

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv přídatku LDL frakce vaječného žloutku na
motilitu býčích spermií po kryokonzervaci ve vysokém
stupni ředění**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Prýcová

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

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Vliv přídavku LDL frakce vaječného žloutku na motilitu býčích spermií po kryokonzervaci ve vysokém stupni ředění jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. MVDr. Radku Rajmonovi, Ph.D. za umožnění zpracování velmi zajímavého a přínosného tématu o vlivu frakce LDL na motilitu býčích spermií. Za možnost zorientovat se v dané problematice a za spoustu cenných rad. Dále bych ráda poděkovala Ing. Ondřeji Šimoníkovi za pomoc s vedením práce, analýzou laboratorních a statistických dat.

Vliv přídatku LDL frakce vaječného žloutku na motilitu býčích spermií po kryokonzervaci ve vysokém stupni ředění

Souhrn

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, zda selepší přežitelnost býčích spermií po rozmrazení náhradou vaječného žloutku izolovaným LDL. Druhou hypotézou bylo, zda selepší přežitelnost spermií přídatkem LDL izolovaného z vaječných žloutků do bezžloutkových ředidel.

Celkem se provedlo 8 odběrů od 4 býků různých plemen i věku. Býci byli z jedné inseminační stanice Natural Hradištko. Každý z ejakulátů byl rozdělen na 15 dílů. Byla použita 3 komerčně vyráběná ředidla, a to AndroMed, Bioxcell a Triladyl. AndroMed a Bioxcell jsou bezžloutková ředidla, takže frakce LDL byla do ředidla přidána, kdežto u Triladylu byl frakci LDL nahrazen vaječný žloutek. Byl vždy 1 kontrolní vzorek s čistým ředidlem, a 3 pokusné varianty s ejakulátem, ke kterým se ředidlo přimíchalo. Do pokusných variant bylo přidáno LDL v koncentraci 4%, 6% a 8% u AndroMedu a Bioxcellu, a 6%, 8% a 10% u Triladylu.

Hodnotily se parametry motility VCL, VAP, VSL a ALH systémem CASA modulu. Dále se hodnotila semipermeabilita membrán pomocí HOS testu.

Kontrolní vzorek byl u AndroMedu vždy statisticky odlišný od vzorků s přidáním LDL. Výsledky ukázaly, že z použitých ředidel lze doporučit AndroMed s přídatkem 6% frakce LDL. Kontrolní vzorek Bioxcellu byl také průkazně odlišný od vzorků s přídatkem LDL, ovšem s tím rozdílem, že tendence křivky byla klesající. Z těchto výsledků vyplývá, že Bioxcell není do budoucna vhodným ředidlem pro experimenty s přídatkem frakce LDL. U Triladylu nebyl rozdíl kontroly a vzorků tak výrazný, ale nejlépe se ukázal 10% přídatek frakce LDL. Nevýraznější rozdíl mohly způsobit žloutkové inkluze v kontrolním vzorku. HOS test neprokázal statisticky průkazné rozdíly mezi kontrolními vzorky a ředidly.

V dalších pokusech by bylo vhodné se věnovat už jen ředidlům AndroMedu a Triladylu, a udělat více experimentů na nejlepší koncentrace, popřípadě vyzkoušet koncentrace jiné. A také se zaměřit na vliv plemene.

Klíčová slova: kryokonzervace, LDL, motilita, ředidlo, spermie, žloutek

Effects of egg yolk LDL fraction addition on motility of bull spermatozoa cryopreserved at a high dilution rate

Summary

The goal of the thesis was to verify the hypothesis whether the persistence of bull's sperm is getting better after refreezing with substitution of egg yolk with isolated LDL. Additional hypothesis checked whether the persistence of sperm is getting better with addition of LDL isolated from egg yolks into egg yolk free extender.

In total 8 samples were carried out from 4 different bulls of different breed and age. The bulls were taken from an insemination station of Natural Hradistsko. Each of the ejaculates was divided into 15 parts. Three commercially sold extenders were used such as Andromed, Bioxcell and Triladyl. AndroMed and Bioxcell are egg yolk free extenders so the fraction of LDL was added into them. On the contrary, with Triladyl the egg yolk was substituted by the fraction of LDL. There was always one control sample with plain extender and three samples with ejaculate into which the extender was added. Into the LDL samples of concentration of 4%, 6% and 8% with Andromed and Bioxcell and 6 %, 8 % and 10 % with Triladyl.

Parameters of motility of VCL, VAP, VSL and ALH were measured by using the CASA module. Then the semipermeability of membranes was measured by using the HOS test.

At AndroMed the control sample was statistically different in all cases compared to the samples with added LDL. The results showed that out the used extenders the best one to recommend is Andromed of 6 % LDL fraction added. The control sample of Bioxcell was also totally different from the samples with LDL added, but with a difference that the curve was descending. Out of this results is obvious that Bioxcell is not suitable extender for the experiments with fraction of LDL fraction. The results with Triladyl were not that different, the best appeared to be the one with 10 % fraction of LDL. A little differences could be due to the egg yolk inclusion in control sample. HOS test did not prove statistically any differences between control samples and extenders.

For the future experiments would be better to use the extenders AndroMed and Triladyl only, and make more experiments on better concentrations or try different concentrations as well. And also make more focus on the influence of the breed.

Key words : cryoconservation, LDL, motility, extender, sperm, egg yolk

OBSAH

1	Úvod	5
2	Cíl práce.....	6
3	Literární rešerže	7
3.1	Semeno.....	7
3.2	Spermie	7
3.2.1	Metabolismus spermií.....	8
3.2.2	Motilita spermií.....	10
3.2.3	Kapacitace a akrozomální reakce	11
3.3	Kryokonzervace býčího ejakulátu	13
3.3.1	Hluboké mrazení semene.....	14
3.4	Sexování spermií.....	15
3.5	Ředění ejakulátu	16
3.5.1	Žloutková ředidla.....	16
3.5.2	BSP proteiny	17
3.6	Low – density lipoprotein (LDL).....	18
3.6.1	Kryoprotektivní účinky LDL	19
3.6.2	Současný stav experimentálního účinku LDL v ředidlech	20
3.6.3	Účinky LDL na inseminační dávky s vysokým stupněm ředění	22
3.6.4	Glutamin a LDL.....	23
4	Metodika	25
4.1	Charakteristika býků	25
4.2	Sběr a zpracování ejakulátu	25
4.3	Příprava ředidel.....	25
4.4	Extrakce LDL	26
4.5	Hodnocení motility spermií	26
4.6	HOS test.....	26

4.7	Statistická analýza.....	27
5	Výsledky.....	28
5.1	AndroMed.....	28
5.2	Bioxcell.....	30
5.3	Triladyl.....	33
5.4	Porovnání nejlepších koncentrací a kontrolních vzorků u jednotlivých parametrů	35
5.4.1	VCL.....	35
5.4.2	VAP.....	35
5.4.3	VSL.....	36
5.4.4	ALH.....	36
5.5	HOS test.....	36
6	Diskuze.....	39
7	Závěr.....	41
8	Reference.....	42
9	Seznam použitých zkratk.....	45

1 Úvod

Umělá inseminace je jednou z nejstarších metod asistované reprodukce. Pro svůj významný přínos v oblasti šlechtění zvířat (využíváním býků zlepšovatelů), podíl na zlepšení zdravotního stavu zvířat (likvidace pohlavních nákaz, onemocnění a eradikace přenosných onemocnění, eliminace nositelů dědičně podmíněných vad) a významný ekonomický přínos, spočívající v redukci počtu býků nezbytných pro udržení potřebné úrovně reprodukce skotu a ve zvýšení hodnoty celých populací zvířat, si stále udržuje významné postavení v oblasti rozmnožování. Snahy o efektivnější využití býků s vynikajícím genofondem se staly impulzem pro další rozvoj poznání v oblasti rozmnožování (Hofírek et al., 2009). Podmínkou pro vykonávání umělé inseminace je správná konzervace ejakulátu a vhodné ředění.

Cílem konzervace ejakulátu je zachovat jeho životaschopnost a dobrou oplozovací schopnost. Dále pak odpovídajícím ředěním vyrobit maximální počet inseminačních dávek s takovým počtem aktivních spermií, který odpovídá biologickým požadavkům pro zajištění úspěšného oplození. Ředěním se vytváří podmínky pro přežívání spermií mimo organismus. Ředidlo by mělo být energetickým zdrojem pro spermie, mít dobrou puřovací schopnost, malý obsah elektrolytu, zajišťovat požadovaný osmotický tlak, pH odpovídající požadavkům býčího ejakulátu, nesmí být toxické, musí být sterilní a ekonomicky dostupné (Louda et al., 2001).

Díky prospěšnému vlivu při kryokonzervaci býčího ejakulátu si bylo povšimnuto vaječného žloutku. Žloutek, ve spojení s dalšími složkami, pomáhá spermiím odolávat chladovému šoku. Je běžně používán v 20% koncentraci, jenže některé laboratorní studie ukázaly, že tato koncentrace stěží standardizovat výsledky. Ke zvýšení požadavků na nahrazení vaječného žloutku také přispěla přítomnost substancí, které zpomalují respiraci spermií nebo snižují jejich motilitu.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo ověřit následující hypotézy. Předpokládáme, že náhrada vaječného žloutku izolovaným LDL zlepší přežitelnost býčích spermií po rozmrazení, a zároveň zlepší přežitelnost spermií přidáním do bezžloutkových ředidel.

3 Literární rešerže

3.1 Semeno

Semeno se skládá ze semenné plazmy a spermií. Semenná plazma obsahuje převážně sekrety pohlavních žláz. Je to tekutina druhově specifického množství a barvy, rozdílného pH (6,2 – 7,5) a konzistence. Představuje přirozené prostředí pro spermie, umožňuje jejich výživu a transport v pohlavních orgánech samice. Má relativně stálý osmotický tlak a vyznačuje se velkými pufracími schopnostmi. Obsahuje minerální látky, bílkoviny, cukry, kyselinu citronovou a askorbovou, četné enzymy a kromě jiných látek i biologicky aktivní složky, jako jsou prostaglandiny, estrogeny a androgeny (Jelínek et al., 2003).

Přežvýkavci se vyznačují malým objemem ejakulátu s velkou koncentrací spermií. U přežvýkavců je sperma vypuzeno na konci pohlavního aktu jednorázovou ejakulací, kterou předchází vyloučení sekretu bulbouretrálních žláz, který upravuje pH močové trubice. Normální objem ejakulátu býka je 2 - 10 ml. Množství spermií v 1 μ l se pohybuje obvykle mezi 0,2 – 2 miliony. Celkové množství spermií v ejakulátu je v hodnotách 4 – 10 miliard (Marvan et al., 2011).

Většina spermií v ejakulátu nikdy nedosáhne vejcovodu. Ve skutečnosti pouze několik desítek spermií se přiblíží vajíčku a pouze jedna se nakonec účastní oplození. Semeno odebrané pro umělou inseminaci je ředěno, aby byl získán větší počet inseminačních dávek (Reece, 2003). Obvykle se požaduje, aby inseminační dávka obsahovala minimálně 10 milionů aktivních spermií při aktivitě spermií v inseminační dávce minimálně 30% (Louda et al., 2001). Inseminace s dávkami obsahujícími nízké počty spermií je používáno k optimalizaci využití elitních býků (Vera-Munoz et al., 2009).

3.2 Spermie

Spermie tvoří nejdůležitější složku ejakulátu. Jejich velikost a tvar jsou druhově rozdílné, společným hlavním znakem je pohyblivost a schopnost oplození (Marvan et al., 2011).

Hlavička spermie tvoří přibližně 51% celkové hmotnosti spermie. Obsahuje akrozom, jádro, malé množství cytoplazmy a cytoskeletární strukturu. Hlavička představuje útvar složený z několika strukturálních a funkčních částí. Základ tvoří jádro, jehož přední část je kryta čepičkovitým akrozomem. Jádro chromozomu je kondenzované a ve srovnání s jádry jiných

typů buněk zaujímá nejmenší objem. Hlavním proteinem, vázaným na jadernou DNA je protamin. Akrozom je specifická organela, která vznikla oddělením z Golgiho aparátu. Během akrozomální reakce je obsah akrozomu uvolněn procesem exocytózy (Gamčík, Kozumplík, 1984).

Základní strukturální komponentou membrány je dvojvrstevný základ fosfolipidů a proteinů. Na vnějším povrchu je buněčná membrána pokryta vrstvou polysacharidů zvanou glykokalix. Význam této membránové složky je víceméně ochranný. Glykokalix je preventivní struktura stabilizující buněčnou membránu, ovlivňující selektivně rychlost difuze látek buněčnou membránou, udržující pH a povrchové napětí. U spermií tvoří též maskování povrchu k snížení rychlosti jejich rekognasce v pohlavních cestách samic (Věžník et al., 2009).

Integrita a normální funkceschopnost plazmatické membrány spermií je nezbytný předpoklad úspěšné fertilizace. Živé buňky si zachovávají asymetrické rozdělení různých fosfolipidů mezi vnitřní a vnější stěnou plazmatické membrány. Jsou-li buňky vystaveny extrémním nefyziologickým podmínkám, dojde v nich k biochemickým a morfologickým změnám a nástupu nekrobiotického procesu. Nekróza začíná zhoršenou schopností buňky zachovat homeostázu, což vede k influxu vody a extracelulárních iontů. Hydropická degenerace se projeví změnou intracelulárních organel a celá buňka se postupně edematically mění. U spermie je především postižena oblast akrozomu a povrchové membrány, postupně mitochondriální struktury a bičík. Funkční testy integrity plazmatické membrány mohou potenciálně charakterizovat kvalitu buněk. Při rutinní analýze spermií se mnohdy zjišťuje významné procento mrtvých spermií. Všeobecně je tato buněčná smrt považována za důsledek buněčných nekrobiotických procesů, neboť používaná vitální barviva pro rozlišení živých a mrtvých spermií pronikají do spermií změnou permeability plazmatické membrány (Věžník et al., 2009).

3.2.1 Metabolismus spermií

Základní metabolické pochody ve spermatu mají za úkol krytí potřeby energie, kterou spermie potřebují pro svůj pohyb. Zdrojem metabolické energie spermií jsou především fruktóza, kyselina mléčná, intracelulární plazmalogen a další látky, které spermie savců čerpají převážně z prostředí, které je obklopuje – ze semenné plazmy (Gamčík, Kozumplík, 1984).

Převážná část energie je oxidacemi uvolňována v mitochondriích, v buňce je však spotřebována na různých funkčních místech, u spermií v dubletovém systému bičíku. Přenos energie se děje v buňce transportními látkami obsahujícími snadno štěpitelné chemické vazby s velkým obsahem energie (makroergické vazby). V buňce jsou pro transport nejdůležitější vazby ATP (adenosintrifosfát). ATP je mononukleotid složený z adeninu, ribózy a tří zbytků kyseliny fosforečné (Věžník et al., 2004). ATP slouží jako pohodlná a všestranná rezerva k pohonu mnoha chemických reakcí v buňkách. ATP vzniká v energeticky nevýhodné fosforylační reakci, ve které je k ADP přidána fosfátová skupina. Je-li třeba, odevzdá ATP svůj energetický balíček při energeticky výhodné hydrolýze na ADP. Znovu vzniklý ADP je potom dostupný pro další kolo fosforylační reakce, v níž vzniká ATP. ATP je nejhojnějším aktivním nosičem v buňkách. Jedním z mnoha příkladů jeho využití je dodávka energie pumpám, které přepravují látky do buňky i z buňky (Alberts et al., 1998).

Spermie získávají energii dvěma hlavními metabolickými procesy. Těmito procesy jsou fruktolýza (glykolýza) a respirace (Věžník et al., 2004).

3.2.1.1 Fruktolýza

Glykolýza je hlavní cestou odbourávání glukózy, vzniklé štěpením sacharidových složek potravy a rezervních polysacharidů. Je to základní metabolický děj probíhající téměř ve všech buňkách, např. v buňkách savců se glykolýzou zpracuje 70 a až 80 % potravou přijatých sacharidů. Slouží k uvolnění energie z molekul sacharidů (Vodrážka, 2007). Při glykolýze, probíhající za nepřítomnosti kyslíku dochází k rozbourávání sacharidů za vzniku kyseliny pyrohroznové a mléčné. Glykolýza je proces, ve kterém spermie býka metabolizují z monosacharidů především glukózu, fruktózu a manózu, z disacharidů maltózu, z polysacharidů glykogen, ten v menší míře (Gamčík, Kozumplík, 1984).

Za anaerobních podmínek je fruktóza rozkládána spermiemi býka enzymy až na kyselinu mléčnou. Hromadění kyseliny mléčné však způsobuje pokles pH, což vede ke zpomalení a nakonec až k zastavení glykolýzy a tím ke ztrátě pohybu spermií.

Fáze metabolických pochodů se různí vzhledem k prostředí, ve kterém se spermie nacházejí. Je možné vymezit tři základní fáze metabolismu. První fází je metabolismus spermií v nadvarletí, druhou fází je metabolismus ejakulovaných spermií v semenné plazmě nebo ředidlech, a konečně třetí fází je metabolismus spermií v pohlavních orgánech samice.

Metabolismus spermií v nadvarletí se vyznačuje především inaktivací pohybu, zatímco v druhých dvou případech je podmínkou pro pohyb spermií (Gamčík, Kozumplík, 1984).

3.2.1.2 Respirace (dýchání)

Respirace je proces, při kterém jsou spermie schopny za přítomnosti kyslíku získat energii přeměnou kyseliny mléčné nebo pyrohroznové za vzniku CO_2 a H_2O (exogenní dýchání), popřípadě získávají energii oxidací části rezervního intracelulárního materiálu (endogenní dýchání). Dochází-li k aerobnímu metabolismu cukrů od samého začátku, nevzniká kyselina mléčná, ale reakce jde obecně jiným směrem. Z metabolizovatelného substrátu jsou odčerpávány jak CO_2 , tak i vodík, ale i elektrony. Během této složité reakce přijímá molekulární kyslík elektrony, čímž se aktivuje a může reagovat s vodíkem za vzniku vody. Vytvoří se asi 38 nových makroergních fosfátových vazeb, což představuje asi 60 % z celkové volné energie, která se může získat úplným spálením cukru (Gamčík, Kozumplík, 1984).

3.2.2 Motilita spermií

Motilita spermií velmi koreluje s fertilitou. Při všech formách pohybu biologických organismů spočívá základ v převodu chemické energie v mechanickou. Z toho je zřejmé, že ve svém principu jsou shodné, i když ve svém působení mohou být funkčně odlišné. Efektorem tohoto děje jsou kontraktilní proteiny, které se vyskytují buď samy, nebo spolu s aktivními komponentami využívají ATPázovou aktivitu k získání energie. Dýchací řetězce zabezpečují látkovou výměnu k tvorbě ATP, jsou lokalizovány ve vnitřní mitochondriální membráně. V matrix mitochondrií jsou lokalizovány enzymatické systémy cyklu kyseliny citronové. Úroveň oxido-redukčních aktivit mitochondrií je ukazatelem potencionální energetické zásoby spermií. Transport ATP ze spojovací části je rovnoměrný po celé délce bičíku a zpětně transportován ADP (Věžník et al., 2004).

Energie získaná při metabolických procesech je převážně využívána k zajištění pohybu spermií (Gamčík, Kozumplík, 1984). Neoddělitelným atributem pohyblivosti je i rychlost pohybu spermií. Rychlost pohybu spermií je citlivým ukazatelem, který dovoluje časně posoudit nastupující vitální degradaci ejakulátu. Z funkčního hlediska je pohyb spermií nutnou podmínkou jejich průniku do vaječné buňky. Proto je připravenost energie (ATP) látkovou výměnou základní potřebou buněčné vybavenosti každé spermie (Věžník et al., 2004).

Zralé a integritní spermie se prezentují v ejakulátu pohybem, který se označuje jako souosý dopředný – progresivní. Aktivita bičíku orientuje pohyb spermie za hlavičkou. V ejakulátu je pohyb spermií nahodilý, neorientovaný. Spermie se velmi rychle přeměrují v případě, že vznikne proudění tekutiny. Rychlost proudění tekutiny ovlivňuje též rychlost pohybu spermií. Spermie při svém progresivním pohybu rotují kolem své osy s frekvencí 3 – 15 otáček za sekundu. Také tento spirálovitý pohyb je zvyšován proudící tekutinou. Jedna z charakteristik pohybu, pozorována především u přežvýkavců, je hromadný pohyb spermií, který se označuje jako masový nebo vířivý. V úzké souvislosti s vířivým pohybem spermií byly zaznamenány i změny v elektrickém odporu a akčních proudů (Věžník et al., 2004).

Všechny faktory ovlivňující motilitu spermií, ovlivňují i látkovou výměnu a naopak. Byl stanoven soubor faktorů ovlivňující endogenně i exogenně motilitu spermií. Z endogenních faktorů se uvádí na prvním místě věk donora, doba pobytu spermií v nadvarleti, doba mezi a po ejakulaci, zrání spermií – morfologické, fyziologické a biochemické, energetická zásoba ATP, membránový transport, pohyb bičíku, vazebné proteiny, aglutinační faktory, protilátky, detergenty, membránová integrita a úroveň aktivity receptorů. Z exogenních faktorů jsou to biofyzikální a fyziologické faktory jako: hydrodynamika, viskozita, osmolalita, pH prostředí, teplota, iontové složení resuspendačních tekutin. Z kontaktních tekutin jsou to: likvory epididymální, semenná plazma, vaginální prostředí, cervikální sekret, uterinní prostředí, prostředí oviduktu. Na stimulaci i inhibici motility spermií se mohou podílet anorganické ionty (Cu, Zn, Cd, Mn, Hg), exkreční produkty, hormony, cyklické nukleotidy, kininy, vnější prostředí a imunochemické faktory (Věžník et al., 2004).

3.2.3 Kapacitace a akrozomální reakce

Z celkového počtu několika miliard spermií, které se při páření nebo inseminaci dostávají do pochvy nebo do děložního krčku, se do vejcovodu dostává jen několik tisíc spermií a pouze jediná vniká do ovocytu. Při průchodu spermií pohlavním ústrojím samice se odehrávají složité biologické pochody, které souvisejí s oplozovací schopností, označovanou jako kapacitace spermií (Marvan et al., 2011).

Proces kapacitace představuje řadu fyziologických změn, konkrétně odstranění zbytků seminální plazmy pokrývající povrch spermií, aktivaci látkové výměny a tím jejich pohyb a konečně vlastní akrozomální reakci, což znamená aktivaci akrozomových enzymů

a vezikulaci úseků zevní membrány akrozomu. Proces kapacitace je druhově odlišný, u býka trvá 6 - 7 hodin (Jelínek et al., 2003). Vlastní proces kapacitace je provázen změnami pohyblivosti spermií, jak v pohybu, tak v jejich rychlosti. Kapacitační hypermotilita může zvýšit rychlost pohybu spermií o více než 40 % a uvolnění pohyblivosti v oblasti krčku spermie zvětšuje průměr šroubovice charakteristického dopředného pohybu. Tento pohyb je specifický pro kapacitované spermie a označuje se jako pohyb hyperaktivovaný (Věžník et al., 2004).

Akrozomální reakce spočívá ve vezikulaci vnějšího listu akrozomální membrány s plazmatickou membránou. Vytvořením pórů dochází aktivizaci enzymů akrozomálního interiéru s převážně proteolytickou aktivitou. Tento obraz akrozomální reakce může být detekován barvicími postupy zvýrazňujícími povrchové změny membrán. Představu, že část enzymů typu hyaluronidázy a akrozinu je uvolňována z akrozomu a část je vázána k další aktivitě, upřesnili roku 1974 Yanagimachi a Usui, kteří doložili tvorbu mikrotubulů na vnitřním listu akrozomální membrány z tubulinu přítomného v akrozomální matrix. Tyto mikrotubuly vytvoří větvičkovitý povrch na vnitřním listu akrozomální membrány a podrží na svém povrchu rezervu proteolytických enzymů, které se mohou aktivně uplatnit při průniku do vajíčka. Ti samí autoři dokládají rozdílné podmínky pro průběh obou procesů. Zatímco kapacitace může probíhat v mediu prostém Ca^{2+} , k nástupu akrozomální reakce jsou esence součástí prostředí. Tuto skutečnost dokumentovali kapacitací spermií v přípravném mediu, a po přidání Ca^{2+} nastoupila v průběhu 10 minut akrozomální reakce (Věžník et al., 2004).

V průběhu procesu chlazení mohou některé spermie prodělat změny, které jsou podobné změnám nastávajícím při kapacitaci (Bailey et al., 2008). Tyto změny se souhrnně nazývají kryokapacitací. Takové spermie mohou vykazovat předčasnou akrozomální reakci a tím ztrácet schopnost fertilizovat oocyty in vivo, ještě před dosažením ampuly vejcovodu. Při fyziologické kapacitaci způsobuje zvýšený příjem Ca^{2+} iontů kaskádu fosforylací vedoucí ke změnám v enzymatické aktivitě a k hyperaktivní motilitě spermií. Kryokapacitace je předčasnou kapacitací, při které většina charakteristických rysů fyziologické kapacitace není kompletně dokončena (Kaneto et al., 2002)

3.3 Kryokonzervace býčího ejakulátu

Historický vývoj umělé inseminace formovali možnosti poznávání vlastností spermií, což ve značné míře záviselo na rozvoji mikroskopické techniky. Její využití umožnilo hlouběji poznat především funkci spermií. Prohlubování těchto poznatků a postupné zlepšování konzervačních metod ejakulátu limitovali rozvoj umělé inseminace hospodářských zvířat. Mimořádný rozvoj nastal po 2. světové válce. V tomto období se začaly využívat znalosti o morfologii spermií získané elektronovým mikroskopem, které umožnily další prohloubení vědomostí o funkci spermií a procesu oplození. Důležitým mezníkem při konzervaci bylo zjištění úlohy glycerolu při zmrazení semene roku 1949. Od tohoto období se začalo semeno zmrazovat do ampulek (1951), pejet (1950-1953) a pelet (1963) (Gamčík, Kozumplík, 1984).

Prostředí a způsob odběru semene výrazně ovlivňují jeho kvalitu. Proto by tyto faktory měly být v maximální míře standardní a při hodnocení výsledků vyšetření semene je třeba je brát v úvahu. Pro volbu metody odběru ejakulátu je rozhodující, za jakým účelem se ejakulát získává. Ejakulát může být získáván pro potřeby umělé inseminace, za účelem prevence poruch plodnosti, pro zpřesnění diagnostiky při poruchách plodnosti nebo pro vědecko-výzkumná sledování (Hofírek et al., 2009).

V současné době se nejčastěji používá odběr do umělé pochvy. Vlastní odběr se provádí na živou atrapu (jiný klidný býk) nebo fantom (pevně zabudovaný nebo mobilní). V současné době se využívá k odběru ejakulátu zkrácená pochva s jednorázovým sběračem, která musí mít v době odběru teplotu 39 – 42°C (Hofírek et al., 2009). Louda et al., 2001 uvádí teplotu 38 – 40°C. Další metodou odběru semene je odběr elektroejakulací. Těto metody se používá výjimečně, pouze u býků zlepšovatelů, kteří ze zdravotních důvodů nejsou schopni odběru pomocí umělé vagíny. Tímto způsobem se získá stejný objem ejakulátu, koncentrace spermií v ejakulátu se nemění, pH bývá zvýšené vlivem většího podílu sekretu uretrálních žláz. Aktivita spermií a obsah fruktózy jsou nižší (Louda et al., 2001). Poslední možností odběru spermatu je odběr masáží ampulí chámovodu, která se provádí rektálním způsobem. Kvalita spermatu získaného tímto způsobem je nižší. Odběr spermatu se touto metodou provádí výjimečně jen pro diagnostické účely (Louda et al., 2001).

3.3.1 Hluboké mrazení semene

První pokusy s mrazením semene prováděli Prevost (1840) a de Quatrefages (1853) tak, že vystavovali sperma teplotám od 0 °C do – 17 °C. Avšak teprve Jahnel (1938) prokázal, že spermie mužů nejsou umrtveny ani teplotami tuhého oxidu uhličitého (- 79 °C), teplotami tekutého dusíku (-196°C) a také v prostředí tekutého helia (-269 °C), neboť při rozmrazení po 40 dnech došlo k oživení spermií. Zásadní obrat v problematice hlubokého chlazení nastal po roce 1949, kdy Polge, Smith a Parkes zjistili, že glycerol přidaný ke spermatu brání účinně poškození spermií během hlubokého chlazení. Lovelock (1954) upozornil na podobné působení dalších neutrálních látek nízké molekulární hmotnosti. Hlavní ochranný účinek nerozpuštěných neutrálních látek spočívá v jejich schopnosti zabraňovat přílišné koncentraci elektrolytů a jiných látek, které se vyskytují v ředidle (Gamčík, Kozumplík, 1984).

Poškození spermií nastává následkem zvýšené koncentrace solí, ke které dochází postupným mrznutím vody, z níž vypadávají soli, a ve zbytku tekuté fáze se tvoří hypertonický roztok. Je-li přidán ke spermatu glycerol, váže na sebe vodu a chrání ji před zmrazením, čímž tato voda slouží jako rozpouštědlo pro soli a jiné látky obsažené v roztoku. Zabrání se tak vytvoření vysoké koncentrace solí a jejich nepříznivému působení na spermie. V průběhu hlubokého chlazení i rozmrazování dochází k poškození určitého počtu spermií. Nejčastěji se toto poškození projevuje morfologickými změnami na hlavičkách spermií. Po rozmrazení je možno pozorovat i značné snížení pohyblivosti spermií, pokles glykolýzy a tvorby kyseliny mléčné. V některých případech jsou po rozmrazení změny ve vitalitě spermií takového rázu, že ejakulát není vhodný k použití. K největšímu odumírání spermií během hlubokého chlazení i rozmrazování dochází při poklesu teploty od 0 °C do – 40 °C (Gamčík, Kozumplík, 1984).

V průběhu zmrazování a rozmrazování spermií dochází ke složitým procesům přeměny skupenství vody a koncentrace roztoků v buňce (spermii) i mimo ni, a tím i k zatížení buněčné membrány. Důsledkem tohoto procesu přežívá jen určitý počet spermií (30 – 50 %). V průběhu zmrazování nastávají v podstatě dva kritické momenty tzv. „solution effects“ a tvorba krystalů. Solution effects nastávají převážně při pomalém zchlazování, zatímco nitrobuněčný led neboli krystaly vznikají při velmi rychlém zchlazování spermií. Solution effect začíná v průběhu mrazení spermatu, při kterém dochází k vytlačování vody ze spermie, ve které se zvyšuje koncentrace solí, postupně dochází k dehydrataci spermie (Louda et al., 2001).

3.4 Sexování spermii

Objevení a zdokonalování se v kryokonzervaci otevřelo cestu k další zajímavé metodě, a to k metodě sexování spermii. Výběr pohlaví při nebo před oplozením je pravděpodobně nejvíce požadovaná biotechnologie všech dob. Již Řekové před 2500 lety se o této otázce zmiňovali. Relativně přesvědčivé vědecké důkazy o tom, že samčí gamety určují pohlaví u savců, se objevili na počátku 20. století. Od té doby se nespočet investorů snažila vyvinout metodu oddělení X a Y spermii (Seidel, 2003).

Po mnoha neúspěšných pokusech o rozlišení spermii, které dávají samčí a které samičí pohlaví, přišel roku 1981 průlom, kdy se prokázalo, že může být měřen přesný obsah DNA ve spermii. Počáteční měření obsahu DNA spermie zabíjelo, ale postupem času se vyvinul systém, který byl schopen rozlišování nejen mezi živými X a Y spermii, ale i třídění do relativně čistých populací bez zjevného poškození buněk. Nejprve v roce 1989, byla nutná chirurgická inseminace, později se množství přeživších spermii zvýšilo, a tudíž se mohlo začít využívat IVF, potažmo i umělé inseminace (Garner et Seidel, 2008).

Na konci 80. let byla vyvinuta metoda průtokové cytometrické separace. Tato metoda je neúčinnější u skotu, u ostatních druhů hospodářských zvířat je zatím průtoková cytometrická separace méně účinná. Metoda je založena na rozdílu v množství DNA ve spermii. U skotu mají spermie s XX chromozomy o 3,8 % více DNA a jsou těžší než spermie s chromozomy XY. Tím, že jsou o trochu těžší a díky fluorescenčnímu barvivu, které se váže na DNA, jsou po ozáření laserem jasnější. Následně se spermii s XX chromozomy přidělí kladný náboj, spermii s XY záporný náboj. Podle náboje jsou spermie na konci kapiláry rozděleny dle pohlaví (Seidel, 2007).

Ze všech zvířat je sexování nejpoužívanější u skotu, díky tvaru spermii. U mléčného skotu je požadováno, co nejvíce samic, jelikož býci jsou jakýsi „odpad“. Dalším důvodem jsou bezproblémovější porody, protože samice mají nižší porodní hmotnost přibližně o 2 kg. Na druhou stranu je také možnost získat od nejlepších krav býčky, kteří budou zlepšovatelem chovu. Trendem této metody je použití dávek s nízkým počtem spermii. Bohužel zatím přetrvávají problémy s horšími výsledky zabřezávání. Problémem je pomalý proces sexování, a také jeho finanční náročnost. Řešením tohoto problému je zlepšení technologie sexování, používání pouze u jalovic, jelikož mají větší procento zabřezávání, než dojnice. A dále pečlivý výběr býků s dobrou oplozovací schopností (Seidel, 2007).

3.5 Ředění ejakulátu

Ředidla musí splňovat vhodné podmínky prostředí pro spermie, aby se nesnížila jejich oplozovací schopnost po dlouhou dobu, a mohla být použita pro větší počet plemenic (Kliment et al., 1983). Nejpoužívanějšími ředidly jsou ředidla žloutková.

Další alternativou jsou mléčná ředidla. Pro uchování spermií se používá zahříváné odstředěné nebo plnotučné mléko, ve kterém je daný ejakulát zředěn a uložen při 4 °C nebo zmrazen za přítomnosti glycerolu. Zdá se, že lipidy nejsou hlavní složkou, která je odpovědná za ochranu spermií, jelikož nezáleží, jestli je přidáno odstředěné mléko, nebo plnotučné (Bergeron et Manjunath, 2006). S největší pravděpodobností je nejhlavnější ochrannou složkou kasein, protože se dokázalo, že izolovaný kasein může chránit spermie hřebce, kozla, berana a býka, jak při 4°C, tak při kryokonzervaci. Mechanismus, kterým kasein spermie chrání, bohužel není přesně znám (Choong et Wales, 1963).

Po přidání laktózy se zvedla ochrana mražených býčích spermií, nicméně ředidlo, které obsahuje pouze laktózu a minerální látky je nedostačující na ochranu spermií. Proto se laktóza bere jako vylepšení účinnosti ředidla, ale nikoliv jako dostačující ochrana (Bergeron et Manjunath, 2006).

3.5.1 Žloutková ředidla

Hlavním cílem použití ředidel je zamezit vytváření smrtelných intracelulárních ledových krystalů a snížit poškození membrány během a po kryokonzervaci (Amirat et al., 2004).

Slepičí vaječný žloutek je nezbytnou přísadou pro přípravu široké škály potravinových emulzí, jako jsou majonézy, salátové dressingy a krémy. Hlavně přispívá k formování a stabilitě těchto emulzí díky vytvoření povrchového filmu mezi olejem a vodou. Ale žloutek je stále používán empiricky a fyzické vlastnosti emulzí žloutku nejsou zcela kontrolovány, protože žloutek je komplexní směs několika lipoproteinů a proteinů, tedy složky, kterým ještě není zcela porozuměno (Anton et al., 2003).

V průběhu posledních 60 let byly složky ředidel průběžně revidovány, ale základní složky zůstávají stejné. Vaječný žloutek, nebo mléko a glycerol představují nepostradatelné sloučeniny a používají se prakticky ve všech ředidlech uchovávající býčí ejakulát (Bergeron et Manjunath, 2006). Vaječný žloutek byl běžně používán v 20 % koncentraci, avšak

laboratorní studie ukázaly, že tato koncentrace ztěžuje standardizovat výsledky (Amirat et al., 2004).

Vaječný žloutek a mléko jsou produkty živočišného původu, a tudíž představují potenciální riziko kontaminace ejakulátu. Dalším problémem je, že jejich složení není jednotné. V důsledku toho je rostoucí zájem vyvinout nová ředidla bez přísad živočišného původu. Je však obtížné najít náhradní substance, jelikož mechanismy podílející se na ochraně spermií u žloutku i mléka zůstávají nejasné (Bergeron et Manjunath, 2006).

Kvůli přítomnosti substancí, které zabraňují dýchání spermií nebo snižují jejich motilitu, se začali množit požadavky na nahrazení celého vaječného žloutku. Proto by mohlo být prospěšné nahradit tyto škodlivé substance žloutku za pouhou účinnou frakci žloutku a přidat ho po extrahování do ředidla, spíše než celý vaječný žloutek (Moussa et al., 2002). Vaječný žloutek se skládá z 68 % z low-density lipoproteinů (LDL), 16 % high-density lipoproteinů (HDL), 10 % livetinů a ze 4 % fosvitinů (Anton et al., 2003).

3.5.2 BSP proteiny

Býčí semenná plazma obsahuje rodinu bílkovin BSP – A1/A2, BSP – A3 a BSP – 30 kDa, jež se souhrnně nazývají BSP proteiny. BSP proteiny jsou sekreční produkty semenných váčků, a představují až 65 % proteinů semenné plazmy býka. Tyto proteiny jsou přítomny u všech savců, ale jejich koncentrace v semenné plazmě se liší podle druhu (Bergeron et Manjunath, 2006).

Tyto proteiny se váží při ejakulaci na povrch spermie, a stimulují cholesterol a odtok fosfolipidů z membrány (Hu et al., 2011). Bergeron et Manjunath (2006) tvrdí, že hlavním mechanismem, kterým LDL chrání spermie je prostřednictvím sekvestrace hlavních proteinů BSP. LDL a BSP proteiny na sebe navzájem specificky působí, tak že LDL snižuje vazbu proteinů na spermie a zabraňuje výtoku lipidů z membrány spermií.

Interakce proteinů BSP a LDL je také spojeno s lecitinem, jehož přítomnost v ředidle pomáhá chránit spermie během procesu kryokonzervace. Na hřebčí sperma je stejně efektivní lecitin z vaječného žloutku, jako ze sójových bobů. Nicméně na býčí sperma je méně efektivní lecitin rostlinného původu, než z vaječného žloutku (Bergeron et Manjunath, 2006).

3.6 Low – density lipoprotein (LDL)

Přesný mechanismus, kterým vaječný žloutek pomáhá při ochraně spermií během zmrazení a rozmrazení není znám. Mnoho autorů předkládá hypotézu, že low density frakce žloutku, která se skládá hlavně z LDL, by mohla být z velké části zodpovědná za odolnost proti šoku z chladu a za zlepšení motility uskladnění. Někteří autoři předpokládají, že LDL by se mohlo lepit na buněčné membrány během procesu zmrazení a rozmrazení, a tím chrání membrány spermií. Ovšem jednotlivé role složek lipidů a proteinů v interakci s membránou spermií nejsou jasně určeny (Moussa et al., 2002).

LDL tvoří zhruba dvě třetiny celé pevné látky slepičího vaječného žloutku a je lokalizováno v rozpustné frakci vaječného žloutku nazývaného plazma. Hustota LDL představuje 0,982 g/ml (Moussa et al., 2002). LDL jsou velké kulovité částice o průměru kolem 35 nm s lipidovým jádrem triglyceridů a esterů cholesterolu obklopené fosfolipidovým a proteinovým filmem (Anton et al., 2003). Fosfolipidy hrají hlavní roli ve stabilitě struktury LDL, protože vazby jsou hlavně hydrofobní. LDL obsahuje 83 – 89 % lipidů a 11 – 17 % proteinů. Lipidy LDL jsou tvořeny zhruba 69 % triglyceridy, 26 % fosfolipidy a 5 % cholesterolu (Moussa et al., 2002).

Donedávna bylo pro očištění LDL od vaječného žloutku všeobecně používána metoda ultracentrifugace. Tato technika izolace poskytuje vynikající čistotu LDL, ale je to velmi časově náročné a extrahované množství je příliš malé, aby mohlo být použito pro komerční využití. Moussa et al, (2002) proto vymysleli způsob, cílem kterého bylo vyvinout takovou metodu extrahování LDL, která by dovolovala produkci na průmyslové úrovni.

Plasma oddělená od žloutku, byla smíchána s 40% síranem amonným jednu hodinu, aby se vysráželi živiny. pH plasmy bylo neměnné 8,7 a teplota byla ustálena na 4 °C. Supernatant od sedimentu oddělila centrifugace na 10 000 x g při 4°C n 45 minut. Supernatant byl poté nejméně 6 hodin dialyzován proti destilované vodě, aby se eliminoval sulfát amonný. Po úplné eliminaci sulfátu byl roztok znovu odstředěn a plovoucí reziduum plné LDL bylo sebráno (Moussa et al., 2002).

Tato metoda je relativně snadná, protože nepoužívá chromatografii nebo ultracentrifugaci a není časově náročná, pouze mírné stupně odstředění. LDL je možné extrahovat za 24 hodin, poskytuje výbornou čistotu LDL (97 %) a uspokojující výtěžek (67 %). Tuto metodu je

možné rozvinout na průmyslovou úroveň, aby se mohl LDL používat v komerčních ředidlech (Moussa et al., 2002).

3.6.1 Kryoprotektivní účinky LDL

V roce 1974 očistili Pace a Graham vaječný žloutek a zjistili, že frakce LDL vykazala kryoprotektivní vlastnosti. Poté mnoho dalších studií potvrdilo, že LDL očištěné od vaječného žloutku má stejné kryoprotektivní působení. Ředidlo obsahující LDL je méně komplexní v chemickém složení než standardní ředidlo, a má ochrannou funkci na plazmatické membrány, jež jsou vystavené kryokonzervaci (Hu et al., 2011).

Kryokonzervace může ovlivnit uspořádání lipidů a chemické složení plazmatické membrány spermií. Extender obsahující LDL je méně komplexní v chemickém složení než standardní extender, a má ochrannou funkci na plazmatickou membránu. LDL může nabídnout ochranu spermiím snížením škodlivého účinku semenných plazmatických proteinů na membrány. Výsledky studie Hu et al. (2010) poskytují důkazy, že 8 % LDL by mohlo být efektivnější než 7 % nebo 9 % LDL.

Je známo, že vaječný žloutek chrání spermie, ale také obsahuje substance, které zabraňují spermiím dýchat. V extenderu s celým vaječným žloutkem je prokázána u beraních a býčích ejakulátů, snížená motilita a metabolismus po rozmražení. Negativní účinky celého vaječného žloutku na životaschopnost spermií jsou přisuzovány HDL. Škodlivé substance v extenderu LDL chybí. Navíc bylo prokázáno, že složení vaječného žloutku je nestálé – záleží na plemeni, a výživě slepic (Hu et al., 2010).

Spermie, jež samovolně prodělají akrozomální reakci po ejakulaci nebo po zmražení nejsou schopné vazby na zonu pellucidu a proto nejsou schopné oplodnit vajíčko. Ve studii Hu et al. (2010) extender obsahující 8 % LDL poskytuje nejlepší ochranu akrozomální integrity, možná prostřednictvím přímého působení skrze výměnu nebo působením fosfolipidů akrozomální membrány nebo jednoduše proto, že extender obsahující LDL je méně bohatý na progesteron než vaječný žloutek kvůli filtrovacímu efektu membrány. Navíc je známo, že motilita je závislá na membránovém transportu. Procento spermií se ztrátou integrity plazmatické membrány kvůli zmražení je vyšší než procento spermií, u kterých je ztráta motility. Proto může být malé procento rozmražených spermií pohyblivých, ale poškozených (Hu et al., 2010).

Životaschopnost spermií může být po rozmrazení oslabena reaktivní formou kyslíku (ROS). K potlačení destruktivních účinků ROS mají spermie antioxidační systém sestávající z superoxiddismutázy (SOD), katalázy (CAT), redukovaný glutathion (GSH), glutathionperoxidáza (GSH-Px), což se zdá být velmi významné při ochraně spermií proti oxidačnímu poškození. Ovšem spermie mají vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně a chybí jim významná cytoplazmatická součást obsahující anti-oxidanty, a proto snadno podléhají poškození, hlavně po kryokonzervaci (Hu et al., 2011).

Všechny aerobní organismy potřebují k životu kyslík. Ačkoliv je produkce reaktivního kyslíku normální fyziologický jev, metabolity kyslíku jsou schopné neblaze modifikovat buněčné funkce, které ohrožují přežití buňky. Navíc se předpokládá, že extendery obsahující vaječný žloutek mohou zvýraznit účinky H_2O_2 . Během konzervace se kvalita semene zhoršuje a spermie bývají poškozeny. Systém anti-oxidantů skládající se z GSH, GSH-Px, CAD a SOD je popsán jako ochranný mechanismus proti peroxidaci lipidů v semeni, a důležitý pro zachování motility a životaschopnosti spermií. SOD je důležitá součást enzymatického anti-oxidačního systému. Potenciální role enzymu CAT může řídit oxidační stres u spermií a ovlivňuje téměř všechny parametry kvality semene, ale většina semene savců obsahuje málo nebo CAT vůbec neobsahuje. GSH hraje důležitou roli v intracelulárním ochranném mechanismu proti oxidačnímu stresu, protože může reagovat s reaktivním kyslíkem a jako kofaktor pro glutathion peroxidázu, vyvolává snížení toxického H_2O_2 a hydroperoxidů. Protože zrající spermie vyřadí většinu své cytoplazmy během finálních fází spermatogeneze, buňky ztratí některé z jejich obranných enzymů. Proto jsou buňky spermií náchylné snadno náchylné k peroxidačnímu poškození, hlavně po zmrazení, s následující ztrátou membránové integrity, poškozením buněčných funkcí, sníženou motilitou a schopností oplození (Hu et al., 2011).

3.6.2 Současný stav experimentálního účinku LDL v ředidlech

Studie Amirata et al. (2005) byla poháněna myšlenkou nalezení lepšího ředidla, než jsou stávající. Pro to je potřeba několika kritérií. Ředidlo pro kryokonzervaci by mělo obsahovat zdroj energie přirozeně využívaný buňkami, jako je fruktóza. Zároveň by měl obsahovat dost solí, které vyrovnávají osmolaritu před zmrazením, a přitom zabránit vysokým koncentracím solí, jež by mohly buňku poškodit. Během procesu mražení se počáteční koncentrace solí zvýší 6,25 krát.

Navíc by mělo ředidlo samozřejmě mít optimální pH, mít viskózní charakter, a hlavně by měl obsahovat propustný netoxický kryokonzervant s vysokou mírou propustnosti membrány. V této práci Amirat et al. (2005) nejdříve srovnali ultrastrukturu býčích spermií po inkubaci 1, 4 a 24 hodin při 4 °C v ředidle obsahujícím vaječný žloutek – Triladylu, v druhém obsahujícím LDL a ve třetím obsahující jinou komerční náhradu vaječného žloutku Biociphu. Ultrastruktura byla studována pomocí elektronového mikroskopu. Poté byly k porovnání efektů použity vzorky po procesu kryokonzervace, a nakonec byla životaschopnost spermií po rozmrazení zhodnocena mírou motility.

LDL bylo o hodně méně agresivní k buňkám inkubovaným až 4 hodiny, tedy doba srovnatelná s většinou klasických zmrazovacích protokolů. Nebyly pozorovány žádné změny plasmatických membrán, a žádné nebo velmi málo opravdových akrozomálních reakcí. Pouze u 7 % buněk se po 4 hodinách ukázal zvětšený akrozom bez rozptýleného akrozomálního obsahu. To by mohlo korespondovat s mrtvými buňkami podléhajícími autolýze. Tento vzorec platil i po kontaktu s LDL po dobu 24 hodin, ale bylo přítomno více poničených plasmatických membrán a autolyzujících akrozomů. Ovšem 63 % buněk bylo nepoškozených. Ve zmraženém stádiu tvořila organická část extenderu, hlavně LDL, vrstvy nedostatečné tloušťky k ochraně spermií před kontaktem s velkými ledovými krystaly. Buňky zapuštěné z části v LDL a z části v ledu vykazovaly očekávané vzory – silně dehydratované v ledu, zatímco normálně hydratované nebo mírně dehydratované v LDL, v závislosti na umístění buněk v pejetách (Amirat et al., 2005). Větších vrstev by pravděpodobně mohlo být dosaženo s extenderem obsahujícím více LDL a tyto extendery by mohly přinést i více ochrany, ale studie Moussy et al., (2002) prokázala významné snížení motility semene, když bylo LDL použito ve vyšším procentu. Motilita, které bylo dosaženo po rozmrazení, byla o hodně lepší než ta, které bylo dosaženo u Triladylu. To je pravděpodobně z velké části způsobeno dobrou konzervací živých buněk před zmražením (Amirat et al., 2005).

Po porovnání ředidel bylo zjištěno, že po 1 hodině inkubace bylo u Triladylu nepoškozených 46 % spermií, zatímco u LDL a Biociphu byla nepoškozená většina buněk. Nejvyšší procentuální podíl akrozomálního poškození byl tedy zaznamenán po inkubaci s Triladylem, zároveň u Biociphu byl vyšší než u LDL. Po 4 hodinách inkubace bylo u LDL 89,7 % nepoškozených buněk, což byla nejvyšší hodnota, protože Biociphos měl 46,9 % nepoškozených spermií, a Triladyl pouhých 11,6 %. Navíc se u Triladylu ukázalo, že má 43 % spermií natrženou plasmatickou membránu. LDL vyšlo nejlépe i po 24 hodinách inkubace,

jelikož 63,2 % spermií bylo neporušeno, zatímco u Biociphu pouze 23 % a u Triladyly 5 % (Amirat et al., 2005).

Motilita, VSL a VAP byly významně vyšší u semene zmrazeného v ředidle obsahujícím 8 % LDL v porovnání se semenem zmraženým v Triladyly, ale nebyl nalezen rozdíl u VCL. Mezi ředidly LDL a Biocphem nebyl nalezen významný rozdíl, nicméně významný rozdíl byl mezi Triladylem a Biociphem (Amirat et al., 2005).

3.6.3 Účinky LDL na inseminační dávky s vysokým stupněm ředění

Zředění na nízký počet spermií na dávku vede k redukcí životaschopnosti po rozmrazení. Je totiž možné, že ve vyšších mírách zředění chybějí nezbytné součásti semenné plazmy. Nicméně momentálně je trendem umělá inseminace dávkami s vysokým stupněm ředění, jelikož se optimalizuje využití elitních plemenných býků. Proto Vera-Munoz et al. (2009) vytvořili studii, jejímž cílem bylo zhodnotit účinky kryokonzervace při vysokých mírách zředění na motilitu spermií a integritu plazmatické membrány s použitím extenderu LDL ve srovnání s Bioxcellem a Triladylem.

Autoři sledovali změnu motility u čerstvého a mraženého ejakulátu, a dle předpokladů mělo čerstvé semeno vyšší motilitu než zmražené, v různých mírách koncentrace i extenderech. Motilita byla významně vyšší u semen, které bylo zmrazeno v extenderu obsahujícím 8 % LDL, v porovnání se semenem zmraženým v Triladyly a Bioxcellu. Ztráta motility kvůli zmrazení byla pro LDL: 20,9%, 32,1%, 44,6% pro koncentraci 120×10^6 , 60×10^6 , 20×10^6 spermií/ml. Pro Triladyl: 27,5 %, 41,3 %, 56,8 %, a pro Bioxcell byla ztráta: 28,1 %, 40,6 %, 55,7 % při stejné koncentraci ejakulátu.

Tyto výsledky dokazují, že po zmrazení ve vysokých mírách zředění nebo se sníženými počty spermií na dávku vzniká výrazná redukce motility býčího spermatu a funkčnosti membrány. Býčí semenná plazma obsahuje směs sekrecí z varlat, nadvarlat a přídatných pohlavních žláz. To obsahuje prospěšné proteiny, které podporují funkci, motilitu a životaschopnost spermií, a zároveň pomáhají zabraňovat samovolné kapacitaci a akrozomální reakci, jenž činí spermii neplodnou. Při nejvyšších zředěních by mohly být tyto prospěšné elementy zředěny, což by snižovalo ochranu spermií (Vera-Munoz et al., 2009).

Redukce motility spermií a integrity membrány se po kryokonzervaci semene lišila dle použitého extenderu, což naznačuje, že sloučeniny přítomné v extenderu mají různé účinky

na membránu a bičíkové struktury. LDL extender byl v ochraně motility a integrity plazmatické membrány ve vysokých mírách zředění efektivnější, než Triladyl a Bioxcell. Jak již bylo řečeno, kryokonzervace ovlivňuje uspořádání lipidů a chemické složení v plazmatické membráně spermie (Vera-Munoz et al., 2009). Přidání LDL poskytlo vyrovnávací ochranu proti škodlivým účinkům zředění a zmrazení v porovnání s Bioxcellem a Triladylem. V této studii byl použit opět 8 % LDL extender, což se prokázalo jako nejlepší koncentrace, která umožňuje ochranu spermii po zředění na 30 milionů spermii na dávku (Vera-Munoz et al., 2009).

Menší poměr spermii s nedotčenými a funkčními membránami po zmrazení a rozmrazení, než u čerstvého semene naznačuje, že některé spermie byly poškozeny právě kvůli tomuto procesu, a to u všech tří extenderů. Snížení integrity membrány bylo významně menší u 8 % LDL, než bylo u Triladylu a Bioxcellu. Navíc byla nalezena významná korelace mezi procentem pohyblivých spermii a počtem spermii, které zbytněly. Procento spermii se ztrátou integrity membrány během kryokonzervace bylo větší než procento spermii, u kterých byla ztráta motility. To dokázalo, že malé procento zmrazených a rozmrazených spermii může být stále pohyblivé, ale zároveň poškozené (Vera-Munoz et al., 2009).

Autoři tuto studii uzavírají tím, že vyšší zředění snižují přežití spermii po kryokonzervaci. Ale 8 % LDL nabízí nejlepší ochranu spermii při koncentraci 5 a 15 milionů spermii na dávku, oproti Triladylu a Bioxcellu. LDL extender by tedy mohl být používán místo těchto dvou ředidel při vyšších stupních ředění býčího ejakulátu (Vera-Munoz et al., 2009).

3.6.4 Glutamin a LDL

Glutamin je používán ve složení ředidel u několika živočišných druhů, ale zatím ne u býků. Proto Amirat-Briand et al. (2009) vytvořili studii, jejímž cílem je demonstrovat kryoprotektivní roli glutaminu při zmrazení býčího semene a určit jeho koncentraci za účelem zlepšení motility a trajektorie spermii. Mezi aminokyselinami používanými pro rozmrazování zvířecího semene se ukázalo, že glutamin je efektivní u několika druhů: člověk, hřebeč, pes, osel a kozel.

Autoři v této studii provedli 3 experimenty. V prvním pokusu byl glutamin přidán do základního media, který se skládá z Tris + glycerol 6,4 % (v/v). Druhý pokus byl odlišný, jelikož byl glutamin zředěn na 40, 80 a 120 mM a přidán k 8 % LDL. Při třetím pokusu byla

určena nejlepší koncentrace glutaminu, což byla 40 mM. Glutamin se poté přidal do extenderu LDL v 10, 20, 30 a 40 mM koncentraci (Amirat-Briand et al., 2009).

Touto studií Amirat-Briand et al. (2009) ukázali, že použití glutaminu ve spojení s 6,4 % glycerolu (bez vaječného žloutku nebo LDL) má kryoprotektivní účinky. Zahrnutí glutaminu umožňuje zlepšení parametrů motility a pohybu spermií. Tato studie demonstruje, že glutamin jednoznačně hraje kryoprotektivní roli při zmražení a rozmražení býčího semene, ale motilita, které bylo dosaženo po zmražení a rozmražení se samotným glutaminem není dostatečná pro nahrazení vaječného žloutku nebo LDL v ředidlech. Minimální motilita vyžadovaná pro umělou inseminaci je 30 %. Použití glutaminu v koncentraci větší než 40 mM v kombinaci s LDL ve srovnání s LDL bez glutaminu nezlepšuje motilitu spermií. Navíc bylo zaznamenáno snížení motility, když byl použit glutamin v koncentraci 80 mM a více, což naznačuje, že glutamin je pro spermie ve vysokých koncentracích toxický. Použití glutaminu v koncentraci 40 mM a více tudíž nemá praktického významu při mražení býčího ejakulátu. Nicméně koncentrace nižší než 40 mM vedou ke zřetelnému zlepšení motility spermií. Studie Amirat-Briand et al. (2009) také ukázala, že 10 mM přidaná do extenderu LDL je nejlepší koncentrace pro zmražení býčího ejakulátu, a vede k významnému zlepšení motility, tudíž by mohl být použit ke zlepšení ředidel pro býky.

4 Metodika

4.1 Charakteristika býků

Do studie byli zařazeny vzorky ejakulátu různých plemen býků chovaných na inseminační stanici Natural Hradištko.

1. NEO 178, ORTY, Holštýnské plemeno, narozen 3. 9. 2010
2. NEO 141, CHOICE, Holštýnské plemeno, narozen 16. 6. 2010
3. ZAA 729, ROCKY, Aberdeen Angus, narozen 1. 4. 2008
4. ZGA 400, XAVER, Galloway, narozen 6. 3. 2009

4.2 Sběr a zpracování ejakulátu

Ejakulát byl odebrán od býků na inseminační stanici Natural Hradištko standardním způsobem do umělé vagíny. Byl posouzen objemu ejakulátu, koncentraci spermií a procenta pohyblivých spermií ($\geq 70\%$). Vzorky, které odpovídaly limitům byly transportovány v chladicím boxu při teplotě 6 – 8 °C do laboratoře.

Ejakulát byl zředěn na koncentraci cca 30×10^6 spermií/ml. Pejety byly po naplnění pomocí pipety uloženy do lednice na dobu jejich ustálení, která trvá 4 hodiny. Po této době byly pejety vloženy do polystyrenového boxu, který je upraven pro kryokonzervaci. 10 minut byly drženy při teplotě -120 °C v dusíkatých párách a následně ponořeny do kapalného dusíku (-196 °C), kde byly skladovány.

4.3 Příprava ředidel

Byl hodnocen vliv přídavku LDL o různých koncentracích do složení komerčních ředidel AndroMed, Triladyl (obě od firmy Minitübe Germany) a Bioxcell (od firmy IMV France). K přípravě ředidel byl použit čistý dialyzovaný LDL, komerčně vyráběná ředidla a deionizovaná voda. Nejprve se přes filtrační papír přefiltroval vaječný žloutek, který se použil na přípravu kontrolních vzorků ředidla Triladyl. Zbylé vzorky byly namíchány se stanovenou koncentrací LDL. Triladyl byl namíchán v poměru 1 (koncentrát): 3 (voda) : 1 (žloutek). AndroMed a Bioxcell byly namíchány v poměru 1:4 pro kontrolní vzorky, do zbylých byla přidána stanovená koncentrace LDL. Zpracování ředidel i ejakulátu probíhalo v chladicím boxu. Ředidla byla připravena dle návodu výrobce a rozdělena na 3 díly, do každého se přidal LDL o určité koncentraci.

4.4 Extrakce LDL

LDL bylo připraveno v souladu s metodikou Moussy et al., 2002. Slepíčí vejce byla získána z Biopharm Inc, a výroba frakce LDL byla zajištěna společností Henna a.s.

Za prvé, vaječný žloutek musel být ručně oddělen od bílku a skutálen na filtrační papír, aby se oddělili chalázy a stopy bílku držící se na vitelinní membráně. Poté byla membrána narušena řezem skalpelu, a žloutky byly odebrány do kádinky, chlazené ve vodě při 4 °C. Vaječný žloutek se zředil s 0,17 M NaCl a centrifugoval se při 10 000 x g 45 minut. Po odstranění supernatantu se postup opakuje. Aby se odstranili livetiny, přidalo se 20,5 g síranu amonného a znovu se centrifugovalo. Supernatant, bohatý na LDL se dalších 10 hodin dialyzoval proti destilované vodě, kvůli odstranění síranu amonného. Dalším krokem byla opět centrifugace, kdy vznikl výsledný sediment s LDL o čistotě nejméně 97 %, a který byl dále skladován při 4 °C.

4.5 Hodnocení motility spermií

Motilita spermií byla hodnocena pomocí CASA modulu (NIS Elements Ar 3.2.), s použitím kamery JENOPTIK ProGres CT1 (30 fps) a stereo mikroskop (Nikon Eclipse E600) s vyhřívanou podložkou (Tokai Hit). Ze vzorku byl odebrán objem 3 µl, který byl hodnocen v kalibrované počítačové komůrce Leja® (hloubka 20 µm). Jeden vzorek byl hodnocen v 6 polích. Nativní a kryokonzervované vzorky byly hodnoceny po 5 minutovém temperování („0 hodin“), a po 2 hodinové inkubaci ve vodní lázni při 37 °C. U obou případů byly posuzovány 3 parametry motility – rychlost hlavičky na skutečné dráze, průměrná rychlost mezi body měření (VCL, µm/s), rychlost hlavičky na napřímené dráze, slouží k plynulejšímu vyjádření pohybu (VAP, µm/s), rychlost hlavičky na přímé dráze, mezi výchozím a konečným bodem měření (VSL, µ/s).

4.6 HOS test

Hypoosmotic swelling test patří mezi jednoduché průkazy membránové úrovně spermií stanovením jejich semipermeability. U intaktních buněk vlivem hypoosmotických podmínek dochází průnikem vody a zvětšováním buněčného objemu ke stáčení bičíků (Věžník et al., 2004).

Rozpustilo se 0,735 g citrátu sodného ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 1,351 g fruktózy ve 100 ml destilované vody. Alikvoty tohoto roztoku se skladovaly zmrazené při $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Rozmrazily se a smísily před použitím. 1 ml roztoku se zkumavce Eppendorf se zahřál na 5 minut na teplotu $37\text{ }^\circ\text{C}$. Přidal se 0,1 ml ejakulátu a jemně se promíchal. Inkuboval se při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Po inkubaci se promíchal a zhotovil se nátěr. Po dobarvení eosin-nigrosinem se pozoroval pod imerzním objektivem.

4.7 Statistická analýza

Získané údaje se průběžně zapisovaly do programu MS Excel, po kontrole a úpravě dat proběhla statistická analýza. Statistická analýza byla provedena pomocí programu Statistika 12, byly použity multifaktoriální metody ANOVA, následně Schéffeho post-hoc test.

5 Výsledky

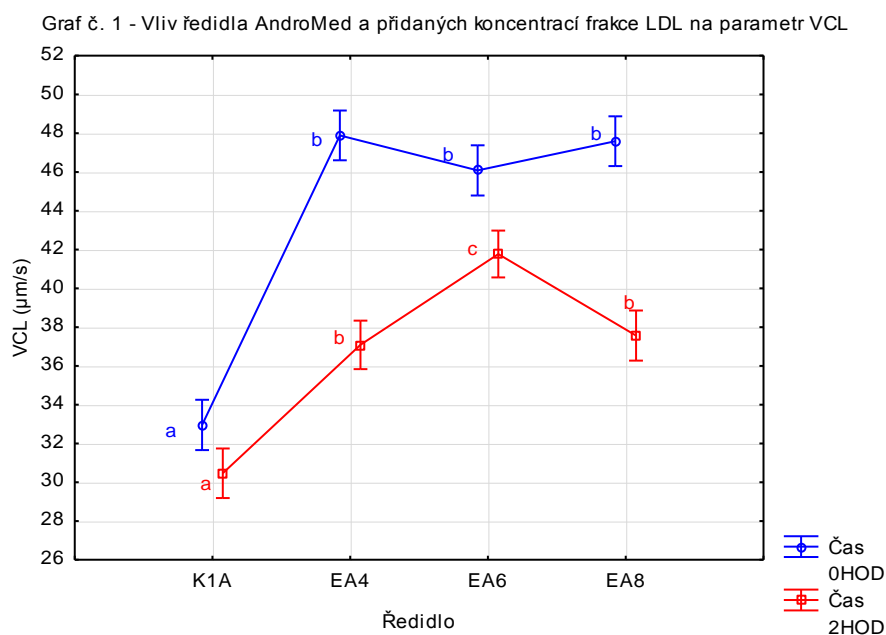
Výsledky jsou zpracovány po jednotlivých ředidlech, poté jsou porovnány nejlepší koncentrace a kontrolní vzorky, a nakonec je vyhodnocen HOS test.

5.1 AndroMed

Výsledky analýzy motility spermií v rozmrazených inseminačních dávkách na bázi ředidla AndroMed dokumentují grafy č. 1 – 4.

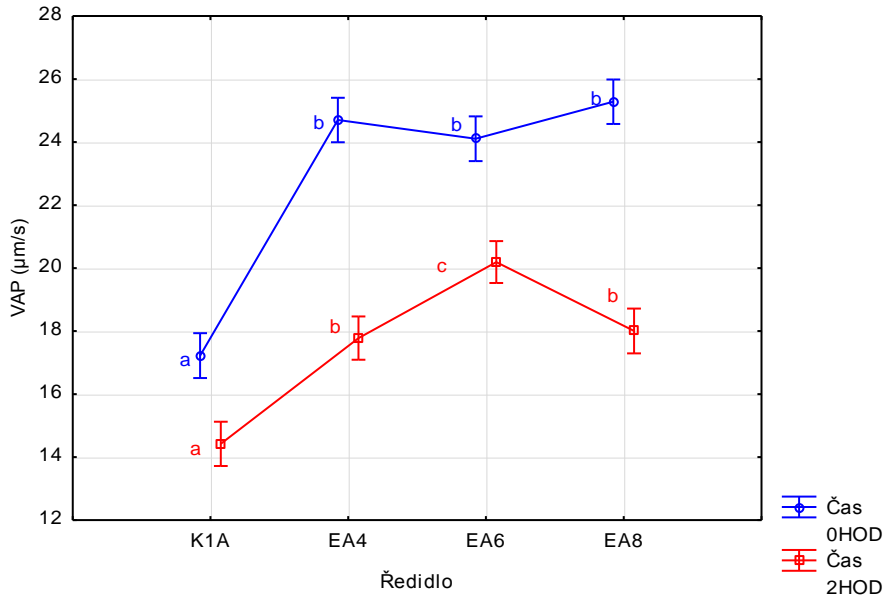
Kontrolní vzorek se průkazně lišil v čase 0 a 2 hodiny ve všech hodnocených parametrech, mimo parametru VCL.

V čase 0 hod. je u 4% koncentrace LDL, a po 2 hodinách, ve všech hodnocených parametrech statisticky významný rozdíl. Nejvýraznější je rozdíl u parametru VCL, kdy je v čase 0 hodin rychlost 47,890 $\mu\text{m/s}$ a po 2 hodinách se rychlost snížila na 37,087 $\mu\text{m/s}$. U 6% koncentrace je jediný parametr ALH bez průkazného rozdílu. Parametr VAP je neodlišnější – v čase 0 hodin je rychlost 24,106 $\mu\text{m/s}$, a po 2 hodinách klesla na 20,191 $\mu\text{m/s}$. 6% koncentrace se u AndroMedu ukázala jako optimální. Výsledky 8% koncentrace jsou srovnatelné s 4% - nejsou mezi nimi statistické rozdíly v žádném parametru.



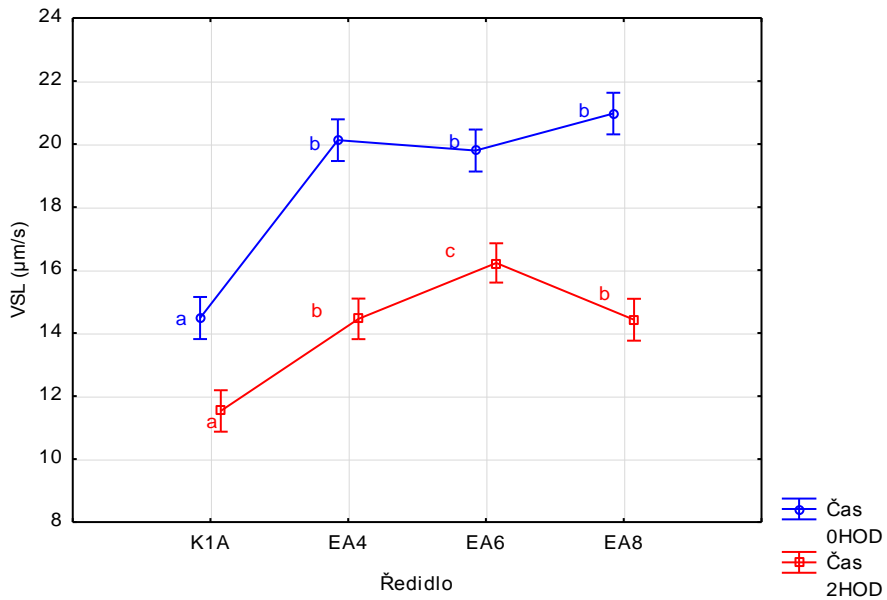
a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 2 - Vliv ředidla AndroMed a přidanych koncentrací frakce LDL na parametr VAP



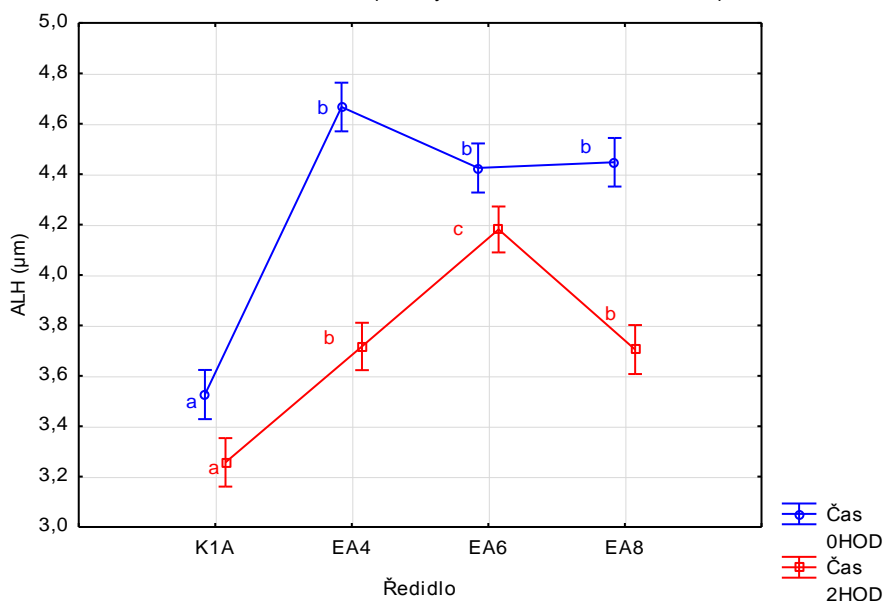
a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 3 - Vliv ředidla AndroMed a přidanych koncentrací frakce LDL na parametr VSL



a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 4 - Vliv ředidla AndroMed a přidávaných koncentrací frakce LDL na parametr ALH



a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.2 Bioxcell

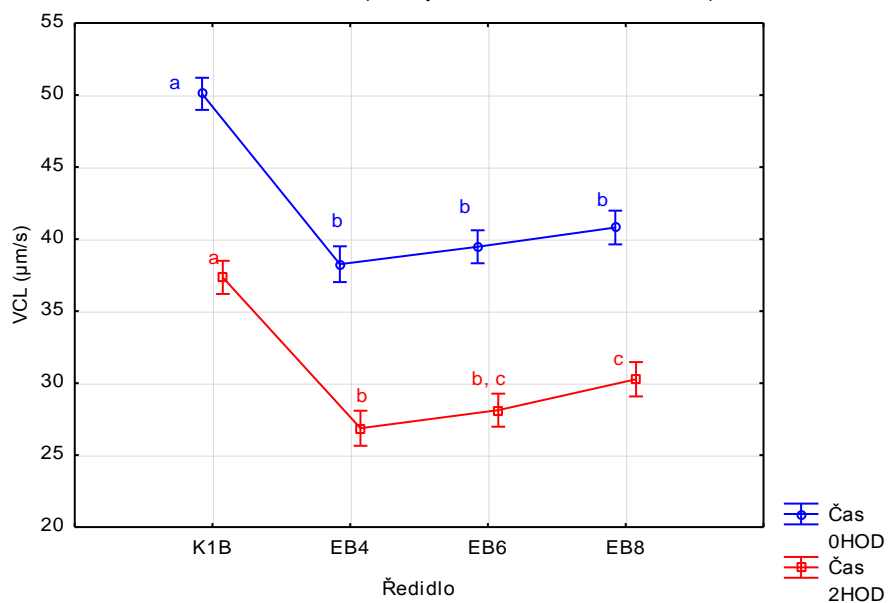
Výsledky analýzy motility spermií v rozmrazených inseminačních dávkách na bázi ředidla Bioxcell dokumentují grafy č. 5 - 8.

U všech hodnocených parametrů je u kontrolního vzorku v čase 0 a 2 hodiny statisticky významný rozdíl, a zároveň mají všechny koncentrace u všech hodnocených parametrů klesající tendenci vůči kontrolnímu vzorku.

4% koncentrace LDL vyšla u Bioxcellu jako nejhorší. U všech sledovaných parametrů je v čase 0 a 2 hodiny statisticky průkazný rozdíl. Podle grafu č. 7 je nejvýraznější rozdíl v parametru VSL, kdy je rychlost 12,985 $\mu\text{m/s}$ v čase 0, a 11,072 $\mu\text{m/s}$ po 2 hodinách. 6% koncentrace se opět statisticky liší ve všech parametrech. Nejlépe vyšla 8% koncentrace LDL, opět je mezi všemi parametry průkazný rozdíl.

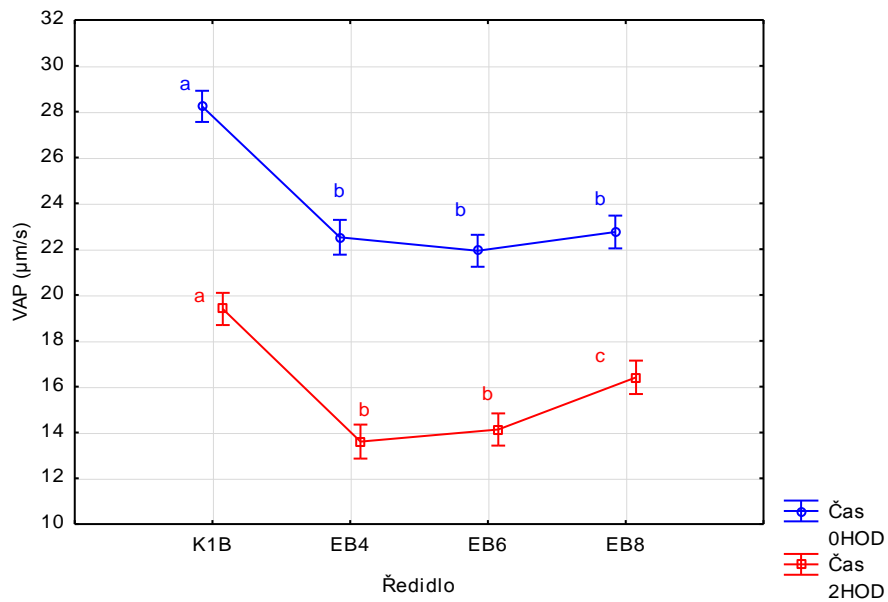
Po 2 hodinách je průkazný rozdíl mezi 4% koncentrací, kdy je rychlost 50,088 $\mu\text{m/s}$ a 8% koncentrací, kdy je rychlost 30,267 $\mu\text{m/s}$ v parametru VCL. V parametrech VAP a VSL je významný rozdíl mezi koncentracemi 4% a 8% (VAP = 13,600 $\mu\text{m/s}$ a 16,404 $\mu\text{m/s}$, VSL = 11,072 $\mu\text{m/s}$ a 13,743 $\mu\text{m/s}$), potom mezi koncentracemi 6% a 8% (VAP = 14,127 $\mu\text{m/s}$ a 16,404 $\mu\text{m/s}$, VSL = 11,416 $\mu\text{m/s}$ a 13,743 $\mu\text{m/s}$).

Graf č. 5 - Vliv ředidla Bioxcell a přidanych koncentrací frakce LDL na parametr VCL



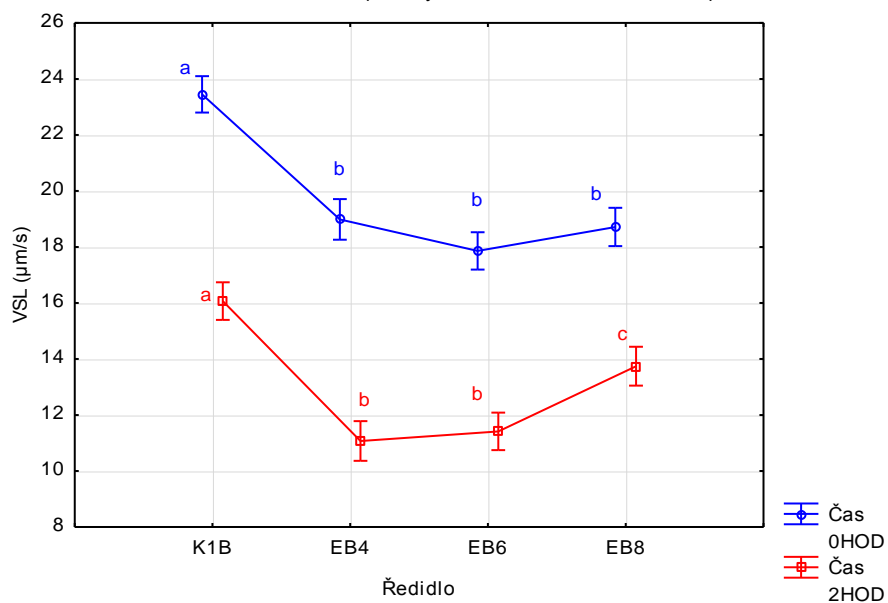
a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 6 - Vliv ředidla Bioxcell a přidanych koncentrací frakce LDL na parametr VAP



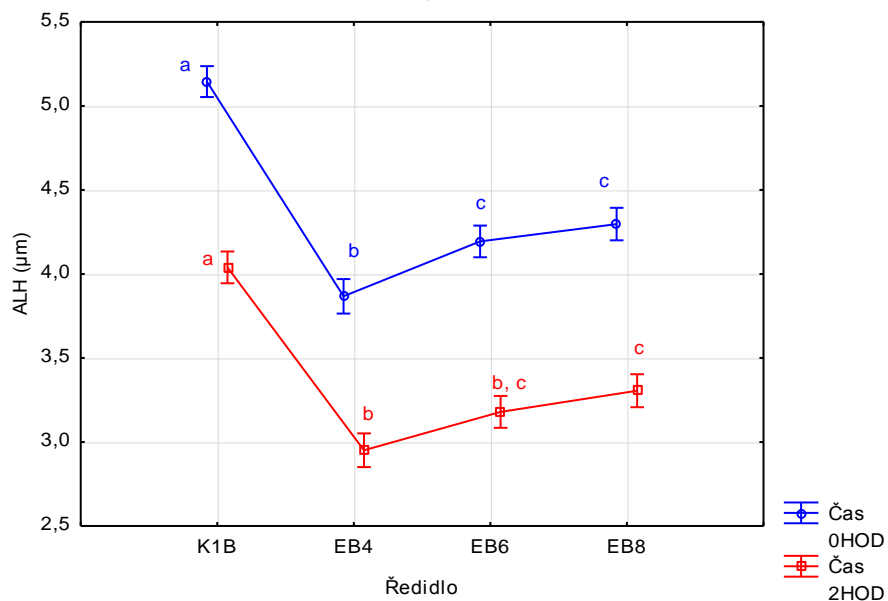
a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 7 - Vliv ředidla Bioxcell a přidání koncentrací frakce LDL na parametr VSL



a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 8 - Vliv ředidla Bioxcell a přidání koncentrací frakce LDL na parametr ALH



a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

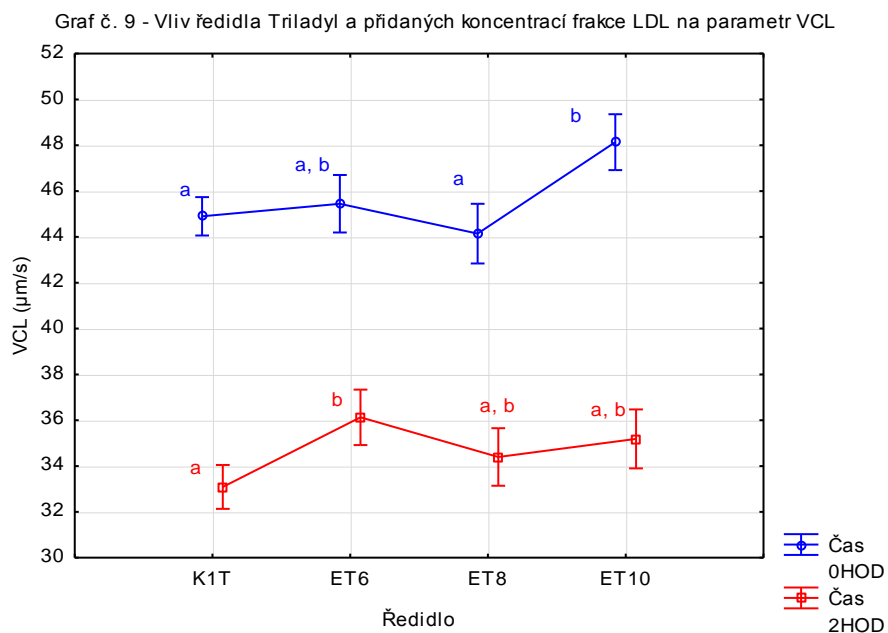
5.3 Triladyl

Výsledky analýzy motility spermií v rozmrazených inseminačních dávkách na bázi ředidla Triladyl dokumentují grafy č. 9 – 12.

Mezi časem 0 a 2 hodiny je u kontrolního vzorku u všech parametrů statisticky významný rozdíl.

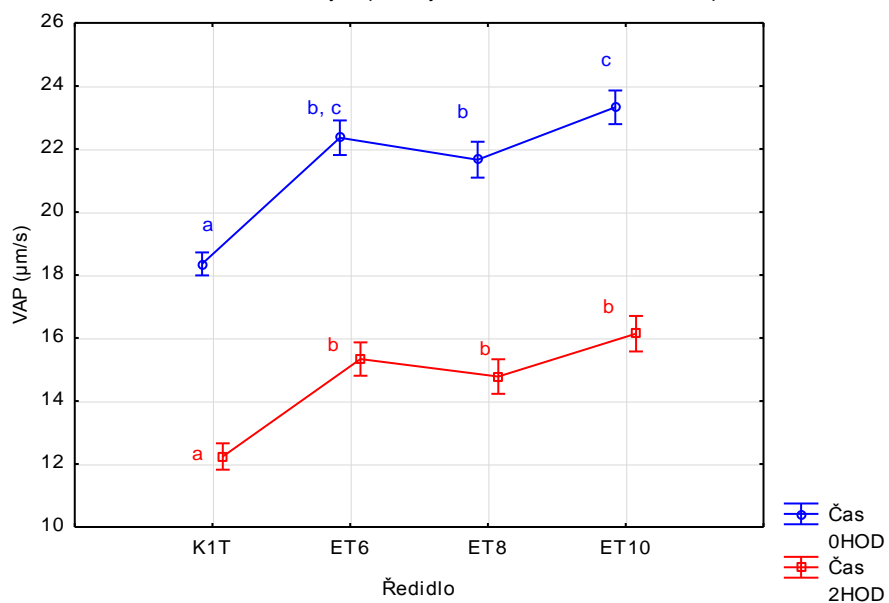
U Triladylu vyšla nejlépe 10% koncentrace, u které je ve všech sledovaných parametrech v čase 0 a 2 hodiny průkazný rozdíl. To samé se dá říci i u ostatních koncentrací.

Nejzajímavějším parametrem je ALH, jelikož dle grafu č. 12 pohyb spermií ve všech koncentracích klesá vůči kontrolnímu vzorku v obou časech. Statisticky významný rozdíl je v čase 0 mezi 10% (ALH = 4,7763 μm) a 8% (ALH = 4,2034 μm), poté mezi 6% (ALH = 4,5748 $\mu\text{m/s}$ a 8% (ALH = 4,2034 μm). Po 2 hodinách je významný rozdíl pouze mezi 10% koncentrací (ALH = 3,9194 μm) a 8% (ALH = 3,6222 μm).



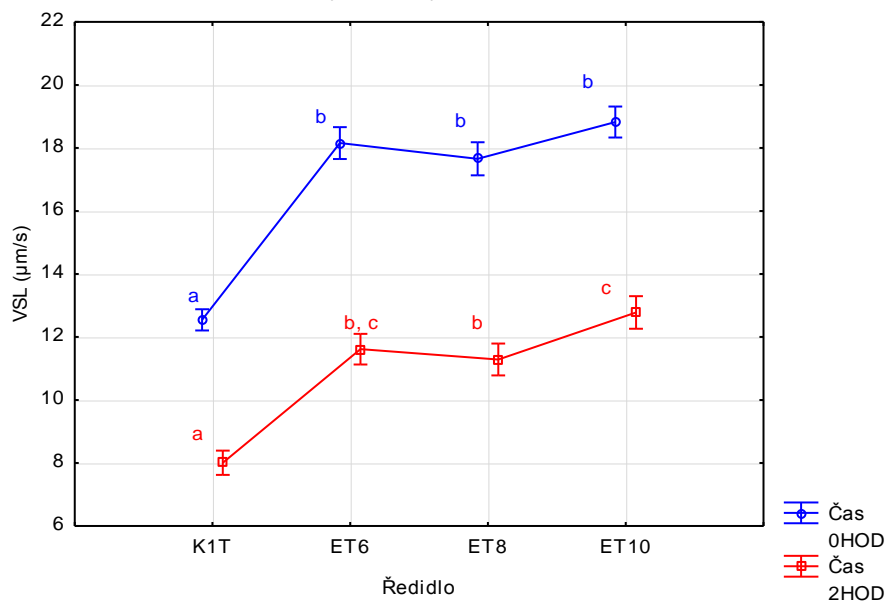
a, b – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 10 - Vliv ředidla Triladyl a přidanych koncentrací frakce LDL na parametr VAP



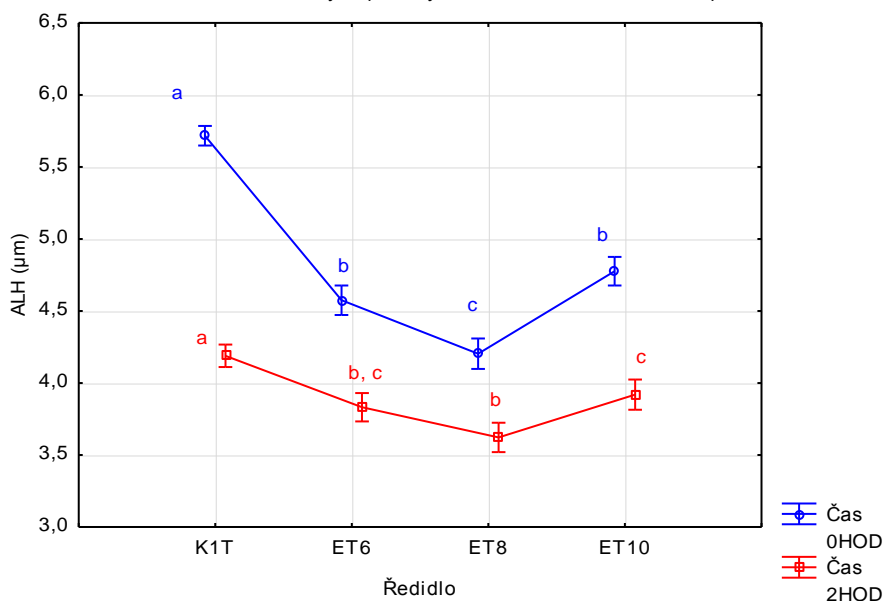
a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 11 - Vliv ředidla Triladyl a přidanych koncentrací frakce LDL na parametr VSL



a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Graf č. 12 - Vliv ředidla Triladyl a přidanych koncentrací frakce LDL na parametr ALH



a, b, c – hodnoty označené shodnými indexy se statisticky významně neliší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.4 Porovnání nejlepších koncentrací a kontrolních vzorků u jednotlivých parametrů

5.4.1 VCL

Dle jednotlivých ředidel se nejlépe uplatnily vzorky EA6, EB8 a ET 10. Ukázalo se, že po 2 hodinách inkubace je statisticky významný rozdíl mezi EA6 (VCL = 41,771) a EB8 (VCL = 30,267) i ET10 (VCL = 35,184). Z toho vyplývá, že v tomto parametru je nevhodnější EA6.

Kontrolní vzorky mají všechny mezi sebou statisticky významné rozdíly již před inkubací. K1A (VCL = 32,954), K1B (VCL = 50,088) a K1T (VCL = 44,900). Po 2 hodinách inkubace se od sebe liší pouze K1A (VCL = 30,462) a K1B (VCL = 37,340). Zajímavostí je, že nejlépe vychází Bioxcell, který po přidání frakce LDL, se jeví nejhůře.

5.4.2 VAP

I u tohoto parametru se ukázali po 2 hodinách stejné statisticky významné odlišnosti jako v předchozím parametru. U EA6 je (VAP = 20,191), EB8 má hodnotu (VAP = 16,404) a hodnota u ET10 (VAP = 16,136). Výsledkem tedy je, že opět EA6 vychází nejlépe.

V 0 hodině se od sebe průkazně liší K1A (VAP = 17,222) a K1B (VAP = 28,234). K1B se také průkazně odlišuje od K1T (VAP = 18,352). Po inkubaci zůstává situace stejná jen s rozdílnými hodnotami parametru K1A (VAP = 14,421), K1B (VAP = 19,389), K1T (VAP = 12,238).

5.4.3 VSL

Statisticky průkazně se u tohoto parametru liší pouze EA6 (VSL = 16,226) a ET10 (VSL = 12,778) také po 2 hodinách inkubace. Proto můžeme říci, že ET10 je pro tento parametr nejméně vhodný.

U VSL zůstává situace před inkubací, pokud jde o průkazné rozdíly stejná. K1A (VSL = 14,478), K1B (VSL = 23,450), K1T (VSL = 12,544). Po inkubaci nastaly změny v tom smyslu, že mezi sebou liší všechny vzorky navzájem, tudíž K1A (VSL = 11,529), K1B (VSL = 16,069) a K1T (VSL = 8,0083).

5.4.4 ALH

Zajímavé je, že u parametru ALH se naopak průkazně liší EA6 (ALH = 4,1807) a EB8 (ALH = 3,3052), opět po inkubaci. Tudíž je v tomto parametru nejméně vhodný EB8.

Před inkubací se od sebe navzájem opět významně odlišují všechny vzorky, to znamená, že K1A (ALH = 3,5258), K1B (ALH = 5,1449), K1T (ALH = 5,7167). Po inkubaci se udály změny v tom, že se průkazně liší K1B (ALH = 4,0394) a K1T (ALH = 4,1887) od K1A (ALH = 3,2565).

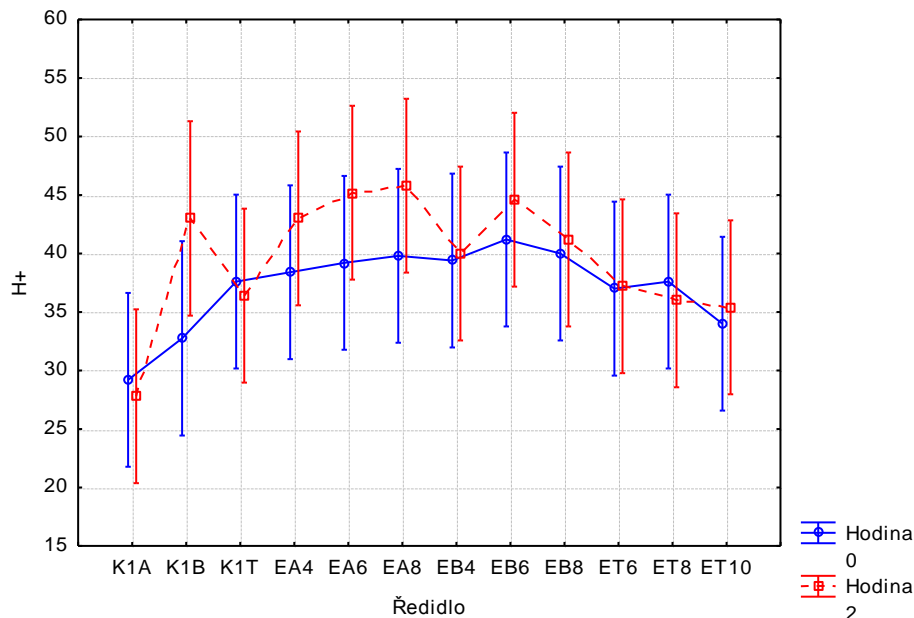
S jistotou tedy můžeme říci, že AndroMed s 6% přídavkem frakce LDL zachovává po kryokonzervaci býčím spermiím nejvyšší motilitu ze všech použitých ředidel a přidaných koncentrací, a zároveň ve všech sledovaných parametrech motility. Pokud jde o kontrolní vzorky, tak s nejlepšími hodnotami přichází jednoznačně Bioxcell.

5.5 HOS test

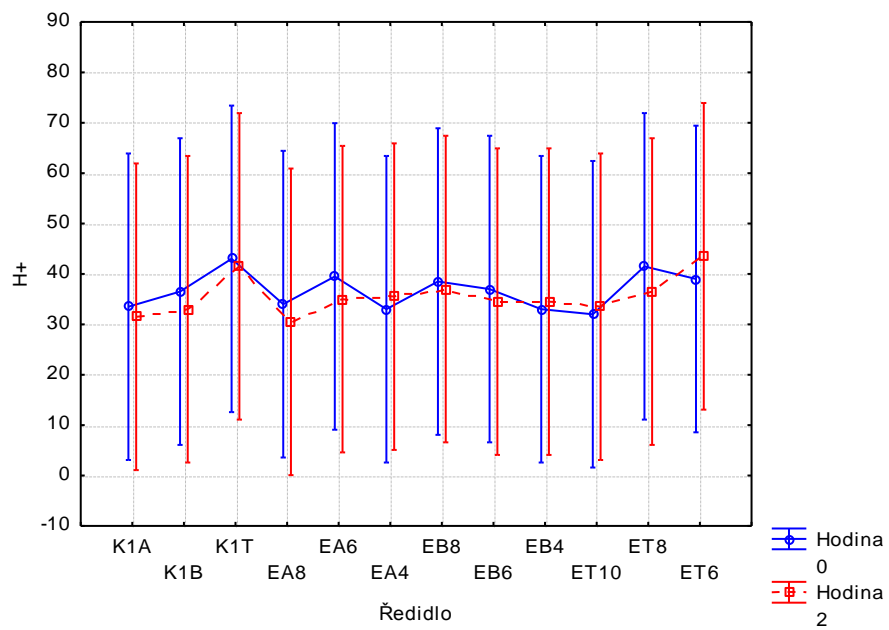
Hypoosmotický test ukázal, mimo jiné, vliv plemene na přežitelnost spermií. Větší přežitelnost spermií ukázala mléčná plemena, jelikož průměr H+ spermií je 38,41525%, kdežto u masných plemen je průměr 36,125%. U masných plemen je i větší míra variability, protože směrodatná odchylka je 15,33127, a u mléčných plemen je pouze 8,731832.

HOS test neprokázal žádné statisticky významné rozdíly mezi kontrolními vzorky, ani mezi přidanými koncentracemi frakce LDL. Nicméně objevila se určitá tendence, která se u AndroMedu téměř ztotožňuje s výsledky parametrů motility, jelikož přidavek frakce LDL také podstatně zvýšila křivku oproti kontrolnímu vzorku. U Bioxcellu lze také srovnávat s výsledky parametrů motility, jelikož oproti kontrolnímu vzorku se křivka téměř nezvedla, což napovídá tomu, že do Bioxcellu nemá příliš význam přidávat frakci LDL. Koncentrace frakce LDL a kontrolní vzorky u Triladylu jsou téměř identické, a příliš se neshodují s výsledky parametrů motility, což mohly mít za následek žlutkové inkluze, a tudíž větší viskozita kontrolního vzorku, a jeho obtížnější vyhodnocení.

Graf č. 13 - Vliv ředidel a přidaných koncentrací frakce LDL na H+ spermie - mléčná plemena



Graf č. 14 - Vliv ředidel a přidavku frakce LDL na H+ spermie - masná plemena



6 Diskuze

Existuje několik zahraničních studií, které se zabývají vlivem přídavku frakce LDL. Po metodické stránce jsou totožné, ovšem od naší metodiky se lehce odlišují. Ve studiích Amirat et al. (2005), Hu et al. (2010) a Moussy et al. (2002), bylo semeno ředěno na koncentraci 120×10^6 spermii/ml, kdežto v naší studii bylo semeno zředěno na koncentraci 30×10^6 spermii/ml, což mohlo velmi ovlivnit hodnoty parametrů motility. To dokazuje i studie Very – Munoz et al. (2009), u které je jasně klesající tendence jak motility, tak propustnosti membrán se snižujícími se počty spermii na dávku. Dalším důvodem pro neztotožnění výsledků může být použití i masných plemen v našem experimentu, kdežto u ostatních jsou plemena pouze mléčná, konkrétně holštýnská.

Kontrolní vzorky Bioxcellu nabývají vyšších hodnot než u Triladyly, což může být způsobeno větší viskozitou Triladyly kvůli žloutkovým inkluzím. Ovšem ve srovnání s ostatními studii, jsou hodnoty našich kontrolních vzorků nižší. Jediným srovnatelným parametrem se studii Amirat et al. (2005), Hu et al. (2010) a Moussy et al. (2002) je parametr VCL, u kterého jsou srovnatelné hodnoty jak u Triladyly, tak u Bioxcellu. Ve studii Hu et al. (2010) má parametr VAP u Bioxcellu také srovnatelnou hodnotu s VAP Bioxcellu v našem experimentu.

Kryokonzervační vlastnosti LDL byly ověřeny ve studiích, kde se LDL použilo jako náhrada žloutku ve žloutkových ředidlech (Moussa et al., 2002; Amirat et al., 2004; Amirat et al., 2005; Hu et al., 2010; Hu et al., 2011). Tyto experimenty obvykle došly k závěrům, že při porovnání různých koncentrací během zmrazení a rozmrazení, nejlépe vychází 8% koncentrace a je vždy lepší, než kontrolní vzorky.

U našeho experimentu bylo použito žloutkového ředidla Triladyly. Naše výsledky se překvapivě liší, jelikož u Triladyly vyšlo, že nejlepší vliv na spermie má koncentrace 10%. To si protiče s názorem Moussy et al. (2002), který tvrdí, že koncentrace LDL v ředidle na 10% a více, vede ke snížení motility spermii. Nicméně i koncentrace 6% a 8%, které vykazují horší výsledky, by mohly být použitelné a jsou přibližně na stejné úrovni.

Hodnoty sledovaných parametrů po zmrazení a rozmrazení získaných v naší studii, byly ve většině případů podstatně nižší ve srovnání se studii Amirata et al. (2005), Hu et al. (2010), Amirat – Briand et al. (2010) a Moussy et al. (2002). S posledně zmíněným autorem

jsou velmi podobné hodnoty u parametru VCL, ale u dalších parametrů jsou také nižší. Rozdíly mohou být způsobeny odlišnou délkou inkubace, nebo mohou být spojeny s tím, že celý proces kryokonzervace byl zjednodušen v našich laboratorních podmínkách. Dalším důvodem může být delší vystavení ejakulátu před zpracováním proteinům býčí semenné plazmy (BSP), které mohou mít negativní vliv na motilitu spermií (Hu et al., 2011).

Bezžloutková ředidla, která jsme zařadili do našeho experimentu, jsou AndroMed a Bioxcell. Bioxcell byl zahrnut do experimentů Moussy et al. (2002), Very – Munoz et al. (2009) a Amirata et al. (2005), ale pouze jako kontrolní vzorky. Ovšem vliv přídavku frakce LDL do bezžloutkových ředidel zatím testován nebyl. Kromě obecně doporučené koncentrace 8%, jsme zkusili do ředidel přidat ještě koncentraci 4% a 6%. Z našich výsledků vyplývá, že u AndroMedu i nižší koncentrace LDL zvýšila po rozmrazení úroveň sledovaných parametrů. Nejlepší koncentrací pro toto ředidlo se jeví 6% přídavek frakce LDL. Nicméně výrazně odlišná situace se ukázala u Bioxcellu, kde ani 8%, ani nižší koncentrace neprokázala po rozmrazení zvýšení úrovně ani jednoho sledovaného parametru. Naopak kontrolní vzorky měly vždy vyšší hodnoty, než vzorky s přídavkem frakce LDL. Z toho bychom mohli usoudit, že do posledně zmíněného ředidla nemá příliš význam přidávat jakoukoliv koncentraci frakce LDL.

HOS test neprokázal žádné statisticky významné odlišnosti mezi kontrolami a sledovanými koncentracemi frakce LDL. Objevují se tendence, které korespondují s parametry motility. U AndroMedu se po přídavku LDL zvýšila křivka oproti kontrolnímu vzorku. Pokud jde o Bioxcell, kontrolní vzorek zůstává téměř na stejné úrovni jako vzorky s přidanou frakcí LDL. Jediný Triladyl se příliš neshoduje s výsledky parametrů motility. Důvodem by mohly být žloutkové inkluze, a tudíž větší viskozita kontrolního vzorku, která ztížila vyhodnocování vzorku. Výsledky HOS testu se dají srovnat s výsledky Very – Munoz et al. (2009), které dosahují podobných hodnot v koncentraci 60×10^6 spermií/ml, což dokazuje dobré výsledky v našem experimentu, protože naše koncentrace byla pouze 30×10^6 spermií/ml. Navíc nám HOS test potvrdil vliv plemene na přežitelnost spermií.

7 Závěr

Pro lepší zachování životaschopnosti spermií je použití přídavku frakce LDL zatím metodou experimentální. Naším cílem bylo zhodnotit účinky různých koncentrací LDL přidaných do komerčně vyráběných ředidel AndroMedu a Bioxcellu, a náhradou vaječného žloutku u Triladylu na motilitu spermií a zvolit tu neoptimálnější. Kontrolní vzorky AndroMedu a Triladylu měly nižší hodnoty parametrů motility, než vzorky s obsahem 4%, 6% a 8% (10%) přídavku frakce LDL. Nicméně u Bioxcellu tomu bylo naopak. I přesto se dá obecně říci, že použití pouze extraktu z vaječného žloutku (tedy LDL) je vhodnější, než použití celého žloutku. A to jak z důvodu lepší manipulace, tak z důvodu sterility, která je vyšší u LDL a tím pádem je menší pravděpodobnost kontaminace ejakulátu.

Naše výsledky potvrdily, že se při použití LDL zlepšuje motilita v ředidlech AndroMed a Triladylu. Jako nejlepší ředidlo se jeví AndroMed a k němu přidaná 6% koncentrace frakce LDL. K Triladylu je nejlepší, podle našich výsledků, přídavek 10% koncentrace LDL. Naše výsledky se příliš neshodují s dostupnou literaturou, která určuje jako nejlepší koncentraci 8% přídavek frakce LDL. Navíc byly provedeny většinou pokusy pouze u Triladylu, a Bioxcell byl použit jen jako kontrolní vzorek. U AndroMedu se zatím žádné experimenty nekonaly.

V dalších pokusech by bylo zajímavé se zaměřit na stanovené koncentrace frakce LDL na jednotlivá plemena býků. Dále pak vliv AndroMedu a k němu přidané 6% koncentrace frakce LDL a vliv na schopnost fertility.

8 Reference

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 740 s. ISBN: 8090290604.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., Gérard, O., Courtens, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], 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, lo density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*. 129. 535 – 543.
- Amirat – Briand, L., Bencharif, D., Vera – Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., Tainturier, D. 2009. Effect of glutamine on post – thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology*. 71. 1209 – 1214.
- Amirat – Briand, L., Bencharif, D., Vera – Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., Destrumelle, S., Desherces, S., Anton, M., Jouan, M., Shmitt, E., Tainturier, D., 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science*. 122. 282 – 287.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaumal, V., David – Briand, E., Rabesona, H. 2003. Chemical and structural characterisation of low – desity lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*. 83. 175 – 183.
- Bailey, J. L., Lessard, C., Jacques, J., Breque, C., Dobrinski, I., Zeng, W., Galantino-Homer, H. L. 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 70. 1251 - 1259.
- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the machanisms of sperm protection by egg yolk and mil. *Molecular reproduction and development*. 73. 1338 – 1344.

- Gamčík, P., Kozumplík, J. (eds.). 1984. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. SZN. Praha. 344 s. ISBN: 6402884.
- Garner, D., L., Seidel, G., E. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*. 69. 886 – 895.
- Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). 2009. Nemoci skotu. Noviko. Brno. 1149 s. ISBN: 9788086542195.
- Hu, J. - H., Li, Q. - W., Zan, L. - S., Jiang, Z. - L., An, J. - H., Wang, L. - Q., Jia, Y. - H. 2010. The cryoprotective effect of low – density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing – thawing. *Animal Reproduction Science*. 117. 11 – 17.
- Hu, J. - H., Jiang, Z. - L., Lv, R. - K., Li, Q. - W., Zhang, S. - S., Zan, L. - S., Li, Y. - K., Li, X. 2011. The advantages of low – density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62. 83 – 87.
- Choong, C. H., Wales, R. G. 1963. The use of various diluents for deep – freezing bull spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*. 16. 896 – 904.
- Jelínek, P., Koudela, K. (eds.). 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Grafos. Brno. 414 s. ISBN: 8071576441.
- Kaneto, M., Harayama, H., Miyake, M., Kato, S. 2002. Capacitation - like alterations in cooled boarspermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine - phosphorylated sperm proteins. *Animal Reproduction Science*. 73. 197 - 209.
- Kliment, J., Hintnaus, J., Novák, M., Rob, O., Šťastný, P. 1983. Reprodukcia hospodárskych zvierat. Príroda. Bratislava. 376 s. ISBN: 6402083.
- Louda, F. (eds.). 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita. Praha. 225 s. ISBN: 8021307021.
- Marvan, F. (eds.). 2011. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda. Praha. 304 s. ISBN: 9788021321885.

- 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, M. M., Graham, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*. 39. 1144 – 1149.
- Reece, W. O. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Grada Publishing. Praha. 456 s. ISBN: 8071695475.
- Seidel, G. E. 2003. Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology, and biology. *Animal Reproduction Science*. 79. 145 – 156.
- Seidel, G. E. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*. 68. 443 – 446.
- Vera – Munoz, O., Amirat – Briand, L., Diaz, T., Vásquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Anton, M., Bencharif, D., Tainturier, D. 2009. Effect of semen dilution to low – sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low – density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl[®] and Bioxcell[®]. *Theriogenology*. 71. 895 - 900.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství. Brno. 197 s. ISBN: 8086895017.
- Věžník, Z., Přinosilová, P., Zajícová A. 2009. Stanovení membránové rezistence spermií kance modifikovaným testem HOS. *Research in pig breeding*. 3. 44 – 47.
- Vodrážka, Z. 2007. *Biochemie*. Academia. Praha. ISBN: 9788020006004.
- Yanagimachi, R., Usui, N. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of Guinea pig spermatozoa. *Experimental Cell Research*. 89. 161 – 174.

9 Seznam použitých zkratek

K1A – ejakulát + kontrolní vzorek AndroMed

K1B – ejakulát + kontrolní vzorek Bioxcell

K1T – ejakulát + kontrolní vzorek Triladyl + žloutek

EA8 – ejakulát + ředidlo AndroMed + 8% LDL

EA6 – ejakulát + ředidlo AndroMed + 6% LDL

EA4 – ejakulát + ředidlo AndroMed + 4% LDL

EB8 – ejakulát + ředidlo Bioxcell + 8% LDL

EB6 – ejakulát + ředidlo Bioxcell + 6% LDL

EB4 – ejakulát + ředidlo Bioxcell + 4% LDL

ET10 – ejakulát + ředidlo Triladyl + 10% LDL

ET8 – ejakulát + ředidlo Triladyl + 8% LDL

ET6 – ejakulát + ředidlo Triladyl + 6% LDL

Čas 0 – stav spermií na začátku testování

Čas 2 – stav spermií po 2 hodinách inkubace ve vodní lázni v 37,5 °C

H+ spermie – pod mikroskopem stočené bičíky, bílá nebo růžová barva – živé

