

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE**

FAKULTA BITECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

1130918

**VPLYV RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ NaCl NA
POHYBLIVOSŤ SPERMIÍ KRÁLIKOV**

2011

Danijela Mocko

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**VPLYV RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ NaCl NA
POHYBLIVOSŤ SPERMIÍ KRÁLIKOV**

Bakalárska práca

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| Študijný program: | Aplikovaná biológia |
| Študijný odbor: | 1536700 Biológia |
| Školiace pracovisko: | Katedra fyziológie živočíchov |
| Školiteľ: | Ing. Jiřina Kročková, PhD. |

Nitra 2011

Danijela Mocko

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Danijela Mocko vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Vplyv rôznych koncentrácií NaCl na pohyblivosť spermii králikov“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 7. mája 2011

Danijela Mocko

Pod'akovanie

Touto cestou by som chcela poďakovať vedúcej záverečnej práce Ing. Jiřine Kročkovéj, PhD., ktorá ma odborne a metodicky usmerňovala. Ďakujem za ochotu, cenné rady, pomoc a pripomienky pri riešení problémov pri vypracovaní bakalárskej práce.

Abstrakt

Pri hodnotení kvality ejakulátu je dôležitým faktorom pohyblivosť spermíí. Fertilita je často spájaná s pohyblivosťou a jej jednotlivými parametrami. V bakalárskej práci sme sledovali parametre pohyblivosti spermíí králikov pod vplyvom rôznych koncentrácií NaCl. Sledovali sme ich pri laboratórnej teplote v rôznych časových intervaloch – 0 a 60 minút. Cieľom našej štúdie bolo určiť účinok zmeny osmotického tlaku na pohyblivosť a progresívnu pohyblivosť králičích spermíí. Parametre pohyblivosti sme sledovali využitím CASA analýzy. Hodnotením percenta pohyblivosti spermíí králikov sme zistili, že pohyblivosť spermíí bola najvyššia vo fyziologickom roztoku (0,9 % roztok NaCl). V čase 0 bola vyššia pohyblivosť spermíí ako po 60 minútach. Vo fyziologickom roztoku v čase 0 bola pohyblivosť spermíí 90,56 % a v čase 60 bola 79,86 %. Pokles percenta pohyblivých spermíí má za následok aj pokles percenta progresívne pohyblivých spermíí. V čase 0 vo fyziologickom roztoku percento progresívne pohyblivých spermíí bolo 83,35 % a v čase 60 bolo 64,78 %. Zvyšovaním a znižovaním koncentrácie NaCl nad a pod 0,9 % NaCl klesalo percento pohyblivých a progresívne pohyblivých spermíí králikov.

Kľúčové slová: spermie, ejakulát, králik, pohyblivosť, CASA

Abstract

In assessing the quality of semen an important factor is sperm motility. Fertility is often associated with motility and its various parameters. In bachelor work we monitored parameters of sperm motility in rabbits under the influence of different concentrations of NaCl. We watched them at room temperature at different time intervals - 0 and 60 minutes. The aim of our study was to determine the effect of change osmotic pressure on rabbit sperm motility and progressive motility. Motility parameters were followed using the CASA analysis. Assessment of the percentage of sperm motility in rabbits, we found that the highest motility was in saline (0.9% NaCl). At time 0 was higher sperm motility than 60 minutes. In saline at time 0 was 90.56% motility and at 60 was 79.86%. Decrease in the percentage of motile sperm results in a decrease in the percentage of progressively motile sperm. At time 0 with saline percentage progressively motile sperm was 83.35% and at 60 was 64.78%. Increasing and decreasing concentrations of NaCl above and below 0.9% NaCl, decreased the percentage motility and progressive sperm motility in rabbits.

Key words: spermatozoa, ejaculate, rabbit, motility, CASA

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Obsah | 6 |
| Úvod | 7 |
| 1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí..... | 8 |
| 1.1 Semenník | 8 |
| 1.2 Spermatogenéza..... | 8 |
| 1.2.1 Rozmnožovanie..... | 9 |
| 1.2.2 Meióza..... | 10 |
| 1.2.3 Metamorfóza | 11 |
| 1.3 Spermie..... | 12 |
| 1.3.1 Hlavička spermie | 13 |
| 1.3.2 Bičik spermie | 14 |
| 1.4 Charakteristika ejakulátu | 15 |
| 1.4.1 Vlastnosti ejakulátu králikov | 17 |
| 1.4.2 Hodnotenie ejakulátu | 17 |
| 1.5 Pohyblivosť spermií | 18 |
| 1.6 Osmóza | 20 |
| 1.7 Metódy hodnotenia pohyblivosti spermií..... | 21 |
| 1.7.1 CASA..... | 22 |
| 2 Cieľ práce..... | 24 |
| 3 Metodika práce a metódy skúmania | 25 |
| 4 Výsledky práce | 28 |
| 5 Diskusia | 31 |
| Záver | 32 |
| Zoznam použitej literatúry | 33 |

Úvod

Umelá inseminácia v dnešnej dobe zohráva významnú úlohu pri chove hospodárskych zvierat. Predstavuje predpoklad rozvíjania úžitkovosti hospodárskych zvierat. Aby inseminácia bola úspešná je potrebné použiť kvalitný ejakulát s požadovanou fertilizačnou schopnosťou. Fertilizačná schopnosť ejakulátu môže byť ovplyvnená rôznymi pozitívnymi alebo negatívnymi faktormi. Kvalitné hodnotenie ejakulátu je dôležitý krok pri inseminácii. Jednou z hlavných charakteristík, ktoré sa sledujú pri hodnotení ejakulátov je pohyblivosť spermíí so svojimi jednotlivými parametrami. Aj keď pohyblivosť spermíí nie je jediná vlastnosť potrebná na oplodnenie, stala sa v praxi jedným zo základných selekčných kritérií na hodnotenie kvality ejakulátu. Pod pojmom kvalita ejakulátu rozumieme biologickú plnohodnotnosť. Je to vlastne schopnosť oplodniť vajíčko, z ktorého sa vyvinie nový život.

Kvalitné hodnotenie daného ejakulátu sa realizuje za pomoci laboratórnych a komputrových metód a techník, ktoré dávajú dôležité informácie o tom či vlastnosti ejakulátu zodpovedajú daným požiadavkám fertilizácie a umožňujú eliminovať nekvalitné ejakuláty. Existujú rôzne spôsoby, metódy a zariadenia na určovanie a hodnotenie kvality ejakulátu. Najpoužívanejšie prístroje na analýzu spermíí sú prístroje pod spoločným názvom CASA (Computer Automated Semen Analyser). V našom výskume sme hodnotili parametre pohyblivosti králičích spermíí použitím CASA analýzy so zameraním na sledovanie vplyvu rôznych koncentrácií NaCl v rôznych časových obdobiach.

1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí

1.1 Semenník

Semenník je pohlavná žľaza samca uložená v miešku, v ktorej dozrievajú a vyvíjajú sa samčie pohlavné bunky – spermie. Predstavuje aj párovú žľazu s vnútornou sekréciou, v ktorej sa tvorí samčí pohlavný hormón – testosterón (Lukáč et al., 2007). Okrem toho má aj exokrinnú funkciu – spermatogézu (Miljković a Veselinović, 2005). Semenník pozostáva z dvoch koncov – hlavového a chvostového konca. Na hlavový koniec prirastá hlava prisemenníka (Kročková a Massányi, 2010). Je obalený väzivovou vrstvou, ktorá sa nazýva belavá blana. Z nej prenikajú do vnútra parenchýmu semenníka priehradky, ktoré rozdeľujú parenchým na menšie úseky (lalôčky) a zaisťujú ochranu a integritu parenchymatických tkanív (Reece, 1998). Lalôčky sú vyplnené intersticiálnym tkanivom a stočenými semenotvornými kanálkami. Semenotvorný epitel, v ktorom sa vytvárajú spermie sa nachádza vo vnútri kanálikov (Kročková a Massányi, 2010). Vedľa semenotvorného epitelu sú v stene kanálikov Sertolihove bunky, v ktorých prebieha posledná fáza spermatogézy metamorfóza spermatíd na spermie (Jelínek et al., 2003). Sertolihove bunky sú medzi sebou spojené systémom výbežkov vytvárajúcich dutinky, v ktorých sú uložené spermatogénne elementy. Sú to rôzne vývojové štádiá spermií. Tie potom prestupujú do semenotvorného kanáliku a do prisemenníka (Kročková a Massányi, 2010). Medzi stočenými semenotvornými kanálkami sú veľké intersticiálne bunky – Leydigove bunky. V týchto bunkách sa tvorí samčí pohlavný hormón testosterón (Jelínek et al., 2003). V semenníku sa vyvíja veľa odlišných typov buniek. Sú to bunky veľmi citlivé na zmeny v prostredí semenníka. Aj napriek tomu, že je to orgán schopný značnej adaptability k zmenám prostredia, jeho funkcie ovplyvňuje mnoho faktorov. K týmto faktorom môžeme zaradiť vplyv sezóny, hormónov, výživy, teploty prostredia, zmeny ovplyvňujúce krvenie semenníka, žiarenie a chemické látky (Lukáč et al., 2007).

1.2 Spermatogéza

Spermatogéza je dlhý proces bunkovej diferenciácie, v ktorej spermatogóniálny výťažok kmeňových buniek podlieha niekoľkým mitotickým a meiotickým deleniam a početným cytologickým transformáciám a vedie ku generácii zrelej pretiahnutých spermatíd (Barth a Oko, 1989). Cieľom spermatogézy je vytvoriť a udržiavať dennú produkciu plne diferencovaných spermií tak, že sa vyprodukuje od 200 miliónov ľudských

do 2 – 3 miliardy bíčích spermií (De Jonge a Barratt, 2006). V tomto procese sa málo diferencované bunky – spermatogónie transformujú na spermie. Vývoj spermií prebieha v semenotvorných kanálikoch semenníkov nepretržite. Napriek tomu, že spermia sa svojim zložením zdá byť jednoduchá, jej vývoj trvá niekoľko mesiacov (Massányi et al., 2002). Začína v dobe pohlavnej dospelosti v zárodočnom epiteli a cyklicky sa opakuje. Jeden cyklus trvá asi 35 – 50 dní (Kulíšek et al., 2006). U zvierat, ktoré majú normálne vyvinutú pohlavnú sústavu, spermatogenéza prebieha celý život a končí v seni. Dĺžka tohto cyklu je druhovo rozdielna. Spermatoogenéza pozostáva z nasledujúcich fáz: rozmnožovanie, meióza a metamorfóza (Massányi et al., 2002). Cykly vytvárania spermií nasledujú za sebou v presných časových intervaloch, pričom sa každý nový cyklus začína o $\frac{1}{4}$ dĺžky neskoršie ako predchádzajúci cyklus. Od obdobia pohlavnej dospelosti tvoria stenu semenotvorných kanálikov podporné Sertolihov bunky a nezrelé spermatogónie (Kulíšek et al., 2006). Medzi spermatogénne elementy patria spermatocyty I. a II. radu, spermatogónie a spermatídy, z ktorých sa diferencujú spermie (Lukáč et al., 2007). Cicavčie spermie sú vysoko diferencované bunky. Ich zvláštna štruktúrna organizácia vychádza z komplexnej morfo genetickej zmeny v priebehu spermatogenézy (Auger, 2010).

1.2.1 Rozmnožovanie

Rozmnožovanie je spojené s mnohonásobným delením a postupnou diferenciáciou buniek. Vznikajú spermatogónie A, Im a B.

A – sú to kmeňové materské bunky, ktoré sa nachádzajú na obvode semenotvorných kanálikov. Majú guľatý tvar. Jadro je obklopené tenkou membránou, v centre jadra sa nachádza jadierko.

Im – sú to spermatogónie intermediárneho typu. Vznikajú delením A – spermatogónií tak, že okrem jednej dcérskej bunky vzniká druhá bunka intermediárneho typu. Má jadro bohatšie na chromatín.

B – spermatogónie vznikajú zo spermatogónií intermediárneho typu. Charakteristické sú tým, že chromatín vo forme kôrovitého zhrubnutia sa nachádza v blízkosti jadrovej membrány.

Východiskovou bunkou spermatogenézy sú spermatogónie. Spermatogónie sa mitoticky delia a vznikajú spermatocyty I. radu. Sú to okrúhle bunky s veľkým jadrom (Massányi et al., 2002). Charakteristické sú prítomnosťou medzibunkových spojení pretrvávajúcich z posledného delenia spermatogónií (Lukáč et al., 2007). Ich interfáza trvá dlho, potom vstupujú do I. meiotického delenia. Delením spermatocytov I. radu vznikajú

dva spermatocyty II. radu (Gamčík et al., 1984). Tieto spermatocyty sú haploidné a ich jadro obsahuje granuly DNA spojené jemnou sieťou chromatínu (Lukáč et al., 2007). Spermatocyty II. radu žijú krátko, len niekoľko hodín a potom vstupujú do II. meiotického delenia a vznikajú spermatídy (Gamčík et al., 1984). Spermatídy predstavujú tretiu generáciu buniek spermatogenézy, ktoré sa ďalej nedelia ale sa vyvíjajú na pohyblivé spermie (Lukáč et al., 2007).

1.2.2 Meióza

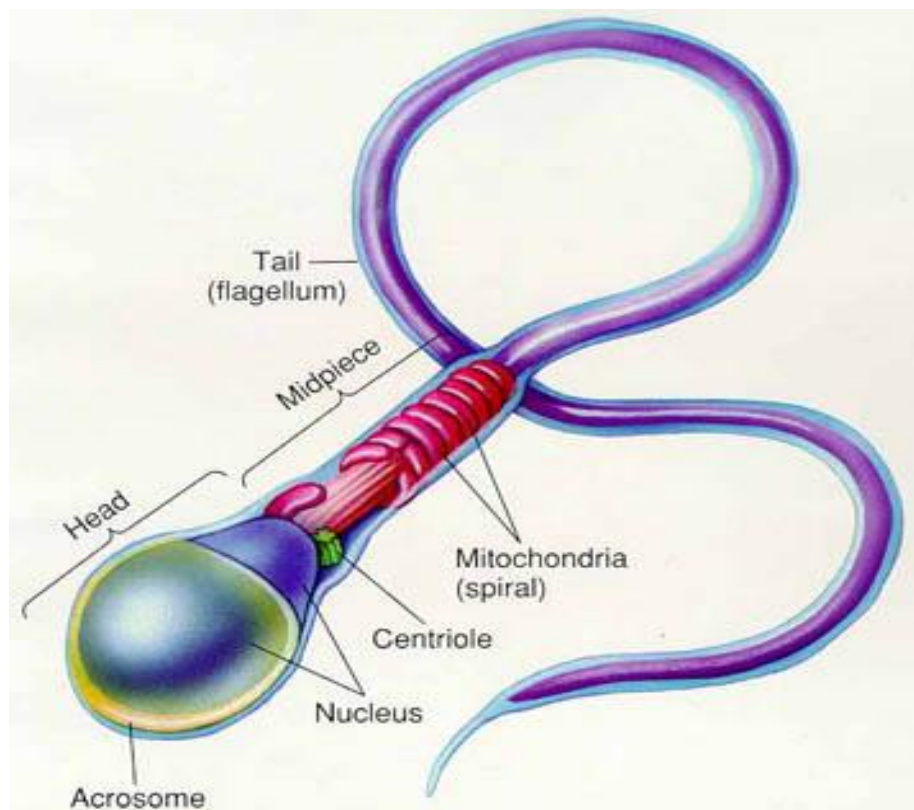
Charakterizuje ju rast a zrecie delenie spermatocytov. Skladá sa z dvoch po sebe nasledujúcich bunkových delení, ktoré sa vyznačujú zmenami na chromozómoch. Cieľom meiózy je výmena materiálu medzi homologickými chromozómami a redukcia ich počtu (Gamčík et al., 1992).

Prvé meiotické delenie sa vyznačuje dlhou profázou, ktorá pozostáva z leptoténneho, zygoténneho, pachyténneho a diploténneho štádia, z diakinézy a premetafázy. Potom nasledujú ďalšie fázy mitózy – metafáza, anafáza a telofáza (Kliment et al., 1989). Začiatok delenia sa prejavuje v rozčleňovaní chromatinovej vrstvy pod jadrovou membránou spermatocytov I. radu na chromatinové vlákna. Z genetického hľadiska je diploténne štádium najdôležitejšie štádium meiózy, pri ktorom sa chromatídy tetrad ovíjajú, na niektorých úsekoch sa dotýkajú a na iných vzdiaľujú. Miesto prekriženia a dotyku chromatíd sa nazýva chiazma. Nastáva výmena určitých chromatídových úsekov, výmena materiálu medzi jednotlivými chromozómami, tzv. crossing – over. Na konci anafázy jadro každého dcerského spermatocytu má haploidný počet chromozómov (Massányi et al., 2002). Druhé meiotické delenie nasleduje po anafáze prvého delenia. Posledná fáza z tohto delenia je zhodná s normálnym mitotickým delением. Prvým delением vzniknú zo spermatocytov I. radu dva spermatocyty II. radu. Druhým meiotickým delением vznikajú z každého radu po dve spermatídy, teda štyri spermatídy (Kliment et al., 1989). Kritické štádium v spermatogenéze znamenajú meiotické delenia a spermatocyty I. radu. Pri porušení deliaceho procesu sa môžu vyvinúť spermie bez fertilizačných vlastností. Meióza prebieha ako dve na seba nadväzujúce delenia materskej bunky. Prvé meiotické delenie je redukčné, prebieha redukcia počtu chromozómov na polovicu. Druhé meiotické delenie je ekválne, počet chromozómov sa už nemení (Kulíšek et al., 2006).

1.2.3 Metamorfóza

V tomto období sa spermatída mení na spermium. Vzniknutá spermia má všetky vlastnosti potrebné na úspešné oplodnenie. Počas premeny si bunka vytvára bičík a formuje sa na penetráciu vajíčka, teda vzniká akrozóm (Massányi et al., 2002). Jadro spermatídy sa mení na hlavičku, z cytoplazmy vznikajú obaly a z organel bičík. Metamorfóza sa rozdeľuje na Golgiho štádium, štádium akrozómovej čiapočky, štádium kaudálnej manžety a štádium zrenia (Gamčík et al., 1992). V Golgiho štádiu sa tvorí základ akrozómu. V štádiu akrozómovej čiapočky sa základ akrozómu zväčšuje a vzniká základ bičíka. V štádiu kaudálnej manžety sa guľaté jadro spermatídy mení na plošnú hlavičku spermie. V štádiu zrenia kaudálna manžeta mizne a vzniká bičík a akrozóm. Vyvíja sa obal hlavného oddielu bičíka a mitochondriálna pošva. Mitochondrie sa prikladajú koncami k sebe a vzniká hrubé vlákno, ktoré sa ovíja okolo osového vlákna na úrovni spojovacieho oddielu bičíka. Po dehydratácii akrozómu a odchode nepotrebných cytoplazmy je premena spermatídy na spermium ukončená. Spermie sa dostávajú zo semenotvorných kanálikov, do vývodných semenných ciest a do chvosta prisemenníka (Massányi et al., 2002). Podľa Augera (2010) transformácie spermatíd, vedúce k formovaniu spermie, neprebiehajú v postupných fázach. Skôr z toho vyplýva, kontinuálny proces pre formovanie každej bunkovej zložky. Cicavčie spermie po opustení semenníka nie sú schopné oplodniť vajíčko. Post – testikulárny proces dozrievania spermíí je iniciovaný počas ich prechodu cez prisemenník. Proces zahŕňa kontinuálne cross-talk medzi spermiami a pohlavným ústrojenstvom epitelu (Kirchhoff et al., 2000).

Zmenené štyri generácie spermatogénnych buniek predstavujú rôzne vývojové štádia celkom rôznych spermatogénnych cyklov, ktoré nasledujú tesne za sebou (Marvan et al., 2003).



Obr. 1

[Stavba spermie (Ptáček, 2007)]

1.3 Spermie

Spermie sú samčie pohlavné bunky, ktoré vznikajú v semenotvornom kanáliku semenníka procesom, ktorý nazývame spermatogéza. Boli objavené v roku 1677 Leeuwehoekovým žiakom Hamom z Leidenu. Vtedy ich považovali za parazity v ejakuláte (Lukáč et al., 2007). Až v roku 1824 Prevost a Dumas dokázali, že spermie majú fertilizačnú schopnosť. Ďalšie prehlbovanie štúdia morfológických vlastností a spoznanie štruktúry spermíí umožnil rozvoj mikroskopickej techniky. Väčšina základných poznatkov o spermách bola popísaná koncom 19. a začiatkom 20. storočia z obdobia svetelného mikroskopu (Massányi et al., 2002). Základné úlohy spermie pri oplodnení sú: aktívne vyhľadávať vajíčko, preniknúť do vajíčka a priniesť genetický materiál. Splniť tieto úlohy jej umožňuje morfológická stavba (Lukáč et al., 2007). Spermia sa skladá z dvoch základných častí – hlavičky a bičika. Obidve tieto časti sú prekryté cytoplazmatickou membránou alebo plazmolemou (Sutovsky et al., 2006). Základ

hlavičky tvorí nukleoplazma, ktorej prednú časť pokrýva akrozóm. Bičik sa skladá zo štyroch oddielov: centriolového (krčka), mitochondriálneho (stredného), hlavného a koncového (Massányi et al., 2004). Z celkovej hmotnosti spermie na hlavičku pripadá 51 % a na bičik 49 % (Lukáč et al., 2007).

1.3.1 Hlavička spermie

Hlavička spermie (*caput spermii*) má hlavnú úlohu pri prenášaní genetického materiálu, ktorý je umiestnený v nukleoplazme (Massányi et al., 2004). Priemerná dĺžka hlavičky je 5 – 10 µm a jej tvar je rôzny v závislosti od druhu (Jelínek et al., 2003). Je celá pokrytá bunkovou membránou, ktorá prechádza na bičik. Na povrchu hlavičky sa dajú rozlišovať viaceré útvary. Zhrubnutie predného okraja hlavičky sa označuje ako apikálny hrebeň (Lukáč et al., 2007). Toto zhrubnutie obkolesuje celý okraj prednej časti hlavičky, ktorú prekrýva akrozóm. Naprieč hlavičkou v jej stredných častiach na prednom okraji *pars intermediallis* akrozómovej oblasti sa niekedy dá pozorovať hrbol, ktorý môže vzniknúť napučíavaním subakrozómovej substancie v mieste zužovania sa akrozómu, čo spôsobí vydutie akrozómu (Massányi, 1991). Častejšie sa v týchto miestach pozoruje polmesiačiková línia. V miestach zadného ukončenia akrozómu prechádza naprieč hlavičkou línia – postakrozómový okraj. Na hlavičke môžeme rozlíšiť dve oblasti – akrozómová oblasť a postakrozómová oblasť (Lukáč et al., 2007).

Akrozómová oblasť – pokrýva ju akrozóm. Na nej rozlišujeme suboblasti: apikálny hrebeň a hlavný (princiálny) segment. Tieto segmenty sa spoločne označujú ako *pars anterior* hlavičky. Ďalej rozlišujeme ekvatoriálny segment, ktorý sa označuje ako *pars intermedialis*.

Postakrozómová oblasť – *pars posterior*, je hladká časť hlavičky medzi postakrozómovým prstencom a postakrozómovým okrajom. Pokrýva ju postakrozómová pošva, existujúca pod cytoplazmatickou membránou a poskytujúca väčšiu rezistentnosť voči vonkajším vplyvom (Massányi, 1991).

Jadro hlavičky spermie je obalené dvojitou membránou, ktorá má ochrannú funkciu (Šťastný et al., 1998). V jadre hlavičky spermie je uložený genetický materiál samčej pohlavnej bunky. Jeho obsah v zrelej spermii predstavuje kondenzovaný chromatín (Lukáč et al., 2007). Genetický materiál je v podobe DNA. Jadro hlavičky spermie má polovičný (haploidný) obsah DNA a chromatín tvorí kompaktnú masu. Okrem DNA jadro bunky obsahuje aj RNA. Vnútro jadra vyplňa nukleoplazma. Tvar jadra je identický s tvarom hlavičky (Massányi et al., 2004). Materiál okolo jadra sa označuje rôznymi názvami ako sú

subakrozómová substancia, perforatórium, perinukleárna substancia atď. Vyplýva to z medzidruhových rozdielov. Ide o tenkú vrstvu medzi jadrom na jednej strane a akrozómom a postakrozómovou pošvou na druhej strane. Táto perinukleárna substancia obsahuje bielkoviny bohaté na lyzín (Lukáč et al., 2007). Podľa Gamčíka et al. (1992) nukleoplazma vyplňa jadro hlavičky spermie. Jej štruktúra je kompaktná a homogénna. Tvar jadra je identický s tvarom hlavičky. V nukleoplazme môžeme pozorovať väčšie alebo menšie prázdne miesta, vakuoly. Vakuoly sa môžu vyskytovať pri 2 – 80 % spermíí.

Akrozóm je cytoplazmatický útvar čiapočkovitého tvaru, ktorý pokrýva prednú časť hlavičky spermie a nachádza sa medzi bunkovou a nukleárnou membránou. Zaberá takmer 50 % plochy hlavičky (Massányi et al., 2004). Akrozóm tiež produkuje dôležité enzýmy akrozín a hialuronidázu, nevyhnutné pre preniknutie spermie do vajíčka a oplodnenie (Miljković, 1998). Na povrchu je akrozóm pokrytý cytoplazmatickou membránou a pod ňou je vonkajšia a vnútorná akrozómálna membrána (Massányi et al., 2004). Akrozómové membrány sú uložené paralelne vedľa seba a uzatvárajú štrbinu vyplnenú akrozómovou hmotou (Lukáč et al., 2007). Vnútro akrozómálneho systému tvorí akrozómový materiál, predovšetkým enzýmy, ktoré napomáhajú k penetrácii a rozpúšťaniu obalov vajíčka. Na akrozóme rozlišujeme tri segmenty – apikálny, hlavný (princiálny) a ekvatoriálny segment (Massányi et al., 2004).

Postakrozómová pošva (čiapka) leží tesne pod cytoplazmatickou membránou v postakrozómovej oblasti. Nie je známe jej biochemické zloženie. Považuje sa za cytoplazmatickú organelu (Lukáč et al., 2007). Obaľuje tú časť jadra, ktorá nepokrýva akrozóm a je odolnejšia voči vonkajším vplyvom (Massányi et al., 2004).

1.3.2 Bičik spermie

V bičíku sa nachádza energetický a pohybový aparát spermie (Lukáč et al., 2007). Dĺžka bičika je 50 – 70 μm . S hlavičkou je spojený krčkom (Jelínek et al., 2003). Bičik je ústroj pohybu spermie, ktorý sprostredkúva transport spermie na miesto oplodnenia. Dôležitú úlohu pri transporte spermíí na miesto oplodnenia má mitochondriálny aparát. Tento produkuje energiu. Zároveň je tu komplex axiálnych vlákien, kde sa táto energia mení na mechanickú, čiže na pohyb spermie. Bičik sa skladá z častí, ktoré sa odlišujú štruktúrou, lokalizáciou a funkciou. Sú to centriolový, mitochondriálny, hlavný a koncový oddiel bičika.

Centriolový oddiel bičika (krčok spermie), je najzložitejšou časťou spermie. Štrukturálny základ tvoria dva centrioly (proximálny a distálny) a segmentované chordy. Z

proximálneho oddielu vznikajú segmentované a nesegmentované chordy a fibrózna pošva. Distálny centriol je pri zreých spermiiach len rudimentálny. Z tohto centriolu vzniká axonéma (Massányi et al., 2004). Centriolový oddiel bičika nadväzuje na mitochondriálny oddiel bičika (Lukáč et al., 2007).

Mitochondriálny oddiel bičika je pokračovaním centriolového oddielu bičika spermie. Distálnym smerom je ohraničený Jensenovým krúžkom. Skladá sa z komplexu osových vlákien. V strede je centrálny pár dutých vlákien a ostatné vlákna sú usporiadané do dvoch koncentrických kruhov. Vnútorňy kruh tvorí deväť dvojitych vlákien, jedno je plné a druhé je duté. Mitochondriálny oddiel sa skladá z 90 individuálnych mitochondrií, sústredených v závitnicovej pošve. Jedna mitochondria tvorí asi $\frac{3}{4}$ závitú špirály. Celá mitochondriálna pošva vytvára 65 – 75 závitov. V mitochondriách sa odohrávajú dôležité procesy získavania energie, ktorú spermie využívajú na pohyb (Massányi et al., 2004).

Hlavný oddiel bičika je najdlhšia časť bičika na spermii (40 – 50 μm) (Jelínek et al., 2003). Chordy sú tenšie a slepo končia. Poslednú štvrtinu hlavného oddielu tvorí iba axonéma. Fibrózna pošva pokrýva komplex osových vlákien a zabezpečuje súdržnosť osových vlákien, ale aj pevnosť a pružnosť potrebnú na kmitanie bičika.

Koncový oddiel obsahuje osová vlákna, ktoré sú obalené cytoplazmatickou membránou. Axonéma má odlišnú štruktúru. Dublety tvoria dva duté mikrotubuly. V druhej polovici koncového oddielu jeden z mikrotubulov zaniká. Celú spermiiu pokrýva neprerušovaná cytoplazmatická membrána (Massányi et al., 2004).

1.4 Charakteristika ejakulátu

Ejakulát charakterizujeme ako výlučok pohlavných orgánov samcov uvoľňujúci sa počas ejakulačného reflexu (Kováčik et al., 2009). Je to viskózna belavá tekutina, ktorá okrem spermii obsahuje sekréty prídavných pohlavných žliaz, prisemenníka a semenníka. Ejakulát je tvorený spermiami a semennou plazmou. V procese ejakulácie podnecuje semenná plazma spermie k pohybu a poskytuje im ochranu proti nepriaznivým vplyvom prostredia. Obsahuje látky, ktoré spermie využívajú ako zdroj energie. Obe zložky ejakulátu sa líšia aj zložením aj funkciou. Tekutá zložka vzniká na rozličných miestach.

Prídavné pohlavné žľazy vylučujú semennú plazmu, ktorá zabezpečuje výživu spermii.

Mechúrikovité žľazy produkujú sekrety kyslej reakcie. Tento sekret tvorí významnú časť ejakulátu (7 až 40 % objemu) (Lukáč et al., 2007). Tieto žľazy sú umiestnené na dorzálnej ploche močového mechúra, po stranách semenovodu (Marvan et al., 2003).

Bulbouretrálne (Cowperove) žľazy vylučujú sekret alkalického reakcie, mliečne zakalený. Tento sekret vytvára so sekretmi ostatných prídavných žliaz želatínové hrudky. Sekret týchto žliaz tiež neutralizuje kyslé pH v močovej rúre samca i v pošve a vytvára priaznivé prostredie pre spermie.

Predstojná žľaza (prostata) produkuje sekret s vysokým obsahom kyslej fosfatázy, mucinázy, voľných aminokyselín, transaminázy, fibrinogénu. Tento sekret je bohatý aj na hormóny prostaglandíny a adrenalín. Má mliečny vzhľad a slabou alkalickú až neutrálnu reakciu.

Ampula semenovodu obsahuje značné množstvo fruktózy a má vysokú koncentráciu kyseliny citrónovej. Ejakulát kráľika je bohatý na fruktózu, kyselinu citrónovú a glycerylfosforylcholín.

Prisemenník – v ňom dochádza k dozrievaniu spermií a spermie tu nadobúdajú pohybovú aktivitu. Sekretmi intraepitelových žliaz obsahujúcich sekrečné granule je ovplyvňovaná pohybová aktivita spermií v prisemenníku (Lukáč et al., 2007).

Pri styku spermií so sekretom dochádza k ich zriedeniu a k prebudeniu pohyblivosti spermií. Všeobecne je ejakulát vylúčený v tekutej alebo polotekutej forme (Massányi et al., 2002). Ejakuláty s výraznejším progresívnym pohybom spermií majú vyššie percento pohyblivých spermií. Jedným z ukazovateľov biologickej plnohodnotnosti ejakulátu je koncentrácia spermií. Od koncentrácie spermií závisí farba a konzistencia získaného králičieho semena. Koncentrácia spermií sa udáva v počte spermií na 1 ml ejakulátu. Stupeň riedenia ejakulátu určuje hustota spermií. Husté semeno má mliečnu farbu a jeho pH je v rozmedzí od 6,8 do 7,5. Ejakuláty, ktoré majú nízku koncentráciu spermií často majú porušené fertilizačné vlastnosti. Priemerný počet spermií u králikov v 1 mm³ je 750 000. V priebehu roka sa koncentrácia spermií v ejakuláte králikov mení. Najvyššia koncentrácia bola zistená v máji a v júni a najnižšia v januári a vo februári. Ak sú spermie rozptýlené vo väčšom objeme ich oplodňovacia schopnosť je znížená (Chrenek et al., 2006). Koncentrácia spermií v ejakuláte sa zisťuje niekoľkými spôsobmi, najčastejšie sa meria hemocytometrom a fotokolorimetrom. Podľa svojho chemického zloženia ejakulát patrí medzi najzložitejšie biologické produkty organizmu. Obsahuje chemické prvky charakteristické pre živú hmotu: jednoduché a zložené bielkoviny, aminokyseliny,

sacharidy, enzýmy, organické kyseliny, vitamíny, soli a iné. Existuje rozdiel v chemickom zložení ejakulátu (Matarugić et al., 2007).

1.4.1 Vlastnosti ejakulátu králikov

Králiky sú zvieratá, ktoré vynikajú plodnosťou a sú schopné páriť sa v ktoromkoľvek ročnom období (Barát, 1989). Ejakulát králikov je belavej farby. Objem získaného ejakulátu je v určitom pomere k veľkosti králika (Miljković, 1998). Králik ejakuluje pri každom skoku 0,4 – 6 ml ejakulátu (Zadina et al., 2009). Pri menších plemenách priemerný objem je od 0,2 ml a pri väčších od 3,0 ml. Progresívna pohyblivosť sa prejavuje pri 40 – 80 % spermii. V ejakuláte králikov sa vyskytuje aj 5 – 25 % patologických spermii. Priemerné pH ejakulátu je 6,9. Pre umelú insemináciu sa selektujú geneticky najlepší samci, u ktorých je v ejakuláte progresívna pohyblivosť spermii najmenej 70 % (Miljković, 1998). Ejakulát sa u králika získava pomocou umelej vagíny (Chrenek et al., 2006). Vnútorňá teplota umelej vagíny by mala byť 42 °C. Týždenne sa od králikov ejakulát môže odobrať 2 – 4 krát a nedôjde k zmene kvality ejakulátu (Miljković, 1998). Získané semeno je často zmiešané s močom. Priemerná rýchlosť spermii u králika bola nameraná 1,1 – 2,0 mm.min⁻¹ (Chrenek et al., 2006).

1.4.2 Hodnotenie ejakulátu

Základným predpokladom získania kvalitného ejakulátu je dodržiavanie zásad hygieny. Ejakulát sa posudzuje okamžite po odbere. Posudzuje sa makroskopicky, mikroskopicky, biochemicky a mikrobiologicky (Massányi et al., 2002).

Makroskopicky sa hodnotí:

- objem ejakulátu,
- konzistencia,
- farba,
- pach ejakulátu,
- cudzie prímiesy (Šťastný et al., 1998).

Mikroskopicky sa hodnotí:

- koncentrácia spermii,
- aktivita pohybu spermii,
- intenzita pohybu spermii,
- morfológické vyšetrenie ejakulátu.

Pri biochemickom vyšetrení sa robia nasledovné testy:

- skúška na prežívateľnosť spermíí (určuje, ako dlho spermie prežijú v prostredí mimo tela),
- skúška rezistencie (zistuje sa odolnosť spermíí voči škodlivému účinku 1 % roztoku NaCl),
- hodnotenie stupňa aglutinácie spermíí (Massányi et al., 2002).

Mikrobiologicky sa hodnotí:

prítomnosť patogénnych a nepatogénnych mikroorganizmov (Šťastný et al., 1998).

1.5 Pohyblivosť spermíí

Látková premena a pohyb sú charakteristickým prejavom života spermíí a ich fertilizačných vlastností (Chrenek et al., 2006). Na distribúciu spermíí v samičej pohlavnej sústave a na penetráciu do vajíčka je nevyhnutná pohyblivosť spermíí. Aj keď to nie je jediná vlastnosť potrebná na oplodnenie, jej hodnotenie sa stalo v praxi jedným zo základných selekčných kritérií kvality ejakulátov a ich výberu na umelú insemináciu (Massányi et al., 2004). Pohyb spermíí je orientovaný rotačne dopredu. Za 1 sekundu bičík dokáže urobiť 3 – 15 otáčok okolo pozdĺžnej osi. Hlavička rotuje okolo vlastnej pozdĺžnej osi tak, že všetky elementy bičíka nevyvíjajú pohyb v rovnakej rovine, ale počas všetkých kontraktílnych cyklov. Prostredníctvom dyneínových ramien mikrotubulov dochádza k vlastnému pohybu spermie. Radiálne spojenia mikrotubulov s dubletmi zodpovedajú za pohyb a kmitanie bičíka. V minulosti sa predpokladalo, že pohyblivosť je jediným faktorom na transport spermie. Spermie, ktoré sú energeticky vyčerpané a s poškodeným pohybovým systémom nerotujú (Gamčík et al., 1992). Aktivita spermíí je vyjadrená ich pohybom. Normálny fyziologický pohyb spermíí je pohyb dopredu. Formy nefyziologického pohybu sú:

- nepohyblivosť,
- pohyb okolo hlavičky,
- pohyb do kruhu,
- retrográdny pohyb,
- trhavý pohyb,
- kolísavý, oscilačný pohyb (Věžník et al., 2004).

Metabolické procesy prebiehajúce v spermiiach sa využívajú na zabezpečenie pohybu spermii. Štiepením ATP sa získava energia potrebná pre pohyb spermii a akumuluje sa v mitochondriálnej pošve bičíka (Massányi et al., 2004). Od energetických zdrojov nachádzajúcich sa v spojovacom oddieli bičíka spermie a v semennej plazme závisí kvalita metabolických procesov (Chrenek et al., 2006). Spermie na svoj metabolizmus používajú vlastné zásoby sacharidov, lipidov a proteínov. Keď spotrebujú tieto zásoby, spermie sa postupne prestanú pohybovať a odumierajú. Spermie majú negatívny elektrický náboj (Miljković et al., 2005).

Anabióza je silné utlmenie životných procesov (metabolizmus, pohyblivosť), ktoré sa obnovia po odstránení podmienok, ktoré ju vyvolali. V chvoste prisemenníka dochádza k prirodzenej anabióze. Tento stav je spôsobený veľkým nahromadením spermii, nedostatkom fruktózy, O₂, vysokou koncentráciou vodíkových iónov, K, CO₂, nízkou koncentráciou elektrolytov a zníženou teplotou v miešku (Kliment et al., 1989).

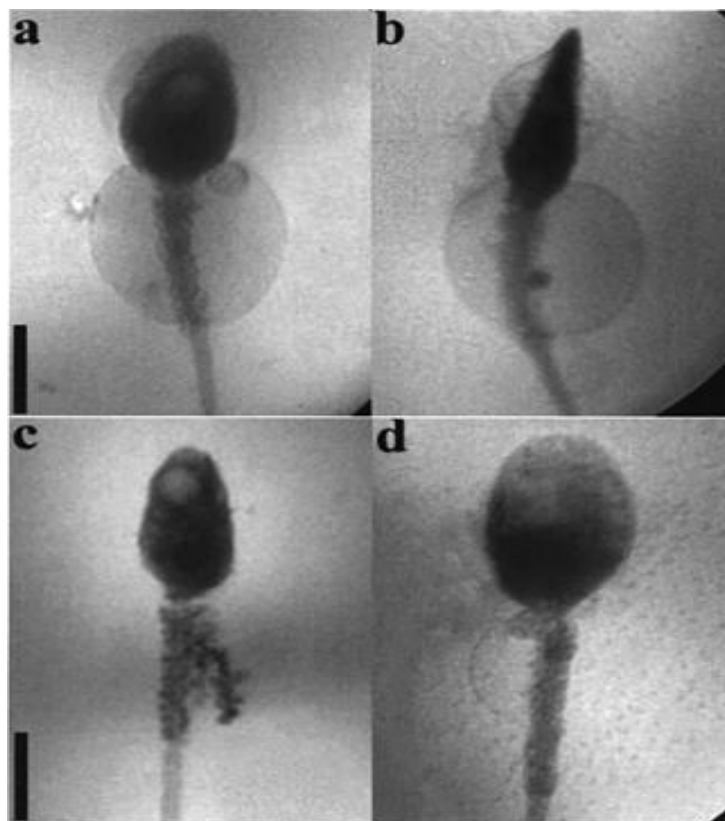
Tab. 1

[Rýchlosť pohybu spermii (Gamčík et al., 1992)]

| Druh | Priemerná rýchlosť pohybu | | |
|---------------|---------------------------|------------------------|----------------------|
| | $\mu\text{m.s}^{-1}$ | $\mu\text{m.min}^{-1}$ | $\mu\text{m.h}^{-1}$ |
| Býk | 94 - 150 | 5,64 – 9,00 | 350 – 540 |
| Baran | 77 | 4,60 | 276 |
| Žrebec | 87 | 5,22 | 312 |
| Kanec | 43 | 2,55 | 153 |
| Králik | 18 - 33 | 1,1 – 2,0 | 66 – 120 |
| Pes | 43 | 2,58 | 155 |
| Muž | 20 - 50 | 2,0 – 3,0 | 120 - 180 |

1.6 Osmóza

Cytoplazmatická membrána je polopriepustná. Membránou prechádza iba rozpúšťadlo – voda. Voda na základe fyzikálnych zákonov prechádza z miesta menšej koncentrácie do miesta s vyššou koncentráciou (Bobák a Šamaj, 1999). Membrána vytvára osmotickú bariéru buniek. Rýchlosť prenikania vody určuje rozdiel osmotického tlaku vnútri a mimo bunky. Ak vložíme bunku do hypertonického roztoku, t.j. roztoku s vyšším osmotickým tlakom, voda z bunky preniká do okolitého prostredia a bunka sa postupne zmršťuje a prichádza k plazmolýze bunky (Massányi et al., 2008). Naopak, ak vložíme bunku do hypotonického prostredia, prostredia s nižším osmotickým tlakom, voda do nej preniká, objem bunky sa zväčšuje a môže bunka prasknúť, prichádza k plazmoptýze bunky. Keď chceme bunky udržať živé v roztokoch, musí byť tento roztok izotonický, t.j. osmotický tlak okolitého prostredia bunky musí byť rovnaký ako osmotický tlak vo vnútri bunky. Takýmto roztokom je roztok 0,9 % NaCl, je to vlastne fyziologický roztok (Bobák a Šamaj, 1999).



a, b – spermie v hypotonickom roztoku; **c, d** – spermie v hypertonickom roztoku.

Obr. 2

[**Obrazky X-lúčovej mikroskopie ľudských spermií (Abraham - Peskir et al., 2002)**]

Spermie sú citlivé na zmeny prostredia. Celú spermiu, hlavičku a všetky oddiely bičíka prekrýva neprerušovaná cytoplazmatická membrána. Táto membrána je veľmi citlivá na zmenu osmózy a ľahko sa poškodí. Pri porušení cytoplazmatickej membrány sa odкрývajú labilné ferménové systémy ako sú akrozóm a mitochondriálny oddiel (Massányi et al., 2004). Pri odbere spermií, na ejakulát živočíchov vplývajú rôzne vonkajšie faktory. Tieto faktory môžu spomaliť alebo urýchliť životné procesy spermií, tak isto môžu poškodiť alebo usmrtiť spermie. Medzi najvýznamnejšie z týchto faktorov patrí osmotický tlak. Izotónia prostredia je jeden zo základných vplyvov významných pre život spermií (Miljković et al., 2005). Izotonické prostredie v semennej plazme je prirodzené prostredie pre spermie. Osmotický tlak prostredia spermií musí zodpovedať osmotickému tlaku spermií. Poruchy osmotických pomerov v ejakuláte, ku ktorým môže dôjsť pri ochorení pohlavných orgánov, majú nepriaznivý vplyv na životnosť spermií. Nepriaznivo pôsobí hypertonický ako aj hypotonický tlak. Nepriaznivý osmotický tlak často vedie aj k deformácii bičíka spermií (Chrenek et al., 2006). V čistej destilovanej vode (hypotonickom prostredí) spermie odumierajú pod vplyvom vnútorného tlaku (spermie praskajú). Hypertonický roztok soli je taktiež spermicídny (napríklad 3 % roztok NaCl) (Miljković et al., 2005). Odumretím spermie vzrastá permeabilita cytoplazmatickej membrány. Tento jav sa používa na farbenie živých a mŕtvych spermií (Massányi et al., 2004).

1.7 Metódy hodnotenia pohyblivosti spermií

Štúdium pohyblivosti spermií je spoločným problémom pre biológov, matematikov a fyzikov. Znalosť rýchlosti pohybu spermií je ukazovateľ, ktorý určuje omnoho výraznejšiu kvalitu ejakulátu. Pri posudzovaní pohybovej aktivity sa sleduje intenzita pohybu, výskyt zmien v tvare bičíkov a vzájomné zhlukovanie spermií (Gamčík et al., 1992). Analýza spermií môže poskytnúť cenné informácie o procesoch spojených s bunkovou činnosťou, pretože sú nepoškodené bunky k dispozícii pre analýzu, ktorá nevyžaduje mechanické alebo chemické poškodenie tkanív. Môže poskytnúť informácie o zdraví semenníkov a prisemenníkov, kvantitatívne informácie o sekrečnej funkcii prostaty, semenných vezikúl a prisemenníka ako aj informácie o vylučovaní liečiv a iných chemických látok z týchto žliaz (Eliasson, 2010). Hodnotenie pohyblivosti spermií sa uskutočňuje rôznymi metódami. Hodnotí sa pohyblivosť spermií indexom pohyblivosti a metódami založenými na princípe kvantitatívneho zistenia percenta pohyblivých spermií. Významnú úlohu pri sledovaní

pohyblivosti spermií má počítačová komôrka. Používaná bola aj metóda sledovania celkovej priemernej rýchlosti pohybu v ejakuláte. Bol navrhnutý nový typ počítačovej komôrky, vhodnej pre zisťovanie pohyblivosti ľudských spermií (Massányi et al., 2002). Evolúcia kvality semena musí uznať, že funkčná spôsobilosť je stanovená niekoľkými faktormi. Hodnotenie morfológického stavu a pohyblivosti spermií sú len hrubé náznaky ich oplodňovacích schopností. Rozmrazenie kryokonzervovaných spermií ukazuje zlú koreláciu s plodnosťou, čo naznačuje, že subcelulárne poškodenie môže ovplyvniť plodnosť bez súčasného vplyvu na pohyblivosť (Blottner et al., 2001). Celkový počet spermií v ejakuláte a celkový objem tekutín sú dve hlavné kvantitatívne vlastnosti spermy, a sú to nevyhnutné merania pri analyzovaní spermií. Kvalita každej spermie je tak isto dôležitá ako aj počet spermií v ejakuláte. V skutočnosti by sa kvalita každej spermie u reprezentatívnej vzorky spermií mala merať s ohľadom na viaceré samostatné vlastnosti, ktoré môžu byť hodnotené buď subjektívnym alebo objektívnym spôsobom (Amann, 2010).

V poslednom období značnú pozornosť zaznamenalo používanie komputrových metód na analýzu ejakulátov, hodnotenie fertility a sterility v humánnej a veterinárnej andrológii. Existuje veľké množstvo spôsobov a zariadení pre hodnotenie ejakulátu – turbidimetrický, spektrofotometrický, fotomikrografické metódy. Prístroje, ktoré sú zahrnuté do skupiny pod spoločným názvom CASA (Computer Automated Semen Analyser) a prístroje, ktoré sa v súčasnosti overujú prípadne používajú na experimentálnej úrovni na báze laserových spektroskopov (Massányi et al., 2002).

1.7.1 CASA

CASA (Computer Automated Semen Analyser) analýza spermií sa stala dnes najpoužívanejšia pri skúmaní kvality spermií mužov alebo hospodárskych zvierat. Je štandardným nástrojom pre hodnotenie pohyblivosti spermií a pohybové vzory, pretože poskytuje objektívne údaje o kvalite spermií (Contri et al., 2010). Používanie CASA metód je vhodnou alternatívou k tradičným spôsobom hodnotenia ejakulátov, k hematocytometrickému hodnoteniu koncentrácie spermií a mikroskopickému sledovaniu pohyblivosti spermií. Tieto metódy sa tiež používajú aj v humánnej praxi ako aj pri hodnotení fertility a sterility u všetkých druhov zvierat (Massányi et al., 1998). Metóda CASA umožňuje lepšiu indikáciu fertilizačných schopností semena (Chrenek et al., 2006). Najväčším výrobcom týchto prístrojov je americká firma Hamilton Thorn Research Inc. Sú rôzne verzie analyzátorov spermií pod označením HTM (Hamilton Thorn Motility

Analysér). Najrozšírenejší prístroj z tejto skupiny je analyzátor spermíí verzie 10 alebo systém IVOS – HTM (Integral Visual Optical System HTM). Tento prístroj má zabudovanú analyzačnú komôrku, obrazovku, klávesy a tlačiareň. Ejakulát sa hodnotí v kvapke prenesenej na špeciálne upravené podložné sklíčko s mikrocelilami na vyhrievanom stolíku. Samotná analýza prebieha automaticky. Vyhodnotenie prebieha na základe veľkosti, pohyblivosti, svetlosti, odrazu a zadržiavania svetelných lúčov spermiami. Analýza môže prebiehať pri vlnovej dĺžke 660 nm alebo 882 nm. Rozlišujú sa nepohyblivé od pohyblivých spermíí a identifikujú sa ich dráhy pohybu. Prístroj najskôr identifikuje pohyblivé spermie. Každá dráha pohybu sa analyzuje samostatne. Pre definovanie dráhy sa vypočíta pozícia centra jasnosti hlavičky. Negatívny fázový kontrast sa používa ako systém analýzy. Dĺžka analýzy závisí od zadaných hodnotiacich kritérií, maximálne trvá 3 minúty. Výsledky analýzy HTM sú:

- pohyblivosť (%),
- celkový počet spermíí (v celej vzorke; v inseminačnej dávke),
- stredná dráhová rýchlosť – VAP ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$),
- progresívny pohyb vo vzorke, v dávke (%),
- priamosť pohybu – STR (%),
- rýchlosť dráhy ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$),
- progresívna rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$),
- linearita – priamosť pohybu (%),
- laterálny pohyb hlavičky (μm),
- plocha hlavičky (μm^2) (Massányi et al., 2002).

2 Cieľ práce

V predkladanej bakalárskej práci sme sa venovali predovšetkým týmto témam: charakteristika spermatogenézy, morfológia spermií, zloženie ejakulátu, vplyv zmeny osmotického tlaku na spermie, pohyblivosť spermií, metódy hodnotenia ejakulátu a vplyv rôznych koncentrácií NaCl na pohyblivosť spermií. Preštudované literárne zdroje sme použili ako podklad pre experimentálne prevedenie záverečnej práce.

Cieľom bakalárskej práce bolo:

- zistiť vplyv rôznych koncentrácií NaCl na pohyblivosť spermií králikov,
- porovnať parametre pohyblivosti (pohyblivosť a progresívna pohyblivosť spermií) v jednotlivých časových intervaloch.

3 Metodika práce a metódy skúmania

V bakalárskej práci sme použili ejakuláty 6 náhodne vybraných plemenných králikov. Odber ejakulátu sa realizoval od samcov králika pomocou umelej vagíny. Pre udržanie teploty ejakulátu po ejakulácii sme uchovávali vzorky v termoske z polystyrénu vystlanej vatovými tampónmi. Všetky ejakuláty sme spolu zmiešali, čím sme vytvorili jednu heterospermatickú vzorku, aby sme mali dostatočné množstvo ejakulátu na analýzu, pretože množstvo ejakulátu jedného králika (asi 0,2 ml) nestačí pre danú analýzu. Ejakuláty sme po prenose do laboratória riedili roztokmi s rôznymi koncentraciami NaCl.

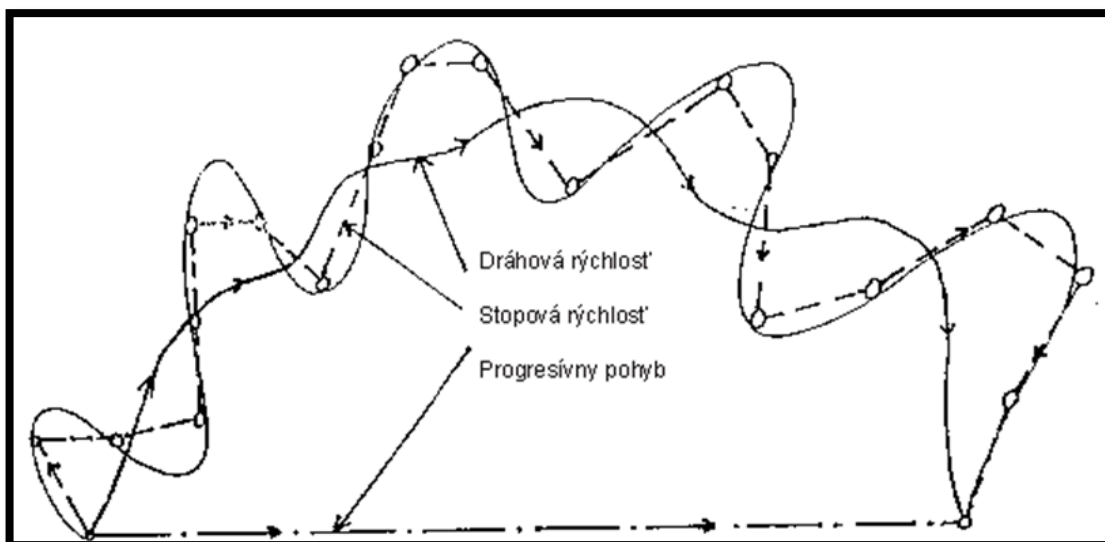
Roztokov bolo sedem: 0,7 %; 0,8 %; 0,9 %; 1,0 %; 1,1 %; 1,2 %; 1,3 % NaCl. Roztok s koncentráciou 0,9 % je fyziologický roztok (kontrola). Ejakulát sme kultivovali pri teplote v miestnosti – laboratórna teplota (25 °C) a riedili s každým roztokom osobitne v pomere 5:1 (500 µl roztoku + 100 µl ejakulátu), čím sme vytvorili sedem pokusných vzoriek. Merania sme vykonávali použitím metódy CASA (Computer Assisted Sperm Analysis – analýza pohyblivosti spermií počítačovou technikou).

CASA analýza

Na hodnotenie pohyblivosti spermií sme použili CASA (Computer Assisted Sperm Analysis – analýza pohyblivosti spermií počítačovou technikou) systém SpermVision (Minitüb, Tiefenbach, SRN) s mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus, Japonsko). Každú vzorku sme umiestnili do počítacej komôrky Makler Counting Chamber s hĺbkou 10 µm (Sefi–Medical Instruments, SRN) a následne umiestnili do zorného poľa. V každej vzorke sme sledovali nasledovné parametre:

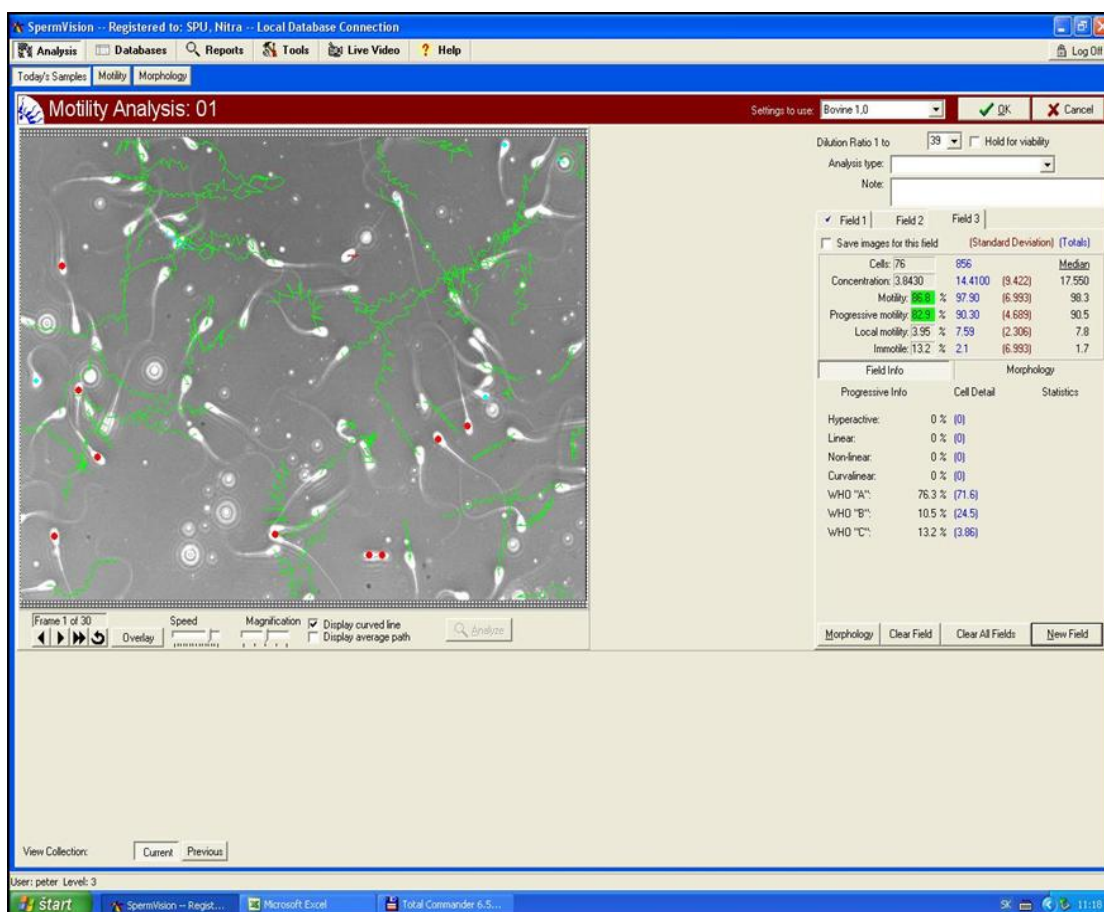
- percento pohyblivých spermií ($>5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
- percento progresívne pohyblivých spermií ($>20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$).

Dané parametre sme sledovali v čase 0 a v čase 60. Princípom metódy CASA je digitalizácia pohybu spermií – jednotlivých krivočiar (Obrázok č. 3), ktorá sa následne vyhodnotí softvérom a znázorní na obrazovke PC (Obrázok č. 4).



Obr. 3

[Priebeh záznamu krivočiarového pohybu spermí a hodnotené parametre]



Obr. 4

[Výstup CASA analýzy na PC]



Obr. 5

[Přístroj Sperm Vision na analýzu kvality spermií]

<http://www.minitube.com/Images/products/sperm-vision.jpg>

4 Výsledky práce

V predloženej bakalárskej práci sme sledovali vplyv zmeny osmotického tlaku na parametre pohyblivosti spermií králikov. Parametre pohyblivosti spermií sme hodnotili CASA analýzou. Výsledky analýzy sú uvedené v tabuľkách 2 – 5.

Percento pohyblivých spermií v čase 0 bolo rôzne v závislosti od koncentrácie roztoku NaCl. Najvyššie percento pohyblivých spermií v čase 0 bolo vo fyziologickom roztoku (0,9 % roztok NaCl). Zvyšovaním a znižovaním koncentrácie klesalo aj percento pohyblivých spermií. Pri 0,7 % roztoku NaCl pohyblivých spermií bolo 74,52 %, pri 0,8 % roztoku 88,14 %, pri 0,9 % roztoku 90,56 %, pri 1,0 % roztoku 90,35 %, pri 1,1 % roztoku 89,09 %, pri 1,2 % roztoku 88,87 % a pri 1,3 % roztoku 88,02 % pohyblivých spermií.

Po 60 minútovej kultivácii spermií v roztokoch s rôznymi koncentraciami NaCl sme zaznamenali nasledovné percentá pohyblivých spermií: pri 0,7 % roztoku 49,13 %, pri 0,8 % roztoku 63,79 %, pri 0,9 % roztoku 79,86 %, pri 1,0 % roztoku 73,75 %, pri 1,1 % roztoku 70,71 %, pri 1,2 % roztoku 70,09 %, pri 1,3 % roztoku 64,99 % pohyblivých spermií.

Okrem percenta pohyblivých spermií sme sledovali aj percento progresívne pohyblivých spermií. V čase 0 percento progresívne pohyblivých spermií pri rôznych koncentráciách bolo nasledovné: pri 0,7 % roztoku 41,42 %, pri 0,8 % roztoku 70,93 %, pri 0,9 % roztoku 83,35 %, pri 1,0 % roztoku 79,75 %, pri 1,1 % roztoku 79,55 %, pri 1,2 % roztoku 77,36 %, pri 1,3 % roztoku 74,87 % progresívne pohyblivých spermií.

V čase 60 sme zaznamenali nasledovné percentá progresívne pohyblivých spermií králikov: pri 0,7 % roztoku 26,37 %, pri 0,8 % roztoku 37,35 %, pri 0,9 % roztoku 64,78 %, pri 1,0 % roztoku 61,56 %, pri 1,1 % roztoku 55,08 %, pri 1,2 % roztoku 54,65 %, pri 1,3 % roztoku 40,04 % progresívne pohyblivých spermií. Aj pri sledovaní tohto parametra pohyblivosti sme zaznamenali najvyššie percento progresívne pohyblivých spermií králikov vo fyziologickom roztoku.

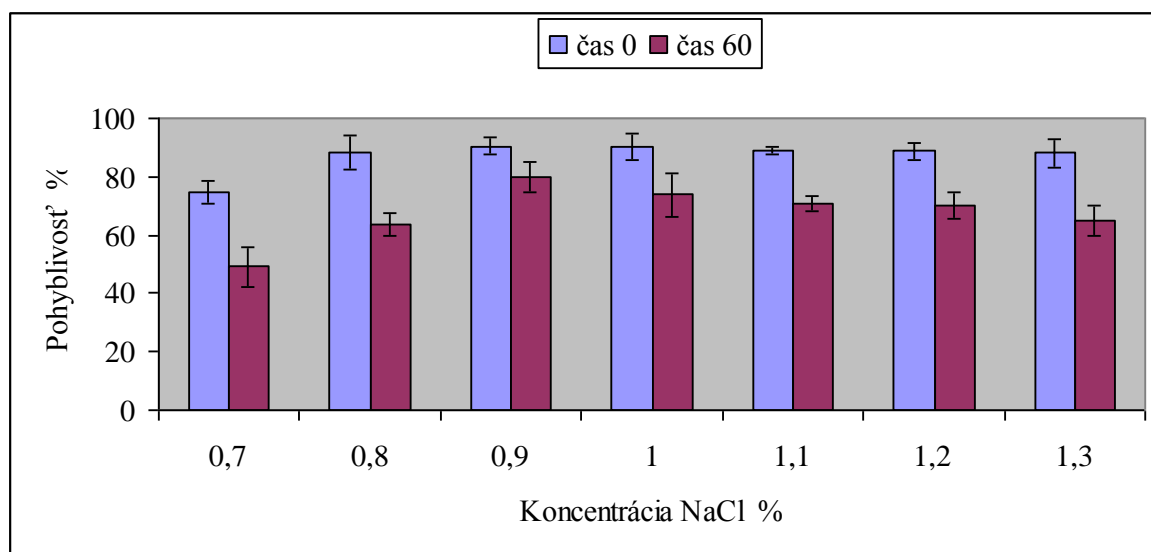
Z týchto výsledkov vyplýva, že akákoľvek zmena osmotického tlaku a takisto zvyšovanie doby kultivácie pri teplote laboratória znižuje pohyblivosť aj progresívnu pohyblivosť spermií králikov.

Tab. 2**[Pohyblivosť spermií v rôznych koncentráciách NaCl v čase 0]**

| | Koncentrácia NaCl (%) | | | | | | |
|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| min | 65,21 | 77,94 | 85,24 | 81,48 | 86,95 | 84,40 | 80,28 |
| max | 79,24 | 95,65 | 95,71 | 96,07 | 91,52 | 93,33 | 96,15 |
| priemer | 74,52 | 88,14 | 90,56 | 90,35 | 89,09 | 88,87 | 88,02 |
| sd | 4,05 | 5,74 | 2,89 | 4,53 | 1,38 | 2,87 | 5,01 |

Tab. 3**[Pohyblivosť spermií v rôznych koncentráciách NaCl v čase 60]**

| | Koncentrácia NaCl (%) | | | | | | |
|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| min | 36,20 | 55,35 | 68,18 | 55,88 | 67,64 | 63,75 | 59,70 |
| max | 60,52 | 67,69 | 87,50 | 81,25 | 75,43 | 76,92 | 74,00 |
| priemer | 49,13 | 63,79 | 79,86 | 73,75 | 70,71 | 70,09 | 64,99 |
| sd | 6,86 | 3,95 | 5,38 | 7,54 | 2,52 | 4,29 | 4,94 |

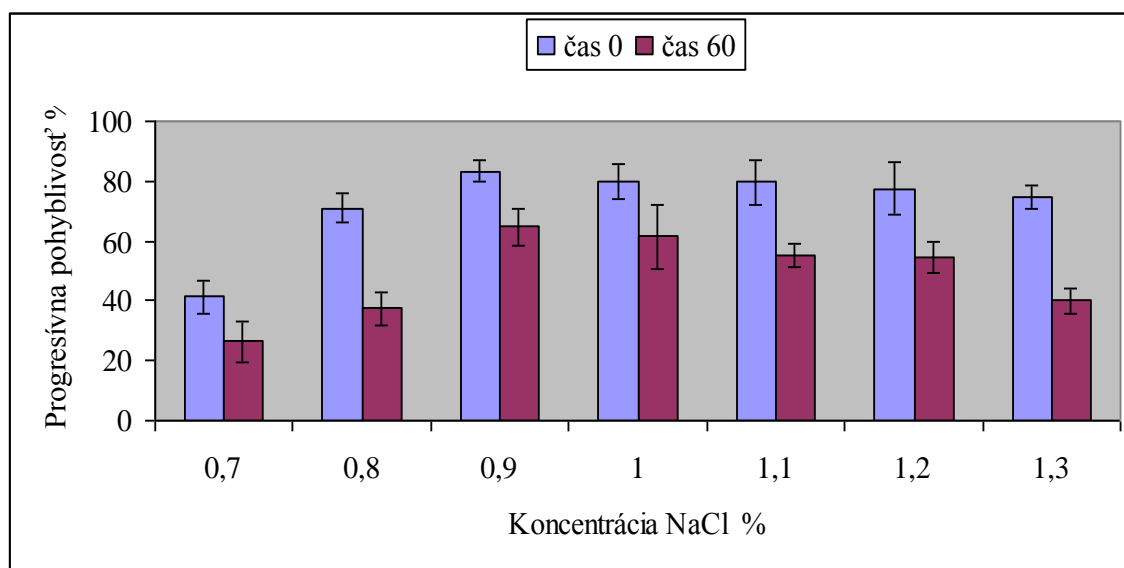
**Graf 1****[Pohyblivosť spermií v rôznych koncentráciách NaCl v čase 0 a čase 60]**

Tab. 4**[Progresívna pohyblivosť spermíí v rôznych koncentráciách NaCl v čase 0]**

| | Koncentrácia NaCl (%) | | | | | | |
|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| min | 32,60 | 61,76 | 77,94 | 66,66 | 62,96 | 57,40 | 69,73 |
| max | 51,02 | 78,26 | 90,00 | 86,11 | 88,23 | 86,66 | 81,90 |
| priemer | 41,42 | 70,93 | 83,35 | 79,75 | 79,55 | 77,36 | 74,87 |
| sd | 5,61 | 4,89 | 3,70 | 5,98 | 7,32 | 8,79 | 3,95 |

Tab. 5**[Progresívna pohyblivosť spermíí v rôznych koncentráciách NaCl v čase 60]**

| | Koncentrácia NaCl (%) | | | | | | |
|----------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| min | 16,66 | 25,37 | 57,57 | 35,29 | 47,50 | 48,93 | 34,32 |
| max | 36,61 | 45,45 | 72,58 | 71,87 | 61,03 | 64,70 | 45,94 |
| priemer | 26,37 | 37,35 | 64,78 | 61,56 | 55,08 | 54,65 | 40,04 |
| sd | 6,61 | 5,47 | 6,07 | 10,66 | 3,81 | 5,15 | 4,24 |

**Graf 2****[Progresívna pohyblivosť spermíí v rôznych koncentráciách NaCl v čase 0 a čase 60]**

5 Diskusia

V práci popisujeme účinok zmeny osmotického tlaku na parametre pohyblivosti spermíí králikov. Zo získaných výsledkov vyplýva, že najvyššia pohyblivosť spermíí králikov bola vo fyziologickom roztoku a že akákoľvek zmena osmotického tlaku nepriaznivo ovplyvňuje pohyblivosť spermíí. Tak isto sme pozorovali, že po ejakulácii parametre pohyblivosti spermíí dosahujú najvyššie hodnoty. S predĺžovaním doby kultivácie sa ich pohyblivosť znižuje.

Amorim et al. (2009) pracovali s Hypoosmotic swelling test (HOST), ktorý sa ukázal ako vhodný nástroj na hodnotenie integrity membrány spermíí rôznych domácich zvierat, vrátane hovädzieho dobytku, koní a ošípaných. Táto metóda doteraz nebola testovaná na králičích spermíách. Štúdia sa zamerala na stanovenie najlepšieho hypotonického roztoku pre stanovenie integrity membrány v čerstvých králičích spermíách. Boli použité roztoky sacharózy: 50, 60, 75, 100, 125 a 150 mOsm/L. Výsledky naznačujú, že 60 mOsm/L bolo najviac žiaduce pre použitie v HOST v čerstvých králičích spermíách.

Cieľom štúdie Stiaula et al. (2010) bolo stanoviť účinok sorbitolu na osmotickú toleranciu počas čiastočného vysychania hovädzích spermíí. Ochranná úloha sorbitolu bola skúmaná študovaním osmotického správania v hypertonickom Tyrodejovom pufrí v prítomnosti sorbitolu a trechalózy a študovaním účinku sorbitolu a trechalózy na pohyblivosť spermíí po čiastočnej dehydratácii. Štúdie zahŕňali aj posúdenie pohyblivosti a objemovej reakcie v prítomnosti prídavných látok. Pohyblivosť bola testovaná po sušení vzoriek, ktoré majú rôzny obsah vody a nasledujúcou okamžitou rehydratáciou. Výsledky ukázali lepšiu pohyblivosť v prítomnosti sorbitolu a trechalózy, kým štúdie so sušením ukázali zvýšenú osmotickú toleranciu v prítomnosti sorbitolu. Štúdia pohyblivosti v hypertonických podmienkach v kombinácii s objemom ejakulátu ukázala, že sorbitol poskytuje zvýšenie permeability v bunkách.

Potenciálne faktory, ktoré ovplyvňujú prežitie spermíí v hypertonických podmienkach boli hodnotené Blancom et al. (2008). Osmotická tolerancia spermíí bola hodnotená po 2, 10, 45 a 60 minútach pri teplote 4 °C a 21 °C. Boli testované žeriavčie a morčacie spermie. Výsledky ukázali rozdiely osmotickej tolerancie medzi žeriavčiami a morčacími spermiami. Teplota a čas expozície ovplyvnili prežitie spermíí v hypertonických podmienkach. Spermie žeriava sú odolnejšie v hypertonickom roztoku.

Záver

V bakalárskej práci sme analyzovali vplyv rôznych koncentrácií NaCl v rôznych časových obdobiach – 0 a 60 minút. Parametre pohyblivosti králičích spermíí sme hodnotili použitím CASA analýzy pri laboratórnej teplote. Cieľom našej štúdie bolo určiť účinok zmeny osmotického tlaku na parametre pohyblivosti – pohyblivosť a progresívnu pohyblivosť. Hodnotením pohyblivosti spermíí králikov sme zistili, že najvyššia pohyblivosť bola vo fyziologickom roztoku (0,9 % roztok NaCl), keď je osmotický tlak roztoku rovnaký ako osmotický tlak vo vnútri spermíí. V čase 0 bola vyššia pohyblivosť spermíí ako po 60 minútovej kultivácii spermíí v roztokoch NaCl. Vo fyziologickom roztoku v čase 0 bola pohyblivosť spermíí 90,56 % a v čase 60 bola 79,86 %, kým pohyblivosť spermíí v roztokoch 0,7 %, 0,8 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 % a 1,3 % NaCl bola nižšia. Progresívny pohyb spermíí klesal spolu s motilitou spermíí. V čase 0 vo fyziologickom roztoku percento progresívne pohyblivých spermíí bolo 83,35 % a v čase 60 bolo 64,78 %, kým pri ostatných roztokoch bol nižší. Zvyšovaním a znižovaním koncentrácie NaCl nad a pod 0,9 % klesalo percento pohyblivých spermíí aj progresívne pohyblivých spermíí králikov. Pri roztokoch s nižšou koncentráciou ako je 0,9 %, t.j. hypotonických roztokoch kde je osmotický tlak nižší ako tlak v spermíách prichádzalo pravdepodobne k lýze buniek. Tiež pri roztokoch s koncentráciou NaCl vyššou ako je 0,9 %, pravdepodobne prichádzalo k lýze buniek, lebo sú to roztoky hypertonické čo znamená, že je ich osmotický tlak vyšší ako osmotický tlak v spermíách čo sa prejavilo aj na parametroch pohyblivosti.

Výsledky, ktoré sme dosiahli naznačujú tendenciu poklesu parametrov pohyblivosti pod vplyvom zmeneného osmotického tlaku. Tak isto môžeme konštatovať, že pohyblivosť spermíí králikov sa znižuje s predlžovaním doby kultivácie pri laboratórnej teplote.

Zoznam použitej literatúry

1. ABRAHAM – PESKIR, J. V. et al. 2002. Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. In *Human Reproduction*, roč. 17, č. 2, s. 375-382.
2. AMANN, R. P. 2010. Tests to measure the quality of spermatozoa at spermiation. In *Asian Journal of Andrology*, roč. 12, s. 71-78.
3. AMORIM, E. A. et al. 2009. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. In *Animal Rreproduction Science*, roč. 111, s. 43-338. ISSN 1873-2232. [online]. [cit. 2011-03-17]. Dostupné na internete: <<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?vid=5&hid=111&sid=86d997de-eae5-4f2b-8919-16d3b3a831bd%40sessionmgr112&bdata=JnNpdGU9ZWZWhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#db=mnh&AN=18583071>>
4. AUGER, J. 2010. Assessing human morphology: top models, underdogs or biometrics? In *Asian Journal of Andrology*, roč. 12, s. 36-46.
5. BARÁT, E. 1989. *Chováme kráľiky*. 1. vyd. Bratislava : Príroda, 1989. 164 s.
6. BARTH, A. D. – OKO, R. J. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames : Iowa State University Press, 1989. 285 s. ISBN 0-8138-0112-5
7. BLANCO, J. M. et al. 2008. Osmotic tolerance of avian spermatozoa: influense of time, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. In *Cryobiology*, roč. 56, vyd. 1, č. 7, s. 8-14. ISSN 00112240. [online]. [cit. 2011-03-17]. Dostupné na internete: <<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?vid=14&hid=111&sid=86d997de-eae5-4f2b-8919-16d3b3a831bd%40sessionmgr112&bdata=JnNpdGU9ZWZWhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#db=a9h&AN=28553064>>
8. BLOTTNER, S. et al. 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non – breeding season. In *Animal reproduction Science*, roč. 65, s. 75-88.
9. BOBÁK, M. – ŠAMAJ, J. 1999. *Cytológia*. Bratislava : Univerzita Komenského v Bratislave, 1999. 284 s. ISBN 80-223-1374-2.
10. CONTRI, A. et al. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. In *Theriogenology*, vyd. 3, roč. 12, č. 74, s. 424-435. ISSN 0093691X. [online]. [cit. 2011-01-17]. Dostupné na internete:

<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?vid=7&hid=111&sid=86d997de-eae5-4f2b-8919-16d3b3a831bd%40sessionmgr112&bdata=JnNpdGU9ZWwhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#db=mnh&AN=20451996>

11. DE JONGE, CH. J. – BARRATT, CH. L. R. 2006. *The sperm cell*. New York : Cambridge University Press, 2006. 359 s. ISBN 978-0-521-85397-2.
12. ELIASSON, R. 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. In *Asian Journal of Andrology*, roč. 12, s. 26-32.
13. GAMČÍK, P. et al. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Bratislava : Príroda, 1992. 299 s. ISBN 80-07-00540-4.
14. GAMČÍK et al. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Bratislava: Príroda, 1984. 344 s.
15. CHRENEK, P. et al. 2006. *Produkcia a analýza transgénnych králikov*. Nitra : Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu v Nitre, 2006. 237 s. ISBN 80-88872-54-5.
16. JELÍNEK et al., 2003. *Fyziologie hospodárskych zvierat*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 414 s. ISBN 80-7157-644-1.
17. KIRCHHOFF, C. – OSTERHOFF, C. – SCHRÖTER, S. 2000. Cross-talk between spermatozoa and cells of the male genital tract. In *Reproduction in Domestic Animals*, roč. 35, s. 7-48. ISSN 0936-6768.
18. KLIMENT, J. et al. 1989. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. Bratislava : Príroda, 1989. 392 s. ISBN 80-07-00027-5.
19. KOVÁČIK, J. et al. 2009. *Fyziológia živočíchov*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2009. 185 s. ISBN 978-80-552-0223-5.
20. KROČKOVÁ, J. – MASSÁNYI, P. 2010. *In vitro cytotoxicita niklu*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2010. 111 s. ISBN 978-80-552-0394-2.
21. KULÍŠEK, V. – HLUCHÝ, S. – TOMAN, R. 2006. *Cytológia, histológia a embryológia*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2006. 196 s. ISBN 80-8069-764-7.
22. LUKÁČ, N. et al. 2007. *Stopové prvky a kvalita spermií*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2007. 188 s. ISBN 978-80-8069-904-8.

-
23. MARVAN, F. et al., 2003. *Morfologie hospodářských zvířat*. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze, 2003. 328 s. ISBN 80-209-0319-4.
 24. MASSÁNYI, L. 1991. *Funkčná morfológia spermie*. Bratislava : Slovenská akadémia vied, 1991. 196 s. ISBN 80-224-0149-8.
 25. MASSÁNYI, P. et al. 1998. Časovo závislá pohyblivosť žrebčích spermií hodnotená komputrovým analyzátorom. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 23, 1998, č. 3, s. 134-135.
 26. MASSÁNYI, P. et al. 2002. *Hodnotenie pohyblivosti spermií komputrovou technikou*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2002. 70 s. ISBN 80-8069-117-7.
 27. MASSÁNYI, P. et al. 2004. *Fyziológia bunky*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2004. 148 s. ISBN 80-8069-443-5.
 28. MASSÁNYI, P. et al. 2008. *Fyziológia bunky*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2008. 140 s. ISBN 978-80-552-0107-8.
 29. MATARUGIĆ, D. – JOTANOVIĆ, S. – MILJKOVIĆ, V. 2007. *Fiziologija i patologija reprodukcije goveda*. Banja Luka : Poljoprivredni fakultet, 2007. 536 s. ISBN 978-99938-93-09-7.
 30. MILJKOVIĆ, V. 1998. *Veštačko osemenjavanje životinja*. Beograd : Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1998. 320 s. ISBN 86-17-06-354-8.
 31. MILJKOVIĆ, V. – VESELINOVIĆ, S. 2005. *Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osmenjavanje domaćih životinja*. Beograd : Veterinarska komora Srbije, 2005. 528 s. ISBN 86-82301-56-3.
 32. PTÁČEK, V. 2007. Stavba spermie. In *Embryologie a reprodukce živočichů*. [online], 2007. [cit. 2011-04-13]. Dostupné na internete: <<http://www.sci.muni.cz/ptacek/REPRODUKCE2.htm>>
 33. REECE, W. O. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Praha : Grada Publishing, 1998. 456 s. ISBN 80-7169-547-5.
 34. SITAULA, R. et al. 2010. A study of the effect of sorbitol on osmotic tolerance during partial desiccation of bovine sperm. In *Cryobiology*, roč. 60, vyd. 3, č. 6, s. 331-336. ISSN 00112240. [online]. [cit. 2011-01-17]. Dostupné na internete: <<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?vid=9&hid=111&sid=86d997de-eae5-4f2b-8919-16d3b3a831bd%40sessionmgr112&bdata=JnNpdGU9ZWZwhvc3QtbGl2ZQ%3d%3d#db=mnh&AN=20233588>>
-

-
35. ŠŤASTNÝ, P. – LACKOVÁ, D. – LUKÁČ, N. 1998. *Praktická inseminácia kráv*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 1998. 36 s. ISBN 80-7137-507-1.
36. VĚŽNÍK, Z. et al. 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Brno : Výzkumní ústav veterinárního lékařství, 2004. 135 s. ISBN 80-86895-01-7.
37. ZADINA, J. et al. 2009. *Chov králíků*. 2. vyd. Praha : Nakladatelství Brádza, 2009. 208 s. ISBN 978-80-209-0369-3.