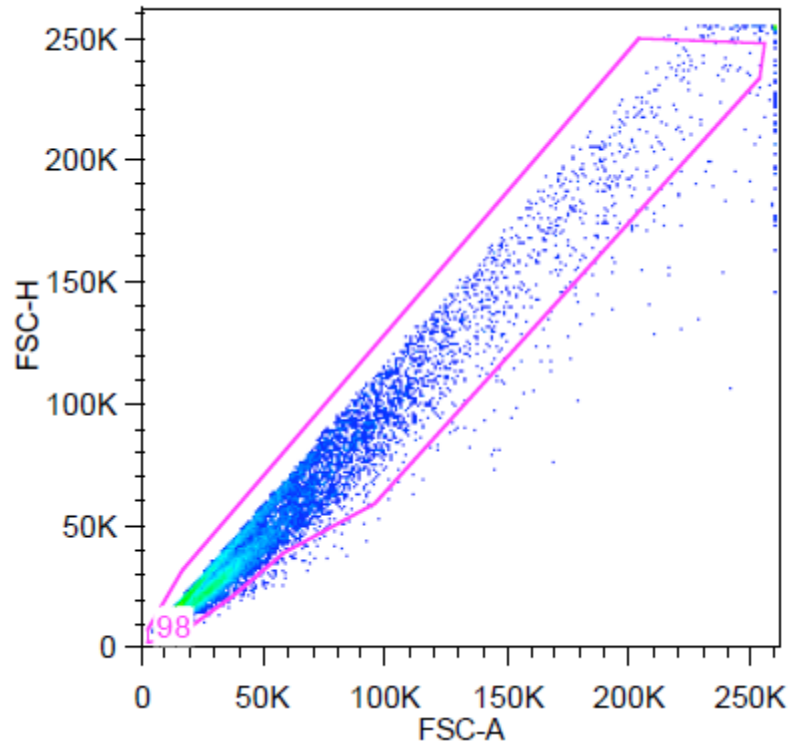
- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7. 871-891.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Semen*. 60-61. 481-492.
- Woelders, H., Matthijs, A., Engel, B. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness, of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*. 35 (2). 93-105.
- Wolf, D. E., Hagopian, S. S., Ishijima, S. 1986. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during *in vitro* capacitation in the mouse. *The Journal of Cell Biology*. 102. 1372-1377.
- Zeron, Y., Grosman-Dahan, D., Laor, R., Mesilati-Stahy, R., Argov-Argaman, N., Zvi, R. 2016. Association between membrane lipid composition and progressive motility in bovine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 169. 95-98.

## 9 Seznam obrázků, tabulek a grafů

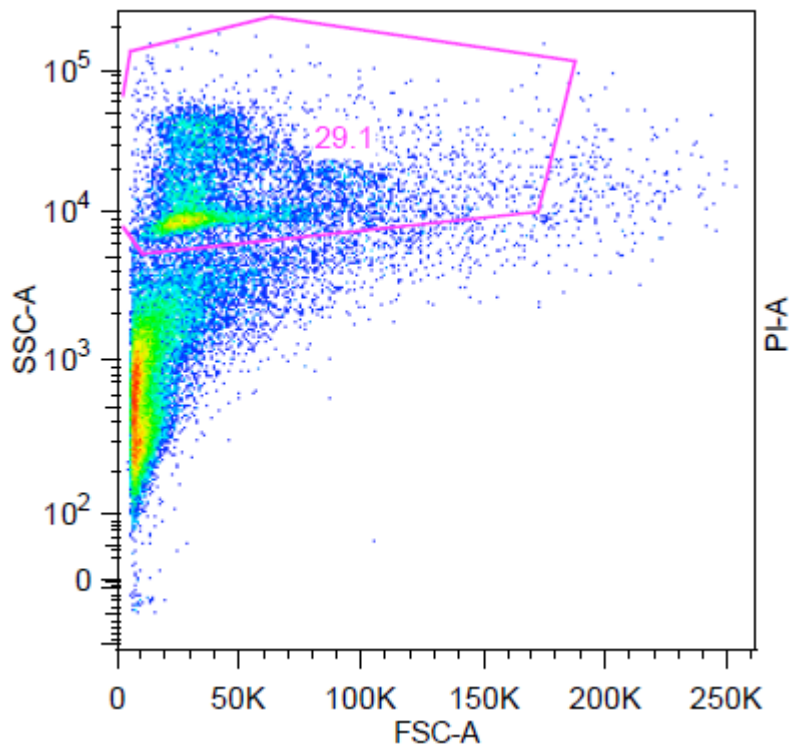
<b>Obrázek 1:</b> Ilustrační fotografie z fluorescenčního mikroskopu .....	27
<b>Tabulka 1:</b> Charakteristika jednotlivých subpopulací spermií na základě vybraných kinematických parametrů (průměr ± SEM – střední chyba průměru).....	31
<b>Graf 1:</b> Procentuální zastoupení progresivně motilních spermií v závislosti na použitém ředidle .....	30
<b>Graf 2:</b> Procentuální zastoupení spermií u jednotlivých subpopulací v závislosti na použitém ředidle .....	32
<b>Graf 3:</b> Procentuální zastoupení viabilních spermií v závislosti na použitém ředidle .....	33
<b>Graf 4:</b> Procentuální zastoupení intaktních akrozomu v závislosti na použitém ředidle.....	34

## 10 Přílohy

**Příloha č. 1:** Odlišení spermií na základě Front side scatteru (FSC)



**Příloha č. 2:** odlišení spermií na základě Side Scatteru (SSC)



**Příloha č. 3:** Výsledné procento živých spermií SYBR14 pozitivních ve fluorescenčním kanále pro Fluorescein isothiokyanát (FITC)

