CERTIFIKOVANÁ METODIKA Č. 5775/2025

Metodika hodnocení integrity akrozomu spermií býků

Autoři
Mgr. Miluše Vozdová, Ph.D.
RNDr. Věra Kopecká, Ph.D.

2025

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
Metodika vznikla na v rámci řešení projektu Národní Centrum Biotechnologií ve Veterinární Medicíně – NaCeBiVet, registrační číslo projektu TN02000017.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA Č. 5775/2025

Metodika hodnocení integrity akrozomu spermií býků

Autoři

Mgr. Miluše Vozdová, Ph.D.

RNDr. Věra Kopecká, Ph.D.

2025

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

Metodika vznikla na v rámci řešení projektu Národní Centrum Biotechnologií ve Veterinární Medicíně – NaCeBiVet, registrační číslo projektu TN02000017.

Ministerstvo zemědělství
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1

v y d á v á

O S V Ě D Č E N Í

č. MZE-91238/2025-13141

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika hodnocení integrity akrozomu spermií býků**

Autorky: **Mgr. Miluše Vozdová, Ph.D., RNDr. Věra Kopecká, Ph.D.**

Názvy organizací: **Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2025**

Metodika vznikla na v rámci řešení projektu Národní Centrum Biotechnologií ve Veterinární Medicíně – NaCeBiVet, registrační číslo projektu TN02000017.

Ing. Jan Vodička, Ph.D.
Digitální podpis: 22.12.2025 14:24
Důvod podpisu: Schvaluji tento dokument.

.....

podpis zástupce odborného útvaru státní správy

v z. Ing, Jan Vodička, Ph.D.

Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy: Ing. Pavel Hakl
ředitel Odboru živočišných komodit
a ochrany zvířat MZe

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe:

Ing. Jan Adamec
Digitální podpis: 29.12.2025 13:54

.....

Mgr. Jan Radoš

Obsah

I. Úvod 2
II. Cíl metodiky 3
III. Vlastní popis metodiky 3
IV. Srovnání novosti postupů 5
V. Popis uplatnění metodiky 6
VI. Ekonomické aspekty 6
VII. Seznam citované literatury 7
VIII. Seznam publikací předcházejících metodice 7
IX. Dedikace 7
X. Jména oponentů 8
XI. Podíl práce 8

I. Úvod

Zvyšování kvality výsledků reprodukce skotu představuje klíčový předpoklad pro zefektivnění chovu skotu a zajištění produkce hovězího masa, mléka a mléčných výrobků. Zejména v chovech dojeného skotu je dnes široce využívána umělá inseminace, která je založena na použití kryokonzervovaných inseminačních dávek od prověřených plemenných býků s vynikajícími produkčními vlastnostmi. Reprodukční úspěšnost je přitom úzce spojena s kvalitou použitých inseminačních dávek. K jejich přípravě se využívá ejakulát vysoce kvalitních býků, který je ještě před samotným zpracováním podroben důkladné kontrole. Hodnocení kvality probíhá prostřednictvím standardních metod, především stanovením koncentrace spermií a jejich motility, přičemž se v současnosti většinou uplatňují moderní softwarové systémy (SCA, CASA). K výrobě inseminačních dávek je následně využíván pouze ejakulát, který splňuje požadované parametry.

I přes rozvoj technologií pro kryokonzervaci spermií a přípravu a uchování inseminačních dávek, vlivem procesu mražení a následného rozmrazování však může docházet k narušení funkčních vlastností spermií v závislosti na individuální citlivosti zvířat k mražení (Přinosilová a kol. 2014). Přestože je nezpochybnitelnou základní podmínkou pro úspěšnou inseminaci a reprodukci především aktivita spermií, existují i další funkční ukazatele, které mohou pomoci při posouzení schopnosti spermií oplodnit vajíčko. Mezi testy, které lze k posouzení oplozovacích schopností spermií použít patří i stanovení integrity akrozomu. Akrozom je klíčová organela lokalizovaná v apikální části hlavičky spermie. Tato váčkovitá struktura obsahuje soubor enzymů (např. hyaluronidázu, akrozin), které umožňují spermii proniknout ochrannými obaly vajíčka a oplodnit je. K uvolnění těchto látek dochází během tzv. akrozomální reakce předcházející splynutí spermie s vajíčkem. Spermie bez akrozomu nebo s narušenou integritou akrozomální membrány tak není schopna proniknout přes obal vajíčka (zonu pellucidu) a oplodnit je.

Mezi významné nadstavbové metody hodnocení kvality spermií patří právě stanovení integrity akrozomu. Integritu membrán v akrozomové oblasti je možno hodnotit několika metodami, ať již ve fázovém kontrastu, přímým morfologickým posouzením po barvení, pomocí monoklonálních protilátek

proti intraakrozomálním proteinům, nebo s využitím vazebné aktivity lektinů *Pisum sativum* PSA (*Pisum sativum* agglutinin) nebo *Arachis hypogaea*, případně dalších.

V této metodice je popsán optimalizovaný postup pro hodnocení integrity akrozomu kryokonzervovaných spermií skotu po rozmražení inseminačních dávek pomocí fluorescenčně značeného lektinu PSA (PSA-FITC). Tento test je vhodnou nadstavbovou technikou hodnocení funkčního stavu kryokonzervovaných spermií nad rámec standardních metod. Při využití PSA-FITC lze v mikroskopu spolehlivě rozlišit spermie s intaktním akrozomem od spermií s poškozenou či chybějící membránou. Tato metoda tak poskytuje důležité doplňující informace k rutinnímu stanovení základních parametrů, jako jsou koncentrace a motilita, a přispívá k lepšímu celkovému zhodnocení kvality inseminačních dávek.

II. Cíl metodiky

Cílem metodiky je optimalizace postupu pro stanovení integrity akrozomu spermií v inseminačních dávkách býků při použití konjugovaného lektinu PSA-FITC a fixace netoxickým činidlem.

III. Vlastní popis metodiky

Reagencie a příprava roztoků

Lektin PSA-FITC (Sigma-Aldrich, kat. č. L0770-2MG)

96% etanol

PBS, pH 6,8

Fyziologický roztok - 0.9% NaCl (0,9 g NaCl ve 100 ml destilované vody)

VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector, kat.č. H-1000-10)

Zásobní roztok lektinu PSA-FITC (10mg/ml) - 2 mg PSA-FITC rozpustit v 0,2 ml PBS. Alikvoty o objemu 1 µl v 1,5 ml mikrozkumavkách lze dlouhodobě uchovávat v mrazáku při -20 °C

Pracovní roztok lektinu PSA-FITC (10µg/ml) připravíme přidáním 999 µl fyziologického roztoku do zkumavky s 1 µl zásobního roztoku PSA-FITC, připravujeme těsně před použitím

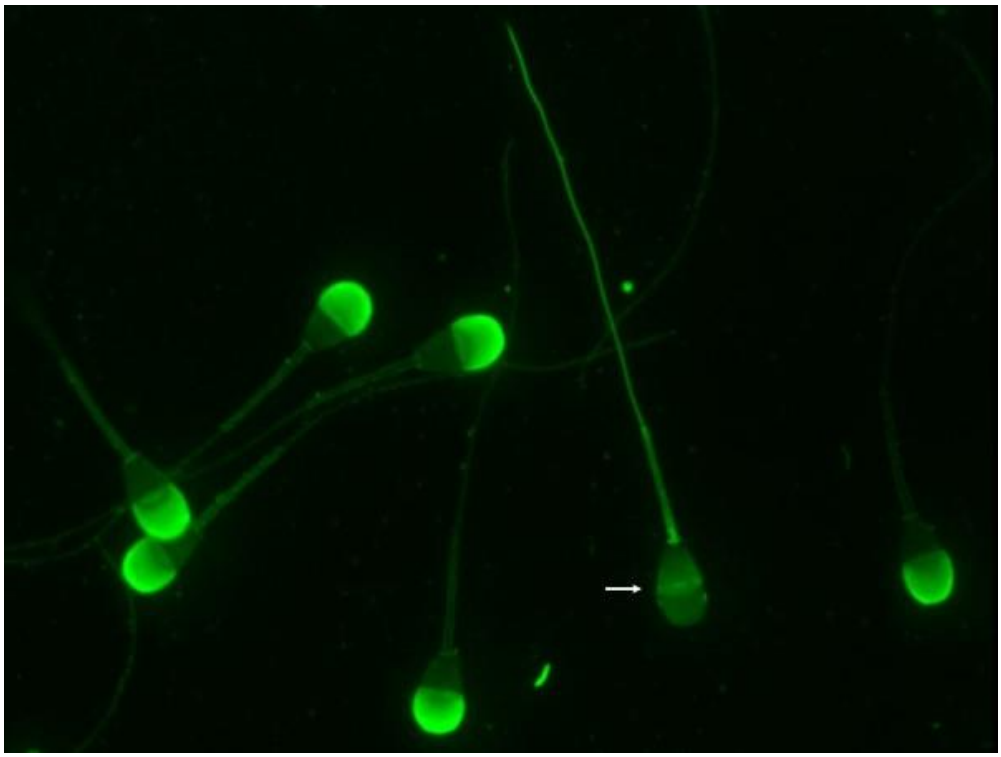
Postup testu

Testovanou inseminační dávku rozmrazíme ponořením pejety do vody o teplotě 37 °C na dobu 30 s. Pejetu vyjmeme, osušíme, obsah přeneseme do mikrozkumavky o objemu 1,5 ml a ponecháme 1 min. na plotýnce předehřáté na 37 °C. Poté jemně promícháme a připravíme nátěr z 15 µl suspenze spermií. Nátěr necháme zaschnout na vzduchu a fixujeme ponořením preparátu do kyvety s 96% etanolem na 30 min. při laboratorní teplotě. Poté preparáty vyjmeme a necháme uschnout na vzduchu. Před vlastním testem si připravíme pracovní roztok lektinu PSA-FITC (10µg/ml) ze zmraženého alikvotu, roztok chráníme před světlem. Naneseme 50 µl tohoto roztoku na preparát a překryjeme plastovou folií. Inkubace probíhá 30 min. ve vlhké komůrce v termostatu při 37 °C. Poté pinzetou odstraníme krycí folii, setřepeme přebytek roztoku PSA-FITC, na ještě vlhký preparát aplikujeme VECTASHIELD Antifade Mounting Medium a překryjeme krycím sklíčkem. Preparáty chráníme před světlem. Hodnocení probíhá ve fluorescenčním mikroskopu při zvětšení 400 – 1 000x s využitím imerzního oleje. Posuzuje se minimálně 200 spermií.

Vyhodnocení testu

U spermií s neporušenou integritou akrozomu dochází k vazbě konjugovaného lektinu PSA-FITC na akrozomální struktury, což lze detekovat ve fluorescenčním mikroskopu. Spermie bez akrozomu nebo s narušenou integritou akrozomální membrány fluorescenci v apikální části nevykazují. Pro stanovení integrity akrozomu spermií ve vzorku je rozhodující procentuální zastoupení spermií s fluorescenčně označeným akrozomem, které představují funkční spermie schopné oplození. Kvalitní inseminační dávky vykazují četnost PSA-pozitivních spermií nad 90%.

Příklady spermií s pozitivní a negativní reakcí na vazbu PSA-FITC jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1. Příklady spermií býka s pozitivní a negativní reakcí na test integrity akrozomální membrány. Šipkou je označena spermie bez intaktního akrozomu a tudíž bez fluorescenčního signálu PSA-FITC.

IV. Srovnání novosti postupů

V inseminačních stanicích býků se při hodnocení kvality spermií v současné době většinou provádí jen základní stanovení koncentrace a motility spermií, ať již v nativním ejakulátu nebo v kryokonzervovaných inseminačních dávkách. Tyto analýzy však podávají pouze částečné informace o funkčních vlastnostech spermií a o jejich reakci na kryokonzervaci.

Tato aktualizovaná metodika kombinuje postupy známé v oblasti lidské reprodukční medicíny (WHO 2021) a u hospodářských zvířat (Věžník a kol. 2004). Pro vizualizaci akrozomu využívá fluorescenčně značený lektin *Pisum sativum* (PSA-FITC). Celkově se jedná o rychlou a spolehlivou metodu, která nevyžaduje dlouhodobou praxi a zkušenosti při hodnocení, jako je tomu u podrobného morfologického vyšetření spermií. Optimalizace metodiky pro vyšetření inseminačních dávek skotu spočívá především ve využití netoxického fixačního činidla (96% etanol v kyvetě) místo tradiční fixace směsí metanol:aceton 1:1 nebo 4% roztokem formaldehydu, kdy se fixační činidlo nechávalo odpařit

do prostoru. Není tak nutná práce v digestoři a nedochází k ohrožení zdraví pracovníků. Zásobní roztok PSA-FITC se připravuje rozpuštěním v běžném PBS pufru místo dříve využívaného roztoku (HEPES/NaCl/Ca+/NaN_3/Mn+) (Věžník a kol. 2004). Pro hodnocení preparátů metodika navíc nově využívá protizhášecí medium (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium), které stabilizuje fluorescenční signály a zabraňuje jejich vybledávání, ať již při skladování nebo přímo při hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu.

V. Popis uplatnění metodiky

Popsaná metodika nalezne uplatnění v podnicích zaměřených na chov plemenných býků a produkci inseminačních dávek a v laboratořích provádějících hodnocení kvality semene. Umožní získat nadstavbové informace o kvalitě produkovaných inseminačních dávek a poskytne i podklady pro případnou negativní selekci býků, jejichž spermie se vyznačují zvýšenou citlivostí k mražení. Metoda je po otestování využitelná i pro jiné druhy hospodářských a zájmových zvířat. Může být provedena v laboratoři, která disponuje potřebným technickým vybavením pro práci se živými spermiemi a fluorescenčním mikroskopem se zvětšením minimálně 400x.

VI. Ekonomické aspekty

V rámci metodiky byla zoptimalizována technika pro hodnocení integrity akrozomu u spermií býků, které prošly procesem kryokonzervace. Otestovaná optimalizace přináší mimo jiné odbourání nutnosti použití nebezpečných toxických látek a zjednodušení přípravy používaných roztoků. Tím odbourává rizika pro provádějící pracovníky a zátěž pro životní prostředí a zjednodušuje provedení metody. Implementace metodiky jako nadstavbového nástroje hodnocení kvality inseminačních dávek skotu pak poskytne možnost lépe posoudit fertilizační potenciál inseminačních dávek a efektivněji řídit využívání býků v chovu. Díky selekci kvalitních dávek lze zvýšit pravděpodobnost úspěšného zabřeznutí a snížit počet inseminací nutných pro dosažení březosti. To se následně promítne do úspor nákladů

spojených s nadměrným prodlužováním servis periody a mezidobí apřispěje k optimalizaci produkčního cyklu – ať už jde o udržení kontinuální mléčné užitkovosti, nebo zkrácení neproduktivních intervalů u masných plemen. Včasné vyřazení jedinců se sníženou odolností spermií vůči mražení také umožní zlepšení genofondu býků aktivně využívaných k inseminaci. Ekonomické aspekty nelze přesně vyčíslit, neboť záleží na aktuálních kvalitativních parametrech sledovaných býků a kryokonzervovaných inseminačních dávek.

VII. Seznam citované literatury

Přinosilová P, Kopecká V, Hlavicová J, Kunetková M. Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. Acta Vet. Brno 2014, 83:313-319.

Věžník Z, Švecová D, Zajícová A, Přinosilová P. Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. 2024. VÚVeL, Brno, Česká republika.

WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th eddition, WHO Press, Geneva Switzerland. ISBN: 978 92 4 0030787. 2021

VIII. Seznam publikací předcházejících metodice

Vozdová M, Kopecká V, Hojer J. Nové metody hodnocení kvality spermií pro zlepšení úspěšnosti inseminace. Náš chov 2023;12:20-22.

IX. Dedikace

Metodika vznikla na v rámci řešení projektu Národní Centrum Biotechnologií ve Veterinární Medicíně - NaCeBiVet, registrační číslo projektu TN02000017.

X. Jména oponentů

Ing. Jan Vodička, PhD. Ministerstvo zemědělství, Odbor živočišných komodit a ochrany zvířat, Těšnov 65/17, 110 00 Praha

Prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chovu a šlechtění zvířat, Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

XI. Podíl práce

Mgr. Miluše Vozdová, Ph.D. – 50 %

RNDr. Věra Kopecká, Ph.D. – 50 %