

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Vliv mrazicí křivky na kvalitativní charakteristiky
beraního semene po kryokonzervaci**

Diplomová práce

**Bc. Jakub Beránek
Reprodukční biotechnologie**

Vedoucí práce: Ing. Martin Ptáček, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv mrazicí křivky na kvalitativní charakteristiky beraního semene po kryokonzervaci" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce, s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za poskytnutí odborných rad, věcné připomínky a za veškerý čas, který mi věnoval. Také bych rád poděkoval Ing. Filippu Savvulidimu a Ing. Anežce Málkové, za veškerou pomoc, kterou mi poskytli v laboratoři během průběhu experimentů, v rámci této práce. V neposlední řadě bych také chtěl poděkovat své rodině, blízkým, přátelům a spolužákům za podporu a motivaci během studia.

Vliv mrazicí křivky na kvalitativní charakteristiky beraního semene po kryokonzervaci

Souhrn

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv mrazicí křivky na oplozovací schopnost spermií malých přežvýkavců. V průběhu experimentu se naskytla možnost využít k této práci i kozla, a proto byly hodnoceny vzorky od dvou beranů a jednoho kozla.

Oplozovací schopnost spermií byla měřena pomocí průtokové cytometrie. Oplození schopná spermie byla definována jako spermie s nepoškozenou cytoplazmatickou membránou, nepoškozeným akrozomem a s aktivními mitochondriemi. Dále byly hodnoceny vlivy na tyto jednotlivé parametry. Hodnocení bylo provedeno u spermatu po ekvilibraci a po rozmrazení.

Byla porovnávána konvenční metoda, využívaná pro mrazení inseminačních dávek malých přežvýkavců, 4 cm nad hladinou tekutého dusíku (křivka I), s různými modifikacemi řízeného poklesu teploty, který byl regulován vzdáleností pejet od hladiny (průměrná rychlost poklesu teploty u mrazicí křivky II: $17\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, III: $12\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, IV: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, V: $7\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$). Pro mrazení byl využit polystyrenový box, který byl modifikován k tomu, aby toto bylo možné.

Oplozovací schopnost spermií po kryokonzervaci byla při použití mrazicí křivky II, III, IV a V bez průkazného rozdílu. Vliv křivky na jednotlivé sledované parametry nebyl statisticky významný rozdíl, pouze při použití mrazicí křivky II bylo naměřeno statisticky významně nižší poškození akrozomu ($59,28 \pm 0,91\%$).

Jako průkazně horší se jeví metoda, při které bylo sperma v pejetách mrazeno 4 cm nad hladinou tekutého dusíku. Při tomto postupu si oplozovací schopnost zachovalo průměrně $4,79 \pm 0,45\%$ spermií. Poškozenou cytoplazmatickou membránu mělo $84,97 \pm 0,41\%$, poškozený akrozom $73,34 \pm 0,68\%$ a nízkou mitochondriální aktivitu $85,57 \pm 0,55\%$ spermií.

Klíčová slova: sperma, kryokonzervace, mrazicí křivka, průtoková cytometrie

Impact of freezing curve on qualitative characteristics of cryoconserved ram sperm

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of the freezing curve on the fertilizing competence of small ruminant sperm. During the experiment it was possible to also use a buck for this thesis, and therefore samples from two Wallachian rams and one Anglo-Nubian goat buck were evaluated.

Sperm fertilizing competence was measured by flow cytometry after sperm equilibration and after thawing. Fertilizing competent spermatozoa was defined as spermatozoa with an intact cytoplasmic membrane, an intact acrosome, and high mitochondrial activity. The effect of the freezing curve on these individual parameters was also evaluated.

Conventionally, the sperm from small ruminants are cryopreserved in plastic cryostraws by their exposition to the vapors of liquid nitrogen at the distance of 4 cm above the liquid nitrogen surface. In the present study, the freezing curve („Curve I“) specific for the conventional method of the cryopreservation of insemination doses from small ruminants was precisely measured. This curve was compared with several different freezing curve modifications. For freezing curve modification, the distance from liquid nitrogen surface was set so, that the average freezing rate of „Curve II“ was $17\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, for „Curve III“: $12\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, for „Curve IV“: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, and for „Curve V“: $7\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$.

Statistically, there was no significant difference observed between the sperm fertilizing competence after cryopreservation using the freezing curves II, III, IV, and V. Between these curves, there was no statistically significant difference observed for the impact of the freezing curve on the individual monitored parameters. This except for the freezing curve II, for which significantly lower acrosome damage was observed ($59.28 \pm 0.91\%$).

The sperm fertilizing competence after cryopreservation using the freezing curve I was significantly lower if compared to any curve modification. For freezing curve I, an average of $4.79 \pm 0.45\%$ of sperm fertilizing competence was observed. Furthermore, for freezing curve I, there was $84.97 \pm 0.41\%$ of spermatozoa with the damaged cytoplasmic membrane, $73.34 \pm 0.68\%$ with the damaged acrosome, and $85.57 \pm 0.55\%$ of sperm with the low mitochondrial activity.

Keywords: cryopreservation, freezing curve, flow cytometry, sperm

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Vědecká hypotéza a cíl práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Anatomie pohlavních orgánů	11
3.2	Sperma	11
3.2.1	Spermie	11
3.2.2	Semenná plasma	12
3.3	Odběr spermatu	12
3.3.1	Umělá vagina	12
3.3.2	Elektroejakulace	12
3.3.3	Odběr epididimálních spermií post-mortem	13
3.4	Hodnocení spermatu	13
3.4.1	Makroskopické hodnocení spermatu	13
3.4.2	Mikroskopické hodnocení spermatu	14
3.4.3	Hypoosmotický test (HOST)	14
3.4.4	Tepelný test přežitelnosti	15
3.4.5	CASA.....	15
3.4.6	Hodnocení spermatu pomocí průtokové cytometrie	16
3.4.6.1	Průtoková cytometrie a její princip	16
3.4.6.2	Odstranění nespermatických částí.....	17
3.4.6.3	Hodnocení životaschopnosti spermií a poškození membrány	17
3.4.6.4	Mitochondriální aktivita	17
3.4.6.5	Integrita akrozomu	18
3.4.6.6	Poškození DNA.....	18
3.4.6.7	Hodnocení koncentrace s využitím průtokové cytometrie	18
3.4.7	Sexace spermií	18
3.5	Faktory ovlivňující parametry spermatu.....	19
3.5.1	Sezónnost	19
3.5.2	Metoda odběru	19
3.5.3	Věk	19
3.5.4	Frekvence odběru	20
3.5.5	Zdravotní stav	20

3.5.6	Tělesná kondice	20
3.5.7	Dědičnost.....	21
3.6	Zpracování spermatu	21
3.6.1	Ředění.....	21
3.6.2	Chlazení.....	22
3.6.3	Ekvilibrace.....	22
3.6.4	Kryokonzervace	22
3.6.5	Lyofilizace	22
3.6.6	Vitrifikace.....	23
3.6.7	Rozmrazení	23
3.7	Umělá inseminace	24
3.7.1	Vaginální inseminace	24
3.7.2	Intracervikální inseminace.....	24
3.7.3	Transcervikální intrauterinní inseminace	24
3.7.4	Laparoskopická inseminace.....	24
4	Materiál a metodika	25
4.1	Charakteristika plemeníků	25
4.2	Odběr a zpracování.....	25
4.3	Hodnocení vzorků před mrazením	26
4.4	Mrazení.....	26
4.5	Rozmrazení a hodnocení vzorků.....	28
4.6	Statistická analýza dat	28
5	Výsledky	30
5.1	Základní statistické údaje	30
5.2	Procentuální zastoupení oplození schopných spermií po kryokonzervaci	31
5.2.1	Popis modelu	31
5.2.2	Vliv jednotlivých faktorů	31
5.2.2.1	Vliv odběrového dne	31
5.2.2.2	Vliv druhu.....	32
5.2.2.3	Vliv plemeníka v rámci druhu	32
5.2.2.4	Vliv mrazicí křivky	33
5.3	Procentuální zastoupení spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou, poškozeným akrozomem a nízkou mitochondriální aktivitou po kryokonzervaci.....	34

5.3.1	Popis modelů.....	34
5.3.2	Vliv jednotlivých faktorů.....	34
5.3.2.1	Vliv odběrového dne	34
5.3.2.2	Vliv druhu	35
5.3.2.3	Vliv plemeníka v rámci druhu	35
5.3.2.4	Vliv mrazicí křivky	36
6	Diskuze.....	38
7	Závěr	42
8	Seznam použité literatury.....	43
9	Samostatné přílohy.....	52
9.1	Příloha č. 1: Nastavení softwaru pro analýzu průtokovým cytometrem	52
9.2	Příloha č. 2: Jednotlivé odběrové dny	57
9.3	Příloha č. 3: Úplné výsledky	58

1 Úvod

Ovce a kozy jsou jedním z nejstarších druhů hospodářských zvířat. Díky jejich chovu může člověk využívat jejich produkty, jako je například mléko, maso, vlnu, nebo kůži.

V České republice, v porovnání s ostatními odvětvími živočišné produkce není počet chovaných ovcí a koz tak vysoký. K 1.4.2020 zde bylo chováno 203 612 kusů ovcí a 28 919 koz.

Pro dosažení vysoké produkční úrovně jsou důležité výborné reprodukční ukazatele. Jedním z důležitých faktorů jsou dobří plemeníci, kteří jsou využíváni pro přirozenou plemenitbu, nebo pro výrobu inseminačních dávek.

V chovech ovcí a koz se využívá spíše přirozená plemenitba a umělá inseminace v tomto odvětví není dostatečně optimalizována, jak tomu je například u skotu nebo prasat. Každé nové poznatky jsou v tomto směru velmi přínosné.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Hypotézou je předpoklad, že různý pokles teploty při kryokonzervaci semene beranů ovlivňuje jeho kvalitativní charakteristiky.

Využití biotechnologických metod u malých přežvýkavců je velmi omezené. Proto všechny informace vedoucí ke zlepšení dílčích postupů jsou důležité pro potenciální rozvoj tohoto odvětví. Průběh kryokonzervace je zásadně dán poklesem teploty v průběhu mrazení. Předmětem diplomové práce bude optimalizovat mrazicí křivku s ohledem na následné ukazatele kvality ejakulátu u vybraných plemenů.

3 Literární rešerše

3.1 Anatomie pohlavních orgánů

Anatomie pohlavní soustavy beranů a kozlů je podobná jako u ostatních přežvýkavců. Je tvořeny varlaty, vývodnými cestami, přídatnými pohlavními žlázami a penisem (Pugh a Baird, 2012).

Varlata mají vejčitý tvar s postranním zploštěním. Hmotnost obou varlat dospělých samců se pohybuje v rozmezí 200–400 g. Dosahují délky přibližně 10 cm (Marvan, 2007; Pugh a Baird, 2012). Pro spermatogenezi je nutné, aby teplota varlat byla o několik stupňů nižší, než je tělesná teplota. Z toho důvodu jsou uložena mimo pánevní dutinu, v šourku (Hafez a Hafez, 2000). U přežvýkavců je šourek uložen ve stydké krajině, mezi stehny. Má lahvovitý tvar a je při u své báze zřetelně zaškrncený. Varlata jsou v něm uložena ve svislé poloze (Jelínek a Jelínek, 2002; Marvan, 2007).

Odvodné tubuly se sbíhají a tvoří nadvarle. Zde dochází k dozrávání spermií a jejich uskladnění. Nadvarlata jsou tvořena celkem ze tří částí – hlavy, těla a ocasu. Hlava leží na dorzokaudálním konci nadvarlete. Ocas, který vzniká rozšířením těla nadvarlete, je možné najít na opačném pólu. Celé nadvarle má strukturu zakroucené trubice a může dosahovat délky až 70 m (Hafez a Hafez, 2000; Yungquist a Threlfall, 2007).

Hlava nadvarlete volně přechází v chámovod. Ten má tvar trubice a na svém konci ústí do močové trubice. V pánevním úseku se u přežvýkavců chámovody rozšiřují a vytváří ampule chámovodu. Tyto žlázy produkují sekret hlenovité konzistence (Marvan, 2007).

Do vývodných cest ústí přídatné pohlavní žlázy. U malých přežvýkavců je možné najít semenné vajíčky, prostatu i bulbouretrální žlázy (Pugh a Baird, 2012).

Penis je fibroelastického typu. Dosahuje délky 30–50 cm a je poměrně tenký. Pokud je v klidovém stavu, vytváří přibližně v polovině své délky esovitou kličku. Na žaludu vystupuje močová trubice na povrch a vytváří několikacentimetrový výběžek. (Bonet, 2013; Marvan, 2007; Pugh a Baird, 2012). Tento výběžek se může při ejakulaci pohybovat a díky tomu rozptýlit sperma po celé oblasti děložního krčku (Reece, 2009).

3.2 Sperma

Sperma je tekutá buněčná suspenze, která obsahuje spermie a semennou plazmu, je produktem žláz samčího reprodukčního traktu (Hafez a Hafez, 2000). Sperma malých přežvýkavců je charakteristické malým objemem a velkou koncentrací spermií (Maxwell and Evans, 1987).

3.2.1 Spermie

Spermie vznikají v semenotvorných kanálcích varlat a jsou konečným produktem spermatogeneze. Ta v sobě zahrnuje mitotické dělení, meiotické dělení a následné dozrávání (Plant a Zeleznik, 2014). Ze spermatogonie vznikne jedna stejná buňka, která zůstává uložena na svém původním místě a druhá, která se nazývá spermatogonie typu A. Spermatogonie A se dále mitoticky dělí po několik generací, až z nich vznikají spermatogonie typu B, které se posledním meiotickým dělením přemění na primární spermatocyty s počtem chromozomů 2n. Ty se meioticky dělí na spermatidy s haploidním počtem chromozomů (Reece, 2009).

Spermatidy se v blízkosti lumen kanálku postupně z nepohyblivých buněk přeměňují na potenciálně pohyblivé, s již vytvořeným bičíkem. Dozrálé spermatidy jsou uvolněny do lumen semenotvorných kanálků jako spermie. Tyto ještě nepohyblivé spermie jsou pomocí kontraktilních elementů a tekutiny, jež je secernována semenotvornými kanálky, transportovány do nadvarlat, kde následně získávají schopnost se pohybovat (Noakes a kol., 2001; Youngquist a Threfall, 2007).

Spermie se skládá ze dvou hlavních částí, hlavičky a bičíku. Hlavička má oválný tvar a je zploštělá. Uvnitř ní je kondenzovaný chromatin, obsahující DNA. Přední část hlavičky je pokryta akrozomem. Akrozom má strukturu dvojité membrány a obsahuje enzymy, které se podílí na fertilizaci. Bičík se skládá z krčku, střední, hlavní a koncové části. Obsahuje mitochondrie a cytoskeletární struktury, díky nimž se spermie může pohybovat (Hafez a Hafez, 2000).

3.2.2 Semenná plasma

Semenná plasma je tekutou složkou spermatu. Je produktem přídatných pohlavních žláz, varlat a nadvarlat. Zajišťuje pro spermie ochrannou funkci, slouží jako tekuté médium, obsahuje zdroje energie pro metabolismus spermií, udržuje osmotický tlak, obsahuje ionty a další chemické látky, spojené s fertilizací (Hafez a Hafez, 2000; Juyena a Stelletta 2011; Youngquist a Threfall, 2007).

3.3 Odběr spermatu

3.3.1 Umělá vagina

Odběr spermatu pomocí umělé vaginy je u přežvýkavců hojně využívaná metoda. Při jejím použití je možné odebrat sperma, jehož kvalita je srovnatelná s kvalitou spermatu při přirozené plemenitbě (Abril-Sánchez a kol., 2019).

Zařízení se skládá z vnějšího pouzdra, které je vyrobené z tvrdého plastu a vnitřní gumové vložky. Vnitřní vložka se vloží do pouzdra a vytvoří hladkou trubici bez záhybů. Vzniklý prostor se naplní vodou, jejíž teplota by při odběru měla být 40–42 °C. Strana, kde dochází k vniknutí penisu je vhodné nalubrikovat látkou, která nemá spermicidní účinek. Na opačný konec se připevní sběrná zkumavka (Romano a Christians, 2009).

V závislosti na výrobci mohou mít sběrná zařízení různé rozměry (např. 110 x 55 mm, 200 x 58 mm). Z důvodu zamezení ztrát odebíraných vzorků způsobených ulpěním na vnitřní vložce, se doporučuje použít vaginu s kratšími rozměry (Romano a Christians, 2009).

3.3.2 Elektroejakulace

Při elektroejakulaci se sperma získává pomocí rektální sondy s elektrodami, která je zavedena do konečníku. Tyto elektrody vydávají elektrické impulzy, které dráždí nervy inervující orgány pohlavní soustavy. To vyvolává erekci penisu a následnou ejakulaci (Brindley, 1981). Při aplikaci by elektrody měly být orientovány ventrálně. Velikost sond se může podle typu lišit, ale obvykle se velikost pohybuje přibližně 22 cm na délku a průměr 2,4 cm. Zařízení vydává elektrické stimuly v několikasekundových intervalech. Obvykle je dostačující napětí do 10 V. Je možné aplikovat stimuly o určitém napětí, nebo ho postupně navyšovat, dokud beran neejakuluje (Ledesma a kol. 2018; Damián a Ungerfeld, 2010).

Před odběrem je nutné rectum zbavit výkalů a očistit oblast předkožky (Jiménez-Rabadán a kol., 2016).

Výhodou je možnost odběru spermatu od zvířat, u kterých nelze použít umělou vaginu. Jsou to například samci divokých druhů, samci mimo chovnou sezonu u druhů, které vykazují sezónní sexuální aktivitu, nebo samci, kteří na odběr pomocí umělé vaginy nejsou naučeni (Abril-Sánchez a kol., 2019; Lincoln a Davidson, 1977; Wulster-Radcliffe et al., 2001; Santiago-Moreno et al., 2009).

Problémem této techniky je v bolestivosti, kterou může působit elektrický proud. U zvířat lze pozorovat fyziologické procesy, typické pro stresové situace, svalové křeče, jejich poškození a hlasové projevy spojené s bolestí (Abril-Sánchez a kol., 2017; Malejane a kol., 2014). Aby se alespoň částečně předešlo těmto problémům, je možné použít anestezii (Abril-Sánchez a kol., 2019).

3.3.3 Odběr epididimálních spermií post-mortem

Touto metodou se spermie odebírají z ocasu nadvarlete. Je nutné vzorky zpracovat co nejdříve po smrti zvířete. V případě, že to není možné, varlata se zchladí na teplotu 4,5–6 °C (Wachida a kol., 2019).

Pomocí skalpelu se provede několik malých řezů, které umožní získání vzorku. Ten je následně shromážděn do ředidla (Abu a kol., 2016). Pro omezení kontaminace je vhodné, aby vzorek neobsahoval krev, její sraženiny a cizí tkáně. Je vhodné vyhnout se řezům skrze cévy, popřípadě z nich předem odstranit krev (Álvarez a kol., 2012; Kaabi a kol., 2003).

Odběr epididimálních spermií je možnost, jak získat genetický materiál geneticky cenných zvířat, nebo zvířat ohrožených druhů, která náhle zemřela (Hajihassani a kol., 2019).

Při správném zacházení s materiálem je možné s těmito vzorky provádět umělou inseminaci až 48 hodin po smrti zvířete (Wachida a kol., 2019).

3.4 Hodnocení spermatu

3.4.1 Makroskopické hodnocení spermatu

Při makroskopickém hodnocení spermatu se posuzuje zejména jeho barva, objem, zápach a přítomnost cizích příměsí (Gamčík a Kozumplík., 1992).

Sperma beranů by mělo mít mléčně krémovou barvu. Sperma kozlů může být také lehce našedlé, nebo nažloutlé. Odstíny červené barvy signalizující přítomnost krve a mohou diagnostikovat zdravotní problémy. Konzistence a barva také závisí na koncentraci spermií (Hafez a Hafez, 2000).

Objem spermatu odebraného od dospělého berana by měl dosahovat 0,5–2 ml, u mladých zvířat 0,5–0,7 ml. U kozlů je objem spermatu 0,5–1,2 ml. Množství může být ovlivněno metodou odběru, kondicí zvířete, ročním obdobím, zkušeností odebírající osoby a frekvencí odběru. Sperma odebrané pomocí elektroejakulace většinou dosahuje většího objemu a může být znečištěno močí (Hafez a Hafez, 2000).

Odebrané sperma může být znečištěno chlupy, předkožkovými nečistotami, vazelínou, kožními parazity, prachem, pískem, krví, močí, nebo hnisem. K dalšímu využití je vhodné zpracovat sperma bez znečištění (Gamčík a Kozumplík., 1992).

3.4.2 Mikroskopické hodnocení spermatu

Při mikroskopickém hodnocení spermatu posuzujeme jeho koncentraci, motilitu spermií, vířivý pohyb a morfologické vady (Hafez a Hafez, 2000).

Koncentrace spermatu by se měla pohybovat v rozmezí $3,5 \times 10^9$ až 6×10^9 spermií v cm^3 u beranů a $2,5 \times 10^9$ až 5×10^9 spermií v cm^3 u kozlů. Koncentraci je možné určit různými metodami. Jednou z nejpřesnějších je stanovení koncentrace pomocí hematocytometru. Tato metoda může být časově náročná. Další možností je spektrofotometr, který byl kalibrován podle hematocytometru. Výhodou je jeho přesnost a rychlost (Hafez a Hafez, 2000). Lze ji také měřit pomocí průtokového cytometru (Martínez-Pastor a kol., 2010).

Motilita se nejčastěji posuzuje pomocí světelného mikroskopu při 200 až 400násobném zvětšení u naředěného vzorku. V kvalitním vzorku by mělo být 70–90 % pohyblivých spermií. Pro hodnocení byla vyvinuta počítačová analýza spermatu (CASA), která dokáže objektivně hodnotit množství parametrů (Hafez a Hafez, 2000).

Vířivý pohyb je pozorován na kapce čerstvého spermatu o objemu 5 μl , nanesené na předehřáté podložní skličko při nízkém zvětšení mikroskopu. Lze pak vidět shluky spermií, které se pohybují ve vlnách. Tento pohyb je hodnocen na stupnici 0–5 (0 – žádný vířivý pohyb, 1 – individuální pohyb, 2 – velmi pomalý pohyb, 3 – pomalý pohyb, 4 – středně rychlý pohyb, 5 – velmi rychlý pohyb) (David a kol., 2015).

Morfologické vady spermií je možné rozlišit na dva typy – primární a sekundární. Primární změny vznikají během spermatogeneze, až do příchodu spermií do nadvarlete. Mezi tyto změny můžeme zařadit degenerativní formy spermií, změny tvaru hlavičky, akrozomu, bičíku a mnoho dalších vývojových anomálií. Sekundární změny vznikají při příliš dlouhém pobytu spermií v nadvarleti, během ejakulace ve vývodných cestách, špatnou manipulací a přípravou vzorku. Mezi tyto změny patří změny hlavičky, akrozomu a bičíku (Gamčík a Kozumplík., 1992).

Mezi morfologickými vadami a fertilitou zvířat existuje korelace. Sperma s obsahem abnormálních spermií přesahující 15 %, by nemělo být využíváno pro umělou inseminaci. Nejmenší množství morfologických abnormalit je možné pozorovat během rozmnožovacího období (Hafez a Hafez, 2000).

3.4.3 Hypoosmotický test (HOST)

Integrita plasmatické membrány je zásadní pro životnost spermie a její fertilizační schopnost. Hypoosmotický test slouží k jejímu hodnocení (Leboeuf a kol., 2006). Pokud je spermie vystavena hypotonické prostředí, reaguje stočením membrány a bobtnáním. Procento těchto spermií naznačuje množství spermií s neporušenou membránou (Ramu a Jeyendran, 2013).

Jako hypoosmotické prostředí je možné použít roztok citrátu sodného a fruktózy. U beranů je doporučené hodnocení testu po 30 minutách (Nalley a Arifiantini, 2014).

3.4.4 Tepelný test přežitelnosti

Tento test hodnotí dlouhodobou přežitelnost spermií při teplotě 37 °C. Touto teplotou jsou simulovány podmínky v reprodukčním traktu samice (Sonar a kol., 2014). K projevům poškození spermií vlivem kryokonzervace nemusí dojít ihned po rozmrazení. Kumar a kol. (2009) hodnotili vliv inkubace na beraní sperma. Vzorčky byly hodnoceny 0, 1, 2, 3 a 4 hodiny po rozmrazení. S přibývajícím časem se parametry motility a integrity akrozomu zhoršovaly.

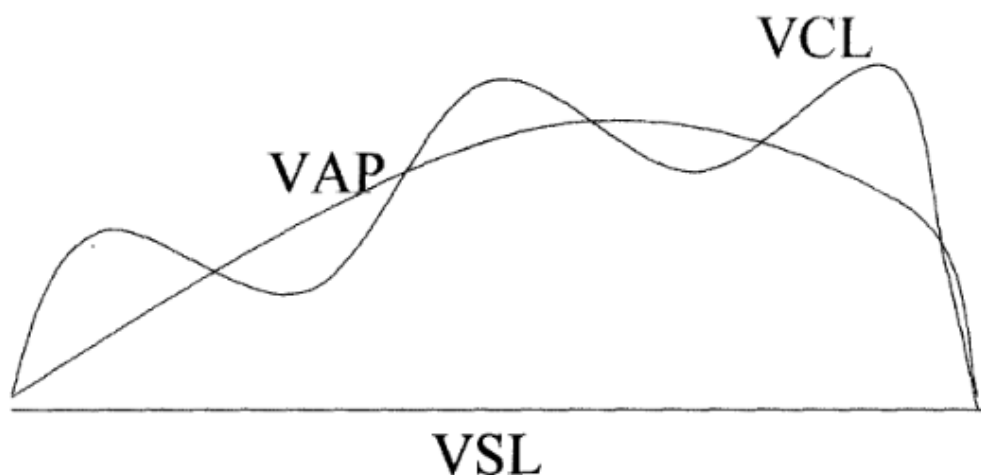
3.4.5 CASA

CASA (computer assisted sperm analysis) je systém, který se skládá z mikroskopu, kamery a počítače se softwarem, který zpracovává pořízené snímky (Talarczyk–Desole a kol., 2017).

Tímto způsobem lze zkoumat koncentraci, motilitu a morfologii spermií. Výhodou je, že rozbor je více objektivní a přesný než při hodnocení člověkem. Během krátkého časového intervalu dokáže analyzovat velké množství spermií. Nevýhodou tohoto systému je vyšší pořizovací cena a nutnost standardizace parametrů přístroje pro daný druh před použitím. Na přístroji je možné nastavit frekvenci pořizování snímků (15–60 Hz), zvětšení mikroskopu, velikost sledovaných objektů, které budou vyhodnoceny jako hlavička spermií, počet a velikost sledovaných polí (Tsakmakidis, 2010).

Analýzou motility je možné vyhodnotit křivkovou rychlost (VCL), což je průměrná rychlost měřená na dráze, kterou spermie urazí z bodu A do bodu B, průměrnou rychlost (VAP), průměrnou přímočarou rychlost (VSL), která představuje průměrnou rychlost měřenou na přímce z bodu A do bodu B, amplitudu posunutí hlavičky v μm (ALH), frekvenci, se kterou hlavička spermie protne průměrnou dráhu spermie (BCF). Z těchto hodnot lze vypočítat přímost (STR; $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$ v procentech) a linearitu (LIN; $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$ v procentech) (Verstegen a kol., 2002).

Olivares a kol. (2017) při svém experimentu s beráním spermatem měli parametry přístroje nastavené na 25 snímků za sekundu, stonásobné zvětšení mikroskopu. Rozbor byl prováděn pod podložním sklíčkem 24×24 mm, ve vzorku o objemu 10 μl . Hodnocena byla tři zorná pole. Plocha objektů, kterou počítač vyhodnotil jako hlavičku spermie, byla 18–60 μm^2 . Vzorek byl při analýze udržován při teplotě 37 °C. Dle VCL byly spermie zařazovány do skupin, pod 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ byly klasifikovány jako nepohyblivé, 10–45 $\mu\text{m}/\text{s}$ středně pohyblivé a rychlé, nad 75 $\mu\text{m}/\text{s}$. Jako spermie s progresivním pohybem byly klasifikovány ty, které dosahovaly STR nad 80 %.



Obrázek č. 1: Parametry motility v systému CASA

Zdroj: Verstegen a kol., 2002.

3.4.6 Hodnocení spermatu pomocí průtokové cytometrie

3.4.6.1 Průtoková cytometrie a její princip

Průtoková cytometrie je relativně nová a rychle se rozvíjející technologie, která umožňuje rychlou, více parametrickou analýzu až desítek tisíc buněk, které jsou rozptýleny v roztoku. Je to výkonný nástroj, který nachází uplatnění v širokém spektru oborů, jakými jsou např. cytologie, virologie, molekulární biologie a různá odvětví medicíny, včetně andrologie (Brito a kol., 2016; Mandy a kol., 1995; McKinnon, 2018).

Průtokový cytometr se skládá z tří hlavních částí: fluidiky, optiky a elektroniky. Pro analýzu je nutné, aby byly buňky rozptýleny v tekutině, která je pod tlakem vstříkována na místo, kde je vzorek analyzován.

Optika se skládá ze soustavy laserů, filtrů a detektorů. Lasery vyzařují záření o určité vlnové délce. Moderní průtokové cytometry obsahují více laserů, které produkují světlo různých vlnových délek. Nejčastěji se používají lasery, které vyzařují světlo o vlnové délce 488 nm (modrá), 405 nm (fialová), 532 nm (zelená), 552 nm (zelená), 561 nm (žlutozelená), 640 nm (červená) a 355 nm (ultrafialová).

Každá částice je pak analyzována na rozptyl světla a jeden nebo více nebo více parametrů fluorescenčních emisních signálů. Měření fluorescence je možné díky označení buněk fluorescenčními barvivy, fluorescenčně konjugovanými protilátkami, nebo díky expresi fluorescenčních proteinů. Při průchodu buňky skrz paprsek laseru je měřen rozptyl světla ve dvou různých směrech, v přímém (Forward Scatter-FSC) a bočním (Side Scatter-SSC), pod úhlem 90 °. Díky přímému rozptylu je možné měřit relativní velikost buňky, pomocí analýzy bočního rozptylu můžeme určit strukturu a členitost povrchu buňky. Vícelaserové systémy jsou schopny měřit až 20 různých parametrů (Brito a kol., 2016; Hossain a kol., 2011; Mandy a kol., 1995; McKinnon, 2018).

Rutinní používání průtokové cytometrie je však omezeno vysokou pořizovací nákladností, potřebou zkušeného operátora a relativně složitou přípravou vzorků a vyhodnocení dat. To v současné době vede k použití této techniky především pro výzkumné

účely. Použití ve velkých střediscích ovšem v posledních letech začíná vzrůstat (Brito a kol., 2016).

3.4.6.2 Odstranění nespermatických částí

Jedním z hlavních problémů, se kterým je možné se setkat během analýzy spermatu pomocí průtokového cytometru, je přítomnost nespermatických částic. Mohou to být bakterie, krvinky, epytelární buňky, různé cizorodé částice a znečištění, nebo součásti ředidla (např. vaječný žloutek).

Je několik možností, jak tyto částice z analýzy odstranit. Mohou vykazovat rozdílný FSC nebo SSC v důsledku rozdílné velikosti a tvaru. Další možností je využít fluorescenčních barviv, která se vážou na DNA, jako je např. Hoechst 33342 nebo kombinace SYBR-14 a propidium iodid (PI) (Martínez-Pastor a kol., 2010).

3.4.6.3 Hodnocení životaschopnosti spermií a poškození membrány

Hodnocení životaschopnosti spermií pomocí fluorescenčního barvení a průtokové cytometrie je možné dvěma způsoby. Použitím barviv pro označení mrtvých, nebo živých buněk. Integrita plazmatické membrány je brána jako předpoklad k tomu, že je buňka živá (Gillan a kol., 2005).

Mezi nejčastěji používané barvivo, které barví poškozené buňky, je propidium jodid (PI) (Dolník a kol., 2019). Toto barvivo se váže na buněčnou DNA, kterou barví na červeně, je schopno procházet do buňky jen pokud je plazmatická membrána poškozena (Oldenhof a kol., 2011).

Do životaschopných, metabolicky aktivních buněk jsou schopna pronikat např. barviva karboxyfluorescein diacetát (CFDA) nebo SYBR-14. Takto označené buňky pak emitují zelené světlo (Dolník a kol., 2019).

Kombinací barviv je možné rozlišit tři typy buněk. Živé spermatické buňky, emitující zelené světlo v důsledku přítomnosti CFDA nebo SYBR-14, mrtvé buňky, emitující červené světlo vlivem PI a poškozené buňky, které emitují oba typy fluorescence (Magistrini a kol., 1997).

3.4.6.4 Mitochondriální aktivita

Mezi první barviva, hodnotící mitochondriální aktivitu byl Rhodamin 123 (R123). Hromadí se v mitochondriích a jeho intenzita závisí na počtu funkčních mitochondrií (Hossain a kol., 2011).

Dalším často používaným barvivem je 5,5,6,6-tetrachlor-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylkarbocyanin jodid (JC-1). Díky tomuto barvivu jsou spermatické buňky se sníženou mitochondriální aktivitou jsou vizualizovány zeleně a vysoce mitochondriálně aktivní buňky červeně (Dolník a kol., 2019).

Barviva MitoTracker jsou skupinou barviv, hromadí se v aktivních mitochondriích, které barví. Jsou vysoce specifické a dostupné v širokém rozsahu emisního spektra (MitoTracker Green, MitoTracker Red FM, MitoTracker Red CM-H2TMRos a MitoTracker Deep Red FM) (Martínez-Pastor a kol., 2010).

3.4.6.5 Integrita akrozomu

Jednou z nejběžnějších metod hodnocení integrity akrozomu je použití rostlinných lektinů, které se vážou na skupiny sacharidů v akrozomální struktuře. Tyto látky nemohou projít nepoškozenou membránou akrosomu a obarveny jsou tedy pouze spermie s poškozeným akrozomem (Dolník a kol., 2019).

Mezi nejvyužívanější lektiny patří aglutinin semen podzemnice olejné (PNA), nebo hrachu (PSA) (Tao a kol., 1993). Tyto lektiny jsou fluorescenčně označeny, například zeleným fluorescein isothiokyanátem (FITC), nebo oranžovým fykoerythrinem (PE) (Martínez-Pastor a kol., 2010; Nagy a kol., 2003).

3.4.6.6 Poškození DNA

Míru poškození DNA je možné hodnotit pomocí testu struktury chromatinu spermií (sperm chromatin structure assay–SCSA). Pro SCSA se využívá barviva akridinové oranže a jeho posunu fluorescence od zelené k červené. Nativní dvouřetězcová DNA emituje zelené záření, zatímco denaturovaná DNA červeně. Výsledkem analýzy je index rozsahu fragmentace, který udává poměr červeného záření k celkové intenzitě fluorescence. Vysoká hodnota v tomto indexu koreluje s vysokým poškozením DNA (Dolník a kol., 2019; Hossain a kol., 2011).

Dalším parametrem, který je možné stanovit pomocí SCSA je poměr spermií, vykazující vysokou zelenou fluorescenci. Tyto spermie mají méně nahuštěný chromatin, což může signalizovat jejich nezralost (Dolník a kol., 2019; Hossain a kol., 2011).

3.4.6.7 Hodnocení koncentrace s využitím průtokové cytometrie

Průtokový cytometr je schopen během krátkého času analyzovat velmi vysoké množství částic rozptýlených v tekutině. Díky tomu je možné ho využívat také ke stanovení jejich koncentrace (Martínez-Pastor a kol., 2010).

Christenen a kol. (2004) tuto metodu porovnávali s běžně užívanými metodami pro počítání buněk jako je hematocytometr, spektrofotometr, nebo elektronického počítadla buněk. Uvádí, že pomocí průtokového lze dosáhnout nejpřesnějších a nejméně variabilních výsledků stanoveného počtu zvířecích spermií. Podobné výsledky uvádí také Prathalingam a kol., (2006).

3.4.7 Sexace spermií

Třídění spermií pracuje na principu sledování množství DNA. Spermie nesoucí chromozom X obsahují větší množství DNA než spermie s chromozomem Y.

Spermie jsou nejprve označeny barvivem, například Hoechst 33342. Při průchodu průtokovým cytometrem jsou pak kapičky suspenze, které emitují hodný fluorescenční signál pomocí elektromagnetického pole vychýleny do sběrných zkumavek.

Využití sexovaných inseminačních dávek může zlepšit efektivitu v živočišné výrobě v ekonomickém, ale i biologickém ohledu v odvětvích, kde jsou více preferováni jedinci jednoho pohlaví, jako jsou například chovy skotu nebo prasat (Hossain a kol., 2011).

3.5 Faktory ovlivňující parametry spermatu

3.5.1 Sezónnost

V mírných zeměpisných šířkách severní polokoule (nad 40° severní šířky) roční období ovlivňuje reprodukční aktivitu, sexuální chování, hormonální funkce, velikost varlat, kvalitativní a kvantitativní ukazatele spermatu (D'Alessandro a Martemucci, 2003). Nejvyšší sexuální aktivitu berani a kozli vykazují na podzim, se zkracujícími se světelnými dny, během období rozmnožování (Hafez a Hafez, 2000). Plemena ovcí a koz, pocházející z tropických oblastí vykazují jen malou, nebo dokonce žádnou sezónnost (Avdi a kol., 2004).

Karagiannidis a kol. (2000) hodnotili vliv ročního období na parametry spermatu (objem, koncentrace, celkové množství spermií, motilitu a morfologii). Nejlepších parametrů dosahovalo sperma na konci léta a na podzim. Uvádí však, že i přes rozdíly v průběhu roku dosahuje sperma dostatečné kvality, aby ho bylo k umělé inseminaci použít kdykoli.

Dle Avdi a kol. (2004) má ročního období vliv na velikost varlat beranů. Největší velikosti dosahovala varlata od července do srpna, nejmenší od února do dubna. Parenchym varlat je z většiny tvořen spermatogenní tkání, a proto jejich objem může ovlivňovat spermatogenní aktivitu.

3.5.2 Metoda odběru

Odběr do umělé vagíny (AV) je uváděn jako nejspolehlivější metoda a je doporučován (Malejane a kol., 2014). Při odběru do AV dosahují vzorky menšího objemu a větší koncentrace oproti elektroejakulaci (EE) (Hošek, 2016). Rozdíly v parametrech ejakulátu za použití AV a EE porovnával Matthews a kol. (2003). Dle této studie lze pomocí AV shromáždit kvalitnější vzorky, dostačujících parametrů se ovšem dá dosáhnout i pomocí EE.

Jiménez-Rabadán a kol. (2016) ve své studii porovnávali vliv metody odběru spermatu od beranů a kozlů na mrazitelnost. Po rozmrazení byla hodnocena motilita spermií, integrita membrány, mitochondriální aktivita a poškození DNA. Negativní vliv na tyto parametry měl u kozlů odběr pomocí EE.

3.5.3 Věk

Proces spermatogeneze začíná během období pohlavního dospívání – puberty, ve věku 4–6 měsíců. Kvalitní sperma však plemenici produkují až ve vyšším věku (Youngquist a Threfall, 2007).

Dle Benia a kol. (2018) mají berani i ve věku 18 měsíců stále horší motilitu a koncentraci spermií než dospělí plemenici ve věku 3–4 let. Akpa a kol. (2012) tvrdí, že k plemenitbě by měli být používáni berani starší než 24 měsíců, protože mladší berani mají větší množství morfologických abnormalit spermií.

Kozli od 8 měsíců začínají produkovat kvalitní ejakulát s motilitou a morfologií spermií srovnatelný se samci starými 1–5 let, objem a koncentrace se ovšem zvyšuje až do 2 let (Youngquist a Threfall, 2007).

Dostatečně kvalitní sperma lze od beranů odebírat až do vysokého věku. Ntemka a kol. (2019) uvádí, že i berany staré 13 let je možné používat pro umělou inseminaci.

3.5.4 Frekvence odběru

Ari a kol. (2011) ve své studii porovnávali kvalitu spermatu dvou skupin beranů. První skupině bylo sperma odebíráno v jednodenních intervalech a druhé ve čtyřdenních intervalech. V parametrech čerstvého spermatu odebíraném v odlišných intervalech nebyl významný rozdíl. Zřetelně lepších výsledků při použití kryokonzervace ovšem dosahovalo sperma odebírané v jednodenních intervalech. Spermie, které jsou déle nahromaděny v nadvarleti, mohou mít sníženou kvalitu oproti spermiiím zvířat, která ejakulují pravidelně, v nižším intervalu.

Dle Yotov a kol. (2011) je pro krátkodobé uchování při čtyřech odběrech v desetiminutových intervalech nejlepší použít sperma získané z druhé ejakulace, které vykazuje nejvyšší přežitelnost. S každou další ejakulací ovšem klesá objem a koncentrace.

Při zvyšující se frekvenci ejakulace také klesá také motilita spermii a mění se iontové a enzymatické složení semenné plasmy (Kaya a kol., 2002).

3.5.5 Zdravotní stav

Fertilitu samců může negativně ovlivnit zhoršený zdravotní stav způsobený špatnou péčí o zvířata, vlivem různých bakteriálních či virových onemocnění, parazitů, intoxikací a jiných činitelů (Tsakmakidis, 2010).

Gouletsou a Fthenakis (2015) ve své práci uvádí souhrn častých mikrobiálních chorob malých přežvýkavců. Mezi ně patří záněty varlat a nadvarlat (orchitida, epididymitida), přídatných pohlavních žláz, penisu, předkožky a šourku.

Jako nejčastější původce zánětů varlat a nadvarlat uvádí bakterie rodu *Brucella* a *Truperella*. *Brucella ovis* způsobuje chronické onemocnění, charakterizované změnami varlat a nadvarlat, které mohou vést až ke ztrátě plodnosti (Iwaniak, 2002). Carrera-Chavez a kol. (2016) porovnával ejakulát zdravých beranů s ejakulátem beranů nakažených bakterií *Brucella ovis*. Ejakulát nakažených plemeníků vykazoval horší charakteristiku. Dle Youngquist a Threfall (2007) je *Brucella ovis* hlavní příčinou snížené plodnosti v Austrálii, na Novém Zélandě a na západě USA.

Virus neštovic způsobuje vředy, jež se mohou nacházet na různých částech těla, včetně penisu a předkožky. Tento virus je celosvětově rozšířen, může napadnout více druhů zvířat a má zoonotický potenciál. Průběh onemocnění se může lišit od subklinického až po úmrtí zvířete. V místě vředů hrozí infikování jinými patogeny (Gouletsou a Fthenakis, 2015).

V případě zjištění nákazy je nutné vyhodnotit, zda je vhodná léčba, popřípadě zvolit utracení zvířete. Pokud se přistoupí k léčbě, volí se vhodná antibiotika, antivirotika, popřípadě antiparazitika (Gouletsou a Fthenakis, 2015)

3.5.6 Tělesná kondice

Maurya a kol. (2010) se zabýval reprodukčními ukazateli beranů v souvislosti s tělesnou kondicí. Bylo zkoumáno sexuální chování, parametry ejakulátu, rozměry šourku a hormony. Zvířata byla rozdělena do tří skupin a následně jim byl upraven režim krmné dávky, dokud nedosáhly požadované kondice. V první skupině byli berani s tělesnou kondicí 2,5, v druhé 3,0 a ve třetí 4,0. Tělesná kondice byla hodnocena na stupnici 1–5, kdy 1 představuje úplně vyhublá a 5 velmi ztučnělá zvířata. Zvířata ve všech třech skupinách prokazovala

plodnost, ovšem nejlepších reprodukčních ukazatelů dosáhla zvířata s průměrnou tělesnou kondicí, a to 3 a 3,5.

3.5.7 Dědičnost

Dle Furstoss a kol. (2007) má hlavní vliv na ukazatele ejakulátu vnější prostředí. Ve své studii určoval u kozlů plemene francouzské alpské kozy a saanské. Koeficient dědivosti pro různé ukazatele spermatu. Hodnoty koeficientu dědivosti u zjišťovaných parametrů se pohybovaly v rozmezí 0,05–0,32 pro plemeno Saaren a 0,03–0,34 u plemene Alpine. Podobné hodnoty zjistil Bodin a kol. (2007) také u beranů plemena Lacaune a Manech tete rousse.

Lze také pozorovat meziplenné rozdíly v plodnosti. Mohammed a kol. (2013) křížil plemeno koz aradi (A) s plemenem damascus (D). Parametry ejakulátu byly sledovány u čistokrevných zvířat a u kříženců $\frac{1}{2}D\frac{1}{2}A$ a $\frac{3}{4}D\frac{1}{4}A$. Ukazatele parametrů spermatu čistokrevných zvířat a hybridů těchto dvou plemen vykazovaly rozdílné hodnoty.

3.6 Zpracování spermatu

3.6.1 Ředění

Ředidla používaná k ředění spermatu malých přežvýkavců, stejně jako u jiných živočišných druhů byla vyvinuta k tomu, aby chránila a udržovala spermie během zpracování a skladování. Vytváří optimální podmínky pro prodloužení životnosti spermií, zachování jejich fertilizační schopnosti a zvyšují objem spermatu pro následnou výrobu inseminačních dávek. Měla by mít odpovídající pH, pufrovací schopnost, vhodnou osmolalitu a měla by chránit spermie před kryogenním poškozením (Maksimovic a kol., 2018; Salmon a Maxwell, 2000). Jsou to látky na bázi citrátu, cukrů, tris, glycerolu, vaječného žloutku, nebo tepelně ošetřeného mléka (Faigl a kol., 2011). Konečný poměr spermatu a ředidla závisí na koncentraci a metodě zpracování spermatu (Faigl a kol., 2011).

Pro skladování spermatu v tekutém stavu používají ředidla na bázi mléka, žloutku a tris (Kasimanickam a kol., 2011). Nejvyužívanější kryoprotektantní látkou je glycerol. Využívá se v koncentraci 6-8 % při rychlém mrazení spermatu ve formě pelet a v koncentraci 3-6 % při pomalém mrazení v pejetách (Salmon a Maxwell, 2000).

Při použití látek živočišného původu, jako je mléko nebo vaječný žloutek přináší riziko mikrobiální kontaminace. Alternativou vaječného žloutku může být sojový lecitin, jako např. v komerčním ředidle BioXCell (Gil a kol., 2003). Jako prevence znehodnocení mikrobiální kontaminací se také využívá přídavku antibiotik (Salmon a Maxwell, 2000).

Komerčně vyráběná ředidla bez živočišných látek lze na trhu najít pod názvem Andromed, Andromed CSS I a II, Biociphos, Biadyl, Optidyl, s živočišnými komponenty pak Triladyl a Ovipro (Hegedúšová a kol., 2012).

Hlavním problémem uchování kozlího spermatu je přítomnost složek semenné plazmy které zhoršují životaschopnost spermií uložených v ředidle obsahující mléko a žloutek. Toxická interakce s vaječným žloutkem je způsobena enzymem EYCE (eqq yolk coagulating enzyme), který je vylučován bulbouretálními žlázami. Podobné účinky má také enzym BUSgp60. Tento enzym hydrolyzuje triglyceridy a trioleiny v mléce na volné mastné kyseliny, které silně inhibují motilitu a poškozují membrány (Gseh a kol., 2012). Odstraněním semenné plazmy je možné zlepšit přežitelnost spermií (Leboeuf a kol., 2000).

3.6.2 Chlazení

Cílem snížení teploty je zpomalení metabolismu a prodloužení životnosti spermií od ejakulace po inseminaci (Faigl a kol., 2011).

Pro krátkodobé uchování je možné ho uchovat při teplotě 4-5 °C. Sperma skladovné při této teplotě si je schopné udržet oplozovací schopnost po dobu několika dní. Kvalita spermatu se však začne výrazně snižovat po 24 hodinách (Falchi a kol., 2018; Salmon a Maxwell, 2000). Salmon a Maxwell (2000) uvádějí, že při dobře načasované laparoskopické inseminaci lze po přidání antioxidantních činidel použít sperma staré až 8 dní.

Nevýhodou uchování spermatu v tekutém stavu je jeho omezená životnost spermií a nemožnost transportu na velké vzdálenosti. K inseminaci je však možné využít relativně malé množství spermií, lze oplodnit velké množství samic a metodu lze jednoduše využít v terénu (Faigl a kol., 2011).

3.6.3 Ekvilibrace

Před kryokonzervací je nutné, aby se sperma po dobu 1,5–2 hodin pomalu zchladilo na teplotu 5 °C. Při této teplotě by měla proběhnout 2–4 hodiny ekvilibrace. Během ekvilibrace se spermie přizpůsobí sníženému metabolismu, kryoprotektanty vstoupí do buněk a dojde k rovnováze osmoticky aktivních látek (Lv a kol., 2019).

3.6.4 Kryokonzervace

Kryokonzervace je proces, při kterém je sperma uskladněno při velmi nízkých teplotách. Díky tomu je možné jeho dlouhodobé skladování a přeprava (Galarza a kol., 2019).

Při mrazení spermatu ve formě pelet se používá suchý led nebo plastová deska s prohlubněmi, ochlazená na -80 °C. Do prohlubně se vnese 0,1–0,2 ml spermatu (Lv a kol., 2019).

Při mrazení spermatu v pejetách se sperma se sperma ukládá do trubiček z PVC o objemu 0,25, nebo 0,5 ml (Maxwell a kol., 1995). Ty se následně vloží do tekutého dusíku. Rychlost, kterou jsou pejety mrazeny, lze regulovat vzdáleností od hladiny (Salamon a Maxwell, 2000). Tato rychlost má vliv na parametry spermatu po rozmrazení a jeho následnou fertilizační schopnost (Byrne a kol., 2000; Ferriera a kol., 2019).

Během kryokonzervace se obvykle životnost spermií sníží o více než 50 %. Poškození spermií je způsobeno tepelným šokem, tvorbou ledových krystalů, dehydratací, změnou koncentrace solí a osmolality (Galarza a kol., 2019). Beraní spermie jsou nejvíce náchylné k poškození při teplotě od -10 do -25 °C (Byrne a kol., 2000).

3.6.5 Lyofilizace

Lyofilizace je konzervační metoda, při které je materiál po smíchání s lyofylizačním médiem vysušen na hodnoty, při kterých nebudou probíhat biologické pochody a chemické reakce. Spermie jsou nejprve zmrazeny pomocí tekutého dusíku. Poté následuje dvoufázové sušení, které probíhá za velmi nízkého tlaku. Led při něm sublimuje přímo na vodní páru (Gil a kol., 2014; Jennings, 2002).

Lyofilizované spermie se se rehydratují přidáním čisté vody, jejíž objem by měl mít stejný, jako objem suspenze před lyofylizací. K ředění rehydratovaných vzorků lze použít jakýkoli fyziologický roztok. Koncentrace ve finálním rehydratačním médiu by měla být taková, aby bylo snadné vyhledávání jednotlivých spermií pro účely ICSI (intracytoplazmatická injekce injekce spermie) (Gil a kol., 2014).

Nevýhodou je fakt, že spermie, které byly uchovány pomocí lyofilizace ztrácí svou motilitu, a proto je nutné pro oplodnění oocyty použít ICSI (Wakayama a Yanagimachi, 1998). Dalším výrazným omezením je poškození integrity DNA vlivem působení DNAáz a oxidačního stresu (Olaciregui a kol., 2017).

Jednou z hlavních výhod lyofilizace oproti kryokonzervaci je snížení nákladů na uskladnění a přepravu, které jsou spojeny s potřebou neustálého přísunu tekutého dusíku. Vzorky je možné skladovat při teplotě 4 °C nebo při pokojové teplotě až jeden rok (Anzalone a kol., 2018; Gil a kol., 2014; Olaciregui a kol., 2017). Anzalone a kol. (2018) uvádí, že přibližně třetina oocytů injektovaných lyofilizovanými spermii oproti mraženému spermatu doroste do fáze blastocysty.

3.6.6 Vitrifikace

Metoda je založena na rychlém zmrazení buněk, přímým ponořením do kapalného dusíku (Jiménez-Rabadán a kol., 2015). Spermia je možné mrazit v pejetách, nebo přímou aplikací kapek spermatu do tekutého dusíku (Arando a kol., 2019; Jiménez-Rabadán a kol., 2015).

Výhodou vitrifikace je její jednoduchost a časová nenáročnost, díky čemuž je jednodušší touto metodou konzervovat spermia i v polních podmínkách (Pradié a kol., 2018), faktem ale je, že u malých přežvýkavců tato metoda nevykazuje uspokojivé výsledky jako u jiných druhů a je nutné ji dále rozvíjet (Arando a kol., 2019).

3.6.7 Rozmrazení

Rozmrazení pelet se provádí při teplotě 35–40 °C po dobu 30–60 sekund ve zkumavce, suchou nebo mokrou metodou. Při mokré metodě se pelety vloží do předehřátého roztoku (Lv a kol., 2019).

Rozmrazení spermatu, které je uložené v pejetách se provádí ve vodní lázni o teplotě 37–40 °C po dobu 30 sekund (Kumar a kol., 2003; Ferreira a kol., 2019).

Vlivem teploty při rozmrazení na spermatické buňky se zabývali Söderquist a kol. (1997). Pejety s beraním spermatem byly rozděleny do tří skupin, kdy první byla rozmrazována při teplotě 70 °C po dobu 5 sekund, druhá 50 °C 9 sekund a třetí 35 °C 12 sekund. Nižší poškození membrány a vyšší motilita byla zaznamenána u první a druhé skupiny.

Obecně lze tedy říct, že pejety se spermatem je možné rozmrazovat po kratší dobu v lázni o vyšší teplotě a naopak.

3.7 Umělá inseminace

3.7.1 Vaginální inseminace

Tuto metodu je možné provádět s čerstvým, nebo chlazeným spermatem. To se deponuje co nehlouběji do pochvy (Faigl a kol., 2011). Využívá se k tomu katetr, který je stejného typu jako u skotu, má jen menší rozměry (Anel a kol., 2006). Technika je rychlá a lze ji za uspokojivých výsledků provést i v polních podmínkách (Faigl a kol., 2011).

3.7.2 Intracervikální inseminace

Pomocí poševního zrcadla se identifikuje ústí děložního kanálu. Do něj se bez nadměrného použití síly zavede inseminační katetr, do nehlouběji dostupného místa, obvykle 5-12 mm. Tato metoda přináší spolehlivější výsledky než vaginální inseminace (Faigl a kol., 2011; Anel a kol., 2006).

3.7.3 Transcervikální intrauterinní inseminace

Při této technice je nejprve nutné zvíře zafixovat ve hřbetní poloze s hlavou směřující dolů. Inseminační dávka je deponována do dělohy skrze kanál děložního krčku (Faigl a kol., 2011). Pomocí poševního zrcadla se identifikuje děložní hrdlo, které se uchopí pomocí kleští a zavede se skrze něj inseminační katetr (Yungquist a Threlfall, 2007).

Problém této techniky spočívá v anatomické stavbě děložního hrdla ovcí, díky které není možné se snadno dostat do dělohy, jako je tomu například u krav (Casali a kol., 2017; Kershaw a kol., 2005), což může vést k poraněním reprodukčních orgánů, popřípadě i přerušení následné březosti vlivem možného traumatu děložního krčku (Faigl a kol., 2011).

3.7.4 Laparoskopická inseminace

Stejně, jako u transcervikální metody je zvíře zafixováno ve hřbetní poloze s hlavou směřující dolů (Yungquist a Threlfall, 2007). Sperma je laparoskopicky, skrze břišní stěnu uloženo přímo do děložních rohů. Z tohoto důvodu lze k inseminaci využít jeho menší množství. Při správném provedení je možné dosáhnout 60–75% úspěšnosti (Faigl a kol., 2011). Díky vyšší spolehlivosti této metody lze k inseminaci využít méně kvalitní sperma, epididimální spermie, nebo sexované dávky (Anel a kol., 2006). Laparoskopie může být také současně využita k diagnostice reprodukčního traktu a případnému odhalení zdravotních problémů (Anel a kol., 2005).

Navzdory tomu, že je laparoskopická inseminace minimálně invazivní postup, je pro její praktikování nutné mít veterinární odbornost (Casali a kol., 2017). Tato metoda může být díky své náročnosti ekonomicky nevýhodná (Anel a kol., 2006).

Metoda inseminace	Objem	Minimální počet motilních spermií
Vaginální	0,2 ml	400×10^6
Intracervikální	0,2 ml	200×10^6
Transcervikální intrauterinní	0,5 ml	200×10^6
Laparoskopická	0,05 ml	20×10^6

Tabulka č. 1: Množství spermatu a jeho koncentrace pro různé metody inseminace

Zdroj: Cseh a kol., 2012

4 Materiál a metodika

4.1 Charakteristika plemeníkú

Pro účely této práce bylo sperma odebíráno od dvou beranů valašské ovce (ušní známka 77808/072, nar. 14. 1. 2014, linie Beskyd; ušní známka 74801/081, nar. 31.3. 2016, linie Juras) a kozla anglo-nubijského plemene (ušní známka 08650/037, nar. 25. 3. 2015, linie Black). Zvířata byla ustájena na pracovišti Demonstrační a pokusné stáje České Zemědělské Univerzity v Praze (50.1296047N, 14.3692311E). Zvířata byla volně ustájena ve skupinových kotcích s možností venkovního výběhu. Ustájovací plochy a technologické vybavení odpovídalo platné legislativě dle zákona č. 208/2004 Sb. Základem krmné dávky v průběhu celého roku bylo luční seno (ad libitum) z vlastní výroby a granule (1580 OVCE UNI, De Heus a.s., Bučovice, ČR). Množství příkrmu regulováno dle kondičního stupně zvířat. Minerální lizy a pitná voda byly k dispozici ad libitum. Tělesná kondice plemeníkú se pohybovala v rozmezí 3,5 a 4,0 (Russel a kol., 1969). Všichni plemeníci byly pod permanentním veterinárním dohledem a v průběhu pokusu nevykazovaly příznaky jakýchkoli onemocnění.

4.2 Odběr a zpracování

Vzorky spermatu byly odebírány v průběhu dvou měsíců, od 21. ledna do 20. února 2020 v pravidelných časových intervalech definovaných v příloze č. 2 diplomové práce. K odběru byla použita standardní umělá vagina pro odběr spermatu malých přežvýkavců (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo). Jako sběrač byl použit latexový prezervativ navlečený přes umělou vaginu. Tento prezervativ byl před odběrem vypláchnut fosfátovým pufrům (PBS) a nalubrikován vazelínou.

Ihned po odběru bylo sperma naředěné ředidlem AndroMed® (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo) o teplotě 38 °C v poměru 1:4. Při této teplotě byly vzorky v přenosném polystyrenovém termoboxu přeneseny do laboratoře k hodnocení. Zde byly vzorky uloženy při pokojové teplotě. Při této teplotě se s nimi také manipulovalo.

Na předehřáté podložní sklo byla nanášena kapka nativního ejakulátu, na kterém bylo pod mikroskopem provedeno subjektivní hodnocení vířivého pohybu dle David a kol. (2015). Dále byla hodnocena koncentrace za použití Bürknerovy komůrky a pomocí spektrofotometru (Genesys™ 10vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Po zhodnocení koncentrace bylo sperma dále ředěno na finální koncentraci $200\text{--}300 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ (Alvarez a kol., 2012). Takto naředěné sperma bylo uloženo do pejet (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo) o objemu 0,25 ml. Pejety byly uzavřeny pomocí plnicího prášku (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Celá tato procedura byla dokončena do 2,5 hodin po odběru ejakulátu.

Naplňené pejety byly uloženy do chladicího boxu, kde při teplotě 5–10 °C po dobu 2–4 hodin probíhala ekvilibrace.

4.3 Hodnocení vzorků před mrazením

Po ekvilibraci byla provedena kontrolní analýza spermatu před mrazením pomocí průtokového cytometru (NovoCyte 3000, Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, California, USA), který byl vybaven laserey emitující fialové (405 nm), modré (488 nm) a červené (640 nm) záření.

25 μl spermatu (koncentrace $200\text{--}300 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$) v objemu 225 μl PBS bylo obarveno 2,5 μl fluorescenčního barviva Hoechst-33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 10 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 μl PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 8 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 μl PNA-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) o finální koncentraci 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 μl Mitotracker Deep Red (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 80 nM. Vzorky byly následně inkubovány po dobu 10 minut ve tmě, při teplotě 38 °C.

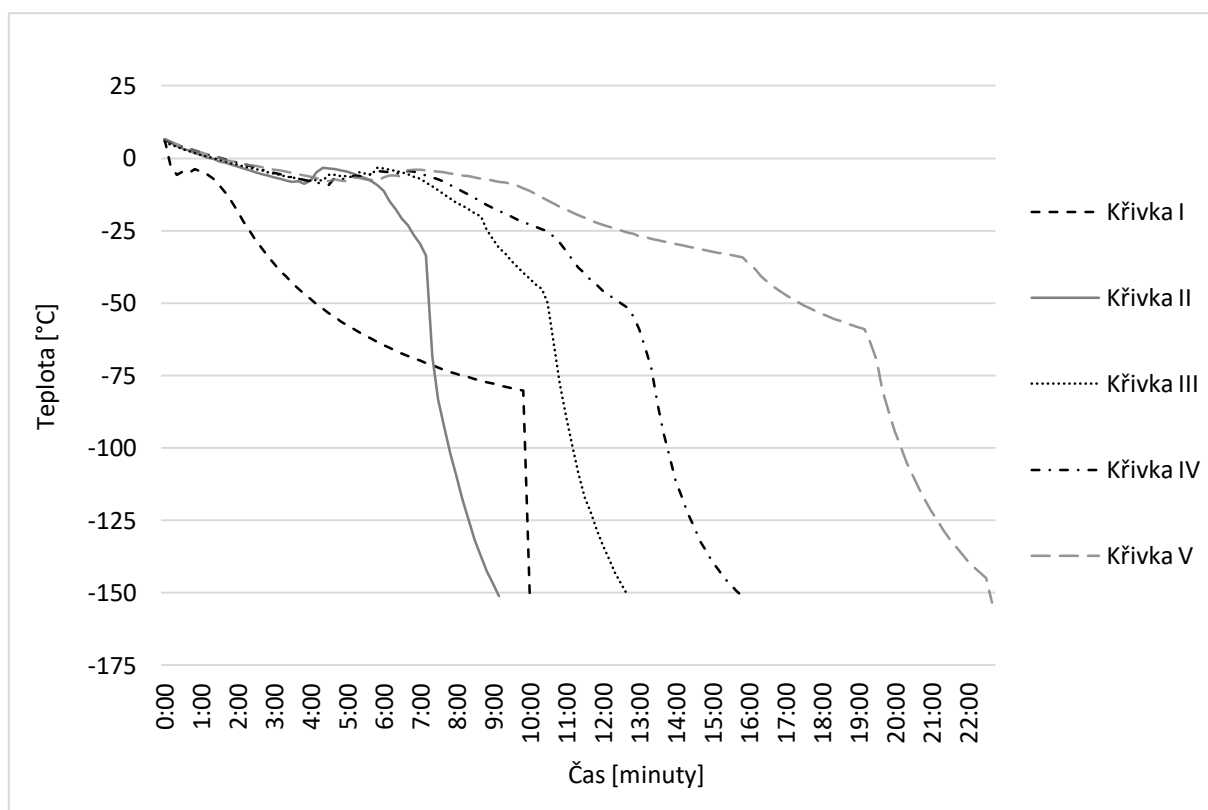
Od každého vzorku bylo analyzováno minimálně 20 000 částic, nízkou rychlostí analýzy. Pro automatizované nastavení cytometru, sběr dat a vyhodnocení byl použit software NovoExpress, verze 1.3.0 (Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, Kalifornie, USA). Nebyla vyžadována žádná kompenzace na filtrech optického systému cytometru. Pro separaci signálu nespermatických částic bylo využito parametru FSC, SSC a barviva Hoechst-33342.

Bylo sledováno poškození cytoplazmatické membrány pomocí barviva PI, poškození akrozomu pomocí PNA-FITC a mitochondriální aktivita pomocí Mitotracker Deep Red. Nastavení softwaru pro úroveň signálů a definování jednotlivých parametrů je detailně zobrazeno v příloze **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

Pro následnou kryokonzervaci bylo využito sperma, které obsahovalo více než 50 % spermií schopných oplození. Spermie, která má schopnost oplodnění byla definována jako buňka s neporušenou cytoplazmatickou membránou, neporušeným akrozomem a vysokou mitochondriální aktivitou

4.4 Mrazení

Mrazení pejet se spermatem probíhalo v parách tekutého dusíku, za použití polystyrenového boxu, který byl speciálně modifikován tak, aby bylo možné kontrolovat vzdálenost mezi pejetami a hladinou dusíku (Ptáček a kol., 2019) a regulovat tak rychlost mrazení. Pejety byly rozděleny do tří skupin, kdy každá skupina byla kryokonzervována podle definované mrazicí křivky (Graf č. 1: Použité mrazicí křivky a níže defionovaná vzdálenost pejet od hladiny tekutého dusíku). Teplota v průběhu kryokonzervace byla měřena pomocí termometru (HH506A, Omega Engineering INC., Norwalk, USA), jehož čidla byla umístěna uvnitř naplněných pejet.



Graf č. 1: Použité mrazicí křivky

Křivka I

Vzorky byly mrazeny konvenční metodou, která je užívána pro mrazení spermatu malých přežvýkavců. Sperma bylo umístěno 4 cm nad hladinu tekutého dusíku, kde bylo po dobu 10 minut. Po této době byly pejety ponořeny do tekutého dusíku (Ferreira a kol., 2019).

Křivka II

Vzorky v této skupině byly mrazeny metodou, při které se pejety postupně přibližovaly k hladině dusíku. Pokles teploty byl řízen vzdáleností pejet od hladiny (Ptáček a kol., 2019).

- 0–3 min: 15 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 3–5 min: 9,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 5–6 min: 5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 6–8 min: 1,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 8 min: <0,5 cm nad hladinou tekutého dusíku

Křivka III

Tato skupina byla mrazena stejným postupem jako skupina II, intervaly zde 1,5krát prodlouženy.

- 0–4,5 min: 15 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 4,5–7,5 min: 9,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 7,5–9 min: 5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 9–12 min: 1,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 12 min: <0,5 cm nad hladinou tekutého dusíku

Křivka IV

Tato skupina byla mrazena stejným postupem jako skupina II, intervaly zde byly dvakrát prodlouženy.

- 0–6 min: 15 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 6–10 min: 9,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 10–12 min: 5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 12–16 min: 1,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 16 min: <0,5 cm nad hladinou tekutého dusíku

Křivka V

Tato skupina byla mrazena stejným postupem jako skupina II, intervaly zde byly třikrát prodlouženy.

- 0–9 min: 15 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 9–5 min: 9,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 15–18 min: 5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 18–24 min: 1,5 cm nad hladinou tekutého dusíku
- 24 min: <0,5 cm nad hladinou tekutého dusíku

4.5 Rozmrazení a hodnocení vzorků

Rozmrazení vzorků proběhlo minimálně 48 hodin po mrazení a následné kryokonzervaci v kontejneru s tekutým dusíkem. Pejety byly vloženy do vodní lázně o teplotě 38 °C po dobu 30 sekund (Arando a kol., 2019). Při této teplotě se se vzorky také nadále manipulovalo.

Kvalita rozmrazených inseminačních dávek byla měřena pomocí průtokového cytometru, stejným postupem jako po ekvilibraci, viz kapitola 0

4.6 Statistická analýza dat

Jako závisle proměnné bylo sledováno procentuální zastoupení oplození schopných spermií po kryokonzervaci, dále procento spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou, akrozomem a nízkou mitochondriální aktivitou.

Statistická analýza byla provedena softwarem SAS 9.4. (SAS/STAT, 2011) obecným lineárním modelem (GLM), metodou nejmenších čtverců. Následující statistické modely byly použity pro vyhodnocení dílčích proměnných vlastností:

Modelová rovnice pro jednotlivé ukazatele po kryokonzervaci

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l + b^*1 \text{ nebo } b^*2 \text{ nebo } b^*3 \text{ nebo } b^*4 + e_{ijklm}$$

- Y_{ijklm} = Závisle proměnná (procento oplození schopných spermií; procento spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou po kryokonzervaci; procento spermií s poškozeným akrozomem po kryokonzervaci; procento spermií s nízkou mitochondriální aktivitou nízkou mitochondriální aktivitou po kryokonzervaci)
- μ = obecná hodnota závisle proměnné
- A_i = fixní efekt i – tého dne odběru ($i = 1$. odběrový den, $n = 32$; $i = 2$. odběrový den, $n = 40$; $i = 3$. odběrový den, $n = 20$; $i = 4$. odběrový den, $n = 40$; $i = 5$. odběrový den, $n = 40$; $i = 6$. odběrový den, $n = 28$; $i = 7$. odběrový den, $n = 56$; $i = 8$. odběrový den, $n = 24$; $i = 9$. odběrový den, $n = 40$; $i = 10$. odběrový den, $n = 40$)
- B_j = fixní efekt j – tého druhu ($j = \text{beran}$, $n = 264$; $j = \text{kozel}$, $n = 96$)
- C_k = vnořený efekt k – tého plemeníka ($k = \text{plemeník 1 (beran)}$, $n = 208$; $k = \text{plemeník 2 (beran)}$, $n = 56$; $k = \text{plemeník 3 (kozel)}$, $n = 96$)
- D_l = fixní efekt l – té mrazicí křivky ($l = \text{křivka I}$, $n = 156$; $l = \text{křivka II}$, $n = 76$; $l = \text{křivka III}$, $n = 36$; $l = \text{křivka IV}$, $n = 76$; $l = \text{křivka V}$, $n = 16$)
- b^*1 = lineární regrese na procentuální zastoupení oplození schopných spermií před kryokonzervací (pouze pro procentuální zastoupení oplození schopných spermií po kryokonzervaci), b^*2 = lineární regrese na procentuální zastoupení spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou před kryokonzervací (pouze pro procentuální zastoupení spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou po kryokonzervaci), b^*3 = lineární regrese na procentuální zastoupení spermií s poškozeným akrozomem před kryokonzervací (pouze pro procentuální zastoupení spermií s poškozeným akrozomem po kryokonzervaci), b^*4 = lineární regrese na procentuální zastoupení spermií s nízkou mitochondriální aktivitou nízkou mitochondriální aktivitou před kryokonzervací (pouze pro procentuální zastoupení spermií s nízkou mitochondriální aktivitou nízkou mitochondriální aktivitou po kryokonzervaci)
- e_{ijklm} = zbytková chyba.

Statisticky průkazné rozdíly byly definovány podle Tukey – Kramerova testu na hladině významnosti $P < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Základní statistické údaje

V tabulce Tabulka č. 2 jsou uvedeny základní statistické údaje. Zastoupení spermií, které byly vyhodnoceny jako oplození schopné, poškození membrány, poškození akrozomu a nízká mitochondriální aktivita bylo měřeno u 360 vzorků. Hodnoty byly měřeny před kryokonzervací a po kryokonzervaci. Z výsledků je patrné, že oplozovací schopnost spermií se vlivem kryokonzervace značně snižuje. Jejich průměrné zastoupení v inseminační dávce po ekvilibraci bylo 66,95 % a po rozmrazení 8,3 %, došlo přibližně k osminásobnému poklesu. Tento trend tedy lze zákonitě pozorovat také u jednotlivých ukazatelů, na jejichž základě byla oplozovací schopnost spermií hodnocena. Poškození cytoplazmatické membrány a akrozomu vzrostlo přibližně třikrát a k poklesu mitochondriální aktivity došlo přibližně u čtyřikrát většího množství spermií.

	Proměnná	Četnost	Aritmetický průměr [%]	Směrodatná odchylka [%]	Minimální hodnota [%]	Maximální hodnota [%]
Před kryokonzervací	Oplození schopné	360	66,95	6,66	54,52	78,88
	Poškození membrány	360	25,97	3,92	17,93	32,33
	Poškození akrozomu	360	20,28	4,20	14,27	28,02
	Nízká mitochondriální aktivita	360	21,59	6,99	1,40	32,35
Po kryokonzervaci	Oplození schopné	360	8,30	8,15	0,00	39,37
	Poškození membrány	360	84,70	9,37	57,91	98,01
	Poškození akrozomu	360	64,34	13,26	24,14	90,66
	Nízká mitochondriální aktivita	360	81,49	11,13	48,45	99,56

Tabulka č. 2: Základní statistické údaje

5.2 Procentuální zastoupení oplození schopných spermií po kryokonzervaci

5.2.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval proměnlivost ukazatele z 76,9 % a byl průkazný ($P < 0,0001$). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv všech jednotlivých faktorů, tedy odběrového dne ($P < 0,0001$), druhu zvířete ($P < 0,0001$), pleménika v rámci druhu ($P < 0,0001$) a mrazicí křivky ($P < 0,0001$).

5.2.2 Vliv jednotlivých faktorů

5.2.2.1 Vliv odběrového dne

Byly shledány statisticky významné rozdíly mezi některými jednotlivými dny. Nejvyšší kvalitu měl ejakulát odebraný 8. den. Tento den byl výrazně lepší než všechny ostatní, což bylo podloženo statisticky průkaznými rozdíly. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u vzorků z 10. dne, nebyly však statisticky horší, než vzorky z 1., 3. a 7. dne. Rozdíly mezi jednotlivými dny mají houpavou tendenci bez jasného trendu. Všechny hodnoty pro jednotlivé kontrolní dny sledování jsou uvedeny v tabulce Tabulka č. 3.

Den	Oplození schopné [%] LSM ± SEM
1 (n = 32)	4,50 ± 0,83 af
2 (n = 40)	12,90 ± 0,78 b
3 (n = 20)	3,13 ± 1,23 acf
4 (n = 40)	13,82 ± 0,79 b
5 (n = 40)	8,20 ± 0,75 d
6 (n = 28)	9,95 ± 1,02 cd
7 (n = 56)	2,14 ± 0,66 af
8 (n = 24)	21,70 ± 1,13 e
9 (n = 40)	3,77 ± 0,79 acd
10 (n = 40)	-1,05 ± 0,85 f

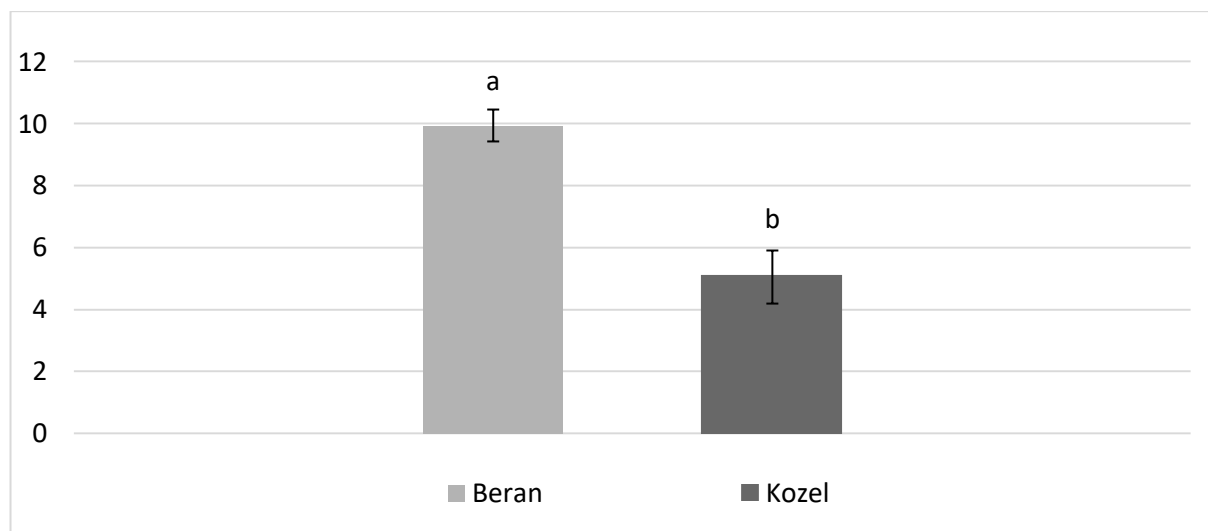
Tabulka č. 3: Procentuální zastoupení oplození schopných spermií v jednotlivých odběrových dnech

LSM ± SEM

a–f = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$)

5.2.2.2 Vliv druhu

Oplozovací schopnost spermií po kryokonzervaci byla u beranů jednoznačně lepší, jak je znázorněno v grafu Graf č. 2. Obecně u beranů dosahovala $9,94 \pm 0,52$ % zatímco u kozla hodnota byla $5,05 \pm 0,86$ %. Toto tvrzení je demonstrováno průkazně vyšším rozdílem ($+4,89$ %) právě u beranů ve srovnání s kozlem.



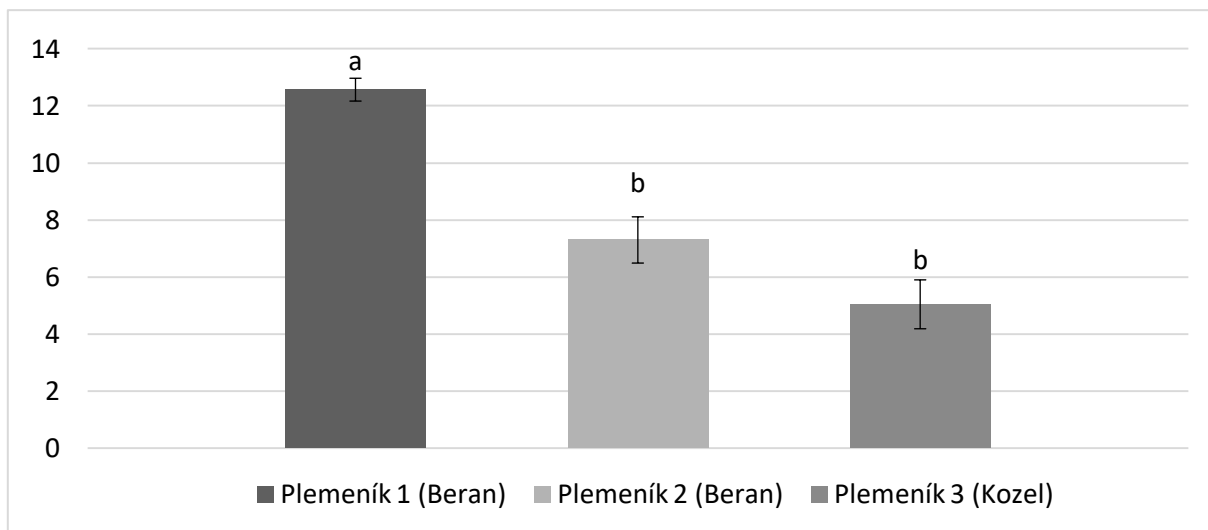
Graf č. 2: Procentuální zastoupení oplození schopných spermií dle druhové příslušnosti Beran, n = 264; Kozel, n = 96

LSM \pm SEM

a–b = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$)

5.2.2.3 Vliv plemeníka v rámci druhu

Oplozovací schopnost spermií plemeníka 1 (beran) byla $12,58 \pm 0,40$ %, plemeníka 2 (beran) $7,31 \pm 0,81$ % a $5,5 \pm 0,86$ % u plemeníka 3 (kozol). Největší množství oplození schopných spermií bylo zaznamenáno u berana. Plemeník 1 (beran) měl tedy statisticky lepší hodnoty ($P < 0,05$) ve srovnání s druhým beranem i kozlem. Druhý beran, plemeník 2, se však průkazně nelišil od plemeníka 3 (kozol), nicméně jeho hodnoty byly o téměř 2 % vyšší.

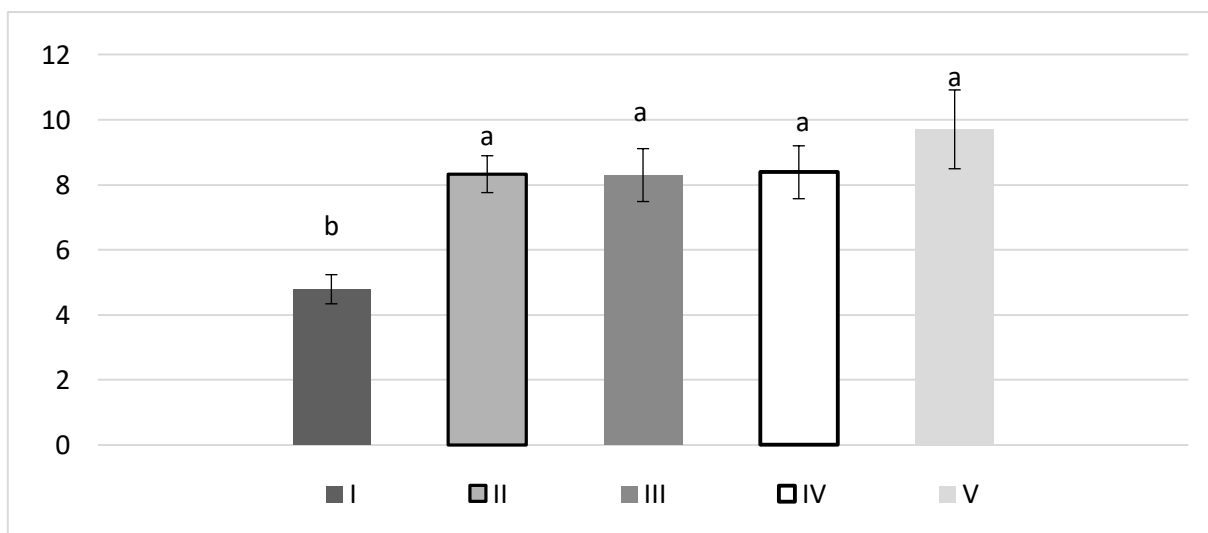


Graf č. 3: Procentuální zastoupení oplození schopných spermií u jednotlivých plemeníků Plemeník 1 (beran), n = 208; plemeník 2 (beran), n = 56; plemeník 3 (kozel), n = 96
LSM ± SEM

a–b = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

5.2.2.4 Vliv mrazicí křivky

Statisticky nejhorší výsledky byly zaznamenány u křivky I, standardně využívané ke kryokonzervaci malých přežvýkavců, v porovnání se všemi ostatními modifikovanými mrazicími křivkami. Mezi křivkami II, III, IV a V nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl a vykazovaly téměř srovnatelné procentuální zastoupení oplození schopných spermií. Určitý potenciál lze shledat u křivky V. Při použití této křivky bylo dosaženo vyšších výsledků. Statisticky neprůkazný rozdíl může být dán nízkým počtem pozorování (n=16).



Graf č. 4: Procentuální zastoupení oplození schopných spermií dle použité mrazicí křivky
LSM ± SEM

křivka I, n = 156; křivka II, n = 76; křivka III, n = 36; křivka IV, n = 76; křivka V, n = 16
a–b = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

5.3 Procentuální zastoupení spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou, poškozeným akrozomem a nízkou mitochondriální aktivitou po kryokonzervaci

5.3.1 Popis modelů

Použitý model pro poškození cytoplazmatické membrány vysvětloval proměnlivost ukazatele z 79,2 %, pro poškození akrozomu ze 73,18 % a pro nízkou mitochondriální aktivitu vysvětloval ze 74,07 %. Všechny modely byly průkazné ($P < 0,0001$). Na každý jednotlivý ukazatel měl statisticky průkazný vliv odběrový den ($P < 0,0001$), druhová příslušnost zvířete ($P < 0,0001$), plemeník v rámci druhu ($P < 0,0001$) a mrazicí křivka ($P < 0,0001$).

5.3.2 Vliv jednotlivých faktorů

5.3.2.1 Vliv odběrového dne

Mezi výsledky v rámci odběrových dnů byly shledány statisticky významné rozdíly. Průměrné hodnoty jsou uvedeny v tabulce Tabulka č. 4: Procentuální zastoupení spermií v průběhu jednotlivých odběrových dní.

Nejvyšší poškození cytoplazmatické membrány spermií bylo naměřeno u vzorků odebraných 9. ($90,13 \pm 0,79$ %) a 10. den ($91,71 \pm 0,80$ %). Nejlepších výsledků bylo dosaženo 8. den ($68,01 \pm 1,06$ %). Tento den byl statisticky významně lepší než ostatní odběrové dny a výsledky byly o 23,7 % lepší než u vzorků z 10. dne.

Podobně velké rozdíly mezi hodnotami z nejhorsího a nejlepšího odběrového dne byly naměřeny také u spermií s nízkou mitochondriální aktivitou.

Množství spermií s poškozeným akrozomem bylo nejvyšší 9. den ($81,66 \pm 1,36$). Nejlepší výsledky byly naměřeny 6. den ($48,54 \pm 1,75$ %). Rozdíl mezi těmito dny je téměř třetinový (33,12 %).

Odběrový den	Poškození membrány %	Poškození akrozomu %	Nízká mtch. aktivita %
1 (n = 32)	81,64 ± 0,93 bg	73,36 ± 1,70 a	87,76 ± 1,27 ag
2 (n = 40)	79,02 ± 0,80 b	60,55 ± 1,41 c	70,81 ± 1,18 ce
3 (n = 20)	84,36 ± 1,12 ecg	58,14 ± 1,90 c	86,53 ± 2,49 ab
4 (n = 40)	72,05 ± 0,77 f	57,18 ± 1,29 c	72,41 ± 1,07 ce
5 (n = 40)	78,10 ± 0,82 b	66,11 ± 1,32 b	83,93 ± 1,12 ab
6 (n = 28)	77,20 ± 1,21 b	48,54 ± 1,75 d	83,04 ± 1,35 ab
7 (n = 56)	88,56 ± 0,67 ac	64,45 ± 1,10 c	93,45 ± 0,96 ce
8 (n = 24)	68,01 ± 1,06 d	64,72 ± 1,72 bc	69,11 ± 1,53 d
9 (n = 40)	90,13 ± 0,79 ac	81,66 ± 1,36 a	84,57 ± 1,05 ab
10 (n = 40)	91,71 ± 0,80 a	73,56 ± 1,32 b	93,78 ± 1,09 eg

Tabulka č. 4: Procentuální zastoupení spermií v průběhu jednotlivých odběrových dní
LSM ± SEM

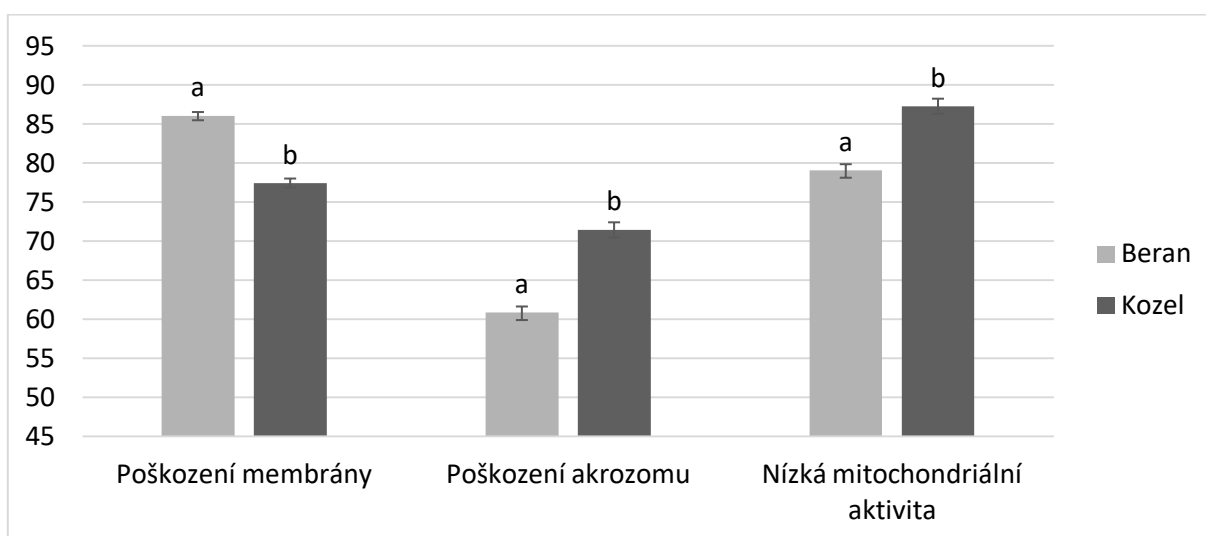
a–g = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$)

5.3.2.2 Vliv druhu

Poškození cytoplazmatické membrány spermií bylo u berana $86,04 \pm 0,48$ %. U kozla mělo poškozenou membránu $77,42 \pm 0,58$ % spermatických buněk. Pouze v tomto parametru po kryokonzervaci vykazoval kozel statisticky významně lepší hodnoty, než berani.

Poškození akrozomu a nízká mitochondriální aktivita byla kozla vyšší než u beranů. Berani měli $60,85 \pm 0,76$ % spermií s poškozeným akrozomem a kozel $71,42 \pm 0,98$ %.

Nízká mitochondriální aktivita byla u $79,07 \pm 0,77$ % beraních a $87,26 \pm 0,97$ % u kozlích spermií. Všechny hodnoty jsou podrobně uvedeny v Graf č. 5: Procentuální zastoupení spermií u jednotlivých druhů



Graf č. 5: Procentuální zastoupení spermií u jednotlivých druhů

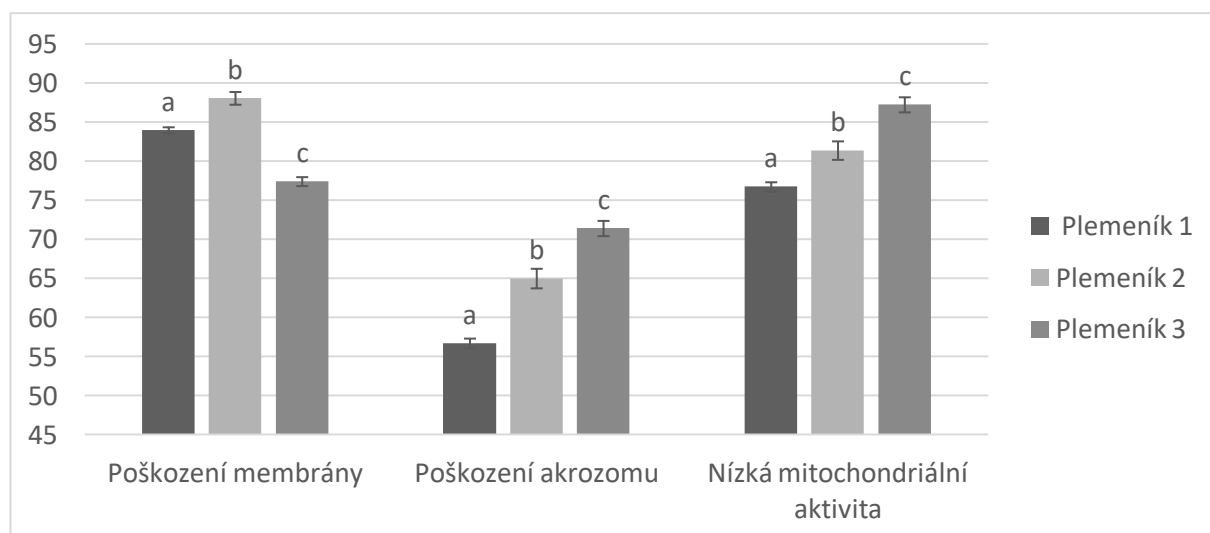
LSM ± SEM

Beran, n = 264; Kozel, n = 96

a–b = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

5.3.2.3 Vliv pleménika v rámci druhu

Vliv pleménika v rámci druhu na jednotlivé parametry mají stejný charakter, jako druhová příslušnost. Množství spermií s poškozenou cytoplazmatickou membránou bylo nejmenší u pleménika 3 (kozla). Ostatní ukazatele byly statisticky průkazně lepší u pleméniků 1 a 2 (berani). Statisticky významné rozdíly však lze pozorovat i mezi pleméniky v rámci jednoho druhu. Všechny parametry, tedy poškození membrány, akrozomu a mitochondriální aktivita jsou lepší ve prospěch pleménika 1. Všechny hodnoty jsou podrobně uvedeny v Graf č. 6: Procentuální zastoupení spermií u jednotlivých pleméniků



Graf č. 6: Procentuální zastoupení spermií u jednotlivých plemenů

LSM ± SEM

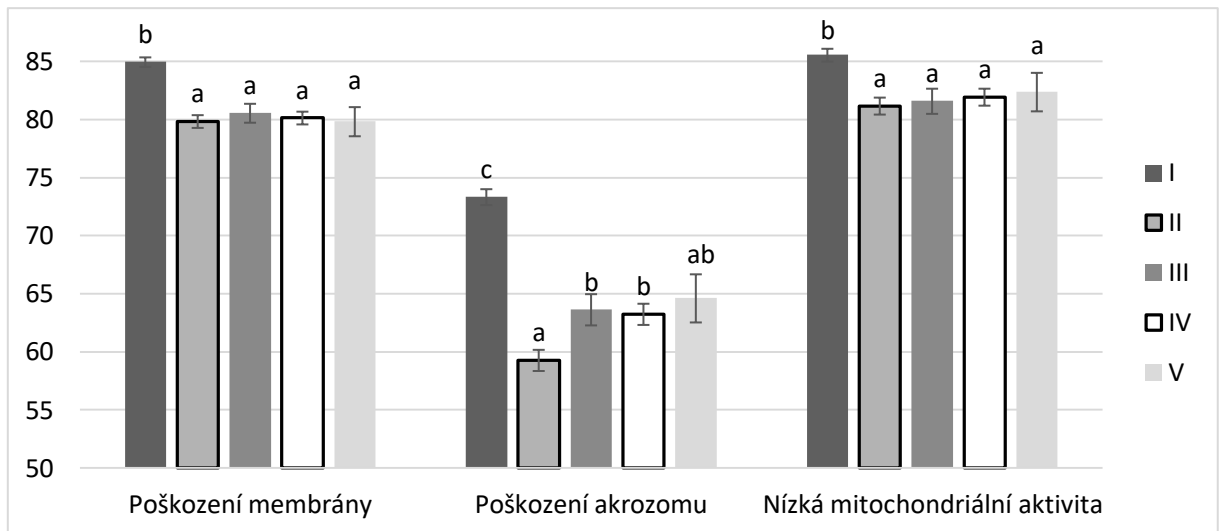
Plemeník 1 (beran), n = 208; plemeník 2 (beran), n = 56; plemeník 3 (kozel), n = 96

a–c = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

5.3.2.4 Vliv mrazicí křivky

Mrazicí křivka I měla statisticky významně nejhorší výsledky u všech sledovaných parametrů konzervovaného beraního a kozlího semene. Na poškození cytoplazmatické membrány a mitochondriální aktivitu měly všechny ostatní použité křivky srovnatelný vliv.

Při použití mrazicí křivky II bylo dosaženo nejnižšího poškození akrozomu ($59,28 \pm 0,91$ %), oproti křivce I, kdy mělo poškozený akrozom $73,34 \pm 0,68$ spermií. Tato křivka je v tomto ohledu také lepší než křivka III ($63,64 \pm 1,35$ %) a IV ($63,25 \pm 0,91$ %). Mezi křivkou II a V ($64,62 \pm 2,07$ %) není rozdíl průkazný, pravděpodobně z důvodu nízkého počtu pozorování, ovšem i v tomto případě bylo dosažení o 5,34 % lepších výsledků.



Graf č. 7: Procentuální zastoupení spermií při použití odlišných mrazicích křivek
LSM ± SEM

křivka I, n = 156; křivka II, n = 76; křivka III, n = 36; křivka IV, n = 76; křivka V, n = 16
a–c = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

6 Diskuze

Cílem práce byla optimalizace postupu kryokonzervace spermatu malých přežvýkavců tím, že bude určena ideální mrazicí křivka při výrobě inseminačních dávek bez použití programovatelného mrazicího zařízení. Sperma bylo mrazeno v polystyrenovém boxu a průběh mrazení byla řízen vzdáleností pejet od hladiny tekutého dusíku. Ideální mrazicí postup byl určen na základě nejvyššího množství spermatických buněk, které si zachovaly oplozovací schopnost, definovanou neporušenou cytoplazmatickou membránou, nepoškozeným akrozomem a vykazující vysokou mitochondriální aktivitu (Dolník a kol., 2019; Martínez-Pastor a kol., 2010).

Dle výsledků této práce není statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými modifikacemi mrazicího postupu dle Ptáček a kol. (2019). Při použití křivky II rozmrazené pejety obsahovaly průměrně $8,33 \pm 0,57$ % životaschopných spermií, u křivky III $8,30 \pm 0,81$ %, $8,39 \pm 0,57$ % u křivky IV a $9,71 \pm 1,21$ % u křivky V. Statisticky horších výsledků bylo však dosaženo při využití křivky I, tedy metody, při níž jsou pejety umístěny nad hladinu tekutého dusíku, bez řízeného poklesu teploty, a to $4,79 \pm 0,45$ %.

Stejný trend vykazuje vliv mrazicí křivky na jednotlivé sledované vlastnosti spermatických buněk. Nejhorších výsledků bylo vždy dosaženo při použití křivky I. Mezi ostatními použitými křivkami není žádný statisticky významný rozdíl. Jedinou výjimku lze najít u akrozomálního poškození, kdy při použití křivky II bylo množství takto poškozených spermií nejnižší.

Galarza a kol. (2019) se ve své studii zabývali vlivem průběhu mrazení na beraní spermií. Byly porovnávány tři mrazicí křivky. Křivka 1 kopírovala pokles teploty, při kterém dochází při nekontrolovaném mrazení v parách tekutého dusíku, při použití křivky 2 byl průběh mrazení od $+5$ °C do -5 °C (4 °C \times min $^{-1}$), od -5 °C do -110 °C (25 °C \times min $^{-1}$) a od -110 °C do -140 °C (35 °C \times min $^{-1}$) a u křivky 3 od $+5$ °C do -10 °C (5 °C \times min $^{-1}$) a od -10 °C do -130 °C (60 °C \times min $^{-1}$). Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití křivky 3 a nejhorší kvality dosahovaly vzorky mrazené podle křivky 1. Autoři uvádí, že nejnižšího poškození spermií bylo dosaženo díky rychlosti poklesu teploty o 60 °C \times min $^{-1}$ v rozmezí -10 až -25 °C, kdy dochází k největšímu poškození buněk. V naší práci, stejně jako ve studii Galarza a kol. (2019), se jeví nejméně vhodná metoda statické mrazení pejet nad hladinou kapalného dusíku, ačkoli se pokles teploty v této práci značně lišil od hodnot, které doporučují (průměrná rychlost poklesu u jednotlivých křivek v rozmezí -10 až -5 °C: II: $5,5$ °C \times min $^{-1}$;

III: $3,8$ °C \times min $^{-1}$; IV: $2,7$ °C \times min $^{-1}$; V: $2,2$ °C \times min $^{-1}$).

Také Jha a kol. (2019) uvádějí podobné výsledky. V jejich práci byly tři skupiny vzorků mrazeny různou rychlostí. První skupina byla mrazena 5 cm nad hladinou tekutého dusíku po dobu 9,5 minut, od 5 °C do -140 °C průměrnou rychlostí $-15,26$ °C \times min $^{-1}$. Druhá skupina byla mrazena od 5 °C do -80 °C rychlostí $-11,33$ °C \times min $^{-1}$ a od -80 °C do -140 °C rychlostí -30 °C \times min $^{-1}$. Třetí skupina od 5 °C do -80 °C rychlostí $-11,33$ °C \times min $^{-1}$, od -80 °C do -120 °C rychlostí $-26,66$ °C \times min $^{-1}$ a od -120 °C do -140 °C rychlostí $13,33$ °C \times min $^{-1}$. Jako nejspolehlivější metoda se dle této práce jeví postup, kterým byla mrazena třetí skupina vzorků. Nejnižší motilitu, a nejvyššího poškození membrány a akrozomu dosahovaly vzorky, které byly mrazeny statickým umístěním nad hladinu tekutého dusíku.

I když je v naší práci není pokles teploty u řízeného mrazení mírně totožný jako ve výše uvedených studiích, tak jsou křivky II, III, IV a V lepší než mrazení v parách tekutého dusíku. Pravděpodobným odůvodněním může být pozvolnější charakter poklesu teploty v počátečních fázích mrazení.

Leboeuf a kol. (2000) pro mrazení kozlího spermatu doporučují ponechat pejety 4–5 cm nad hladinou tekutého dusíku po dobu 4–5 minut a následně ponořit, popřípadě umístit pejety 16 cm nad hladinu po dobu 2 minut a následně přemístit 4 cm nad hladinu a zde nechat 3 minuty. Choe a kol. (2006) však udávají jako vhodnější postup mrazit pejety 5 cm nad hladinou po 10 minut oproti poklesu z 5 °C na -5 °C rychlostí $-0.5\text{ °C}\times\text{min}^{-1}$, zde nechat po dobu 10 minut, dále rychlostí $-1\text{ °C}\times\text{min}^{-1}$ ochladit na -30 °C a vložit do tekutého dusíku. Jako další méně vhodný způsob, oproti statickému mrazení, uvádí ochlazení vzorků z 5 °C na -5 °C rychlostí $-0.5\text{ °C}\times\text{min}^{-1}$, zde ponechat 10 minut, následně zchladit na -15 °C rychlostí $-1\text{ °C}\times\text{min}^{-1}$ a poté umístit 5 cm nad hladinu po dobu 10 minut a pak vložit do dusíku. Také Küçük a kol. (2014) ve své práci mrazili kozlí sperma 4 cm nad hladinou dusíku po dobu 7 minut.

Vliv druhové příslušnosti na oplozovací schopnost byl statisticky významný. U beranů dosahovala $9,94 \pm 0,52\%$, u kozla $5,05 \pm 0,86\%$. Jednotlivé sledované vlastnosti byly v případě kozla také horší. Jedinou výjimku představuje poškození cytoplazmatické membrány, které bylo u kozla nižší než u obou beranů. Celkově však kozel v našem případě vykazuje nižší toleranci ke kryokonzervaci.

Mezi jednotlivými plemeníky lze také pozorovat statisticky významné rozdíly. Průměrné množství oplození schopných spermií u plemeníka 1 (beran) představovalo $12,58 \pm 0,40\%$, u plemeníka 2 (beran) $7,31 \pm 0,81\%$, oproti $5,5 \pm 0,86\%$ u plemeníka 3 (kozel). To odpovídá Agossou a Koluman (2018), kteří uvádějí, že krom použitého ředidla, kryoprotektantu a rychlosti mrazení a rozmrazení hraje významnou roli také individualita zvířete a jeho tolerance ke kryokonzervaci.

V rámci jednotlivých odběrových dnů se kvalita lišila a mezi jednotlivými dny se vyskytovaly průkazné rozdíly. Průměrné množství oplození schopných spermií se pohybovalo od téměř nulových hodnot až po přibližně 20 %.

V mírných zeměpisných šířkách, nad 40 ° severní polokoule, lze pozorovat jasnou sezónnost. Nejlepších reprodukčních ukazatelů bývá dosaženo zpravidla v průběhu reprodukční sezóny, tedy na konci léta a v průběhu podzimu (D'Allesandro a Martemucci, 2003). Autoři uvádějí, že inseminační dávky, vyrobené ze semene, které bylo odebráno v toto období má lepší mrazitelnost.

V práci, kterou prováděli Ptáček a kol. (2019) bylo sperma odebíráno v průběhu roku, a to v srpnu (před začátkem reprodukčního období), v říjnu (v průběhu reprodukčního období) a v prosinci (po skončení reprodukčního období). Prokazatelně lepší parametry motility po kryokonzervaci měly spermie, obsažené ve vzorcích odebraných v průběhu října. Tento trend byl pozorovatelný u vzorků, které byly hodnoceny ihned po rozmrazení a také při analýze provedené 2 hodiny po rozmrazení.

Vzorky pro naši práci byly odebírány v průběhu zimy, v lednu a v únoru. Provedení odběrů v doporučené období by potenciálně mohlo zlepšit výsledky. Karagiannidis a kol. (2000) však na základě své práce uvádějí, že i navzdory sezónnosti, lze berany využívat k rozmnožování po celý rok.

Ari a kol. (2011) uvádějí, že jednodenní interval mezi odběry spermatu, které je následně využíváno pro kryokonzervaci je vhodnější oproti čtyřdennímu intervalu. To je částečně v souladu s výsledky naší práce. Pro naši práci byl odběr prováděn vždy v úterý a ve čtvrtek (viz Příloha č. 2: Jednotlivé odběrové dny). Lze pozorovat, že v téměř každý týden, jsou výsledky lepší ve čtvrtek, tedy až ve druhý odběrový den.

Vliv na kvalitu vzorků po rozmrazení má také způsob, kterým byly schlazeny před ekvilibrací a samotná ekvilibrace. Jako ideální teplota, při které by měly být vzorky ekvilibrovány, se uvádí 5 °C (Kumar a kol., 2009). V chladicím boxu, který byl použit pro tuto práci, se teplota pohybovala v rozmezí od 5 do 10 °C. To, že teplota chladicího boxu není stále konstantní mohlo také ovlivnit variabilitu výsledků v jednotlivých odběrových dnech.

Dalším aspektem, který ovlivňuje kvalitu výsledků je rychlost, jakou jsou vzorky ochlazeny před ekvilibrací. Aby se předešlo poškození spermií vlivem chladového šoku, je vhodné, aby byla rychlost poklesu teploty přibližně $-0,15 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Kumar a kol., 2009). Ke chlazení je možné použít programovatelné chladicí zařízení, nebo je možné ideálního poklesu teploty dosáhnout vložením pejet do optimalizovaného objemu vody o stejné teplotě jako je teplota vzorků a následným vložením do chladicího boxu, ve kterém je teplota 5 °C. V této práci byly vzorky jen vloženy do chladicího boxu a pokles zde probíhal neřízeně. Následným měřením byla zjištěn průměrný pokles teploty o $1,5 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. V naší práci dosáhly vzorky teploty, při které probíhala ekvilibrace, průměrně za 10 minut.

To potvrzují také Joshi a kol. (2008). Ve své práci porovnával vzorky, které byly na 5 °C ochlazeny rychlostí $-0,15 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a vzorky ve druhé skupině byly chlazeny nekontrolovanou rychlostí vložením do chladicího boxu s teplotou 5 °C. Spermie chlazené kontrolovaným poklesem teploty vykazovaly lepší motilitu a integritu akrozomu.

Sledované vlastnosti byly hodnoceny pomocí průtokového cytometru. Dle Martínez-Pastor a kol. (2010) je doporučována kombinace více metod, jako například metody využívající fluorescenční barvení a CASA. Výsledky naší práce však korelují s výsledky Ashrafi a kol. (2011). Ti ve své práci porovnávali pomocí CASA motilitu beraních spermií, které byly umístěny po dobu 15 minut, 4 cm nad hladinou tekutého dusíku oproti vzorkům, u kterých byl pokles teploty kontrolován a měl nižší rychlost. Dle autorů je pomocí řízeného poklesu teploty možné dosáhnout výrazně lepších pohybových charakteristik spermií.

Na základě naší práce lze doporučit, že modifikace mrazicí křivky, při které je pokles pozvolnější. Oproti přímému vložení do par tekutého dusíku je řízený pokles teploty ve všech variantách prodloužení jeho průběhu lepší. Potenciálně nejvýhodnější se jeví mrazicí křivka V, tedy modifikace, kdy je doba třikrát prodloužena oproti křivce II. I přes to, že nebyl shledán statisticky významný rozdíl s ostatními modifikacemi, průměrné množství oplození schopných spermií bylo vyšší. Nutno však přihlídnout k faktu, že při této metodě nebylo hodnoceno tak vysoké množství vzorků jako v ostatních případech.

V budoucnosti by tedy bylo vhodné se touto skutečností zabývat a zjistit, zda mrazicí křivka V přináší skutečně lepší výsledky, demonstrováné statisticky průkaznými rozdíly oproti ostatním postupům. Výsledky každopádně naznačují alternativu ke standardně prováděnému způsobu zmrazování pejet nad hladinou tekutého dusíku. Mrazení za použití alternativních křivek bylo úspěšně testováno v provozních podmínkách, kam jsou tyto mobilní kryoboxy primárně určeny. Statisticky neprůkazné rozdíly mezi křivkami II, III, IV a V naznačují, že i v případě, že nejsme v provozu schopni dosáhnout zcela uniformního způsobu mrazení, kvalita inseminačních dávek by neměla být nijak významně negativně ovlivněna.

7 Závěr

Cílem práce bylo optimalizovat postup pro mrazení inseminačních dávek malých přežvýkavců, bez využití programovatelného mrazicího zařízení. Bylo porovnáváno pět mrazicích křivek. Mrazení bylo provedeno pomocí polystyrenového boxu upraveného tak, aby bylo možné průběh mrazení regulovat vzdáleností pejet od hladiny tekutého dusíku.

U vzorků bylo hodnoceno poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu a mitochondriální aktivita. Pokud byla buňka bez poškození, s vysokou mitochondriální aktivitou, byla vyhodnocena jako oplození schopná. Měření probíhalo pomocí průtokové cytometrie.

Nejhorších výsledků bylo jednoznačně dosaženo při použití mrazicí křivky I (4 cm nad hladinou tekutého dusíku). Při tomto postupu bylo naměřeno nejmenší množství oplození schopných spermií. Všechny jednotlivé měřené parametry byly v tomto případě nejnižší. Mezi ostatními mrazicími křivkami, kdy byl pokles teploty regulován (křivka II: průměrně $17\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, III: $12\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, IV: $10\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$, V: $7\text{ }^{\circ}\text{C}\times\text{min}^{-1}$) nebyl statisticky významný rozdíl.

Pro výrobu inseminačních dávek malých přežvýkavců v polních podmínkách lze na základě této práce doporučit jakýkoli mrazicí postup, při kterém byl pokles teploty regulován změnou vzdálenosti od hladiny tekutého dusíku (II, III, IV, V). Na základě statisticky neprůkazných rozdílů mezi těmito postupy lze usoudit, že inseminační dávky lze vyrobit bez ztráty kvality i v případě, že nejsme schopni dosáhnout zcela uniformního způsobu mrazení.

Jako potenciálně nejspokojivější se jeví mrazicí křivka V. Při použití této křivky bylo dosaženo nejvyššího množství oplození schopných spermií. Pomocí tohoto postupu však bylo mrazeno nejmenší množství vzorků. V budoucnu by tedy bylo vhodné potvrdit, zda je možné pomocí křivky V vyrobit inseminační dávky nejvyšší kvality.

8 Seznam použité literatury

- Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Damián JP, Giriboni J, Villagrà-García A, Ungerfeld R. 2017. Ejaculation does not contribute to the stress response to electroejaculation in sheep. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* **52**:403–408.
- Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Giriboni J, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. 2019. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science* **205**:1–9.
- Abu AH, Kisani AI, Ahemen T. 2016. Evaluation of sperm recovered after slaughter from cauda epididymides of red Sokoto bucks. *Veterinary World* **9**:1440–1444.
- Agossou J, Koluman-Darcan N. 2018. An Objective Analysis of Factors Affecting Buck Semen Quality Attributes during Cryopreservation: A Mini Review. *Annual Research & Review in Biology* **27**.
- Akpa, G. N., Suleiman, I., Alphonsus, C., Adu, A. 2012. The variation of age, hair type and body condition score with sperm morphology and cation concentration in yankasa ram **47**:8629–8636.
- Alvarez M, Tamayo-Canul J, Anel E, Boixo JC, Mata-Campuzano M, Martinez-Pastor F, Anel L, de Paz P. 2012. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology* **77**:1111–1118.
- Álvarez M, Tamayo-Canul J, Martínez-Rodríguez C, López-Urueña E, Gomes-Alves S, Anel L, Martínez-Pastor F, de Paz P. 2012. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Animal Reproduction Science* **132**:145–154.
- Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Anel E, de Paz P. 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* **41 Suppl 2**:30–42.
- Anel L, de Paz P, Álvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, González M, Kaabi M, Anel E. 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* **60**:1293–1308.
- Anel L, Kaabi M, Abroug B, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Fuente LF de la, Paz P de. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology* **63**:1235–1247.
- Anzalone DA, Palazzese L, Iuso D, Martino G, Loi P. 2018. Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species. *Animal Reproduction Science* **190**:85–93.

- Arando A, Delgado JV, Arrebola FA, León JM, Alcalá CJ, Pérez-Marín CC. 2019. Vitrification induces critical subcellular damages in ram spermatozoa. *Cryobiology* **87**:52–59.
- Ari U, Necdet A, Lehimcioğlu C, Yildiz S, Kulaksız R, Öztürkler Y. 2011. Effects of semen collection interval on fresh and frozen semen parameters in Tushin rams. *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy* **55**:67–70.
- Ashrafi I, Kohram H, Najjian H, Poorhamdollah M, Mirzakhani H. 2011. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* **10(44)**:8965–8969.
- Avdi M, Banos G, Stefos K, Chemineau P. 2004. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. *Theriogenology* **62**:275–282.
- Benia AR, Saadi MA, Ait-Amrane A, Belhamiti TB, Ammar S, Kaidi R. 2018. Effect of season and age on main characteristics of sperm production in the Ouled-Djellal rams. *Livestock Research for Rural Development* **30**.
- Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. 2013. *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer Science & Business Media.
- Brindley GS. 1981. Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **44**:9–18.
- Brito LFC et al. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* **85**:1507–1527.
- Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science* **62**:265–275.
- Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalira A, Menchaca A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology* **103**:30–35.
- Chávez J, Quezada-Casasola A, Pérez-Eguía E, Itzá-Ortiz M, Gutiérrez-Hernández J, Quintero-Elisea J, Tortora J. 2016. Sperm quality in naturally infected rams with *Brucella ovis*. *Small Ruminant Research* **144**:220–224.
- Choe C-Y, Kim J-G, Cho S-R, Son D-S, Kim Y-K, Balasubramanian S, Choe S-Y, Rho G-J. 2006. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. *Reproduction in Domestic Animals* **41**:55–60.
- Christensen P, Stenvang JP, Godfrey WL. 2004. A Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Sperm Concentration and Viability in Mammalian and Avian Semen. *Journal of Andrology* **25**:255–264.

- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* **130**:187–192.
- D'Alessandro AG, Martemucci G. 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science* **79**:93–102.
- Damián J, Ungerfeld R. 2010. The Stress Response of Frequently Electroejaculated Rams to Electroejaculation: Hormonal, Physiological, Biochemical, Haematological and Behavioural Parameters. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **46**:646–50.
- David E. Noakes BVet Med PhD FRCVS DVRRep, Timothy J. Parkinson BVSc PhD DBR, Gary C. W. England BVetmed PhD FRCVS CertVA DVR DVRRep, editors. 2009. *Veterinary Reproduction & Obstetrics*, 9e9 edition. Saunders Ltd., Edinburgh.
- David I, Druart X, Lagriffoul G, Manfredi E, Robert-Granié C, Bodin L. 2007. Genetic and environmental effects on semen traits in Lacaune and Manech tête rousse AI rams (Open Access publication). *Genetics Selection Evolution* **39**.
- David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, Druart X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science* **161**:75–81.
- Dolník M, Mudroňová D, Pošivák J, Lazar G, Mudroň P. 2019. Flow cytometry in assessment of sperm integrity and functionality – a review. *Acta Veterinaria Brno* **88**:169–175.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*. Butterworths, Sydney.
- Faigl V, Vass N, Jávora A, Kulcsár-Huszenicza M, Solti L, Amiridis GS, Cseh S. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta veterinaria Hungarica* **60**:115–29.
- Falchi L, Galleri G, Zedda MT, Pau S, Bogliolo L, Ariu F, Ledda S. 2018. Liquid storage of ram semen for 96h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science* **207**:1–6.
- Ferreira CER, Goularte KL, da Cruz Tavares G, Gheller SMM, Mondadori RG, Vieira AD, Lucia T. 2019. Impact of Distinct Freezing Curves on the Quality of Ram Sperm after Thawing. *Cryo Letters* **40**:193–199.
- Furstoss V, David I, Leboeuf B, Guillouet P, Boué P, Bodin L. 2009. Genetic and non-genetic parameters of several characteristics of production and semen quality in young bucks. *Animal Reproduction Science* **110**:25–36.

Galarza DA, López-Sebastián A, Woelders H, Blesbois E, Santiago-Moreno J. 2019. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*.

Gamčík P, Kozumplík J. 1992. *Andrológia a umela inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava.

Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* **59**:1241–1255.

Gil L, Olaciregui M, Luño V, Malo C, González N, Martínez F. 2014. Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reproduction in Domestic Animals* **49**:72–81.

Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* **63**:445–457.

Gouletsou PG, Fthenakis GC. 2015. Microbial diseases of the genital system of rams or bucks. *Veterinary Microbiology* **181**:130–135.

Hafez ESE, Hafez B, editors. 2000. *Reproduction in Farm Animals* 7 edition. Wiley-Blackwell, Philadelphia.

Hajihassani A, Ahmadi E, Shirazi A, Shams-Esfandabadi N. 2019. Reduced glutathione in the freezing extender improves the in vitro fertility of ram epididymal spermatozoa. *Small Ruminant Research* **174**:13–18.

Hegedúšová Z, Štolc L, Louda F, Čunát L, Vejnar J. 2012. Effect of different extenders on ram sperm traits during storage. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **60**:111–116.

Hošek M. 2016. *Sheep and Goat Insemination*. Mendel University in Brno.

Hossain MdS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* **13**:406–419.

Iwaniak W, Pilaszek J. 2002. Ovine epididymitis in rams caused by *Brucella ovis*. *Medycyna Weterynaryjna* **58**:181–184.

Jelínek K. 2002. *Morfologie hospodárskych zvierat*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

Jennings TA. 1999. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles* 1 edition. CRC Press, Englewood. CO.

- Jha PK, Shahi Alam MG, Mansur AAL, Naher N, Islam T, Uddin Bhuiyan M, Bari FY. 2019. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. *Cryobiology* **89**:35–41.
- Jiménez-Rabadán P, García-Álvarez O, Vidal A, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Ramón M, del Olmo E, Fernández-Santos R, Garde JJ, Soler AJ. 2015. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology* **71**:85–90.
- Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Fernández-Santos MR, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science* **167**:103–108.
- Joshi A, Kumar D, Naqvi M, Maurya V. 2008. Effect of Controlled and Uncontrolled Rate of Cooling, Prior to Controlled Rate of Freezing, on Motion Characteristics and Acrosomal Integrity of Cryopreserved Ram Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking - BIOPRESERV BIOBANK* **6**:277–284.
- Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**:536–551.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraiez P, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* **60**:1249–1259.
- Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. 2000. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research* **37**:125–130.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Tibary A, Pelzer K. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Ruminant Research* **99**:208–213.
- Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research* **44**:153–158.
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* **64**:1225–1235.
- Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A, Serin İ. 2014. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology* **68**:327–331.

- Kumar D, Joshi A, Naqvi M. 2009. Effect of post-thaw incubation on semen characteristics of ram spermatozoa cryopreserved under controlled and uncontrolled rate of cooling. *Anim. Reprod* **6**:526–534.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* **46**:246–253.
- Leboeuf B, Le Vern Y, Furstoss V, Kerboeuf D, Guillouet P, Magistrini M. 2006. Response of goat sperm to hypoosmotic steps modelled probit analysis. *Animal Reproduction Science* **91**:265–274.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* **62**:113–141.
- Ledesma A, Manes J, Cesari A, Alberio R, Hozbor F. 2014. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in Corriedale rams. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* **49**:324–332.
- Lincoln GA, Davidson W. 1977. The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility* **49**:267–276.
- Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. 2018. Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation and Biobanking* **17**:171–182.
- Magistrini M, Guitton E, Levern Y, Nicolle JC, Vidament M, Kerboeuf D, Palmer E. 1997. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* **48**:1229–1235.
- Maksimovic N, Milovanovic A, Barna T, Caro Petrovic V, Pantelic V, Lazarevic M, Stojanov I. 2018. Short-term liquid storage of ram semen in various extenders. *South African Journal of Animal Science* **48**:717–723. South African Society for Animal Science (SASAS).
- Malejane C, Greyling J, Raito M. 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *South African Journal of Animal Science* **44**:26.
- Mandy FF, Bergeron M, Minkus T. 1995. Principles of flow cytometry. *Transfusion Science* **16**:303–314.
- Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, Paz PD. 2010. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:67–78.
- Marvan F. 2007. *Morfologie hospodářských zvířat*, 4th edition. Brázda, Praha.

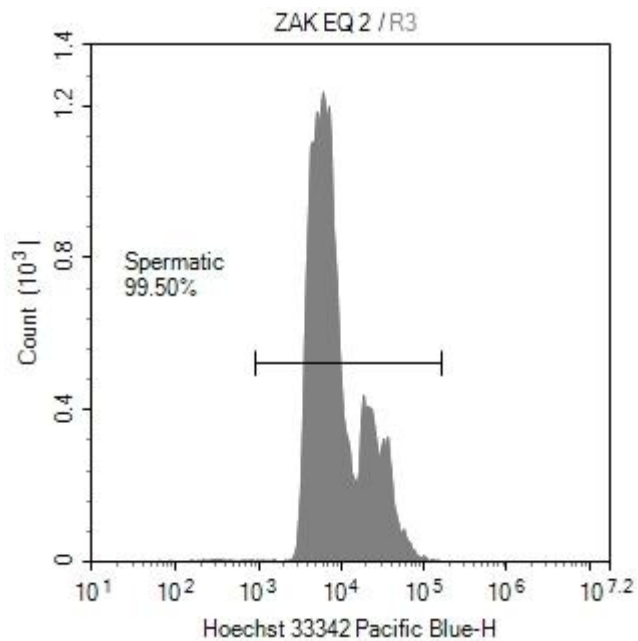
- Matthews N, Bester N, Schwalbach LMJ. 2003. A comparison of ram semen collected by artificial vagina and electro-ejaculation. *S.A. Anim. Sci.* **4**:28–30.
- Maurya VP, Sejian V, Kumar D, Naqvi SMK. 2010. Effect of induced body condition score differences on sexual behavior, scrotal measurements, semen attributes and endocrine responses in Malpura rams under hot semi-arid environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **94**:e308–e317.
- Maxwell WMC, Landers AJ, Evans G. 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* **43**:1201–1210.
- McKinnon KM. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* **120**:5.1.1-5.1.11.
- Mohammed KM, Khalil MH, Al-Saef AM. 2013. Genetic analysis for semen traits in a crossing program of Saudi Aradi with Damascus goats. *Small Ruminant Research* **112**:7–14.
- Nagy S, Jansen J, Topper E, Gadella B. 2003. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. *Biology of reproduction* **68**:1828–35.
- Nalley WMM, Arifiantini I. 2013. The hypo-osmotic swelling test in fresh garut ram spermatozoa. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* **38**.
- Ntemka A, Kiossis E, Boscós C, Theodoridis A, Kourousekos G, Tsakmakidis I. 2019. Impact of old age and season on Chios ram semen quality. *Small Ruminant Research* **178**:15–17.
- Olaciregui M, Luño V, Domingo P, González N, Gil L. 2017. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific Reports* **7**:1096.
- Oldenhof H, Blässe A-K, Wolkers WF, Bollwein H, Sieme H. 2011. Osmotic properties of stallion sperm subpopulations determined by simultaneous assessment of cell volume and viability. *Theriogenology* **76**:386–391.
- Olivares CCS, Souza-Fabjan JMG de, Fonseca JF da, Balara MFA, Freitas VJ de F, Oliveira RV de, Brandão FZ. 2017. Comparison of Different Sperm Selection Techniques in Ram Frozen-Thawed Sperm. *Acta Scientiae Veterinariae* **45**:11.
- Plant TM, Zeleznik AJ. 2014. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press.

- Pradié J, Sánchez-Calabuig MJ, Castaño C, O'Brien E, Estes MC, Beltrán-Breña P, Maillo V, Santiago-Moreno J, Rizos D. 2018. Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology* **108**:314–320.
- Prathalingam NS, Holt WW, Revell SG, Jones S, Watson PF. 2006. The Precision and Accuracy of Six Different Methods to Determine Sperm Concentration. *Journal of Andrology* **27**:257–262.
- Ptáček M, Stádníková M, Savvulidi F, Stádník L. 2019. Ram Semen Cryopreservation Using Egg Yolk or Egg Yolk-free Extenders: Preliminary Results. *Scientia Agriculturae Bohemica* **50**:96–103.
- Pugh D, Baird AN. 2012. *Sheep and Goat Medicine*. Elsevier.
- Ramu S, Jeyendran RS. 2013. The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **927**:21–25.
- Reece WO. 2009. *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals* 4 edition. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Romano JE, Christians CJ. 2009. Sperm loss using different artificial vaginas in rams. *Small Ruminant Research* **83**:85–87.
- Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science* **72**:451–454. Cambridge University Press.
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* **62**:77–111.
- Santiago-Moreno J, Coloma M, Dorado J, Pastor A, Gómez-Guillamón F, Salas-Vega R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. 2009. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* **71**:1253–60.
- SAS (2011) SAS/STAT®9.4. User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. (n.d.).
- Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. 1997. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology* **48**:1115–1125.
- Sonar BP, Tiwari RP, Poyam MR, Mishra G, Sahu SB. 2014. Effect of post-thaw thermal resistance test on motility, membrane integrity and migration capacity of sperm in Gir bulls. *Indian Journal of Animal Sciences* **84**:170–172.
- Talarczyk-Desole J, Berger A, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. 2017. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: Can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? *Ginekologia Polska* **88**:56–60.

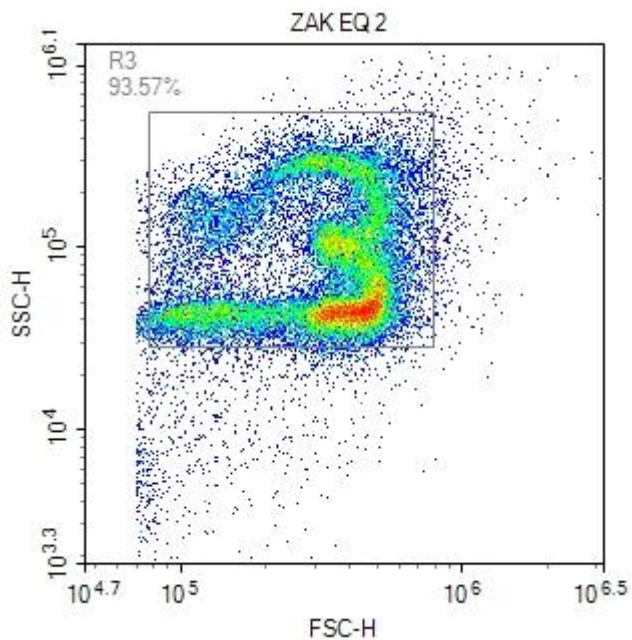
- Tao J, Critser ES, Critser JK. 1993. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development* **36**:183–194.
- Tsakmakidis I. 2010a. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research* **92**:126–130.
- Tsakmakidis IA. 2010b. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research* **92**:126–130.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* **57**:149–179.
- Wachida N, Emekopobong Bassey U, Dawuda PM. 2019. Effect of storage time on the quality of cauda epididymal spermatozoa of West African dwarf (WAD) rams. *Animal Reproduction Science* **205**:144–149.
- Wulster-Radcliffe M, Williams M, Stellflug J, Lewis G. 2002. Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of animal science* **79**:2964–7.
- Yotov S, Fasulkov I, Vassilev N. 2011. Effect of ejaculation frequency on spermatozoa survival in diluted semen from Pleven Blackhead rams. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **35**:117–122.
- Youngquist RS, Threlfall WR. 2007. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Elsevier Health Sciences.

9 Samostatné přílohy

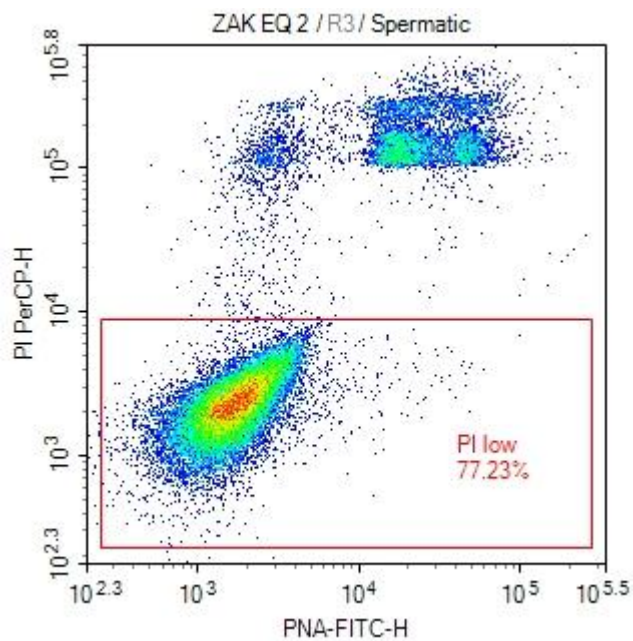
9.1 Příloha č. 1: Nastavení softwaru pro analýzu průtokovým cytometrem



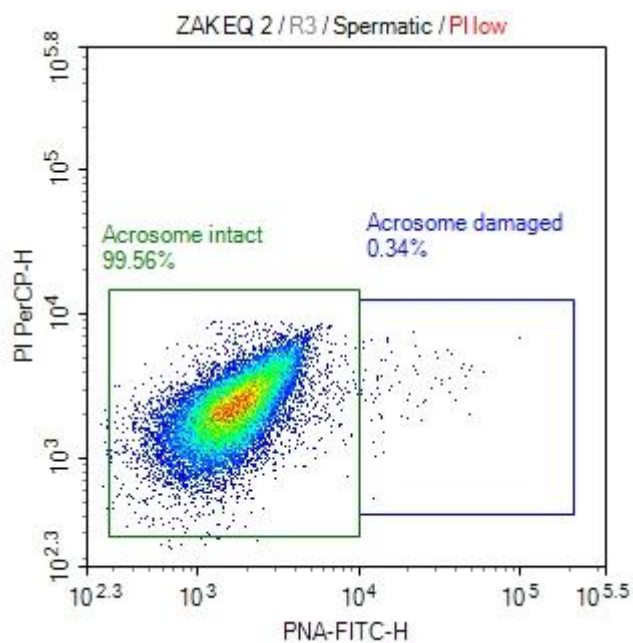
Obrázek č. 2: Spermatické buňky dle SSC a FFC (R3)



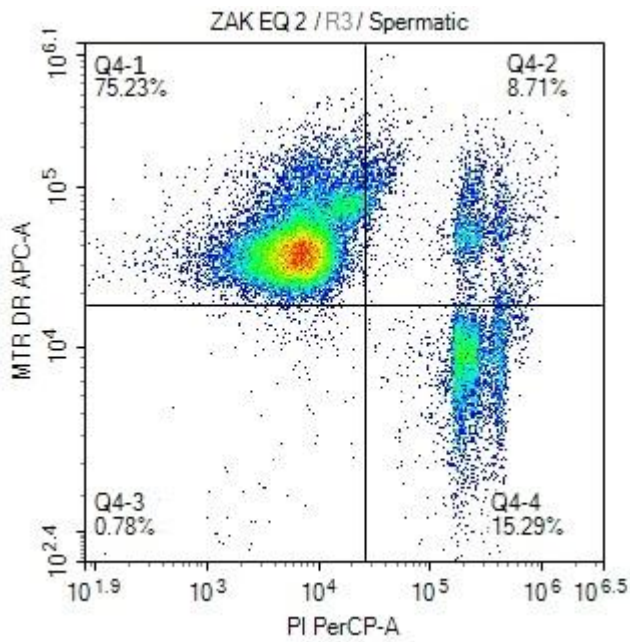
Obrázek č. 3: Spermatické buňky na základě intenzity fluorescence barviva Hoechst-33342 Pacific Blue (Spermatic)



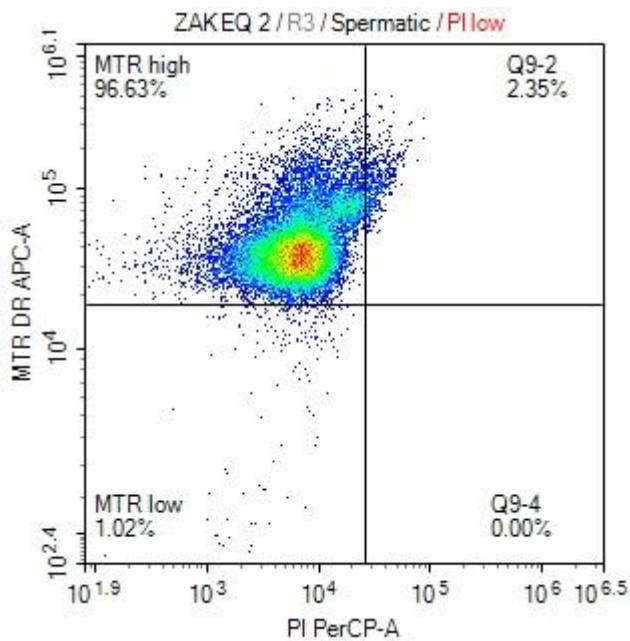
Obrázek č. 4: Spermatické buňky s nepoškozenou cytoplazmatickou membránou (PI low) na základě intenzity fluorescence barviva propidium iodid



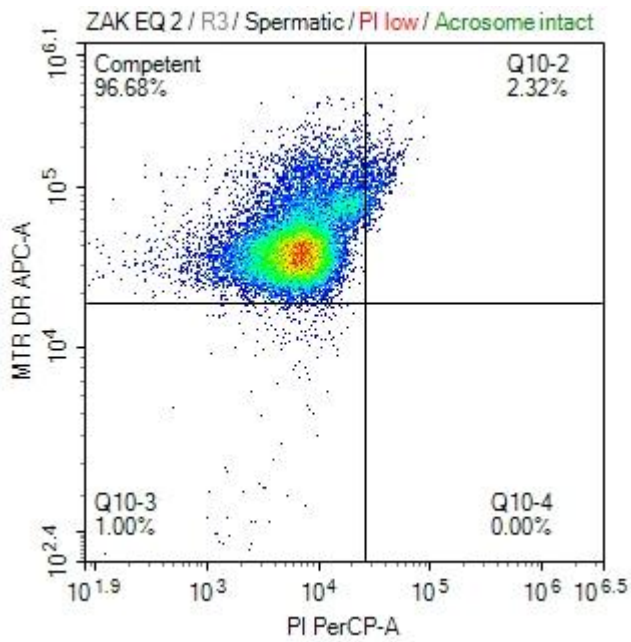
Obrázek č. 5: Spermatické buňky s poškozeným akrozomem (Acrosome damaged) a intaktním akrozomem (Acrosome intact) na základě intenzity fluorescence barviva PNA-FITC



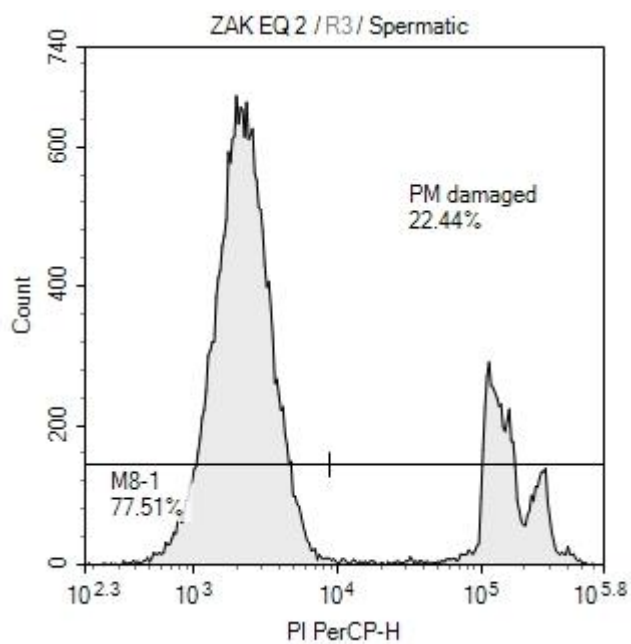
Obrázek č. 6: Spermatické buňky s vysokou mitochondriální aktivitou a nepoškozenou plazmatickou membránou (Q4-1) na základě intenzity fluorescence barviva Mitotracker Deep Red a propidium iodid



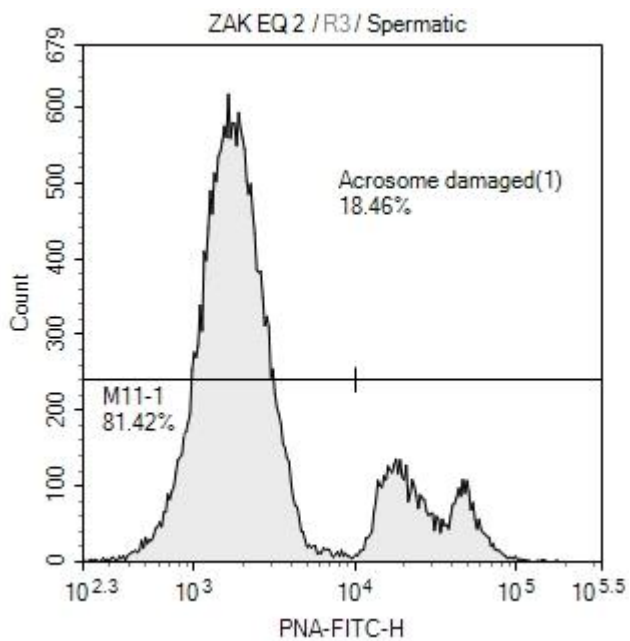
Obrázek č. 7: Spermatické buňky s vysokou mitochondriální aktivitou a nepoškozenou plazmatickou membránou (MTR high) na základě intenzity fluorescence barviva Mitotracker Deep Red a propidium iodid



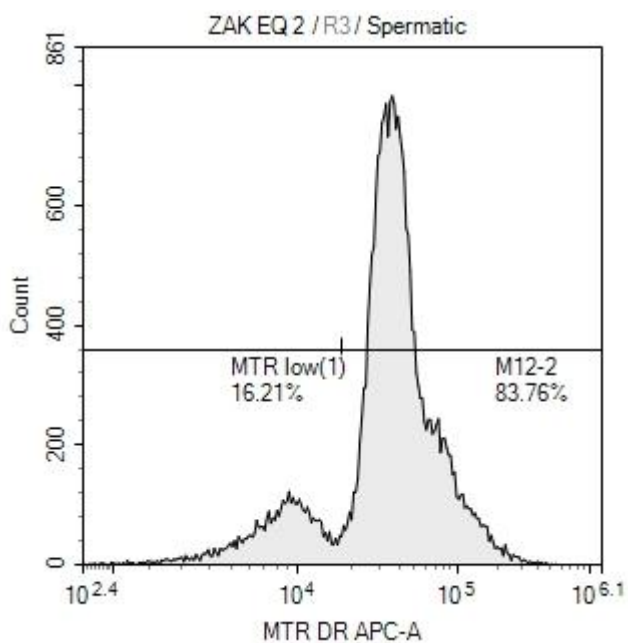
Obrázek č. 8: Oplození schopné spermie (Competent)



Obrázek č. 9: Spermatické buňky s poškozenou cytoplazmatickou membránou (PM damaged) na základě intenzity fluorescence barviva propidium iodid



Obrázek č. 10: Spermatické buňky s poškozeným akrozomem (Acrosome damaged) na základě intenzity fluorescence barviva PNA-FITC



Obrázek č. 11: Spermatické buňky s nízkou mitochondriální aktivitou (MTR low) na základě intenzity fluorescence barviva Mitotracker Deep Red

9.2 Příloha č. 2: Jednotlivé odběrové dny

Odběrový den	Datum
1	21.1.2020
2	23.1.2020
3	28.1.2020
4	30.1.2020
5	4.2.2020
6	6.2.2020
7	11.2.2020
8	13.2.2020
9	18.2.2020
10	20.2.2020

9.3 Příloha č. 3: Úplné výsledky

		LSM [%]	Směrodatná odchylka
Odběrový den		P < 0,05	
	1	4,50 ± 0,83	af
	2	12,90 ± 0,78	b
	3	3,13 ± 1,23	acf
	4	13,82 ± 0,79	b
	5	8,20 ± 0,75	d
	6	9,95 ± 1,02	cd
	7	2,14 ± 0,66	af
	8	21,70 ± 1,13	e
	9	3,77 ± 0,79	acd
	10	-1,05 ± 0,85	f
Druh		P < 0,05	
	Beran	9,94 ± 0,52	a
	Kozel	5,05 ± 0,86	b
Druh	Plemeník	P < 0,05	
Beran	1	12,58 ± 0,40	a
Beran	2	7,31 ± 0,81	b
Kozel	3	5,05 ± 0,86	b
Křivka		P < 0,05	
	I	4,79 ± 0,45	b
	II	8,33 ± 0,57	a
	III	8,30 ± 0,81	a
	IV	8,39 ± 0,57	a
	V	9,71 ± 1,21	a

Tabulka č. 5: Oplozovací schopnost spermií

a - f = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

		LSM [%]	Směrodatná odchylka
Odběrový den		P < 0,05	
1		81,64 ± 0,93	bg
2		79,02 ± 0,80	b
3		84,36 ± 1,12	ecg
4		72,05 ± 0,77	f
5		78,10 ± 0,82	b
6		77,20 ± 1,21	b
7		88,56 ± 0,67	ac
8		68,01 ± 1,06	d
9		90,13 ± 0,79	ac
10		91,71 ± 0,80	a
Druh		P < 0,05	
Beran		86,04 ± 0,48	a
Kozel		77,42 ± 0,58	b
Druh	Plemeník	P < 0,05	
Beran	1	83,99 ± 0,39	a
Beran	2	88,09 ± 0,81	b
Kozel	3	77,42 ± 0,58	c
Křivka		P < 0,05	
I		84,97 ± 0,41	b
II		79,85 ± 0,55	a
III		80,57 ± 0,81	a
IV		80,15 ± 0,55	a
V		79,84 ± 1,25	a

Tabulka č. 6: Poškození cytoplazmatické membrány

a - f = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

	LSM [%]	Směrodatná odchylka
Odběrový den		P < 0,05
1	73,36 ± 1,70	a
2	60,55 ± 1,41	c
3	58,14 ± 1,90	c
4	57,18 ± 1,29	c
5	66,11 ± 1,32	b
6	48,54 ± 1,75	d
7	64,45 ± 1,10	c
8	64,72 ± 1,72	bc
9	81,66 ± 1,36	a
10	73,56 ± 1,32	b
Druh		P < 0,05
Beran	60,85 ± 0,76	a
Kozel	71,42 ± 0,98	b
Druh	Plemeník	P < 0,05
Beran	1	56,70 ± 0,63 a
Beran	2	65,01 ± 1,25 b
Kozel	3	71,42 ± 0,98 c
Křivka		P < 0,05
I	73,34 ± 0,68	c
II	59,28 ± 0,91	a
III	63,64 ± 1,35	b
IV	63,25 ± 0,91	b
V	64,62 ± 2,07	ab

Tabulka č. 7: Poškození akrozomu

a - d = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)

		LSM [%]	Směrodatná odchylka
Odběrový den		P < 0,05	
1		87,76 ± 1,27	ag
2		70,81 ± 1,18	ce
3		86,53 ± 2,49	ab
4		72,41 ± 1,07	ce
5		83,93 ± 1,12	ab
6		83,04 ± 1,35	ab
7		93,45 ± 0,96	ce
8		69,11 ± 1,53	d
9		84,57 ± 1,05	ab
10		93,78 ± 1,09	eg
Druh		P < 0,05	
Beran		79,07 ± 0,77	a
Kozel		87,26 ± 0,97	b
Druh	Plemeník	P < 0,05	
Beran	1	76,74 ± 0,60	a
Beran	2	81,40 ± 1,18	b
Kozel	3	87,26 ± 0,97	c
Křivka		P < 0,05	
I		85,57 ± 0,55	b
II		81,18 ± 0,73	a
III		81,60 ± 1,08	a
IV		81,95 ± 0,73	a
V		82,39 ± 1,66	a

Tabulka č. 8: Nízká mitochondriální aktivita

a - e = Odlišná písmena potvrzují statisticky významný rozdíl (P<0,05)