

Acta fytotechnica et zootechnica 1
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, s. 1–6

VPLYV ENERGETICKÝCH ZLOŽIEK KULTIVAČNÝCH MÉDIÍ NA POHYBOVÉ PARAMETRE BOVINNÝCH SPERMIÍ V PODMIENKACH *IN VITRO*

INFLUENCE OF ENERGY COMPONENTS TO CULTURE MEDIA ON THE BOVINE SPERM MOTILITY PARAMETERS *IN VITRO*

Zuzana KŇAŽICKÁ,¹ Eva TVRDÁ,¹ Annamária KERTI,² Jozef BULLA,¹ Peter MASSÁNYI,¹ Norbert LUKÁČ¹

Slovak University of Agriculture, Slovak Republic¹
Szent Istvan University, Gödöllő, Hungary²

The aim of this study was to analyse the influence of different energetic substrates used in culture media, on maximum viability and motility of bovine spermatozoa during a 24-hour cultivation *in vitro*. We compared undiluted ejaculate (N) with groups to which different culture media (A, B, C, D, E, F, G) were applied during three time periods (time 0, time 1 and time 24) using Sperm Vision™ CASA system. Our experimental study shows that the average motility and progressive motility of bovine spermatozoa in the control sample value decreased during a 24-hour cultivation in comparison with time 0 and time 1. The most significant inhibitory effect on the bovine sperm motility parameters was while applying media E 5.890±3.111%. The highest motility value was detected while applying culture media G 96.0±2.31%. A significantly high motility ($P < 0.001$) was detected between N : A, N : F a N : G. Average progressive motility value decreased in all of the used media. The lowest progressive motility value was detected in group E, containing glucose (5%) and sacharose (5%), 4.615±1.182%. The maximum viability of bovine spermatozoa was while applying culture media G 45.11±5.395%. This adequate culture medium i.e. glucose (5%), trehalose (1%) and sacharose (5%), ensured sufficient energy supply for their survival *in vitro*. A significantly high progressive motility ($P < 0.001$) was detected in groups E and G when comparing with the control sample. Our results suggest that the optimal culture medium for sperm cultivation should contain glucose, sacharose and trehalose in an adequate proportion, using glucose as the dominant energy substrate.

Key words: culture media, energy substrates, bovine spermatozoa, motility, progressive motility

V súčasnosti je zabezpečenie kvalitného ejakulátu a príprava inseminačných dávok jedným zo základných pilierov živočíšnych biotechnológií. Zároveň je primárnym predpokladom pre úspešnú umelú insemináciu, kryokonzerváciu či *in vitro* fertilizáciu. Kvalitné inseminačné dávky sú nevyhnutným kritériom pre zabezpečenie optimálneho biologického materiálu pre chovateľské i šľachtiteľské účely, ako aj zabezpečenie určitej formy ochrany a zachovania biodiverzity (Lukáč et al., 2007). Základným kritériom pre prácu s ejakulátom v laboratóriu je zabezpečenie optimálnych podmienok pre jeho *in vitro* kultiváciu (Balaban et al., 1999; Jankovičová et al., 2006), ktorá predstavuje značne komplikovaný proces.

Spermie sú mimoriadne senzibilné na *ex vivo* prostredie a na stratu exogénneho zdroja energie. Metabolickú energiu vyžadujú pre široké spektrum svojich funkcií, a to predovšetkým na podporu motility. Hlavnými zdrojmi ATP je mitochondriálna glykolýza a oxidačná fosforylácia. Pokiaľ spermia nemá, resp. spotrebuje exogénny zdroj energie, rýchlo zmetabolizuje svoje vlastné energetické zásoby a po krátkom čase odumiera (Breuer a Wells, 1977). Jedným z rozhodujúcich faktorov úspešnej kultivácie spermíí je predovšetkým prítomnosť energetického substrátu. Ako univerzálne kultivačné médium sa najčastejšie využíva glukóza. Poskytuje okamžite dostatočné množstvo energie bez potreby zapojenia iných metabolických dráh. Jej nevýhodou je však jej inhibičný vplyv na proces akrozómovej reakcie a vývin embryí hovädzieho dobytku (Williams a Ford, 2001). Na dlhodobú kultiváciu nie je príliš vhodná, pretože prežívateľnosť a pohyblivosť spermíí je časovo obmedzená. Jej vhodnou alternatívou je fruktóza, ktorá sa prirodzene vyskytuje v reprodukčnom trakte hovädzieho dobytku

i králikov. V neprítomnosti glukózy je možné ako substrát pre glykolýzu, využiť aj organické zlúčeniny t. j. laktát, alebo pyruvát (Ford, 2006). V poslednom období sa pozornosť obracia na trehalózu, ktorá ako disacharid, poskytuje značné množstvo metabolického energie. Mimoriadne sa oceňujú aj jej sekundárne funkcie, akými sú stabilizácia a ochrana bunkových membrán pred stresom vyvolaným napr. zmrazením, vysušovaním, alebo zvýšenými teplotami (Uysal a Bucak, 2009).

Dlhodobá kultivácia spermíí je dôležitým predpokladom pre analýzy spojené so základným výskumom. Cieľom takýchto analýz je pozorovanie vitality, oplodňovacej schopnosti spermíí po podaní implementorov. Takéto analýzy by mohli priniesť pozoruhodné výsledky využiteľné pri prevencii alebo liečbe problémov spojených s infertilitou (Schneider, 1999).

Cieľom predkladanej práce bola analýza vplyvu rôznych energetických substrátov použitých v kultivačných médiách, ktoré zabezpečia maximálnu prežívateľnosť a motilitu spermíí počas 24-hodinovej kultivácie v podmienkach *in vitro*.

Materiál a metódy

Východiskovým materiálom pre našu laboratórnu analýzu boli ejakuláty, ktoré pochádzali od pohlavne dospelých plemenných býkov ($n = 15$). Biologický materiál sme získali z inseminačnej stanice býkov. Hodnotené vzorky museli spĺňať požadované základné kritériá kladené na daný druh hospodárskeho zvieratá. Čerstvý ejakulát sa získaval pravidelným odberom do umelej vagíny valcovitého tvaru. Následne bol

Tabuľka 1 Kultivačné médiá s rôznou energetickou zložkou

Skupina (1)	Médium (2)	Zloženie (3)
N	kontrolná skupina	⇒ natívna vzorka bez kultivačného média
A	komerčné riedidlo	⇒ triladyl, vaječný žĺtok a redestilovaná voda
B	glukóza	⇒ 10% glukóza (D-glukosa monohydrát p.a, Penta, Chrudim)
C	fruktóza	⇒ 10% fruktóza (D-fruktosa p.a, Lach-Ner, Neratovice)
D	sacharóza	⇒ 5% sacharóza (Sacharosa p.a, Centralchem, Bratislava)
E	glukóza a sacharóza	⇒ 5% glukóza (D-glukosa monohydrát p.a, Penta, Chrudim) ⇒ 5% sacharóza (Sacharosa p.a, Centralchem, Bratislava)
F	glukóza a trehalóza	⇒ 10% glukóza (D-glukosa monohydrát p.a, Penta, Chrudim) ⇒ 1% trehalóza (D(+)-trehalose, Fluka, Sigma-Aldrich, USA)
G	glukóza, trehalóza a sacharóza	⇒ 5% glukóza (D-glukosa monohydrát p.a, Penta, Chrudim) ⇒ 1% trehalóza (D(+)-trehalose, Fluka, Sigma-Aldrich, USA) ⇒ 5% sacharóza (Sacharosa p.a, Centralchem, Bratislava)

Table 1 Culture media with different energy substrates
(1) group, (2) medium, (3) content

spracovaný v laboratóriu (22–25 °C), kde bolo vykonané základné vyšetrenie a štandardne posúdený objem (ml), koncentrácia ($\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$) a pH podľa Gamčíka et al. (1992). Po spracovaní sa ejakuláty riedili fyziologickým roztokom (sodium chloride 0,9% w/v, Bieffe Medital, Italia) v pomere 1 : 39, 1 : 50 a 1 : 60 v závislosti od koncentrácie spermií v ejakulátoch. Na predĺženie životaschopnosti spermií bolo použitých 7 rôznych kultivačných médií s energetickou zložkou (tabuľka 1), ktoré sa taktiež zriedovali fyziologickým roztokom (sodium chloride 0,9% w/v, Bieffe Medital, Italia). Maximálnu prežívateľnosť a motilitu spermií sme posudzovali v rôznych časových intervaloch (0 h, 1 h a 24 h), pričom hodnotené vzorky boli inkubované v termostate (37 °C). Z heterospermy sme pomocou systému CASA (Computer assisted/automated semen analysis) s využitím SpermVision™ (MiniTüb, Germany) programu s optickým mikroskopom Olympus BX 51 (Olympus, Japan) sledovali základné parametre pre pohybovú aktivitu boviných spermií v podmienkach *in vitro*. V každej analýze sa zhodnotilo 1 000–1 500 spermií. Dosiahnuté výsledky boli spracované počítačovým štatistickým programom GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Incorporated, San Diego California USA). Preukaznosť bola zistená *t*-testom na hladine štatistickej významnosti $\alpha = 99,99$.

Výsledky a diskusia

Na základe výsledkov mali niektoré energetické médiá v rôznych časových intervaloch (0 h, 1 h a 24 h) preukazný rozdiel v ukazovateli motility i progresívnej pohyblivosti, ktoré uvádzame v tabuľkách 2, 3.

Porovnávali sme neriedený ejakulát ako kontrolnú skupinu (N), so skupinami do ktorých sa aplikovali kultivačné médiá, ktorých základ tvoril rôzny energetický substrát (A, B, C, D, E, F, G).

Základné štatistické ukazovatele motility boviných spermií

Neriedený ejakulát resp. kontrolná skupina (0 h) bez prídania energetickej zložky, vykazovala priemernú hodnotu motility $80,3 \pm 10,4\%$, čo zároveň bola najnižšia hodnota v porovnaní s ostatnými sledovanými skupinami. Najvýraznejší pokles per-

centuálnej pohyblivosti z porovnaných skupín sme zaznamenali pri aplikácii komerčného riedidla, a to $83,8 \pm 5,35\%$. Pri porovnaní kontroly s ostatnými skupinami, sa výrazne zvyšovala pohyblivosť spermií vplyvom kultivačných médií C $93,7 \pm 3,06\%$, D $93,8 \pm 3,46\%$ a E $94,3 \pm 4,19\%$, ktorých hodnoty boli pomerne vyrovnané. Určitý nárast priemernej hodnoty pohyblivosti vzhľadom na neriedený ejakulát sme zistili aj pri skupinách B $85,1 \pm 20,1\%$ a F $87,4 \pm 4,16\%$. Dokázateľne najvyššia hodnota bola detekovaná pri aplikácii energetického média G, ktorého hodnota bola $96,0 \pm 2,31\%$. Základné štatistické ukazovatele sledovaného znaku prezentujeme v tabuľke 2. Na základe nami zistených výsledkov bola zaznamenaná v 0h vysoká preukaznosť ($P < 0,001$) v pohyblivosti spermií pri porovnaní skupín N : C, N : D, N : E a N : G. Pri porovnaní N:A, N:B a N:F nebol zistený žiadny štatisticky preukazný rozdiel ($P < 0,05$) v sledovanom ukazovateli.

Po uplynutí 60 minútovej kultivácie kontrolná skupina dosiahla mierny nárast pohyblivosti spermií na hodnotu $82,64 \pm 5,162\%$. Pri porovnaní výsledkov s 0h začala životaschopnosť spermií zreteľne klesať pri skupinách C $89,28 \pm 7,591\%$, D $90,27 \pm 5,907\%$ a paralelne i v skupinách E $83,46 \pm 5,614\%$, a G $92,72 \pm 4,591\%$. Napriek tomu sa po hodnovej kultivácii najvyššia percentuálna motilita spermií dosiahla práve pri skupine G. Aplikáciou komerčného riedidla $86,44 \pm 4,029\%$, sa taktiež pozitívne ovplyvnila motilita spermií. Určitý nárast hodnoty pohyblivosti sa zistil pri použití 10% glukózy $91,07 \pm 4,468\%$. Výrazný pokles v percentuálnej pohyblivosti hodnotených spermií s nižším ako dosahoval neriedený ejakulát, vykazovala skupina F $79,97 \pm 11,84\%$. Štatisticky významná signifikancia na hladine $\alpha = 99,99$ bola preukazná medzi N : B, N : D a N : G. Pri porovnaní kontroly so skupinou, ktorá obsahovala fruktózu (10%) bol štatisticky preukazný rozdiel ($P < 0,01$) v sledovanom ukazovateli. Počas tejto časovej periódy neboli ostatné skupiny štatisticky preukazné ($P < 0,05$) v porovnaní s kontrolou.

Počas dlhodobej kultivácie (24h) bola priemerná motilita kontrolnej vzorky $15,60 \pm 8,107\%$. Zreteľný bol časovo závislý pokles tohto ukazovateľa v kontrolnej skupine pri porovnaní s 0 h a 1 h. Výrazný pokles hodnoty pohyblivosti bol zistený v skupine B $18,24 \pm 8,295\%$, C $6,901 \pm 3,869\%$ a D $19,08 \pm 11,39\%$. Určitý pokles tohto sledovaného ukazovateľa bol i v skupinách A $42,26 \pm 20,97\%$ a F $42,49 \pm 7,885\%$. Najvýraznejší inhibičný účinok zo všetkých použitých kultivačných médií bol pri apliká-

Tabuľka 2 Základné štatistické ukazovatele motility spermíí po použití rôznych kultivačných médií v časových periódach (0 h, 1 h, 24 h)

Skupina (1)	N/MOT	A/MOT	B/MOT	C/MOT	D/MOT	E/MOT	F/MOT	G/MOT
0 h								
x	80,3	83,8	85,1	93,7 ^A	93,8 ^A	94,3 ^A	87,4	96,0 ^A
minimum	56,5	74,3	25,6	86,5	80,4	83,3	81,5	91,3
maximum	98,1	93,8	98,9	98,4	100	100	93,5	98,5
S.D.	10,4	5,35	20,1	3,06	3,46	4,19	4,16	2,31
CV v %	12,95	6,38	23,57	3,26	3,69	4,44	4,76	2,41
1 h								
x	82,64	86,44	91,07 ^A	89,28 ^B	90,27 ^A	83,46	79,97	92,72 ^A
minimum	70,45	79,34	78,26	76,56	76,42	70,27	55,93	79,38
maximum	93,02	97,46	98,79	98,00	99,07	90,54	98,61	97,75
S.D.	5,162	4,029	4,468	7,591	5,907	5,614	11,84	4,591
CV v %	6,25	4,66	4,91	8,50	6,54	6,73	14,81	4,95
24 h								
x	15,60	42,26 ^A	18,24	6,901	19,08	5,890	42,49 ^A	50,00 ^A
minimum	4,260	13,14	2,770	0,7200	2,220	2,220	25,00	40,90
maximum	32,72	78,43	32,72	16,85	37,03	10,76	49,31	58,92
S.D.	8,107	20,97	8,295	3,869	11,39	3,111	7,885	5,625
CV v %	51,97	49,62	45,48	56,07	59,70	52,81	18,56	11,25

x – aritmetický priemer, S.D. – smerodajná odchýlka, CV % – variačný koeficient
^A P < 0,001, ^B P < 0,01, ^C P < 0,05

Table 2 Basic statistic bovine spermatozoa motility parameters after applications of different culture media in time periods (time 0, time 1, time 24) (1) group

cii energetického média E 5,890±3,111%. Maximálna pohyblivosť spermíí sa po 24-hodinovej inkubácii dosiahla pri skupine G 50,00±5,625%. Štatisticky významná signifikantnosť na hladine $\alpha = 99,99$ bola preukazná medzi N : A, N : F a N : G. Pri porovnávaní médií v skupinách B, C, D a E s kontrolou nebola zistená žiadna štatistická preukaznosť (P < 0,05) v sledovanom ukazovateli.

Základné štatistické ukazovatele progresívnej pohyblivosti boviných spermíí

Druhým sledovaným ukazovateľom bola progresívna pohyblivosť spermíí resp. pohybu spermíí priamočiaro za hlavičkou (>20 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), ktorá sa taktiež merala počas troch časových období po kultivácii s rôznymi energetickými médiami. Kontrolná skupina bez pridania energetickej zložky dosahovala v 0h priemernú progresívnu motilitu 75,9±12,5%, čo zároveň predstavovalo najnižšiu hodnotu v porovnaní s ostatnými sledovanými skupinami. Veľmi nízku hodnotu progresívnej pohyblivosti sme zaznamenali i v skupine A s aplikáciou komerčného riedidla, a to len 77,6±2,18%. Na dosiahnutie maximálnej pohyblivosti mali výrazný vplyv energetické média skupín D 90,1±5,41% a E 92,3±5,87%. Najvyššia hodnota bola detekovaná v skupine G na úrovni 93,4±2,46%. Základné štatistické parametre progresívnej pohyblivosti uvádzame v tabuľke 3. Počas tejto časovej periódy sme zaznamenali vysokú signifikantnosť (P < 0,001) progresívnej pohyblivosti medzi N : C, N : D, N : E a N : G. Štatistická významnosť na hladine (P < 0,05) v sledovanom parametri sa nepreukázala medzi skupinami N : A, N : B a N : F.

Po uplynutí 60 minút inkubácie nastal v kontrolnej skupine mierny pokles progresívnej pohyblivosti na hodnotu 74,4±6,59%. Časovo závislý pokles tohto ukazovateľa pri porovnaní s 0h sme zaznamenali v skupine C 83,8±7,52%, D 84,7±7,84 %, E 81,1±6,81%, F 75,1±11,0% a G 89,8±4,79%.

Napriek tomu bola percentuálna pohyblivosť spermíí v tomto časovom intervale najvyššia pri skupine G. Určitý nárast hodnoty pohyblivosti sme dokázali pri skupine A 78,3±5,26% a B 86,5±4,95%. Pri testovaní závislosti sme zistili vysokú signifikantnosť (P < 0,001) progresívnej pohyblivosti medzi N : B, N : C, N : D a N : G. Štatistická významnosť na hladine (P < 0,05) sledovaného ukazovateľa sa preukázala medzi kontrolou a skupinou E, ktorá obsahovala glukózu (5 %) so sacharózou (5 %). Pri porovnávaní skupín A, F s kontrolou nebola zistená žiadna štatistická preukaznosť (P < 0,05).

Po 24-hodinovej kultivácii neriedený ejakulát dosahoval priemernú hodnotu progresívnej pohyblivosti boviných spermíí 14,28±5,915%. Zreteľný bol časovo závislý pokles tohto ukazovateľa v kontrolnej skupine pri porovnávaní v 0 h a po 1 h. Priemerná progresívna pohyblivosť dosahovala klesajúce hodnoty vo všetkých sledovaných energetických médiach. Veľmi nízka hodnota bola zistená pri porovnávaní kontroly so skupinou C 5,394±2,979% t. j. s aplikáciou fruktózy (10 %). Najvýraznejší pokles vitality spermíí bol však detekovaný skupine E 4,615±1,182 %, ktorá dosahovala najnižšiu hodnotu zo všetkých sledovaných kultivačných médií. Maximálna progresívna pohyblivosť spermíí sa po 24-hodinovej kultivácii dosiahla po použití energetického média G 45,11±5,395 %. Dokázala sa vysoká signifikantnosť (P < 0,001) progresívnej pohyblivosti spermíí medzi N : F a N : G. Pri porovnávaní kontroly so skupinou A a skupinou C sa zistil štatisticky preukazný rozdiel (P < 0,05) v sledovanom ukazovateli. Ostatné skupiny už neboli preukazné (P < 0,05) v porovnaní s kontrolou.

Na základe nášho experimentu môžeme konštatovať, že po posúdení rôznych časových období, pôsobilo najviac stimulačne na pohybovú aktivitu boviných spermíí médium G. Toto kultivačné médium, ktorého základ tvoril energetický substrát z glukózy (5 %), trehalózy (1 %) a sacharózy (5 %) zabezpečo-

Tabuľka 3 Základné štatistické ukazovatele progresívnej pohyblivosti spermií po použití rôznych kultivačných médií v časových periódach (0 h, 1 h, 24 h)

Skupina (1)	N/PROG	A/ PROG	B/ PROG	C/ PROG	D/ PROG	E/ PROG	F/ PROG	G/ PROG
0 h								
x	75,9	77,6	80,8	88,0 ^A	90,1 ^A	92,3 ^A	85,1	93,4 ^A
minimum	40,7	74,3	20,9	78,7	66,7	75,0	79,4	88,8
maximum	97,2	81,3	96,3	95,3	97,2	100	91,3	97,1
S.D.	12,5	2,18	20,6	3,92	5,41	5,87	4,10	2,46
CV v %	16,46	2,81	25,47	4,45	6,00	6,36	4,82	2,63
1 h								
x	74,4	78,3	86,5A	83,8 ^A	84,7 ^A	81,1 ^C	75,1	89,8 ^A
minimum	62,6	65,2	73,9	67,0	66,4	62,2	52,5	77,9
maximum	90,7	84,8	93,8	94,0	95,4	89,2	92,9	96,4
S.D.	6,59	5,26	4,95	7,52	7,84	6,81	11,0	4,79
CV v %	8,85	6,72	5,72	8,98	9,25	8,39	14,69	5,34
24 h								
x	14,28	22,37 ^C	15,53	5,394 ^C	16,92	4,615	38,26 ^A	45,11 ^A
minimum	5,240	0,3400	2,770	0,5400	1,610	3,250	22,50	33,33
maximum	23,57	50,98	28,97	12,35	35,18	6,270	45,00	51,78
S.D.	5,915	15,08	7,720	2,979	10,94	1,182	6,744	5,395
CV v %	41,42	67,43	49,71	55,22	64,65	25,60	17,63	11,96

x – aritmetický priemer, S.D. – smerodajná odchýlka, CV v % – variačný koeficient

^A P < 0.001, ^B P < 0.01, ^C P < 0.05

Table 3 Basic statistic of bovine spermatozoa progressive motility parameters after applications of different culture media in time periods (time 0, time 1, time 24)
(1) group

val počas dlhodobej kultivácie (24 h) dostatočný prísun energie potrebnej na ich prežívanie v podmienkach *in vitro*. Kultivačné médiá ako glukóza (10 %) a komerčné riedidlo zabezpečovali pohyblivosť boviných spermií iba počas obmedzeného časového úseku (1 h), preto sú vhodné len na krátkodobú kultiváciu ejakulátu. Z dosiahnutých výsledkov môžeme ďalej potvrdiť, že použité kultivačné médiá skupín C a E preukazovali najvýraznejší inhibičný účinok na pohybové parametre boviných spermií, preto nie sú vôbec vhodné na dlhodobejšiu kultiváciu.

Problematika vplyvu energetického substrátu na prežívateľnosť a pohyblivosť spermií v podmienkach *in vitro* je v súčasnosti značne diskutovanou témou. Mnohé odborné práce sa orientujú predovšetkým na analýzu energetických potrieb humánnych spermií. Avšak spermie živočíchov, najmä hovädzieho dobytku, sa v spôsobe zisku energie pre ich motilitu mierne líšia od ľudských. Doteraz nie je úplne jasné adekvátne sacharidové zloženie kultivačných médií.

Energetické substráty sú väčšinou prítomné v kultivačných médiách, nakoľko sú potrebné pre správnu funkčnosť spermií. Z nich je glukóza esenciálna pre myšie a potkanie spermie, je však potvrdené, že pri hovädzom dobytku je za určitých kultivačných podmienok škodlivá, nakoľko brzdí fertilizáciu. Motilita spermií závisí predovšetkým od dostupnosti energetického substrátu a schopnosti spermie využiť mitochondrie na produkciu ATP a cAMP (Mahadevan et al., 1997). Williams a Ford (2001) skúmali efekt niekoľkých metabolizovateľných cukrov na motilitu, kapacitáciu a zisk energie v humánnych spermiách. Pridanie 5,56 mmol glukózy alebo fruktózy do nesacharidového média okamžite zvýšilo koncentráciu ATP a motilitu spermií. Tieto parametre boli počas nasledujúcich 3 hodín stabilné, avšak výrazne klesli po 18 hodinách. Bez prídania sacharidu potrebného pre glykolýzu došlo k poklesu motility už počas prvej hodiny a iba 2–3 % spermií bolo pohyblivých po 18 hodinách

kultivácie. Na základe týchto výsledkov sa autori domnievajú, že pre motilitu a hyperaktiváciu spermií je potrebná energia pochádzajúca predovšetkým z glykolýzy. Mújica et al. (1991) sa zaoberal vplyvom glukózy na motilitu morčacích spermií. Po pridaní glukózy do kultivačného média bez obsahu sacharidu prejavili tieto spermie zvýšené parametre motility. Analýza spermií však poukázala na fakt, že prídanie glukózy nemalo efekt na nárast cAMP, z čoho vyplýva, že glukóza nemá vplyv na syntézu cAMP, avšak má výrazný účinok na celkovú motilitu a syntézu ATP. Porovnaním využitia glukózy a fruktózy pri *in vitro* kultivácii boviných spermií skúmali Vantienhoven et al. (1952). Ich práca predpokladala, že spermie ako v prítomnosti seminálnej plazmy, tak aj v jej absencii využívala prednostne glukózu, pokiaľ bola k dispozícii. Domnievali sa, že využitím fruktózy dochádza k aktivácii ďalších enzýmov v procese glykolýzy. Preto sa energia z fruktózy uvoľňovala pomalšie. Na základe nášho experimentu môžeme potvrdiť, že fruktóza (10%) nie je sama o sebe postačujúca pre zabezpečenie maximálnej motility spermií, a tým zároveň nie je vhodná na dlhodobejšiu kultiváciu. Pre tento účel je najvhodnejšou voľbou obohatiť kultivačné médium o glukózu. Tsuji et al. (2006) sa vo svojej práci zamerali na možný efekt prídania fruktózy do kultivačného média už obsahujúceho glukózu. Kombinácia 5,0 mmol glukózy a 0,5 mmol fruktózy preukazne zvýšila motilitu po 2–6 hodinách inkubácie, v porovnaní iba s glukózou 5,0 mmol. Jednoznačne sa teda potvrdil pozitívny vplyv fruktózy nielen na motilitu a akrozómovú reakciu, ale aj na celkovú fertilizačnú schopnosť spermií.

Médium, ktoré dosiahlo najlepšie parametre pohyblivosti pri našom experimente, obsahovalo popri glukóze a trehalóze aj sacharid zložený z jednotiek glukózy a fruktózy. Domnievame sa, že prítomnosť fruktózy pôsobí na spermie pozitívne, vychádzajúc z jej stimulačnej funkcie v rep-

roductnom trakte. Na druhej strane je potrebné dodať, že fruktóza sama o sebe pravdepodobne nie je postačujúca pre zabezpečenie maximálnej motility spermíí. Súhlasíme preto s Vantienhovenom et al. (1952) a predpokladáme, že pre tento účel ostáva vhodnejšou voľbou glukóza.

Zvýšená pozornosť sa momentálne obracia aj na trehalózu, ktorá má antioxidantný vplyv na membránovú integritu spermíí, ale aj ochrannú funkciu pred teplotným šokom pri mrazení inseminačných dávok. Preto sa množstvo štúdií venuje práve analýze vplyvu trehalózy na vitalitu spermíí pred a počas zmrazovania vzoriek, ako aj po ich rozmrazovaní. Monilinia et al. (1994) a Matsuoka et al. (2006) zistili, že motilita rozmrazených baraních spermíí bola vyššia po pridaní trehalózy ako po podaní glukózy do kultivačného média. Z analýzy Uysaka a Bucaka (2009) vyplýva, že pridanie 50 alebo 100 mM trehalózy do zmrazovacieho média preukazuje zvýšilo parametre pohyblivosti baraních spermíí, avšak koncentrácia 150 mM parametre pohyblivosti výrazne znížila. Z tejto štúdie vyplýva, že vyššie koncentrácie trehalózy môžu pôsobiť toxicky. Hu et al. (2009) sa zaoberali vplyvom trehalózy na parametre kančích spermíí po rozmrazení. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté po pridaní 100 mM trehalózy, a to čo sa týka nielen pohyblivosti, ale aj akrozómovej stability a membránovej integrity, pričom jej pridávanie do média by mohlo podstatne znížiť kryokapacitáciu spermíí počas zmrazovania. Ďalšia experimentálna práca Hua et al., (2010) bola založená na skúmaní efektov rôznych koncentrácií trehalózy na parametre kvality a antioxidantné vlastnosti zmrazených býčích spermíí. Pridanie 100 mM trehalózy dosiahlo najvyššie parametre pohyblivosti, ale aj akrozómovej reakcie a parametrov stability membrány spermíí. Rovnako sa znížil oxidačný stres vyvolaný zmrazovaním a následným opätovným rozmrazovaním. Z uvedených prác môžeme konštatovať, že optimálna koncentrácia trehalózy pridanej do kultivačného média pred zmrazovaním vzoriek má na prežívateľnosť spermíí veľmi pozitívny vplyv. Na druhej strane však vyššie koncentrácie trehalózy môžu pozmeniť štruktúru resp. pôsobiť toxicky na spermie. Vychádzajúc z našich výsledkov môžeme rovnako potvrdiť stimulačný vplyv nízkych koncentrácií trehalózy na prežívateľnosť boviných spermíí. Obe média, ktoré obsahovali trehalózu, dosiahli najlepšie parametre motility. Môžeme konštatovať, že trehalóza pôsobí pozitívne nielen pri zmrazovaní inseminačných dávok, ale poskytuje ochranu aj natívnym spermíám pred stresom z dlhodobej kultivácie *in vitro*. Pozitívny efekt by sa mohol rovnako docieľiť aj v médiách bez zmrazovania.

Záver

Z výsledkov vyplývajúcich z našej analýzy predpokladáme, že optimálnou voľbou pre dlhodobú kultiváciu boviných spermíí je kombinácia niekoľkých druhov sacharidov, pričom dominantným substrátom by mala byť glukóza, ktorá poskytuje dostatočné množstvo energie, a to aj počas 24 hodinovej kultivácie spermíí. Potvrzuje sa teda fakt, že väčšinu energie pre pohyb získava spermia v procese glykolýzy a glukóza je pre metabolizmus spermie najlepším využiteľným substrátom.

Najvyššiu motilitu i progresívnu motilitu sme dosiahli počas dlhodobej kultivácie v médiách v zložení glukóza (5%), sacharóza (5%) a trehalóza (1%), ako aj v médiu v zložení glukóza (10%) a trehalóza (1%). Médium, ktoré dosiahlo najlepšie parametre pohyblivosti, obsahovalo popri glukóze a trehalóze aj sacharózu, teda disacharid zložený z jednotiek glukózy a fruktózy. Domnievame sa, že prítomnosť fruktózy pôsobí na spermie pozitívne, nakoľko je fruktóza dominantným

sacharidom prítomným v prirodzenom prostredí reprodukčného traktu býkov. Na druhej strane je však potrebné dodať, že fruktóza sama o sebe nie je postačujúca pre zabezpečenie maximálnej motility spermíí. Pre tento účel ostáva vhodnejšou voľbou glukóza.

Obe médiá, ktoré obsahovali trehalózu, dosiahli najlepšie parametre motility. Môžeme konštatovať, že trehalóza nielen pôsobí pozitívne pri zmrazovaní inseminačných dávok, ale poskytuje ochranu aj natívnym spermíám pred stresom z dlhodobej kultivácie *in vitro*. Pozitívny efekt by sa mohol rovnako docieľiť aj v médiách bez zmrazovania.

Relatívne vyššie parametre pohyblivosti preukazovali spermie počas kultivácie v komerčnom riedidle. Médium je však vhodné len na krátkodobú kultiváciu spermíí pred následnými úpravami, tým spĺňa svoj účel. Možno však predpokladať, že po pridaní iných stimulačných látok by mohlo byť vhodné i pre kultiváciu dlhodobejšiu.

Na záver je potrebné dodať, že energetický substrát je pre prežívateľnosť spermíí v podmienkach *in vitro* jednou z rozhodujúcich zložiek kultivačného média, ale rovnako dôležité sú aj iné substancie, ako napr. aminokyseliny, proteíny alebo minerálne látky. Vplyv týchto látok na vitalitu spermíí je potrebné analyzovať a po následnom vyhodnotení ich vplyvu bude relevantné pripraviť médium pre získanie optimálnych parametrov motility spermíí počas 24-hodinovej kultivácie v podmienkach *in vitro*.

Súhrn

Cieľom experimentu bola analýza vplyvu rôznych energetických substrátov použitých v kultivačných médiách, ktoré zabezpečia maximálnu motilitu boviných spermíí počas 24-hodinovej kultivácie v podmienkach *in vitro*. Porovnávali sme neriedený ejakulát (N) so vzorkami, do ktorých sa aplikovali rôzne kultivačné médiá (A, B, C, D, E, F, G) počas troch časových období (0h, 1h a 24h) pomocou systému CASA s využitím SpermVision™ programu. Z našej experimentálnej práce vyplýva, že priemerná motilita a progresívna motilita boviných spermíí v kontrolnej skupine počas 24-hodinovej kultivácie klesala pri porovnávaní s 0h a 1h. Najvýraznejší inhibičný účinok na pohybové parametre boviných spermíí bol pri aplikácii energetického média E, obsahujúceho glukózu (5%) a sacharózu (5%), $5,890 \pm 3,111\%$. Najvyššia hodnota motility bola detekovaná pri aplikácii kultivačného média G $96,0 \pm 2,31\%$. Vysoká signifikancia pohyblivosti ($P < 0,001$) bola detekovaná medzi N : A, N : F a N : G. Druhým sledovaným ukazovateľom bola priemerná progresívna motilita, ktorá dosahovala pokles svojej hodnoty vo všetkých sledovaných médiách. Najnižšia hodnota progresívnej motility bola detekovaná v skupine $4,615 \pm 1,182\%$. Maximálna prežívateľnosť boviných spermíí bola počas aplikácií kultivačného média G $45,11 \pm 5,395\%$. Toto kultivačné médium v zložení glukóza (5%), sacharóza (5%) a trehalóza (1%) zabezpečoval dostatočný prísun energie na ich prežívanie v podmienkach *in vitro*. Vysoká signifikancia ($P < 0,001$) progresívnej motility bola detekovaná v skupine E a G pri porovnávaní s kontrolnou skupinou.

Kľúčové slová: kultivačné médiá, energetické substráty, spermie, motilita, progresívna motilita

Práca vznikla za finančnej podpory grantových projektov APVV SK-HU-0005-08 a MŠ SR KEGA 101-001 SPU-4/2010.

Literatúra

- BALABAN, B. – URMAN, B. – SERTAC, A. – ALATAS, C. – AKSOY, S. – MERCAN, R. – NUHOGLU, A. 1999. *In vitro* culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. In: Human Reproduction, vol. 14, 1999, no. 11, p. 2808–2811.
- BREUER, D. J. – WELLS, M. E. 1977. Effect of *In Vitro* Incubation of Bovine Spermatozoa in Bovine Follicular Fluid. In: J. Anim. Sci., vol. 44, 1977, p. 262 – 265.
- FORD, W. C. L. 2006. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? In: Human Reproduction Update, vol. 12, 2006, no. 3, p. 269–274.
- GAMČÍK, P. – KOZUMOLÍK, J. – MESÁROŠ, P. – SCHVARC, F. – VLČEK, Z. – ZIBRIŇ, M. 1992. Andrológia a inseminácia hospodárskych zvierat. Bratislava : Príroda, 1992. 299 s. ISBN 80-07-00540-4.
- HU, J. H. – LI, Q. W. – LI, GANG, L. – JIANG, Z. L. – BU, S. H. – HAI, Y. – WANG, Q. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. In: Animal reproductive science, vol. 112, 2009, no. 1–2, p. 107–118.
- HU, J. H. – ZAN, L. S. – ZHAO, X. L. – LI, Q. W. – JIANG, Z. L. – LI, Y. K. – LI, X. 2010. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress parameters in frozen-thawed bovine semen. In: J. Anim. Sci., published online first.
- JANKOVIČOVÁ, J. – SIMON, M. – ANTALÍKOVÁ, J. 2006. Methods for evaluation of an acrosome reaction of bovine spermatozoa. In: Acta fytotechnica et zootechnica, vol. Special issue, 2006, p. 118–119.
- LUKÁČ, N. a kol. 2007. Stopové prvky a kvalita spermií. Nitra : SPU, 2007, 118 s. ISBN 978-80-8069-904-0.
- MAHADEVAN, M. M. – MILLER, M. M. – MOUTOS, D. M. 1997. Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics *in vitro*. In: Human Reproduction, vol. 12, 1997, p. 119–123.
- MATSUOKA, T – IMAI, H. – KOHNO, H. – FUKUI, Y. 2006. Effects of bovine serum albumine and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. In: J. Reprod Dev, vol. 52, 2006, p. 675–683.
- MOLINIA, F. C. – EVANS, G. – MAXWELL, W. M. C. 1994. Effects of monosaccharides and disaccharides in tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. In: Anim Reprod Sci, vol. 36, 1994, p. 113–122.
- MÚJICA, A. – MORENO-RODRÍGUEZ, R. – NACIFF, J. – NERI, L. – TASH, J. S. 1991. Glucose regulation of guinea-pig sperm motility. In: Journal of Reproduction and Fertility, vol. 92, 1991, p. 75–87.
- SCHNEIDER, C. S. 1999. Relationship between bull field fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. In: Theriogenology, vol. 51, 1999, no. 6, p. 1085–1098.
- TSUJI, H. – OHTA, E. – MIAH, A. G. – HOSSAIN, S. – SALMA, U. 2006. Effect of fructose on motility, acrosome reaction and *in vitro* fertilization capability of boar spermatozoa. In: Reproductive Medicine and Biology, vol. 5, 2006, no. 4, p. 255–261.
- UYSAL, O. – BUCAK, M. N. 2009. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen. In: Ankara Univ Vet Fak Derg, vol. 56, 2009, p. 99–103.
- VANTIENHOVEN, A. – SALISBURY, G. W. – VANDEMARK, N. L. – HANSEN, R. G. 1952. The Preferential Utilization by Bull Spermatozoa of Glucose as Compared to Fructose. In: Journal of Dairy Science, vol. 35, 1952, no. 7, p. 637–641.
- WILLIAMS, A. C. – FORD, W. C. 2001. The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa. In: Journal of Andrology, vol. 22, 2001, p. 680–695.

Kontaktná adresa:

Ing. Zuzana Kňazická, Katedra fyziológie živočíchov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika, ☎ ++421-37-641 42 88, e-mail: zuzanaknazicka25@gmail.com