

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky

**Technologie zmrazování spermií býků ve vztahu k jejich přežitelnosti a
oplozovací schopnosti**

Doktorská disertační práce

Doktorand: Ing. Martina Doležalová

Školitel: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

Praha 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou disertační práci na téma „**Technologie zmrazování spermií býků ve vztahu k jejich přežitelnosti a oplozovací schopnosti**“ vypracovala samostatně a použila jsem pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 31. 10. 2016

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména doc. Ing. Luďku Stádníkovi, Ph.D. za vedení disertační práce, dále Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků, kolegům z KSZ, KVD a spolupracovníkům ze společnosti Natural s r. o., kteří se účastnili výroby a zpracování inseminačních dávek.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	SOUČASNÁ SITUACE V REPRODUKCI SKOTU	2
2.2	PLODNOST SKOTU	2
2.3	PARAMETRY EJAKULÁTU	3
2.3.1	Biologie spermie	3
2.3.2	Semenná plazma.....	5
2.3.3	Změny plazmatické membrány spermií v průběhu poklesu teploty	7
2.3.4	Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu	8
2.3.5	Faktory působící na spermie v průběhu výroby ID.....	8
2.3.6	Hodnocení ejakulátu.....	11
2.4	TECHNOLOGIE VÝROBY ID	11
2.4.1	Ředění ejakulátu.....	12
2.4.2	Chlazení, ekvibrace.....	16
2.4.3	Mrazení.....	17
2.5	Rozmrazování.....	19
3	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	21
4	MATERIÁL A METODIKA.....	22
4.1	METODICKÝ OKRUH I.....	22
4.2	METODICKÝ OKRUH II	24
5	PŘEHLED PUBLIKACÍ	27
5.1	Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance	28
5.2	Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock	35
5.3	Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock.....	42
5.4	Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing	47
5.5	The effect of the freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing....	58
6	ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI.....	67
7	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	70
8	POUŽITÁ LITERATURA	75
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	89

1 ÚVOD

Průměrná úroveň plodnosti dojníc je nedostatečná a tato situace je ekonomicky dlouhodobě neudržitelná. Ekonomika chovu skotu závisí na co nejvyšší úrovni zabřezávání dojníc inseminovaných optimálně geneticky nejčennějšími býky. Plodnost je ovlivňována faktory genetickými, ale především faktory vnějšího prostředí. Schopnost spermií oplodnit vajíčko má zásadní význam pro efektivní management chovu skotu, proto je plodnost býka jedním z dílčích faktorů významně se podílejících na výsledku plodnosti dojníc. Plodnost býků je důležitým faktorem v reprodukci skotu a je reprezentována vstupní kvalitou čerstvého ejakulátu a výslednou kvalitou inseminační dávky. Hlavní ekonomické ztráty chovatelů jsou způsobeny v důsledku zvýšení nákladů spojených s ustájením nezabřezlých samic, stejně jako samců, kteří nemají požadovanou kvalitu ejakulátu.

Pro úspěšné zabřeznutí jsou důležité jak samičí, tak i samčí gamety. Nejrozšířenější biotechnologickou metodou u skotu je umělá inseminace (AI), využívaná pro zlepšení parametrů reprodukce a zajištění genetického zisku. Analýza ejakulátu je v současné době nejvíce používaným postupem pro hodnocení plodnosti samců. Hlavním zájmem je produkce vysoce kvalitních inseminačních dávek (ID) a snaha dosáhnout podobného stupně zabřezávání při inseminaci rozmrazeným ejakulátem jako po přirozené plemenitbě.

Na inseminačních stanicích po celém světě je široce využívána kryokonzervace ejakulátu býků. Nicméně významné procento spermií odumře v průběhu výroby ID právě v důsledku ztráty oplozovací schopnosti spermie vzniklé jejich poškozením v důsledku změny teplot, respektive chladovým šokem, při procesu chlazení a mrazení ID. Najít optimální podmínky pro zpracování ejakulátu může být obtížné, vzhledem k interakcím mezi různými parametry, jako například složení ředícího média, nebo podmínky ekvilibrace a mrazení.

Udržení oplozovací schopnosti ejakulátu v průběhu dlouhého a náročného procesu jeho zpracování, ředění a mrazení, při výrobě inseminační dávky či po jejím rozmrazení může zajistit vyšší úroveň zabřezávání dojníc, snížit spotřebu inseminačních dávek, zkrátit délku mezidobí a zlepšit celkovou ekonomickou efektivitu jejich chovu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 SOUČASNÁ SITUACE V REPRODUKCI SKOTU

V posledních letech se počet inseminovaných plemenic výrazně neměnil, celkově bylo inseminováno na první inseminaci 495 tis. plemenic s celkovým počtem 459 tis. zabřezlých plemenic po všech inseminacích. Největší podíl inseminovaných plemenic byl zaznamenán u plemene holštýn (56,1%), dále pak české strakaté plemeno (37,9%), na masné plemenice připadlo 6% prvních inseminací.

Nejvyššího podílu zabřezávání bylo dosaženo u jalovic (60,5%), u krav potom (41,2%). Nejlépe zabřezávaly plemenice masných plemen (67,6%), nejhůře naopak plemenice mléčných plemen (holštýnský skot, 42,4%). Průměrná délka inseminačního intervalu postupně klesala až na současných 75,3 dní, SP na 118,8 dní a mezidobí na 407 dní. Ekonomickou ztrátu prodloužení SP nebo mezidobí nad optimální délku o den, resp. o pohlavní cyklus, lze odhadnout na 50 až 70 Kč, resp. na 1000 až 1400 Kč (Kvapilík et al., 2015).

2.2 PLODNOST SKOTU

Plodnost je základní biologická a současně ekonomicky významná užitková vlastnost skotu. Rozhodujícím způsobem ovlivňuje obě hlavní užitkové vlastnosti skotu. Plodností rozumíme schopnost produkovat životaschopné potomstvo. Realizuje se produkcí pohlavních buněk, oplozením vajíčka a porodem telete (Louda et al., 2008).

Plodnost je komplexní vlastnost ovlivňována mnoha faktory, jako je genetika, epigenetika, faktory životního prostředí a epistáze, ve výsledku je to ale nízké dědivé vlastnosti (Collins et al., 1962; Blaschek et al., 2011; Parisi et al., 2014). Ačkoli většinou genetické faktory ovlivňují plodnost, faktory prostředí, jako je klima, výživa a management chovu mají významný vliv na fyziologii organismu a tím i na jeho plodnost. Mezi tyto faktory patří například extrémní klimatické výkyvy, dlouhá doba přepravy nebo nevybalancovaná krmná dávka (Parisi et al., 2014). Klima (teplo, chlad, vítr, vlhkost) může mít vliv na počet spermií, morfologii, fyziologii a další. Významné rozdíly v plodnosti existují i mezi býky produkující spermie s normální pohyblivostí, morfologií a koncentrací. Optimální teplota pro produkci spermií je mezi 5 a 15°C (Fuerst-Waltl et al., 2006).

Nezbytně důležitou součástí optimální reprodukční schopnosti je správná funkce endokrinního systému, respektive řízení produkce spermií a jejich zrání (Parisi et al., 2014). Například koncentrace FSH (folikuly stimulujícího hormonu) a inhibinu v organismu jsou

nezbytné pro produkci a životaschopnost spermií (Gilbert et al., 2012). Taktéž vyvážená krmná dávka během odchovu býčků má významný vliv na testikulární biosyntézu steroidních hormonů mající podpůrnou funkci pro Leydigovy buňky (Parisi et al., 2014).

Vzhledem k tomu, že se na plodnosti podílejí komplikované, různorodé a silně působící faktory, přetrvává nízká plodnost, popřípadě neplodnost. Přestože vysoké ekonomické náklady v chovech jsou spojeny s nízkou plodností, molekulární, buněčné a fyziologické mechanismy ovládající plodnost býků dosud nejsou přesně známy (Parisi et al., 2014).

2.3 PARAMETRY EJAKULÁTU

Vyhodnocení parametrů ejakulátu vypovídá o potenciální oplozovací schopnosti inseminační dávky, tudíž i o samotné plodnosti býka. Parametry ejakulátu vychází z biologie spermie a jejího fungování.

2.3.1 Biologie spermie

Spermie je vysoce diferenciovaná a polarizovaná buňka (Holt, 1984). Každý savčí druh je specifický svými proteiny umístěnými na povrchu spermie, které se podílejí na oplození oocyty, dále jsou známy rozdílné velikosti a tvary spermií, umožňující pohyb a penetraci skrz extracelulární vrstvu chránící oocyt (Vieira et Miller, 2006). Spermie se dělí na 3 části: hlavička, spojovací část a bičík. Taktéž plazmatická membrána těchto součástí je rozdělená do tří odpovídajících (navazujících) oblastí (Gadella et al., 1994). Délka hlavičky spermie býka je přibližně 10 μm a šířka 5 μm (Hofírek et al., 2009).

K mnoha charakteristickým změnám dochází v průběhu spermatogenního cyklu, kdy je dokončeno druhé meiotické dělení spermatocytů a formuje se spermatida jako podlouhlá buňka tvaru spermie. Dále je formován akrozom, který u zralé spermie překrývá apikální část protáhlého jádra spermie, obsahuje matrix pro enzymy nutné k dosažení povrchu oocyty a průniku skrz kumulární vrstvu oocyty a zonu pelucidu (hyaluronidázu a akroziny) (Hofírek et al., 2009; Gadella, 2008). Během této fáze zabírá místo kondenzovaný chromatin. Základem hlavičky je kondenzovaná nukleoplazma krytá jadernou membránou (Hofírek et al., 2009). Kondenzované histony DNA jsou odstraněny a nahrazeny protaminy, což vede k superkondenzaci DNA. Bazální část hlavičky, která se též označuje jako postnukleární čepička, má vykrojení, označované jako implantační jamka. Do ní zapadá rozšířená část bičíku, krček, označovaný jako implantační talíř, tvořený segmentovanými chordami, tato část vzniká z proximálního centriolu (Hofírek et al., 2009). Bičík se ve své střední části skládá

z cca 100 mitochondrií, které jsou spirálovitě ovinuty kolem střední části bičíku a jsou zodpovědné za aerobní fungování spermie (Tanaka et Baba, 2005). Hlavní funkcí mitochondrií je produkce ATP, vstupují také do mnoha fyziologických procesů jako je homeostáza kalcia, metabolismus lipidů a aminokyselin, ale i apoptóza a další (Green et Watson, 2001). Mitochondrie mají vlastní genom zahrnující 37 genů kodujících 13 peptidů, 22 tRNA a 2 rRNA (Park et Larsson, 2011). Mitochondrie jsou považovány za nejdůležitější orgány pro hodnocení kvality spermií, mají výrazný vliv na funkce spermie, změny v mitochondriální struktuře spermií ovlivňují motilitu spermie (Piomboni et al., 2012) a mohou mít vliv na schopnost spermie oplodnit oocyt (Le Guillou et al., 2013). Obsahují vlastní DNA a membránový potenciál, který může být snadno zkoumán in vitro pomocí integrity DNA spermií a pomocí hodnocení motility (Carra et al., 2004). V distální části bičíku spermie nejsou obsaženy žádné mitochondrie, ale je zde specifická soustava husté cytoskeletární formace, která zajišťuje pohyb vpřed. Distální koncová část bičíku je obklopena plazmatickou membránou. Před tím, než se spermie odpoutá od lumen Sertoliho buněk, zbavuje se množství nepotřebných organel jako Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum, lyzozomy, peroxizomy a ribozomy, které nejsou nezbytně nutné pro oplodnění oocytu (Gadella et al., 2008). Díky ztrátě organel je z hlediska molekulární biologie povrch spermie velmi inertní.

Když volné spermie migrují ze semenotvorných kanálků přes rete testis do vývodu nadvarlete v hlavě nadvarlete, mají už svůj typický tvar s hlavičkou obsahující jádro s vysoce kondenzovaným chromatinem, který obsahuje haploidní genom a specifické sekreční orgány a vysoce specializovaný bičík. V důsledku událostí, které proběhly na povrchu spermie, došlo ke změnám některých metabolických procesů, což mělo vliv na vlastnosti pohybu spermií (v hlavě nadvarlete jsou spermie nepohyblivé). V ocasu nadvarlete na svůj povrch spermie přitahují množství proteinů, které se následně podílejí na oplození. Jedná se o integrální membránové proteiny (GPI – glycosyl proshpatidyl inositol) (Sullivan et Saez, 2013).

Celý povrch spermie pokrývá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která se skládá převážně z lipidů a proteinů (Hofírek et al., 2009). Distribuce lipidů v membráně je nestálá nehomogenní, neustále dochází ke změnám v jejich umístění (Parks et Lynch, 1992). Lipidové složení membrány spermie dodává potřebnou flexibilitu pro buňku, reguluje její buněčné funkce jako spermatogeneze a kapacity (Sanocka et Kurpisz, 2004). V membráně se nachází glycerol-fosfolipidy, jejichž zastoupení je mezidruhově stálé (Parks et Lynch, 1992). Negativně nabitě lipidy jsou přednostně umístěny ve vnitřní vrstvě membrány, zatímco

kladně nabitě lipidy (sfingomyeliny, fosfatidylcholin) nebo neutrální lipidy jsou umístěny ve vnější vrstvě membrány (Le Guillou et al., 2013). V plazmatické membráně býků jsou lipidy rozděleny asymetricky a obsahují především polynenasycené mastné kyseliny.

Vyšší zastoupení těchto kyselin v membráně pozitivně ovlivňuje zastoupení spermií s intaktní plazmatickou membránou, důvodem je zvyšování fluidity membrány. Naopak nižší zastoupení polynenasycených mastných kyselin způsobuje nepoddajnost membrány (nepřizpůsobivost). Úroveň zastoupení určitých mastných kyselin hraje významnou roli především z hlediska odolnosti spermií vůči kryokonzervaci v rámci mezidruhových i individuálních rozdílů (Phelps et al., 1999; Watson, 2000).

Převažujícími lipidy jsou fosfolipidy a cholesterol (Hofírek et al., 2009). Poměr cholesterolu a fosfolipidu v cytoplazmatické membráně spermie je důležitý determinant fluidity a stability buněčné membrány za působení nízkých teplot (Watson, 1981). Cholesterol je hydrofobní molekula ve vodě nerozpustná, má vliv na buněčnou membránu spermie včetně její stabilizace a snížení propustnosti, představuje 25 – 50 % lipidů plazmatické membrány, což tvoří téměř 90 % celkového obsahu cholesterolu v buňce (Crockett, 1998; Mocé et al., 2010). Cholesterol je důležitým prvkem regulace membránové fluidity (Purdy et Graham, 2004).

Zatímco fosfolipidy představují stavební komponenty plazmatické membrány, proteiny plní její specifické funkce. Dělí se do dvou základních skupin podle jejich připojení na membránu a to na transmembránové, které jsou začleněny přímo do lipidové dvojvrstvy a na periferní, které jsou navázány na fosfolipidy nepřímo na membráně. Slouží jako iontové kanály a přenašeče, účastní se selektivního přenosu molekul skrz membránu a dále regulačních a signálních procesů. Zatímco periferní proteiny slouží zejména při oplození (Tapia et al., 2012).

2.3.2 Semenná plazma

Při ejakulaci jsou promíseny spermie z ocasu nadvarlete s tekutinou z přídatných pohlavních žláz samce (Cowperovy, bulbouretrální žlázy a prostata) (Gibbons et al., 2005). Jedná se o komplexní kapalinu, která zprostředkovává chemické funkce ejakulátu. Její pH se druhově liší a u býků je mírně kyselé (6,2 – 7,2) (Le Guillou et al., 2013). Obecně je semenná plazma považována za médium, které umožňuje přežití spermií a usnadňuje jejich transport (Juyena et al., 2012). To nasvědčuje tomu, že komponenty semenné plazmy se účastní klíčových událostí spojených s funkcí spermií, oplodněním a vývojem embrya v samičím pohlavním traktu (Juyena et al., 2012).

Semenná plazma je tvořena ionty (Na^+ , K^+ , Zn^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl_2), energetickými substráty (fruktóza, sorbitol, glycerylphosphocholin), organickými sloučeninami (kyselina citronová, aminokyseliny, peptidy, proteiny s nízkou a vysokou molekulovou hmotností, lipidy, hormony – testosteron, estrogen a prostaglandiny, citokiny) a dusíkatými komponenty (amoniak, močovina, kyselina močová, kreatinin a redukující látky – kyselina askorbová a hypotaurin). Složení semenné plazmy je dáno objemem, skladováním a výstupem z různých částí samčího pohlavního traktu (Mann, 1964). Chemické složení plazmy a funkce přídatných pohlavních žláz se liší jak v rámci druhu, tak i mezi ejakuláty jednoho samce. Rozdíly v koncentracích některých komponent v semenné plazmě mohou být způsobeny výživou, managementem chovu, působením enzymů přítomných v plazmě a metabolickou aktivitou spermií rozptýlených v semenné plazmě. Přidání semenné plazmy do rozmrazeného ejakulátu zvyšuje spotřebu kyslíku a motilitu spermií, pomáhá obnovit některé povrchové proteiny a celkově zvyšuje parametry kvality ejakulátu (Vieira et Miller, 2006).

Po smíchání spermií s výměšky přídatných pohlavních žláz jsou spermie vystaveny novému prostředí s komplexní směsí nových proteinů. Obecně je známo, že semenná plazma stabilizuje membránu spermie obklopením jejího povrchu. Semenná plazma překrývá proteiny spojené s oplozovací schopností z nadvarlete na povrchu spermie a tím se absorbují na povrchu spermie. Proteiny semenné plazmy tvoří ochrannou vrstvu spermie s dekapacitačními faktory, které inhibují oplozovací schopnost ejakulované spermie (Gibbons et al., 2005), to umožňuje spermiím zachovat si oplozovací schopnost v průběhu průchodu pochvou, děložním čípkem a dělohou, respektive skrz prostředí, které je pro spermie nepřátelské. Semenná plazma hraje imunoregulační roli, která je prospěšná pro přežití spermií v samičím pohlavním traktu (Juyena et al., 2012).

Při ejakulaci je semenná plazma se spermiemi deponována do pohlavního traktu samice. K aktivaci spermií dochází ve vejcovodu samice. Tato aktivace se nazývá kapacitace. Spermie, které se dostanou do vejcovodu, vyplavou ze semenné plazmy, tudíž obnaží své dekapacitační faktory (Talevi et Gualtieri, 2010) a začíná jejich reakce s řasinkami epitelu vejcovodu. Při ovulaci dochází na těchto buňkách k masivní sekreci, která způsobuje uvolnění spermií z povrchu řasinek. Uvolněné spermie získávají hyperaktivní pohyb. Pouze takto aktivované spermie mohou být přijaty komplexem oocyty (Chang et Suarez, 2012).

2.3.3 Změny plazmatické membrány spermií v průběhu poklesu teploty

Znalost termodynamického procesu, kterému podléhá biologický vzorek během konzervace, má velký význam pro optimalizaci chladicích a mrazicích procesů. Jedná se hlavně o měření teploty ve vzorku a její změnu v průběhu chlazení a mrazení, tyto informace jsou vhodné zejména pro výpočet rychlosti chlazení vzorku.

Během chlazení dochází k určitým změnám v cytoplazmatické membráně spermie. Když je membrána zchlazena na teplotu fázového přechodu, změní se z kapalného krystalického stavu do stavu gelu (Amann, 1989). Při poklesu teploty na určitou úroveň dochází ke změnám v uspořádání lipidů v membráně, každý druh lipidu podléhá této změně za působení rozdílné teploty, tudíž membrána, která je jako celek složena z mnoha různých lipidů, podléhá této změně v relativně širokém teplotním rozmezí. Ve fázi krystalického gelu se řetězce fosfolipidů narovnávají a prodlužují, což vede k jejich obalení membránou a k následnému omezení pohybu lipidů a proteinů ve vnitřním uspořádání. Samostatné proteiny jsou vyloučeny z krystalického gelu, k mnoha reakcím lipidů a proteinů proto nemůže docházet. Nahromaděním proteinů a změnou struktury lipidů se cytoplazmatická membrána stává nestabilní, její funkce jsou poškozeny (Amann et Pickett, 1987) a může docházet ke chladovému šoku (Amann, 1989). Rychlé zchlazení spermií ve fázi přechodu vyvolává ztrátu lipidů (Watson, 1976) z nového uspořádání proteinů a lipidů v membráně. Tato ztráta následně vede k ohrožení membrány, která se stává propustnou pro vodu a ionty, vedoucí k abnormální motilitě u spermií (Loomis et Graham, 2008).

Při použití tekutého dusíku (LN₂ – teplota varu kapaliny -196°C) k mrazení je rozdíl teploty kapaliny a mrazeného vzorku, který může mít pokojovou teplotu, natolik vysoký, že způsobuje var kapaliny (Santos et al., 2013). K varu kapaliny dochází, když velké množství tekutiny obklopuje povrch ponořeného vzorku a tekutina neproudí (Sansinena et al., 2012). Jakmile je pejeta ponořena do LN₂, její větší teplota způsobuje silné vypařování LN₂ okolo povrchu pejety, vytváří zde *difúzní vrstvu*, která obklopuje její povrch a slouží jako tepelně izolační vrstva. V důsledku toho je prostup tepla (tepelný tok) mezi pejetou a LN₂ omezený a pejeta se tudíž bude ochazovat pomaleji a je zabráněno rychlému chlazení vzorku, což je jev, kterému je potřeba se při kryokonzervaci vyhnout. Tento bod se nazývá bod *minimálního tepelného toku* (Santos et al., 2013). Izolační vrstva par dusíku nacházející se kolem pejety je překonána, když se tepelný tok postupně zvyšuje a je nastolen přechod do režimu varu obsahu pejety (zmrazení obsahu pejety). To je charakterizováno prudkým zvýšením toku tepla do bodu zvaného *maximální tepelný tok* (Santos et al., 2013).

Současné metody kryokonzervace spermií v pejetách zahrnují jejich ekvilibraci před samotným mražením (Sansinena et al., 2012). Křivka varu, která odpovídá kolísání tepelného toku, závisí na několika faktorech: použití kryogenní kapaliny a její tepelné vlastnosti, materiálu obalu vzorku a relativní poloha vzorku v kryogenní kapalině (vertikální, horizontální nebo v určitém úhlu) a tvar nádoby, ve které je vzorek uložen (koule, válce nebo nepravidelné tvary).

2.3.4 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu

Kvalita spermií je ovlivněna faktory vnitřními, mezi které patří plemenná příslušnost, vliv individuality býka a jeho věk (Štolc et al., 2009). V práci Beran et al. (2011) byl zkoumán vliv plemene, věku a tělesné kondice býků na kvalitativní a kvantitativní parametry ejakulátu. Plemenná příslušnost měla vliv na motilitu spermií a procentuální zastoupení živých spermií v ejakulátu (Beran et al., 2011). Vyšší pokles motility po 90 minutách trvání testu přežitelnosti byl zaznamenán u býků plemene holštýn oproti českému strakatému plemeni. Celkově bylo u tohoto plemene dosaženo vyšší motility v průběhu testu přežitelnosti spermií. Tělesná kondice býků ovlivňovala koncentraci spermií, motilitu a podíl patologických spermií. Vyšší motilita ihned po odběru byla zaznamenána u býků s vyšší tělesnou kondicí ($> 2,75$). Věk býků ovlivňoval objem a koncentraci spermií v ejakulátu. Podle Štolc et al. (2009) je patrný vliv věku plemeníka a procesu zpracování ejakulátu na pokles celkové motility spermií zejména po 60 a 90 minutách testu. Objem ejakulátu, koncentrace a aktivita spermií v průběhu celého testu přežitelnosti spermií byly vyšší u býků nižšího věku. Kvalita spermií je dále ovlivněna faktory vnějšími jako složení krmné dávky, obsah doplňkových látek (Čeřovský et al., 2009), podmínky prostředí, četnost odběrů ejakulátu (Wolf et Smítal, 2009) a období roku (Hajirezaee et al., 2010).

2.3.5 Faktory působící na spermie v průběhu výroby ID

Faktory prostředí jako je například pH, osmolarita a teplota také mohou ovlivňovat funkci spermií (Shum et al., 2011). Například studie (Gatti et al., 1993; De Pauw et al., 2003) prokázaly vliv intracelulárního pH na motilitu spermií, tento mechanismus se podílí na získávání pohyblivosti spermií po skladování a funkčním dozrání spermií v ocasu nadvarlete a během ejakulace. Po dozrání spermie ztrácí schopnost biosyntézy, reparace, růstu, dělení a má minimální metabolické funkce (Hammerstedt, 1993), čímž jsou plně závislé na podmínkách prostředí. Bavister et al. (1983) zjistil, že snižující se extracelulární pH snižuje motilitu spermií a zvyšuje jejich životaschopnost. Vztah mezi intracelulárním pH a motilitou

byl potvrzen, souvislost mezi těmito parametry může být přisuzována fosforylaci proteinů. V práci Contri et al. (2013) nižší hodnoty pH (5,5) zapříčinily sníženou motilitu spermií a sníženou integritu membrány, zatímco zvýšení pH (8,5) vedlo k významnému snížení mitochondriální aktivity spermií. Při působení kyselého prostředí ($\text{pH} < 7$) spermie znehybní a motilita se opět obnoví, když se hodnota pH vrátí na optimum ($\text{pH} 6,2 - 7,2$) (Le Guillou et al., 2013). Při působení alkalických podmínek prostředí ($\text{pH} > 7$) je ale ztráta motility ireverzibilní (Makler et al., 1981) i přes navrácení pH na optimum. Důvodem je nevratná ztráta integrity membrány spermie. Z výsledků práce (Contri et al., 2013) je zřejmé, že odlišné pH v různých částech pohlavního traktu samice moduluje pohyblivost spermií. Hodnota pH semenné plazmy se může lišit mezi jednotlivci, je tudíž možné, že variabilita mezi parametry spermií může částečně záviset na extracelulární tekutině, ve které jsou spermie rozptýleny.

Během kryokonzervace je membrána vystavena náhlým změnám osmotického tlaku, který působí na plazmatickou membránu a může způsobit trvalé poškození její celistvosti (Hammerstedt et al., 1979). Spolu s ostatními parametry (koncentrace, pH, motilita) osmotický tlak hraje významnou roli při kryokonzervaci spermií a má vliv na kvalitu zmrazeného ejakulátu. Vyhodnocení normálních hodnot osmotického tlaku a vliv různého tlaku na integritu plazmatické membrány a životaschopnost spermií může přispět k porozumění změn během mrazení a rozmrazování (Khan et Ijaz, 2008). Za normální osmotický tlak je považován tlak 300 mOsm/l celého ejakulátu a 285 mOsm/l tlak semenné plazmy. V práci Khan et Ijaz (2008) bylo porovnáváno působení různého osmotického tlaku (50, 100, 150, 190 a 250 mOsm/l) na buvolí spermie a bylo zjištěno, že vyšší integrity plazmatické membrány spermií v čerstvém ejakulátu bylo dosaženo při působení osmotickým tlaku 50 – 190 mOsm/l než při působení osmotického tlaku 250 mOsm/l, který významně snížil integritu plazmatické membrány spermií. Stejného výsledku bylo v této práci dosaženo při hodnocení vlivu osmotického tlaku na integritu membrán spermií v rozmrazeném ejakulátu. Ztráta životaschopnosti byla nejvyšší při osmotickém tlaku 50 mOsm/l naopak nejnižší při působení tlaku 250 mOsm/l u čerstvého i rozmrazeného ejakulátu. Výsledkem práce bylo shrnutí, že vyšší osmotický tlak působící na buňky nemá příznivé účinky na následnou motilitu a integritu membrán. Změny v osmotických podmínkách způsobují tvorbu letálních extracelulárních krystalů (Holt, 2000).

Integrita DNA spermie je rozhodující pro reprodukci (Bochenek et al., 2001). Změna v konformaci chromatinu spermií může způsobit snížení plodnosti. Spermatická DNA je pod neustálým tlakem oxidativního stresu v důsledku nadměrné tvorby ROS (reaktivní formy

kyslíku), které oxidují DNA a narušují kapacitaci, hyperaktivaci spermií a fúzi oocyty (Parisi et al., 2014). Gamety všeobecně jsou velmi citlivé právě na změny způsobené ROS. V případě spermií je tato citlivost způsobena specifickým složením plazmatické membrány, omezenými schopnostmi antioxidantního systému a neschopností opětovné syntézy poškozených komponent (Hammerstedt, 1993). ROS jsou produkovány uvnitř buňky, stejně jako mimo buňku atmosferickým kyslíkem a ostatními environmentálními faktory včetně znečištění a radiace (Agarwal et Prabakaran, 2005). Také polynenasycené mastné kyseliny obsažené v membráně spermií jsou náchylné k poškození oxidací, jejich poškození narušuje schopnost spermie oplodnit oocyt. Taktéž příliš vysoké hladiny lipidů způsobují větší náchylnost k poškození ze strany reaktivních forem kyslíku (ROS) (Parisi et al., 2014).

Chladový šok je označován jako stresová reakce spermie na pokles teploty. Obecně poškození chladovým šokem se projevuje snížením buněčného metabolismu, poškozením permeability buněčné membrány, ztráta intracelulárních komponent, nevratná ztráta motility spermií a tudíž i vyšší podíl mrtvých spermií v ejakulátu. Zejména proces chlazení je hlavním stresovým faktorem, způsobuje změnu konfigurace fosfolipidů v plazmatické membráně, tím se naruší jejich funkce i fluidita membrány (Lessard et al., 2000). K největším změnám dochází nejčastěji za působení teplot 15 – 5 °C (Drobnis et al., 1993), pod 0°C ustávají (Watson, 2000). Citlivost spermií různých druhů na chladový šok je pravděpodobně způsobena lipidovým složením membrány (Loomis et Graham, 2008). Poškození buněk vyplývající z procesu chlazení nebo mrazení má vliv na strukturu i funkci buněk. Způsobuje předčasnou akrozomální reakci, změny v mitochondriálních funkcích, změny v chromatinové dekonenzaci a všechny tyto změny negativně ovlivňují životaschopnost spermií (Watson, 2000).

Když se ejakulát zchladí příliš rychle, rychlost dehydratace není dostačující pro předcházení výskytu intracelulárního ledu (Woelders, 1997). Intracelulární ledové krystaly mohou negativně ovlivnit plazmatickou membránu spermie, integritu akrozomální nebo mitochondriální membrány (Defoin et al., 2008) a způsobit ztrátu intracelulárních komponent (Graham et Mocé, 2008), která může iniciovat buněčnou smrt (Padrik et al., 2012). Toto poškození je odpovědné za ztrátu motility, životaschopnosti a oplodovací schopnosti spermií v následně rozmrazeném ejakulátu (Holt, 2000). Během pomalého chlazení dochází k dehydrataci spermie, může být dosaženo bodu osmotické rovnováhy mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím, to znamená, že buněčná dehydratace je maximální (Woelders, 1997). Eliminace těchto negativních vlivů je docíleno využíváním kryoprotektantů a optimálních mrazících křivek (Pena et al., 2011).

2.3.6 Hodnocení ejakulátu

Hlavním cílem hodnocení ejakulátu je posoudit jeho kvalitu, resp. vyhodnotit potenciální plodnost samce. Pro vyhodnocení plodnosti samců je potřeba začít s fyzickým hodnocením zvířete (Rodriguez-Martinez et Barth, 2007) jako je hodnocení zdraví, vyšetření vnitřních a vnějších pohlavních orgánů a hodnocení kvality ejakulátu. Jedná se o jednoduchý a nákladově efektivní způsob hodnocení plodnosti býků (Hoflack et al., 2006). Velikost, tvar a obvod šourku je spojen s býčí plodností. Obvod býčích varlat poskytuje představu o množství tkáně, produkující spermií. Existují korelace mezi obvodem šourku, plodností a nástupem puberty u dcer býka (Parisi et al., 2014). Analýza kvality ejakulátu představuje výkonný nástroj pro vyhodnocení potenciálu plodnosti samců více druhů (Rodriguez-Martinez et Barth, 2007). Pro vyhodnocení kvality spermií je možné využít mikroskopie, analýzu spermií pomocí počítačové techniky a průtokovou cytometrii (Lorton, 2014). Mezi laboratorní metody hodnotící kvalitu spermií patří posouzení integrity různých struktur jako struktury genomové DNA (gDNA), akrozomu, buněčné membrány a mitochondrií, tak se hodnotí i dynamické parametry spermií jako je hyperaktivní motilita (Davis et al., 1992), stejně jako interakce spermií a vajíčka (Rodriguez-Martinez, 2006). Integrita plazmatické membrány spermií je důležitá pro optimální funkci spermií. Pouze spermií s neporušenou plazmatickou membránou může podstoupit komplex změn v samičím reprodukčním traktu a má schopnost oplodnit vajíčko (Yanagimachi, 1994), proto byla většina metod založena na posuzování životaschopnosti spermií (Věžník et al., 2004). Korelace mezi motilitou a plodností se pohybovaly mezi 0,15 a 0,83 (Bailey et al., 2000, Januskauskas et al., 2003), zatímco nejvyšší korelace $r^2=0,83$ byla naměřena mezi motilitou a parametry funkce spermií (pohyb spermií, integrita DNA a životaschopnost spermií) (Januskauskas et al., 2001). Graham et al. (1980) uvádí, že korelace mezi plodností býka a rozborem motility, morfologií a životaschopnosti spermií se pohybuje v rozmezí 0,06 – 0,86. Přesnost těchto metod závisí na přesnosti analýz a na počtu pozorování (Rodriguez-Martinez, 2006).

Proces výroby ID snižuje motilitu spermií, tudíž počáteční kvalita ejakulátu je rozhodující pro výslednou kvalitu ejakulátu po rozmrazení (Beran et al., 2011).

2.4 TECHNOLOGIE VÝROBY ID

Zmrazený ejakulát je efektivně využíván k inseminaci u mnoha druhů zvířat. Hlavním cílem je dosáhnout podobného stupně zabřezávání zmrazeným ejakulátem jako čerstvým ejakulátem, využitím co nejnižšího počtu spermií v ID a vyhovující technologií inseminace (Mocé et al., 2010). Samotné zpracování ejakulátu zahrnuje adaptaci biologických buněk na

osmotický tlak a stres související se změnami teplot, kterým prochází při naředění, chlazení, procesu mrazení a rozmrazování (Watson et al., 1992). Pokles teplot, chladový šok a intracelulární ledové krystaly mohou negativně ovlivnit plazmatickou membránu spermií, integritu akrozomální nebo mitochondriální membrány (Defoin et al., 2008) a způsobit ztrátu intracelulárních komponent (Graham et Mocé, 2008), která může iniciovat buněčnou smrt (Padrik et al., 2012). Toto poškození je odpovědné za ztrátu motility, životaschopnosti a oplozovací schopnosti spermií v následně rozmrazeném ejakulátu (Holt, 2000). Kvalita rozmrazeného ejakulátu je faktor, který významně ovlivňuje zabřezávání (Saacke, 1984).

Zájmem inseminačních stanic je udržovat nejvyšší kvalitu spermatu. Záleží na samotném odchovu a chovu plemeníka, na technice krmení a krmné dávce, taktéž na odběru a zpracování ejakulátu. Po makroskopickém a mikroskopickém zhodnocení odebraného ejakulátu následuje jeho dlouhodobá konzervace – ředění a zmrazování. Právě tyto fáze mají rozhodující vliv na oplozovací schopnost a přežitelnost spermií v ID (Beran et al., 2014).

Úspěšnost kryokonzervace spermatu závisí na mnoha faktorech, včetně interakcí mezi kryoprotektivy, typu ředidla, rychlosti mrazení, rychlosti rozmrazení, balení a individualitě dárce (Cooter et al., 2005; Clulow et al., 2008).

2.4.1 Ředění ejakulátu

Z počátku bylo býčí sperma před použitím ředěno a konzervováno jen krátkodobě (Verberckmoes et al., 2005). S objevením složky kryoprotektantů a výhod spojených s použitím ředidel a kryokonzervace bylo postupně omezováno použití čerstvého nebo chlazeného ejakulátu (Papa et al., 2015; Loomis et Graham, 2008). Ve srovnání s čerstvým ejakulátem, se stejným počtem spermií, kryokonzervované sperma přináší nižší plodnost. Proces ředění musí být zahájen do 150 minut po odběru. Teplota přidávaného ředidla i ředěného ejakulátu musí být stejná, aby se předešlo chladovému šoku (Ball et Peters, 2004).

Ředěním ejakulátu se vytváří podmínky pro přežívání spermií mimo organismus. Životními projevy jako je dýchání spermií, vznikají v ejakulátu produkty látkové výměny, například kyselina mléčná. Ta postupně okyseluje prostředí, zpomaluje pohyb spermií, navozuje anabiózu a jejich odumření (Mutalík et al., 2014).

Jako ředidla jsou dostupné specifické biochemické látky, které ovlivňují schopnost spermií a předchází jejich poškození v průběhu mrazícího procesu (Tatham, 2000), slouží zde jako ochrana pro spermiie během mrazení (snaha zabránit chladovému šoku) a zlepšení motility po následném rozmrazení (Siddique et al., 2006). Ředidlo musí být zdrojem energie pro spermiie, musí mít dobrou pufrovací schopnost (Rasul et al., 2000), musí obsahovat malé

množství elektrolytu, musí zajistit požadovaný osmotický tlak, stálou hodnotu pH a nesmí být pro spermie toxické (Beran et al., 2014). Mnoho studií se zabývalo nahrazením pufru za chemické látky jako například Matharoo et Singh (1980), Chinnaiya et Ganguli (1980), kteří využívali ředidla na bázi citrátu, Tris a kyseliny citrónové.

Mezi základní stavební kameny ředidla v současné době patří Bi-destilovaná voda sloužící jako nosič ostatních komponent, kryoprotektiva, pufrů, cukry, antibiotika, aminokyseliny a mastné kyseliny (Beran et al., 2014).

Kryoprotektiva chrání buňky před roztrháním ledovými krystaly, které vznikají během procesu mrazení, taktéž chrání buňky před chladovým šokem a zvyšují jejich odolnost (Ball et Peters, 2004). Jedná se o látky penetrující do spermie skrz cytoplazmatickou membránu, působící intracelulárně i extracelulárně. Tyto látky však také mohou mít toxický vliv na spermie a to destabilizací membrán a denurací proteinů a enzymů (Swain et Smith, 2010). Zvyšují tekutost membrán pomocí uspořádání membránových lipidů a bílkovin, které se projevuje větší dehydratací při nižších teplotách a sníženou formací ledu uvnitř buněk (Holt, 2000). Druhou skupinou jsou nepenetrující látky, které působí pouze extracelulárně. Jde zejména o bílkoviny, aminokyseliny a cukry, které se chovají jako osmoprotektanty a které mohou mírnit poškození způsobená penetrujícími kryoprotektanty (Swain et Smith, 2010). Nicméně oba typy kryoprotektantů vyvolávají změny objemu, který může poškodit buňky (Loomis et Graham, 2008). Mezi nejpoužívanější penetrující kryoprotektanty při konzervaci spermií býků patří zejména glycerol a vaječný žloutek (Ball et Peters, 2004).

Po dlouhou dobu se využíval glycerol jako efektivní kryoprotektant pro konzervaci spermií (Polge et al., 1949), avšak měl za následek relativně nízkou přežitelnost spermií po rozmrazení (Mocé et al., 2010). Glycerol chrání spermie před mechanickým poškozením během mrazení (De Leeuw et al., 1993) a snižuje bod mrznutí intracelulární a extracelulární tekutiny na hodnoty pod bodem mrazu vody a omezuje tak vliv nízké teploty na koncentraci roztoků a rozdíly osmotických tlaků (Amann et Pickett, 1987). Více specifické je fyziologické působení glycerolu na spermie během procesu mrazení, zastává funkci při výměně intracelulární tekutiny nezbytné pro udržení buněčného objemu společně s ionty a makromolekulami, bod mrznutí vody a z toho vyplývající pokles koncentrace elektrolytů ve volné frakci, tudíž se objevuje méně ledových krystalů za každé teploty (Medeiros et al., 2002). Optimální koncentrace glycerolu je ovlivněna ostatními komponenty ředidla (Woelders et al., 1997). Ve vysokých koncentracích může způsobovat vážná osmotická poškození, protože překonává membrány spermií mnohem pomaleji, než jiné kryoprotektanty (Guthrie, 2002).

Vaječný žloutek zlepšuje funkce spermií a udržuje jejich oplozovací schopnost (Barak et al., 1992). Vaječný žloutek je společný komponent ředidel ejakulátů u mnoha druhů hospodářských zvířat. Aktivními frakcemi vaječného žloutku, které poskytují spermiím ochranu při chlazení a mrazení jsou fosfolipidy a LDL (low-density lipoprotein), které se během chlazení spermií dostávají do jejich membrán (Medeiros, 2002). Obecně se má za to, že LDL, který je součástí vaječného žloutku je z velké části zodpovědný za ochranu spermií v průběhu mrazení (Pace et Graham, 1974), chrání proti chladovému šoku (Moussa et al., 2002). Předpokládá se, že LDL působí na spermatickou membránu její stabilizací. Druhá hypotéza tvrdí, že fosfolipidy obsažené v LDL chrání povrch spermie ochranným filmem anebo nahrazují spermatickou membránu fosfolipidy, které jsou ztraceny nebo poškozeny během kryokonzervace (Graham et Foote, 1987). A třetí způsob předpokládané ochrany je, že LDL zachytává škodlivé proteiny přítomné v semenné plazmě, tedy zlepšuje schopnost mrazení spermií (Bergeron et Manjunath, 2006). Přesný způsob ochrany spermií a vliv na jejich motilitu pomocí LDL je zatím nejasný (Amirat et al. 2004; Bathgate et al., 2006). Literatura uvádí, že pro kryokonzervaci býčího ejakulátu se doporučuje koncentrace vaječného žloutku 20% (Sansone et al., 2000), ve větších koncentracích se potom stává pro spermie toxickým (Shannon, 1972). Cílem studie, kterou publikovali Amirat et al. (2004), bylo zhodnotit vliv LDL na konzervaci býčího spermatu. Aktivita spermií, konzervovaná v LDL, byla srovnávána s ejakulátem konzervovaným v Optidylu[®], komerčně vyráběném ředidle. Aktivita spermií po rozmrazení byla dvakrát vyšší u LDL než v Optidylu[®]: 54,4 % oproti 30,2%. Muino et al. (2007) zjišťovali vhodnost použití dvou bezžloutkových komerčních ředidel (AndroMed[®] a Biociphos-Plus[®]) ve srovnání se žloutkovým ředidlem (Biladyl[®]). Dále byl sledován vliv ředidla, býka, opakování a interakce mezi nimi na životaschopnost spermií a neporušenost akrozómu. Semeno ředěné Biladylem[®] vykazovalo lepší přežitelnost spermií (47,9%) než semeno mrazené AndroMedem[®] (38,5%) nebo Biociphosem-Plus[®] (34,9 %). Singh et al. (1999) dokázal, že koncentrace vaječného žloutku v ředidle 10% je lepší pro spermie v procesu mrazení. V poslední době bylo testováno ředidlo z vaječného žloutku, ovšem osvědčilo se toto ředidlo s přídavkem 6% LDL (Low Density Lipoprotein) s 20 mmol glutaminu (Bencharif et al., 2012). Podle Moussa et al. (2002) se jako optimální koncentrace jeví 8% přídavek LDL do ředidla. Další možné ředění je 4, 5, 6, 7 a 10% LDL (Moussa et al., 2002). Přídavek LDL do ředidla má větší vliv na kvalitu spermií po rozmrazení, na jejich oplozovací schopnost a motilitu ve srovnání s komerčně používanými ředidly na bázi vaječného žloutku jako například Optidyl[®] (Amirat et al., 2004), či Triladyl[®] (Amirat et al., 2005). Obecně ředidla obsahující LDL, který je extrahovaný

z vaječného žloutku, mohou být využita jako ředidla s lepšími účinky na spermie během mrazení než ředidla komerčně využívaná (Moussa et al., 2002). Přídavek LDL může být také využit při mrazení sexovaných dávek (Vera-Munoz et al., 2009). Úspěch mrazení spermií také závisí na stupni ředění (Salomon et Maxwell, 2000) a v současné době mnoho studií zkoumá využívání změn a různých koncentrací kryoprotektantů (Mocé et al., 2010). Protože v současné době není známý přesný vliv LDL na spermie a ani není doporučena jeho jednoznačná koncentrace v ředidle, je vše předmětem budoucího zkoumání.

Mezi nepenetrující kryoprotektanty se řadí bovinní sérový albumin (BSA), trehalóza a sacharóza (De Leeuw et al., 1993). Vyznačují se nižší molekulární hmotností, hydrofilií a nulovou toxicitou. Pomáhají buňkám stabilizovat koncentraci vnitřních roztoků při osmotickém stresu (Cleland et al., 2004). Díky své neschopnosti překonat plazmatickou membránu vytvářejí osmotický tlak, který snižuje bod mrazu média a tím i tvorbu extracelulárního ledu, čímž poskytují buňkám ochranu (Aisen et al., 2002).

Přídavek cukru do ředidla se ukázal jako vhodný, protože cukr není schopný se rozptýlit přes plazmatickou membránu, proto například laktoza, sacharóza, rafinosa anebo dextransy přidávané do ředidel působí jako kryoprotektanty. V takovýchto sloučeninách vytváří cukr osmotický tlak, proto se zde intracelulární ledové krystaly vyskytují méně. Cukr také reaguje s fosfolipidy v plasmatické membráně, reorganizuje membránu a způsobuje, že jsou spermie schopné přežít během procesu kryokonzervace (Aisen et al., 2002).

K dispozici jsou různá bezžloutková ředidla neobsahující živočišné proteiny. Jsou to ředidla na bázi kombinace lecitinu a glycerolu. Ředidla jako například citrátové ředidlo, citrátové ředidlo s přídavkem cukru (laktoza, sacharóza, rafinosa). Dále jsou k dispozici mléčná ředidla v kombinaci s fruktozou nebo citrátem, ředidla na bázi laktozy, sacharózy, Tris (hydroxymethyl) aminomethanu a další (Salamon et Maxwell, 1995). Komerčně jsou vyráběná ředidla AndroMed[®] (Minitube, Tiefenbach, Německo), Bioxcell[®] a OptiXcell[®] (IMV technologies, L'Eigle, Francie). Jejich použitím se snižuje riziko přenosu patogenů a virů při udržení stejné oplozovací schopnosti spermií (Thun et al., 2002). Nehring et al. (2005) zjistili, že právě ředidla Bioxcell[®] a AndroMed[®] mohou být vhodnou náhradou za běžná média na bázi vaječného žloutku.

Druhou skupinou ředidel jsou ředidla na bázi vaječného žloutku, kde je ovšem nevýhodou použití živočišného produktu a nekonzistentní složení a granula ztěžující stanovení aktivity spermií (Akhter et al., 2010). V současné době se jedná o komerčně dostupná ředidla Trilady[®], Bilady[®] (Minitube, Tiefenbach, Německo), BullXcell[®] (IMV technologies, L'Eigle, Francie), BoviPRO[®] (Minitube of America). K dispozici jsou také

komerčně vyráběná ředidla s obsahem ionizovaného žloutku Steridyl® (Minitube, Tiefenbach, Německo) a Optidyl® (Biovet, Fleurance, Francie)

1.1.1 Chlazení, ekvilibrace

Ke změnám v motilitě spermií a jejich struktuře dochází v různých fázích chlazení, mrazení nebo rozmrazování (Ferero-Gonzalez et al., 2012). Chlazení je fáze adaptace spermií na zpomalení metabolismu (Watson, 2000). Metabolismus spermie se snižuje o polovinu s každým poklesem o 10°C, tudíž při zchlazení z 39°C na 4-5°C se metabolismus spermie sníží asi na 10% původní úrovně (Amann, 1989). Bylo zjištěno, že rychlé chlazení spermatu vyvolává extrémní zatížení buněk vedoucí k jejich smrti. Rychlé zchlazení redukuje rozklad fruktozy, obsah kyslíku a syntezu ATP, znamená to, že spermie ztrácí zásobení energií a následně i motilitu (Blackshaw et Salisbury, 1957). Námaha buněk při chlazení je přímo úměrná mrazicí křivce a teplotnímu gradientu. Tento proces se nazývá chladový šok a jeho účinky se liší v závislosti na druhu (Ferero-Gonzalez et al., 2012). Naředěný ejakulát je proto chlazen pomalu, aby se předešlo chladovému šoku.

Součástí technologického procesu výroby inseminačních dávek je způsob ekvilibrace. Ekvilibrace je brána jako celkový čas během kterého spermie zůstává v kontaktu s glycerolem před zmrazením. V tomto stádiu glycerol penetruje do spermatických buněk a nastavuje určitou bilanci mezi intracelulární a extracelulární koncentrací. Nemělo by být přehlíženo, že ekvilibrace spočívá v bilanci koncentrace glycerolu, ale také osmoticky aktivních komponent ředidel (Salomon et Maxwell, 2000).

Po naředění jsou dávky postupně zchlazovány z 34°C na 4°C, před vlastním zmrazením jsou uchovány 2 hodiny v teplotě 4°C (Moussa et al., 2002). Například Talevi et al. (1994) zjistil, že nejvhodnější doba ekvilibrace je 1 hodina. Dharni et al. (1996) zase shledal, že nejvhodnější je pomalé chlazení pejet z 30°C na 5°C za 2 hodiny anebo rychlé zchlazení na 10°C s následnou 2. hodinovou ekvilibrací. Ekvilibrace se jeví jako nezbytný proces pro úspěšné mrazení býčího spermatu, má vliv na jeho oplozovací schopnost a přežitelnost. Ekvilibrace se označuje jako celkový čas, po který spermie zůstává v kontaktu s kryoprotektantem před samotným mrazením (Salomon et Maxwell, 2000). Délka ekvilibrace je variabilní, trvá od 30 minut do 24 hodin před samotným mrazením (Dharni et al., 1992). Muiño et al. (2007) vyhodnotili jako optimální délku ekvilibrace několik hodin (4 – 18) při teplotě 5°C. Některé studie označují za nejvhodnější délku ekvilibrace 18 hodin nebo dokonce přes noc před samotným mrazením s cílem zvyšování kvality vyrobených ID. Naopak, z provozního hlediska, je snaha délku ekvilibrace zkrátit, či ji úplně eliminovat a tím urychlit

kryokonzervaci, aniž by byla ohrožena kvalita spermií po rozmrazení (Dhami a Sahni, 1992). Výsledky práce Arav et al. (2000) naznačují, že prodloužení doby ekvibrace zvyšuje oplozovací schopnost spermií. Dnes je málo známo o interakci ředidla ejakulátu s délkou ekvibrace spermatu býků. Například Leite et al. (2010) zaznamenali určité interakce mezi délkou ekvibrace a použitým ředidlem.

Současně je spolurozhodující také teplotní gradient chlazení, resp. následné mrazení inseminačních dávek. Maximalizace přežití buněk, které jsou podrobeny zmrazení a rozmrazení vyžaduje pečlivé kontroly procesu mrznutí (Arav et al., 2002). Doležalová et al. (2015) testovali různé délky ekvibrace (30, 120 a 240 minut) a různé mrazicí křivky na životaschopnost spermií po rozmrazení. Jako nejvhodnější vzhledem k motilitě po rozmrazení byla vyhodnocena délka ekvibrace 120 minut a více. Přesto dosud nejsou uvedené interakce dostatečně známé.

2.4.3 Mrazení

Kryokonzervace ovlivňuje buňky, které jsou zmrazeny. Když vnější voda zmrzne, výsledkem je čistá voda s obsahem nezmrazených vysoce koncentrovaných rozpuštěných látek. Buňky zůstávají v těchto nezmrazených částech, kde jsou vystaveny hyperosmotickým podmínkám způsobující ztrátu vody, která indikuje zmenšování buněk. Doba, po kterou jsou buňky chlazeny, určuje rozsah i délku trvání buněčné dehydratace a hypertonicity, které jsou buňky vystaveny. Pokud je chlazení příliš rychlé, intracelulární voda může zmrznout v podobě ledových krystalů dříve, než voda stihne opustit buňku a intracelulární led může buňku poškodit (Loomis et Graham, 2008). Když se spermie zmrazí při dostatečně nízkých teplotách, jejich metabolismus se v podstatě zastaví (Amann, 1989).

Je všeobecně známo, že proces kryokonzervace snižuje životaschopnost spermií o více než 50% (Watson, 1976). Nízká oplozovací schopnost po rozmrazení je dána poškozením, ke kterým došlo v průběhu mrazení (Saragusty et al., 2007). Značný význam kryokonzervace jako je chlazení nebo mrazení má kritická teplota -5°C až -50°C , která určuje, zda spermie zůstane v rovnováze s extracelulárním prostředím nebo se postupně prochladí a zvýší se možnost tvorby intracelulárních ledových krystalů (Kumar et al., 2003). Naproti tomu Rubei et al. (2004) jako kritickou shledal teplotu -6°C až -15°C . Změna teploty ve vzorku je závislá na biologickém materiálu, tepelné vodivosti a geometrickém tvaru nádoby (Diller, 1992). Polge et al. (1957) navrhl využití pomalého mrazení rychlostí 1 až $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ mezi 5 až -15°C , dále pak rychlost mrazení $4-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ mezi -15 až -79°C . Chen et al. (1993) zase doporučil

rychlost mrazení 15°C/min od 5 do -100°C a následné přeložení přímo do tekutého dusíku. Ferero-Gonzalez et al. (2012) shledali jako vhodné využití kontrolovaného systému chlazení.

Dříve používaná metoda konvenčního mrazení spočívala v mrazení inseminačních dávek nad parami tekutého dusíku po dobu 10 minut ve výšce 2 cm nad hladinou tekutého dusíku za působení teploty -80°C, rychlost mrazení byla -8°C/min, poté byly dávky umístěny přímo do tekutého dusíku (Reid et al., 2009). Nevýhodou tohoto způsobu mrazení byla nemožnost kontrolovat tvorbu ledových krystalů, které mohou roztrhat a zabít buňku (Saragusty et al., 2007). Lepší kvality zmrazeného ejakulátu je dosaženo při kontrolovatelném (programovatelném) procesu mrazení. Rozdílné stupně (fáze) mrazení podávají lepší výsledky životaschopnosti spermií po rozmrazení.

V současné době známe několik metod kryokonzervace gamet a to vitrifikaci, pomalé zmrazování a zmrazování závislé na teplotní křivce a další. Vitrifikace je proces, při kterém se kapalina přemění na pevnou látku bez tvorby ledových krystalů (Luyet et Hodapp, 1938). Touto metodou se mrazí embrya a oocyty. Přenos tepla v buňkách s většími objemy (více než 0,1 ml) je příliš pomalý pro použití metody vitrifikace z důvodu nebezpečí tvorby krystalů (Arav et al., 2002).

Ejakulát je možno mrazit, v dnešní době ve velké míře využívanou, konvenční metodou pomalého programovatelného mrazení, která zahrnuje postupné snížení teploty v komoře. Tato metoda je úspěšná v mrazení inseminačních dávek u mnoha druhů zvířat, je založena na řízení teplotního gradientu a přesné kontrole tvorby ledových krystalů. Dávky se rozloží horizontálně na hliníkový rám o velikosti například 10 x 10 cm a vkládají se do mrazicího boxu. Mrazicí box má různé rozměry a je 30 minut před mrazením ekvilibrován parami tekutého dusíku na požadovanou teplotu (Si et al., 2010). Rampa s dávkami by měla být 4 cm nad hladinou par tekutého dusíku (Bencharif et al., 2012), díky kterým je regulována teplota uvnitř boxu. Stradaoli et al. (2007) využíval ve své práci teplotní gradient v první fázi z 5°C na -5°C rychlostí 3°C/min, v další fázi z -5°C na -42°C rychlostí -40°C/min a z -42°C na -140°C rychlostí -10°C/min, poté jsou dávky přeloženy přímo do tekutého dusíku (-196°C). S programovatelným procesem mrazení je dosaženo lepší kvality zmrazeného ejakulátu než při mrazení konvenčním (Rasul, 2000). Metoda Multi Thermal Gradient (MTG) je systém mrazení založený na řízení postupu tuhnutí, který umožňuje přesnou kontrolu tvorby ledových krystalů během procesu mrazení. Vzorek je v podstatě vložen do vhodné nádoby, která je posouvána určitou rychlostí skrz předem určený teplotní gradient, který jde přes bod mrznutí do velmi nízkých teplot (CORE DYNAMICS, 2012). Po nařazení jsou dávky postupně zchlazovány a následně mrazeny v parách tekutého dusíku a prochází

teplotními stupni v několika fázích. Rozhodující je rozdíl teplot v mrazící komoře a jeho rozpětí se pohybuje od 10 - 60°C. Např. při výrobě sexovaných inseminačních dávek je v zahraničí používána metoda Harmony Freezing Method, která je vůči pohlavním buňkám šetrnější a u sexovaných spermií zajistí vyšší přežitelnost ve srovnání s konvenčním postupem mrazení. Tato metoda je založená na MTG, kdy rozpětí teplot v mrazící komoře je od 0 do -50°C a ve sběrači pejet poté teplota -40°C až -70°C, rychlost posouvání pejet je 0,5; 1,5 až 2,5 mm/s (Si et al., 2010). Poškození buněk je díky tomu minimalizováno (Arav et al., 2002). Metody řízeného postupu mrazení mají signifikantně lepší výsledky než metody konvenční (Saragusty et al., 2007).

Existují komerční doporučení pro technologie mrazení gamet jednotlivých druhů hospodářských zvířat. Nicméně lze předpokládat, že průběh mrazicí křivky různým způsobem významně ovlivní následnou motilitu spermií po rozmrazení inseminační dávky jednotlivých býků.

2.4.4 Rozmrazování

Následný proces rozmrazování je také důležitý pro přežitelnost spermií stejně jako proces mrazení. Rychlost rozmrazování inseminační dávky významně ovlivňuje přežitelnost spermií. Je ovlivněna řadou faktorů jako je typ ředidla, koncentrace glycerolu, způsob plnění pejet a rychlost zmrazování (Rodriguez et al., 1975). Spermie, které jsou uloženy v pejetách v tekutém dusíku (-196°C) a mají být rozmrazeny, musí projít dvěma kritickými teplotami z -50 do -5°C (Marshall, 1984). Rozmrazovací efekt záleží na tom, zda stupeň chlazení byl dostatečně vysoký na vyvolání intracelulárního mžrnutí nebo pomalý pro nedostatečnou dehydrataci buňky. Podle Mazur (1966) je pro optimální přežitelnost spermií nutno sladit rychlost zmrazování inseminačních dávek s rychlostí následného rozmrazování, avšak tuto teorii později zavrhl Watson (1976), který nenalezl žádný vztah mezi rychlostí mrazení a rozmrazování inseminačních dávek. Robbins et al. (1973) došli k závěru, že rychlé mrazení a následné rychlé rozmrazení významně neovlivní motilitu ani integritu membrán spermie. Naopak pomalé mrazení má za následek nízkou přežitelnost spermií nezávisle na rychlosti rozmrazování (Rodriguez et al., 1975). Nur et al. (2003) tvrdí, že rychlejší rozmrazování inseminačních dávek má za následek vyšší motilitu a akrozomální integritu spermií. V případě rychlého rozmrazení je potřeba předcházet rekrystalizaci intracelulárního ledu ve spermii, kdy opětovné nastolení rovnováhy mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím je rychlejší než u pomalého rozmrazování (Salomon et Maxwell, 2000). Vhodná teplota a doba

rozmrazování a následná manipulace záleží na použité technologii mrazení (Moussa et al., 2002).

Při rozmrazování jsou pejety vloženy do vodní lázně o teplotě 37°C po dobu 30 - 120 vteřin. Obecně používaná metoda rozmrazování inseminačních dávek je ve vodní lázni s teplotou 35°C po dobu 30 s (Marshall, 1984). Rao et al. (1986) testoval rozmrazování dávek ve dvou fázích (ve vodní lázni s teplotou 37°C po dobu 30 s a následně 75°C po 9 sekund), další jako například Dhami et al (1992, 1996), Takahashi et al. (2012) studovali různé teploty a stupně rozmrazování. Nejvhodnější se ale prozatím jeví teplota lázně 45 – 60°C po dobu 15 sekund (Medranol et al., 2002). Kvalita rozmrazeného ejakulátu je faktor, který také ovlivňuje zabřezávání (Saacke, 1984).

Aplikace optimální kombinace technologických postupů chlazení a zmrazování inseminačních dávek může vést ke zlepšení kvalitativních ukazatelů inseminačních dávek a jejich oplozovací schopnosti s následným praktickým uplatněním těchto inovovaných technologií v praxi.

3 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

- *hypotézy*

- ❖ Předpokládáme, že ředění čerstvého ejakulátu odlišnými typy ředidel, současně s přidavkem LDL, různým způsobem ovlivní odolnost spermií vůči chladovému šoku.
- ❖ Lze předpokládat, že odlišné délky ekvibrace a různé technologie mrazení inseminačních dávek býků ovlivní kvalitativní parametry inseminační dávky.

- *Cílem práce je vyhodnotit vliv:*

- ❖ ředění ejakulátu různými typy komerčních ředidel při konvenčním postupu i současném přidavku LDL do ředidel na kvalitativní ukazatele naředěného ejakulátu vystaveného chladovému šoku,
- ❖ prodloužení, respektive zkrácení délky ekvibrace, současně změnu času a teploty konvenční technologie mrazení na kvalitativní ukazatele inseminační dávky po rozmrazení.

4 MATERIÁL A METODIKA

V průběhu 2012 – 2016 byl opakovaně odebírán ejakulát od skupiny plemenných býků (n=27, býci holštýnského a českého strakatého plemene) na inseminační stanici býků Natural s.r.o. se sídlem v Hradištku pod Medníkem, s důrazem na stejný věk, systém ustájení, výživu a ošetřování, standardně využívané pro komerční účely. Býkům byla podávána stejná krmná dávka: seno (10 kg), sláma (5 kg), sójový šrot (0,5 kg), směs obilných šrotů: 1/3 ovesného, 1/3 pšeničného a 1/3 ječného šrotu, v celkové dávce 3 kg a směs minerálií Premin 22 Natural od firmy VVS Verměřovice s. r. o. Tento minerální doplněk obsahuje: 25% žitných otrub, 25 % KH_2PO_4 , 19% CaCO_3 , 13% NaCl , 9% MgO , 4% řepné melasy a ostatní minerály (obsah na 1 kilogram krmné směsi): Ca (11,4%), P (6%), Na (5%), Mg (5,2%), Vitamín A (1250000 i.u.), Vitamín D3 (250000 i.u.), Vitamín E (5000 mg), Vitamín B1 (61 mg), FeCO_3 (8200 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (600 mg), MnO (3000 mg), ZnO (5500 mg), $\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$ (45 mg), $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (45 mg), Na_2SeO_3 (36,5 mg), Niacin (825 mg), Beta karoten (800 mg).

Ejakulát byl standardně odebrán pomocí umělé vaginy a neprodleně předán k hodnocení do laboratoře inseminační stanice, kde byla vyškoleným personálem na základě platné metodiky vyhodnocena jeho vstupní kvalita. Byl hodnocen objem ejakulátu (g), koncentrace ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$) a motilita spermií (progresivní pohyb spermií vpřed za hlavičkou, %). K výrobě byl využit ejakulát s minimální koncentrací spermií $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ a progresivní motilitou minimálně 70 %.

Metodika pokusu byla rozdělena na dva okruhy, první se týkal vlivů přídavku frakce vaječného žloutku LDL cholesterolu do několika typů ředidel na následnou odolnost spermií vůči chladovému šoku. Druhý okruh se poté věnoval další fázi procesu výroby inseminačních dávek a to hledání nejvhodnější délky ekvilibrace naředěných dávek a následně mrazení dle rozdílných typů mrazicích křivek, které se lišily teplotou a rychlostí poklesu teploty v komoře mrazicího boxu a jejich vlivu na následnou životaschopnost spermií po rozmrazení.

4.1 METODICKÝ OKRUH I

Příprava ředidel

V práci byly testovány dvě varianty ředidel a to kontrolní bez přídavku LDL a pokusné obohacené o přídavek LDL o určité koncentraci. Hodnocena byla 3 v praxi běžně používaná komerčně vyráběná ředidla: AndroMed[®] na bázi sójového lecitinu (Minitübe, GmbH, Tiefenbach, Germany), bezžloutkové ředidlo Bioxcell[®] (IMV, L'Aigle, France) a ředidlo Triladyl[®] obsahující 20 % přídavek vaječného žloutku (Minitübe, GmbH, Tiefenbach, Germany). Pokusné varianty ředidel AndroMed[®] a Bioxcell[®] byly obohacené o přídavek LDL

o koncentraci 4 – 8 %, ředidlo Triladyl® obsahovalo koncentraci LDL 6 – 10 %. Vyšší koncentrace LDL v ředidle Triladyl® nahrazovala přidavek vaječného žloutku, který patří mezi základní komponenty tohoto ředidla. Ředidla byla připravena přesně podle návodu výrobce a před samotným použitím byla uchována v chladicím boxu o teplotě 5 – 10 °C.

Ředění a zpracování ejakulátu

Ejakulát splňující standardní vstupní podmínky byl rovnoměrně rozdělen pomocí sterilní pipety na 6 - 12 částí. Ejakulát byl po odběru uložen v chladicím boxu (4 °C) po dobu cca 1 hodiny, kdy byl převezen z inseminační stanice na ČZU. Ejakulát byl následně rozpipetován do předem vychlazených sterilních skleněných zkumavek (5 – 10 °C). Byly vytvořeny kontrolní varianty ředění ejakulátu ředidly AndroMed®, Bioxcell® a Triladyl® bez přídávku. Dále byly připraveny varianty ředění obohacené o přidavek LDL cholesterolu a to AndroMed® a Bioxcell® s 4 %, 6 % a 8% LDL, k ředidlu Triladyl® bylo pak přidáno 6 %, 8 % a 10 % LDL. Čerstvý ejakulát byl naředěn pomocí sterilní pipety na požadovanou výslednou koncentraci spermií $30 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$.

Hodnocení odolnosti spermií vůči chladovému šoku

Od každé varianty byly naplněny dvě skleněné kapiláry o objemu 0,1 ml o teplotě +4 ° a vloženy na 10 minut do chladicího boxu (No Ice, Bibby Scientific, Ltd., Staffordshire, UK) o teplotě 0 °C. Po uplynutí stanovené doby byl objem kapiláry na hodinovém sklíčku o teplotě 37 °C smícháván s 20 µl Eosinu po dobu 30 s a poté bylo přidáno 40 µl Nigrosinu. Z výsledného roztoku bylo odebráno 20 µl a přeneseno na předeřáté podložní sklíčko, následně byl proveden roztěr. Totožný vzorek byl z chladicího boxu přemístěn do vodní lázně o teplotě 37 °C, kde byl vzorek 2 hodiny inkubován, a následně byl opět proveden roztěr. Pomocí barvení Eosinem a Nigrosinem byl hodnocen vliv chladového šoku na přežitelnost spermií danou podílem živých spermií v ejakulátu na začátku a po ukončení tepelného testu přežitelnosti. Roztěry byly hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Eclipse, E200, Nikon®, Tokyo, Japan) při zvětšení 1000 x. Bylo napočítáno minimálně 100 spermií a byl zjišťován podíl živých spermií, které neměly zbarvenou hlavičku a podíl mrtvých spermií, které měly hlavičku obarvenou.

Metodický okruh I. je podrobněji definován detailními metodikami uvedenými v následujících publikacích (Kapitola č. 5):

- Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šimoník, O., **Doležalová, M.**, Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P. 2015. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Vet. Brno* 2015, 84: 125-131, doi: 10.2754/avb201584020125.
- Beran, J., Šimoník, O., Stádník, L., Rajmon, R., Ducháček, J., Krejčárková, A., **Doležalová, M.**, Šichtař, J. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* LXI (6), 1575-1581.
- Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Krejčárková, A., Ducháček, J., Šichtař, J. 2016. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(2): 395–399, <http://dx.doi.org/10.11118/actaun201664020395>.

4.2 METODICKÝ OKRUH II

Ředění a zpracování ejakulátu

Ejakulát, který splňoval vstupní podmínky byl naředěn standardně využívaným ředidlem AndroMed® na bázi sojového lecitinu (Minitübe, GmbH, Tiefenbach, Germany). Naředěný ejakulát byl po promísení naplněn do pejet (0,25 ml, IMV, L'Aigle, France), zchlazen a ekvilibrován v chladicím boxu (4 °C) po dobu 30, 120 a 240 minut. Ejakulát byl následně mrazen v programovatelném mrazicím boxu (Digit Cool, IMV, L'Aigle, France) dle 4 typů mrazicích křivek lišících se teplotou a rychlostí poklesu teplot v komoře. K mrazení byla využita standardně využívaná a výrobcem doporučená 3 – fázová mrazicí křivka, kde v první fázi teplota klesala z +4 °C na -10 °C rychlostí 5 °C/min, v další fázi teplota klesala na -100 °C rychlostí 35 °C/min a v závěrečné fázi klesala na -140 °C rychlostí 20 °C/min, dále 2 – fázová mrazicí křivka, kde v první fázi teplota klesala z +4 °C na -10 °C rychlostí 4 °C/min, ve druhé fázi pak klesala na -150 °C rychlostí 40 °C/min. Dále byla vybrána 3 – fázová mrazicí křivka s pomalejším poklesem teplot v komoře, v první fázi teplota klesala z +5 °C na -5 °C rychlostí 3 °C/min, v další fázi klesala na -42 °C rychlostí 40 °C/min a ve třetí fázi klesala na -140 °C rychlostí 10 °C/min a 3 – fázová mrazicí křivka s rychlejším poklesem teplot v komoře, kde teplota klesala v první fázi z +4 °C na -10 °C rychlostí 10 °C/min, v další fázi klesala na -100 °C rychlostí 20 °C/min a v poslední fázi teplota klesala na -140 °C

rychlostí 60 °C/min. Neprodleně po mrazení byly dávky přemístěny do kontejneru s tekutým dusíkem -196 °C.

Hodnocení spermií

Kvalita vyrobených dávek byla testována pomocí motility spermií zjištěné na základě CASA a podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti trvajícím po dobu 120 minut od rozmrazení dávky. V průběhu tepelného testu byly vzorky inkubovány ve výhřevném bloku o teplotě 37 °C. Pejety byly rozmrazovány ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 30 vteřin (Rubio-Guillén et al. 2007). Následně byl jejich obsah smíchán s vytemperovaným fyziologickým roztokem (500 µl; 37,5 °C) a byla zjišťována motilita spermií (%) pomocí CASA (SCA[®] Production v. 5.3., MICROPTIC, Spain) s mikroskopem s fázovým kontrastem (Eclipse E200, Nikon[®], Tokyo, Japan) při 200-300x zvětšení. Z každého vzorku bylo hodnoceno 5 zorných polí (Tuncer et al. 2011). Současně byl hodnocen podíl živých spermií, ihned po rozmrazení a po 120 minutách trvání tepelného testu přežitelnosti. Sterilní nahřátou pipetou bylo ze vzorku odebráno 20 µl a přeneseno na hodinové sklíčko o teplotě 37 °C. Následně byl vzorek mícháván s 20 µl Eosinu po dobu 30 s a poté bylo přidáno 40 µl Nigrosinu. Z výsledného roztoku bylo odebráno 20 µl a přeneseno na předehřáté podložní sklíčko, následně byl proveden roztěr. Roztěry byly hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Eclipse, E200, Nikon[®], Tokyo, Japan) při zvětšení 1000 x. Bylo napočítáno minimálně 100 spermií a zjišťován podíl živých spermií, které neměly zabarvenou hlavičku a podíl mrtvých spermií, které měly hlavičku obarvenou.

Metodický okruh II. je podrobněji definován detailními metodikami uvedenými v následujících publikacích (Kapitola č. 5):

Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Stupka, R. 2016. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11): 00 -, doi:10.17221/23/2016-CJAS – accepted.

Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*, 84 (4): 383-391, doi: 10.2754/avb201584040383.

V rámci statistického hodnocení byl ve všech publikacích jako sekundární faktor hodnocen vliv individuality býka. Data byla hodnocena pomocí statistického softwaru SAS

(SAS/STAT[®], 2011) použitím procedury UNIVARIATE, CORR, MIXED a GLM. Podrobnější popis aplikovaných statistických modelů obsahují jednotlivé následující publikace.

5 PŘEHLED PUBLIKACÍ

5.1 Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance

Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šimoník, O., **Doležalová, M.**, Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P. 2015. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Vet. Brno* 2015, 84: 125-131, doi: 10.2754/avb201584020125.

5.2 Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock

Beran, J., Šimoník, O., Stádník, L., Rajmon, R., Ducháček, J., Krejčířková, A., **Doležalová, M.**, Šichtař, J. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* LXI (6), 1575-1581.

5.3 Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock

Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Krejčířková, A., Ducháček, J., Šichtař, J. 2016. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(2): 395–399, <http://dx.doi.org/10.11118/actaun201664020395>.

5.4 Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing

Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Stupka, R. 2016. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11): 00 -, doi:10.17221/23/2016-CJAS – accepted.

5.5 The effect of the freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing

Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*, 84 (4): 383-391, doi: 10.2754/avb201584040383.

Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistanceLuděk Stádník¹, Radko Rajmon², Jan Beran¹, Ondřej Šimoník², Martina Doležalová¹,
Jiří Šichtař², Roman Stupka¹, Petra Folková²¹Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Department of Animal Husbandry,
²Department of Veterinary Sciences, Prague, Czech Republic*Received October 22, 2014**Accepted February 25, 2015***Abstract**

The objectives of this study were to determine the effects of sire, extender, and addition of Low Density Lipoprotein (LDL) to extenders used on the percentage rate of spermatozoa survival after cold shock. Two groups of extenders were compared: without LDL addition (control variants) and LDL enriched (experimental variants). Three extenders were used: AndroMed[®], Bioxcell[®], and Triladyl[®]. Experimental variants included 4–8% LDL addition into the AndroMed[®] and Bioxcell[®] extenders, and 6–10% LDL addition into the Triladyl[®] extender. In total, 12 samples of fresh semen were collected from 4 bulls during a period of 8 weeks. Bovine spermatozoa cold shock resistance (1 ± 1 °C, 10 min) was evaluated by the percentage rate of live sperm using eosin-nigrosine staining immediately and after heat incubation (37 ± 1 °C, 120 min). The results showed the effect of sire as important and individual differences between selected sires in their sperm resistance against cold shock were confirmed. AndroMed[®] and Bioxcell[®] were found to be providing better protection of bull semen to cold shock compared to Triladyl[®] due to lower decline of live sperm proportion. Our results detected a positive effect of LDL addition on sperm resistance against cold shock, especially on lower decrease of live sperm percentage rate after 120 min of the heat test ($P < 0.05$). Further studies are needed to assess the optimal concentration of LDL in various kinds of extenders as well to state ideal time and temperature conditions for ensuring LDL reaction with sperm.

Reproduction, bull sperm, extender, LDL cholesterol, sperm survival, cold shock, eosin-nigrosine staining

Fertility of dairy cows has declined over the past five decades as milk production per cow has increased (Walsh et al. 2011). Cattle fertility has been intensively studied in recent years with regard to females (Hanuš et al. 2010; Beran et al. 2013a). However, cows' reproduction results are affected by the male component as well.

Sperm quality is influenced by many internal and external factors, e.g. breed, variation between individuals, age of sire (Thara and Nair 2007; Beran et al. 2012; Härtlová et al. 2013), environmental conditions (Balić et al. 2012), and frequency of collecting the ejaculate (Karoui et al. 2011). Collection of the ejaculate and its subsequent processing present further potential risk factors for declined sperm quality. The steps of producing insemination doses (diluting the sperm, filling the straws, cooling and freezing) have a significant effect on sperm motility after thawing (Siddique et al. 2006). Especially, the properties of extender used (Crespilho et al. 2012; Cao et al. 2013; Špaleková et al. 2014) and freezing methods are important (Watson 2000; Medeiros et al. 2002).

In general practice, different types of semen extenders are used. They can be divided according to the type of cryoprotective substance into skimmed-milk extenders, extenders based on plant phospholipids, and extenders containing egg yolk (Vishwanath and Shannon 2000). Pace and Graham (1974) found that the important component of egg yolk responsible for its cryoprotective properties is low density lipoprotein (LDL) and they concluded that LDL can protect bull sperm as efficiently as fresh egg yolk. Furthermore,

Address for correspondence:

Assoc. Prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Department of Animal Husbandry
Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources
Czech University of Life Sciences Prague
Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 - Suchbát, Czech Republic

Phone: +420 224 383 057
E-mail: stadnik@af.czu.cz
<http://actavet.vfu.cz/>

replacement of egg yolk only by its active LDL fraction can prevent microbial risks, as the results of the study Bousseau et al. (1998) showed that commercially produced egg yolk extenders could be bacterial contaminated. The mechanism of the LDL protective action has not yet been completely explained. However, the positive effects of LDL were reported by Bergeron and Manjunath (2006). They identified that the family of phospholipid-binding proteins (BSP proteins) present in seminal plasma are detrimental to sperm preservation since they interact with LDL. This interaction prevents lipid efflux from sperm and positively influences sperm storage in liquid or frozen states, but the optimal time and temperature conditions of the abovementioned interaction have not been sufficiently explored yet. It is assumed that extenders containing LDL, which is extracted from egg yolk, might have more positive effects on spermatozoa membranes during the freezing than commercially used diluters (Moussa et al. 2002).

Biological tests of the ejaculate have been developed to assess the resistance and fertilization ability of sperm using LDL addition into diluters, e.g. short-term heat test of sperm survival (Maurya and Tuli 2003) or hypo-osmotic swelling tests (Přinosilová et al. 2014). However, resistance of sperm against cold shock has not been evaluated as well in relation to the addition of LDL. Moreover, the results of a previous study (Beran et al. 2013b) have shown different results in relation to the concentration of LDL.

Thus, the aim of this study was to determine the effects of sire, extender, and addition of LDL to extenders used on the percentage rate of spermatozoa survival after cold shock.

Materials and Methods

LDL extraction

Low density lipoprotein (LDL) was prepared in accordance with the methodology of Moussa et al. (2002). Hen eggs were obtained from Biopharm Inc. (Pohoří - Chotouň, Czech Republic), and production of the LDL fraction was ensured by the company Hena Inc. (Prague, Czech Republic). Firstly, egg yolk had to be separated from albumen manually, by rolling on filter paper in order to remove the endosperm and chalaza. Then the vitellin membrane was cut with a scalpel, and egg yolks were collected in a tube kept refrigerated by ice at 4 °C. In this way egg yolk plasma obtained was diluted by 0.17 M NaCl solution and then stirred for 60 min. Afterwards, centrifugation at $10,000 \times g$ for 45 min at 10 °C was performed and after supernatant removal, the procedure was repeated. The main purpose of this centrifugation was to achieve the separation of egg yolk granules from plasma. The obtained egg yolk plasma was stored at 4 °C. Then, 20.5 g of ammonium sulphate was added to 100 ml of plasma for removal of livetines, and this was stirred for 1 h at pH 8.7 and temperature 4 °C. Precipitated livetines were subsequently separated by centrifugation at $10,000 \times g$ for 45 min. The supernatant was then dialyzed further 10 h for the purpose of ammonium sulphate elimination and selective coagulation of LDL. At the end of this dialysis the mixture was centrifuged at $10,000 \times g$ for 45 min, and the resulting sediment (pellets) represented LDL with a purity of 97%, which had to be stored at 4 °C.

Extender preparation

Two groups of extenders were compared in this experiment: without LDL addition (control variants) and LDL enriched (experimental variants). Three commercially available extenders were used: AndroMed® extender containing plant phospholipids (MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Germany), Bioxcell® non-egg yolk extender (IMV, L' Aigle, France), and Triladyl® containing 20% of egg yolk (MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Experimental variants included 4–8% LDL addition to the AndroMed® and Bioxcell® extenders, and 6–10% LDL addition into the Triladyl® extender. The higher proportion of LDL addition in Triladyl® replaced the egg yolk which is normally its essential component. All the extenders were prepared on the day of sampling from one batch number according to the instructions of the producers and stored in a cooling box (5–10 °C) before ejaculate dilution.

Semen collecting, dilution and processing

Semen was collected from 4 bulls of same age, breed and frequency of collecting, bred in one sire insemination center (Natural Ltd., Hradištko pod Medníkem, Czech Republic) approved for public use in a standard way. Because climatic conditions during the observation period were similar, we did not include the effect of climatic conditions in the statistical model.

In total of 12 sampling days, ejaculate samples were obtained using an artificial vagina. Volume of fresh semen (VOL), density of sperm (DEN), and percentage rate of progressive motile spermatozoa above head (ACT) were evaluated by only one trained technician of the sire insemination centre. The mean volume of collected semen was 9.78 g. The mean sperm density was $1.28 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$. Proportion of progressive motile spermatozoa above

head detected immediately after collection was 87.50%. The mean percentage rate of live sperm was 74.12% in the beginning and 54.37% after 120 min of heat incubation.

Samples of fresh semen were divided into 12 portions (1 control - Andromed[®], Bioxcell[®] as well as Triladyl[®]; 3 experimental variants per extender - Andromed[®] and Bioxcell[®] with 4%, 6%, and 8% LDL as well as Triladyl[®] with 6%, 8%, and 10% LDL), and pipetted using a sterile pipette to a sterile chilled (5–10 °C) tubes. Each portion was immediately diluted to a concentration of approximately 30×10^6 /ml. The required amount of extenders was applied using sterile pipettes directly to the tubes with samples.

Evaluation of resistance against cold shock

Tube contents were then divided into two portions. The first portion was used for cold shock test: three glass capillaries (0.1 ml) closed at one end with plasticine were successively filled from each tube with diluted sample of semen at $7 \pm 1^\circ\text{C}$, and subsequently stored in a cool bath (No Ice, Bibby Scientific, Ltd., Staffordshire, UK) for 10 min ($1 \pm 1^\circ\text{C}$). After the end of cold incubation the content of capillaries was gently mixed on preheated hour glass ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) with 20 μl of eosin by circular motion for 30 s and then nigrosine was added at the amount of 40 μl . A volume of 20 μl of the resulting suspension was added onto a preheated glass slide and smear was done.

The second portion of diluted semen was stored in a water bath at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 120 min. After that time the cold shock test was repeated by the above mentioned methodology. A total of 576 smears were thus collected (12 collecting days, 4 bulls, 3 extenders used, and 4 samples per extender).

Dried smears were examined under a phase contrast microscope (Eclipse E200, Nikon[®], Tokyo, Japan) at $\times 1\,000$ magnification and with oil immersion by only one evaluator. A minimum of 100 spermatozoa were classified as either dead (with red heads) or live (with white heads) and expressed as the percentage rate of live sperm at the beginning of the test (LS0) and after 120 min of heat incubation (LS120).

Statistical analysis

The data were evaluated with the statistical software SAS[®] (Version 9.3; SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA) using MIXED procedure. The following equation was used:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{SIRE}_i + \text{EXT}_j + \text{LDL}_k + b_1^*(\text{VOL}) + b_2^*(\text{DEN}) + b_3^*(\text{ACT}) + e_{ijkl}$$

where:

Y_{ijkl} = observed value of the dependent variable (percentage rate of live sperm at the beginning of the test and after 120 min heat incubation, difference between these two measurements),

SIRE_i = fixed effect of the i^{th} sire ($i = 1, n = 144; 2, n = 144; 3, n = 144; 4, n = 144$);

EXT_j = fixed effect of the j^{th} extender ($j = 1 - \text{AndroMed}^{\text{®}}, n = 192; 2 - \text{Bioxcell}^{\text{®}}, n = 192; 3 - \text{Triladyl}^{\text{®}}, n = 192$);

LDL_k = fixed effect of the k^{th} presence of LDL ($k = \text{NO}, n = 144; \text{YES}, n = 432$);

$b_1^*(\text{VOL})$ = regression on initial volume of fresh ejaculate;

$b_2^*(\text{DEN})$ = regression on initial density of sperm in fresh ejaculate;

$b_3^*(\text{ACT})$ = regression on initial activity of sperm in fresh ejaculate;

e_{ijkl} = residual effects.

The differences between the variables estimated were tested at the levels of significance $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$.

Results

Model repeatability ranged from $r^2 = 0.406$ to $r^2 = 0.852$ during the evaluation of observed traits when the significance of the whole model was $P < 0.001$ in all evaluations as well as the effect of volume, density and activity regression. The effect of sire was significant ($P < 0.01$) in relation to all the evaluated traits. The effect of extender was significant ($P < 0.001$) in relation to the percentage rate of live sperm after 120 min of heat incubation and difference between the percentage rate of live sperm at the beginning and 120 min of the test. The effect of LDL presence in the tested samples was significant ($P < 0.05$) to the percentage rate of live sperm at the beginning of the test and the difference between the percentage rate of live sperm at the beginning and after 120 min of the test.

The results from MIXED procedure for the fixed effect of sire are given in Table 1. Significant differences ($P < 0.05$) in sperm survivability after cold shock were detected between sires regardless of the extender used or presence of LDL. The highest percentage rate of live sperm at the beginning of the test (LS0) was achieved by sire no. 2 ($78.39 \pm 1.086\%$), while the highest survivability after 120 min of the test (LS120) was achieved by sire no. 1 ($64.19 \pm 1.799\%$), including the lowest difference between LS0 and LS120 ($11.01 \pm 1.742\%$). Significantly ($P < 0.01$) the lowest values of sperm survivability

Table 1. Effect of sire on sperm survivability after cold shock.

Sire	LS0	LS120	LS0 – LS120
1	74.96 ± 1.195 ^A	64.19 ± 1.799 ^A	11.01 ± 1.742 ^A
2	78.39 ± 1.086 ^A	56.13 ± 1.619 ^B	22.32 ± 1.568 ^{a,B}
3	75.27 ± 1.624 ^A	61.99 ± 2.407 ^{A,B}	13.05 ± 2.331 ^{b,A,B}
4	54.23 ± 3.437 ^B	14.76 ± 5.149 ^C	38.86 ± 4.986 ^{b,B,C}

LS0 = percentage of live sperm at the beginning of the test; LS120 = percentage of live sperm after 120 min of the test; LS0 – LS120 = difference between percentage of live sperm at time 0 and 120 min of the test; different superscripts mean a significant difference within a column – a, b = $P < 0.05$; A, B, C = $P < 0.01$

Table 2. Effect of extender on sperm survivability after cold shock.

Extender	LS0	LS120	LS0 – LS120
AndroMed [®]	71.22 ± 1.027	54.44 ± 1.515 ^A	16.78 ± 1.468 ^A
Bioxcell [®]	71.46 ± 1.027	50.17 ± 1.516 ^B	21.07 ± 1.469 ^B
Trilady [®]	69.46 ± 1.027	43.19 ± 1.529 ^C	26.09 ± 1.481 ^C

LS0 = percentage of live sperm at the beginning of the test; LS120 = percentage of live sperm after 120 min of the test; LS0 – LS120 = difference between percentage of live sperm at time 0 and 120 min of the test; different superscripts mean a significant difference within a column – A, B, C = $P < 0.01$

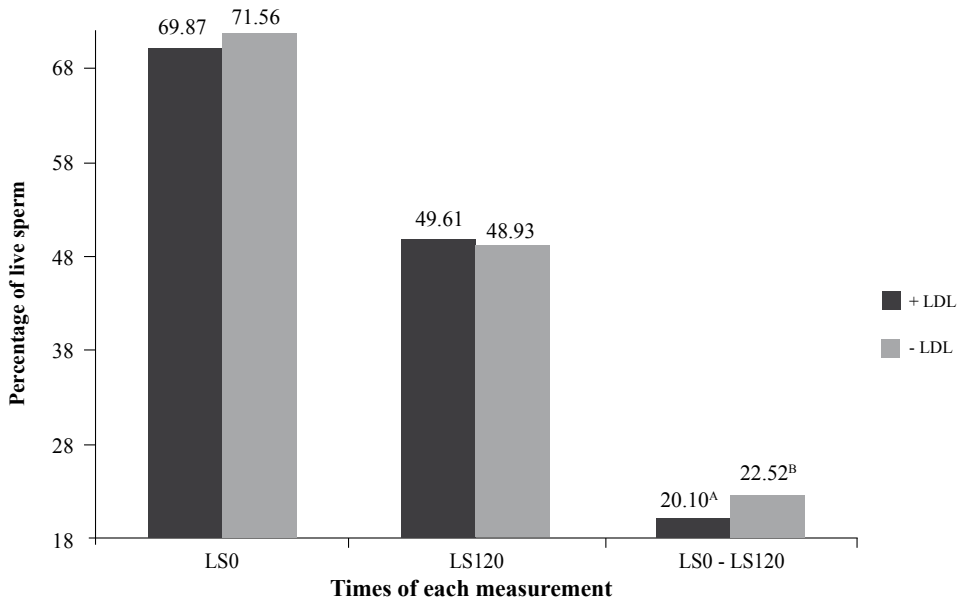


Fig. 1. Effect of LDL addition on sperm survivability after cold shock

LS0 = percentage of live sperm at the beginning of the test; LS120 = percentage of live sperm after 120 min of the test; LS0 – LS120 = difference between percentage of live sperm at time 0 and 120 min of the test; different superscripts mean a significant difference between columns – A, B = $P < 0.05$

during whole test was achieved by sire no. 4 ($L0 = 54.23 \pm 3.437$, respectively $LS120 = 14.76 \pm 5.149\%$). This sire had also significantly ($P < 0.05-0.01$) the highest sperm survivability decline during the test ($38.86 \pm 4.986\%$).

Focusing on the influence of the extender used regardless of the presence of LDL and sire effect (Table 2), we can assume that AndroMed® and Bioxcell® showed non-significantly ($P > 0.05$) the highest percentage rate of live sperm at the beginning of the test ($LS0 = 71.22 \pm 1.027\%$, resp. $71.46 \pm 1.027\%$). On the other hand, significantly the lowest percentage rates of live sperm were found in Triladyl® at the beginning ($LS0 = 69.46 \pm 1.027\%$; $P > 0.05$) and after 120 min of the test compared to Bioxcell® (-6.98% ; $P < 0.01$) and AndroMed® (-11.25% ; $P < 0.01$). Triladyl® also achieved significantly ($P < 0.01$) the highest decline of the percentage rate of live sperm during the entire test ($26.09 \pm 1.481\%$) differing by 5–16% from the other diluents.

Results of LDL addition influence on sperm survivability without specification of the extender type are also presented in Fig. 1. Significantly ($P < 0.05$) higher percentage rate of live sperm at the beginning of the test had samples without LDL ($LS0 = +1.69\%$) compared to samples containing LDL. On the other hand, opposite results were detected after 120 min of the test, when higher percentage rate of live sperm ($LS120 = +0.68\%$; $P > 0.05$) was achieved by the samples containing LDL. These samples also had significantly ($P < 0.05$) lower difference between time 0 and 120 min of the test (20.10%). These findings indicate that a protective effect of LDL occurred after 120 min incubation in water bath (37 ± 1 °C) only.

Discussion

Our results presented in Table 1 confirmed sires' individuality as an important effect; many significant individual differences were detected between sires. Our findings are in accordance with Thara and Nair (2007), who found that semen from different sires had different fertilization ability *in vitro*.

Cold shock test belongs to the main evaluation methods of sperm quality (Benson et al. 1967). We focused on evaluation of ejaculate viability and fertility using this test as well. Our results showed that better results of the cold shock test were achieved using AndroMed® and Bioxcell®. This is in accordance with Stradaoli et al. (2007) who state AndroMed® and Bioxcell® as the most suitable extenders for cryopreservation of bull semen. However, the general course of reproduction results in cows points out the necessity of continuous improving of extenders. For this reason, the addition of selected cryoprotectant was evaluated and tested.

The positive effect of LDL found in our study has been shown also in several other studies, e.g. by Hu et al. (2010), and Vera-Munoz et al. (2011). The authors concluded that LDL binds to the cell membrane protecting it from a 'cold shock'. This reaction requires time, and therefore the protective effect of LDL was shown after 120 min, and not immediately after dilution. This finding brings the need to test this reaction in shorter intervals or, on the other hand, during a longer equilibration time, however, under lower temperature. Another advantage of the LDL extender compared to standard egg yolk extender lies in clearly defined and stable chemical composition (Amirat et al. 2004). Manjunath et al. (2002) and Bergeron et al. (2004) stated that LDL has the ability to form very stable complexes with major BSP proteins. This interaction increases the sperm robustness against cold shock. Our results confirmed the mentioned statement.

Based on our monitoring we can assume that the effect of sire is important and individual differences between selected sires in their sperm resistance against cold shock were confirmed. AndroMed® and Bioxcell® have been found to be more suitable extenders for cryopreservation of bull semen compared to Triladyl® due to the lower decline of live

sperm proportion during the cold shock test. Our results found a positive effect of LDL addition on sperm resistance against cold shock, especially a lower decline of the live sperm percentage rate during 120 min of the test ($P < 0.05$). Further studies evaluating the LDL effect during and/or after equilibration period are needed. More research is also needed to assess the optimal concentration of LDL in various kinds of extenders and to determine the ideal time and temperature conditions for ensuring LDL reaction with sperm.

Acknowledgments

The work was funded by “S” grant of MŠMT ČR and project NAZV QJ1210109. We thank the company Natural Ltd. for cooperation on this work and Mrs. Lois Russell for her editorial help with this manuscript.

References

- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M 2004: Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl (R), a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* **61**: 895-907
- Balić IM, Milinković-Tur S, Samardžija M, Vince S 2012: Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology* **78**: 423-431
- Benson RW, Pickett BW, Komarek RJ, Lucas JJ 1967: Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *J Anim Sci* **26**: 1078-1081
- Beran J, Stádník L, Bezdiček J, Louda F, Čitek J, Ducháček J 2012: Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Arch Tierz-Arch Anim Breed* **55**: 207-218
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Okrouhlá M, Doležalová M, Kadlecová V, Ptáček M 2013a: Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* **142**: 28-34
- Beran J, Šimoník O, Stádník L, Rajmon R, Ducháček J, Krejčířková A, Doležalová M, Šichtař J 2013b: Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Univ Agric Silvic Mendel Brun* **61**: 1575-1581
- Bergeron A, Crete MH, 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. *Biol Reprod* **70**: 708-717
- Bergeron A, Manjunath P 2006: New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* **73**: 1338-1344
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M 1998: Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* **50**: 699-706
- Cao HL, Sun XZ, Li QW, Zhou SX, Nan XB, Hu JH, Wang LQ, He YM 2013: Testing *Rhodiola sachalinensis* saccharide as cryoprotectant for bovine spermatozoa. *J Dairy Sci* **96**: 6965-6972
- Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'Aqua JA Jr, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, Martins A, Papa FO 2012: Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* **149**: 1-6
- Hanuš O, Frelích J, Tomáška M, Vyletěllová M, Genčurová V, Kučera J, Trínáctý J 2010: The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech J Anim Sci* **55**: 11-29
- Härtlová H, Rajmon R, Krontorádová I, Mamica J, Zita L, Klabanová P, Černocký A 2013: Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise. *Acta Vet Brno* **82**: 31-35
- Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH 2010: The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci* **117**: 11-17
- Karoui S, Diaz C, Serrano M, Cue R, Celorrio I, Carabaño MJ 2011: Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Anim Reprod Sci* **124**: 28-38
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M 2002: Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* **67**: 1250-1258
- Maurya VP, Tuli RK 2003: Post-thaw thermal resistance test on motility and acrosomal integrity of filtered and non-filtered frozen semen of Murrah buffalo bulls. *Asian Aust J Anim Sci* **16**: 1424-1428
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL 2002: Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* **57**: 327-344
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M 2002: Low density lipoproteins extracted from

- hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* **57**: 1695-1706
- Pace MM, Graham EF 1974: Components in egg-yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* **39**: 1144-1149
- Přinosilová P, Kopecká V, Hlavicová J, Kunetková M 2014: Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Vet Brno* **83**: 313-319
- Siddique M, Ali R, Raza A 2006: Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *J Agri Soc Sci* **2**: 117-119
- Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M 2007: Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* **67**: 1249-1255
- Špaleková E, Makarevich AV, Kubovičová E, Ostró A, Chrenek P 2014: Effect of caffeine on functions of cooling-stored ram sperm *in vitro*. *Acta Vet Brno* **83**: 19-25
- Thara KM, Nair SP 2007: Sire effect on *in vitro* fertilizability of matured cattle oocytes. *Indian J Biotechnol* **6**: 421-422
- Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Bencharif D, Anton M, Desherces S, Shmitt E, Thorin C, Tainturier D 2011: Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 degrees C. *Asian J Androl* **13**: 281-286
- Vishwanath R, Shannon P 2000: Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* **62**: 23-53
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO 2011: A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* **123**: 127-138
- Watson PF 2000: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **60**: 481-492

EFFECT OF BULL, DILUTER AND LDL-CHOLESTEROL CONCENTRATION ON SPERMATOOZOA RESISTANCE AGAINST COLD SHOCK

Jan Beran, Ondřej Šimoník, Luděk Stádník, Radko Rajmon,
Jaromír Ducháček, Adéla Krejčířková, Martina Doležalová, Jiří Šichtař

Received: August 30, 2013

Abstract

BERAN JAN, ŠIMONÍK ONDŘEJ, STÁDNÍK LUDĚK, RAJMON RADKO, DUCHÁČEK JAROMÍR, KREJČÁRKOVÁ ADÉLA, DOLEŽALOVÁ MARTINA, ŠICHTAŘ JIŘÍ: *Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock*. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 2013, LXI, No. 6, pp. 1575–1581

The objectives of this study were to determine and evaluate the effect of bull, diluter and addition of LDL in different concentration on the percentage rate of spermatozoa survival after cold shock. In total, four bulls were collected during a period of eight weeks. A total of 8 samples of fresh semen with required quality were processed. Three extenders were used for dilution of each sample; AndroMed[®], Bioxcell[®] and Triladyl[®], each in standard and LDL enriched variants. In the case of AndroMed[®] and Bioxcell[®], 4, 6 and 8% of LDL were simply added. In Triladyl[®], 6, 8 and 10% of LDL replaced the standard egg yolk component. Resistance of spermatozoa against cold shock (0 °C, 10 minutes) was evaluated by the percentage rate of live sperm using Eosin-Nigrosine staining immediately and 2 hours after heat incubation (37 °C). The results showed the influence of bull individuality as an important factor. Among diluters used it is possible to recommend AndroMed[®] and Bioxcell[®] due to significantly ($P < 0.01$) lower decline of live sperm proportion during the cold shock test than Triladyl[®] (-9.19, respectively -4.95%). The optimal LDL concentration increasing resistance of spermatozoa against cold shock was not determined, therefore subsequent research is necessary.

bull semen, sperm survival, cold shock, extender, LDL cholesterol

Fertility of dairy cows has declined over the past five decades as milk production per cow has increased (Zink *et al.*, 2012; Walsh *et al.*, 2011). The issue of cattle fertility was intensively studied in recent years from cow point of view and effects on their reproductive performance (Doležalová *et al.*, 2013; Roche *et al.*, 2011; Hanuš *et al.*, 2010; LeBlanc *et al.*, 2010). However, cow's reproduction results are also affected by male component which is represented by the fertilization ability of bull ejaculate.

Sperm quality is influenced by many factors, e.g. by such internal factors as breed, variation between individuals, and age of sire (Beran *et al.*, 2011; Štolc *et al.*, 2009), and by such external

factors as environmental conditions (Balic *et al.*, 2012), composition of the diet (Horký *et al.*, 2012) and frequency of collecting ejaculate (Kaya *et al.*, 2002). Collection of ejaculate and its subsequent processing present further potential risk factors for declined sperm quality. Phases of producing insemination doses (diluting of sperm, filling of straws, cooling and freezing) have a significant effect on sperm motility after thawing (Siddique *et al.*, 2006), and the properties of extender used are especially important (Beran *et al.*, 2012; Hegedušová *et al.*, 2012), as well as method of thawing (Filipčík and Hanuláková, 2011).

Low Density Lipoprotein (LDL cholesterol – LDL) – a component of egg yolk – is believed to

be largely responsible for the egg yolk protective effects on spermatozoa during the freezing process (Pace and Graham, 1974) increasing their resistance against cold shock (Moussa *et al.*, 2002). There is an assumption that extenders containing LDL, which is extracted from egg yolk, can have better effects on spermatozoa membranes during the freezing than diluters commercially exploited (Moussa *et al.*, 2002).

Biological tests of ejaculate have been developed to assess the resistance and the fertilization ability of sperm using LDL addition into diluters, e.g. short-term heat test of sperm survival (Maurya and Tuli, 2003), hypo-osmotic swelling tests (Padrik *et al.*, 2012), however resistance of sperm against cold shock has not been evaluated as well in relation to addition of LDL.

Thus, the aim of this paper was to determine the effect of bull, diluter and addition of LDL in different concentration on the percentage rate of spermatozoa survival after cold shock.

MATERIAL AND METHODS

Semen collecting, dilution and processing

Ejaculate of four bulls (No. 1, 2, 3, and 4) belonging to one artificial insemination (AI) centre approved for public use, were sampled and evaluated. Samples of ejaculate were obtained using an artificial vagina during the period of eight weeks and tested immediately after collection. Volume of semen (VOL), density of sperm (DEN, and percentage of progressive motile spermatozoa above head (ACT) were evaluated by only one trained technician of AI centre. A total of 8 samples of fresh semen with required quality (minimum progressive motility 70% and sperm concentration $0.7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$) were then transferred at 4 °C to the university laboratory within one hour for next processing.

Three extenders were used for dilution of each sample; AndroMed[®], Triladyl[®] (both from MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and Bioxcell[®] (IMV, L' Aigle, France). Control variants of diluters (0% LDL addition) were prepared according to the manufacturer's instructions. Experimental variants included 4, 6 and 8% LDL addition into the AndroMed[®] and Bioxcell[®] diluters, and 6, 8 and 10% LDL addition into the Triladyl[®] diluter prepared without using egg yolk, which is normally its essential component. Higher concentrations of LDL in Triladyl[®] replaced cryoprotective properties of egg yolk. The extenders were prepared on the day of sampling and stored at the cooling box (4 °C) before ejaculate dilution.

Samples of semen were pipetted using a sterile pipette to a sterile chilled (4 °C) tubes. Each sample of semen was immediately diluted to 50 000 spermatozoa/ml. The required amount of diluters was applied using sterile syringes directly to the tubes with samples. Thereafter tubes were sealed with sterile stoppers, mixed gently and placed into the cooling box (4 °C).

Evaluation of resistance against cold shock

Three capillaries (0.1 ml) were successively filled from each sample at 4 °C, closed at one end with plasticine and stored at 0 °C into a cooled bath (No Ice, Bibby Scientific, Ltd., Staffordshire, UK) for ten minutes. After the end of cold incubation the capillaries content was gently mixed on preheated hour glass (37 °C) with 20 µl of Eosin by circular motion for 30 sec. and then Nigrosine was added at amount of 40 µl. A volume of 20 µl of the resulting suspension was added into a preheated glass slide and smear was done at the beginning of the test (time 0). This procedure was repeated after 2 hours heat incubation of extended semen samples in a water bath at 37 °C. After drying each smear (72 of each collecting day, 576 together) was examined under a phase contrast microscope (Eclipse E200, Nikon[®], Tokyo, Japan) at 1 000x magnification and with oil immersion by only one evaluator. Minimum of 100 spermatozoa was classified as either dead (with red heads) or live (with white heads) and expressed as a percentage rate of live sperm at the beginning of the test (L0) and after 2 hours of heat incubation (L2).

Statistical analysis

The data were evaluated with statistical software SAS 9.3. (SAS/STAT[®] 9.3, 2011) using UNIVARIATE, CORR, and MIXED procedures. The following equation was used:

$$Y_{ijkl} = \mu + BULL_i + DIL_j + LDLC_k + b_1*(VOL) + b_2*(DEN) + b_3*(ACT) + e_{ijkl}$$

where:

- Y_{ijkl}observed value of the dependent variable (percentage rate of live sperm at the beginning of the test and after 2 hours heat incubation, difference between these two measurements),
 $BULL_i$ fixed effect of the i^{th} bull ($i = 1, n = 216; 2, n = 216; 3, n = 72; 4, n = 72$);
 DIL_j fixed effect of the j^{th} diluter ($j = 1 - \text{AndroMed}^{\circledast}, n = 192; 2 - \text{Bioxcell}^{\circledast}, n = 192; 3 - \text{Triladyl}^{\circledast}, n = 192$);
 $LDLC_k$ fixed effect of the k^{th} concentration of LDL ($k = 0, n = 144; 4, n = 96; 6, n = 144; 8, n = 144; 10, n = 48$);
 $b_1*(VOL)$ regression on volume of ejaculate;
 $b_2*(DEN)$ regression on density of sperm;
 $b_3*(ACT)$ regression on activity of sperm;
 e_{ijkl} residual effects.

The differences between the variables estimated were tested at the levels of significance $P < 0.05$ and $P < 0.01$. Pearson correlation coefficients were also determined.

RESULTS AND DISCUSSION

The basic statistical characteristics of observed data are shown in Tab. I. The volume of ejaculate

I: Basic statistical characteristics of observed data

Variable	Unit	Min	Max	Mean	SD
VOL	[g]	6.2	11.8	9.78	1.663
DEN	[10 ⁶ . mm ⁻³]	0.9	1.8	1.28	0.269
ACT	[%]	80	90	87.5	3.542
L0	[%]	23.27	93.2	74.12	16.245
L2	[%]	5.98	89.25	54.37	16.667
L0 – L2	[%]	0.61	54.62	19.68	11.528

Key: VOL = volume of ejaculate; DEN = density of sperm; ACT = activity of sperm; L0 = percentage rate of live sperm at the beginning of the test; L2 = percentage rate of live sperm after 2 hours of the test duration; L0 – L2 = difference between percentage rate of live sperm at time 0 and 2 hours of the test

II: Pearson correlation coefficients *r* and related statistical significance *P* among evaluated traits

		DEN [10 ⁶ . mm ⁻³]	ACT [%]	L0 [%]	L2 [g]	L0 – L2 [%]
VOL [g]	r	0.5886	0.7563	0.8524	0.6006	0.3445
	P	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
DEN [10 ⁶ . mm ⁻³]	r		0.4616	0.5607	0.3876	0.2377
	P		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
ACT [%]	r			0.8063	0.6007	0.2914
	P			<.0001	<.0001	<.0001
L0 [g]	r				0.7565	0.3256
	P				<.0001	<.0001

Key: VOL = volume of ejaculate; DEN = density of sperm; ACT = activity of sperm; L0 = percentage rate of live sperm at the beginning of the test; L2 = percentage rate of live sperm after 2 hours of the test duration; L0 – L2 = difference between percentage rate of live sperm at time 0 and 2 hours of the test

ranged from 6.2 to 11.8g in selected bulls. The volumes of ejaculates correspond to the findings of other authors, e.g. Louda *et al.* (2007) reported the range 3–12g in sires kept in AI centre. Ball and Peters (2004) mentioned the closer range from 5 to 6g.

The sperm density ranged from 0.9 to 1.8 × 10⁶ mm⁻³. Our results again agreed with those of Louda *et al.* (2007), who reported standard sperm density of bulls' ejaculates from 0.8 to 2.0 × 10⁶ mm⁻³. Ball and Peters (2004) observed a range from 0 in azoospermic bulls to 3 000 × 10⁶ mm⁻³ in excellent sires, however especially mentioned substandard marginal bulls could not be used as widely applied sires.

The activity of sperm immediately after collection ranged from 80 to 90% due to determined threshold of 70% commonly used in Czech AI centers. These values correspond with those of Louda *et al.* (2007), who reported sperm activity 45–75% or more. Similarly, Ball and Peters (2004) reported that at least 60% of the spermatozoa should be shown straight progressive movement above head. This requirement was fulfilled within our observation.

Cold shock test belongs to the main evaluation method of sperm quality. We take a reflection about viability and fertility of ejaculate. The rate of live sperm ranged from 23.27 to 93.2% in the beginning and from 5.98 to 89.25% after 2 hours of the heat incubation.

Indicators mentioned above belong to the main characteristics of collected fresh semen (Hanuláková *et al.*, 2012) and determine the initial quality of ejaculate subsequently used for AI doses manufacturing (Vágenknechtová *et al.*, 2011). The last findings confirm that the initial quality of ejaculate determines final quality of AI dose (Beran *et al.*, 2012).

Tab. II contains Pearson correlation coefficients among the evaluated traits. Significant (*P* < 0.01) correlation coefficients (*r* = 0.2377 to 0.8524) were detected between all characteristics evaluated.

Further, the effects of bull, diluter and LDL addition have been evaluated in detail by the statistical model designed. Results of this evaluation are presented in Tab. III and IV. Coefficient of the whole model repeatability ranged from *r*² = 0.408 to *r*² = 0.852 during the evaluation of observed traits. Effect of bull was significant (*P* < 0.01) in relation to the whole evaluated traits. Effect of diluter was significant (*P* < 0.01) in relation to the percentage rate of live sperm after 2 hours of the heat incubation and difference between percentage rate of live sperm at the beginning and 2 hours of the heat incubation. Effect of LDL concentration in tested samples was insignificant to all evaluated traits (*P* > 0.05). The statistical model also included the effects of the initial quality parameters of ejaculate regression (volume, density and activity). Effect of volume of ejaculate was significant (*P* < 0.01) only in relation

III: Effects of individual factors in statistical model

TRAIT	MODEL		BULL		DIL		LDLC		VOL		DEN		ACT	
	r ²	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
L0	0.852	<0.001	34.03	<0.001	2.06	0.13	1.20	0.311	9.13	0.003	9.02	0.003	13.38	<0.001
L2	0.697	<0.001	62.70	<0.001	26.61	<0.001	0.13	0.969	1.20	0.274	9.44	0.002	3.11	0.08
L0 – L2	0.408	<0.001	25.31	<0.001	19.38	<0.001	1.23	0.298	0.68	0.410	27.8	<0.001	18.85	<0.001

Key: L0 = percentage rate of live sperm at the beginning of the test; L2 = percentage rate of live sperm after 2 hours of the test duration; L0 – L2 = difference between percentage rate of live sperm at time 0 and 2 hours of the test; BULL = effect of each bull; DIL = effect of each diluter; LDLC = effect of different concentration of LDL in tested sample; VOL = volume of ejaculate; DEN = density of sperm; ACT = activity of sperm

IV: Effect of bull, diluter and concentration of LDL on sperm survivability after cold shock

EFFECT	LEVEL	L0	L2	L0 – L2
		LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
BULL	1	75.40 ± 1.193 ^A	64.05 ± 1.807 ^A	11.56 ± 1.747 ^A
	2	78.82 ± 1.083 ^A	56.00 ± 1.624 ^B	22.86 ± 1.571 ^{a,B}
	3	75.70 ± 1.625 ^A	61.84 ± 2.408 ^{A,B}	13.67 ± 2.328 ^{b,A,B}
	4	54.66 ± 3.447 ^B	14.60 ± 5.167 ^C	39.54 ± 4.996 ^{b,B,C}
DIL	AndroMed [®]	71.65 ± 1.053	54.25 ± 1.556 ^A	17.43 ± 1.504 ^A
	Bioxcell [®]	71.88 ± 1.053	50.02 ± 1.554 ^B	21.67 ± 1.502 ^B
	Triladyl [®]	69.91 ± 1.032	43.10 ± 1.531 ^C	26.62 ± 1.481 ^C
LDLC	0	69.87 ± 1.075	49.61 ± 1.597	20.12 ± 1.545
	4	71.27 ± 1.238	49.46 ± 1.840	21.51 ± 1.779
	6	71.26 ± 1.075	48.58 ± 1.587	22.76 ± 1.535
	8	72.18 ± 1.075	48.84 ± 1.597	23.20 ± 1.545
	10	71.16 ± 1.632	49.14 ± 2.404	21.95 ± 2.325

Key: BULL = effect of each bull; DIL = effect of each diluter; LDLC = effect of different concentration of LDL in tested sample; L0 = percentage rate of live sperm at the beginning of the test; L2 = percentage rate of live sperm after 2 hours of the test duration; L0 – L2 = difference between percentage rate of live sperm at time 0 and 2 hours of the test. Different superscript letters mean a significant difference within a column – a, b = P < 0.05; A, B, C = P < 0.01

to the percentage rate of live sperm at the beginning of the test. This is in accordance with physiological basis, due to amount of sperm and their supply with important substances from seminal plasma. Effect of sperm density was significant (P < 0.01) in relation to the whole evaluated traits. This result has also biological background, because density of sperm in ejaculate defines the average conditions for the cells functioning. The effect of sperm activity was significant (P < 0.01) to the percentage rate of live sperm at the beginning and difference between percentage rate of live sperm at time 0 and after 2 hours of the heat incubation. This is also logical as sperm activity represents an indicator of initial quality – viability of spermatozoa.

Significant differences (P < 0.05 – 0.01) were detected between bulls regardless of the used diluter or LDL concentration. At the beginning of the test was the best bull No. 2 (78.82 ± 1.083%), while after 2 hours had the best survivability bull No. 1 (64.05 ± 1.807%), including the smallest difference between the first and second measurement (11.56 ± 1.747%). Significantly (P < 0.01) the lowest values of sperm survivability during whole test had bull number 4 (54.66 ± 3.447, respectively 14.60 ± 5.167%). This

bull also had significantly (P < 0.05–0.01) the highest sperm survivability decline between time 0 and 2 hours of the heat incubation (39.54 ± 4.996%). Our results confirmed that effect of bull is important, individual differences were found between them (Thara and Nair, 2007).

Focusing on the influence of diluter regardless of the concentration of LDL we can assume that AndroMed[®] (71.65 ± 1.053%) and Bioxcell[®] (71.88 ± 1.053%) had the best results at the beginning of the test and Triladyl[®] (69.91 ± 1.032%) reached the worst results. Triladyl[®] extender achieved significantly (P < 0.01) the worst results after 2 hours of the heat incubation (–6.92% less than Bioxcell[®] and –11.12% less than AndroMed[®]). This extender also had significantly (P < 0.01) the highest declined percentage rate of live sperm during the entire the test (26.62 ± 1.481%). Our results showed that better results of the cold shock test were achieved using the AndroMed[®] and Bioxcell[®]. This is in accordance with Jannet *et al.* (2005) or Stradaoli *et al.* (2007) who state that AndroMed[®], respectively Bioxcell[®] are the most suitable extenders for cryopreservation of bull semen.

In Tab. IV are also shown results of LDL concentration influence on sperm survivability without specification of extender type. Differences between each concentration of LDL cholesterol were statistically insignificant ($P > 0.05$). The lowest value of percentage rate of live sperm ($69.87 \pm 1.075\%$) at the beginning of the test had control samples (0% LDL cholesterol). While these samples had the best results at the end of the heat incubation ($49.61 \pm 1.597\%$). These samples also had the smallest difference between time 0 and 2 hours of the test. There is need to say that all differences of sperm survivability detected in relation to concentration of LDL were insignificant ($P > 0.05$). The values of percentage rate of live sperm after 2 hours of the heat incubation were almost the same in all LDL concentrations. From these results we cannot clearly determine the most suitable concentration of LDL

addition and subsequent research in this area is necessary.

CONCLUSION

Based on our monitoring we can assume that effect of bull is important and individual differences between selected sires in their sperm resistance against cold shock were detected. AndroMed® and Bioxcell® have been found as the more suitable extenders for cryopreservation of bull semen compared to Triladyl® due to lower decline of live sperm proportion during the cold shock test. Effect of LDL concentration added to extenders was insignificant ($P > 0.05$) and showed unclear results. We cannot recommend the optimal LDL concentration increasing resistance of spermatozoa against cold shock. Therefore, subsequent research of this topic is necessary.

SUMMARY

The aim of this study was to determine and evaluate the effect of bull, diluter and addition of LDL in different concentration on the percentage rate of spermatozoa survival after cold shock.

In total, four bulls were collected during a period of eight weeks. A total of 8 samples of fresh semen with required quality were processed. Three extenders were used for dilution of each sample: AndroMed®, Triladyl® (both from MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and Bioxcell® (IMV, L' Aigle, France). In the case of AndroMed® and Bioxcell®, 4, 6 and 8% of LDL were simply added. In Triladyl®, 6, 8 and 10% of LDL replaced the standard egg yolk component. Resistance of spermatozoa against cold shock (0 °C, 10 minutes) was evaluated by the percentage rate of live sperm using Eosin-Nigrosine staining in time 0 and 2 hours of heat incubation (37 °C) after exposure to cold. In total, 576 smears were evaluated. Statistical software SAS 9.3., procedures UNIVARIATE, CORR, and MIXED were used for analyzing the data.

Effect of bull was significant ($P < 0.01$) in relation to the whole evaluated traits. Effect of diluter was significant ($P < 0.01$) in relation to the percentage rate of live sperm after 2 hours of the heat incubation and difference between percentage rate of live sperm at the beginning and 2 hours of the heat incubation. We can recommend AndroMed® and Bioxcell® due to significantly ($P < 0.01$) lower decline of live sperm proportion during the cold shock test than Triladyl® (-9.19, respectively -4.95%). Effect of LDL concentration in tested samples was insignificant to all evaluated traits ($P > 0.05$). We cannot recommend the optimal LDL concentration increasing resistance of spermatozoa against cold shock and subsequent research is necessary.

Acknowledgment

The work was funded by „S” grant of MŠMT ČR and project NAZV QJ1210109. We thank the company Natural Ltd. for cooperation on this work.

REFERENCES

- BALIC, I. M., MILINKOVIC-TUR, S., SAMARDZIJA, M., VINCE, S., 2012: Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology*, 78, 2: 423–431. ISSN 0093-691X.
- BALL, P. J. H., PETERS, A. R., 2004: *Reproduction in cattle*. 3. vyd. Oxford: Blackwell Publishing, 242 s. ISBN 1-4051-1545-9.
- BERAN, J., STÁDNÍK, L., DUCHÁČEK, J., TOUŠOVÁ, R., LOUDA, F., 2011: Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 59, 6: 37–44. ISSN 1211-8516.
- BERAN, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J., LOUDA, F., ČÍTEK, J., DUCHÁČEK, J., 2012: Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archiv für Tierzucht – Archives Animal Breeding*, 55, 3: 207–218. ISSN 0003-9438.
- DOLEŽALOVÁ, M., STÁDNÍK, L., NEJDLOVÁ, M., NĚMEČKOVÁ, D., BERAN, J., DUCHÁČEK, J., 2013: The relationship between energy balance after calving and reproductive functions in

- Holstein dairy cows treated by the OVSYNCH system. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 61, 3: 601–610. ISSN 1211-8516.
- FILIPČÍK, R., HANULÁKOVÁ, Š., 2011: Vliv způsobu rozmrazení inseminační dávky skotu na aktivitu spermií, (The influence of the thawing method of a cattle insemination dose on sperm motility). *Výzkum v chovu skotu – Cattle Research*, 53, 3: 12–16. [in Czech]. ISSN 0139-7265.
- HANULÁKOVÁ, Š., MAMICA, O., MÁCHAL, L., KRIVÁNEK, I., FILIPČÍK, R., HOŠEK, M., CHLÁDEK, G., 2012: Physical properties of stallion semen in relation to some qualitative and quantitative characteristics. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 60, 6: 97–102. ISSN 1211-8516.
- HANUŠ, O., FRELICH, J., TOMÁŠKA, M., VYLETĚLOVÁ, M., GENČUROVÁ, V., KUČERA, J., TRINÁCTÝ, J., 2010: The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech Journal of Animal Science*, 55: 11–29. ISSN 1212-1819.
- HEGEDŮŠOVÁ, Z., ŠTOLC, L., LOUDA, F., ČUNÁT, L., VEJNAR, J., 2012: Effect of different extenders on ram sperm traits during storage. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 60, 6: 111–116. ISSN 1211-8516.
- HORKÝ, P., JANČÍKOVÁ, P., ZEMAN, L., 2012: The effect of a supplement of chromium (picolinate) on the level of blood glucose, insulin activity and changes in laboratory evaluation of the ejaculate of breeding boars. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 60, 1: 49–56. ISSN 1211-8516.
- JANETT, F., KEO, S., BOLLWEIN, H., HÄSSIG, M., THUN, R., 2005: Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Archiv Tierheilk.*, 147: 62–62. ISSN 0003-9438.
- KAYA, A., AKSOY, M., TEKELI, T., 2002: Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*, 44, 2: 153–158. ISSN 0921-4488.
- LEBLANC, S., 2010: Assessing the Association of the Level of Milk Production with Reproductive Performance in Dairy Cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 56: S1–S7. ISSN 0916-8818.
- LOUDA, F., BJELKA, M., JEŽKOVÁ, A., POZDÍŠEK, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J., 2007: *Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemennosti*, (Principles of breeding bulls use on natural breeding conditions). 1. vyd. Rapotín: Research Institute for Cattle Breeding, Ltd, Rapotín, Czech Republic, 56 s. ISBN 978-80-87144-01-5 [in Czech].
- MAURYA, V. P., TULI, R. K., 2003: Post-thaw thermal resistance test on motility and acrosomal integrity of filtered and non-filtered frozen semen of Murrah buffalo bulls. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16, 10: 1424–1428. ISSN 1011-2367.
- 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. ISSN 0093-691X.
- PACE, M. M., GRAHAM, E. F., 1974. Components in egg-yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, 39, 6: 1144–1149. ISSN 1212-1819.
- PADRIK, P., HALLAP, T., KAART, T., BULITKO, T., JAAKMA, U., 2012: Relationships between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. *Czech Journal of Animal Science*, 57, 10: 490–497. ISSN 1212-1819.
- ROCHE, J. R., BURKE, C. R., MEIER, S., WALKER, C. G., 2011: Nutrition x reproduction interaction in pasture-based systems: is nutrition a factor in reproductive failure? *Animal Production Science*, 51, 12: 1045–1066. ISSN 1836-0939.
- SAS, 2011: SAS – STAT® 9.3. User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 5121 s.
- SIDDIQUE, M., ALI, R., RAZA, A., 2006: Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 2: 117–119. ISSN 1813-2235.
- STRADAIOLI, G., NORO, T., SYLLA, L., MONACI, M., 2007: Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67, 7: 1249–1255. ISSN 0093-691X.
- ŠTOLC, L., STÁDNÍK, L., JEŽKOVÁ, A., LOUDA, F., 2009: Relationships among herd, ram breeds, age of rams, sperm density before diluting and sperm motility during thermal survival test. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 57, 4: 109–116. ISSN 1211-8516.
- THARA, K. M., NAIR, S. P., SURESH, 2007: Sire effect on *in vitro* fertilizability of matured cattle oocytes. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 3: 421–422. ISSN 0972-5849.
- VÁGENKNECHTOVÁ, M., HOŠEK, M., MÁCHAL, L., CHLÁDEK, G., 2011: The influence of external and internal factors on the quality of semen collection and qualitative indicators of semen in the dog (*Canis familiaris*). *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 59, 6: 373–380. ISSN 1211-8516.
- WALSH, S.W., WILLIAMS, E.J., EVANS, A.C.O., 2011: A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123, 3–4: 127–138. ISSN 0378-4320.
- ZINK, V., LASSEN, J., ŠTÍPKOVÁ, M., 2012: Genetic parameters for female fertility and milk production traits in first-parity Czech Holstein cows. *Czech Journal of Animal Science*, 57, 3: 108–114. ISSN 1212-1819.

Address

Ing. Jan Beran, Ph.D., Department of Animal Husbandry, Ing. Ondřej Šimoník, Department of Veterinary Sciences, Assoc. Prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D., Department of Animal Husbandry, Assoc. Prof. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D., Department of Veterinary Sciences, Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D., Department of Animal Husbandry, Ing. Adéla Krejčířková, Department of Veterinary Sciences, Ing. Martina Doležalová, Department of Animal Husbandry, Ing. Jiří Šichtař, Ph.D., Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 21, Praha 6 – Suchbátka, Czech Republic, e-mail: beranj@af.czu.cz

EFFECT OF LDL ADDITION INTO SELECTED BULL SPERM DILUTERS ON RESISTANCE OF SPERMATOZOA AGAINST COLD SHOCK

Jan Beran¹, Ondřej Šimoník², Radko Rajmon², Luděk Stádník¹,
Martina Doležalová¹, Adéla Krejčířková², Jaromír Ducháček¹, Jiří Šichtař²

¹ Department of Animal Husbandry, Faculty of Agrobiological Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, Czech Republic

² Department of Veterinary Science, Faculty of Agrobiological Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, Czech Republic

Abstract

BERAN JAN, ŠIMONÍK ONDŘEJ, RAJMON RADKO, STÁDNÍK LUDĚK, DOLEŽALOVÁ MARTINA, KREJČÍŘKOVÁ ADÉLA, DUCHÁČEK JAROMÍR, ŠICHTAŘ JIŘÍ. 2016. Effect of LDL Addition Into Selected Bull Sperm Diluters on Resistance of Spermatozoa Against Cold Shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(2): 395–399.

The aim of work was to determine the effect of LDL cholesterol addition into selected diluters on the resistance of spermatozoa against cold shock and on their short-term survivability during cold test. The hypothesis was that the addition of LDL cholesterol will positively affect sperm resistance to cold shock and ensure a higher survivability of spermatozoa during short-term cold survival test. Four bulls of different breeds and ages, from the same sire insemination center were used. A total of eight semen collections were processed. Each ejaculate was divided into 6 portions (3 controls and 3 samples). Three commercially produced diluters, AndroMed[®], Bioxcell[®], and Triladyl[®] were used, each in standard and LDL enriched variants. In the case of AndroMed[®] or Bioxcell[®], 6% of LDL was simply added. In Triladyl[®], 10% of LDL replaced the standard egg yolk component. Spermatozoa resistance to cold shock was evaluated by the percentage of live sperm using Eosin-Nigrosine staining. The results showed the influence of bull individuality as an important factor. It is possible to recommend Bioxcell[®] with addition of LDL cholesterol in 6% concentration, which survivability was 69.17% at the beginning of the test, and 52.94% after 2 hours of incubation.

Keywords: AndroMed, Bioxcell, bull semen, LDL, Triladyl, sperm survivability

INTRODUCTION

During the processing of semen, spermatozoa are exposed to many non-physiological changes, e.g. of temperature, pH, osmotic pressure induced by cryoprotectants, formation and dissolution of ice crystals and of course the absence of female genital secretions, with which the sperm are mixed after ejaculation (Beran *et al.*, 2014). Biochemical and anatomical characteristics of sperm can be altered during the freezing process, plasma membrane is primarily affected (Hammerstedt *et al.*, 1990). So, the success of cryopreservation depends on many factors, including the interaction between cryoprotectants, type of diluters (Stádník *et al.*, 2015), speed of freezing/thawing (Doležalová *et al.*, 2015),

packaging and individuality of donor (Cooter *et al.*, 2005; Clulow *et al.*, 2008).

Composition of diluters affects the viability and fertilization ability of sperm in the insemination dose (Siddique *et al.*, 2006). Therefore, the most suitable protecting media are continuously looking for and developing.

Egg yolk improves sperm function and keeps their fertilization ability (Barak *et al.*, 1992). The phospholipids and low-density lipoprotein (LDL) permeating into membranes are basic fractions of egg yolk which provide protection for sperm during cooling and freezing (Medeiros *et al.*, 2002). Egg yolk can be replaced in diluters by plant phospholipids due to its inconsistent composition (Ansari

et al., 2010) and risk of bacterial contaminations (Bousseau *et al.*, 1998). There is an assumption that LDL addition to commercially manufactured diluters (animal and/or plant phospholipid-based) can improve cryoprotective properties of them.

The potential fertility of sperm can be evaluated by several methods (Dhurvey *et al.*, 2012). Cold shock test was evaluated in relation to LDL addition to diluters (Beran *et al.*, 2013), but optimal LDL concentration increasing resistance of spermatozoa against cold shock was not suggested. Thus, the aim of this study was to determine the effect of the LDL addition to selected diluters on the rate of spermatozoa survival following cold shock and propose the optimal combination of the diluter and LDL concentration.

MATERIALS AND METHODS

Collection of Semen, Dilution and Processing

Three commercially available diluters – AndroMed[®], Triladyl[®] (both from MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Germany) and Bioxcell[®] (IMV, L' Aigle, France) were used. Control variants (CA, CB, and CT) of diluters were prepared according to the manufacturer's instructions. Experimental variants included 6% LDL cholesterol addition into the AndroMed[®] (A6) and Bioxcell[®] (B6) diluters, and 10% LDL addition into the Triladyl[®] (T10) diluter prepared without using egg yolk, which is normally its essential component. Increased concentration of LDL in Triladyl[®] replaced cryoprotective properties of egg yolk. The diluters used were prepared on the day of sampling and stored at the cooling box (4 °C).

Four bulls (bull A, B, C, and D) of different breeds (two bulls of Holstein breed, two bulls of Czech Fleckvieh breed), of ages from two to four years and the same frequency of collecting (once weekly) belonging to one sire insemination center were used. The bulls were proved and actively used for sperm production. Eight samples of ejaculate were obtained from selected bulls using an artificial vagina during the period of eight weeks. The samples of semen were then transferred to the university laboratory within one hour at 4 °C for next processing.

Samples of semen were pipetted using a sterile pipette to a sterile chilled (4 °C) tubes. Each sample of semen was immediately diluted to 50 000 spermatozoa/ml. The required amount of diluters was applied using sterile syringes directly to the tubes with samples. Thereafter tubes were sealed with sterile stoppers, mixed gently and placed into the cooling box (4 °C).

Evaluation of Resistance Against Cold Shock

Three capillaries (0.1 ml) were gradually filled from each sample at 4 °C, closed at one end with plasticine and stored for ten minutes in a cooled bath (No Ice, Bibby Scientific, Ltd., Staffordshire, UK) at 0 °C. After the end of incubation, Eosin-

Nigrosine staining was done: the capillaries content was gently mixed with 20 µl of Eosin by circular motion for 30 sec. Then 40 µl of Nigrosine was added, gently mixed and smear was done from this suspension. This procedure was repeated after 2 hours incubation of extended semen samples in a water bath at 37 °C. Smears (36 of each collecting day, 288 together) were examined after drying under a phase contrast microscope (Eclipse E200, Nikon[®], Tokyo, Japan) at 1000× magnification and with oil immersion by one evaluator. Minimum of 100 spermatozoa was classified as either dead (with red heads) or live (with white heads) and expressed as a percentage rate of live sperm.

Statistical Analysis

The data set was analyzed using a generalized linear model in the statistical program SAS/STAT 9.1. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The following equation was used:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{BULL}_i + \text{SAMPLE}_j + e_{ijk}$$

where

Y_{ijk}observed value of the dependent variable (percentage rate of live sperm at the beginning and the end of 2 hours incubation, difference between these measurements),

μaverage value of the dependent variable,
 BULL_ifixed effect of the i^{th} bull ($i = \text{bull A}, n = 3;$
 bull B, $n = 3;$ bull C, $n = 1;$ bull D, $n = 1$),

SAMPLE_jfixed associated effect of the j^{th} sample of diluter and LDL addition combination ($j = \text{A6}, n = 48;$ B6, $n = 48;$ T10, $n = 48;$ CA, $n = 48;$ CB, $n = 48;$ CT, $n = 48$),

e_{ijk}residual effects.

The differences between the variables estimated were tested at the levels of significance $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

RESULTS

The basic characteristics of the model equation used are presented in Tab. I. The coefficient of determination ranged from $r^2 = 0.24$ to 0.84. The sire individuality had a significant effect ($P < 0.01$) on all investigated characteristics (ACT 0, ACT 2 and ACT 0–ACT 2). The effect of sample (diluter and LDL addition) was statistically higher significant ($P < 0.01$) only on sperm survivability after 2 hours of the test (ACT 2) and on the difference between sperm survivability in time 0 and 2 hours of the test (ACT 0–ACT 2).

The results of evaluation of the effect of the bull on the sperm survivability are presented in Tab. II. The highest survivability of sperm at the beginning of the test was found in bull A (81.62%), the lowest was detected in bull D (36.44%, $P < 0.01$). The highest sperm survivability after 2 hours of the test duration was found in bull C (61.25%, $P < 0.05$ –0.01), whereas the lowest was detected in bull D

I: Basic characteristics of the model equation used for data analysis

TRAIT	MODEL		BULL		SAMPLE	
	r ²	P	F-test	P	F-test	P
ACT 0	0.84	< 0.01	598.33	< 0.01	1.58	0.0813
ACT 2	0.56	< 0.01	123.48	< 0.01	4.18	< 0.01
ACT 0–ACT 2	0.24	< 0.01	21.97	< 0.01	2.94	0.0003

ACT 0 = sperm survivability at the beginning of the test; ACT 2 = sperm survivability after 2 hours of the test duration; ACT 0–ACT 2 = difference between sperm survivability in time 0 and 2 hours of the test.

II: The effect of bull on sperm survivability

	Bull A	Bull B	Bull C	Bull D
	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
ACT 0	81.62 ± 0.56 ^{CD}	80.61 ± 0.56 ^{CD}	70.34 ± 0.98 ^{ABD}	36.44 ± 0.98 ^{ABC}
ACT 2	57.43 ± 1.05 ^D	56.47 ± 1.05 ^{CD}	61.25 ± 1.82 ^{BD}	20.31 ± 1.82 ^{ABC}
ACT 0–ACT 2	24.18 ± 1.06 ^{CD}	24.14 ± 1.06 ^{CD}	9.09 ± 1.84 ^{ABD}	26.12 ± 1.84 ^{ABC}

ACT 0 = sperm survivability at the beginning of the test in percent; ACT 2 = sperm survivability after 2 hours of the test duration in percent; ACT 0–ACT 2 = difference between sperm survivability in time 0 and 2 hours of the test in percent; upper script letters means significant difference among sires – a, b, c, d = P < 0.05; A, B, C, D = P < 0.01.

III: The effect of the diluter and LDL addition on sperm survivability against cold shock

Sample	Label	ACT 0	ACT 2	ACT 0–ACT 2
		LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
A6	A	67.86 ± 1.36	47.12 ± 2.52	20.74 ± 2.56 ^D
B6	B	69.17 ± 1.36 ^e	52.94 ± 2.52 ^e	16.23 ± 2.56 ^e
T10	C	65.97 ± 1.36	44.53 ± 2.52 ^f	21.44 ± 2.56 ^f
CA	D	64.75 ± 1.36	47.85 ± 2.52 ^E	16.90 ± 2.56 ^{AE}
CB	E	65.61 ± 1.36 ^b	46.16 ± 2.52 ^{BD}	19.46 ± 2.56 ^{BD}
CT	F	67.41 ± 1.36	51.40 ± 2.52 ^c	16.01 ± 2.56 ^c

ACT 0 = sperm survivability at the beginning of the test in percent; ACT 2 = sperm survivability after 2 hours of the test duration in percent; ACT 0–ACT 2 = difference between sperm survivability in time 0 and 2 hours of the test in percent; A6 = AndroMed[®] with 6% LDL; B6 = Bioxcell[®] with 6% LDL; T6 = Trilady[®] with 10% LDL; CA = control samples of AndroMed[®]; CB = control samples of Bioxcell[®]; CT = control samples of Trilady[®]; upper script letters means significant difference among samples – a, b, c, d, e, f = P < 0.05; A, B, C, D, E, F = P < 0.01.

again (20.31%, P < 0.01). The smallest difference in sperm survivability (9.09%, P < 0.01) was reached by bull C, on the other hand the highest difference was determined in bull D (26.12%, P < 0.01). Results presented in Tab. II documented significant variability of sperm survival among selected sires at the beginning of observation, at the end of the test, as well as in sperm survival decline during the entire test performed.

The results of evaluation of the diluter and LDL addition effect on sperm survivability against cold shock are presented in Tab. III. Significantly the highest survivability of sperm at the beginning of the test was found in sample B6 (69.17%) compared to CB (65.61%; P < 0.05), and the lowest was detected in sample CA (64.75%; P > 0.05). Significantly the highest sperm survivability after 2 hours of the test duration was found again in sample B6 (52.94%) in comparison with CB (46.16%; P < 0.05) and significantly the lowest values were detected in sample T10 (44.53%) compared to CT (51.40%; P < 0.05). Some of other differences among evaluated diluters at the end of the test were significant as

well (P < 0.05–0.01). The difference between the beginning and the end of the test duration was the largest in sample T10 (21.44%) and the lowest were detected in CT (16.01%; P < 0.05). The second lowest decline of sperm survival was detected in sample B6 (16.23%), significantly (P < 0.05) different from CB (19.46%). Some of measured differences of sperm survival decline were statistically significant to each other as well (P < 0.05–0.01).

DISCUSSION

The experiment brought some interesting results. Using the extracted LDL – cholesterol from egg yolk has been investigated previously in various extenders (Vera-Munoz *et al.*, 2009), at different concentrations (Moussa *et al.*, 2002) and confirmed by thermal test or cryoconservation, but the cold shock test was used in this experiment for the first time. According to Anton *et al.* (2003) is known that egg yolk has a positive effect during sperm cryopreservation, because the components in egg yolk can create the absorption of oil and

water phase interface and make the oil droplets protective film. These abilities include membrane stabilization or cool shock protection. Egg yolk contains phospholipids; the largest amount is represented by LDL – cholesterol, which provides sperm cryoprotection during freezing or thawing by increasing the stability of the plasma membrane (Moussa *et al.*, 2002). Watson (1995) stated that is important to test both, the effect of heat and cold on sperm survivability. Chantler *et al.* (2000) confirmed the loss of motility of sperm if the cryoprotective substances (e.g. egg yolk) were not added into ejaculate. Cold shock was also investigated in boar sperm survivability using egg yolk. Positive results attributed to the composition of egg yolk, natural source of LDL cholesterol (Hu *et al.*, 2006).

Individuality of bulls has very important effect on sperm survivability. Effect of bull was significant ($P < 0.01$) on all monitored indicators. The significantly ($P < 0.01$) lowest sperm survivability was found in bull D in all observed characteristics. On the other hand the highest sperm survivability had bull A at the beginning of the cold test and bull C at the end of the test; bull C had simultaneously the lowest ($P < 0.01$) difference between the beginning and the end of the test. In general we can say that considerable individual differences in sperm survivability between bulls were determined. This is in accordance with the work of Beran *et al.* (2012 and 2013).

We can assume that the associated effect of diluter and LDL addition on sperm survivability against cold shock was highly significant ($P < 0.01$) only after 2 hours of the test. This is in accordance with Vera-

Munoz *et al.* (2011) findings. They confirmed that samples with LDL showed better sperm motility and plasma membrane integrity even after 8 days of incubation. Similarly, Amirat *et al.* (2005) determined the lowest damage of sperm diluted with LDL after 4 hours incubation.

Based on our results, we can say that the samples of AndroMed® and Bioxcell® enriched by LDL achieved balanced or higher sperm survival (-0.73% to +6.78%) compared to control samples. Control Triladyl® contained 20% of egg yolk and provided higher level of sperm survival during the test (+1.44% and +6.87%) than 10% addition of LDL cholesterol as substitution of egg yolk. Concurrently, Bioxcell® with 6% LDL addition was the best variant for resistance of sperm following cold shock. This variant had the highest values of sperm survivability at the beginning (69.17%) and after 2 hours incubation (52.94%) compared to Triladyl® and AndroMed®. Bioxcell® with 6% LDL addition had the smallest decline during the entire test (16.23%) as well. However, significant differences were determined only to control variant of Bioxcell®. The combination of Bioxcell® and 6% of LDL was the most favorable for sperm due to the lower decline of motility compared to other experimental variants of diluters.

If we compare the control samples each other we can state that the best variant is the diluter Triladyl®. This variant has achieved the lowest decline (16.01%). This is in opposite with Vera-Munoz *et al.* (2009) who state that the LDL diluter had better results than Triladyl® and AndroMed®.

CONCLUSION

Generally, we can recommend addition of 6% LDL into diluter Bioxcell® according to significantly higher sperm survival and its lowest decline in comparison with control variant of Bioxcell®.

Acknowledgement

The paper was supported by „S” grant of MŠMT ČR and NAZV [No. QJ1210109].

REFERENCES

- AMIRAT, L., ANTON, M., TAINURIER, D., CHATAGNON, G., BATTUT, I., COURTENS, J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129(4): 535–543.
- ANSARI, M. S., RAKHA, B. A., ANDRABI, S. M. H., AKHTER, S. 2010. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reprod. Biol.*, 10(3): 235–240.
- ANTON, M., MARTINET, V., DALGALARRONDO, M., BEAURNAL, V., DAVID-BRIAND, E., RABESONA, H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.*, 83(2): 175–183.
- BARAK, Y., AMIT, A., LESSING, J. B., PAZ, G., HOMMONAI, Z. T., YOGEV, L. 1992. Improved fertilization rate in an in vitro fertilization program by egg yolk-treated sperm. *Fertil. Steril.*, 58: 197–198.
- BERAN, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J., LOUDA, F., ČÍTEK, J., DUCHÁČEK, J. 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Arch. Tierz.-Arch. Anim. Breed.*, 55(3): 207–218.
- BERAN, J., ŠIMONÍK, O., STÁDNÍK, L., RAJMON, R., DUCHÁČEK, J., KREJČÁRKOVÁ, A., DOLEŽALOVÁ, M., ŠICHTAŘ, J. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.*, 61(6): 1575–1581.

- BERAN, J., STÁDNÍK, L., DOLEŽALOVÁ, M., TOUŠOVÁ, R. 2014. *Improving the quality of bulls insemination doses by selecting a suitable semen extender* [in Czech: *Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu*]. 1st ed. Prague: Czech University of Life Sciences Prague
- BOUSSEAU, S., BRILLARD, J. P., MARQUANT-LE GUIENNE, B., GUERIN, B., CAMUS, A., LECHAT, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50(5): 699–706.
- CHANTLER, E., ABRAHAM-PESKIR, J. V., LITTLE, S., MCCANN, C., MEDENWALDT, R. 2000. Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology*, 41(2): 125–134.
- CLULOW, J. R., MANSFIELD, L. J., MORRIS, L. H. A., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 108(3–4): 298–308.
- COOTER, P. Z., GOOLSBY, H. A., PRIEN, S. D. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 40(2): 98–99.
- DHURVEY, M., GUPTA, V., NEMA, S., PATIDAR, A., SHIVHARE, M., SINGHT, N., SHAKYA, V. 2012. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *DHR-IJBLS*, 3(1): 62–83.
- DOLEŽALOVÁ, M., STÁDNÍK, L., BINIOVÁ, Z., DUCHÁČEK, J., BERAN, J. 2015. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Vet. Brno*, 84(4): 383–391.
- HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAM, J. K., NOLAN, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm – what ask them to survive. *J. Androl.*, 11: 73–88.
- HU, J. H., LI, Q. W., GANG, L., CHEN, X. Y., HAI, Y., ZHANG, S. S., WANG, L. Q. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 19(4): 486–494.
- MEDEIROS, C. M. O., FORELL, F., OLIVEIRA, A. T. D., RODRIGUES, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1): 327–344.
- 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.
- SIDDIQUE, M., ALI, R., RAZA, A. 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *J. Agric. Soc. Sci.*, 2(2): 117–119.
- STÁDNÍK, L., RAJMON, R., BERAN, J., ŠIMONÍK, O., DOLEŽALOVÁ, M., ŠICHTAŘ, J., STUPKA, R., FOLKOVÁ, P. 2015. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Vet. Brno*, 84(2): 125–131.
- VERA-MUNOZ, O., AMIRAT-BRIAND, L., DIAZ, T., VASQUEZ, L., SCHMIDT, E., DESHERCES, S., ANTON, M., BENCHARIE, D., TAINTURIER, D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl (R) and Bioxcell (R). *Theriogenology*, 71(6): 895–900.
- VERA-MUNOZ, O., AMIRAT-BRIAND, L., BENCHARIE, D., ANTON, M., DESHERCES, S., SHMITT, E., THORIN, C., TAINTURIER, D. 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 degrees C. *Asian J. Androl.*, 13(2): 281–286.
- WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7(4): 871–891.

Contact information

Jan Beran: h.beran@seznam.cz
 Ondřej Šimoník: simoniko@af.czu.cz
 Radko Rajmon: rajmon@af.czu.cz
 Luděk Stádník: stadnik@af.czu.cz
 Martina Doležalová: dolezalovamartina@af.czu.cz
 Adéla Krejčárková: krejcarkova@af.czu.cz
 Jaromír Ducháček: duchacek@af.czu.cz
 Jiří Šichtař: sichtar@af.czu.cz

Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing

M. DOLEŽALOVÁ, L. STÁDNÍK, Z. BINIOVÁ, J. DUCHÁČEK, R. STUPKA

Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiological Sciences, Department of Animal Husbandry, Prague, Czech Republic

ABSTRACT: The objective was to determine effects of equilibration length and freezing curve type as well as their interactions on motility and live spermatozoa proportion in bull sperm after thawing. The ejaculates of 6 sires were repeatedly collected. Fresh semen was diluted with one extender and divided into 3 groups equilibrated for 30, 120, and 240 min. Subsequently, half straws of each group were frozen using standard 3-phase or 2-phase freezing curve differing in the rate of temperature decrease. The spermatozoa motility (M) was evaluated immediately after thawing and at 30, 60, 90, and 120 min of thermodynamic test (TDT). Live spermatozoa proportion was evaluated after thawing and at the end of TDT. Average of spermatozoa motility (AM), decrease of spermatozoa motility (MD), average proportion of live spermatozoa (ALS), and decrease of live spermatozoa proportion (DLS) through the TDT were calculated. The data set was analyzed using SAS 9.3. Significant inter-sire differences in AM (0.45–17.0%; $P < 0.05$ –0.01), MD (0.76–12.57%; $P < 0.05$ –0.01), and ALS (0.99–23.8%; $P < 0.01$) were detected. The longest equilibration ensured the highest M during TDT and AM (+2.72 and +4.58%; $P < 0.05$ –0.01), however higher MD (+4.06%; $P < 0.01$) compared to standard length as well. Straws frozen using 2-phase curve achieved higher M through TDT, AM (+7.3%; $P < 0.01$) as well as ALS (+11.77%; $P < 0.01$). The 2-phase curve presented higher M compared to the 3-phase freezing curve within all equilibration lengths. Significant differences in AM, MD, and ALS (0.45–6.78%, 0.62–5.35%, and 20.79–21.11%; $P < 0.05$ –0.01) between equilibration length vs freezing curve interactions were determined. Results document the importance of equilibration length, freezing curve, and their interaction effect on live spermatozoa proportion and sperm motility after thawing as well as necessity of individual conditions for processing bulls semen and insemination doses production.

Keywords: sire; spermatozoa; cryopreservation; insemination dose; fertilization capability

INTRODUCTION

Growing interest in improving the quality of frozen bull semen for the needs of the market in recent years has been determined by the declined fertility of dairy cows (Beran et al. 2013a, Stádník et al. 2015a) and world-wide practical usage of artificial insemination (Shahverdi et al. 2014). Therefore, it is necessary to ensure optimal genetic sires selection (Zhang et al. 2015) as well as semen

processing including semen collection (Dzyuba et al. 2015), dilution (Meamar et al. 2016), slow cooling to 4–6°C (Kristan et al. 2014), and equilibration (Beran et al. 2013b) as well as cryopreservation maintaining spermatozoa fertilization capability (Andrabi 2007) evaluated objectively if possible (Simonik et al. 2015).

Equilibration as the total period of spermatozoa contact with a cryoprotectant prior to freezing helps keep spermatozoa membrane integrity as well

Supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (“S” grant), and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. QJ1210109).

as their survival (Leite et al. 2010). Extenders used serve as protection during cooling and freezing (Linhartova et al. 2014) and preserve spermatozoa motility after subsequent thawing (Muchlisin et al. 2015). Nevertheless, the most suitable interactions of extender vs equilibration length still are not determined sufficiently (Shahverdi et al. 2014). Leite et al. (2010) recorded only limited interactions between the extender used and the equilibration length. Dhimi et al. (1992) recommended 30 min to 24 h equilibration prior to freezing, while Muino et al. (2007) determined optimal length of equilibration from 4 to 18 h. Selected studies indicate that 18 h or overnight equilibrations prior to freezing are the most appropriate equilibration lengths in order to increase quality of the insemination doses produced (Shahverdi et al. 2014). However, from the doses production point of view, effort to shorten equilibration or to eliminate it completely and thereby to accelerate sperm processing and cryopreservation is definitely desirable. On the other hand, efficiency of doses production contradicts the fact that equilibration is essential for the spermatozoa characteristics after subsequent thawing (Gao et al. 1997).

The success of cryopreservation depends on the course of cooling and freezing (Clulow et al. 2008). Interaction of temperature vs extender used affects spermatozoa cold shock resistance (Stadnik et al. 2015b). The extent of spermatozoa damage caused by cold shock depends on temperature, however on the rate of temperature decrease as well. Generally, the higher the cooling rate, the more serious the sperm damage (Lemma 2011) determining the subsequent post-thaw spermatozoa motility (Andrabi 2007). Thus the result of sperm cryopreservation is also affected by the type and course of freezing curve (Dolezalova et al. 2015).

Summarily, the length of equilibration as well as the freezing curve type are responsible for many important physicochemical changes leading to different degrees of spermatozoa structure damage (Forero-Gonzalez et al. 2012) deteriorating spermatozoa characteristics after thawing (Spalekova et al. 2014). Despite this fact, interactions mentioned have not been sufficiently known yet. Therefore, the objective of study was to evaluate the effect of different equilibration lengths and freezing curve type interactions on motility and proportion of live spermatozoa in bull sperm after insemination doses thawing.

MATERIAL AND METHODS

Bulls and semen collecting. The ejaculates of pre-selected bulls ($n = 6$) ordinarily used for commercial purposes were repeatedly collected during April and September. Sires of the same age, breed, and frequency of collecting were stabled in a private Sire insemination centre under the same breeding conditions as handling, stabling, feeding system, and feeding ratio composition. Samples of ejaculate were obtained using an artificial vagina and immediately evaluated in the lab of the Sire insemination centre according to methodology applied. Volume of fresh semen (VOL, g), density of spermatozoa (DEN, $\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$), and percentage rate of progressive motile spermatozoa above head (MOT, %) were evaluated by only one trained technician. Only ejaculates corresponding to the initial parameters required (minimum DEN $0.7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ and MOT 70%) were subsequently processed. Average quality of fresh semen collected is presented in Table 2. The average values of VOL, DEN, and MOT achieved in all sires observed were 6.15 g, $0.93 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, and 74.17%, respectively.

Semen dilution and processing. Fresh semen was ordinarily diluted with phospholipid extender Andromed® (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany) to a spermatozoa concentration 10×10^6 per one insemination dose immediately after lab evaluation of fresh sperm quality. Diluted ejaculate was mixed up at room temperature (25°C) for 10 min and automatically loaded into 0.25 ml differently coloured straws using a computer-controlled filler (IMV Technologies, L'Aigle, France). After filling, straws were divided into 3 groups ($n = 20$ insemination doses per sire at least), immediately placed into a cooling box, cooled at an average speed of 0.2°C per min to 4–5°C, and equilibrated (Camara et al. 2011). According to pre-defined methodologies, equilibration lengths of 30 min (Leite et al. 2010), 120 min (Shahverdi et al. 2014), and 240 min (Januskauskas et al. 1999) were applied and tested. Subsequently, equilibrated straws were divided into 2 groups ($n = 10$ insemination doses per sire per equilibration length at least) and frozen using 2 freezing curves providing the highest spermatozoa motility after thawing (Dolezalova et al. 2015). Freezing was performed using the controlled freezing methodology Direct Freezing in a freezer box Digitcool® (IMV Cryo Bio System, L'Aigle, France). Figure 1 documents

doi: 10.17221/23/2016-CJAS

the course of the freezing curves. The standard, commercially recommended 3-phase curve (according to Muino et al. 2007) and the 2-phase freezing curve described by Januskauskas et al. (1999) and Gil et al. (2000) were applied.

Evaluation of semen characteristics. The straws cryopreserved were subsequently thawed in a water bath at $38 \pm 1^\circ\text{C}$ for 30 s according to methodology recommended by Rubio-Guillen et al. (2007). The percentage rate of progressive motile spermatozoa above head (MOT) was evaluated and recorded using SCA[®] Production CASA system v. 5.3. (MICROPTIC S.L., Barcelona, Spain) with a phase contrast microscope Eclipse E200 (Nikon, Tokyo, Japan) at 200–300× magnification when five fields of view per each straw were evaluated at least (Tuncer et al. 2011). MOT was determined immediately after thawing (M0) as well as during the subsequent thermodynamic test (TDT) of spermatozoa survivability after 30, 60, 90, and 120 min (M30, M60, M90, and M120) of the test duration in a dry heater Thermoblock (Falc Instruments, Treviglio, Italy) at a temperature of $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

The proportion of live sperm was also evaluated immediately after straw thawing (L0) and at the end of TDT (L120). Sample volume of 20 µl was gently mixed on preheated hour glass ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) with 20 µl of eosin by circular motion for 30 s and then 40 µl of nigrosine were added. A volume of 20 µl of the resulting suspension was pipetted on preheated glass slide and smear was done. The rest of the thawed semen was stored in a water bath at $38 \pm 1^\circ\text{C}$ for 120 min. Subsequently, the second smear was prepared according to the above mentioned procedure. A phase contrast microscope with oil immersion (Eclipse E200, Nikon) at 1000× magnification was used by only one evaluator to examine all smears acquired. Minimally 100 spermatozoa were classified as either dead (with red heads) or live (with white heads), and expressed as a percentage rate of live sperm (Beran et al. 2012).

Data handling and statistical analysis. The data were analyzed by SAS software (Statistical Analysis System, Version 9.3., 2011) using the UNIVARIATE and GLM procedures. The procedures MEANS and UNIVARIATE were used to calculate basic statistics. The REG procedure (STEPWISE option) was used to develop a final model. Average of spermatozoa motility (AM) and decrease of spermatozoa motility (DM) through the entire

TDT were calculated according to MOT values during individual phases of TDT. Average proportion of live spermatozoa (ALS) and decrease of live spermatozoa (LSD) through the entire TDT was determined corresponding to L0 and L120 values as well. Based on Akaike information criterion, the values of M0, M30, M60, M90, and M120, DM as well as ALS and LSD were evaluated using a model corrected for the fixed effects of bull, length of equilibration, type of freezing curve, and interaction of the equilibration length vs the type of freezing curve. For evaluation of average sperm motility the fixed effects of thermodynamic test duration as correction of MOT values in individual phases of TDT were added into the model. Detail comparison was performed by Tukey-Kramer test. The model equation for spermatozoa motility, proportion of live spermatozoa, and both decrease during TDT were as follows:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{BULL}_i + \text{EQI}_j + \text{CUR}_k + \text{EQICUR}_{jk} + e_{ijkl}$$

where:

- Y_{ijkl} = dependent variable (spermatozoa motility at the beginning and after 30, 60, 90, and 120 min of the TDT; average spermatozoa motility, average proportion of live spermatozoa, and both decrease through the entire TDT)
- μ = mean value of dependent variable
- BULL_i = fixed effect of i^{th} bull individuality ($i = 1, n = 36; i = 2, n = 36; i = 3, n = 36; i = 4, n = 36; i = 5, n = 36; i = 6, n = 36$)
- EQI_j = fixed effect of j^{th} length of equilibration ($j = 30 \text{ min}, n = 72; j = 120 \text{ min}, n = 72; j = 240 \text{ min}, n = 72$)
- CUR_k = fixed effect of k^{th} type of freezing curve ($k = 1, n = 108; k = 2, n = 108$)
- EQICUR_{jk} = interaction between length of equilibration and freezing curve ($jk = \text{always } 6 \text{ groups}$)
- e_{ijkl} = random error

Within the evaluation of average spermatozoa motility through the entire TDT, the model applied was supplemented with fixed effect:

DUR_l = fixed effect of l^{th} thermodynamic test duration ($l = 0 \text{ min}, n = 216; l = 30 \text{ min}, n = 216; l = 60 \text{ min}, n = 216; l = 90 \text{ min}, n = 216; l = 120 \text{ min}, n = 216$)

Significance levels $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ were used to evaluate the differences between groups.

Table 1. Reliability of the model

Index	Model		FC		Sire		E		Time		FC * E	
	r^2	P	F -test	P	F -test	P	F -test	P	F -test	P	F -test	P
ALS	0.37	< 0.001	14.07	< 0.001	7.5	< 0.001	2.84	0.06	63.69	< 0.001	3.35	0.048
AM	0.65	< 0.001	10.16	0.002	84.95	< 0.001	17.67	< 0.001	65.96	< 0.001	4.18	0.016

FC = freezing curve, E = length of equilibration, ALS = average proportion of live spermatozoa through the entire thermodynamic test, AM = average spermatozoa motility

RESULTS

In Table 1 the model repeatability ranged from $r^2 = 0.37$ to 0.65 during the evaluation of observed traits when statistical significance of all models used was $P < 0.001$ in all evaluations. Effect of sire was significant ($P < 0.01$ to 0.001) in relation to all evaluated traits. Significance of the freezing curve effect differed ($P < 0.05$ to 0.001) according to individual dependent characteristics. The effect of equilibration length represented significance level $P < 0.05$ at average spermatozoa motility. The effect of equilibration length vs freezing curve interaction represented significance level $P < 0.05$.

Table 2 documents the initial parameters of fresh semen. The volume ranged from 3.0 to 9.4 g, density ranged from 0.8 to $1.5 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$, and initial motility of processed semen was 70–80%.

Figure 2 documents different course of spermatozoa motility in individual TDT phases corresponding to sires observed. The highest value of spermatozoa motility for all bulls was evaluated immediately after thawing (33.89–55.83%). During the entire TDT motility declined gradually and finally reached values of 21.94–40.83%. However, sire individuality describing higher motility after

thawing does not determine the higher motility during the entire TDT.

Table 3 shows the highest average spermatozoa motility through the entire TDT in sire V (46.33%) significantly ($P < 0.05$ –0.01) differing in comparison with all other sires (–3.33% to –17.00%). On the contrary, sire II achieved the lowest value (29.33%) significantly ($P < 0.01$) differing from levels detected in sires I, V, and VI (+12.5% to +17.00%). Spermatozoa motility decrease through the TDT differed significantly ($P < 0.05$ –0.01) among sires as well. The highest value of average proportion of live spermatozoa through the TDT (37.18%; $P < 0.01$) was determined in sire V, sire with the highest average spermatozoa motility. On the other hand, the lowest proportion (13.38%) was detected in sire III. Table 3 documents other significant inter-sire differences as well. Although different decreases of live spermatozoa proportion were determined, no differences were statistically significant.

Evaluating the effect of equilibration length demonstrated in Figure 3, the longest equilibration (240 min) ensured the highest values of spermatozoa motility in all TDT phases. This fact corresponds to the highest average spermatozoa motility through the entire TDT (39.83%) sig-

Table 2. Average values of fresh ejaculate parameters per sire

Sire	VOL (g)	DEN ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$)	MOT (%)
I	6.9	0.8	80
II	9.4	1.1	80
III	6.4	1.5	70
IV	6.3	0.8	70
V	3.0	0.7	75
VI	4.9	0.7	70
Average	6.15	0.93	74.17

VOL = volume of fresh semen, DEN = density of spermatozoa, MOT = percentage rate of progressive motile spermatozoa above head

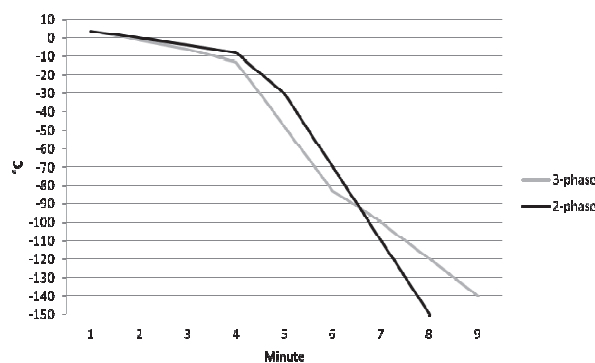


Figure 1. The course of 3-phase and 2-phase freezing curves applied

doi: 10.17221/23/2016-CJAS

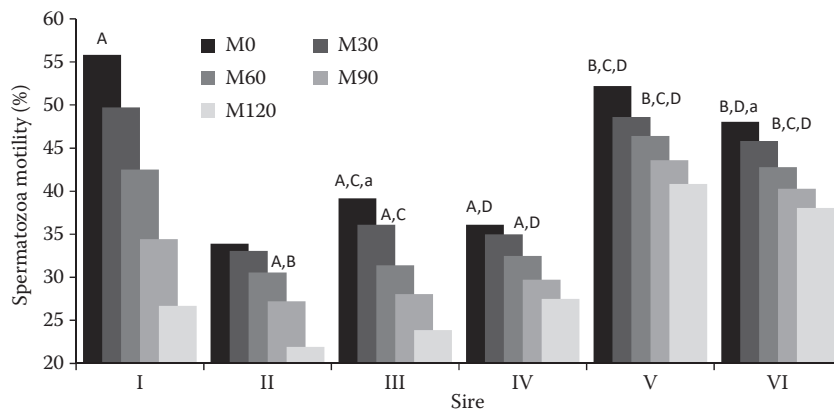


Figure 2. Effect of sire individuality on the percentage rate of progressive motile spermatozoa above head in individual phases of thermodynamic test M0, M30, M60, M90, M120 = percentage rate of progressive motile spermatozoa above head evaluated immediately after thawing, at 30, 60, 90, and 120 min of thermodynamic test, respectively

nificantly ($P < 0.05-0.01$) differing compared to equilibration of 30 min (-4.58%) and 120 min (-2.72%). The highest decline of spermatozoa motility during the entire TDT was recorded at 30 min equilibration (10.45%), while the smallest decline of motility was reached at 120 min equilibration (5.52%). Differences were significant ($P < 0.01$), and are presented in Table 3.

Figure 3 showed that the highest values of spermatozoa motility during TDT (0, 30, 60, 90, and

120 min) were reached at 240 min equilibration (47.5, 43.89, 40, 35.69, and 32.8%) in comparison to 120 min equilibration (-5.97 , -3.33 , -2.36 , -1.38 , -0.55%) and 30 min equilibration (-3.89 , -4.17 , -4.58 , -4.02 , -6.25%). On the other hand, 30 min equilibration presented higher spermatozoa motility after thawing TDT compared to 120 min equilibration. However, this motility significantly decreased after 30, 60, 90, and 120 min of TDT. Therefore, using 30 min equilibration, the highest

Table 3. Effect of bull, equilibration length, freezing curve, and equilibration length vs freezing curve interaction on the decrease and average of sperm motility (%) and proportion of live spermatozoa (%) through the thermodynamic test

		Motility		Live spermatozoa	
		MD	AM	DLS	ALS
		LSM ± SE			
Sire	I	17.50 ± 0.938 ^A	41.83 ± 0.776 ^A	33.02 ± 7.332	33.46 ± 3.838 ^A
	II	5.69 ± 0.938 ^A	29.33 ± 0.776 ^{A,B}	11.37 ± 7.332	14.37 ± 3.838 ^{A,B}
	III	9.31 ± 0.938 ^{A,a}	31.72 ± 3.839 ^{A,C}	19.39 ± 7.332	13.38 ± 3.838 ^{A,C}
	IV	4.93 ± 0.938 ^{A,a}	32.17 ± 0.776 ^{A,D}	27.97 ± 7.332	34.84 ± 3.838 ^{B,C}
	V	7.36 ± 0.938 ^A	46.33 ± 0.776 ^{A,B,C,D,a}	22.68 ± 7.332	37.18 ± 3.838 ^{B,C}
	VI	6.32 ± 0.938 ^A	43.00 ± 0.776 ^{B,C,D,a}	35.68 ± 7.332	25.14 ± 3.838
Equilibration (min)	30	10.45 ± 0.663 ^A	35.25 ± 0.548 ^{A,a}	22.44 ± 5.184	22.90 ± 2.715
	120	5.52 ± 0.663 ^{A,B}	37.11 ± 0.548 ^{B,a}	29.68 ± 5.184	31.58 ± 2.715
	240	9.58 ± 0.663 ^B	39.83 ± 0.548 ^{A,B}	22.93 ± 5.184	24.71 ± 2.715
Freezing curve	3-phase	8.80 ± 0.542	36.39 ± 0.448 ^A	21.37 ± 4.233	20.51 ± 2.217 ^A
	2-phase	8.24 ± 0.542	38.41 ± 0.448 ^A	28.67 ± 4.233	32.28 ± 2.217 ^A
Equilibration length vs freezing curve interaction	30 vs 3	11.18 ± 1.133 ^{A,a}	33.28 ± 1.018 ^A	20.62 ± 7.306	19.18 ± 4.389 ^a
	120 vs 3	5.21 ± 1.133 ^{A,b}	35.83 ± 1.018 ^a	19.31 ± 7.306	22.87 ± 4.389
	240 vs 3	10.00 ± 1.133 ^b	40.06 ± 1.018 ^{A,a}	24.17 ± 7.306	19.50 ± 4.389 ^b
	30 vs 2	9.72 ± 1.133	37.22 ± 1.018	24.27 ± 7.306	26.62 ± 4.389
	120 vs 2	5.83 ± 1.133 ^a	38.39 ± 1.018 ^A	40.04 ± 7.306	40.29 ± 4.389 ^{a,b}
	240 vs 2	9.17 ± 1.133	39.61 ± 1.018 ^A	21.69 ± 7.306	29.91 ± 4.389

MD = spermatozoa motility decrease, AM = average spermatozoa motility, DLS = decrease of live spermatozoa proportion, ALS = average proportion of live spermatozoa through the entire thermodynamic test, the same superscript letters confirm statistical significance of differences ^{A-D}($P < 0.01$), ^{a,b}($P < 0.05$)

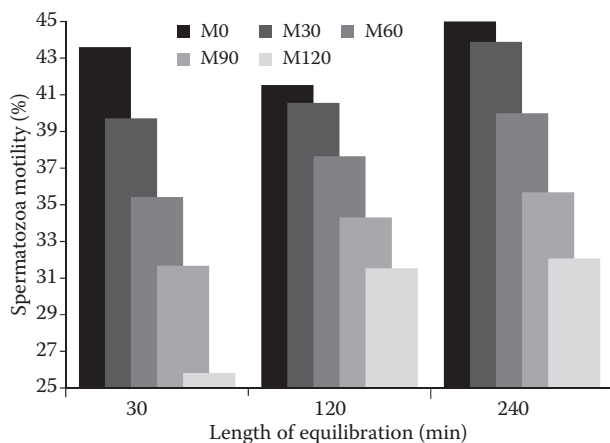


Figure 3. Effect of equilibration length on the percentage rate of progressive motile spermatozoa above head in individual phases of thermodynamic test

M0, M30, M60, M90, M120 = percentage rate of progressive motile spermatozoa above head evaluated immediately after thawing, at 30, 60, 90, and 120 min of thermodynamic test, respectively

decrease of spermatozoa motility significantly ($P < 0.01$) differing compared to 120 min equilibration was determined. On the other hand, Table 3 documented that the highest average proportion of live sperm was detected in straws equilibrated for 120 min (31.58%), although differences (from -6.87 to -8.68%) from other equilibrations were insignificant, probably due to the non-significantly highest decrease of live spermatozoa (29.68%) during the TDT. Our results describe the 30 min

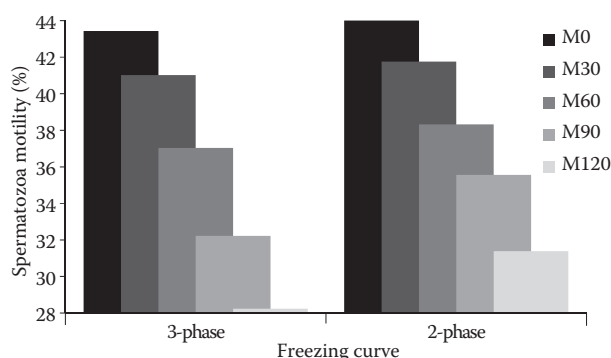


Figure 4. Effect of freezing curve on the percentage rate of progressive motile spermatozoa above head in individual phases of thermodynamic test

M0, M30, M60, M90, M120 = percentage rate of progressive motile spermatozoa above head evaluated immediately after thawing, at 30, 60, 90, and 120 min of thermodynamic test, respectively

equilibration as the least appropriate from this point of view.

The direct effect of freezing curve type is demonstrated in Figure 4. The 2-phase freezing curve was less threatening to sperm as documented by spermatozoa motility level in all individual phases of TDT after thawing (45, 41.76, 38.33, 35.56, 31.39%) in comparison to 3-phase freezing curve (-1.57 , -0.76 , -1.29 , -3.34 , -3.15%). This fact is confirmed by higher average spermatozoa motility ($+2.02\%$; $P < 0.01$) as well as higher average proportion of live sperm ($+11.77$; $P < 0.01$) through the entire test as shown in Table 3. However, differences in the decrease of spermatozoa motility and live spermatozoa proportion were insignificant.

Based on the evaluation of individual effects and interactions described in Table 3, the most appropriate is 240 min equilibration combined with 2-phase freezing curve. Compared to 120 and 240 min equilibration, 30 min equilibration using both 3-phase (-2.55% and -6.78%) and 2-phase (-1.17% and -2.39%) curves presented the lowest values of motility. In evaluating the average proportion of live spermatozoa, 30 min equilibration using both 3-phase (-3.69% and -0.32%) and 2-phase (-13.67% and -3.29%) curves presented the lowest values compared to 120 and 240 min equilibration. The highest proportion of live spermatozoa in comparison to the other variants was reached using 120 min equilibration and 2-phase freezing curve ($+21.11$, $+17.42$, $+20.79$, $+13.67$, $+10.38\%$). Significant differences ($P < 0.05$) between this variant and variants using 3-phase freezing curve and equilibration length 30 and 240 min were found as well. The highest decrease of live spermatozoa proportion during TDT using 120 min equilibration and 2-phase freezing curve was found (40.04%), conversely, the lowest decline (19.31%) was reached using 120 min equilibration and 3-phase freezing.

Figure 5 shows the course of motility in individual phases of TDT in relation to freezing curve and equilibration length interactions. The 2-phase curve presented higher motility values compared to 3-phase curve within all lengths of equilibration, except motility immediately after thawing at 240 min equilibration (-1.12%). The longer the equilibration, the higher the motility levels determined. However, 30 min equilibration vs 2-phase curve interaction achieved higher motility levels compared to standard interaction of 120 min equilibration

doi: 10.17221/23/2016-CJAS

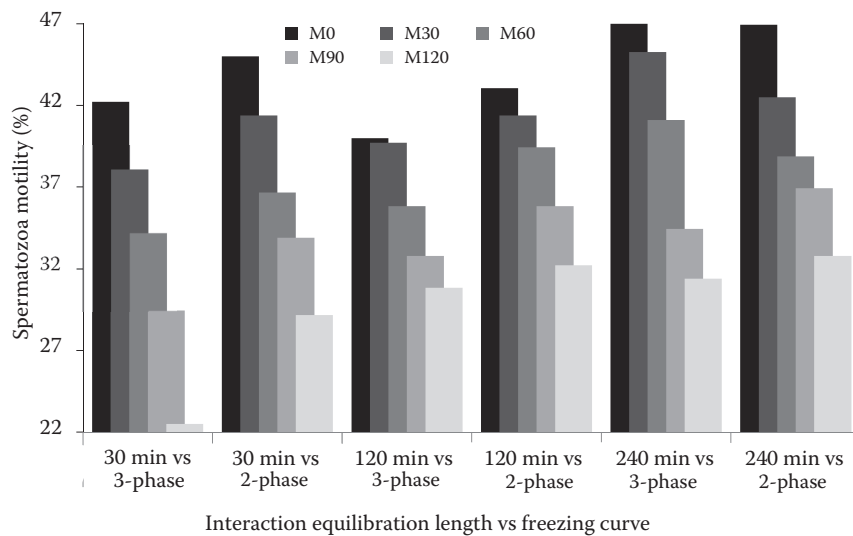


Figure 5. Effect of equilibration length and freezing curve interaction on the percentage rate of progressive motile spermatozoa above head in individual phases of thermodynamic test
M0, M30, M60, M90, M120 = percentage rate of progressive motile spermatozoa above head evaluated immediately after thawing, at 30, 60, 90, and 120 min of thermodynamic test, respectively

vs 3-phase curve. These facts are supported by average spermatozoa motility presented in Table 3. Applying the 2-phase curve ensured higher motility irrespective of equilibration length, compared to standard combination of 120 min equilibration and 3-phase curve. However, the highest average spermatozoa motility (40.06%) was determined within the interaction of 240 min equilibration vs 3-phase curve compared to 30 min (−6.78%) and 120 min (−4.23%) equilibration. Similar motility results were detected within the 2-phase curve. No trend was described in decrease of spermatozoa motility during the TDT. On the other hand, average proportion of live spermatozoa through the entire TDT was significantly ($P < 0.05$) the highest under 120 min equilibration vs 2-phase curve, especially compared to the lowest values of 30 min vs 3-phase and 240 min vs 3-phase interactions. A similar trend in the decrease of live spermatozoa proportion was not statistically significant.

DISCUSSION

The present study showed significant interactions between equilibration times and freezing curves affecting sperm motility and live spermatozoa proportions. Simultaneously inter-sire individuality was confirmed. Evaluation of semen quality is based on several parameters related to concentration, morphology, and motility (Defoin et al. 2008).

Initial parameters of observed fresh semen agreed with those of Ball and Peters (2004).

Sperm quality is influenced by many factors, e.g. the internal factors like breed, variation between individuals, and age of sire (Beran et al. 2011). The values of spermatozoa motility during TDT declined; this finding is in accordance with the results of previous studies (Defoin et al. 2008; Beran et al. 2011). The results reported by Stadnik et al. (2002) and Beran et al. (2013a) indicated individual differences in resistance of sperm to freezing as well as to environmental conditions after thawing, theoretically including the conditions in cow vagina and uterus after insemination. From this point of view, results of TDT should be very interesting and important. Also according to Dolezalova et al. (2015), sperm frost resistance largely differs among bulls. Differences in average proportion of live spermatozoa as well as in its decrease during the TDT confirm the effect of sire individuality on final fertilization capability of sperm and correspond to Thurston et al. (2002) finding spermatozoa resistance towards cryopreservation can correlate also with genetic factors explaining inter-species, breed, as well as individual differences. The results of Beran et al. (2011) documented these relationships according to significant decline of spermatozoa motility after thawing. Evaluating interbreed differences, spermatozoa motility after collection and dilution was higher in Holstein bulls but spermatozoa motility after freezing/thawing was higher in Czech Fleckvieh bulls.

Our findings are in agreement with Shahverdi et al. (2014) who stated the length of contact between sperm and cryoprotectant is essential for

maintaining motility and integrity of sperm membranes and directly affects its post-thawed characteristics. With respect to average spermatozoa motility, Leite et al. (2010) determined 240 min as the most appropriate length of equilibration period in comparison to non-equilibration and 120 min equilibration, in accord with our study. The non-equilibration gave the lowest values of total and progressive sperm motility, and higher percentage proportion of sperm with intact plasma and acrosomal membranes, with no significant differences between different extenders used. In a similar study focusing on the cryopreservation of bull semen, Dhama et al. (1992) reported that 2 h of equilibration at 5°C compared with 0 h improved the post-thaw recovery, incubation survival, and fertility rates of buffalo frozen semen. Herold et al. (2006) found that 120–540 min equilibration was suitable for spermatozoa freezing, however that specific length did not affect straw characteristics after thawing. We can agree with this statement in accordance with spermatozoa motility at the end of TDT in straws equilibrated for 120 and 240 min. Equilibration length exceeding 2 h resulted in the greatest preservation of total and progressive motility, as well as the integrity of plasma and acrosomal membranes during cryopreservation. The use of 4 h equilibration period can be safe with soybean lecithin extender for cryopreservation of buffalo spermatozoa (Shahverdi et al. 2014). Shahverdi et al. (2014) tested equilibration period of 2, 4, 8, and 16 h and two extenders (tris or Bioxcell) on cryopreservation of buffalo semen. The post-thaw sperm motility and the percentage of progressive motile spermatozoa after 2 h equilibration in both extenders were lower than for the other equilibration times. On the other hand, post-thaw sperm motility for equilibration times of 4, 8, and 16 h did not show significant differences ($P < 0.05$) in either extender (Shahverdi et al. 2014). Contrary to these results, in the cryopreservation of bull semen some studies have detected higher conception rates for semen frozen following 12–18 h of equilibration compared with 4–6 h (Foote and Kaproth 2002). Although equilibration time significantly affected total and progressive motility in the present study, there was no significant effect on more detailed characteristics of sperm movement (Shahverdi et al. 2014). According to Leite et al. (2010), optimum equilibration time for semen storage in straws ranged from 2 to 10 h and was dependent on cooling

time, and slowly cooled semen seemed to require less equilibration for optimal final motility. Equilibration for 4 h resulted in the greatest preservation of total and progressive motility, as well as the integrity of plasma and acrosomal membranes during cryopreservation.

Freezing of AI doses, storage for long period, and thawing is a demanding process for sperm membranes and sperm viability (Frydrychova et al. 2010). The freezing and thawing process can adversely affect the nucleus, plasma, acrosome and mitochondrial membranes of spermatozoa and is associated with production of reactive oxygen species which can generally lead to increased permeability of membranes, release of soluble inter-membrane mitochondrial regulator proteins and apoptotic factors that might activate apoptogenic metabolic pathways (Mohan et al. 2014). Recent studies suggest that the sensitivity of sperm to cryopreservation might be partly related to genetic factors, which could explain variations between species, breeds and individuals (Thurston et al. 2002). Indeed, one obvious characteristic of cryopreserved spermatozoa is the decline in motility (Watson 2000). Alterations in sperm motility and structure occur simultaneously in different stages of freezing and thawing. It has been reported that fast cooling induces lethal stress in some cells in the semen, and this stress is proportional to freezing curve and rate of temperature decline (Forero-Gonzalez et al. 2012). Our finding corresponds to that of Leite et al. (2010) who stated longer equilibration is absolutely necessary for maintaining spermatozoa motility during freezing. According to Watson (2000), the medium freezing rate presented in our observation by the 2-phase curve, supports optimal spermatozoa dehydration by the selected cryoprotective substance and minimizes negative effect on spermatozoa frozen, especially on ice crystal formation. Also Dolezalova et al. (2015) in previous study confirmed these results. However, Chen et al. (1993) obtained a successful protocol for freezing bull semen commercially cooling sperm by the rate of 15°C/min from +5 to –100°C, followed by transfer to liquid nitrogen. In general, semen cryopreservation protocols use freezing curves ranging from 10 to 100°C/min, resulting in good survival rates after thawing. Moreover, the freezing rate depends on the method of processing as well as of storage (Lemma 2011). The rate of temperature drop was found

doi: 10.17221/23/2016-CJAS

to be most critical over the specific temperature range of 0–5°C when motility was evaluated later. In general, the faster the rate of cooling, the more severe the damage. There is further evidence which suggests that the rate of temperature drop also determines the subsequent active life of the spermatozoa (Andrabi 2007). The type of extender used and the speed of temperature drop are known to affect susceptibility of spermatozoa to cold shock and the success rate of freezing semen (Shahverdi et al. 2014). Interaction of equilibration length and freezing curve documented positive effect of prolonged equilibration combined with less demanding slower temperature decline of the 2-phase curve. Mentioned results have to be taken into account within the adjustment of AI doses manufacturing.

CONCLUSION

Effects of the equilibration length and freezing curve type on motility and live spermatozoa proportion in bull sperm after thawing were observed and evaluated. Significant inter-sire differences in observed spermatozoa characteristics were confirmed. The longer the equilibration, the higher was the spermatozoa motility during the entire thermodynamic test. The 2-phase freezing curve ensured higher spermatozoa motility and higher proportion of live spermatozoa compared to the standard 3-phase curve. Within interactions of equilibration length vs freezing curve analyzed, similar trends were detected. The significant effect of the selected interactions documents the importance of appropriate length of equilibration and freezing curve for the proportion of live spermatozoa and its motility after thawing. Results emphasize the necessity to detect and subsequently apply the optimum combination of equilibration length and freezing curve for each individual sire in order to optimize efficiency of its ejaculate processing as well as insemination doses manufacturing.

REFERENCES

- Amann R.P., Katz D.F. (2004): Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology*, 25, 317–325.
- Andrabi S.M.H. (2007): Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9, 367–369.
- Ball P.J.H., Peters A.R. (2004): *Reproduction in Cattle*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Beran J., Stadnik L., Duchacek J., Tousova R., Louda F., Stolc L. (2011): Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59, 37–44.
- Beran J., Stadnik L., Bezdicek J., Louda F., Citek J., Duchacek J. (2012): Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archiv Tierzucht*, 55, 207–218.
- Beran J., Stadnik L., Duchacek J., Okrouhla M., Dolezalova M., Kadlecova V., Ptacek M. (2013a): Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 142, 28–34.
- Beran J., Simonik O., Stadnik L., Rajmon R., Duchacek J., Krejcarkova A., Dolezalova M., Sichter J. (2013b): Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 61, 1575–1581.
- Camara D.R., Silva S.V., Almeida F.C., Nunes J.F., Guerra M.M.P. (2011): Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76, 342–350.
- Chen Y., Foote R.H., Brockett C.C. (1993): Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30, 423–431.
- Clulow J.R., Mansfield L.J., Morris L.H.A., Evans G., Maxwell W.M.C. (2008): A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 108, 298–308.
- Defoin L., Granados A., Donnay I. (2008): Analysing motility parameters on fresh bull semen could help to predict resistance to freezing: a preliminary study. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 606–611.
- Dhami A.J., Sahni K.L., Mohan G. (1992): Effect of various cooling rates (from 30 degrees to 5 degrees C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. *Theriogenology*, 38, 565–574.
- Dolezalova M., Stadnik L., Biniova Z., Duchacek J., Beran J. (2015): The effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*, 84, 383–391.
- Dzyuba V., Cosson J., Dzyuba B., Rodina M. (2015): Oxidative stress and motility in tench *Tinca tinca* spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 250–255.
- Foote R.H., Kaproth M.T. (2002): Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *Journal of Dairy Science*, 85, 453–456.

- Forero-Gonzalez R.A., Celeghini E.C.C., Raphael C.F., Andrade A.F.C., Bressan F.F., Arruda R.P. (2012): Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44, 154–159.
- Frydrychova S., Cerovsky J., Lustykova A., Rozkot M. (2010): Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*, 55, 160–166.
- Gao D., Mazur P., Critser J.K. (1997): Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow A.M., Critser J.K. (eds): *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. Academic Press, San Diego, USA, 263–328.
- Gil J., Januskauskas A., Haard M., Johannisson A., Soderquist L., Rodriguez-Martinez H. (2000): Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Bio-ciphos-Plus[®] and Triladyl[®]. *Reproduction in Domestic Animals*, 35, 69–77.
- Herold F.C., de Haas K., Colenbrander B., Gerber D. (2006): Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl[™] or AndroMed[®]. *Theriogenology*, 66, 1123–1130.
- Januskauskas A., Gil J., Soderquist L., Haard M.G.M., Haard M.C., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. (1999): Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52, 641–658.
- Kristan J., Hatfaj A., Alavi S.M.H., Policar T. (2014): Sperm morphology, ultrastructure, and motility in pikeperch *Sander lucioperca* (Percidae, Teleostei) associated with various activation media. *Czech Journal of Animal Science*, 59, 1–10.
- Leite T.G., de Vale Filho V.R., de Arrudab R.P., de Andradeb A.F.C., Emericka L.L., Zaffalonb F.G., Martinsa J.A.M., Andrade V.J. (2010): Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120, 31–38.
- Lemma A. (2011): Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: Manafi M. (ed.): *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech, Rijeka, Croatia, 191–216.
- Linhartova Z., Rodina M., Guralp H., Gazo I., Saito T., Psenicka M. (2014): Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). *Czech Journal of Animal Science*, 59, 381–390.
- Meamar M., Shahneh A.Z., Zamiri M.J., Zeinoaldini S., Kohram H., Hashemi M.R., Asghari S. (2016): Preservation effects of melatonin on the quality and fertility of native Fars rooster semen during liquid storage. *Czech Journal of Animal Science*, 61, 42–48.
- Mohan R., Atreja S.K. (2014): Soya milk tris-based phyto-extender reduces apoptosis in cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 797–805.
- Muchlisin Z.A., Nadiyah W.N., Nadiya N., Fadli N., Hendri A., Khalil M., Siti-Azizah (2015): Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*, Burchell 1822 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 10–15.
- Muino R., Fernandez M., Pena A.I. (2007): Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 305–311.
- Rubio-Guillen J., Gonzalez D., Garde J.J., Estes M.C., Fernandez-Santos M.R., Rodriguez-Gil J.E., Madrid-Bury N., Quintero-Moreno A. (2007): Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 354–357.
- Shahverdi A., Rastegarnia A., Topraggaleh T.R. (2014): Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal*, 16, 279–288.
- Simonik O., Sichtar J., Krejcarkova A., Rajmon R., Stadnik L., Beran J., Dolezalova M., Biniova Z. (2015): Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 85, 3–11.
- Spalekova E., Makarevich A., Stadnik L., Kubovicova E. (2014): Motility and viability of bull sperm in relation to incidence of malformed sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 95–96.
- Stadnik L., Louda F., Jezkova A. (2002): The effect of selected factors at insemination on reproduction of Holstein cows. *Czech Journal of Animal Science*, 47, 169–175.
- Stadnik L., Duchacek J., Beran J., Tousova R., Ptacek M. (2015a): Relationships between milk fatty acids composition in early lactation and subsequent reproductive performance in Czech Fleckvieh cows. *Animal Reproduction Science*, 155, 75–79.
- Stadnik L., Rajmon R., Beran J., Simonik O., Dolezalova M., Sichtar J., Stupka R., Folkova P. (2015b): Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno*, 84, 125–131.
- Thurston L.M., Watson P.F., Holt W.V. (2002): Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters*, 23, 255–262.

doi: 10.17221/23/2016-CJAS

Tuncer P.B., Sariozkan S., Bucak M.N., Ulutas P.A., Akalin P.P., Buyukleblebici S., Canturk F. (2011): Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*, 75, 1459–1465.

Watson P.F. (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492.

Zhang X.G., Hong J.Y., Yan G.J., Wang Y.F., Li Q.W., Hu J.H. (2015): Association of heat shock protein 70 with motility of frozen-thawed sperm in bulls. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 256–262.

Received: 2016–03–18

Accepted after corrections: 2016–07–28

Corresponding Author

doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D., Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Animal Husbandry, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6-Suchdol, Czech Republic
Phone: +420 224 383 057, e-mail: stadnik@af.czu.cz

The effect of the freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing

Martina Doležalová, Luděk Stádník, Zuzana Biniová, Jaromír Ducháček, Jan Beran

Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Animal Husbandry, Czech Republic

Received February 24, 2015

Accepted June 24, 2015

Abstract

The objective of this work was to determine the effect of selected freezing curves on spermatozoa survivability after thawing, defined by its motility. The ejaculates of nine selected sires of the same age, breed, and frequency of collecting, bred under the same breeding conditions including handling, stabling, feeding system and feeding ratio composition, were repeatedly collected and evaluated. Sperm samples of each sire were diluted using only one extender and divided into four parts. Selected four freezing curves – the standard, commercially recommended three-phase curve; a two-phase curve; a slow three-phase curve; and a fast three-phase curve, differing in the course of temperature vs time, were applied. The percentage rate of progressive motile spermatozoa above head was determined immediately after thawing, and after 30, 60, 90, and 120 min of the thermodynamic test (TDT). Moreover, average spermatozoa motility (AMOT) and spermatozoa motility decrease (MODE) throughout the entire TDT were evaluated. Insemination doses frozen using the simpler two-phase curve demonstrated the highest motility values (+2.97% to +10.37%; $P < 0.05$ – 0.01) immediately after thawing and during the entire TDT. Concurrently, the highest AMOT (+4.37% to +8.82%; $P < 0.01$) was determined. The highest spermatozoa motility values were detected after thawing doses frozen by the two-phase freezing curve in eight out of nine sires. Simultaneously, a significant effect of sire individuality was clearly confirmed. Inter-sire differences of spermatozoa motility during TDT as well as AMOT and MODE were significant ($P < 0.01$). The findings describing both factors of interaction indicate the necessity of individual cryopreservation of the ejaculate to increase its fertilization capability after thawing.

Reproduction, sire, ejaculate, cryopreservation, sperm survival, frost resistance

Evaluation of bull sperm quality during the entire course of processing as well as its subsequent fertilization ability are based on basic indicators such as spermatozoa concentration, morphology, and motility (Rodriguez-Martinez 2003), integrity of plasma membrane, acrosome, DNA, and traits of spermatozoa metabolism (Foote 2002). Spermatozoa are significantly affected by interactions of extracellular and intracellular fluid, sugars, proteins, salts of individual microelements and other substances whose concentration increases simultaneously with the osmotic pressure following ice crystal formation (Watson 2000). Cryopreservation is also associated with oxidative stress and increased formation of reactive oxidants reducing the fertilization ability of frozen spermatozoa (Wang et al. 1997; Piantadosi 2008). Cold shock caused by the action of low temperatures on the spermatozoa during the freezing process may damage mitochondria (Pena et al. 2009), plasma as well as the acrosomal membrane of spermatozoa (Meyers 2005), inducing changes in the lipid composition or in the integrity and permeability of plasma and membranes (Januskauskas et al. 2003). Furthermore, cold shock induces spermatozoa capacitation or acrosome reaction (Januskauskas et al. 2005) and influences the stability of spermatozoa chromatin structure (Gravance et al. 1998). These effects decrease fertilization capability up to 50% of spermatozoa during cryopreservation (Celeghini et al. 2008) and reduce subsequent spermatozoa viability and the ability to fertilize an egg (Defoin et al. 2008). The success of spermatozoa cryopreservation

Address for correspondence:

Assoc. Prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Department of Animal Husbandry
Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources
Czech University of Life Sciences Prague
Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 – Suchbát, Czech Republic

E-mail: stadnik@af.czu.cz
Phone: +420 224 383 057
<http://actavet.vfu.cz/>

depends on many factors, including individuality (Härtlová et al. 2013), the interaction between cryoprotectants and the extender type (Špaleková et al. 2014; Stádník et al. 2015), the length of cooling and equilibration period (Andrabi 2007), and the speed of freezing or thawing (Clulow et al. 2008).

The freezing process causes the release of latent heat from the semen changing the course of temperature, leading to ice crystal formation and therefore, prolonging its duration (Bwanga et al. 1991). Kumar (2003) stated the range from $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ as the critical temperatures determining whether spermatozoa will remain in equilibrium with the extracellular plasma or will be gradually cooled, followed by a higher risk of intracellular ice crystal formation consequently threatening the survival of cells (Saragusty et al. 2007). Reducing the temperature is associated with a lower proportion of unfrozen fractions as well as an increase of osmotic pressure. This fact indicates that the freezing speed should be maximized as much as possible. However, fast freezing causes intracellular ice crystal formation. Therefore, freezing has to be slow enough for sufficient spermatozoa dehydration (Watson 2000).

Semen can be frozen by conventional methods without checking the ice crystal formation (Saragusty et al. 2007). On the other hand, freezing with a direct and precise control of temperature in the freezer box and with a precise control of the ice crystal formation can provide higher quality of frozen-thawed sperm (Stradaioli et al. 2007).

Based on the above mentioned statements, we can presume a dissimilar course of the freezing curve will significantly and differently affect the sperm characteristics after the thawing of insemination doses. Therefore, the objective of this work was to determine the effect of selected freezing curves on spermatozoa survivability after thawing defined by its motility.

Material and Methods

Semen collection

The ejaculates of nine selected sires bred in a private sire insemination centre and ordinarily used for commercial purposes were repeatedly collected during the period from April 2013 to February 2014. Bulls

Table 1. Mean values of fresh ejaculate variables per sire.

Sire	VOL	DEN	MOT
1	16.1	0.9	70
2	10.9	1.3	70
3	1.9	1.0	80
4	4.7	1.2	70
5	16.3	1.1	70
6	3.6	0.8	70
7	18.2	0.8	70
8	2.3	0.9	80
9	15.7	1.0	70

VOL - volume of fresh semen in g; DEN - density of spermatozoa $\times 10^6\text{ mm}^{-3}$; MOT - percentage rate of progressive motile spermatozoa above head

were of the same age, breed (Czech Fleckvieh), and frequency of collecting, bred under the same breeding conditions including handling, stabling, feeding system, and feeding ratio composition. Samples of ejaculates were obtained using an artificial vagina and immediately evaluated in the centre lab according to the methodology applied. The volume of fresh semen (VOL, g), density of spermatozoa (DEN, $\times 10^6\text{ mm}^{-3}$), and the percentage rate of progressive motile spermatozoa above head (MOT, %) were evaluated by only one trained technician. Only ejaculates corresponding to the initial required values (minimum DEN $0.7 \times 10^6\text{ mm}^{-3}$ and MOT 70%) were subsequently processed. The observed average quality of fresh semen per sire is stated in Table 1. The average volume of fresh semen collected represented 9.97 g. The mean spermatozoa density of fresh ejaculate was $1.00 \times 10^6\text{ mm}^{-3}$. The mean percentage rate of progressive motile spermatozoa above head in fresh ejaculate achieved 72.22%.

Semen dilution and processing

Samples of fresh semen were ordinarily immediately diluted with the phospholipid extender Andromed® (Minitübe GmbH, Tiefenbach, Germany) to a spermatozoa concentration of 10×10^6 per one insemination dose. The required amount of extender was applied using sterile pipettes directly to the tubes with samples. Subsequently, the diluted semen was filled to 0.25 ml straws (IMV, L'Aigle, France) and equilibrated at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Diluted semen of each sire was divided into four parts frozen differently according to one of the 4 selected freezing curves. Freezing was performed using computer controlled freezing methodology Direct Freezing in

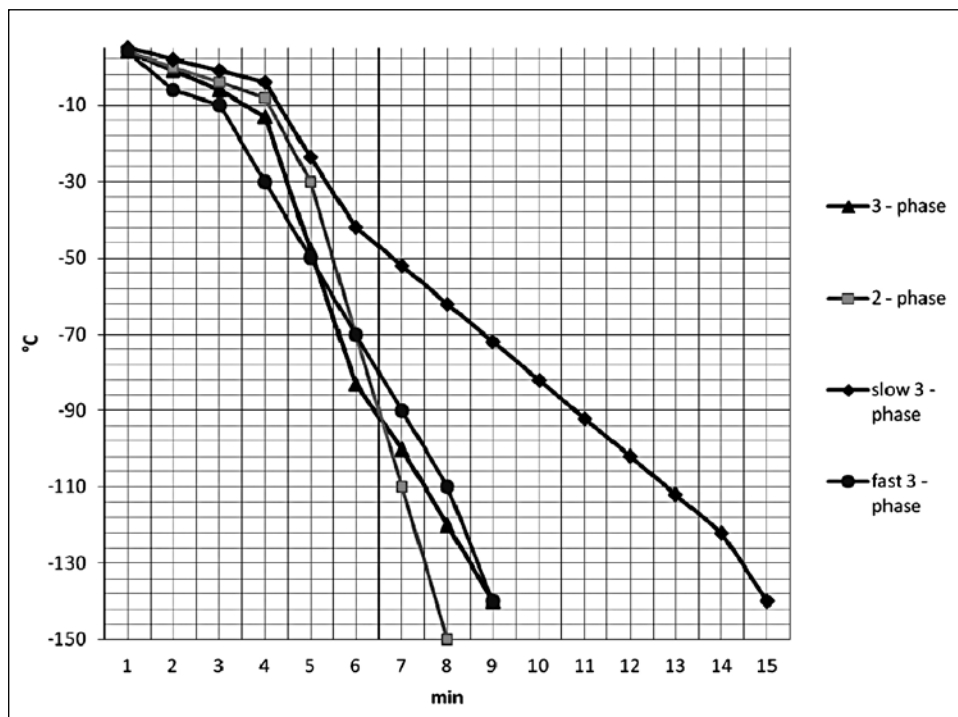


Fig. 1. Course of the freezing curves applied

the freezer box DigitCool (Digitcool®; IMV CryoBio-System, L'Aigle, France). In total, 15 insemination doses were analysed per sire and curve. Figure 1 describes the course of four selected freezing curves. As the first, the standard commercially recommended three-phase curve designed for the freezing of bull semen (Muñoz et al. 2007) was applied. The second was the two-phase freezing curve according to the methodology described by Januskauskas et al. (1999) and Gil et al. (2000). Furthermore, a slower (Stradioli et al. 2007) as well as a faster freezing curve (Saragusty et al. 2007) based on the three-phase freezing curve were selected and used for freezing of doses. Thereafter, doses were handled into a liquid nitrogen container and stored at -196°C .

Evaluation of spermatozoa motility

The straws were thawed in a water bath at $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 30 s (Rubio-Guillén et al. 2007). The percentage rate of progressive motile spermatozoa above head was determined immediately after thawing (T_0), while the ejaculate was heated at $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ all the time. Spermatozoa motility was evaluated subjectively using phase contrast microscopy (LP 3000, Arsenal®, Prague, Czech Republic) at $200\text{--}300\times$ magnification when at least three fields of view per each straw were evaluated (Tuncer et al. 2011). Subsequently, thermodynamic test (TDT) of spermatozoa survivability was performed (Beran et al. 2012b). Thus, spermatozoa motility values (T_{30} , T_{60} , T_{90} , and T_{120}) using the same above mentioned methodology, were determined 30, 60, 90, and 120 min of the test duration in a dry heater (Thermo-block, FALC®, Treviglio, Italy) at a temperature of $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Statistical analysis

Statistical evaluation was performed using SAS® 9.3 (SAS/STAT 2011) UNIVARIATE, and GLM procedures. Based on Akaike information criterion the values of average spermatozoa motility (AMOT – average of T_0 , T_{30} , T_{60} , T_{90} , and T_{120} motility values) throughout the entire thermodynamic test (TDT) were corrected for the effect of the following fixed factors: sire, freezing curve, time of thermodynamic test, and interaction between sire and freezing curve. Simultaneously, spermatozoa motility decrease (MODE – T_{120} minus T_0 motility values) as well as spermatozoa motility at individual phases of TDT (T_0 , T_{30} , T_{60} , T_{90} , and T_{120}) was evaluated by the same model without the effect of TDT duration. Comparison of details was performed by Tukey-Kramer test. The model equation for average spermatozoa motility was as follows:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + e_{ijkl}$$

where:

Y_{ijkl} = dependent variable (spermatozoa motility at the beginning and after 30, 60, 90, and 120 min of the TDT; average spermatozoa motility and decrease of spermatozoa motility through the entire thermodynamic test);

μ = mean value of dependent variable;

A_i = fixed effect of i^{th} freezing curve ($j = 1, n = 135; j = 2, n = 135; j = 3, n = 135; j = 4, n = 135$);

B_j = fixed effect of j^{th} sire ($i = 1, n = 60; i = 2, n = 60; i = 3, n = 60; i = 4, n = 60; i = 5, n = 60; i = 6, n = 60; i = 7, n = 60; i = 8, n = 60; i = 9, n = 60$);

C_k = fixed effect of k^{th} time of thermodynamic test ($k = 0 \text{ min}, n = 108; k = 30 \text{ min}, n = 108; k = 60 \text{ min}, n = 108; k = 90 \text{ min}, n = 108; k = 120 \text{ min}, n = 108$) in case of average spermatozoa motility evaluation;

$(AB)_{ij}$ = interaction between fixed effect of sire and freezing curve ($ij = \text{always } 36 \text{ groups}, n = \text{always } 15$);

e_{ijkl} = random error.

Significance levels $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ were used to evaluate the differences among groups.

Results

The model repeatability ranged from $r^2 = 0.555$ to 0.740 during the evaluation of observed traits when the significance of all models used was $P < 0.001$ in all evaluations. The effect of freezing curve was significant ($P < 0.05\text{--}0.001$) with respect to spermatozoa motility in individual phases of TDT, significant ($P < 0.001$) in relation to the average spermatozoa motility throughout the entire TDT, and non-significant ($P > 0.05$) within evaluation of the spermatozoa motility decrease. The effect of sire was significant ($P < 0.001$) in relation

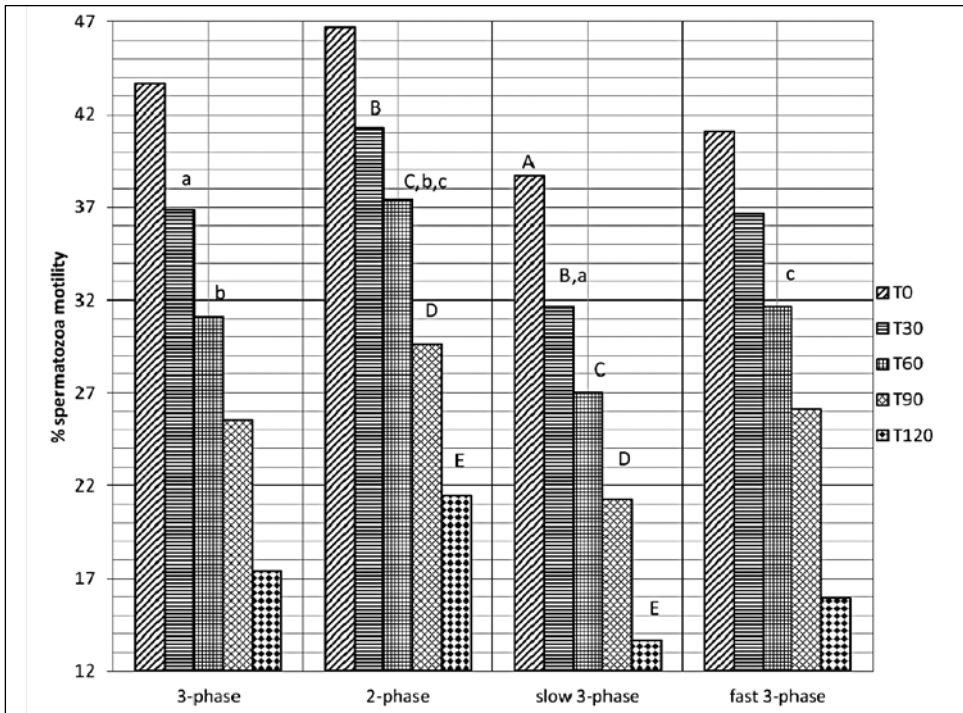


Fig. 2. Effect of the freezing curve on spermatozoa motility in individual phases of the thermodynamic test T0, T30, T60, T90, T120 – percentage spermatozoa motility evaluated immediately after thawing, and after 30, 60, 90, and 120 min of the thermodynamic test; the same upper-script letters confirm the significance of difference A, B, C, D, E ($P < 0.01$); a, b, c ($P < 0.05$)

Table 2. Effect of the freezing curve on average spermatozoa motility and its decrease throughout the entire thermodynamic test.

Freezing curve	AMOT	MODE
	LSM ± SE	LSM ± SE
1 st (3-phase)	30.93 ± 0.643 ^A	15.97 ± 0.757
2 nd (2-phase)	35.30 ± 0.643 ^{A,B}	14.21 ± 0.757
3 rd (slow 3-phase)	26.48 ± 0.643 ^{A,B,C}	15.28 ± 0.757
4 th (fast 3-phase)	30.30 ± 0.643 ^{B,C}	13.52 ± 0.757

AMOT – average spermatozoa motility; MODE – spermatozoa motility decrease; the same upper-script letters confirm the significance of difference A, B, C ($P < 0.01$); SE – ?

($P < 0.05$) were determined compared to the third, i.e. slower three-phase freezing curve representing the lowest spermatozoa motility during all phases of TDT. Comparing the first and fourth freezing curves, a similar trend was detected, although without significant differences.

Table 2 documents the second, i.e. two-phase freezing curve as the most appropriate when average spermatozoa motility throughout the entire TDT (AMOT) achieved 35.30%, and the differences in comparison with other curves were significant ($P < 0.05$). The motility decline detected throughout the entire TDT (MODE) was similar (13.52–15.97%) with non-significant differences among all 4 curves analysed.

Although the fresh ejaculate of all observed sires achieved spermatozoa motility higher than 70%, the courses of the TDT after thawing differed, as documented in Fig. 3. Sires

to all the evaluated traits. The effect of the thermodynamic test time as well as sire and freezing curve interaction was significant ($P < 0.001$) in all evaluations.

Figure 2 shows TDT prolonging declined spermatozoa motility in individual phases of the test regardless of the curve type. However, the highest values of spermatozoa motility in all phases of TDT were detected using the two-phase freezing curve. The most frequent and significant differences

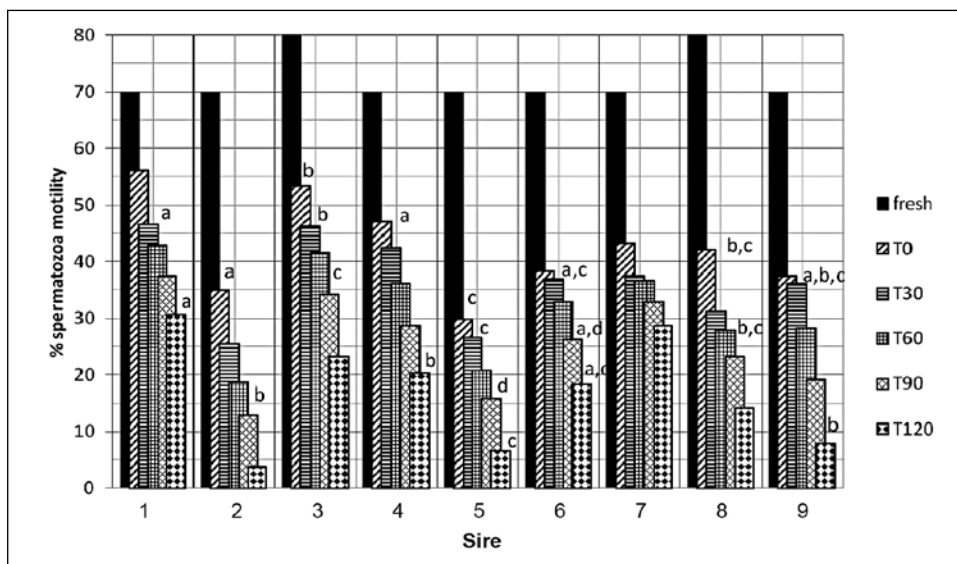


Fig. 3. Effect of sire individuality on spermatozoa motility in individual phases of the thermodynamic test fresh, T0, T30, T60, T90, T120 – percentage spermatozoa motility evaluated immediately after collecting and thawing respectively, and after 30, 60, 90, and 120 min of the thermodynamic test; the same upper-script letters confirm the significance of difference a, b, c, d ($P < 0.05$)

Table 3. Effect of sire individuality on average spermatozoa motility and its decrease throughout the entire thermodynamic test.

Sire	AMOT	MODE
	LSM ± SE	LSM ± SE
I	42.83 ± 0.965 ^A	16.77 ± 1.136 ^A
II	19.17 ± 0.965 ^{A,B}	19.79 ± 1.136 ^{B,a}
III	39.75 ± 0.965 ^{B,C,a}	16.98 ± 1.136 ^C
IV	35.00 ± 0.965 ^{A,B,D,a,b}	15.10 ± 1.136 ^c
V	20.00 ± 0.965 ^{A,C,D,E}	12.50 ± 1.136 ^{B,d}
VI	30.58 ± 0.965 ^{A,B,C,D,E,F,b,c}	9.69 ± 1.136 ^{A,B,C,D,a,c}
VII	35.83 ± 0.965 ^{A,B,E,F,G}	9.38 ± 1.136 ^{A,B,C,E,c,e}
VIII	27.75 ± 0.965 ^{A,B,C,D,E,G}	17.92 ± 1.136 ^{D,E,d}
IX	25.83 ± 0.965 ^{A,B,C,D,E,G,c}	14.58 ± 1.136 ^{a,e}

Key: AMOT – average spermatozoa motility; MODE – spermatozoa motility decrease; the same upper-script letters confirm the significance of difference A, B, C ($P < 0.01$); SE – ?

with higher spermatozoa motility of fresh semen did not achieve higher motility during phases of TDT concurrently.

Table 3 shows that the highest AMOT (42.83%; fresh semen motility 70%) was found in Sire 1, whereas the lowest one in Sire 2 (19.17%, fresh semen motility 70%). This difference as well as other differences between the evaluated sires were in most cases significant ($P < 0.05$). Simultaneously, Sire 2 presented significantly ($P < 0.05$ –0.01) the highest value of MODE. On the other hand, the lowest MODE was detected in Sire 7 ($P < 0.05$ –0.01).

Figure 4 documents that the highest spermatozoa motility values were detected after thawing doses frozen by the second, i.e. two-phase freezing curve in eight out of nine sires evaluated. Inter-sire differences of spermatozoa motility were significant ($P < 0.01$). However, Sire 6 presented the highest spermatozoa motility values of doses frozen by the first, standard freezing curve regularly applied in the sire insemination centre. Overall, the two-phase freezing curve was the most suitable for most sires.

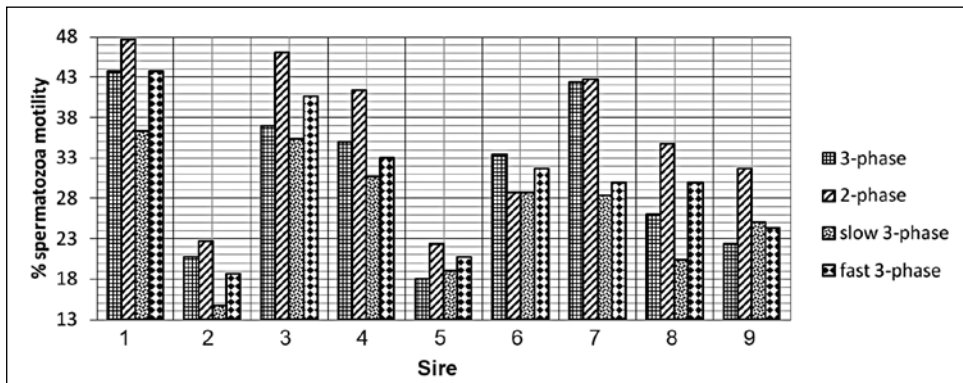


Fig. 4. Effect of sire individuality vs freezing curve interaction on average spermatozoa motility throughout the entire thermodynamic test.

The vast majority of differences was significant at $P < 0.05$ –0.01

Discussion

Based on the overall findings (Table 2, Figs 2 and 4) the second, i.e. two-phase curve was the most appropriate using the extender AndroMed® in relation to subsequent spermatozoa motility after thawing. Figure 1 documents the two-phase curve's intermediate course of temperature vs time compared to different types of three-

phase curves. According to Watson (2000), a medium freezing rate supports optimal spermatozoa dehydration by the selected cryoprotective substance and minimizes the negative effect on frozen spermatozoa, especially on ice crystal formation. Our results also generally correspond (Figs 2 and 3) with the conclusion by Januskauskas et al. (2005) that freezing affects all spermatozoa motility indices and negatively influences the percent proportion of motile spermatozoa in total as well as progressive motile spermatozoa above head.

According to Defoin et al. (2008) it is possible to predict spermatozoa frost resistance already before freezing based on motility indices of fresh ejaculate directly during its processing. This fact was confirmed as Fig. 2 describes evaluating different freezing curves in individual phases of TDT. The highest spermatozoa motility at the beginning of TDT represented the highest spermatozoa motility during the entire TDT. Simultaneously, the spermatozoa motility level at the beginning comparatively determines the motility level in individual phases of TDT. The mentioned option allows to process only ejaculates with the required progressive motile spermatozoa above head after thawing and to dispose the substandard ones. This fact significantly improves the efficiency of insemination dose processing and production.

With regard to Table 3 and the report by Amann and Katz (2004), spermatozoa frost resistance differs significantly between sires and even between individual ejaculates of one sire. Also Defoin et al. (2008) determined different effects of freezing on subsequent spermatozoa motility after thawing in relation to individual ejaculates. Our results confirm the mentioned findings and validate the necessity of individual processing technology proposed for each specific sire.

Figure 3 documents that individual motility in TDT phases significantly differed despite the same values of spermatozoa motility in the fresh ejaculate. This fact confirms individual variability and is in agreement with results of Beran et al. (2012a). However, these findings partially contradict the results of the above mentioned Defoin et al. (2008) who stated significant correlations between spermatozoa motility before and after freezing, when ejaculates with high motility maintained high values after thawing as well. The authors stated that these correlations can be used to determine sperm quality after freezing and thawing. Our results emphasize more individual variables of the ejaculate after collecting and during processing. Furthermore, Thurston et al. (2002) indicated that spermatozoa resistance towards cryopreservation can also correlate with genetic factors explaining inter-species, breed as well as individual differences.

According to Muiño et al. (2008) sire individuality and cryopreservation procedure significantly contribute to the final spermatozoa motility as well. Evaluation of spermatozoa motility immediately after thawing (Fig. 2) as well as average spermatozoa motility throughout the entire TDT (Fig. 4) with the highest values detected in doses frozen using the two-phase curve corresponds with the mentioned statement. Our findings confirm previous results and innovatively demonstrate a significant effect of the interaction between sire individuality and the course of the freezing curve.

The effect of the freezing curve type on sire spermatozoa motility after thawing and during the thermodynamic test was observed and evaluated. The two-phase freezing curve, different from the standard, commercially recommended one, was detected as the most appropriate in relation to spermatozoa motility after thawing. Insemination doses frozen using the two-phase curve demonstrated the highest motility values immediately after thawing and during the entire thermodynamic test as well. Concurrently, a significant effect of sire individuality was conclusively confirmed. The findings describing both factors of interaction indicate the necessity of individual cryopreservation of each ejaculate with the potential to increase its fertilization capability after thawing and thus the efficiency of insemination dose production.

Acknowledgments

The work was funded by „S” grant of MŠMT ČR and project NAZV QJ1210109. We thank the company Natural Ltd. for cooperation on this work and Mrs. Lois Russell for her editorial help with this manuscript.

References

- Amann RP, Katz, DF 2004: Reflections on CASA after 25 years. *J Androl* **25**: 317-325
- Andrabi SMH 2007: Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *Int J Agric Biol* **9**: 367-369
- Beran J, Stádník L, Bezdiček J, Louda F, Čitek J, Ducháček J 2012a: Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Arch Tierzucht* **55**: 207-218
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Toušová R, Louda F, Štolc L 2012b: Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Univ Agric et Silvic Mendel Brun* **59**: 37-44
- Bwanga CO, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H 1991: Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Vet Scand* **32**: 455-461
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodriguez PHM 2008: Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci* **104**: 119-131
- Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC 2008: A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **108**: 298-308
- Defoin L, A Granados A, Donnay I 2008: Analysing motility parameters on fresh bull semen could help to predict resistance to freezing: A preliminary study. *Reprod Dom Anim* **43**: 606-611
- Foote RH 2002: The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci* **80**: 1-10
- Gil J, Januskauskas A, Haard M, Johannisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H 2000: Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reprod Dom Anim* **35**: 69-77
- Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ 1998: Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl* **19**: 704-709
- Härtlová H, Rajmon R, Krontorádová I, Mamica J, Zita L, Klabanová P, Čermocký A 2013: Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise. *Acta Vet Brno* **82**: 31-35
- Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Haard MGM, Haard MC, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H 1999: Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* **52**: 641-658
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H 2003: Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* **60**: 743-758
- Januskauskas A, Lukoseviciute K, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H 2005: Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology* **63**: 160-178
- Kumar S, Millar JD, Watson PF 2003: The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* **46**: 246-253
- Meyers SA 2005: Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim Reprod Sci* **89**: 57-64
- Muñoz R, Fernández M, Peña AI 2007: Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Dom Anim* **42**: 305-311
- Muñoz R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI 2008: Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci* **109**: 27-39
- Pena FJ, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C, Gonzalez-Fernandez L, Macias-Garcia B 2009: Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Dom Anim* **44**: 345-349
- Piantadosi CA 2008: Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radical Bio Med* **45**: 562-569
- Rodriguez-Martinez H 2003: Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Dom Anim* **38**: 312-318
- Rubio-Guillén J, González D, Garde JJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Rodríguez-Gil JE, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A 2007: Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Dom Anim* **42**: 354-357
- Saragusty J, Gacitua H, Pettit MT, Araw A 2007: Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reprod Dom Anim* **42**: 610-615
- SAS Institute Inc. 2011: SAS/STAT 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 684 p.
- Stádník L, Rajmon R, Beran J, Šimonik O, Doležalová M, Šichtař J, Stupka R, Folková P 2015: Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Vet Brno* **84**: 125-131
- Stradioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M 2007: Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* **67**: 1249-1255

- Špaleková E, Makarevich AV, Kubovičová E, Ostró A, Chrenek P 2014: Effect of caffeine on functions of cooling-stored ram sperm *in vitro*. *Acta Vet Brno* **83**: 19-25
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV 2002: Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *CryoLetters* **23**: 255-262
- Tuncer PB, Sariözkan S, Bucak MN, Ulutaş PA, Akalin PP, Büyükleblebici S, Canturk F 2011: Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* **75**: 1459-1465
- Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR 1997: Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* **49**: 921-925
- Watson PF 2000: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **60-61**: 481-492

6 ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

Cílem výroby inseminačních dávek (konzervace) je zajistit co nejvyšší oplozovací schopnost spermií, která v průběhu náročného procesu manipulace a samotné výroby klesá až o 50 %. Proto je snaha optimalizovat proces výroby dávek pomocí použití vhodného ředidla, popřípadě vhodné koncentrace přídatku různých komponent (zejména LDL cholesterolu) do komerčně vyráběných ředidel, následně se jedná o optimalizaci procesu chlazení a ekvibrace naředěného ejakulátu a samotnou technologii mrazení v podobě aplikace mrazicích křivek, které musí být co nejšetrnější ke spermiím. V celém procesu je snaha se vyvarovat toxicitě použitých ředidel a jejich přídatků, dále pak zajistit spermiím dostatečnou odolnost vůči chladovému šoku, ke kterému dochází v průběhu poklesu teplot a zajistit harmonický pokles teplot v mrazicím boxu.

Byla zjišťována odolnost spermií vůči chladovému šoku v průběhu krátkodobého chladového testu (0 °C) trvajícího po dobu 10 minut po výrobě vzorků z čerstvého ejakulátu. Podíl živých spermií byl následně zaznamenán po zahřátí vzorku a po 120 minutách trvání tepelného testu přežitelnosti. Vzorky byly vyrobeny ředěním různými komerčně vyráběnými ředidly (AndroMed[®], Bioxcell[®], Trilady1[®]), zároveň byly vyrobeny varianty ředěné těmito ředidly a ke každému z nich byla přidána frakce vaječného žloutku LDL cholesterolu o různých koncentracích 4 – 10 %. Nejvyšší podíl živých spermií byl zaznamenán na začátku testu u ředidel Andromed[®] (71,22 %) a Bioxcell[®] (71,46 %), nejnižší podíl živých spermií byl zaznamenán u ředidla Trilady1[®] (69,46 %). Nejvyšších hodnot podílu živých spermií po 2 hodinové inkubaci bylo dosaženo u ředidla Andromed[®], u kterého byl také současně zaznamenán nejnižší pokles podílu živých spermií v průběhu inkubace (-4,29 % a -9,31 %; $P < 0,01$). Pozitivní vliv LDL na odolnost spermií vůči chladovému šoku se projevil v celkovém průměrném poklesu podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti, kdy byl pokles hodnot nižší při přídatku LDL do ředidel o 2,42 %, rozdíly mezi hodnotami zjištěnými bez a s přídatkem LDL byly statisticky průkazné ($P < 0,05$). Uvedené výsledky byly podrobněji publikovány v práci Stádník et al. (2015).

Na základě předchozí studie, kdy byl vyhodnocen pozitivní vliv přídatku LDL na spermie a jejich zvýšení odolnosti vůči chladovému šoku, bylo nutné však zjistit jaká koncentrace přídatku LDL je nejvhodnější. Byla využita komerčně vyráběná ředidla Andromed[®] a Bioxcell[®] bez a s přídatkem LDL 4%, 6% a 8%, ředidlo Trilady1[®] bylo připraveno bez a s přídatkem LDL 6%, 8% a 10 %. Shodně nejvyšších průměrných hodnot podílu živých spermií na začátku tepelného testu přežitelnosti bylo dosaženo při ředění

ředidly Andromed[®] a Bioxcell[®] (71,65 %; 71,88), rozdíly mezi ředidly nebyly statisticky průkazné ($P < 0,05$). Po uplynutí 120 minutové inkubace byl nejvyšší průměrný podíl živých spermií zaznamenán při ředění ředidlem Andromed[®] (54,25 %), současně také pokles v průběhu celého trvání testu byl nejnižší (-4,24 % a -9,19 %), rozdíly oproti ostatním ředidlům byly statisticky průkazné ($P < 0,01$). Nejvyšší podíl živých spermií na začátku testu byl vyhodnocen u 8% přídatku LDL do ředidla (72,18 %), u tohoto přídatku byl zaznamenán i nejvyšší pokles v průběhu testu (+3,08 % až +0,44 %), avšak nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi uvedenými variantami přídatku LDL. Nejnižších hodnot podílu živých spermií na začátku testu bylo dosaženo ve variantách bez přídatku LDL (69,87 %), současně bylo dosaženo i nejnižšího poklesu podílu živých spermií v průběhu testu (20,12 %). Na základě zjištěných výsledků lze doporučit ředidla Andromed[®] a Bioxcell[®] a přídatok LDL pro jejich pozitivní vliv na rezistenci spermií vůči chladovému šoku. Uvedené výsledky byly podrobněji publikovány v práci Beran et al. (2013).

Opětovně byl testován vliv přídatku LDL do různých typů ředidel na odolnost spermií vůči chladovému šoku. Byla použita ředidla Andromed[®] a Bioxcell[®] bez a s 6% přídatkem LDL, déle pak Triladyl[®] bez a s 10 % přídatkem LDL. Nejnižšího poklesu podílu živých spermií v průběhu krátkodobého chladového testu bylo dosaženo při použití ředidla Triladyl[®] bez přídatku LDL (16,01 %; -5,36 % až -0,22 %), naopak nejvyššího poklesu podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti spermií trvajících 120 minut bylo dosaženo u totožného ředidla s 10 % přídatkem LDL (21,44 %). Nejvyššího průměrného podílu živých spermií bylo na začátku testu dosaženo při ředění ředidlem Bioxcell[®] s 6 % přídatkem LDL a to 69,17 % (+1,31 % až +4,42 %) a po 120 minutové inkubaci 52,94 % (+1,54% až +8,41 %), rozdíly oproti variantě ředění ředidla Bioxcell[®] bez přídatku LDL byly statisticky průkazné ($P < 0,05$). Uvedené výsledky byly podrobněji publikovány v práci Beran et al. (2016).

Byl hodnocen vliv délky ekvilibrace na následnou motilitu a podíl živých spermií. Byly testovány délky ekvilibrace 30, 120 a 240 minut před samotným mrazením. Nejvyšších průměrných hodnot motility v průběhu tepelného testu přežitelnosti bylo dosaženo při nejdéle hodnocené délce ekvilibrace a to 240 minut (39,83 %), naopak nejnižší motilitu vykazovala ekvilibrace trvajících 30 minut (-2,72 % a -4,58 %), zaznamenané rozdíly mezi testovanými délkami ekvilibrace byly statisticky průkazné ($P < 0,05$). Nejvyšší podíl živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti byl zaznamenán při použití délky ekvilibrace 120 minut (+6,87 % a +8,68 %), což je standard při výrobě, avšak rozdíly oproti ostatním testovaným délkám ekvilibrace nebyly statisticky významné. Uvedené výsledky byly podrobněji publikovány v práci Doležalová et al. (2016).

Nejvyšších průměrných hodnot motility v průběhu tepelného testu přežitelnosti trvajících 120 minut po rozmrazení inseminační dávky bylo dosaženo při mrazení na základě 2 – fázové mrazicí křivky a to 35,3 %, rozdíly oproti ostatním typům mrazicích křivek (+4,37 % až 8,82 %) byly statisticky průkazné ($P < 0,01$). Tato 2 - fázová mrazicí křivka zahrnovala pozvolný pokles teploty z +4 °C na -10 °C v první fázi a v další fázi pokles na -150 °C rychlostí 40°C/minutu. Nejnižších výsledků průměrné motility bylo dosaženo u 3 – fázové mrazicí křivky s pomalým poklesem teplot v mrazicím boxu (26,48 %). Dále byla potvrzena rozdílná reakce ejakulátu různých býků na mrazení, současně také citlivost k mrazení u jednoho býka v rámci několika odběrů. Uvedené výsledky byly podrobněji publikovány v práci Doležalová et al. (2015).

Pro další výzkum na základě předchozích výsledků byla vybrána 2 – fázová mrazicí křivka a 3 – fázová mrazicí křivka, standardně využívaná při mrazení ejakulátu býků. Vyšších průměrných hodnot motility a podílu živých spermií ve vzorku bylo souhlasně dosaženo při mrazení dle 2 – fázové mrazicí křivky (38,41 %), rozdíl mezi uvedenými křivkami činil 2,02 % a byl statisticky průkazný ($P < 0,05$). Současně byly testovány interakce mezi délkou ekvilibrace (30, 120 a 240 minut) a dvěma typy mrazicích křivek (2 – fázová a 3 – fázová standardní), kde byla potvrzena nejvyšší průměrná motilita spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti vždy při využití délky ekvilibrace 240 minut (40,06 % a 39,61 %), nejnižších průměrných hodnot motility pak bylo souhlasně dosaženo u obou mrazicích křivek při využití délky ekvilibrace 30 minut (33,28 % a 37,22 %) ($P < 0,05$), zatímco vliv mrazicí křivky nebyl potvrzen. Lze tudíž tvrdit, že výsledná oplozovací schopnost inseminační dávky je ovlivněna jak individualitou býka, tak především manipulací a technologií výroby dávek před samotným mrazením. Uvedené výsledky byly podrobněji publikovány v práci Doležalová et al. (2016).

Přídavek LDL obecně zvyšoval odolnost spermií vůči chladovému šoku, po kterém byl zaznamenán nižší pokles podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti spermií než při ředění ejakulátu ředidly bez přídavku LDL. Ředidla Andromed® a Bioxcell® přispívají k zajištění vyšší životaschopnosti spermií, zejména se jako vhodná ukázala 6% koncentrace LDL v ředidle Bioxcell. Po procesu ředění následoval proces chlazení a ekvilibrace, kde délka ekvilibrace 120 minut a déle znamenala vyšší hodnoty motility spermií a podíl živých spermií po rozmrazení. Na základě porovnání různých typů mrazicích křivek a jejich vlivu na oplozovací schopnost spermií po rozmrazení byl zjištěn pozitivní vliv na následnou motilitu spermií při mrazení dle 2 – fázové mrazicí křivky s pozvolným, přitom dostatečně rychlým, poklesem teplot v mrazicím boxu. Výsledná motilita po rozmrazení byla ovlivněna zejména technologií zpracování ejakulátu před samotným zmrazením. Přesto, že

byla sledována jako druhotný faktor, tak ve všech zmíněných studiích byla také souhlasně potvrzena individualita mezi býky, což poukazuje na potřebu volit individuálně pro každého býka jinou technologii zpracování ejakulátu a výroby inseminačních dávek.

7 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Vědecké publikace s IF:

- Doležalová, M.**, Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Stupka, R. 2016. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. Czech Journal of Animal Science, 61(11): 00 -, doi:10.17221/23/2016-CJAS – accepted.
- Doležalová, M.**, Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. Acta Veterinaria Brno, 84 (4): 383-391. doi: 10.2754/avb201584040383
- Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šimoník, O., **Doležalová, M.**, Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P. 2015. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. Acta Vet. Brno 2015, 84: 125-131, DOI: 10.2754/avb201584020125.
- Ducháček, J., Beran, J., Ptáček, M., Stádník, L., Okrouhlá, M., Toušová, R., **Doležalová, M.** 2015. Relationships of fatty acid group contents in milk and reproductive performance in Holstein cows. Turk J Vet Anim Sci, 39 (3), 357-363. doi:10.3906/vet-1411-43
- Šimoník, O., Šichtař, J., Krejčárková, A., Rajmon, R., Stádník, L., Beran, J., **Doležalová, M.**, Biniová, Z. 2015. Computer Assisted Sperm Analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. Indian Journal of Animal Sciences, 85 (1), 3-11.
- Stádník, L., Makarevich, A.V., **Doležalová, M.**, Kubovičová, E., Beran, J., Hegedušová, Z., Čítek, J., Holásek, R., Stupka, R. 2014. The yield and cell viability of bovine in vivo recovered embryos in relation to season of flushing. Journal of Animal and Feed Sciences, 23, 2014, 309-316.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., **Doležalová, M.**, Kadlecová, V., Ptáček, M. 2013. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows, Animal Reproduction Science, 142, 28-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.005>.

Vědecké recenzované publikace:

- Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Krejčárková, A., Ducháček, J., Šichtař, J. 2016. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. Acta Universitatis Agriculturae et

Silviculturae Mendeliana Brunensis, 64(2): 395–399.
<http://dx.doi.org/10.11118/actaun201664020395>.

- Beran, J., Šimoník, O., Stádník, L., Rajmon, R., Ducháček, J., Krejčárková, A., **Doležalová, M.**, Šichtař, J. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.. LXI (6), 1575-1581.
- Doležalová, M.**, Stádník, L., Nejdlová, M., Němečková, D., Beran, J., Ducháček, J. 2013. The relationship between energy balance after calving and reproductive functions in Holstein dairy cows treated by the OVSYNCH system. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.. LXI (3), 601-610.

Příspěvky z konferencí publikované ve sbornících:

- Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Krejčárková, A., Ducháček, J., Šichtař, J. 2013. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. Book of Abstracts of the 8th International Conference of Journal of Central European Agriculture. 20-22. 11. 2013. Nitra, Slovak Republic. s. 32-32. ISBN: 978-80-552-1102-2.
- Stádník, L., Ducháček, J., Ptáček, M., **Doležalová, M.**, Beran, J. 2015. Effect of climatic condition on basic ejaculate characteristics in Holstein bulls. In Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 19th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) Albena, Bulgaria, 17th – 19th September 2015, Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, Volume 50, Issue Supplement S3, s. 78-78.
- Ducháček, J., Biniová, Z., Stádník, L., Ptáček, M., **Doležalová, M.**, Beran, J. 2015. Effect of breed on basic bulls semen characteristics immediately after collection. In Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 19th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) Albena, Bulgaria, 17th – 19th September 2015, Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, Volume 50, Issue Supplement S3, s. 51-51.
- Bezdíček, J., Stádník, L., Makarevich, A., Kubovičová, E., Louda, F., **Doležalová, M.**, Holásek, R., Hegedušová, Z., Fellnerová, I. 2014. The response to the superovulation in cows with different inbreeding level. The 2nd International Scientific Conference "Animal Biotechnology" in Slovak Journal of Animal Science. 11.12.2014 Nitra,

Slovak Republic, NPPC – Research Institute for Animal Production Nitra, Slovak Republic, s. 205-206 ISSN 1337-9984.

Stádník, L., **Doležalová, M.** 2015. Možnosti optimalizace oplozovací schopnosti inseminačních dávek býků. Sborník příspěvků ze semináře „Intenzifikační faktory plodnosti skotu“, 24.3.2015, Rapotín, Agrovýzkum Rapotín s.r.o., s. 25-31. ISBN 978-80-87592-23-6.

Odborné publikace:

Bezdiček, J., Stádník, L., Makarevich, A., Kubovičová, E., Louda, F., Hegedúšová, Z., Holásek, R., Beran, J., **Doležalová, M.** 2015. Nepříznivé dopady inbreedingu na kvalitu a množství embryí. *Náš chov* 46 (3), 34 – 35.

Doležalová, M., Stádník, L., Vodička, J. 2014. Přídavek kryoprotektantů do ředidel ejakulátu býků. *Náš chov*, 45 (7), 24-25.

Doležalová, M., Stádník, L., Vodička, J. 2014. Chlazení a ekvibrace při výrobě inseminačních dávek. *Náš chov*, 45 (6), 22-23.

Doležalová, M., Stádník, L., Nejdlová, M. 2014. Energetická bilance po otelení a reprodukční funkce dojníc. *Náš chov*, 45 (4), 28-32.

Doležalová, M., Stádník, L., Beran, J. 2013. Inseminace – intenzifikační faktor reprodukce. *Náš chov*, 44 (10), 56-57.

Doležalová, M., Stádník, L., Louda, F. 2013. Zásady manipulace s inseminačními dávkami. *Náš chov*, 44 (6), 10-13.

Doležalová, M., Stádník, L. 2013. Metody mrazení ejakulátu býků. *Náš chov*, 44 (5), 36-38.

Certifikované metodiky:

Stádník, L., **Doležalová, M.**, Ducháček, J. 2015. Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky. Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 21.12.2015, č.j. 17210/2015-5, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 27 stran. ISBN 978-80-213-2615-6.

Stádník, L., Beran, J., **Doležalová, M.**, Ducháček, J., Toušová, R. 2014. Vybrané faktory ovlivňující kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků. Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-8, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 37 stran. ISBN 978-80-213-2536-4.

Beran, J., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Toušová, R. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-7, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 30 stran. ISBN 978-80-213-2537-1.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Agarwal, A., Prabakaran, S. A., Said, T. M. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology*, 26: 654–660.
- Aisen, E. G., Medina, V. H., Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57: 1801–1808.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H, Iqbal, S., Ullah, N. 2010. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology*, 74: 951–955.
- Amann, R. P., Pickett, B. W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7: 145 – 173.
- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*, 10: 89 –98.
- Amann, R. P., DeJarnette, J. M. 2012. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: a paradigm shift. *Journal of Dairy Science*, 77: 795–817.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., Gérard, O., Courtens, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61: 895 – 907.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., Courtens, J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129: 535 – 543.
- Arav, A., Zeron, Y., Ocheretny, A. 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 53: 248 – 249.
- Arav, A., Yavin, S. Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 77 – 81.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N. 2000. Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21: 1–7.
- Ball, P. J. H., Peters, A. R. 2004. Reproduction in cattle. 3rd ed. UK: Blackwell Publishing.

- Barak, Y., A., Lessing, J. B., Paz, G., Homonnai, Z. T., Yogev, L. 1992. Improved fertilization rate in an invitro fertilization program by egg yolk-treated sperm. *Fertility and Sterility*, 58: 197-198.
- Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 68–73.
- Bavister, B. D., Leibfried, M. L., Lieberman, G. 1983. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, 28: 235–247.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M-L., Barriere, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2012. The advantages of using combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Veterinary Science*, 93: 440 – 7.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Toušová, R., Louda, F., Štolc, L. 2011. Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, 59(6):37-44.
- Beran, J., Stádník, L., Bezdíček, J., Louda, F., Čítek, J., Ducháček, J. 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archiv Tierzucht*, 55 (3): 207-218.
- Beran, J., Stádník, L., Doležalová, M., Toušová, R. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. *Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-7, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 30 stran. ISBN 978-80-213-2537-1.*
- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 1338–1344.
- Bhosrekar, M. R., Mokashi, S. P., Purohit, J. R., Gokhale, S. B., Mangurkar, B. R. 1994. Effect of glycerolization and deep freezing on the levels and release of enzymes in buffalo semen in relation to initial seminal attributes. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, *Proceedings of 4th World Buffalo Cong.*, Sao Paulo, Brazil. International Buffalo Federation, Roma, Italy, 465–467.

- Blackshaw, A. W., Salisbury, G. W. 1957. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa 11: cold-shock and its prevention. *Journal of Dairy Science*, 40: 1099–1106.
- Blaschek, M., Kaya, a., Zwald, n., Memili, E., Kirkpatrick, B. W. 2011. A whole-genome association analysis of noncompensatory fertility in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 94 (9): 4695-4699.
- Bochenek, M., Smorag, Z., Pilch, J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56: 557–567.
- Bussalleu, E., Yeste, M., Sepúlveda, L., Torner, E., Pinart, E., Bonet, S. 2011. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic E. coli on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 127: 176–182.
- Carr, D. W., Acott, T. S. 1989. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biology in Reproduction*, 41: 907–920.
- Carra, E., Sangiorgi, D., Gattuccio, F., Rinaldi, A. M. 2004. Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 322: 333-339.
- Cleland, D., Krader, P., McCree, C., Tang, J., Emerson, D. 2004. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods*, 58(1): 31-38.
- Clulow, J. R., Mansfield, L. J., Morris, L. H. A., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 108: 298-308.
- Collins, W. E., Inskip, E. K., Tyler, W. J., Casida, L. E. 1962. Variation in conception rates of Guernsey cattle. *Journal of Dairy Science*, 45: 1234-1236.
- Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Valorz, C., Wegher, L., Carluccio, A. 2013. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal Reproduction Science*, 136: 252– 259.
- Cooter, P. Z., Goolsby, H. A., Prien, S. D. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 40: 98- 99.
- CORE DYNAMICS. 2012. Dostupné z <http://coredynamics.com/CoreDynamic/Templates/showpage.asp?DBID=1&LNGID=1&TMID=87&FID=422&PID=631>, citováno 15.8.2015.
- Crockett, E. L. 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist*, 38: 291–304.

- Čeřovský, J., Frydrychová, S., Lustyková, A., Lipenský, J., Rozkot, M. 2009. Semen characteristics of boars receiving control diet and control diet supplemented with L-carnitine. *Czech Journal of Animal Science*, 54: 417–425.
- Davis, R. O., Niswander, P. W., Katz, D. F. 1992. New measures of sperm motion. I. Adaptive smoothing and harmonic analysis. *Journal of Andrology*, 13: 139–152.
- De Leeuw, F. E., De Leeuwa, M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., Verkleij, A. J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30: 32-44.
- De Pauw, I. M. C., Van Soom, A., Mintiens, K., Verberckmoes, S., de Kruif, A. 2003. In vitro survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions. *Theriogenology*, 59: 1093–1107.
- Defoin L, A Granados A, Donnay I 2008: Analysing motility parameters on fresh bull semen could help to predict resistance to freezing: A preliminary study. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 606-611
- Dhami, A. J., Sahni, K. L., Mohan, G. 1992. Effect of variol cooling rates (from 30 deg to 5_C) and thawing temperatures on the deep-freezing of Bos taurus and Bos bubalis semen. *Theriogenology*, 38: 565–574.
- Dhami, A. J., Sahni, K. L., Mohan, G., Jani, V. R. 1996. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology*, 46: 109–120.
- Diller, K. R. 1992. Modeling of bioheat transfer processes at high and low temperatures. In: Cho, Y.I. (Ed.), *Bioengineering Heat Transfer*, vol. 22. Academic Press, San Diego, CA, 157–357.
- Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*, accepted for printing
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchoroguy, T. J., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes - a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*. 265 (4). 432-437.
- Ferero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., Arruda, R. P. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44: 154–159.

- Frydrychová, S., Čerovský, J., Lustyková, A., Rozkot, M. 2010. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*, 55 (4): 160–166.
- Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, Ch., Sölkner, J. 2006. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science*, 95 (1-2): 27-37.
- Gadella, B. M. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci*, 107:229–36.
- Gatti, J. L., Chevrier, C., Paquignon, M., Dacheux, J. L. 1993. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98: 439–449.
- Gibbons, R., Adeoya-Osiguwa, S. A., Fraser, L. R. 2005. A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolaminebinding protein 1. *Reproduction*, 130:497–508.)
- Gilbert, G. L., Gilbert, E. A., Govindaraj, A., Jury, L., Mason, M. C., Pfeiffer, K. E., Rowlinson, T. M., Ward, L., Kaya, A., Larson, J. 2012. Endocrine control of bull fertility. In: Liu G, editor. *Cattle Domestication, Diseases and the Environment*. Hauppauge, NY, USA: Nova Publishers, 1–34.
- Graham, E. F., Schmehl, M. K. L., Nelson, D. S. 1980. Problems with laboratory assai. In: *Proceedings of the Eighth Technical Conference on AI and Reproduction NAAB*, 1 – 8.
- Graham, J. K., Foote, R. H. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24: 42–52.
- Graham, J. K., Mocé, E. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 105: 104 – 118.
- Green, C. E., Watson, P. F. 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122: 889–898.
- Guthrie, H. D., Liu, J., Critser, J.K., 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67: 1811–1816.
- Hajirezaee, S., Mojazi Amizi, B., Mirvaghefi, A., Sheikh Ahmadi, A. 2010. Evaluation of semen quality of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in different times of spermiation during the spawning season. *Czech Journal of Animal Science*, 55: 445–455.

- Hammerstedt, R. H. 1979. Characterization of sperm surface using physical techniques. In: Fawcett DW and Bedford JM (Eds). *The spermatozoon: Maturation, Motility, Surface Properties and Comparative Aspects*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, USA, 205-216
- Hammerstedt, R. H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reproduction Fertility and Development*, 5: 675–690.
- Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z., a kol. 2009. Nemoci skotu. *Noviko a.s., Česká buiatrická společnost*, Brno, ISBN: 978-80-86542-19-5, 1149.
- Hoflack G, Opsomer G, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, Duchateau L. 2006. Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. *Theriogenology*, 66(8):1834-1846.
- Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47–58.
- Hugentobler, S., Morris, D. G., Kane, M. T., Sreenan, J. M. 2004. In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology*, 61: 1419–1427.
- Chang, H., Suarez, S. S. 2012. Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct. *Biol Reprod*, 86:1–8. 140.
- Chen, Y., Foote, R. H., Tobback, C., Zhang, L., Hough, S. 1993. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk–tris and whole milk extenders. *Journal of Dairy Science*, 76: 1028–1034.
- Cheong, S.H., Nydam, D.V., Galvão, K.N., Crosier, B.M., Ricci, A., Caixeta, L.S., Sper, R.B., Fraga, M., Gilbert, R.O. 2012. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 77: 858–864.
- Chinnaiya, G. P., Ganguli, N. C. 1980. Acrosomal damage of buffalo spermatozoa during freezing in extenders. *Zentralblatt fur veterinarmedizin reihe A-journal of veterinary medicine series A-animal physiology pathology and clinical veterinary medicine*, 27: 339–342.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen–thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*, 55: 947–961.

- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60: 743-758.
- Juyena, N. S., Stelletta, C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Review Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33 (4): 536-551.
- Kaya, A., Birler, S., Enwall, L., Memili, E. 2014. Determinants of sperm morphology. In: Chenoweth PJ, Lorton SP, editors. *Animal Andrology: Theories and Applications*. Wallingford, UK: CAB International, 34–56.
- Khan, M. I. R., Ijaz, A. 2008. Effects of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Animal*, 2 (4): 548-553.
- Kvapilík, J., Růžička, Z., Bucek, P., 2015: Ročenka 2014. Chov skotu v České republice. Praha: *Českomoravská společnost chovatelů*, a. s., 95 s.
- Kumar, S., Millar, J. D., Watson, P. F. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46: 246–253.
- Le Guillou, J., Ropers, M. H. Gaillard, C., David-Briand, E., Desherces, S., Schmitt, E., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Tainturier, D., Anton, M. 2013. Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108: 246-254.
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M., de Andrade, V. J. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120: 31–38.
- Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., Bailey, J. L., Sullivan, R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl*, 21:700–7.
- Loomis, P. R., Amann, R. P., Squires, E. L., Pickett, B. W. E. L. J. 1983. *Animal Science*, 56: 687–693.
- Loomis, P. R., Graham, J. K. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105: 119–128.

- Lorton, S. P. 2014. Evaluation of semen in the Andrology Laboratory. In: Chenoweth PJ, Lorton SP, editors. *Animal Andrology: Theories and Applications*. Wallingford, UK: CAB International, 100–143.
- Louda, F., Bjelka, M., Ježková, A., Pozdíšek, J., Stádník, L., Bezdíček, J. 2007. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. ČR: *Výzkumný ústav pro chov skotu*, s.r.o. Rapotín.
- Louda, F., Vaněk, D., Ježková, 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, Česká republika, ISBN: 9788087144053, 56 s.
- Luyet, B. J., Hodapp, R. 1938. Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology*, NY 39, 433 – 434.
- Makler, A., David, R., Blumenfeld, Z., Better, O.S. 1981. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertility and Sterility*, 36: 507–511.
- Mann, T. 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. 2nd ed. London, United Kingdom: Methuen.
- Mann, T., Lutwak-Mann, C. 1981. Male reproductive function and semen. In: *Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 495.
- Marshall, C. E. 1984. Considerations for cryopreservation of semen. *Zoo Biology*, 3: 343–356.
- Matharoo, J. S., Singh, M. 1980. Revivability of buffalo-spermatozoa after deep freezing the semen using various extenders. *Zentralblatt für veterinärmedizin reihe A-journal of veterinary medicine series A-animal physiology pathology and clinical veterinary medicine*, 7: 385–391.
- Mazur, P. 1966. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology*, 2: 181–192.
- 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.
- Medranol, A., Watson, P. F., Holt, W. V. 2002. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*, 123: 315–322.
- Mocé, E., Purdy, P. H., Graham, J. K. 2010. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 118: 236–247.

- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57: 1695 – 1706.
- Muiño, R., Fernández, M., Peña, A. I. 2007: Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 305–311.
- Mutalík, 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. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(3): 183-188.
- Nehring, H., Rothe, L., Reguszynski, K., Schumann-Zuhlke, D. 2005. Developments in quality estimation and cropreservation of bull semen. *Zuchtingkunde*, 77(2-3): 93-109.
- Nur, Z., Dogan, I., Soyulu, M. K., Ak, K. 2003. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue de Medecine Veterinaire*, 154: 487–90.
- Pace, M. M., Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.*, 39, 1144–1149.
- Padrik, P., Hallap, T., Kaart, T., Bulitko, T., Jaakma, U. 2012. Relationships between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. *Czech Journal of Animal Science*, 57 (10): 490–497.
- Papa, P. M., Maziero, R. D., Guasti, P. N., Junqueira, C. R., Freitas-Dell’Aqua, C. P., Papa, F. O., Vianna, F. P., Alvarenga, M. A., Crespilho, A. M., Dell’Aqua, J. A. 2015. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, 83: 107–113.
- Parisi, A. M., Thompson, S. K., Kaya, A., Memili, E. 2014. Molecular, cellular, and physiological determinants of bull fertility. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 637-642.
- Park, C. B., Larsson, N. G. 2011. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Journal of Cell Biology*, 193: 809-818.
- Parks, J. E., Lynch, D. V. 1992. Lipid-composition and thermotropic phase-behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29 (2). 255-266.
- Pena, F. J., Macias Garcia, B., Samper, J. C., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C. 2011. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*. 76 (7). 1177-1186.

- Perry, G. A., Perry, B. 2008. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 34: 333–338.
- Phelps, M. J., Liu, J., Benson, J. D., Willoughby, C. E., Gilmore, J. A., Critser, J. K. 1999. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*. 61 (4). 1031-1041.
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V. 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Journal of Andrology*, 35: 109–124.
- Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666.
- Polge, C. 1957. Low temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society London*, 147: 488–508.
- Purdy, P. H., Graham, J. K. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 48 (1). 36-45.
- Rao, A. V. N., Haranath, G. B., Sekharam, G. S., Rao, J. R. 1986. Effect of thaw rates on motility, survival and acrosomal integrity of buffalo spermatozoa frozen in medium French straws. *Animal Reproduction Science*, 12: 123–129.
- Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59: 31–41.
- Reid, C. E., Hermes, R., Blottner, S., Goeritz, F., Wibbelt, G., Walzer, C., Bryant, B. R., Portas, T. J., Streich, W. J., Hildebrandt, T. B. 2009. Split-sample comparison of directional and liquid nitrogen vapour freezing method on post-thaw semen quality in white rhinoceroses. *Theriogenology*, 71: 275 – 291.
- Robbins, R. K., Saacke, R. G., Chandler, P. T. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *Journal of Animal Science*, 42: 145–54.
- Rodriguez, O.L., Berndtson, W.E., Ennen, B.D., Pickett, B.W., 1975. Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *Journal of Animal Science*, 41: 129–135.
- Rodriguez-Martinez, H., Barth, A. D. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Society of Reproduction and Fertility*, 64, 39–54.

- Rodriguez-Martinez, H. 2006. Can we increase the estimated value of semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 2–10.
- Rubei, M., Degl’Innocenti, S., De Vries, P. J., Catone, G., Morini, G. 2004. Directional freezing (Harmony Cryocare – Multi Thermal Gradient 516): a new tool for equine semen cryopreservation. 2004: 15th *International Congress on Animal Reproduction*, Porto Seguro, Brazil, 503.
- Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J. J., Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., Rodríguez-Gíl, J. E., Madrid-Bury, N., Quintero-Moreno, A. 2007. Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 354–357.
- Saacke, R. G. 1984. Semen quality: importance of and influencing factors. In: Proceedings of 10th NAAB Tech. Conf. A. I. Reprod Milwaukee, WI, USA. *National Association of Animal Breeders*, Columbia, USA, 30–36.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37: 185 – 249.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77–111.
- Sanocka, D., Kurpisz, M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2: 12.
- Sansinena, M., Santos, M. V., Zaritzky, N., Chirife, J. 2012. Comparison of heat transfer in liquid and slush nitrogen by numerical simulation of cooling rates for French straws used for sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 77: 1717–1721.
- Sansone, G., Nastri, M. J. F., Fabbrocini, A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 55–76.
- Santos, M. V., Sansinena, M., Zaritzky, N., Chirife, J. 2013. Mathematical prediction of freezing times of bovine semen in straws placed in static vapor over liquid nitrogen. *Cryobiology*, 66: 30–37.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Pettit, M. T., Araw, A. 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 610 – 615.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Zeron, Y., Rozenboim, I., Arav, A. 2009. Double freezing of bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 115: 10 – 17.

- Senger, P. L. 2003. Organization of function and the male reproductive systems. In: Senger PL, editor. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Pullman, WA, USA: Current Conceptions, 44–79.
- Shannon, P. 1972. The effect of egg yolk level and dose rate of semen diluted in caprogen. Proceedings of 7th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I. Munich, Germany. *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Milan, Italy, 1440–1442.
- Shum, W.W.C., Ruan, Y.C., Da Silva, N., Breton, S. 2011. Establishment of cell–cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *Journal of Andrology*, 32: 576–586.
- Siddique, M., Ali, R., Raza, A. 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture, Forestry and the Social Sciences*. 2: 117-119.
- Si, W., Lu, Y., He, X., Ji, S., Niu, Y., Tan, T., Ji, W. 2010. Directional freezing as an alternative method for cryopreserving rhesus macaque sperm. *Theriogenology*, 74: 1431 – 1438.
- Singh, P., Singh, S., Hooda, O. K. 1999. Effect of different level of egg yolk on freezability of buffalo semen. *Haryana Veterinarian*, 38: 26–28.
- Stradioli, G., Noro, T., Sylla, L., Monaci, M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67: 1249 – 1255.
- Sullivan, R., Saez, F. 2010. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* 2013;146:R21–35.
- Swain, J. E., Smith, G. D. Cryoprotectants. In: Chian RC, Quinn P (ed.). *Fertility cryopreservation*. New York: Cambridge University Press; 24–38.
- Štolc, L., Stádnik, L., Ježková, A., Louda, F. 2009. Relationships among herd, ram breeds, age of rams, sperm density before diluting and sperm motility during thermal survival test. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, 57 (4): 109–116.
- Takahashi, T., Itoh, R., Nishinomiya, H., Katoh, M., Manabe, N. 2012. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long- term equilibration of freezing of bovine spermatozoa with poor fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 92 – 97.
- Talevi, R., Pelosi, S., Sansone, G., Graso, F., Matasino, D. 1994. Effect of different prefreezing rates on buffalo sperm motility and ultrastructure preservation. In: Vale

- WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, Proceedings of 4th World Buffalo Cong Sao Paulo, Brazil. *International Buffalo Federation*, Roma, Italy, 537–539.
- Talevi, R., Gualtieri, R. 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*, 73:796–801.
- Tanaka, H., Baba, T. 2005. Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 62:344–54.
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Pena, F. J., Aparicio, I. M. 2012. The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 65-75.
- Tatham, B. 2000. Increasing Buffalo Production; Using Reproduction Technology. *Report Rur. Indust. Res Corp. Dev.*, Kingston, ACT, Australia
- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57: 1087-1094.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vasquez, L., Schmidt, E. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: comparison to Triladyl and Bioxcel. *Theriogenology*, 71: 895–900.
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., de Kruif, A. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen, *Theriogenology*, 63 (3): 912–922.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer-assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149–79.
- Vieira, A., Miller, D. J. 2006. Gamete interaction: is it species-specific? *Mol Reprod Dev*, 73:1422–9.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy. ČR: *Výzkumný ústav veterinárního lékařství*, Brno.
- Watson, P. 1976. The preservation of semen in mammals. In: Finn CA (ed.), *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 1 st edn Oxford Univ. Press, Oxford, 283 – 350.
- Watson, P. F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London, 189–218.
- Watson, P. F., Kunze, E., Cramer, P., Hammerstedt, R. H. 1992. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa, *Journal of Andrology*, 13: 131–138.

- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61: 481–492.
- Woelders, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19: 135– 138.
- Wolf, J., Smital, J. 2009. Effects in genetic evaluation for semen traits in Czech Large White and Czech Landrace boars. *Czech Journal of Animal Science*, 54: 349–358.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd., New York, 189–317.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ID – inseminační dávka

AI – umělá inseminace

ATP – adenosintrifosfát

ROS – reaktivní formy kyslíku

LDL – low density lipoprotein cholesterol, frakce vaječného žloutku

LN₂ – liquid nitrogen, tekutý dusík

CASA – computer assisted semen analysis, počítačová metoda hodnocení spermií