

**SPERMIOGENEZE, SLOŽENÍ A
KVALITA SPERMATU
ZÁSADY UCHOVÁNÍ SPERMATU**

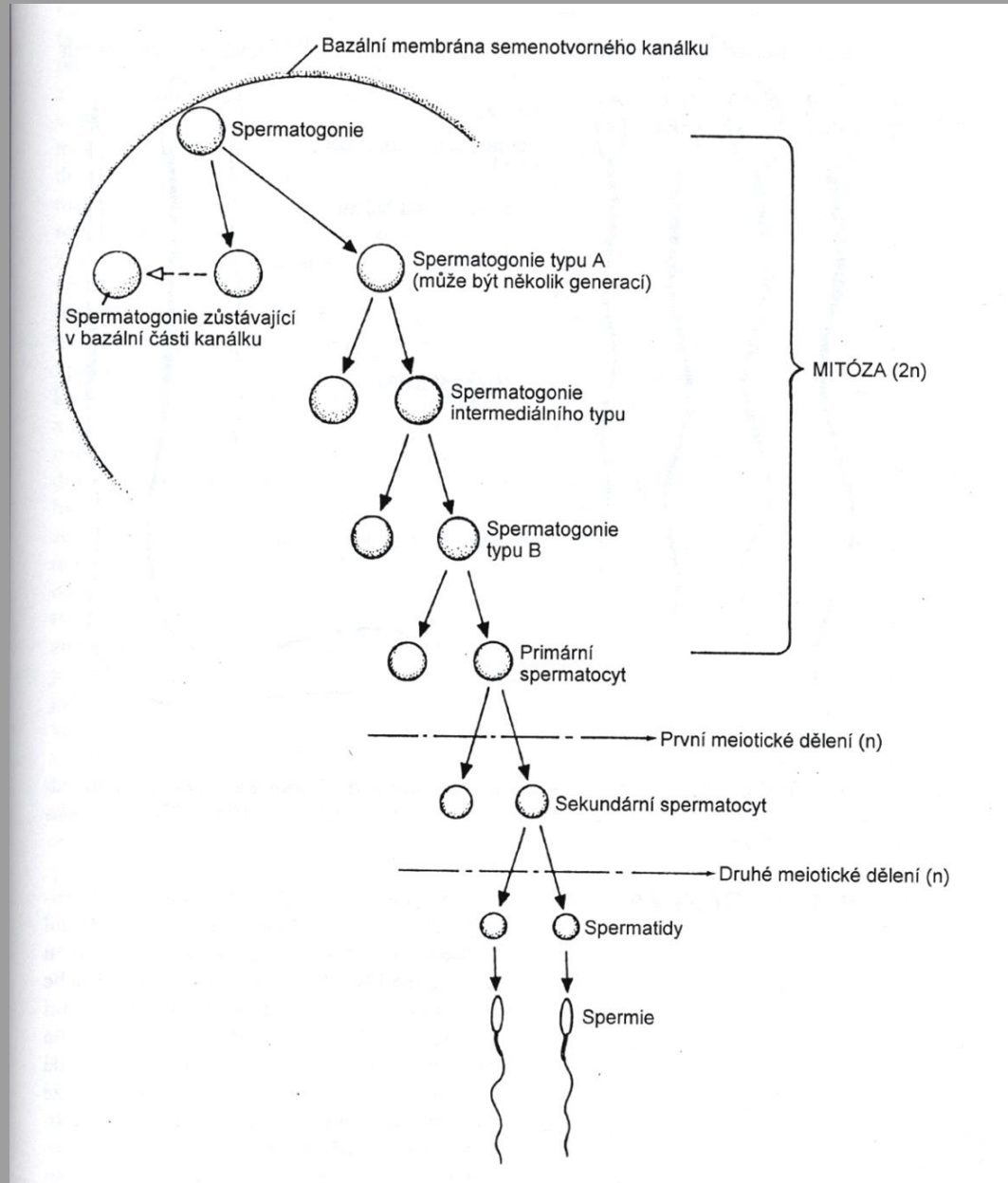
SPERMATOGENEZE

(spermiogeneze)

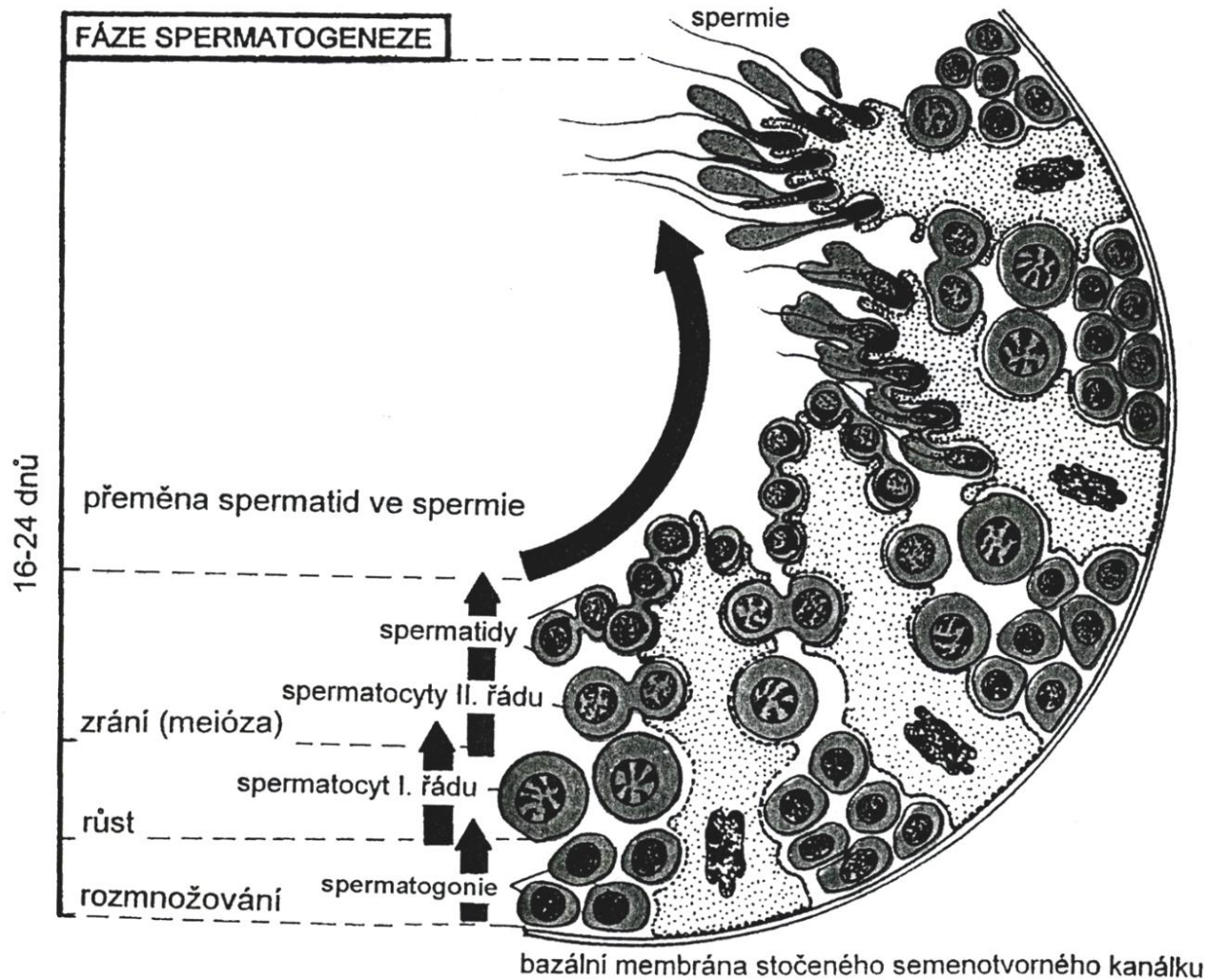
= je vznik a vývoj spermií ve varleti

- Nezralé spermie jsou uvolněny do semenotvorných kanálků, odkud putují do **nadvarlete**, kde definitivně dozrávají.
- Zralé spermie jsou díky svému bičíku plně pohyblivé.

Schéma spermatogeneze



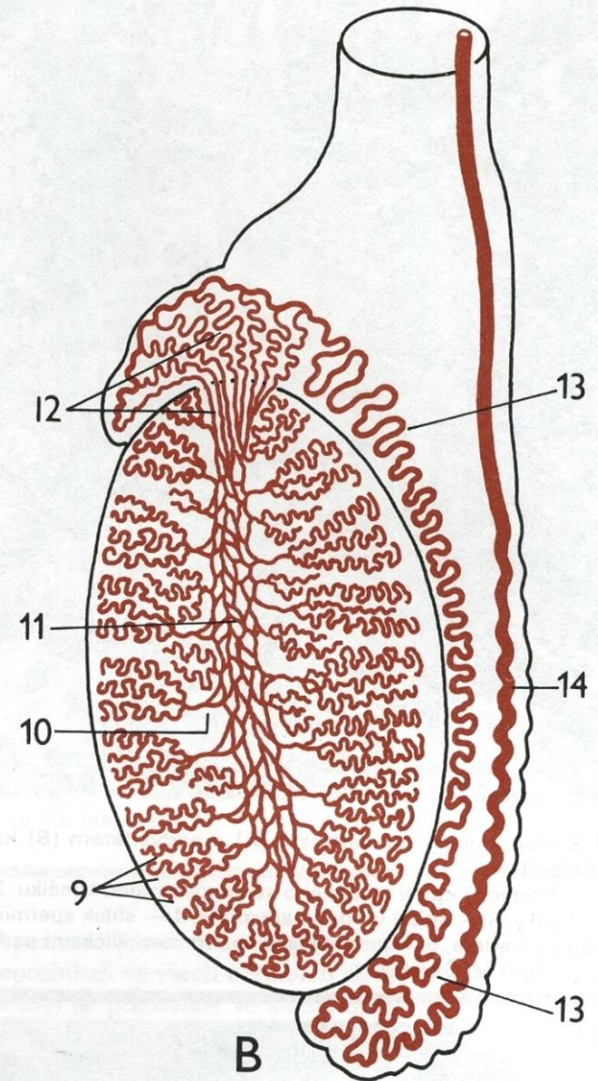
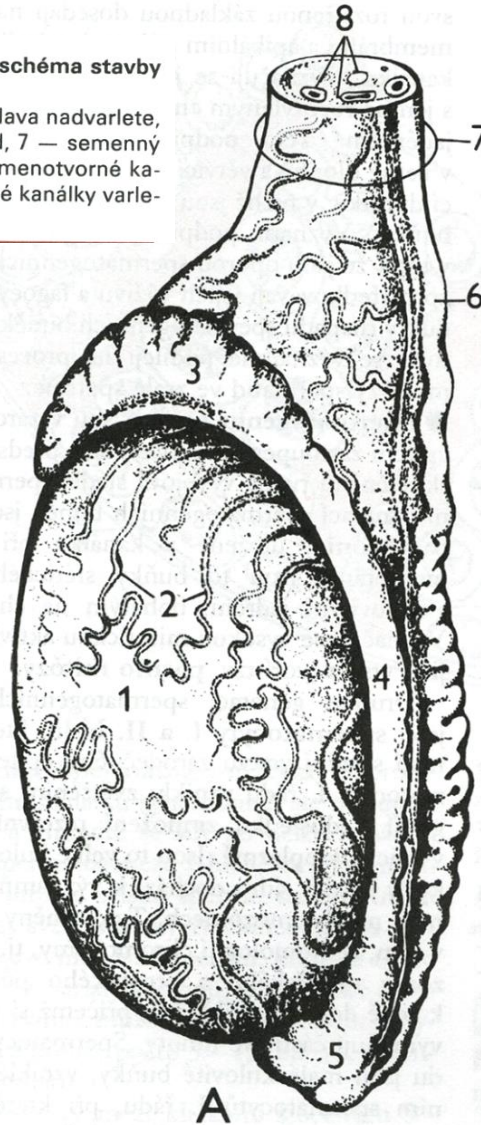
Fáze spermatogeneze



Stavba varlete a nadvarlete býka

11.1 Varle a nadvarle býka po vyjmutí ze šourku (A) a schéma stavby varlete a nadvarlete (B).

1 — varle, 2 — krevní cévy v bělavém obalu varlete, 3 — hlava nadvarlete, 4 — tělo nadvarlete, 5 — ocas nadvarlete, 6 — chámovod, 7 — semenný provazec, 8 — varletní tepna, žila a nerv, 9 — stočené semenotvorné kanálky, 10 — přímý kanálek, 11 — varletní síň, 12 — odvodné kanálky varlete, 13 — vývod nadvarlete, 14 — chámovod.



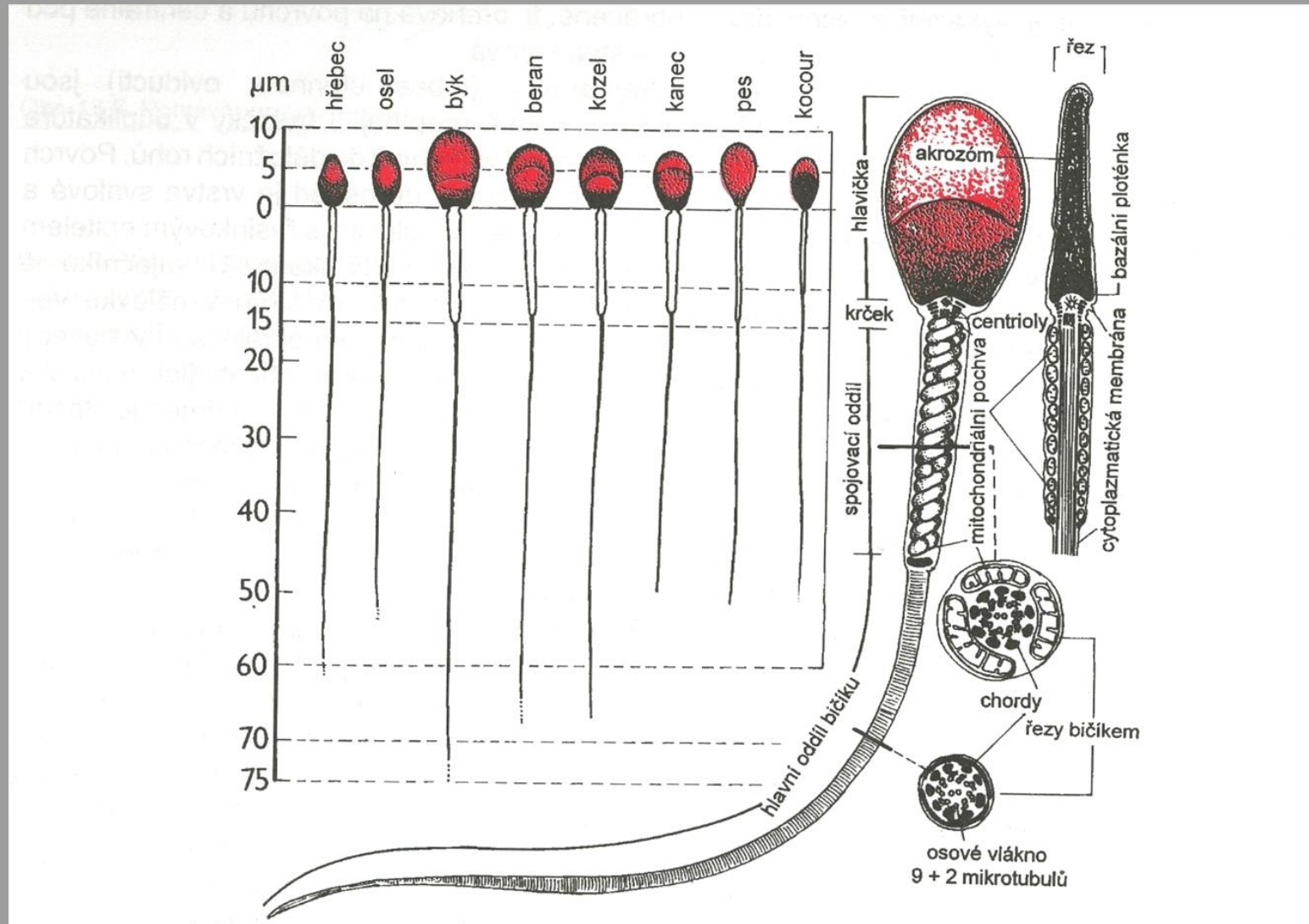
Denní produkce spermií

- Býk denně $2,5 \times 10^9$ spermií
- Kanec denně 15×10^9 , druhý rok až 31×10^9
- Hřebec 6×10^9 spermií denně, rezerva až 20×10^9
- U vyčerpaných nutná sexuální pauza 4-7 dní

Rozměry spermií (mikrony)

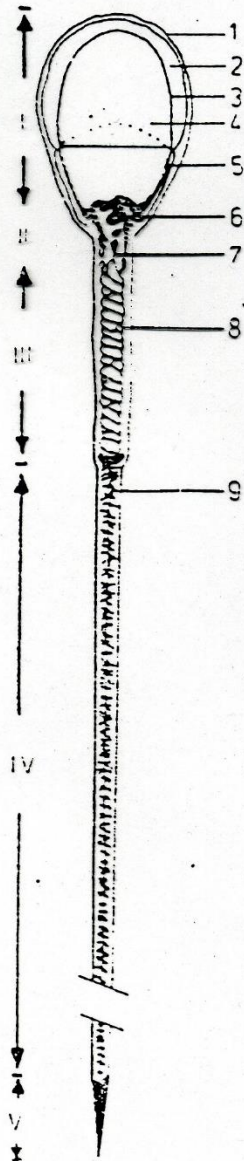
	Celková délka	Délka hlavičky	Šířka hlavičky
Býk	75-80	9-10	4-5
Beran	70-80	8-9	4-5
Kanec	50-60	7-10	4-5
Hřebeč	55-60	5-8	2-5
Králík	55-60	8-9	4-5
Drůbež	50-120	7-14	0,5

Spermie různých druhů savců



Mikrostruktura spermie

Mikrostruktura býčí spermie



I - hlavička

II - krček

III - spojovací oddíl bičíku

IV - hlavní oddíl bičíku

V - terminální oddíl bičíku

1 - cytoplasmatická membrána

2 - akrozóm

3 - jaderná membrána

4 - jádro

5 - postnukleární čepička

6 - proximální centriol

7 - osové vlákno

8 - mitochondriální spirála

9 - fibrózní spirála

Mikrostruktura spermie

- **Hlavička spermie:**
 - 51% hmotnosti spermie
 - Její úloha je přenést dědičný materiál v nukleoplazmě
 - Přední část kryta čepičkou – akrozomem (enzymy neleptávající stěnu vajíčka)
- Akrozom
 - Cytoplazmatický útvar, složen z mukopolysacharidů
 - Zaujímá 50% plochy hlavičky
 - Nositelem specifických enzymů (hyaluronidáza, akrozin, proakrozin, kyselá fosfatáza, proteináza aj.), které rozpouštějí zonu pellucidu a cytoplazmatický obal vajíčka
 - Citlivost na osmotické změny vnějšího prostředí (bobtnání, oddělení)
 - Dobře barvitelný

Mikrostruktura spermie

■ Krček

- Spojuje hlavičku s bičíkem, 2-3 μ m
- Dva za sebou uložené centrioly, distální centriol obklopen devíti příčně segmentovanými provazci = chordami
- Hlavice bičíku zapadá do implantační jamky, kloubové spojení

■ Bičík

- **Transport spermie**
- **Mitochondriální aparát – tvorba energie**
- Axiální vlákna – přeměna na mechanickou energii

Spojovací část bičíku:

- ❖ Pokračováním krčku, ukončena distální centriolou
- ❖ Osové vlákno – 9+2 fibril + chordy (hrubá vlákna)
- ❖ Spirálovitá pochva – mitochondrie – respirační aparát

Fyzikálně chemické vlastnosti spermatu

- Směs spermií a semenné plasmy
- Husté sperma: býk, beran, kozel
- Řídké sperma: hřebec, kanec
- Objem a hustota biologicky uzpůsobeny poměrům depozice do pohlavních orgánů –
intravaginální x intracervikální

Parametry spermatu

	cm ³	∅	Sper. v mm ³	∅
Býk	2 – 10	5	0,2 – 2,0x10 ⁶	1,0x10 ⁶
Beran	0,5 – 2	1	0,5 – 5,0x10 ⁶	3,0x10 ⁶
Hřebec	20 – 300	70	0,03 – 0,8x10 ⁶	0,12x10 ⁶
Kanec	100 – 500	250	0,05 – 0,5x10 ⁶	0,25x10 ⁶
Králík	0,4 – 2,0	1	0,05 – 0,5x10 ⁶	0,25x10 ⁶
Kohout	0,1 – 1,5	1	0,5 – 7,0x10 ⁶	3,0x10 ⁶
Krocan	0,2 – 1,0	0,5	3,0 – 7,0x10 ⁶	4,0x10 ⁶
Kačer	0,1 – 1,5	0,5	0,05 – 3,0x10 ⁶	1,0x10 ⁶
Houser	0,2 – 1,5	0,8	0,5 – 1,5x10 ⁶	0,25x10 ⁶
Muž	2,0 – 6,0	3,5	0,05 – 0,15x10 ⁶	0,1x10 ⁶

Životní projevy spermií

- Spotřeba energie – metabolické pochody
- Zdroj energie – fruktóza (glukóza), kys.mléčná
 - Fruktolýza (glykolýza) → kyselina mléčná
 - Dýchání (respirace) → kys.mléčná do Krebsova cyklu
- Průběh metabolismu:
 - V nadvarleti inaktivace: nižší teplota, pH 5,6 – 6,6, vyšší koncentrace CO₂, nedostatek fruktózy
 - V semenné plasmě (ředidle) a pohl. orgánech samice aktivace

Pohyb spermií

- V nadvarleti nepohyblivé
- Pohyb při styku se sekretem před. pohl. žláz
- Zralá a zdravá spermie má *přímočarý progresivní pohyb vpřed za hlavičkou*
- Způsoby pohybu:
 - Kmitáním bičíku
 - Otáčivé pohyby kolem podélné osy
 - Nejrychlejší pohyb v čerstvém spermatu
 - Pohyb začíná od báze hlavičky a probíhá po celé délce bičíku
 - 9 vln a 3-15 otoček za vteřinu

Pohyb spermií

- Hromadný pohyb: aktivní spermie rozvlí a uvedou do pohybu plasmu, která unáší spermie náhodným směrem
- Centrum pohybu: v proximální centriole krčku
- Směr pohybu:
 - V ejakulátu nahodilým směrem
 - V pohl. orgánech reotaxe = schopnost pohybu proti proudu tekutiny
 - Rychlost spermií se zvyšuje s rychlostí proudící tekutiny, orientují se podle proudu
- Nežádoucí pohyb:
 - Krouživý (může být vydatný)
 - Otáčivý (kolem hlavičky)
 - Vlnivý na místě
 - Zpětný
- Aglutinace = shlukování spermií, ztráta záporného el. náboje (pokles pH, staré sperma)

Vlivy působící na aktivitu spermií

- **Teplota**
 - Největší pohyb při 38-41°C
 - Při 0°C se pohyb zastavuje
 - Při 48 – 50°C dochází ke koagulaci bílkovin optim. teplota pro uchovávání spermatu je 0-3°C u býčích spermií kritická teplota 15 – 17°C – dochází k tepelnému šoku při -1 až -17°C dochází k intenzivní krystalizaci
- **pH**
 - Nejpriznivější 6,8 až 7,5
 - Pod 6,0 a nad 8,0 spermie hynou
- Světlo – nepříznivě působí sluneční paprsky

Rychlost transportu

■ Prasnice

- Spermie ve vejcovodu za 40 min. (průměrně 1-2 hod)

■ Krávy a ovce

- Spermie ve vejcovodu za 4 až 6 hodin
- Průchod krčkem 30 min.
- Průchod dělohou 2 hod.
- Průchod vejcovodem až 8 hod.

Zásady ředění a uchování spermatu

- cílem je uchovat oplozovací schopnost spermií
- ředění spermatu: větší objem, přežití spermií
→ uchování vitality a fertility, jen za stavu anabiózy
- konzervační roztok:
 - stejné fyzikálně – chemické vlastnosti
 - chrání spermie před produkty metabolismu
 - zabraňuje chladovému šoku

Komponenty používaných ředidel

- vaječný žloutek:
 - obsahuje výživné látky, ochranné koloidy
 - zvyšuje odolnost spermií proti chladovému šoku
 - pufovací schopnost, antikoagulační účinek
 - nevýhoda: živná půda pro zárodky → používání pouze čerstvých vajec (max 10 dnů stáří) od slepic z chovů prostých nákaz
- mléko:
 - pufovací roztok, zabraňuje aglutinaci
 - snižuje nebezpečí chladového šoku
 - používá se plnotučné, odstředěné, homogenizované, laktóza
- kryoprotektiva:
 - zabránění chladovému šoku
 - glycerin
- výživné látky:
 - fruktoza, laktoza, kys. citronová
- antibiotika:
 - streptomycin, penicilin, linkomycin, spektinomycin
 - po přidání antibiotik ponechat min 45 min při 5°C

Ředidla pro dlouhodobé uchování

■ TRILADYL

- komerční ředidlo dodávané v koncentrované formě
- dest. voda, glycerol, kys.citronová, fruktoza, antibiotika
- do koncentrátu destilovaná voda + vaječný žloutek, zahřátí na 30°C

■ LAKTÓZOVÉ ŘEDIDLO

- 11% vodný roztok laktózy, vaječný žloutek, glycerin
- míchání ve sterilním prostředí, přidávání antibiotik

■ TRIS

- destilovaná voda, tris, kys.citrónová, fruktóza, antibiotika
- TRIS = hydroxymethyl - aminometan
- přidání žloutku + glycerinu

■ Další komerční ředidla:

- příprava podle pokynů výrobce

Hluboké chlazení spermatu

- kryobiologie = biologie nízkých teplot, chování biologických objektů při nízkých teplotách
- kryokonzervace = uchování bio materiálu při teplotách pod bodem mrazu
- kryoprotektiva = látky chránící biologický materiál
 - zvyšují počet přežívajících buněk
 - snížení množství ledových krystalů
 - vliv na strukturu vody, zvyšují uspořádanost molekul
 - v přírodě přežívají larvy až -30°C (glycerol dosahuje až 25% hmotnosti celé larvy)
- glycerol: pro kryokonzervaci pohl. buněk, krve, kostní dřeně
 - přidáný ke spermatu váže volnou vodu
 - zabraňuje krystalizaci
 - důležitá je propustnost buněčné membrány
 - nutné ponechat buňky v prostředí s glycerolem = ekvilibrace

Hluboké chlazení spermatu

- dimethylsulfoxid:
 - rychleji řrechází přes buněčnou membránu
 - nevýhodou jsou toxické účinky
- suchý led:
 - poprvé Polge a kol. (Anglie), 1949
 - ekvilibrace 3-5°C 4-16 hod, 16% glycerinu
 - zmrazování na suchém ledu -79°C v peletách
 - kontaminace směsí mikroorganismů
- tekutý dusík:
 - Meryman (1966) → anabióza spermií při -130°C, pod -160°C jsou zastaveny rekrystalizační procesy
 - tekutý dusík -196°C
 - 1969 – 1972 zavedení japonské metody v ČR, snížení rizika kontaminace
- mykoplazmata:
 - 60% ID kontaminováno (pelety), mycoplasma bovis genitalium
 - při -160°C přežívají několik let, eliminace antibiotiky

Postup zmrazování spermatu

- 20% ejakulátů nevhodných ke zmrazování
- největší odumírání při 0 až -40°C , kritická teplota v kontejneru -60°C
- naplnění dutinek, ekvilibrace (= pronikání glycerolu přes cytoplazmatické membrány) průměrně 5 hod, nejméně však 2 hod
- zmrazování podle křivky řízené počítačem
- na roštu, páry tekutého dusíku, $t -130^{\circ}\text{C}$, po vložení stoupne teplota na -70°C (kritická hranice)
- zmrazování po dobu 9 min → do tekutého dusíku

Uchování zmraženého spermatu

Dlouhodobě uchovávané sperma je sperma, které je po speciálním technologickém postupu uchováváno při teplotě -196°C

- ID v provozních kontejnerech v kelímcích
- po 24 až 48 hod. od zmražení hodnocení aktivita
- vyřazení spermatu s aktivitou nižší než 30% a když vyrobené množství pejet přesáhlo max. počet stanovení výpočtem
- pejety v kelímcích umístěny vatovou zátkou dole

Rozmrazování spermatu

- rozmrazování bezprostředně před inseminací
- pejeta do vodní lázně, teplota cca 35°C
- pejety s obsahem 0,25 cm³ 7 vteřin
- pejety s obsahem 0,50 cm³ 15 vteřin
- kontrola označení, vzduchová bublinka musí být u zavařeného konce pejety
- vložení do přenosové aparatury

Lyofilizace

- odstranění vody sublimací za zmrazeného stavu
- 1949 Polge – sperma kohouta (30% glycerolu)
- sperma se zmrazí a vysuší ve vakuu
- zabrání se hypertonickému prostředí
- získá se suchý prášek
- oživení spermií 5-20%