

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
1130967**

**ÚČINOK PRIDANIA KOFEÍNU NA POHYBLIVOSŤ
SPERMIÍ KRÁLIKA IN VITRO**

2011

Lucia Slyšková

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA
UNIVERZITA NÁZOV FAKULTY**

**ÚČINOK PRIDANIA KOFEÍNU NA POHYBLIVOSŤ
SPERMIÍ KRÁLIKA IN VITRO**

Bakalárska práca

Študijný program:	Agrobiotechnológie
Študijný odbor:	2908700 biotechnológie
Školiace pracovisko:	Katedra fyziológie živočíchov
Školiteľ:	Massányi Peter prof. MVDr., PhD.

Nitra 2011

Lucia Slyšková

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Lucia Slyšková vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Účinok pridania kofeínu na pohyblivosť spermií králika in vitro“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

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

V Nitre 17. mája 2011

Lucia Slyšková

Pod'akovanie

Touto cestou vyslovujem pod'akovanie vedúcemu diplomovej práce prof. MVDr. Peter Massányimu, PhD. za pomoc, odborné vedenie, cenné rady, konzultácie a pripomienky pri vypracovaní mojej diplomovej práce.

Abstrakt

Cieľom práce bolo zistiť parametre pohyblivosti spermíí králikov vplyvom rôznych koncentrácií kofeínu a v rôznych časových intervaloch a teplotách kultivácie. Odber ejakulátu bol realizovaný od dospelých samcov králika. Následne boli vzorky zriedené a upravované – prídavok kofeínu 1,25 (skupina KA), 2,5 (skupina KB) a 7,5 µg (skupina KC) a porovnávané s kontrolnou skupinou (KK). Kofeín bol riedený v 250 ml fyziologického roztoku. Vzorky sme merali v rôznych časových intervaloch pri teplote 37°C: 0, 30, 60, 120 minút, pri teplote 5°C: 1440, 2880 minút. Merania sme vykonávali použitím metódy CASA.

Pri hodnotení výsledkov sme zistili zvýšenú pohyblivosť spermíí už po 30 minútach. Výrazný pokles pohyblivosti spermíí oproti ostatným časovým intervalom, bol preukázaný v čase kultivácie 1440 a 2880 minút, kedy sme kultivovali pri 5°C. Pri hodnotení percenta progresívne pohyblivých spermíí pri kultivácií 30, 60, 120 minút bola preukázaná zvýšená pohyblivosť. V čase kultivácie 1440 a 2880 minút bol zaznamenaný pokles progresívnej pohyblivosti. Sledovaním DAP, DCL, DSL parametrov sme zistili zvýšenie pohyblivosti v časových intervaloch 30, 60, 120 minút.

Výsledky našej analýzy dokazujú, že prídanie kofeínu do ejakulátov pri teplote 37°C stimuluje pohyblivosť spermíí. Pri kultivácií spermíí pri teplote 5°C sa však pohyblivosť znížila.

Kľúčové slová: spermie, pohyblivosť, kofeín, teplota

Abstract

Target of this study was to analyze rabbit spermatozoa motility parameters affected by various caffeine concentrations at various time periods and temperatures of culture. The semen collection was realized from rabbit adult males. Subsequently the samples were diluted and processed – addition of caffeine 1.25 (group KA), 2.5 (group KB) and 7.5 (group KC) a compared to control group (KK). Caffeine was diluted in 250 ml of physiological solution. Samples were measured in various time periods (0; 30; 60 and 120 minutes) at the temperature 37°C and at 5°C after 1440 and 2880 minutes of culture. All measurements were realized using CASA method.

In the results evaluation increased spermatozoa motility was detected even after 30 minutes. Significant increase of spermatozoa motility against other time periods was detected at the culture times 1440 and 2880 minutes at 5°C temperature culture. For the evaluation of spermatozoa progressive motility at the culture time 30, 60 and 120 minutes a significant increase was found. Detection of DAP, DCL and DSL parameters achieved an increase at time period 30, 60 and 120 minutes.

Results of our analysis demonstrate that addition of caffeine to semen increase spermatozoa motility at 37°C. At culture temperature 5°C spermatozoa motility decreased.

Key words: spermatozoa, motility, caffeine, temperature

Obsah

Úvod	7
1 Reprodukcia zvierat	8
1.1 Miešok	8
1.2 Semenníky (<i>testes</i>)	9
1.3 Prisemenník (<i>epididymis</i>)	10
1.4 Semenovod (<i>ductus deferens</i>)	10
1.5 Ejakulát	11
1.6 Spermie	11
1.6.1 Hlavička spermie (<i>caput spermii</i>)	12
1.6.2 Bičiek (<i>flagellum spermii</i>)	14
1.7 Spermatogenéza	15
1.8 Metabolizmus a pohyb spermíí	19
1.9 Faktory ovplyvňujúce pohyblivosť spermíí	19
1.10 Podmienky chovu hospodárskych zvierat, výživa a stres	20
1.11 Kofeín	21
2 Ciele práce	23
3 Materiál a metodika práce	24
4 Výsledky	26
5 Diskusia	43
6 Záver	45
7 Zoznam použitej literatúry	46

Úvod

Rozvoj biologických vied bol v poslednom desaťročí veľmi intenzívne spojený s rozvojom technológií zameraných na spoznanie princípov a riadenie biologických procesov reprodukcie cicavcov. Biotechnológie cicavcov, ako súbor techník a technológií sa u zvierat vyvíjali s cieľom skrátiť reprodukčné intervaly zvierat, využiť a skvalitniť ich genetický materiál, prekonať poruchy reprodukcie, resp. využiť ich ako zdroj buniek, tkanív, alebo poznatkov využiteľných v biomedicínskom výskume.

Medzi biotechnologické metódy patria aj *in vivo* a *in vitro* experimenty. *In vivo* pokusy sú procesy, pri ktorých pracujeme so živými zvieratami. *In vitro* kultivácie sú zamerané výhradne na prácu s bunkami, mimo organizmu v podmienkach napodobňujúcich prostredie organizmu. Izolácia buniek pre použitie *in vitro* kultivácií redukuje počet použitých zvierat, pretože množstvo pokusov sa môže vykonávať z jedného orgánu. Bunky sú veľmi citlivé na zmeny teploty a svetla. Optimálna teplota pre kultiváciu je 37°C. Prítomnosť kyslíka je nežiaduci jav, ktorý sa pri *in vitro* kultivácii nedá úplne odstrániť, ale len eliminovať, napr. prídavkom kyseliny askorbovej, resp. glutamínu alebo BSA – bovine serum albumin do média, ktoré zmierňujú tento efekt.

Účelom bakalárskej práce bol využiť kofeín, ako prídavok do ejakulátu králikov.

1 Reprodukcia zvierat

Reprodukcia hospodárskych zvierat je podklad vývoja ich úžitkovosti. Jej ciele pre najbližšie obdobie možno zhrnúť do komplexného štúdia procesu oplodnenia veľkých hospodárskych zvierat, oplodnenia *in vitro*, zmrazovania embryí, štúdia blastocýst a experimentálneho overovania možností ich vývoja *in vitro*, ako aj štúdia využitia ováriálnych oocytov. Tieto úlohy zdanlivo viac smerujú do oblasti samičej pohlavnej sústavy. V skutočnosti je to však samčie pohlavné bunky – spermie – ktorá je aktívna pri oplodnení vajíčka. Z vývojového aspektu je spermia produktom spermatogenézy v semenotvornom kanáliku. Na jej formovaní sa podieľajú mnohé faktory. Pohlavné funkcie riadi nervová a endokrinná zložka v rámci geneticky fixovaného riadiaceho systému, ktorý je zvyčajne pod vplyvom vonkajších faktorov. Semenník má endokrinnú aj exokrinnú funkciu, ktorú plní nielen z hľadiska svojho orgánu, ale aj celého organizmu a vonkajšieho prostredia (Massányi, 1991).

Samčiu reprodukčnú sústavu tvoria orgány s produkčnou funkciou – miešok a semenníky, orgány tvoriace vývodné cesty – prisemenník a semenovod, ďalej prídavné pohlavné žľazy a kopulačný orgán (penis) (Kliment et al., 1989).

Samčie pohlavné ústroje majú tri základné pohlavné funkcie: tvorbu spermií, tvorbu pohlavnej aktivity samca a prenos spermií do pohlavných orgánov samice. K týmto funkciám sú i stavebne prispôsobené (Kresan a Marenčák, 1979).

1.1 Miešok (*scrotum*)

Miešok je kožný vak, v ktorom sú uložené semenníky. Pod kožou mieška je vrstva buniek hladkej svaloviny (*tunica dartos*), ktorá sa za chladných podmienok kontrahuje a pridrží semenníky bližšie ku brušnej stene (Reece, 1998).

V strednej rovine vytvára prepážku, rozdeľujúcu mieškovú dutinu na dve polovice. Pre svoje kontrakčné schopnosti môže táto vrstva reagovať na zmeny teploty prostredia. V chladnom prostredí sa zmršťuje, zvráťuje koža mieška a znižuje tým jeho odparovaciu plochu. Naopak v teplejšom prostredí ochabuje, čím sa odparovacia plocha mieška zväčšuje. Je to termoregulačný mechanizmus, ktorý udržiava v miešku

teplotu o 3 – 4°C nižšiu než konečníka čo je teplota optimálna pre správny vývoj spermii v semenníku (Kresan a Marenčák, 1979).

Do vnútra dutiny mieška sa vyliučuje priečna brušná fascia, ktorá zrastá so stenovým listom podbrušnice a vytvára spoločný obal semenníka a semenného povrazca. Na laterálnu plochu obalu sa upína priečne pruhovaný sval – dvíhač semenníka. Tento dvíhač priťahuje spoločný obal semenníka a semenník k slabinovému kanálu (Kliment a kol., 1989). Najvnútornejšia vrstva mieškovej steny je blana, tvorená vnútornou fasciou semenníka (*fascia spermatica interna*), ku ktorej z vnútra prirastá tzv. pošvový obal.

1.2 Semenníky (*testes*)

Semenníky sú párové pohlavné žľazy samcov, v ktorých sa tvoria spermie nutné pre oplodnenie vajíčok a samčí pohlavný hormón testosterón. Majú vajcový tvar a ich veľkosť závisí na plemene. Semenníky zostupujú do mieška. Je to vak samostatný pre každý semenník a je vytvorený vychlípením brušnej steny. Na povrchu je kryty jemnou kožou s množstvom žliaz a je zarastený jemnými chlpkami (Zadina et al., 2009).

Povrch semenníka je obalený tuhým fibróznym väzivom (púzdom) – *tunica albuginea*. Z púzdra semenníka prenikajú do jeho parenchýmu väzivové trámce, ktoré rozdeľujú žľaznaté tkanivo semenníka na jednotlivé lalôčky. Každý lalôčik je tvorený 2 – 3 stočenými semenotvornými kanálkami. Tie sú vystlané zárodočným epitelom, v ktorom vznikajú spermie. Medzi bunkami epitelu sa nachádzajú podporné Sertoliho bunky, ktoré zaisťujú výživu spermii. Smerom ku stredu semenníka sa stočené semenotvorné kanáliky (*tubuli seminiferi contorti*) napriamujú v kanáliky priame a prepletú sa, takže vzniká sieť semenníka. Z neho vystupujú kanáliky odvodené a vedú k hlave prisemenníka (Miholová a Lipský, 1976).

Pri vrchole sa všetky kanáliky lalôčiku spájajú v krátky priamy semenotvorný kanálik (*tubulus semeniferus rectus*) vstupujúci do mediastína semenníka. Dĺžka celého semenotvorného kanáliku po rozvinutí je v priemere 50 – 80 cm, takže celá ich dĺžka v oboch semenníkoch dosahuje značných hodnôt od 600 do 1000 m, u kancov až 3000 m (Kresan a Marenčák, 1979).

Králik ejakuluje pri každom skoku 0,4 – 0,6 ml semena, ktoré v 1 ml obsahuje 700 000 až 2 miliardy spermií (Zadina et al., 2009).

1.3 Prisemenník (*epididymis*)

Prisemenník je orgán uložený pozdĺž semenníka, ktorý tvorí ďalšiu časť vývodných ciest spermií. Zhrubnutú časť, označovanú ako hlava prisemenníka, tvoria vývodné kanáliky vystupujúce zo siete semenníka. Vývodné kanáliky sa postupne zlievajú do prisemenníkového kanáliku, ktorý svojimi bohatými slučkami vytvára telo prisemenníka a chvost prisemenníka. Kanálik opúšťa prisemenník ako semenovod. Vývodné kanáliky sú z vnútornej plochy vystlané epitelom. Epitel tvoria miestami skupiny vysokých cylindrických buniek s kinocíliami, ktoré sa striedajú s nižšími cylindrickými až kubickými bunkami. Nízke bunky, tzv. intraepitelové žľazy, obsahujú v cytoplazme sekrečné granuly na výživu spermií (Kliment a kol., 1989).

Sekret prisemenníka je bohatý na vodíkové ióny (pH 5,6 – 6,6), draslík a CO₂, ako aj nízkomolekulové bielkoviny, glycerolfosforylcholín a ergothioneín (kanec). Naopak obsahuje málo Cl, Na, kyseliny citrónovej a fruktózy. Táto skutočnosť a nižšia teplota v prisemenníkoch udržujú spermie v stave anabiózy a oplodňovacia schopnosť je viac ako mesiac (Lukáč et al., 2007).

Okrem sekrečnej činnosti majú tieto bunky aj resorpčnú schopnosť, o čom svedčí ich kefovitý lem. Kanálik prisemenníka sa stáča a jeho dĺžka po rozvinutí dosahuje až niekoľko desiatok metrov (Kliment a kol., 1989).

1.4 Semenovod (*ductus deferens*)

Semenovod je pokračovaním vývodného systému z chvostu prisemenníka do panvového úseku močovej trubice. Ako náhle semenovod opustí prisemenník a smeruje do brušnej dutiny je spolu so semennou tepnou, žilou, nervom, lymfatickými cievami a svalom vnútorného zdvíhača semenníka (*musculus cremaster internus*) obalený listom pošvového obalu (*tunica vaginalis propria*). Tento celý útvar sa nazýva semenný povrazec (Reece, 1998).

Má hviezdovitý lúmen vyplnený sekrétom a spermiami. Pri malom zväčšení môžeme na stene semenovodu pozorovať tri vrstvy, zriadenú sliznicu a mohutnú svalovú vrstvu s adventiciou (Krajňák a Šťastný, 1993).

1.5 Ejakulát

Ejakulát je belavá, viskózna tekutina, ktorá okrem spermii produkovaných semenníkom obsahuje sekréty prídavných pohlavných žliaz, prisemenníka a semenníka. V jednom ejakuláte býka sa nachádza 5 miliard spermii, človeka 200 až 500 miliónov a králika 300 miliónov (Lukáč et al., 2007) U niektorých druhov zvierat sa okrem uvedených zložiek nachádza v ejakuláte aj hlien (kanec, žrebec, hlodavce atď.) (Gamčík et al., 1984).

Tabuľka 1: Základné charakteristiky ejakulátu domácich zvierat

Druh	Objem v ml	Koncentrácia v $10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$	Celkový počet spermii v ejakuláte v $10^9 \cdot \text{ml}^{-1}$
Býk	2 – 13	0,5 – 2,0	1,0 – 26,0
Kanec	100 – 700	0,1 – 0,7	5,0 – 150,0
Žrebec	30 – 300	0,05 – 0,3	0,6 – 48,0
Baran	0,3 – 3	1,0 – 5,3	1,0 – 15,0
Cap	0,5 – 3	0,5 – 5,0	1,0 – 8,0
Kohút	0,1 – 2	0,5 – 6,0	0,8 – 9,0
Moriak	0,1 – 2	1,0 – 5,0	0,7 – 5,0
Gunár	0,2 – 1,5	0,8 – 1,5	0,16 – 3,0
Králik	0,3 – 0,6	0,1 – 1,5	0,03 – 0,9
Pes	2,0 – 6,0	0,1 – 0,2	0,2 – 1,2
Kocúr	0,06 – 0,5	0,4 – 0,6	0,8 – 10,0

1.6 Spermie

Spermie – pohlavné bunky – vznikajú v semenotvornom kanáliku procesom, ktorý nazývame spermatogenéza. Objavil ich v roku 1677 Leeuwenhoekov žiak Ham z Leidenu. V tom čase ich považovali za zárodky, ktoré parazitujú v ejakuláte. Normálna

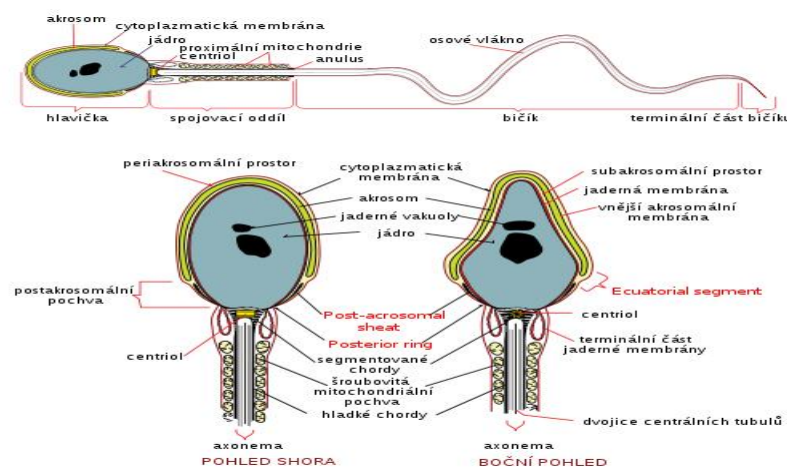
spermia sa skladá z dvoch základných častí – hlavičky a bičíka. Na hlavičku pripadá 51% a na bičík 49% celkovej hmotnosti spermie. Priemerná dĺžka spermie býka sa pohybuje od 70 do 75 μm , dĺžka hlavičky 8,5 – 10,0 μm a 4 – 4,25 μm je šírka hlavičky.

Spermia má pri oplodnení splniť 3 základné úlohy: musí aktívne vyhľadať vajíčko, preniknúť do neho a preniesť genetický materiál od otca (Lukáč et al., 2007).

Splniť tieto úlohy jej umožňuje morfológické zloženie – aktívny pohyb zabezpečuje bičík, na penetrácii sa zúčastňuje akrozóm, genetické informácie sú uložené v jadrovej hmote – kondenzovanej nukleoplazme. Ak sa poruší jedna z týchto funkcií, vajíčko sa neoplodní (Gamčík et al., 1984).

Počas spermatogenézy sa relatívne málo diferencované kmeňové bunky spermatogónie transformujú na spermie. Počas jeho priebehu sa rozlišujú 3 základné fázy alebo etapy : spermatocytogenéza, meióza a spermiogenéza. Morfológické zmeny spermií vyvolávajú poruchy plodnosti vtedy, keď sa vyskytujú vo veľkom množstve trvale pri tom istom plemenníkovi. (Massanyi, 1991).

Obrázok 1: Stavba spermie



1.6.1 Hlavička spermie (*caput spermii*)

Zhrubnutie predného (anteriórneho) okraja hlavičky sa nazýva apikálny hrebeň (Massanyi, 1991). Zhrubnutie obkolesuje celý okraj prednej časti hlavičky, ktorú

pokrýva akrozóm a vpredu je najvýraznejšie, potom sa smerom dozadu postupne zmenšuje a stráca sa v miestach, kde sa končí akrozóm. Na jeho tvare sa odrážajú medzidruhové rozdiely.

Na povrchu hlavičky môžeme opísať 2 hlavné oblasti:

- akrozómovú, ktorú pokrýva akrozóm. Rozlišujeme na nej suboblasti (segmenty): apikálny segment, ktorého podklad tvorí zhrubnutie okraja hlavičky (apikálny hrebeň); lemuje okraj hlavičky, ďalej hlavný alebo princípálny segment zahŕňa časť hlavičky ohraničenú po bokoch apikálnym segmentom až po ekvatoriálny segment. Uvedené segmenty sa spoločne označujú ako *pars anterior* hlavičky. Ekvatoriálny segment hlavičky tvorí úsek medzi priečnym hrboľom alebo polmesiačikovitou líniou a postakrozómovým okrajom. Označuje sa tiež ako *pars intermedialis*,
- postakrozómová oblasť hlavičky sa označuje tiež ako *pars posterior*. Je to časť hlavičky medzi postakrozómovým okrajom a postakrozómovým prstencom, ktorú nepokrýva akrozóm. Pod cytoplazmatickou membránou v tejto oblasti sa nachádza postakrozómová pošva (Massanyi, 1991).

Hlavička spermie sa počas spermiohistogenézy vytvára najmä z jadra spermatídy, takže základným materiálom hlavičky je jadro. Celú hlavičku pokrýva bunková membrána, ktorá prechádza na bičík (Gamčík et al., 1984). Úlohou hlavičky je preniesť dedičný materiál lokalizovaný v nukleoplazme (Massányi et al., 2002).

Nukleoplazma

Nukleoplazma vyplňa celé jadro hlavičky spermie. Jej štruktúra je homogénna a kompaktná, tvar jadra je identický s tvarom hlavičky. V jadre sa nachádza otcovský dedičný materiál v kondenzovanej forme v podobe DNA. Jadro hlavičiek spermií sa odlišuje od jadier somatických buniek tým, že má polovičný (haploidný) obsah DNA a chromatín nemá usporiadaný vo forme vlákien, ale tvorí kompaktnú hmotu. Jadrová tekutina sa v nukleoplazme spermie nenachádza. Hlavička takto pripomína tzv. pyknotické jadrá. Strata tekutých častí z jadra sa prejavuje znížením mernej hmotnosti spermie, ktorá sa po ich dozretí mení od 1,240 do 1,334 (Massányi et al., 2002).

V nukleoplazme môžeme príležitostne pozorovať väčšie alebo menšie svetlé prázdne miesta, vakuoly. Vakuoly sa najčastejšie nachádzajú na apikálnom okraji a ekvatoriálnom segmente hlavičky spermie. Zatiaľ sa zistili v spermiiach býka, žrebca, kanca, kráľika a muža. Hoci pri niektorých druhoch, napr. u človeka, je výskyt vakuol v nukleoplazme spermii pomerne častý, tento jav je nenormálny a vakuoly treba zaradiť medzi primárne štrukturálne malformácie spermii (Gamčík et al., 1992).

Jadro

Bunkové jadro je regulačným a koordinačným centrom každej bunky. Je nositeľom genetického materiálu a ovplyvňuje, riadi a kontroluje činnosť všetkých cytoplazmatických štruktúr. Jadro, ako genetické riadiace centrum je zodpovedné za všetky životné prejavy bunky (Massányi et al., 2008). Jeho obsah v zrelej spermii predstavuje kondenzovaný chromatín. Od jadier somatických buniek sa líši tým, že má polovičný obsah DNA a chromatín v ultratenkých rezoch nie je usporiadaný do vláknitej štruktúry, ale tvorí kompaktnú masu (Lukáč et al., 2007).

Nukleoplazma neobsahuje jadrovú tekutinu a pripomína tzv. pyknotické jadro. Kondenzácia dosahuje taký stupeň, že sa materiál na elektrónogramoch normálne javí ako tmavý a homogénny, obsahuje prevažne dezoxyribonukleovú kyselinu (DNA). Ultraštrukturálna charakteristika jadra v prvých štádiách spermatogenézy v podstate detailnejšie vysvetľuje to, čo poznáme zo štúdia optickým mikroskopom. Takto môžeme rozlíšiť typy jadier A, IM, B spermatogónií podľa hustoty a uloženia jadrového chromatínu (Massanyi, 1991).

1.6.2 Bičik (*flagellum spermii*)

Bičik ako ústroj pohybu sprostredkúva transport spermie na miesto oplodnenia (Gamčík et al., 1984). Podľa rozloženia niektorých charakteristických útvarov sa bičik rozdeľuje na centriolový (implantačný) oddiel tzv. křčok, mitochondriálny (stredný) oddiel, hlavný oddiel a koncový (terminálny) oddiel. Takéto označenie dobre vystihuje funkčnú podstatu jednotlivých častí bičíka, treba však povedať, že tieto oddiely morfológicky a funkčne netvoria oddelené celky. Na rozdiel od hlavičky sa zdôrazňuje len cytoplazmatický pôvod bičíka (Massanyi, 1991)

Centriolový oddiel sa v ultraštruktúre javí ako komplikovaná sústava, ktorej základ tvoria dva centrioly (proximálny a distálny), z ktorých sa v zrelej spermii zachováva iba proximálny. Ďalej sú to segmentované chordy. Z organel sa v tejto časti nájdú 1 – 2 mitochondrie. Centriolový oddiel nadväzuje na mitochondriolový oddiel bičika. Mitochondriový oddiel je charakteristický koncentricky usporiadanými mitochondriami tesne pod cytoplazmatickou membránou. V tomto úseku je 80 až 120 mitochondrií, ktoré sú závitnicovo usporiadané. Je ukončený anulom (Jensenovým prstencom). Hlavný oddiel nasleduje za anulom. Charakterizuje ho fibróza pošva umiestnená okolo osového vlákna. Koncový oddiel nepokrýva už fibróza pošva, ale iba cytoplazmová membrána (Lukáč, 2007).

Pohyb bičíkov i riasiniek zabezpečuje interakcia dyneínu a tubulínu periférnych mikrotubulov. Pri kontrakcii dyneínové ramienka obopnú B mikrotubuly susedných dubletov, posúvajú sa pozdĺž povrchu B mikrotubulu susedného dubletu, priemer bičika (riasinky) sa dočasne zníži a táto kontrakčná vlna sa posúva po celej dĺžke bičika alebo riasinky. Kĺzavý pohyb medzi priľahlými mikrotubulmi obmedzuje prítomnosť nexínu a radiálnych lúčov, takže sily vyvinuté týmto procesom riasinky a bičíky ohýbajú, čím sa vyvolá ich pohyb. Po kmitu sa uvoľnia, ohnú sa pod hlienovou vrstvou, aby ju neporušili alebo neposunuli späť a vracajú sa do východiskovej polohy. Frekvencia pohybu cílie je 2,5 kmitu za sekundu. Zdrojom energie je adenosíntrifosfát. Spojenie susedných dubletov mikrotubulov sa počas hydrolýzy ATP preruší. Utváraním a prerušovaním dyneínových mostíkov dochádza k vzájomnému kĺzaniu dubletov mikrotubulov. Tým vzniká určité napätie oproti okolitým dubletom a centrálnemu páru mikrotubulov, čo spôsobuje ohýbanie bičika alebo riasinky (Massányi, 2008).

1.7 Spermatogenéza

Výraz spermatogenéza sa vzťahuje na celý proces, zahrňujúci transformáciu kmeňových buniek (zárodočných epitelových buniek) na spermie. V procese spermatogenézy sa vyskytujú dva typy delení a to mitóza (delenie buniek, pri ktorom každá nová bunka zostáva diploidná, alebo má $2n$ počet chromozómov) a meióza (delenie, kedy každá nová bunka má polovičný – haploidný alebo n počet chromozómov). V začiatocnom štádiu prvého meiotického delenia vytvára každý

chromozóm z chromozómového páru dve chromatídy, ktoré zostávajú spojené dokopy, a tak tieto chromozómy majú duplikované gény (Reece, 1998).

Medzi spermatogénne elementy patria spermatogónie, spermatocyty primárne a sekundárne, spermatídy, z ktorých sa diferencujú spermie. Spermatogónie sa vyvíjajú z prvotných pohlavných buniek – gonocytov. Sú uložené po obvode semenotvorných kanálikov a majú oválny tvar (Lukáč, et al. 2007).

Rozmonožovanie je spojené s mnohonásobným delením a postupnou diferenciáciou buniek. Vznikajú nasledovné spermatogónie:

A – spermatogónie (materská bunka),

Im – spermatogónie (spermatogónie intermediárneho typu) a

B – spermatogónie.

Spermatogónie sa mitoticky delia, pričom vznikajú spermatocyty 1. radu a ich počet geometricky rastie. Spermatogónie sú východiskovou bunkou spermatogenézy. Predstavujú kombináciu semenotvorných buniek nachádzajúcich sa v parietálnom rade semenotvorného epitelu dotiaľ, kým sa vytvoria spermatocyty.

A – spermatogónie sú kmeňové materské bunky nachádzajúce sa na obvode semenotvorných kanálikov. Sú to veľké bunky guľatého tvaru s malým množstvom cytoplazmy, na povrchu s chromatínom. Jadro obklopené tenkou membránou má elipsovité tvar s dlhou osou, ktorá leží paralelne so stenou tubulov. V centre jadra leží veľké jadierko.

Im – spermatogónie vznikajú delením A – spermatogónií tak, že okrem jednej dcérskej bunky, ktorá sa podobá materskej, vzniká druhá bunka vyššie diferencovaná, intermediárneho typu. Táto bunka je podobná A – spermatogónii, ale s tým rozdielom, že má menšie jadro, ktoré je bohatšie na chromatín.

B – spermatogónie sú pokračovaním spermatogónií intermediárneho typu, po niekoľkonásobnom rozdelení a rozmnožení. Tieto bunky sú charakteristické tým, že chromatín sa nachádza v blízkosti jadrovej membrány vo forme kôrovitého zhrubnutia. Od A – spermatogónie sa líši tvarom chromozómov (uzlíkovité zhrubnutie na konci) a veľkosťou, ktorá sa mení počas mitotického delenia (Massányi et al., 2002)

Spermatocyty predstavujú produkt druhej etapy spermatogenézy, ktorá pozostáva z dvoch po sebe nasledujúcich zrecích delení. Rozoznávame dva typy spermatocytov :

a) primárne spermatocyty sú produkované posledným mitotickým delením B – spermatogónii. Sú to bunky, ktoré reprezentujú premeiotickú interfázu a sú charakteristické prítomnosťou medzibunkových spojení pretrvávajúcich z posledného delenia spermatogónii. Jadro je okrúhle so zhlukmi chromatinu. Delením primárnych spermatocytov vznikajú dve dcérske bunky – sekundárne spermatocyty;

b) sekundárne spermatocyty sú haploidné a ich okrúhle jadro obsahuje granuly DNA spojené jemnou sieťou chromatinu. Ich život trvá len niekoľko hodín a prechádzajú do druhého meiotického delenia. Jadro sekundárnych spermatocytov je menšie ako primárnych, ale väčšie ako okrúhlych spermatíd, druhé meiotické delenie je krátke a má podobné fázy ako prvé meiotické delenie. Dokončí sa v ňom rozdelenie chromozómov a vznikajú dve okrúhle spermatídy (Lukáč et al., 2007).

Každá spermatida, ktorá sa nakoniec utvorí, má iba polovicu génov pôvodnej spermatogonie. Podobne aj vzniknuté vajíčko má polovičný počet chromozómov, takže zygota, vznikla oplodnením vajíčka spermou má diploidný počet chromozómov (Reece, 1998).

Mitóza

Mitóza je proces delenia jadra zabezpečujúci rovnomerné rozdelenie chromozómov z parentálnej bunky do dvoch novovznikajúcich dcérskych buniek. Pred začiatkom delenia jadra, čiže mitózy, sa každý chromozóm zreplikuje a je tvorený dvoma identickými chromatídami (označovanými ako sesterské chromatídy), ktoré sú po celej dĺžke spojené vzájomne interagujúcimi proteínmi naviazanými na povrchu oboch chromatíd. Počas mitózy sa tieto proteíny uvoľnia, sesterské chromatídy sa od seba oddeľujú a stávajú sa na sebe nezávislými dcérskymi chromozómami, ktoré sú mitotickým vretienkom ťahané od seba k opačným pólom bunky (Gálová et al., 2004).

Mitóza má štyri fázy:

Profáza – zjavujú sa zreteľné vláknité chromozómy, rozštiepené na dve chromatídy, spojené v mieste zvanom centroméra; jadrová membrána sa rozpadá jadričko mizne, centrioly sa zdvoja a putujú k opačným pólom bunky; medzi nimi sa vytvára deliace vretienko zložené z jemných vláken.

Metafáza – chromozómy sa zoskupujú v poludníkovej rovine bunky, vlákna deliaceho vretienka sa upínajú na chromozómy v mieste centroméry; neskôr sa rozdelí aj centroméra a z každého chromozómu vzniknú dva samostatné chromozómy.

Anafáza – rozdelené chromozómy sú skracovaním vlákien deliaceho vretienka priťahované k pólom bunky – k centriolom, cytoplazma a bunkové organely sa tiež preskupujú k pólom.

Telofáza – rekonštruuje sa obal jadra a jadierko, zanikne deliace vretienko, chromozómy prestanú byť zreteľné, bunka sa v strednej rovine zaškrť a vzniknú dve dcérske bunky (Kopecký, 2003).

Meióza

Zrecím delením (meiózou) sa zníži počet chromozómov na polovicu – haploidný počet. Tak je zabezpečené, že pri oplodnení počet chromozómov nenarastá, ale obnoví sa diploidný počet. Zrelá pohlavná bunka je pritom vybavená úplnou sadou chromozómov, pretože pri meióze je zabezpečené, že z každého páru homologických chromozómov prejde do každej bunky po jednom chromozóme „otcovského“ alebo „materského“ pôvodu. Výber jedného alebo druhého člena homologického páru je celkom náhodný (Vacek, 2006).

Meiózu charakterizuje rast a zrecie delenie spermatocytov. Meióza, alebo zrecie delenie pohlavných buniek sa skladá z dvoch po sebe nasledujúcich a funkčne úzko spojených bunkových delení, ktoré sa vyznačujú zmenami na chromozómoch a ich delením. Pri prvom meiotickom delení vznikajú zo spermatocytov 1. radu spermatocyty 2. radu a pri druhom delení spermatidy, posledná najpočetnejšia generácia vo vývoji spermií. Prvé meiotické delenie sa týka spermatocytov 1. radu. Je charakteristické veľmi dlhou profázou zloženou z leptoténneho, zygoténneho, pachyténneho, diploténneho štádia a diakinézy, pokračuje metafázou, anafázou a telofázou. Začiatok tohto zložitého delenia sa prejavuje v rozčleňovaní chromatínového vlákna. Špiralizované chromozómy sú v plnom (diploidnom) počte a podobajú sa hrubým tyčinkám alebo guľôčkam. V leptotennom štádiu nastáva dešpiralizácia chromozómov. Tieto sa predlžujú na veľmi dlhé, tenké vlákna. Centromérami sa sústreďujú na okraj jadra, blízko centriolu a vytvárajú takto tzv. leptoténny buket, druhé konce sú voľné. V chromonémach (základné vlákna chromozómov) sa začína syntéza DNA (Massanyi et al., 2002).

Meiotické delenie a spermatoocyty 1. radu znamenajú v spermatogenéze kritické štádium. Pri porušení deliaceho procesu sa môžu vyvinúť spermie bez fertilizačných vlastností. Nepravidelnosť v meióze bola zaznamenaná predovšetkým pri mladých jedincoch (Johnson et al., 2000).

1.8 Metabolizmus a pohyb spermii

Spermie sa pohybujú dopredu rotáciou. Hlavička a predná časť bičíka slúžia ako oporný bod, proti ktorému bičik vyvíja svoju hnaciu silu. Za 1 sekundu môže bičik urobiť 3 – 15 otáčok okolo pozdĺžnej osi. Súčasne sa pozdĺž bičíka šíria kontrakčné impulzy. Vlny, ktoré počas ohybových cyklov vznikajú sa zvyšujú postupne k distálnemu koncu bičíka. Hlavička rotuje okolo vlastnej pozdĺžnej osi tak, že všetky elementy bičíka nevyvíjajú presne pohyb v rovnakej rovine, ale počas všetkých kontraktálnych cyklov. Spermie s poškodeným pohybovým systémom a energeticky vyčerpané nerotujú (Massányi, 2002).

Na základe súčasných ultraštruktúrálnych poznatkov o bičíku, ako aj ďalších experimentov sa utvorila predstava o mechanizme pohyblivosti bičíka. Energia na pohyb bičíka sa získava podobnou cestou ako pri iných celulárnych pracovných procesoch – hydrolytickým štiepením ATP na adenozíndifosfát (ADP) a kyselinu fosforečnú. Susedné dublety mikrotubulov sú spojené výbežkami z vysokomolekulovej bielkoviny – dyneínu. Pri hydrolýze sa tieto spojenia prerušia. Dyneín má ATPázovú aktivitu. Ak môžu mikrotubuly popri sebe kĺzať pomocou svojich dyneínových ramien, predpokladá sa, že pri správnej postupnosti tejto aktivity a primeraných tlakových síl v axonéme budú vznikať vlny a následne charakteristický pohyb pre spermium (Massányi, 1991).

1.9 Faktory ovplyvňujúce pohyblivosť spermii

Na metabolizmus pohyblivosť a schopnosť oplodnenia majú vplyv rôzne faktory (Gamčík et al., 1984). Samotný reprodukčný proces samcov ako zložitý biologický systém je zraniteľný rozličnými environmentálnymi, fyzikálnymi ako aj chemickými faktormi. V súčasnosti poznáme mnoho agresorov, ktoré priamo i nepriamo ovplyvňujú

reprodukčné schopnosti hospodárskych zvierat. Kumuláciou viacerých toxických a nepriaznivých činiteľov dochádza k potencii negatívnych účinkov čo zároveň prispieva k mnohým subfertilným a infertilným stavom. Kvalitatívne aj kvantitatívne vlastnosti ejakulátu výrazne ovplyvňujú aj exogénne a endogénne činitele. Na ich vplyve majú výrazný podiel aj ťažké kovy resp. stopové rizikové prvky, ktoré zasahujú do najcitlivejších orgánových systémov resp. pohlavného systému (Lukáč et al., 2009).

Príčinou immotility spermii je absencia dyneínových ramien v prípade Kartagenerovho syndrómu. Ide o hereditárne založenú ciliárnu dyskinézu inak živých spermii, ktorá sa opísala zatiaľ iba u ľudí, absenciu radiálnych spojok, centrálného páru mikrotubulov a transpozíciu mikrotubulov. Pri býkoch sa opísal sterilizujúci defekt pahýľa bičika (*tail stump defect*), ktorý sa v ultraštruktúre prejavuje ako malá stopka namiesto bičika, pyriformná kvapka, rudimentárny bičik alebo kyjakovitý bičik dĺžky 2 – 3 μm . Do komplexu zmien bičika možno zahrnúť aj rozličné degeneratívne zmeny. Dôležité sú najmä anomálie na mitochondriálnej časti. Najčastejšou viditeľnou malformáciou aj optickým mikroskopom je skrátenie, zhrubnutie, predĺženie, prerušenie mitochondriálnej časti, ďalej holé osovú vlákno a nitkovite vyvinutá mitochondriálna špirála. Zmena v organizácii mitochondriálnej špirály sa opisuje pod názvom vývrtkový defekt (*corkscrew defekt*). Zaraďuje sa medzi dedične podmienené anomálie mitochondriálnej špirály. Mitochondrie sa na niektorých častiach stredného oddielu akumulujú do chumáčov, na niektorých častiach chýbajú, takže mitochondriálny oddiel nadobúda tvar vývrтки (Massanyi, 1991).

1.10 Podmienky chovu hospodárskych zvierat, výživa a stres

Dôležitú úlohu v kvalite ejakulátu zohrávajú podmienky vonkajšieho prostredia a chovu plemenníkov. Je žiaduce, aby proces vývoja spermii, ich prežívanie v semenníkoch a aj samotný proces ejakulácie čo najlepšie podporiť prostredníctvom optimálnej výživy počas puberty a v prvej fáze dospelosti zvierat. Taktiež je treba klásť dôraz najmä na dotovanie kŕmnej dávky mikroprvkami (ide hlavne o meď, kobalt, zinok), ktoré sú životne dôležitou súčasťou enzýmov a ďalších dôležitých molekúl ovplyvňujúcich fertilitu. Veľmi často ovplyvňujúcim faktorom zhoršenej kvality semena je stres v dôsledku transportu, športového využitia zvierat. Tento fenomén sa

môže vyskytnúť po dlhšom časovom odstupe, kedy stresovú situáciu už neberieme do úvahy (Grafenau et al., 2005).

Tabuľka 3: Rýchlosť pohybu spermií (Gamčík et al., 1992)

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

1.11 Kofeín

3,7–dihydro–1,3,7–trimetyl–1H–purine–2,6–dion je purínový alkaloid – trimetylderivát xantínu, ktorý je prítomný v rôznych rastlinách ako sú kávové alebo kakaové bôby, listy čajovníkov, plody rastliny guarana, a orechy koly. Stimuluje centrálny nervový systém, srdcovú činnosť, zvyšuje duševný a fyzický výkon. Chemicky čistý kofeín je pevná látka najčastejšie vo forme ihlicovitých bielych a lesklých kryštálikov, bez zápachu slabej horkastej chuti.

Na metabolizácii kofeínu u človeka sa podieľajú obličkový cytochromoxygénázový systém P450, izoenzy my CYP1A2, CYP2A6 a ďalej N–acetyltransferáza 2 a xanthioxidáza. Kofeín stimuluje uvoľnenie kortizonu a adrenalínu, čo zvyšuje tlak krvi a vyvoláva zrýchlenú frekvenciu srdca. Je veľmi pravdepodobné, že nežiaduce účinky kofeínu môžu byť pripísané jeho rozdielne biotransformácie u ľudí s rozdielnym genotypom, v čom hrajú význam najmä izoenzým cytochromoxidázy CYP1A2 a O–metyltransferáza. Toxicita kofeínu je relatívne nízka, hodnoty strednej smrteľnej dávky (LD50) pre niektoré živočíšne druhy sú zhrnuté v tabuľke 4.

Kofeín funguje tým spôsobom, že blokuje enzým, ktorý za normálnych okolností odbúrava adrenalín a noradrenalín. Vyplavenie adrenalínu a noradrenalínu do krvi je bežne záležitosťou desiatok sekúnd. V normálnej situácii sa nadbytočné

množstvo týchto stresových hormónov okamžite deaktivuje, tak aby nemohlo dôjsť k „predávkovaniu“ organizmu z nadprodukcie. Smrteľná dávka kofeínu je pri orálnom užití 150 mg.kg^{-1} , to je pre 100 kg ťažkú osobu 15 g, prerátané na kávu je to 25 litrov. Najvyššia dávka, ktorú človek prežil bola 24 gramov. Najnižšia, ktorú neprežil je 3.2 gramy, ale vnútrožilne. Za rozumné denné množstvo sa považuje cca 300 mg kofeínu, čo sú asi tri šálky kávy (<http://www.trener.sk/vyziva/kofein.html>).

Tabuľka 4: Hodnoty strednej smrteľnej dávky (LD50) kofeínu pre niektoré živočíšne druhy

Živočíšny druh	Spôsob aplikácie	LD50 (mg.kg^{-1})
Potkan laboratórny	i.p.	240
Králik	i.p.	224
Myš	s.c.	242
myš	p.o.	127
Škrečok	p.o.	230

i.p. – intraperitoneálne, s.c. – subkulánne, p.o. – perorálne (Bromová et al., 2010)

2 Ciele práce

Čiastkovým cieľom bakalárskej práce bolo zhrnutie poznatkov v oblasti reprodukcie kráľika, ejakulátu a faktorov ovplyvňujúcich pohyblivosť spermii so zameraním na kofeín, ktorý výrazne ovplyvňuje pohyblivosť spermii.

Hlavným parametrom tejto práce bolo zistiť parametre pohyblivosti spermii kráľikov vplyvom rôznych koncentrácií kofeínu a v rôznych časových intervaloch a teplotách kultivácie.

3 Materiál a metodika práce

Odber ejakulátu bol realizovaný od samcov králika (CVŽV Nitra). Kvôli udržaniu teploty, ktorú ejakulát mal bezprostredne po ejakulácii, sa vzorka udržiavala v termoske. Termoska je z polystyrénu vystlaná vatovými tampónmi. Po spracovaní boli vzorky udržiavané v laboratóriu.

Následne boli zriedené a upravované podľa nasledovnej schémy:

skupina	objem ejakulátu (μl)	Kofeín (μg)	fyziológický roztok (μg)	zásobný roztok (μg)
Kontrolná (KK)	50	0	250	0
KA	50	1,25	0	250
KB	50	2,5	250	250
KC	50	7,5	1250	250

Skúškou na prežívateľnosť spermií možno určiť, ako dlho vydržia spermie mimo organizmu v určitom prostredí. Pri jeho určovaní sme používali termický test a test určujúci čas prežitia.

Termický test prežívateľnosti sa vykonáva vo vodnom kúpeli pri teplote 37 – 39°C. Táto teplota zodpovedá prostrediu pohlavných ústrojov plemenníc. Pri určovaní motility spermií sa posudzujú len spermie s progresívnym pohybom a výsledok sa hodnotí 10 – bodovou stupnicou (10 bodov – 100% progresívne sa pohybujúcich spermií). V kvalitnom ejakuláte vykazuje ešte po 6 hodinách testu 70% spermií progresívny pohyb a aspoň 60% spermií aktivitu endogénnych reductáz.

Pre dlhodobý test prežívateľnosti sa v malej skúmavke v chladničke nechá 1 ml zriedeného semena a každý deň sa mikroskopom s ohrievacou doskou určí motilita spermií (pri teplote 37 – 39°C), tým istým spôsobom ako pri termickom teste. Prežívateľnosť ejakulátu má byť najmenej 96 hodín od okamihu odobratia, pričom aktivita má byť najmenej 50%.

Naše vzorky sme merali v rôznych časových intervaloch pri teplote 37°C: 0, 30, 60, 120 minút, pri teplote 5°C: 1440, 2880 minút.

Merania sme vykonávali použitím metódy CASA (Computer – Assisted Sperm Analysis – analýza pohyblivosti spermií počítačovou technikou) systémom SpermVision (Minitub, Tiefenbach, SRN) s mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus,

Japonsko). Princípom metódy je digitalizácia pohybu spermií – jednotlivých krivočiar, ktorá sa následne vyhodnotí softvérom a znázorní na obrazovke PC. Každú vzorku sme umiestnili do počítačovej 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 (%), percento progresívne pohyblivých spermií (%), DAP (distance average path) – priemerná vzdialenosť (μm), DCL (distance curved line) – krivočiarová vzdialenosť (μm), DSL (distance straight line) – priamočiarová vzdialenosť (μm), VAP (velocity average path) – priemerná dráhová rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) [časovo – závislá pohyblivosť hlavičky spermie pozdĺž jej priamej dráhy], VCL (velocity curved line) – krivočiarová rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) [časovo – závislá pohyblivosť hlavičky spermie pozdĺž aktuálnej krivočiarej dráhy ako vnímané dva rozmery pod mikroskopom], VSL (velocity straight line) – priama rýchlosť ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) [časovo – závislá pohyblivosť hlavičky spermie pozdĺž jej priamej línie medzi jej prvou a jej poslednou zistenou pozíciou], STR (straightness) – priamosť pohybu, LIN (linearity) – priamočiarosť [priamočiarosť krivočiarovej dráhy, vyjadrená ako VSL:VCL], WOB (wobble) – kmitanie [miera pre kmitanie (osciláciu) aktuálnej dráhy okolo priemernej dráhy, vyjadrená ako VAP:VCL], ALH (amplitude of lateral head displacement) – amplitúda laterálneho (bočného) premiestnenie hlavičky ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) [stupeň laterálneho premiestnenia hlavičky spermie okolo priemernej dráhy. ALH môže byť vyjadrená ako maximálna alebo priemerná hodnota] a BCF (beat cross frequency) – frekvencia krížových úderov (Hz) [frekvencia pri ktorej VCL križuje VAP].

Na porovnanie výsledkov CASA analýzy v jednotlivých časových obdobiach pri sledovaní vplyvu riedidiel sme použili štatistický Scheffeho test a štandardný štatistický Studentov t -test. Preukaznosť rozdielov sme hodnotili na hladine preukaznosti $p < 0,05$.

4 Výsledky

V jednotlivých časových intervaloch sme sledovali účinok *in vitro* kultivácie spermií králikov s pridaním kofeínu. Popisujeme pohybové parametre spermií králikov hodnotené komputеровou technikou a jej odlišnosti. Pri meraniach sme zaznamenali priemernú hodnotu (\bar{x}), minimálnu (min) a maximálnu (max) hodnotu, smerodajnú odchýlku (sd) a variačný koeficient (cv). Vzorok sme označili písmenami KK – kontrolná vzorka, KA, KB, KC s pridaním kofeínu.

Kompletné výsledky percenta pohyblivých spermií po pridaní kofeínu, nám vykázali štatisticky preukazné rozdiely ($p < 0,05$). Pri 0 minútach kultivácie bola pohyblivosť (motilita) vzoriek mierne znížená, no už po 30 minútach bol preukazný rozdiel medzi vzorkami KK – KB; KK – KC, po 60 a 120 minútach kultivácie bol preukazný rozdiel medzi všetkými vzorkami (Tabuľka 5). Z toho môžeme konštatovať, že kofeín ovplyvnil zvýšenie pohyblivosti spermií. V čase 1440 minút bol preukazný rozdiel medzi vzorkami KK – KC; KK – KA a v čase 2880 minút medzi KK – KA; KK – KB; KC – KB. Výrazný pokles pohyblivosti spermií oproti ostatným časovým intervalom, bol preukázaný v čase kultivácie 1440 a 2880 minút, kedy sme kultivovali pri 5°C (Graf 1).

Pri hodnotení percenta progresívne pohyblivých spermií neboli pri kultivácii v čase 0 minút preukázané zmeny. Pri kultivácii 30, 60, 120 minút bola preukázaná zvýšená pohyblivosť (Tabuľka 6). Výrazný pokles pohyblivosti oproti ostatným časovým intervalom bol zistený v čase kultivácie 1440 a 2880 minút (Graf 2). V čase 1440 minút bol preukazný rozdiel medzi všetkými časovými intervalmi.

Pri sledovaní detailných vzdialenostných parametrov sme pri DAP zistili preukazné zvýšenie pohyblivosti spermií pri 30 a 60 minútach. Pri vzorke KA sa nám pohyblivosť mierne znížila pri 120 minútach a následne sa pohyblivosť u vzorky KB a KC zvýšila (Tabuľka 7). V čase 1440 a 2880 minút bola pohyblivosť preukazne nižšia oproti ostatným časovým intervalom.

Hodnotením DCL – krivočiarovej vzdialenosti boli zistené zvýšenia pohyblivosti pri všetkých vzorkách (Tabuľka 8). V čase 1440 minút bol preukazný rozdiel medzi všetkými časovými intervalmi (0, 30, 60, 120, 2880), v čase 2880 minút bol tiež preukazný rozdiel medzi časovými intervalmi (0, 30, 60, 120, 1440) . Priamočiara vzdialenosť (DSL) kopírovala ostatné pohybové parametre (DAP, DCL)

s tým, že preukazná zvýšená pohyblivosť je v časových intervaloch 30, 60, 120 minút (Tabuľka 9).

Sledovaním dráhových rýchlostí spermií sme zistili, že všetky ukazovatele – priemerná dráhová rýchlosť (VAP, Tabuľka 10), krivočiarová rýchlosť (VCL, Tabuľka 11) ako aj priama rýchlosť (VSL, Tabuľka 12) preukazne zvýšili pohyblivosť spermií v časových intervaloch 30, 60, 120 minút, okrem vzorky KA pri 120 minútach bol zaznamenaný pokles pohyblivosti pri všetkých dráhových rýchlostiach. Pri dráhových rýchlostiach nebola preukazne zmenená rýchlosť hneď na začiatku (0 minút) hoci bola evidentná tendencia poklesu dráhových rýchlostí. V čase 1440 minút bol preukazný rozdiel medzi všetkými časovými intervalmi (0, 30, 60, 120, 2880), v čase 2880 minút bol tiež preukazný rozdiel medzi časovými intervalmi (0, 30, 60, 120, 1440).

Pri hodnotení priamosti pohybu (STR, Tabuľka 13), priamočiarosti krivočiarovej dráhy pohybu (LIN, Tabuľka 14), kmitania (WOB, Tabuľka 15), sme zistili pokles rýchlosti spermií aj keď bola evidentná tendencia zvýšenia rýchlosti. Pri STR bol preukazný rozdiel v čase 2880 minút medzi časovými intervalmi (0, 30, 60, 120, 1440). Pri WOB nastal rozdiel medzi 2880 – 60; 2880 – 120, 1440 – 0; 1440 – 60 a 1440 – 120 minút.

Preukazne zvýšená pohyblivosť nastala pri ALH (amplitúda laterálneho premiestnenia hlavičky) v časových intervaloch 30, 60, 120 minút. Okrem KA pri 120 minútach bol zaznamenaný mierny pokles pohybu (Tabuľka 16). Boli zistené štatisticky preukazné rozdiely v čase 1440 a 2880 minút od časov 0, 30, 60, 120 minút.

Frekvencia krížových úderov (BCF) bola preukazne vyššia v časových intervaloch (30, 60, 120) okrem KA vzorky, pri ktorej v 30 minútach bol zaznamenaný mierny pokles pohybu (Tabuľka 17). V čase 1440 a 2880 minút bol preukazný rozdiel od ostatných časových intervalov (0, 30, 60, 120 minút).

Tabuľka 5: Pohyblivosť spermií (%) v jednotlivých skupinách

vzorka	x	sd	min	max	Cv
čas 0 minút					
KK	54,34¹	2,40	23,22	74,65	7,41
KA	48,86	2,24	23,10	67,29	8,57
KB	50,87	3,28	25,38	66,76	11,84
KC	50,70	1,89	24,27	68,19	5,64
čas 30 minút					
vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	68,20*	1,17	51,2	100	1,53
KA	86,96	9,19	28,91	99,37	11,13
KB	88,03	2,26	76,31	99,03	2,47
KC	79,88	1,82	72,58	98,46	2,04
čas 60 minút					
vzorka	x	Sd	min	max	cv
KK	52,80*	2,25	32,35	95,01	3,43
KA	82,39	2,51	68,43	95,16	2,91
KB	87,33	2,13	63,52	99,03	2,42
KC	71,99	1,74	42,16	99,12	2,23
čas 120 minút					
vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	58,63	1,62	19,99	92,85	3,24
KA	65,78¹	2,79	36,34	91,99	4,79
KB	72,23¹	1,57	28,34	95,12	2,16
KC	70,94¹	2,07	17,34	99,55	5,33

min – minimum; max – maximum; x – priemer; sd – smerodajná odchýlka, cv – variačný koeficient (%)

¹p<0,05 (KA: 0–120; 30–120; 60–120; KB: 0–120; 30–120; 60–120; KC: 30–120; KK: 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KB; KK–KC; 60 min.: KK–KB; KK–KA; KK–KC)

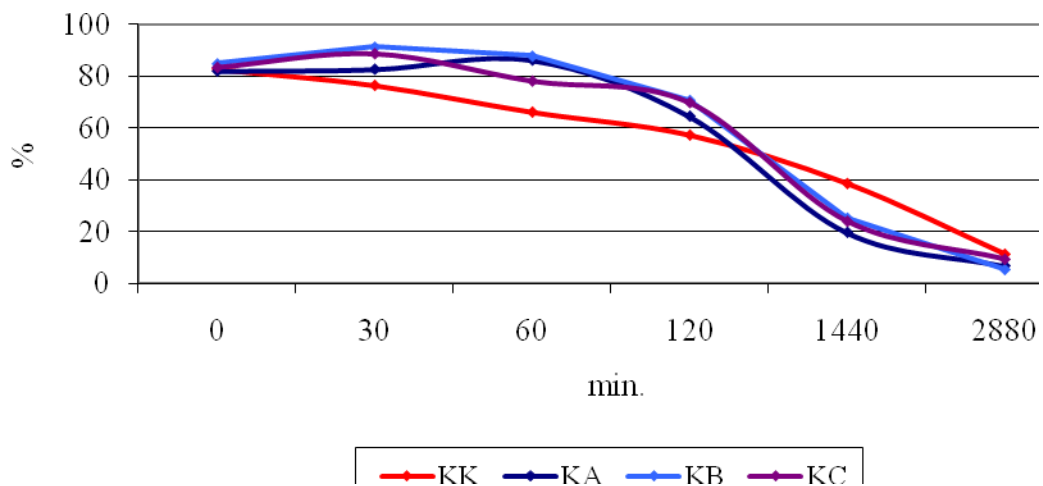
Tabuľka 6: Progresívna pohyblivosť spermií (%) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	42,02¹	1,14	26,62	61,89	18,73
KA	41,02	1,30	67,22	56,94	32,03
KB	40,61	2,04	36,36	53,83	25,08
KC	39,82	0,98	29,65	54,35	20,33
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	58,22*	2,22	18,57	93,87	3,81
KA	71,18	4,29	6,02	97,50	6,03
KB	81,64	3,46	64,10	95,50	4,23
KC	80,39	1,46	59,67	95,26	1,82
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	53,48*	3,09	30,25	92,34	5,84
KA	76,09	4,17	52,72	92,23	5,58
KB	78,34	3,04	47,50	94,47	3,89
KC	70,17	1,50	30,40	97,37	2,18
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	47,26	2,26	19,54	87,39	6,41
KA	48,35¹	3,09	15,09	82,35	6,64
KB	59,11	1,66	11,17	85,20	2,73
KC	61,39	1,30	17,09	95,10	2,09

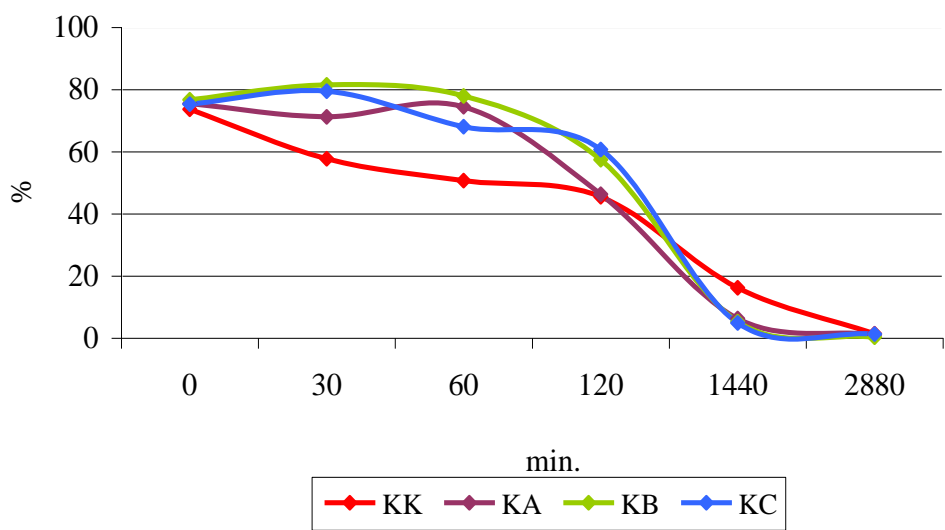
¹p<0,05 (KA: 0–120; 30–120; 60–120; KB:0–120; 30–120; 60–120; KK: 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KB; KK–KC; 60 min.: KK–KB; KK–KA; KK–KC)

Graf 1: Pohyblivosť spermií v jednotlivých skupinách



Graf 2: Progressívna pohyblivosť spermií v jednotlivých skupinách



Tabuľka 7: DAP (μm) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	Cv
čas 0 minút					
KK	19,72¹	0,68	10,61	30,4	5,92
KA	18,89¹	1,30	6,19	41,96	12,65
KB	18,70¹	2,35	11,46	35,84	21,60
KC	19,58	2,54	6,02	36,88	22,58
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	20,55*	0,43	12,53	33,35	2,12
KA	24,14	0,77	11,23	34,20	3,22
KB	27,28	0,42	19,75	37,40	1,56
KC	27,05	1,19	15,99	37,96	4,43
čas 60 minút					
Vzorka	x	Sd	min	max	cv
KK	21,87*	1,12	18,68	32,49	6,35
KA	24,99	1,11	16,67	34,00	4,62
KB	27,11	0,65	18,30	35,15	2,49
KC	26,13	0,24	19,88	34,09	0,86
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	23,22	1,00	15,67	36,65	5,18
KA	21,35	0,68	12,02	30,98	2,96
KB	24,53	0,87	11,80	34,48	3,57
KC	25,77*	1,28	16,88	34,44	5,15

¹p<0,05 (KA: 0–30; 0–60; 0–120; KB: 0–30; 0–60; 0–120; KK: 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KB; KK–KC; 60 min.: KK–KB; KK–KC; 120 min.: KC–KA)

Tabuľka 8: DCL (μm) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	36,64¹	5,38	16,06	60,58	21,35
KA	37,55¹	7,84	10,77	77,61	31,63
KB	36,53¹	6,33	21,05	69,64	36,22
KC	36,52	7,72	12,13	74,08	22,77
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	39,24*	0,92	27,31	60,28	2,35
KA	47,018	2,81	21,46	58,48	5,98
KB	53,19	1,64	40,67	71,11	3,09
KC	54,09	2,40	34,75	75,79	4,45
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	39,26*	1,67	17,85	57,64	4,85
KA	47,41	1,79	36,55	61,30	3,83
KB	51,45	1,59	34,76	63,34	3,09
KC	49,15	0,86	38,83	62,62	1,74
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	23,56	2,17	15,95	66,39	8,93
KA	25,64	1,40	21,36	64,27	6,09
KB	31,32	1,91	23,45	70,55	7,44
KC	24,99	3,13	15,11	64,77	19,32

¹p<0,05 (KA: 0–30; 0–60; 0–120; KB: 0–120; KK: 0–30; 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KC; KK–KB; KK–KA; 60 min.: KK–KB; KK–KC; KK–KA)

Tabuľka 9 : DSL (μm) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	16,04¹	1,26	8,62	26,89	8,78
KA	15,20¹	2,66	4,86	28,41	19,28
KB	14,85¹	1,83	8,36	28,60	23,61
KC	15,77¹	3,70	4,52	30,53	27,63
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	15,92*	0,63	10,07	27,94	3,98
KA	18,04	0,78	7,96	30,76	4,34
KB	20,63	0,70	13,53	33,09	3,42
KC	19,74	1,11	10,67	31,51	5,62
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	16,90*	0,79	7,66	25,25	6,25
KA	20,02	0,84	12,65	29,33	4,33
KB	20,51	0,46	14,33	29,43	2,35
KC	19,28	0,28	14,67	25,54	1,50
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	18,10	0,89	16,78	19,47	5,71
KA	19,47	0,59	20,38	15,60	2,90
KB	19,16	0,90	20,29	16,57	4,76
KC	21,02	0,93	14,05	20,62	4,47

¹p<0,05 (KA: 0–30; 0–60; 0–120; KB: 0–120; KC: 0–60; KK: 0–30; 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KB; 60 min.: KK–KB; KK–KA)

Tabuľka 10: VAP ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	47,04¹	7,26	24,66	70,72	16,34
KA	44,73¹	7,20	14,34	72,47	16,57
KB	43,95	6,87	27,29	77,28	19,32
KC	46,40	13,32	13,75	88,41	32,67
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	48,49*	0,86	29,15	75,59	1,78
KA	56,11	1,65	27,29	80,09	2,95
KB	63,14	0,73	45,53	82,81	1,16
KC	62,77	2,84	36,59	89,30	4,53
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	51,89*	2,67	22,19	77,04	6,41
KA	57,69	2,61	38,19	76,46	4,72
KB	63,31	1,49	45,75	82,52	2,45
KC	61,33	0,29	46,04	78,76	0,50
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	55,07	2,7	18,65	83,75	5,87
KA	49,59	1,54	28,32	71,08	2,90
KB	57,47¹	1,83	28,69	78,18	3,16
KC	61,10*	3,96	19,04	81,27	6,83

¹p<0,05 (KA: 0–30; 0–60; 0–120; KB: 0–120; KK: 0–30; 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KB; KK–KC; 60 min.: KK–KB; KK–KC; 120 min.: KC–KA)

Tabuľka 11: VCL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	82,51¹	11,35	46,85	137,60	20,16
KA	86,79¹	16,44	24,90	163,54	28,66
KB	83,64	13,69	52,35	153,64	42,09
KC	89,84	17,72	27,62	183,44	22,15
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	91,98*	1,63	63,38	136,76	1,78
KA	108,65	5,67	50,41	140,22	5,22
KB	122,73	3,50	94,82	161,51	2,85
KC	125,06	4,59	79,35	168,08	3,67
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	92,48*	3,11	41,74	134,71	3,83
KA	109,12	2,81	83,57	137,27	2,61
KB	119,65	2,03	86,04	146,02	1,70
KC	115,12	1,04	89,76	145,09	0,83
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	99,59	4,79	37,66	157,39	5,73
KA	95,06	3,41	52,31	145,73	3,67
KB	110,311	3,73	56,87	157,83	3,39
KC	110,28	8,44	33,86	148,42	7,90

¹p<0,05 (KA: 0–30; 0–60; 0–120; KB: 0–120; KK: 0–30; 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KC; KK–KB; 60 min.: KK–KB; KK–KC; KK–KA)

Tabuľka 12: VSL ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	42,28¹	4,15	20,00	62,62	12,19
KA	41,53¹	6,36	11,29	62,89	13,81
KB	39,52¹	3,94	20,1	58,70	17,03
KC	38,63	8,37	9,94	73,92	24,79
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	37,80*	1,08	63,44	23,81	2,86
KA	42,12	1,93	72,26	17,45	4,59
KB	47,89	1,27	73,17	31,89	2,65
KC	46,12	2,54	70,74	24,26	5,51
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	40,36*	1,98	18,06	59,21	6,54
KA	46,35	1,92	29,20	66,24	4,27
KB	48,08	1,47	34,44	69,78	3,12
KC	45,41	0,55	34,36	67,74	1,43
Čas	120 minút				
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	43,28	2,59	14,41	69,16	7,21
KA	40,41	1,25	22,56	61,15	3,04
KB	45,08	1,89	19,88	62,89	4,23
KC	47,77	2,91	15,07	67,02	6,44

¹p<0,05 (KA: 0–30; 0–60; 0–120; KB: 0–60; 0–120; KC: 0–60; KK: 0–30; 0–60; 0–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KB; 60 min.: KK–KB)

Tabuľka 13: STR v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	0,74	0,10	0,36	0,94	15,04
KA	0,81	0,09	0,20	0,95	13,26
KB	0,65	0,07	0,36	0,95	18,58
KC	0,73	0,10	0,30	0,94	16,86
Čas	30 minút				
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,77*	0,01	0,70	0,86	1,38
KA	0,73	0,03	0,54	0,90	3,85
KB	0,74	0,01	0,64	0,88	0,73
KC	0,72	0,02	0,65	0,85	2,45
Čas	60 minút				
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,76	0,07	0,36	0,87	10,03
KA	0,79*	0,01	0,74	0,89	0,69
KB	0,75	0,02	0,65	0,87	1,46
KC	0,73	0,01	0,65	0,82	1,54
Čas	120 minút				
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,77	0,07	0,38	0,90	8,75
KA	0,80	0,00	0,74	0,88	0,33
KB	0,78	0,03	0,62	0,86	3,31
KC	0,77	0,08	0,36	0,95	10,20

* $p < 0,05$ (30 min.: KK–KA; KK–KC; 60 min.: KA–KB; KA–KC)

Tabuľka 14: LIN v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	0,41*	0,07	0,19	0,70	17,76
KA	0,38	0,08	0,10	0,74	23,94
KB	0,34	0,07	0,17	0,73	29,90
KC	0,42	0,07	0,11	0,73	16,42
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,40*	0,02	0,33	0,51	3,89
KA	0,37	0,01	0,28	0,52	3,92
KB	0,38	0,01	0,31	0,50	2,77
KC	0,36	0,01	0,30	0,42	1,93
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,43*	0,06	0,19	0,6	12,95
KA	0,41	0,00	0,34	0,52	1,60
KB	0,39	0,01	0,32	0,50	1,96
KC	0,38	0,01	0,32	0,46	2,40
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,46	0,06	0,18	0,74	12,03
KA	0,42	0,00	0,36	0,52	1,66
KB	0,40	0,03	0,28	0,48	6,13
KC	0,42	0,03	0,25	0,56	6,66

* $p < 0,05$ (0 min.: KK–KA; 30 min.: KK–KC; 60 min.: KK–KB; KK–KC)

Tabuľka 15: WOB v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	0,50*	0,08	0,23	0,76	16,13
KA	0,45	0,09	0,12	0,79	20,99
KB	0,43	0,07	0,24	0,77	22,92
KC	0,50	0,07	0,18	0,78	15,33
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,52	0,01	0,40	0,6	2,23
KA	0,51	0,03	0,40	0,59	5,18
KB	0,51	0,01	0,46	0,58	1,83
KC	0,50	0,00	0,46	0,53	0,79
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,55	0,07	0,26	0,71	11,67
KA	0,52	0,01	0,45	0,59	1,23
KB	0,52	0,01	0,46	0,58	1,07
KC	0,53	0,01	0,46	0,59	1,69
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	0,57*	0,06	0,23	0,81	10,83
KA	0,51	0,01	0,44	0,63	2,15
KB	0,51	0,02	0,42	0,57	3,27
KC	0,55	0,08	0,25	0,81	15,44

* $p < 0,05$ (0 min.: KK–KA; 120 min.: KK–KB)

Tabuľka 16: ALH (μm) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	3,66	0,23	1,17	5,40	6,72
KA	3,46	0,46	0,82	5,15	15,12
KB	3,46	0,52	1,55	6,51	23,88
KC	3,81	0,50	1,08	6,06	14,36
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	4,11*	0,11	2,33	5,14	2,72
KA	5,02	0,10	2,9	6,82	2,10
KB	5,26	0,07	3,64	6,52	1,33
KC	5,22	0,22	3,72	6,51	4,31
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	4,28*	0,40	1,55	5,29	10,07
KA	4,32*	0,16	3,49	5,17	3,85
KB	5,09	0,16	3,71	6,41	3,09
KC	5,15	0,07	3,76	6,10	1,27
čas 120 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	4,03*	0,36	1,82	5,21	9,74
KA	3,77¹	0,14	2,88	4,61	3,64
KB	4,32¹	0,08	3,34	5,45	2,03
KC	4,47*	0,37	2,28	5,52	8,92

¹p<0,05 (KA: 0–120; 30–120; KB: 30–120; 60–120)

*p<0,05 (30 min.: KK–KB; KK–KC; KK–KA; 60 min.: KA–KB; KA–KC; KK–KB; KK–KC; 120 min.: KC–KK; KA–KC; KA–KB)

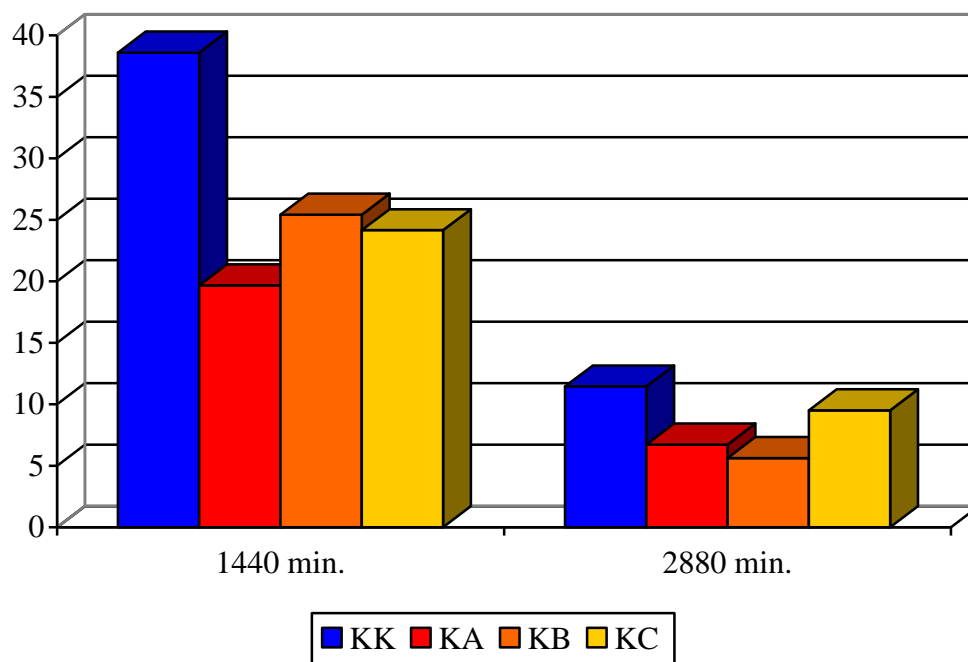
Tabuľka 17: BCF (Hz) v jednotlivých skupinách

Vzorka	x	sd	min	max	cv
čas 0 minút					
KK	23,80¹	3,22	13,10	36,36	19,85
KA	24,19	4,77	7,85	42,16	25,66
KB	24,00¹	2,44	13,36	42,87	28,43
KC	24,92¹	4,39	7,01	44,88	21,49
čas 30 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	27,94	0,25	22,68	34,17	0,91
KA	27,38	1,48	18,47	38,91	5,42
KB	28,74	1,03	24,53	38,77	3,61
KC	28,93	0,15	22,54	36,74	0,53
čas 60 minút					
Vzorka	x	sd	min	max	cv
KK	26,57*	1,25	13,67	35,88	5,38
KA	40,00*	0,67	27,67	38,23	2,25
KB	29,04	0,63	23,88	35,91	2,19
KC	27,47	0,85	23,70	33,12	3,15
čas 120 minút					
Vzorka	x	Sd	min	max	cv
KK	27,71	4,04	12	40,75	16,87
KA	29,31	0,9	17,12	39,71	3,17
KB	29,07	1,26	18,11	35,43	4,34
KC	27,78	1,88	13,22	36,47	7,04

¹p<0,05 (KB: 0–60;0–120; KC: 0–60; 0–120; KK: 0–60; 0–120)

*p<0,05 (60 min.: KA–KC; KK–KA; KK–KB)

Graf 3: Pohyblivosť spermií pri teplote 5°C v jednotlivých skupinách



5 Diskusia

V našej práci popisujeme účinok kofeínu na parametre (CASA parametre) pohyblivosti spermíí králikov pri rôznych časových intervaloch (0, 30, 60, 120, 1440, 2880 minút) a pri teplote 37°C a 5°C.

Welles et al. (1995) sa zaoberali účinkom teploty na semenníky. Pokus prebiehal na 35 býkoch, ktorý trpeli horúčkou. Zvieratá sa nadmerne potili a mali zmenšené semenníky. Výsledky naznačujú, že zvýšenie teploty v semenníkoch má negatívny vplyv na spermatogézu, znižuje kvalitu ejakulátu, ktorý je charakterizovaný nízkou progresívnou motilitou a zvyšuje sa percento spermíí z primárnymi a sekundárnymi abnormalitami. Uvádzajú, že v tomto prípade hlavnou príčinou nekvalitného ejakulátu je zlyhanie termoregulácie.

Slanina (2010) uvádza výrazný pokles pohyblivosti spermíí moriakov pri teplote laboratórnej (22°C) a v chlade (4°C). Pri laboratórnej teplote bol pokles preukazný od času 0 (94,15%) po čas 180 minút kultivácie (53,91%). Pri kultivácií v chlade zistili rozdiel nižší (95,41 a 78,86%) a rozdiely boli štatisticky preukazné od kultivácie 30 minút až po 180 minút.

Podobne Kordic (2009) hodnotila percento pohyblivosti spermíí býkov pri zvýšenej teplote 40°C a aj pri zníženej teplote 7°C. Po uplynutí 120 a 180 minút zistila výrazné zmeny v klesaní pohyblivosti aj progresívnej pohyblivosti spermíí. Pri sledovaní detailných vzdialenostných parametroch, krivočiarovej dráhy pohybu a rýchlostných parametrov zistila preukazný pokles pohyblivosti pri 40°C aj 7°C. Avšak pri hodnotení priamosti pohybu a priamočiarosti došlo pri 40°C aj 7°C k preukaznému zvýšeniu po 120 a 180 minútach. Frekvencia krížových úderov bola preukazne vyššia v skupine pri kultivácii pri teplote 7°C.

Pivko et al. (2009) vo svojom výskume sledovali vplyv kofeínu na pohyblivosť spermíí. Zistili, že kofeín neovplyvnil frekvenciu 1. stupňa (spermia z nepoškodenou plazmovou membránou hlavičky a nepoškodeným akrozóm), ale znížil výskyt 2. stupňa (spermia zo zvlhenej a naštrbenej plazmovou membránou) a zvýšil výskyt abnormalít spermíí v 3. a 4. stupni (3 – spermia z napuchnutým alebo poškodeným akrozómom, 4 – spermia s pseudoakrozomálnou reakciou vytvorenou vačkami alebo chýbajúcim akrozomálnym obsahom), teda viedol ku akrozomálnej reakcii. Zistilo sa, že menšie

množstvo prísunu kofeínu pozitívne ovplyvní pohyblivosť spermíí, ale vzrastom prísunu kofeínu sa spermie deformujú a mutujú, čo sme potvrdili aj v našej práci.

V štúdií Alminana et al. (2005) bol skúmaný vplyv kombinácie troch (kofeín, adenzín, kyselina hyalurónová) kapacitačných agens na efektivitu *in vitro* fertilizácie pri použití kryokonzervovaných dávok dvoch kancov. Zo štúdie vyplýva, že jediný preukázateľný vplyv na efektivitu fertilizácie pomocou kryokonzervovaných spermíí mala indukcia kapacitácie za prítomnosti kofeínu. Vplyv prítomnosti kofeínu v kultivačnom médiu sa v prípade niektorého kanca prejavila ako pozitívna vzhľadom k efektívite IVF. V prípade iného kanca však bola zistená vyššia efektívita fertilizácie v kultivačnom médiu bez prídavku kofeínu. Zo záveru tejto štúdie vyplýva, že kofeín je dôležitou zložkou kultivačných médií iba v prípade niektorých kancov.

6 Záver

V práci sme analyzovali pohyblivosť spermíí králikov účinkom *in vitro* kultivácie po pridaní kofeínu pomocou CASA analýzy pri dvoch rôznych teplotách a to 37°C a 5°C, v časových intervaloch 0, 30, 60, 120, 1440, 2880 minút.

Pri hodnotení výsledkov sme zistili zvýšenú pohyblivosť spermíí už po 30 minútach. Výrazný pokles pohyblivosti spermíí oproti ostatným časovým intervalom, bol preukázaný v čase kultivácie 1440 a 2880 minút, kedy sme kultivovali pri 5°C.

Pri hodnotení percenta progresívne pohyblivých spermíí pri kultivácií 30, 60, 120 minút bola preukázaná zvýšená pohyblivosť. V čase kultivácie 1440 a 2880 minút bol zaznamenaný pokles progresívnej pohyblivosti.

Sledovaním DAP, DCL, DSL parametrov sme zistili zvýšenie pohyblivosti v časových intervaloch 30, 60, 120 minút. Preukazné zníženie pohyblivosti sme zaznamenali po 1440 a 2880 minútach, kedy boli vzorky kultivované v chlade. Sledovaním dráhových rýchlostí spermíí (VAP, VCL, VSL) po 120 minútach bol zaznamenaný pokles pohyblivosti. V čase 1440 a 2880 minút bol preukazný rozdiel medzi všetkými časovými intervalmi (0, 30, 60, 120).

Pri hodnotení priamosti pohybu (STR), priamočiarosti krivočiarovej dráhy pohybu (LIN), kmitania (WOB), sme zistili pokles rýchlosti spermíí, aj keď bola evidentná tendencia zvýšenia rýchlosti. Preukazne zvýšená pohyblivosť bola stanovená pri ALH, BCF v časových intervaloch 30, 60 a 120 minút.

Z našej analýzy vyplýva, že po pridaní kofeínu do ejakulátov pri teplote 37°C sa pohyblivosť spermíí evidentne zvýšila. Pri kultivácií spermíí pri teplote 5°C sa pohyblivosť opačne znížila. Môžeme teda zhodnotiť, že na pohyblivosť vplýva nielen kofeín, ale aj teplota, ktorá má za následok pokles pohyblivosti spermíí.

7 Zoznam použitej literatúry

ALMINANA, C. – GIL, M. A. – CUELLO, C. – ROCA, J. – VAZQUEZ, J.M. – RODRIGUEZ –MARTINEZ, H. – MARTINEZ, E.A. 2005. Adjustments in IVF system for individual boars: Value of additives and time of sperm-oocyte co-incubation. In *Theriogenology*. 2005, 1783–1796 s.

BROMOVÁ, M. – DALIHODOVÁ, A. – HOLINKOVÁ, P. – LICHTENBERGOVÁ, I. – MAXOVÁ, M. – MUBIANA, N. – NOVÁKOVÁ, P. – PODLENOVÁ, K. – RŮŽIČKOVÁ, L. – VINKLEROVÁ, L. – VÍT, Z. – PATOČKA, J. 2010. Zdravotní rizika energetických nápojů. In *Prevence úrazů, otráv a násilí*, České Budejovice: Jihočeská univerzita, 2010, vol. 4, no. 2, 205 – 224. ISSN 1801-0261

GÁLOVÁ, E. – ŠEVČOVIČOVÁ, A. – MIKLOVIČOVÁ, M. – ŠVEC, M. 2004. Vybrané texty a príklady k cvičeniam z genetiky. Bratislava: Univerzita Komenského, 2004. 106 s.

GAMČÍK, P. – KOZUMPLÍK, J. – MESÁROŠ, P. – SCHVARC, F. – VLČEK, Z. – ZIBRÍN, M. 1984. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Bratislava : Príroda, 1984. 341 s.

GAMČÍK, P. – KOZUMPLÍK, J. – MESÁROŠ, P. – SCHVARC, F. – VLČEK, Z. – ZIBRÍN, M. 1992. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Bratislava : Príroda, 1992. 299 s. ISBN 80-07-00540-4.

GRAFENAU, P. – PIVKO, J. – KUBOVIČOVÁ, E. 2005. Inseminácia koní. Výskumný ústav živočíšnej výroby v Nitre, 2005, [cit. 2007-05-22], Dostupné na internete: <http://www.agroporadenstvo.sk/zv/kone/insem_koni.htm>

JOHNSON, L.A. – WEITZE, K.F. – FISER, P. – MAXVELL, W.M.C. 2000. Storage of boar semen. In *Animal Reproduction Science*, č. 62, 143–172 s.

KLIMENT, J. – HINTNAUS, J. – NOVÁK, M. – ROB, O. – ŠŤASTNÝ, P. 1989. Reprodukcia hospodárskych zvierat. 2. vyd. Bratislava: Príroda, 1989. 392 s. ISBN 80-0700027-5.

Kofeín. 19:21 [cit. 2008-5-11], Dostupné na internete:

< <http://www.trener.sk/vyziva/kofein.html>>

KOPECKÝ, Š. 2003. Základy anatómie človeka. Trnava. 2003. 179 s. ISBN 80-85665-61-1.

-
- KORDIC, V. 2009. Detekcia termického stresu na parametre pohyblivosti spermií. Nitra: SPU. 2009. 51 s.
- KRAJŇÁK, P. - ŠŤASTNÝ, P. 1993. Reprodukcia hospodárskych zvierat. Nitra: SPU, 1993. 148 s. ISBN 80-7137-062-2.
- KRESAN, J. – MARENČÁK, L. 1979. Morfológia hospodárskych zvierat. 1. vyd. Bratislava : Príroda, 1979. 629 s.
- LUKÁČ, N. – BULLA, J. – CIGÁNKOVÁ, V. – FLEŠÁROVÁ, S. – KOVÁČIK, J. – MASSÁNYI, P. – NAĎ, P. – SKALICKÁ, M. – STAWARZ, R. – TRANDŽÍK, J. 2007. Stopové prvky a kvalita spermií. 1.vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2007. 118 s. ISBN 978-80-8069-904-8
- MASSANYI, L. 1991. Funkčná morfológia spermie.1. vyd. Bratislava: Slovenská akadémia vied, 1991. 193 s. ISBN 80-224-0149-8.
- MASSÁNYI, P. – TRANDŽÍK, J. – LUKÁČ, N. – TOMAN, R. – HALO, M. – STRAPÁK, P. 2002. Hodnotenie pohyblivosti spermií komputerovou technikou. Nitra: SPU, 2002, 70 s. ISBN 80-8069-117-7.
- MASSÁNYI, P. – LUKÁČ, N. – TOMAN, R. – KOLESÁROVÁ, A. 2008. Fyziológia bunky. 1. vyd. Nitra: SPU, 2008. 138 s. ISBN 978-80-552-0107-8.
- MIHOLOVÁ, B. – LIPSKÝ, D. 1976. Anatomie a fyziologie hospodárskych zvierat. 1. vyd. Praha : Zemědělské nakladatelství, 1976. 258 s.
- PIVKO, J. – MAKAREVICH, A.V. – KUBOVIČOVÁ, E. - RIHA, Ľ. – SIROTKIN, A.V. – MATEJAŠAKOVÁ, E. 2009. Ultrastructural alterations in sperm heads under influence of several implementors to ram semen. In *Slovak Journal of Animal Science*. 2009, vol. 4, 149-154, ISSN 1337-9984.
- REECE, O. W. 1998. Fyziologie domácích zvířat. Praha : Grada, 1998. 456 s. ISBN 8071695475.
- SLANINA, T. 2010. Faktory ovplyvňujúce motilitu spermií moriakov – teplota a vek. Nitra: SPU, 2010. s. 63
- VACEK, Z. 2006. Embryologie. 1. Vyd. Praha: Grada, 2006. 256 s. ISBN 80-247-1267-9.
- ZADINA, J. – HAJLÍČEK, K. – MACH, K. – MAJZLÍK, I. – SKŘIVANOVÁ, V. 2009. Chov králíku. Praha: Nakladatelství Brazda, 2009. 207 s. ISBN 978-80-209-0369-3
-