

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Vliv přídavku glycerolu v různých fázích výroby beraních  
inseminačních dávek a jejich následné kvalitativní  
parametry po rozmrazení**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Anna Boudová**

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

**Konzultant: Ing. Filipp G. Savvulidi, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv přídavku glycerolu v různých fázích výroby beraních inseminačních dávek na jejich následné kvalitativní parametry po rozmrazení" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

---

## **Poděkování**

Tímto způsobem bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za veškeré odborné konzultace, teoretické informace, věcné připomínky a veškerý čas, který věnoval mně a mé diplomové práci. Dále bych touto cestou ráda poděkovala svému konzultantovi Ing. Filippu Georgijeviči Savvulidi, Ph.D. za odborné vedení v rámci mé činnosti v laboratoři při získávání dat pro experimentální část diplomové práce. Velké díky patří také Ing. Anežce Málkové za praktické a teoretické rady u experimentální části diplomové práce. V neposlední řadě patří velké poděkování celé mé rodině, která mě v rámci celého studia podporovala.

# Vliv přídavku glycerolu v různých fázích výroby beraních inseminačních dávek na jejich následné kvalitativní parametry po rozmrazení

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vliv přídavku glycerolu při přípravě inseminačních dávek na zachování oplozovací schopnosti spermií u beranů. Během experimentu byly použity vzorky ejakulátu beranů plemene valašská ovce. Valašská ovce patří mezi jeden z geneticky ohrožených druhů a proces kryokonzervace je pro záchranu těchto cenných zvířat rozhodující.

Oplozovací schopnost spermií byla zjišťována pomocí CASA softwaru a průtokové cytometrie. Za oplození schopné spermie byly považovány ty, které neměly poškozenou cytoplazmatickou membránu, měly vysokou celkovou a progresivní motilitu, neměly poškozený akrozom a měly zachovanou mitochondriální aktivitu. Hodnoceny byly také vlivy působící na jednotlivé parametry. Sperma bylo hodnoceno po ekvilibraci a po rozmrazení.

Byla porovnávána metoda okamžitého přídavku glycerolu při ředění, který byl součástí ředidla Andromed (obsah 6-7 % glycerolu) s modifikací, kdy byl glycerol přidán těsně před mrazením.

Ihned po rozmrazení byly zjištěny signifikantní rozdíly pouze v rámci hodnoceného parametru poškození akrozomu a mitochondriální aktivity. Průkazně lepších výsledků dosáhl ejakulát, kdy byla použita metoda s přídavkem glycerolu těsně před zmrazením, který vykazoval vysokou mitochondriální aktivitu  $43,3 \pm 2,69$  % a poškození akrozomu  $22,29 \pm 1,13$  %. Hodinu a dvě hodiny po rozmrazení byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi všemi jednotlivými parametry hodnocenými pomocí průtokové cytometrie.

Jako průkazně horší se jeví metoda s použitím ředidla s obsahem glycerolu. Při použití této metody mělo hodinu po rozmrazení poškození akrozomu  $25,92 \pm 1,13$  % spermií a vysoká mitochondriální aktivita byla zjištěna pouze u  $33,25 \pm 2,69$  %.

Získané výsledky poskytly slibné předpoklady pro zlepšení kvality kryokonzervovaného ejakulátu námi modifikovanou metodou. Proto je důležité ověřit účinek této metody formou inseminace.

**Klíčová slova:** průtoková cytometrie, CASA, kryokonzervace, sperma

# **Influence of glycerol addition in different phases of ram insemination doses processing on subsequent sperm qualitative parameters after thawing**

## **Summary**

The aim of this diploma thesis was to evaluate the effect of the addition of glycerol in the preparation of insemination doses for the preservation of the fertilizing ability of sperm in rams. During the experiment, samples of Wallachian sheep rams ejaculate were used. Wallachian sheep belong to one of the genetically endangered species and their cryopreservation is important for the rescue of these valuable animals.

Sperm fertilization capacity was determined using CASA software and flow cytometry. Fertilizable sperm were considered to be those that did not have damaged cytoplasmic membrane, had high overall and progressive motility and retained mitochondrial activity, and no damaged acrosome. The influences acting on individual parameters were also evaluated. Sperm were evaluated after equilibration and thawing. The method of immediate addition of glycerol at dilution, which was an ingredient of the Andromed diluent (6-7% glycerol content), was compared with a modification, in which glycerol was added just before freezing.

Significant differences immediately after thawing were found only within the evaluated parameter of acrosome damage and mitochondrial activity. Significantly better results were achieved with the ejaculate, when the method with the addition of glycerol just before freezing was used, which showed a high mitochondrial activity of  $43.3 \pm 2.69$  % and acrosome damage of  $22.29 \pm 1.13$ %. One hour and two hours after thawing, significant differences were found among all individual parameters evaluated by flow cytometry.

The method with use of a diluent containing glycerol appears to be significantly worse. Using this method,  $25.92 \pm 1.13$ % sperm showed damaged acrosome and high mitochondrial activity was found in only  $33.25 \pm 2.69$  % of sperm one hour after thawing.

**Keywords:** flow cytometry, CASA, cryopreservation, semen

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>3.1 Pohlavní orgány berana.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>3.2 Ejakulát.....</b>	<b>- 4 -</b>
3.2.1 Spermie .....	- 5 -
3.2.2 Kvantitativní a kvalitativní charakteristiky ejakulátu .....	- 5 -
3.2.2.1 Koncentrace spermií .....	- 5 -
3.2.2.2 Pohyblivost spermií .....	- 6 -
3.2.2.3 Objem ejakulátu .....	- 6 -
3.2.2.4 Morfologie spermií .....	- 7 -
3.2.3 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu .....	- 8 -
3.2.3.1 Obvod šourku.....	- 8 -
3.2.3.2 Věk.....	- 8 -
3.2.3.3 Plemeno .....	- 9 -
3.2.3.4 Sezóna a teplota .....	- 9 -
3.2.3.5 Výživa.....	- 10 -
3.2.3.6 Metoda odběru ejakulátu .....	- 10 -
3.2.4 Metody hodnocení ukazatelů ejakulátu .....	- 11 -
3.2.4.1 Makroskopické a mikroskopické vyšetření ejakulátu.....	- 11 -
3.2.4.2 Spektrofotometrická metoda.....	- 12 -
3.2.4.3 Hemocytometrické vyšetření .....	- 13 -
3.2.4.4 Fluorescenční mikroskopie .....	- 14 -
3.2.4.5 Počítačem asistovaná analýza spermií (CASA).....	- 15 -
<b>3.3 Průtoková cytometrie.....</b>	<b>- 16 -</b>
3.3.1 Princip.....	- 17 -
3.3.2 Hodnocení spermií pomocí průtokové cytometrie.....	- 18 -
3.3.3 Hodnocení jednotlivých parametrů.....	- 19 -
3.3.3.1 Hodnocení životnosti spermií .....	- 19 -
3.3.3.2 Hodnocení mitochondriální funkce .....	- 19 -
3.3.3.3 Hodnocení akrozomu spermií.....	- 20 -
<b>3.4 Metody mražení spermatu .....</b>	<b>- 20 -</b>
3.4.1 Obecný postup .....	- 21 -
3.4.2 Ředidla a komponenty používané při mražení ejakulátu.....	- 22 -
3.4.3 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu po rozmrazení .....	- 23 -
3.4.3.1 Vliv ředidel .....	- 23 -
3.4.3.2 Vliv přídavku aditiv .....	- 24 -

3.4.3.3	Vliv metody rozmrazení .....	- 24 -
3.4.3.4	Vliv přídavku glycerolu .....	- 28 -
<b>4</b>	<b>Materiály a metody.....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Plemeníci.....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>4.2</b>	<b>Odběr ejakulátu a zpracování vzorků .....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>4.3</b>	<b>Hodnocení vzorků před mrazením .....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>4.4</b>	<b>Mrazení vzorků ejakulátu .....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>4.5</b>	<b>Hodnocení ejakulátu po rozmrazení .....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>5</b>	<b>Statistická analýza dat .....</b>	<b>- 33 -</b>
<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>6.1</b>	<b>Výsledky CASA.....</b>	<b>- 35 -</b>
6.1.1.1	Základní charakteristiky – CASA.....	- 35 -
<b>6.2</b>	<b>Výsledky průtokové cytometrie .....</b>	<b>- 36 -</b>
6.2.1	Základní charakteristiky – průtoková cytometrie .....	- 36 -
6.2.2	Procentuální zastoupení životaschopných spermíí po rozmrazení .....	- 37 -
6.2.2.1	Popis modelu .....	- 37 -
6.2.2.2	Vliv odběrového dne.....	- 37 -
6.2.2.3	Vliv použité metody přídavku glycerolu .....	- 39 -
6.2.3	Procentuální zastoupení spermíí s poškozenou cytoplazmatickou membránou, poškozeným akrozomem a nízkou mitochondriální aktivitou po kryokonzervaci- 40 -	
6.2.3.1	Popis modelu .....	- 40 -
6.2.3.2	Vliv odběrového dne.....	- 40 -
6.2.3.3	Vliv metody přídavku glycerolu.....	- 42 -
<b>7</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>- 46 -</b>
<b>8</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>- 52 -</b>
<b>9</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>- 61 -</b>
<b>11</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>- 62 -</b>
<b>11.1</b>	<b>Vzorník možných abnormalit vyskytujících se u spermíí (Lipenský et al., 2014)</b>	<b>- 62 -</b>
<b>11.2</b>	<b>Použité modely.....</b>	<b>- 63 -</b>
11.2.1	Životaschopnost spermíí.....	- 63 -
11.2.2	Poškození cytoplazmatické membrány, poškození akrozomu, nízká mitochondriální aktivita .....	- 63 -
<b>11.3</b>	<b>Interakce mezi odběrovými dny a použitými variantami přídavku glycerolu</b>	<b>- 64 -</b>

# 1 Úvod

Ovce patří mezi jedny z nejdéle chovaných hospodářských druhů zvířat. Chov ovcí má v České republice bohatou historii. Pro člověka jsou ovce po dlouhá léta zdrojem kvalitních živočišných produktů, ke kterým řadíme maso, mléko, kůži a v neposlední řadě vlnu. V České republice není spotřeba skopového masa v porovnání s ostatními státy příliš vysoká, čemuž odpovídají i nepříliš vysoké početní stavy ovcí v ČR. K prosinci roku 2020 bylo evidováno 203 612 kusů ovcí.

Cílem všech chovatelů ovcí je dosažení vysoké produkce, jejíž předpokladem jsou vysoké reprodukční ukazatele. Zásadní vliv má výběr kvalitních plemenů, jejichž ejakulát slouží k výrobě inseminačních dávek, či přirozenou plemenitbu.

Vlivem nedostatečné optimalizace procesu kryokonzervace při výrobě inseminačních dávek se v praxi uplatňuje přirozená plemenitba.

Výhoda asistované reprodukce spočívá v podstatně menším počtu používaných beranů v porovnání s přirozenou plemenitbou.

Ve své práci se zaměřuji na optimalizaci procesu kryokonzervace ejakulátu modifikací metody přídatku glycerolu, jelikož všechna nová fakta jsou pro dosažení lepších výsledků při použití inseminace stěžejní.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

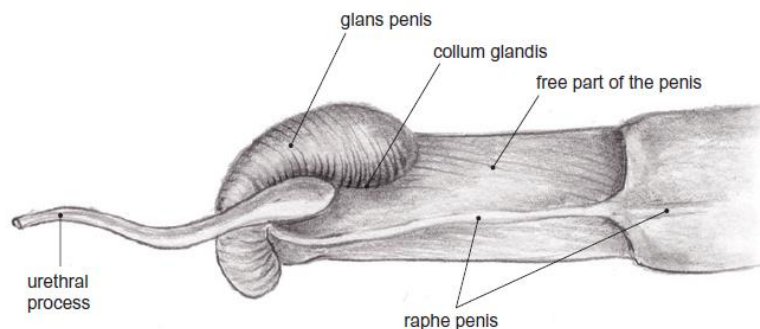
**Hypotéza:** Předpokládáme, že přídavek glycerolu ve finální fázi výroby inseminačních dávek může pozitivně ovlivnit následné kvalitu ID po rozmrazení.

**Cíl práce:** Využití biotechnologických metod u malých přežvýkavců je velmi omezené. Proto všechny informace vedoucí ke zlepšení dílčích postupů, jsou důležité s ohledem na potenciální rozvoj tohoto odvětví. Glycerol je běžně využívané kryoprotektivum obsažené v ředidlech při výrobě inseminačních dávek. Zároveň má toxický účinek na buňky. Zkrácením doby působení glycerolu na pohlavní buňky v průběhu ekvibrace může dojít ke zlepšení kvality inseminačních dávek. Předmětem diplomové práce bude ověření tohoto aspektu a v důsledku optimalizovat způsob výroby beraních inseminačních dávek.

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Pohlavní orgány berana

U všech samců hospodářských zvířat jsou pohlavní orgány tvořeny kopulačním orgánem, pohlavními žlázami (varlaty), vývodními cestami a přídatnými pohlavními žlázami. Párová varlata jsou pohlavní žlázy, které jsou uloženy v šourku. Ve varlatech jsou tvořeny samčí pohlavní buňky, spermie. Varlata mají endokrinní část, kterou představují Leydigovy buňky, a v kterých se tvoří samčí pohlavní hormon testosteron. Varlata berana jsou ze stran zploštělá a mají vejčitý tvar. U berana se hmotnost varlat pohybuje v rozmezí od 195 do 300 g. Na varlata navazují párová nadvarlata. Nadvarlata tvoří kličky vývodných kanálků varlete. V nadvarlatech se nachází zásoba spermií a spermie zde získávají schopnost pohybu. Nadvarlata se skládají ze tří částí, z těla, hlavy a ocasu. Další část pohlavních orgánů představuje chámovod, který navazuje na ocas nadvarlete a ústí do močové trubice. Chámovod se před vyústěním do močové trubice rozšiřuje v ampuli chámovodu. Od místa vyústění chámovodu do močové trubice vzniká společná vývodná cesta močová a pohlavní. Pro malé přežvýkavce je typické, že se za žaludem táhne výběžek močové trubice. U berana dosahuje tento výběžek délky asi 4 cm. Při kopulaci dochází k erekci výběžku močové trubice. Erekcce umožní zavedení výběžku močové trubice až do děložního krčku samice. Vnější pohlavní ústrojí samce představuje penis. Penis umožňuje vpravení semene do pohlavních orgánů samice a tím může dojít k případnému oplodnění. Na konci penisu se nachází žalud, který je při ochablém stavu kryt kožní duplikaturou, předkožkou. U berana je penis i ve fázi ochabnutí tuhé konzistence, jelikož se jedná o penis fibroelastického typu. Z přídatných pohlavních žláz se u berana vyskytují všechny typy, tedy ampule chámovodu, měchýřkovitá žláza, žláza bulbouretrální a prostata pouze v roztroušené podobě. Přídatné pohlavní žlázy produkují semennou plazmu, která představuje živné médium pro spermie. (Hafez 2000; Jelínek & Koudela 2003; Najbrt 1982).



**Obrázek č. 1:** Penis malých přežvýkavců (Constantinescu 2010)

### 3.2 Ejakulát

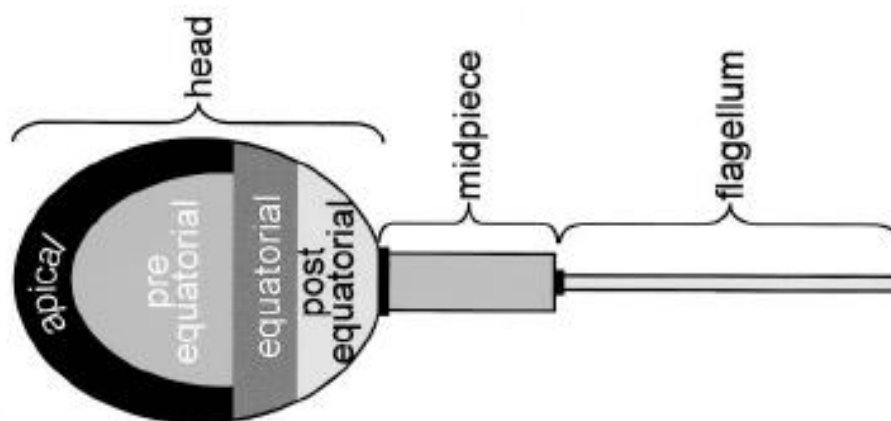
Ejakulát je složen ze spermií suspendovaných v tekutém médiu. Tekuté médium označujeme semenná plazma, která je nejčastěji bílé až šedavé barvy. Semenná plazma je důležitá pro chemickou funkci semene (Gamčík & Kozumplík 1984). Veškeré složky semenné plazmy jsou syntetizovány v síti varlete, v nadvarleti a přídatných pohlavních žlázách. Semenná plazma obsahuje velkou koncentraci bílkovin stejně jako ostatní tělní tekutiny (Domínguez et al. 2008). V rámci jednotlivých druhů hospodářských zvířat existují značné rozdíly ve složení bílkovin semenné plazmy (Muiño-Blanco et al. 2006). Sekrety přídatných pohlavních žláz tvoří většinu objemu semenné plazmy. Semenná plazma představuje živné médium pro spermie a usnadňuje jejich transport. Semenná plazma a tím i její složky se účastní klíčových procesů. Mezi procesy, na kterých se podílejí můžeme zařadit oplodnění vajíčka, vývoj zárodku a funkčnost spermií. Mezi složky semenné plazmy patří organické sloučeniny (peptidy, lipidy, kyselina citronová, aminokyseliny, cytokiny a hormony), ionty (sodné, draselné, vápenaté, hořečnaté, zinečnaté a další.) a energetické sloučeniny (sorbitol, fruktóza a glycerylfosfocholin). U přežvýkavců můžeme dále v semenné plazmě nalézt některé dusíkaté sloučeniny, které představuje močovina, kyselina močová, kreatinin nebo amoniak. Mezi další složky, které nalézáme u přežvýkavců patří některé redukční látky jako hypotaurin či kyselina askorbová. Obsah jednotlivých složek je dán sekreční činností, velikostí a skladovací kapacitou samčích pohlavních orgánů (Juyena & Stelletta 2011).

**Tabulka č. 1:** Složení semenné plazmy u berana (Juyena & Stelletta 2011)

<b>Složka</b>	<b>Beran</b>
<b>Fruktóza (mg/ dl)</b>	150–600
<b>Glukóza (mg/ dl)</b>	0,9 - 1,6
<b>Kyselina citronová (mg/ dl)</b>	110–260
<b>Proteiny (g/dl)</b>	2,30 - 2, 50
<b>Lipidy (mg/ dl)</b>	254–396
<b>Fosfolipidy (mg/ dl)</b>	/
<b>Kyselina glutamová (mg/ dl)</b>	4, 5 - 5,2
<b>Na (mg/ dl)</b>	120–258
<b>K (mg/ dl)</b>	50–140
<b>Ca (mg/ dl)</b>	6,0 - 15
<b>P (mg/ dl)</b>	4,8 - 12
<b>Cl (mg/ dl)</b>	86
<b>Mg (mg/ dl)</b>	2,0 - 13
<b>Zn (mg/ dl)</b>	56–179

### 3.2.1 Spermie

Spermie se tvoří v semenotvorných kanálcích varlat během procesu spermatogeneze a jedná se o zárodečné buňky s haploidním počtem chromozomů (Gadella & Luna 2014). proces spermatogeneze můžeme rozdělit na tři části. První fáze spermatogeneze zahrnuje proliferaci spermatogonie. Druhou fází nazýváme meióza, při níž dochází ke vzniku spermatid, které vznikají přes stádium primární a sekundární spermatidy. Poslední fázi označujeme jako diferenciaci, při které vznikají specializované buňky, spermie. Spermie všech savců mají podobnou strukturu a každá spermie je tvořena hlavou, krčkem a bičíkem. Hlava spermie měří v průměru 2 až 5  $\mu\text{m}$  a obsahuje jádro a akrozom (Malo et al. 2006). Délka bičíku se pohybuje v rozmezí 10–100  $\mu\text{m}$ . Bičík se skládá z komplexu mikrotubulů uspořádaných kolem středové části, kterou tvoří především mitochondrie. Většina cytoplazmy spermie se nachází v hlavičce a její objem je velmi malý. Jediným úkolem spermie je přenos genetické informace do oocyty (Erikson & Health 2014).



Obrázek č. 2 : Savčí spermie (Erikson & Health 2014)

### 3.2.2 Kvantitativní a kvalitativní charakteristiky ejakulátu

#### 3.2.2.1 Koncentrace spermií

Koncentrace spermií představuje kvantitativní vlastnost ejakulátu, která je vyjádřena počtem spermií v 1 ml ejakulátu a svědčí o jeho biologické plnohodnotnosti (Gamčík & Kozumplík 1984). Fyziologická koncentrace ejakulátu berana kolísá od  $3,5 \times 10^9$  do  $6 \times 10^9$  spermií na ml ejakulátu (Hafez 2000).

Carvajal-Serna et al. (2018) ve své studii hodnotili kvalitu ejakulátu u beranů plemene Hampshire a Romney marsh. U plemene Hampshire byla statisticky prokázána vyšší koncentrace spermií než u plemene Romney marsh. Průměrná koncentrace u plemene Hampshire byla  $2,4 \pm 163,2 \times 10^9$  spermií/ml. U plemene Romney marsh byla průměrná koncentrace pouze  $2,16 \pm 168,01 \times 10^9$  spermií/ml. Mezi jednotlivými plemeníky v rámci plemene nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi naměřenými koncentracemi

spermií. Průměrné hodnoty koncentrací uvedené v této studii jsou nižší oproti rozmezí, které pro tento parametr uvádí Gamčík a Kozumplík (1984).

### 3.2.2.2 Pohyblivost spermií

Mezi jeden z kvantitativních parametrů ejakulátu patří motilita spermií. Motilita spermií je elementární parametr při vyšetření kvality ejakulátu. Motilita spočívá ve schopnosti spermií projít přes pohlavní orgány samice a poté oplodnit vajíčko. Motilita neboli pohyblivost spermií, patří mezi parametr, který má vliv na plodnost ovcí (David et al. 2015). Aguiar & Tilburg (2013) ve své studii uvádějí, že pohyblivost spermií se během roku výrazně nemění.

Carvajal-serna et al.(2018) zkoumali vliv plemene na pohyblivost spermií, přičemž zjistili významné rozdíly v motilitě spermií u plemen Hampshire a Romney marsh. Pohyblivost spermií u plemene Romney marsh byla  $75,49 \pm 2,75$  %. U plemene Hampshire byla průměrná hodnota pohyblivosti spermií vyšší než u plemene Romney marsh a dosahovala hodnot  $85,45 \pm 1,55$  %.

Další studie hodnotí vliv sezóny na motilitu spermií. Motilita spermií byla hodnocena u plemen ovcí Východofríská ovce a Chios. Bylo zjištěno, že nejlepších výsledků v případě hodnocení motility spermií bylo dosaženo u obou plemen během podzimu. Průměrná hodnota motility spermií během podzimu dosahovala u plemene Východofríská ovce  $75,29 \pm 1,48$  %, avšak u plemene Chios byla o 0,29 % nižší. Nejhorších výsledky byly získány během jara a léta, kdy se průměrná hodnota motility pro plemeno východofríská ovce pohybovala v rozmezí od  $69,21 \pm 1,78$  % do  $70,76 \pm 1,04$  % a pro plemeno Chios od  $69,35 \pm 1,17$  % do  $70,83 \pm 1,84$  %. Z výsledků studie vyplývá, že procento pohyblivosti spermií mezi jarem a podzimem kolísá o 5 až 6 % a sezóna má tedy významný vliv na tento parametr (Karagiannidis et al. 2000). Vliv sezóny na motilitu spermií ve své studii také potvrdili Qureshi et al. (2013), Malejane et al. (2014) a Catunda et al. (2011).

### 3.2.2.3 Objem ejakulátu

Mezi další sledovaný parametr ejakulátu patří jeho objem. Jedná se o parametr, který přímo ovlivňuje oplozovací schopnost samců (Jha et al. 2018).

U plemene Suffolk dosahoval objem získaný odběrem pomocí umělé vagíny hodnoty 1,2 ml (Hernández et al. 2012) přičemž Karagiannidis et al. (2000) a Khandoker (2013) uvádějí vliv plemene na objem ejakulátu. Z dalších studií bylo zjištěno, že objem ejakulátu závisí také na výživě (Almeida et al. 2007), respektive tělesné kondici plemeníka jak uvádí Turri et al. (2016) a sezóně odběru (Domínguez et al. 2008). Vliv na objem ejakulátu má také metoda odběru, přičemž bylo zjištěno, že pomocí elektroejakulace lze dosáhnout většího objemu v porovnání s odběrem do umělé vagíny (Jha et al. 2018).

Řada autorů ve své studii potvrdila vliv plemenné příslušnosti na objem ejakulátu. Srovnání mezi vybranými plemeny a podrobnější výsledky jsou prezentovány v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2:** Parametry ejakulátu u vybraných plemen ovcí

Plemeno	Objem ejakulátu (ml)	Pohyblivost spermií (%)	Morfologie spermií (normální spermie) %	Koncentrace ejakulátu ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Zdroj
<b>Berani</b>					
Romney marsh	2,29 $\pm$ 0,19	75,49 $\pm$ 2,75	88.34 $\pm$ 1.85	2164 $\pm$ 168,01	(Carvajal-Serna et al. 2018)
Hampshire	2,81 $\pm$ 0,17	85,45 $\pm$ 1.55	94.07 $\pm$ 0.85	2389 $\pm$ 163,22	(Carvajal-Serna et al. 2018)
Suffolk	1,05 $\pm$ 0,06	30 až 80	x	3281,7 $\pm$ 108, 6	(Boland et al. 1985; Mickelsen et al. 1981)

### 3.2.2.4 Morfologie spermií

Každý odebraný vzorek ejakulátu obsahuje nějaké procento patologických spermií. Výskyt patologických spermií je nepřímo úměrný k plodnosti. Vysoký počet poškozených spermií způsobuje kupříkladu tepelný stres. Vysoká vlhkost v kombinaci s vysokou teplotou může vést ke sterilitě samců po dobu až 6 týdnů (Mieusset et al. 2004; Hafez 2000). Karagiannidis et al. (2000) zjistili, že velké množství patologických spermií se objevuje v ejakulátech, které jsou shromažďovány během obnovy reprodukční funkce. Popsali také, že dostatečné množství čisté studené vody a zajištění dostatečného stínu napomáhá minimalizovat vliv tepelného stresu. Hafez (2000) uvedl, že pokud se ve vzorku ejakulátu vyskytuje více než 20 % patologických spermií, tak lze plodnost berana považovat za spornou. Pro inseminaci by neměly být použity ejakuláty s výskytem abnormálních spermií vyšším než 15 %, avšak Solti et al. (2012) uvádějí, že rozmezí přijatelného výskytu patologických spermií je 20 až 30 %. Bylo zjištěno, že výskyt patologických spermií se mění sezónně. Bravo et al. (2014) se zabývali sledováním morfometrických parametrů během sezóny. Výsledky studie ukazují, že průměrná délka spermií během připouštěcí sezóny (podzim, zima) kolísala od 8,25  $\pm$  0,33  $\mu\text{m}$  do 8,36  $\pm$  0,34  $\mu\text{m}$ , přičemž průměrná šířka se pohyboval od 4,87  $\pm$  0,18  $\mu\text{m}$  do 4,97  $\pm$  0,18  $\mu\text{m}$ . Během období mimo připouštěcí sezónu (jaro, léto) byla délka spermií přibližně o 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$  kratší a šířka o 0,1  $\mu\text{m}$  tenčí.

Pro hodnocení výskytu abnormálních spermií by měl být použit vzorek ejakulátu odebraný maximálně po sedmi dnech sexuální abstinence ne, však dříve než po dvou dnech sexuální abstinence. Pokud se pro hodnocení výskytu abnormálních spermií používá více vzorků, měl by být počet dní sexuální abstinence u všech hodnocených vzorků stejný. Pro získání objektivních výsledků je vhodné zkontrolovat minimálně dva až tři vzorky ejakulátu. V 85 % případů dává správné výsledky již první vzorek, avšak variace mezi jednotlivými vzorky jsou velmi významné. Hodnocení výskytu patologických spermií zahrnuje posouzení hlavičky, které zahrnuje posouzení velikosti, tvaru, dále posouzení akrozomu včetně posouzení akrozomálních vakuol, jejichž přítomnost se hodnotí pomocí vizuálního vyšetření. Dále hodnocení zahrnuje analýzu krčku spermie, bičíku a spojovacího oddílu (Lasiene et al. 2013;

Hidalgo & Dorado 2009). Detailní popis vyskytujících se abnormalit spermií včetně obrázků je k dispozici v samostatných přílohách.

### 3.2.3 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu

#### 3.2.3.1 Obvod šourku

Významný vliv na kvalitu ejakulátu má i obvod šourku, který má vliv na oplodňovací schopnost spermií a jejich kvalitu. Pezzanite et al.(2010) ve své studii uvádí, že obvod šourku může během sezóny kolísat, což souvisí s tělesnou hmotností a pohlavní aktivitou. Během období rozmnožování je obvod šourku větší, naopak v období mimo rozmnožování se obvod šourku může zmenšit o 2-3 cm. Dále bylo prokázáno, že beran, který má být použit pro reprodukci by měl mít obvod šourku minimálně 33 cm. Pokud je však obvod šourku menší, tak by měl být beran vyřazen, protože není schopen produkce dostatečného množství ejakulátu pro oplodnění dostatečného množství samic

Braun et al. (1980) ve své studii provedli měření obvodu šourku u 717 beranů. K měření byli použiti berani devíti odlišných plemen, přičemž bylo zjištěno, že existuje přímá úměra mezi tělesnou hmotností a obvodem šourku. Berani větších plemen mají obecně větší obvod šourku.

Při hodnocení obvodu šourku mohou být berani klasifikováni třemi stupni – vynikající, uspokojiví, či pochybní, přičemž tato klasifikace se provádí při zařazení beranů do plemnitby. Berani, u nichž byly zjištěny pochybné výsledky se znovu přeměřují za 4–8 týdnů. Berani, kteří dosáhli obvodu šourku ve věku >14 měsíců více než 35 cm jsou klasifikováni jako výborní. (Pezzanite et al. 2010)



**Obrázek č. 3:** Měření obvodu šourku u berana (Pezzanite et al. 2010)

#### 3.2.3.2 Věk

Je dokázáno, že za optimálních podmínek prostředí zvířata rostou v raném věku, přičemž po dosažení pohlavní dospělosti se růst zpomaluje a zcela se zastaví po dosažení dospělosti tělesné. Stejný trend růstu platí i pro vývoj varlat, kdy v raném věku je růst rychlý a

po dosažení pohlavní dospělosti následuje období pomalého růstu (Karagiannidis et al. 2000). Dowsett & Knott (1996) ve své studii zkoumali vliv věku na morfologii spermií, přičemž zjistili, že výskyt patologického tvaru hlavy spermie se vyskytuje ve větší míře ve věku do 2 let, naopak potom se výskyt spermií s abnormální hlavou snižoval. K vyššímu výskytu spermií s patologickým tvarem hlavy potom docházelo po 5 roce věku. Nedokonalá spermiogeneze v raném věku pravděpodobně způsobuje výskyt většího procenta morfologicky abnormálních spermií, po dosažení pohlavní dospělosti se výskyt normálních spermií zvyšuje, přičemž k poklesu dochází ve stáří či vlivem poruchy funkce varlat.

Bylo zjištěno, že změny ve výskytu abnormálních spermií, jsou doprovázeny změnami v obvodu šourku. Do věku 20 měsíců se obvod šourku zvětšoval, avšak množství výskytu patologických spermií se snižovalo. Po dosažení tohoto věku došlo k ustálení hodnot, které se týkaly jak výskytu abnormálních spermií, tak obvodu šourku. Byl prokázán výskyt vyššího počtu abnormálních spermií ve věku 2 až 5 let, oproti výskytu patologických spermií ve věku mezi 1. a 2. rokem života (Ferdinand et al. 2012; Bongso et al. 1982).

Samci, kteří se používají k odběru ejakulátu či v chovu by měli být ve věku, kdy dosahují optimálních růstových schopností a mají vyhovující hodnoty spermiogramu. Pro správný výběr plemenných zvířat musí být hodnoceny reprodukční ukazatele, které následně porovnáváme mezi různými plemeny ve stejném věku (Harder et al. 1995).

### **3.2.3.3 Plemeno**

Jedním z faktorů, které ovlivňují vlastnosti ejakulátu, velikost varlat a v neposlední řadě i velikost těla hospodářských zvířat je plemeno (Karagiannidis et al. 2000).

Ke zvětšení varlat dochází až po dosažení pohlavní dospělosti (Al-ghalban et al. 2004). Karagiannidis et al. (2000) zjistili, že plemeno ovlivňuje morfologii spermií u hospodářských zvířat, přičemž se jednalo zejména o změny tvarů spermií.

Štolc et al. 2009 zkoumali vliv plemene beranů na aktivitu ejakulátu a počet produkováných inseminačních dávek. Hodnoceno bylo celkem 59 beranů. Z celkového počtu samců bylo 42 plemene Šumavská ovce a 17 plemene Valašská ovce. Významný rozdíl mezi plemeny byl prokázán pouze v počtu produkováných inseminačních dávek, kde lepších výsledků dosáhli berani plemene Šumavská ovce, ačkoli berani plemene Valašská ovce dosáhli lepších výsledků v jiných parametrech. U plemene šumavská ovce bylo průměrně vyprodukováno  $16,8 \pm 0,32$  inseminačních dávek, oproti tomu u plemene Valašská ovce bylo průměrně vyprodukováno pouze  $13,85 \pm 0,93$  inseminačních dávek. U beranů plemene Valašská ovce byl pozorován větší objem ejakulátu a vyšší progresivní aktivita spermií před i po ředění oproti beranům plemene Šumavská ovce.

### **3.2.3.4 Sezóna a teplota**

Každoroční výkyvy ve fotoperiodě vyvolávají u ovcí sezónnost reprodukční aktivity. U samic je sezónnost během roku velmi výrazná, přičemž se střídá období, kdy jsou ovce připraveny na reprodukci (reprodukční období) s období, kdy ovce nejsou schopny reprodukce. Období, kdy ovce nejsou schopny reprodukce označujeme jako anestrus. U samců nejsou výkyvy během střídání reprodukčního a nereprodukčního období tak velké, přičemž



spermatogeneze a sexuální aktivita zůstává téměř konstantní během celého roku. Ke změnám, které můžeme pozorovat během sezóny u samců patří změna velikosti varlat, změna sexuálního chování tzv. libido sexualis, změna sekrece hormonů a jednotlivých parametrů ejakulátu (César et al. 2017; Santolaria 2011). Přímé působení melatoninu má prokazatelný vliv na pohyblivost spermií a další charakteristiky ejakulátu v rámci období mimo připouštěcí sezónu. Tohoto zjištění bylo využito při inseminaci bahnic během anestrů berany, kterým byl implantován melatonin. Implantovaný melatonin způsobil u beranů vyšší objem šourku a u bahnic bylo dosaženo vyšších reprodukčních ukazatelů, i když byla inseminace provedena v období anestrů. Na výsledky inseminace má kvalita ejakulátu nezastupitelný vliv (Santolaria 2011). I Abecia et al. (2012) zjistili vliv rozdílné délky světelného dne během roku na reprodukční aktivitu.

### **3.2.3.5 Výživa**

Jeden z předních faktorů, které mají vliv na růst a produkci spermií je výživa hospodářských zvířat (Widiyono et al. 2017). U malých přežvýkavců žijících v oblasti tropického podnebného pásu je výživa jeden z hlavních modulátorů reprodukční aktivity, jelikož se zde výrazně neprojevují výkyvy během roku v délce světelného dne. V ostatních zeměpisných pásmech je vliv změny délky světelného dne na reprodukční ukazatele značný. Nejde proto v těchto oblastech výživou ovlivnit například snížení velikosti varlat během období mimo reprodukční sezónu. Vyšší úroveň krmiva napomáhá rychlejší obnově velikosti varlat po oteplení. Malý přežvýkavci, stejně jako ostatní hospodářská zvířata potřebují pro udržení tělesného metabolismu, růstu, produkce a reprodukce dostatek živin. Vyvážený obsah bílkovin v krmné dávce a kvalita krmné dávky působí na zlepšení tělesné kondice. Kvalita krmné dávky má dále vliv na velikost varlat, a tím na parametry ejakulátu, respektive plodnost. Pozitivně působí na růst varlat a produkci spermií zvýšení příjmu energie z krmné dávky (Gebre, 2007).

Výživa má významný vliv na udržení a zvýšení sekrece gonadotropinů, čímž snižuje výskyt morfologicky abnormálních spermií. Nízká úroveň výživy vede naopak ke snížení růstu a snížení kvality ejakulátu. Snížená kvalita ejakulátu se potom projeví zvýšeným výskytem nezralých a sníženou úrovní reprodukce. Krmivo pro berany by mělo obsahovat dostatečné množství bílkovin, jelikož bylo prokázáno, že příjem krmiv chudých a bílkoviny negativně působí na pohyblivost spermií, jejich morfologii a dochází k depresi růstu varlat a potlačení spermiogeneze. U březích ovcí vede výživa s nízkým obsahem bílkovin a energie ke snížené plodnosti u jehňat. U novorozených jehňat se potom vyskytuje snížený počet Sertoliho buněk varlete, což se projevuje snížením budoucí kapacity pro produkci spermií. Snížená úroveň výživy dále působí na snížení sekrece folikulostimulačního a luteinizačního hormonu, což se projevuje zpomaleným růstem varlat u beránků (Gebre 2007; Smith et al. 2010).

### **3.2.3.6 Metoda odběru ejakulátu**

U beranů můžeme pro odběr ejakulátu použít dvě různé metody. První metoda spočívá v odběru ejakulátu pomocí umělé vagíny a druhá v odběru ejakulátu pomocí elektroejakulace. Odběr pomocí elektroejakulace spočívá v zavedení sond či elektrod do rekta berana. Postupné zvyšování elektrického napětí způsobuje podráždění sympatických nervů a následnou ejakulaci. Při elektroejakulaci dochází ke střídání fází elektrické stimulace se stejně dlouhou fází odpočinku. Každá z fází trvá přibližně 3 až 5 sekund (Stafford 1995). Další metoda odběru

ejakulátu představuje odběr pomocí umělé vagíny. Umělá vagína se skládá z vnějšího válce, vnitřní vložky a sběrače. Sběrač může být plastový či skleněný a dlouhý k zachycení semene. Před použitím umělé vagíny dochází k dezinfekci všech jejích součástí a k jejímu následnému sestavení. Před odběrem dochází k dezinfekci všech částí umělé vagíny a jejich následnému sestavení. Po sestavení umělé vagíny je mezi vnější válec a vnitřní vložku napuštěna voda o teplotě 41 až 42 °C, aby odpovídala fyziologickému rozmezí teploty ve vagíně přirozené. Příliš vysoká teplota uvnitř umělé vagíny může vést až k poranění penisu beranů. Odběr beranů pomocí umělé vagíny probíhá skokem na atrapu či fantom (Wulster-Radcliffe et al. 2001). V praxi je odběr pomocí umělé vagíny upřednostňovanou metodou, avšak tento způsob odběru ejakulátu vyžaduje dostatečný trénink. K odběru pomocí elektroejakulace je přistupováno jako k přijatelné alternativě pro nezkušené samce, kteří zatím nejsou naučeni odběru ejakulátu pomocí umělé vagíny. Ve studii byl zkoumán vliv metody odběru ejakulátu na kvalitu spermií. Berani byli odebíráni pomocí elektroejakulace a pomocí umělé vagíny ve stejný den. Po odběru byly získané ejakuláty zamrazeny a po nějaké době proběhlo hodnocení rozmražených ejakulátů. Vyšetření ejakulátu spočívalo v posouzení pohyblivosti spermií, které bylo hodnoceno metodou CASA. U vzorků odebraných pomocí umělé vagíny byla zjištěn prokazatelně vyšší motilita než u vzorků, které byly získány odběrem pomocí elektroejakulace. Po zhodnocení motility spermií byl ejakulát vyšetřen prostřednictvím průtokové cytometrie, ke byla hodnocena životaschopnost spermií, neporušenost plazmatické membrány a mitochondriální aktivita. U ejakulátu odebraného pomocí umělé vagíny bylo dosaženo lepších výsledků zkoumaných parametrů než u ejakulátu odebraného prostřednictvím elektroejakulace (Jiménez-Rabadán et al. 2016).

Juyena & Stelletta (2011) ve své studii uvádí že může dojít ke změně sekreční činnosti jedné nebo více přídatných pohlavních žláz při odběru pomocí elektroejakulace. Následkem změny sekreční činnosti potom dochází ke změně složení semenné plazmy. Bylo zjištěno, že způsob odběru ejakulátu může mít vliv na složení bílkovin a jiných složek v semenné plazmě samců. Změna koncentrace některých bílkovin může vést ke změně kryorezistence vzorků spermií a může hrát klíčovou roli v prevenci proti chladovému šoku.

### **3.2.4 Metody hodnocení ukazatelů ejakulátu**

#### **3.2.4.1 Makroskopické a mikroskopické vyšetření ejakulátu**

Ihned po odběru ejakulátu dochází k makroskopickému vyšetření (Gamčík & Kozumplík 1984). Při makroskopickém vyšetření dochází k vizuálnímu posouzení barvy, objemu a konzistence ejakulátu. V rámci makroskopického vyšetření můžeme dále hodnotit zápach, cizí příměsi či hodnotu pH. Makroskopické posouzení je základní vyšetření, které vede k posouzení funkce přídatných pohlavních žláz, k odhadu možného množství inseminálních dávek vyrobených z ejakulátu a k odhadu koncentrace spermií v ejakulátu. Patologické zbarvení ejakulátu signalizuje poškození vyskytující se v reprodukčním traktu samce (Dhurvey et al. 2012).

Barva ejakulátu berana by měla být jemně krémová až mléčně bílá, přičemž každá jiná barva svědčí o patologii. Přítomnost krve v ejakulátu způsobí růžové zbarvení ejakulátu, které je následkem poranění penisu během získávání ejakulátu. Šedé či hnědé zbarvení ejakulátu

signalizuje přítomnost infekce v reprodukčním ústrojí. Žluté zbarvení ejakulátu signalizuje přítomnost moči, což je velmi časté u odběru ejakulátu pomocí elektroejakulace. Ejakulát po odběru velmi nepříjemně zapáchá a přítomností moči je znehodnocen. V závislosti na použité metodě odběru ejakulátu se mění i jeho objem. Obecně platí, že odběrem pomocí umělé vagíny dosáhneme nižšího objemu než odběrem pomocí elektroejakulace. Další faktory ovlivňující objem ejakulátu je kondice, věk, sezóna a frekvence odběru ejakulátu. Fyziologicky by měl objem ejakulátu berana dosahovat hodnot 0,5-2 ml. U mladých beránků objem ejakulátu kolísá od 0,5 do 0,7 ml. Hodnota objemu ejakulátu může být zjištěna pomocí odměrného válce, či jiné kalibrované nádoby (Gamčík & Kozumplík 1984).

V rámci mikroskopického hodnocení ejakulátu posuzujeme koncentraci spermií, jejich aktivitu, morfologii spermií, přítomnost cizích příměsí a v neposlední řadě rezistenci a přežitelnost spermií. Do mikroskopického vyšetření řadíme všechny metody zkoumající výše uvedené parametry (Gamčík & Kozumplík 1984)

### **3.2.4.2 Spektrofotometrická metoda**

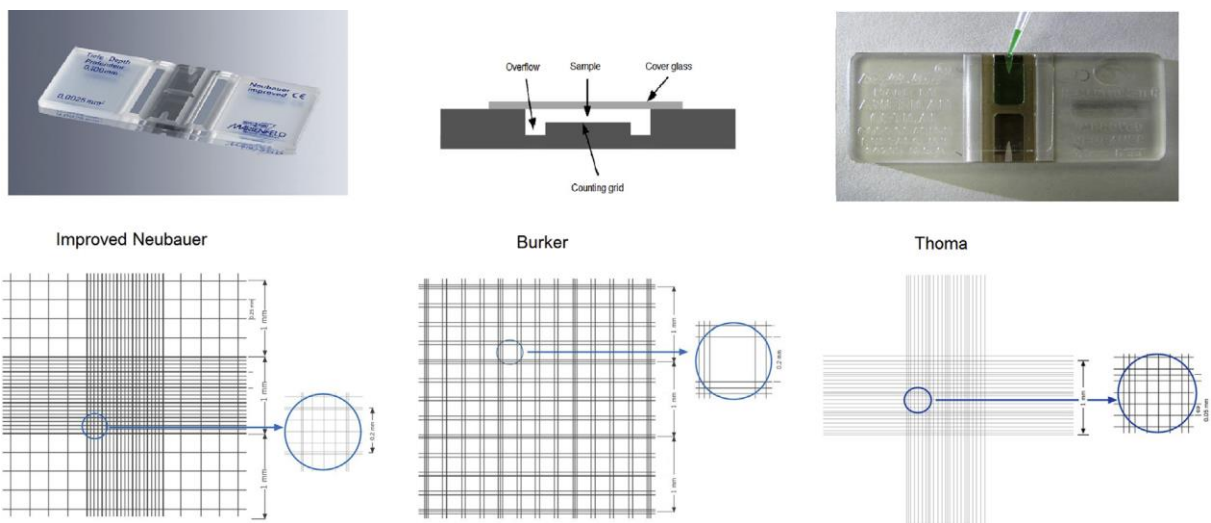
Spektrofotometrická metoda slouží k měření koncentrace spermií v ejakulátu, přičemž se jedná o časově méně náročnou metodu v porovnání například s metodou hemocytometrickou. Přístroje jimiž je koncentrace spermií měřena se nazývají spektrofotometry (Barszcz et al. 2011). Výhodou spektrofotometrické metody je časová nenáročnost a poměrně malé množství vzorku potřebné pro vyšetření koncentrace. Nevýhoda potom spočívá v nepříliš přesných výsledcích, které jsou závislé na správném použití a kalibraci přístroje. Spotřební materiál a nástroje používané v rámci této metody patří k těm levnějším a školení laboratorních techniků nevyžaduje příliš mnoho času. Z důvodů rychlosti a jednoduchosti této metody se jedná o nejběžněji využívanou metodu v centrech pro zpracování ejakulátu. Měření pomocí spektrofotometrů spočívá v měření intenzity světla (Cardeal et al. 2017).

Ejakulát obsahuje mimo spermií i jiné nespermatické složky mezi které můžeme zařadit organické a anorganické sloučeniny. Vzorky ejakulátu tedy představují komplexní suspenzi, ve které není přenos světla odrazem pouze počtu spermií. S charakteristikami suspenze potom souvisí množství přenášeného světla, což je základem pro posouzení koncentrace spermií pomocí spektrofotometru. Při vyšetření koncentrace spermií chápeme absorpci světla jako rozdíl intenzity světla před průchodem suspenzí a po jejím průchodu. Množství světla, které je suspenzí absorbováno je přímo úměrné koncentraci částic v roztoku. Grafem koncentrace spermií dle absorbance je přímka. Analýza pomocí spektrofotometru se provádí za použití monochromatického světla, jelikož je vše závislé na vlnové délce. Pro vyšetření koncentrace spermií hospodářských zvířat je používána vlnová délka v rozmezí od 500 do 650 nm (Brito et al. 2016) .

### 3.2.4.3 Hemocytometrické vyšetření

Hemocytometrické vyšetření ejakulátu patří mezi nejstarší metody a spočívá v manuálním počítání spermií. Hodnocení spermií je založeno na jejich přímé vizualizaci a jedná se o poměrně levnou, avšak časově náročnou metodu. Tuto metodu je často využíváno v andrologických laboratořích. Principem této metody je využití komor, ve kterých jsou spermie pozorovány a následně počítány v určité oblasti. Počet spermií potom umožní výpočet koncentrace spermií na jednotku objemu. Hemocytometr se skládá z tlustého podložního skla, který má obdélníkový tvar, přičemž uprostřed je střed sklíčka ve tvaru písmene „H“, které tak určuje dvě oddělené komůrky. Po obou stranách písmene „H“ se nacházejí držáky, které slouží k upevnění krycího sklíčka nad povrchem počítacích ploch. Standardní hloubka počítacích komor činí 100  $\mu\text{m}$ , přičemž někteří výrobci vyrábí specifické hemocytometry s jinou hloubkou. Po upevnění krycího sklíčka nad počítací plochy je hemocytometr připraven k použití. Po obou stranách počítacích komor se nachází výřez ve tvaru písmene V, do kterého se kápne asi 10  $\mu\text{m}$  vzorku. Na základě kapilárního účinku dojde ke vtažení tekutiny do komůrky. Každá počítací komůrka je opatřena vyrytou počítací mřížkou, jejíž vzor liší v závislosti na výrobci (Brito et al. 2016; Hansen 2011).

Nejvíce využívanou mřížkou pro hodnocení koncentrace spermií je tzv. Neubauer. Mřížka je v tomto případě rozdělena do 9 velkých čtverců, přičemž jeden čtverec má rozměr 1  $\text{mm}^2$ . Centrální čtverec mřížky je rozdělen na 25 malých čtverců o velikosti 0,2 nebo 0,04  $\text{mm}^2$ . Ve čtyřech rozích mřížky jsou umístěny čtverce, které jsou rozděleny na 16 malých čtverců o ploše 0,25  $\text{mm}^2$  nebo 0,0625  $\text{mm}^2$  (Jayme Barbedo 2013). Mezi další používané mřížky patří tzv. Bürkerova komůrka, která je rovněž rozdělena na 9 čtverců, přičemž plocha jednoho čtverce je 1  $\text{mm}^2$ . Jednotlivé čtverce (čtverce Q) jsou vymezeny třemi nepřerušovanými čarami. Každý čtverec Q je rozdělen na 16 menších čtverců o velikosti plochy 0,2 nebo 0,04  $\text{mm}^2$ . Další používanou mřížkou je mřížka dle Thoma, která je tvořena centrálním čtvercem o rozměru 1  $\text{mm}^2$ . Centrální čtverec je potom rozdělen na 16 menších čtverců o velikosti plochy 0,2 nebo 0,04  $\text{mm}^2$  (Brito et al. 2016).

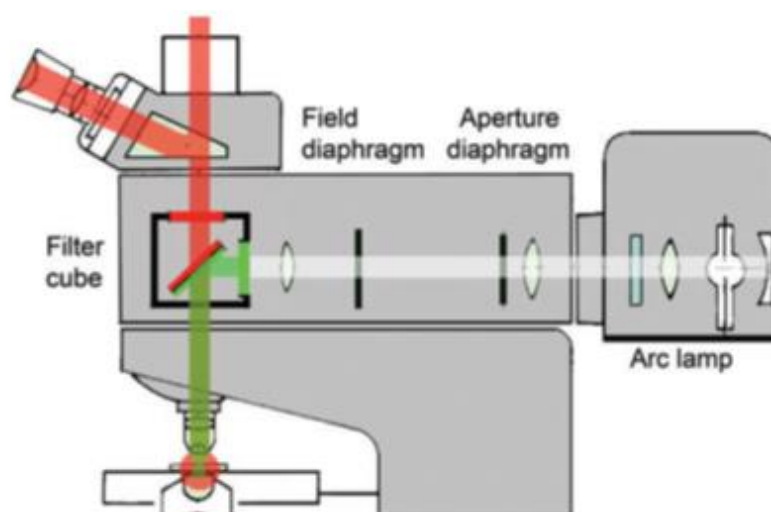


Obrázek č. 4: Možnosti počítacích mřížek. (Brito et al. 2016)

### 3.2.4.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je základní metodou používanou v oborech buněčné biotechnologie a biologie. Pomocí fluorescenční mikroskopie lze sledovat fyziologické vlastnosti buněk. Metoda fluorescenční mikroskopie umožňuje sledovat jednotlivé molekuly v živých či fixovaných buňkách (Shahsavani & Yousefi 2018). Tuto metodu lze využít pro hodnocení neporušenosti cytoplazmatické membrány spermíí, hodnocení procesu kapacitace spermíí či posouzení mitochondriální aktivity a neporušenosti akrozomu. Metoda fluorescenční mikroskopie představuje alternativu pro použití průtokové cytometrie (Magistrini et al. 1997). Principem fluorescenční mikroskopie je, že buňky, které jsou předmětem hodnocení fluoreskují. Buňky jsou v tom případě schopny přijmout energetické kvantum fotonů a uvolnit energii v podobě emise světla (fluorescence). K fluorescenci dochází v nanosekundách ( $10^{-9}$ ). Dochází k filtraci světla s krátkou vlnovou délkou za účelem vizualizace světla s dlouhou vlnovou délkou. Faktor, který ovlivňuje funkčnost fluorescenční mikroskopie je tzv. Stokesův posun. Stokesův posun je v podstatě rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima a určuje sílu, dobu a intenzitu fluorescence. Při fluorescenční mikroskopii se využívá tzv. fluoroforů (Sanderson et al. 2014).

Fluorofory se v mikroskopii uplatňují díky svým fluorescenčním vlastnostem a schopnosti excitace. Schopnost excitace spočívá v přesunu elektronů z valenčních orbitalů na vyšší energetickou hladinu po dodání dostatečného množství energie. Potřebná energie je elektronům dodána vlivem nárazu fotonů na fluorofory. Fluorofory nevydrží v excitovaném stavu příliš dlouho, a proto mají tendenci ztrácet energii formou emise světla a tím se postupně vrací na původní energetickou hladinu. Fluorescenční vlastnosti, emisní a excitační vlnová délka jsou určeny prostřednictvím valenčního orbitalu. Přejít elektronů do excitovaného stavu popisuje tzv. Jablonského diagram. Jablonského diagram popisuje vztahy mezi základním stavem ( $S_0$ ) a excitovanými stavy  $S_1$  a  $S_2$ , které můžeme označit jako singletové. Singletový stav  $S_2$  má vyšší energetickou hodnotu než  $S_1$  a  $S_1$  má vyšší energii než  $S_0$ . Během emise světla zůstává elektron po delší dobu v excitovaném stavu  $S_1$ , protože energetická mezera mezi  $S_1$  a  $S_0$  je širší oproti  $S_1$  a  $S_2$  (Ogundele et al. 2013; Lichtman & Conchello 2005).

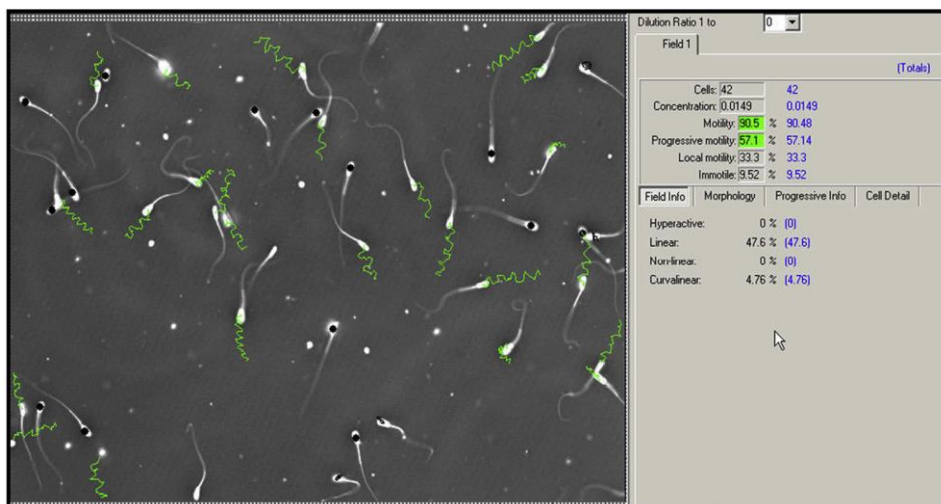


**Obrázek č. 5:** Schéma fluorescenčního mikroskopu (Lichtman & Conchello 2005)

### 3.2.4.5 Počítačem asistovaná analýza spermií (CASA)

CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) představuje automatizovaný systém obsahující hardware a software, který digitalizuje a vizualizuje několik po sobě jdoucích obrazů. Na základě toho, že známe velikost plochy obrazu můžeme vypočítat koncentraci spermií v ejakulátu a jeho objem. Metoda CASA poskytuje přesné výsledky týkající se pohyblivosti spermií (Amann & Katz 2004). Vyšetření motility spermií patří k elementárním parametrům, které jsou hodnoceny během rutinní analýzy či v experimentálních studiích. Výhodou je, že výsledky motility získané prostřednictvím softwaru CASA jsou objektivní (Palacín et al. 2013).

Některé systémy CASA dokážou současně vyhodnotit několik parametrů ejakulátu najednou, jako například současně vyhodnotit pohyblivost a morfologii spermií. CASA může být také použita pro odhad koncentrace spermií v ejakulátu. Metoda CASA je založena na principu vizualizace a digitalizace několika po sobě jdoucích snímků ejakulátu pomocí mikroskopu (hardwaru). Po fázi vizualizace a digitalizace dochází k analýze obrazu a následně identifikaci a počítání spermií (software). Rozdíly mezi jednotlivými systémy CASA spočívají především v odlišném hardwaru a softwaru (Amann & Waberski 2014). Systém CASA využívá samostatných mikroskopů, přičemž pro umístění vzorků na požadovanou souřadnici X/Y a pro nastavení zaostření na ose Z slouží manuální či automatické posuvné plošiny. Systémy CASA využívají širokopásmové osvětlení ve viditelném spektru. Pro tuto metodu je využíván mikroskop, který je opatřen negativním (pozitivním) fázovým kontrastem. Jednotlivé snímky zachycuje obrazový snímač CCD. Zachycení snímků probíhá v 0,5 s intervalech, kdy je předem stanovena frekvence pořizování snímků (např. 60 MHz). Zvolená frekvence pořizování snímků je regulována trváním impulsu osvětlení stroboskopu či pomocí spouště. Většina systému CASA používá patentovaný software k detekci spermií. Na spermii je při detekci vytvořen tzv. centroid, který představuje centrální bod na hlavě a používá se při sledování trajektorie spermií. Detekci hlavy spermie umožňují předem definované parametry, mezi které patří rozměry, počet pixelů nebo jas. Výsledná koncentrace spermií může být významně ovlivněna změnou těchto parametrů. Systém CASA používá několik algoritmů, které přispívají k objektivnějším výsledkům. Jde například o algoritmy, které odliší spermie s kříženou trajektorií, či spermie, které se v průběhu hodnocení srazí. Vzorce používané pro hodnocení jednotlivých parametrů spermií jsou součástí softwarového balíčku. Oblast, ve které probíhá hodnocení je dána zvětšením a objem závisí na hloubce komory použité pro analýzu. Analýza poskytuje výsledky jednotlivých parametrů pohyblivosti spermií. Hodnocené parametry jsou křivočará rychlost [VCL], průměrná rychlost [VAP], přímočará rychlost [VSL], amplitud laterálního posunu hlavy [ALH], linearita křivočaré dráhy [LIN], přímmost průměrné cesty [STR] a kmitočtová frekvence [BCF] (Brito et al. 2016).



**Obrázek č. 6:** Označení jednotlivých spermií dle pohyblivosti pomocí CASA (Brito et al. 2016)

Při použití metody CASA je pro detekci spermií použit software. Na obrazovce počítače (obrázek č. 6) je potom patrné, které spermie jsou pohyblivé (zelená linie) či nepohyblivé (černá tečka). Současně probíhá automaticky kvantifikace spermií, avšak je známa celá řada faktorů, které ovlivňují výsledky při použití CASA. Bylo zjištěno, že výsledky mohou být negativně ovlivněny zvětšením, koncentrací spermií, rychlostí pořizování snímků, typem komory či přítomností nespermatických částic, které mohou být falešně vyhodnoceny jako spermie. V rámci objektivizace výsledků je nutné neustále provádět vizuální posouzení vzorků a zjištěné problémy odstranit jejich úpravou (Brito et al. 2016). Mezi elementární faktor ovlivňující kvalitu výsledků patří odborná způsobilost laborantů, kteří musí být řádně proškoleni na používání systému CASA (Fraser & Group 1998).

### 3.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie, která uživateli umožňuje zkoumat morfologické a fenotypové charakteristiky jednotlivých buněk. Jedná se o laserovou technologii (Kendall & Riley 2002).

Pro analýzu ejakulátu byla průtoková cytometrie znovu zavedena na počátku 80. let 20. století. Pomocí průtokové cytometrie lze dosáhnout reprezentativní analýzy vzorků s ohledem na celý ejakulát. Pro objektivní výsledky je potřeba vyhodnocovat vyšší počet spermií, který by měl být v řádech tisíců. Vyhodnocení takového množství spermií konvenční analýza (hemocytometrická metoda, fluorescenční mikroskopie) neumožňuje, naproti tomu průtoková cytometrie ano. Technikou průtokové cytometrie lze během několika sekund vyhodnotit tisíce spermií a tím dosáhnout vyšší reprezentativnosti výsledků analyzovaného vzorku (Peña 2015).

Průtoková cytometrie umožňuje kromě rychlého automatizovaného počítání spermií i vyloučení nespermatických částic a ostatních buněčných komponent. Jde tedy o velmi přesnou metodu pro určení koncentrace spermií (Brito et al. 2016).

Základem funkčnosti průtokové cytometrie je oddělení spermií od jiných nespermatických částic a jejich rozptýlení v suspenzi (Hafez 2000).

Nevýhodou průtokové cytometrie jsou vysoké pořizovací náklady vybavení, potřeba kvalifikovaného pracovníka a složitost metod, kterými se připravují vzorky a vyhodnocují data.

Všechny výše zmíněné faktory omezují použití průtokové cytometrie při rutinní analýze ejakulátu a tato metoda je zatím využívána spíše pro výzkumné účely nebo ověření správnosti jiných metod. Během posledních let však pozorujeme zvýšení použití průtokové cytometrie pro analýzu spermatu (Brito et al. 2016).

### 3.3.1 Princip

Principem průtokové cytometrie je využití detekce rozptylu světla a fluorescence jednotlivých buněk. Eliminace odchylek mezi jednotlivými vzorky spočívá v aplikaci přesných objemů, což je rozdíl oproti jiným používaným metodám. Pro dávkování přesných objemů jsou používány přístroje opatřeny pevně umístěnými elektrodami a detekují tak pokles hladiny kapaliny či jsou vybaveny velice přesnými injekčními stříkačkami, které vstříkují předem stanovený objem do systému. Základem pro hodnocení spermií je využití akustické, či hydrodynamické fokusace, která umožní uspořádání náhodně rozptýlených částic v suspenzi do jednoho proudu, ve kterém jsou jednotlivé spermie uspořádány za sebou. Spermie jedna po druhé prochází vyšetřovací komorou, ve které jsou vystaveny laserovému paprsku. Pokud jsou spermie obarveny fluorochromy tak fluoreskují a rozptylují světlo laseru. Na základě rozptylu světla, lze určit relativní velikost jednotlivých částic oddělit spermie od ostatních buněk či nečistot (Brito et al., 2016).

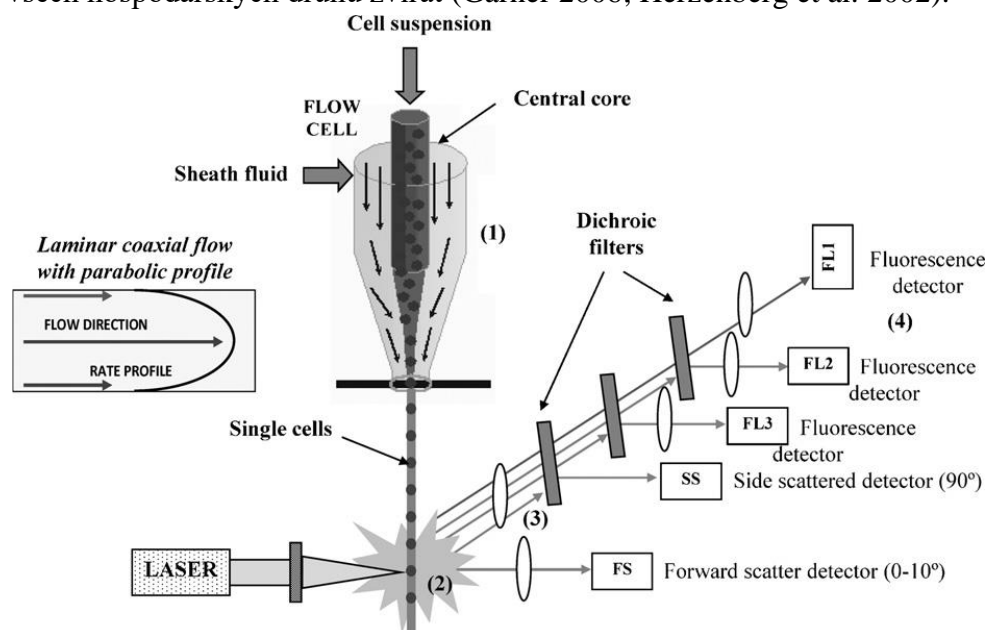
Nový přístup pro hodnocení ejakulátu představuje tzv. hmotnostní cytometrie, která pro označení částic využívá stabilních izotopů kovů. Stabilní izotopy kovů jsou následně detekovány pomocí atomové hmotnostní spektroskopie. Princip spočívá v použití protilátek, které označí stabilní izotopy kovů tím, že se na ně navážou a jsou následně detekovány hmotnostním spektrometrem. Analýza je realizována vstříkovaním buněk do argonové komory. Buňky se zde ionizují a atomizují, přičemž vytváří tzv. iontovou mlhu. Iontová mlha je poté analyzována hmotnostním spektrometrem. Hmotnostní spektrometr měří obsah kovů v buňce. Pomocí hmotnostní cytometrie lze rozlišit jednotlivé buňky a analyzovat u nich více než 40 buněčných parametrů současně. Hmotnostní cytometrie není omezena zkoumáním jedné úrovně buněčného metabolismu, proto mohou být hladiny bílkovin, posttranslační modifikace či produkty rozkladu bílkovin vyhodnoceny z jednoho pokusu. Během experimentu dochází při použití hmotnostní cytometrie ke zničení všech analyzovaných buněk, což představuje velkou nevýhodu této metody (Cosma et al., 2017).

Nesmíme opomenout ani zobrazovací průtokovou cytometrie, která kombinuje funkce fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. Zobrazovací průtoková cytometrie umožňuje multiparametrickou analýzu několika tisíců buněk. Každá částice, která prochází detektorem je zachycena a vyhodnocena formou obrazu. Zobrazovací cytometrie umožňuje analýzu morfologických parametrů v populaci i jednotlivých buňkách (Herzenberg et al., 2002).

Metodou průtokové spermie lze dosáhnout sexace spermií za použití přesného barvení DNA fluoroforem specifickým pro tuto nukleovou kyselinu (Hoechst 33342). V tomto případě dochází k odlišení subpopulací Y a subpopulací X. Třídění spermií následně umožňuje vysokorychlostní třídič. Příkladem může být FACS, což je fluorescenčně aktivovaný vysokorychlostní buněčný třídič, který umožňuje současné obarvení, třídění a analýzu buněk. Rychlost třídění spermií se pohybuje okolo 8000 spermií/ s, přičemž získáváme subpopulaci X



či Y. Jednotlivé subpopulace jsou shromážděny v podpůrných médiích a mohou být tak následně použity pro oplodnění in vitro či umělou inseminaci. Toto předurčení pohlaví lze využít u všech hospodářských druhů zvířat (Garner 2006; Herzenberg et al. 2002).



Obrázek č .7: Schéma průtokového cytometru (Díaz et al. 2010)

### 3.3.2 Hodnocení spermií pomocí průtokové cytometrie

Použití průtokové cytometrie pro hodnocení spermií umožňuje vyhodnocení více parametrů současně, čímž jsou poskytovány spolehlivější výsledky, které umožní přesnější odhad oplozovací schopnosti spermií (Peña 2015). Provedení analýzy spočívá v tom, že každá spermie je obarvena barvivem a množství barviva, které je absorbováno spermií změní průtokový cytometr, jehož schéma je znázorněno na obrázku č. 7. Spermie jsou ze vzorku ejakulátu vstříkovány do uzavřeného kanálku, kterým proudí tekutina, což umožňuje získat informace o jednotlivých spermiích (Graham 2001). Tekutina, ve které jsou rozptýleny buňky se postupně rozkládá na jednotlivé kapky, přičemž každá kapka má schopnost udržet jednu buňku (spermiu) – technologie jet in air. Technologie jet in air spočívá v tom, že existuje proud kapaliny, který nese buňky. V určité vzdálenosti od trysky se kapalina rozpadne na jednotlivé kapičky, přičemž každá kapička v sobě nese jednu buňku a velikost kapiček závisí na nastavení přístroje a velikosti otvoru trysky. Velikost kapek se pohybuje v rozmezí 40–200 mikronů. Jednotlivé kapičky potom prochází laserovým paprskem, který způsobí fluorescenci jednotlivých barviv absorbovaných spermií. Nevýhodou třídičů využívajících technologii jet-in-air je, že kapičky, které se pohybují ve vzduchu poskytují horší optické rozlišení v porovnání s kyvetovými třídiči. Jejich rychlost třídění ovšem představuje značnou výhodu. Kyvetové třídiče (cuvette-based cytometer) pracují na podobném principu jako výše uvedené, ale buňky jsou v tomto případě nuceny protékat kyvetou, ve které interagují s laserem. Kyveta je pomocí speciálního optického gelu spojená se zvětšovacími objektivem, čímž je dosaženo lepší detekce emitovaného světla (Schmid, 2012). Průtoková cytometrie využívá detektoru, který je schopný zachytit i slabé optické signály. Detektor, který je spojený s filtry umožňuje procházet světlu pouze o určitých vlnových délkách a dokáže určit, zda jednotlivé kapičky obsahují nebo naopak

neobsahují buňku. Pokud kapička buňku obsahuje, tak dojde k vyhodnocení specifické barvy, se kterou je buňka spojena. Dochází k vyhodnocení toho, zda buňka je či není obarvena. Mimo to je kvantifikováno množství barvy spojené s každou buňkou. Fluorescenční sondy jsou průtokovým cytometrem detekovány pouze ve spojení s buňkami (Drummond 2013). Pokud se ve vzorku vyskytují některé fluorescenční sondy, které nejsou spojeny s buňkou nemusí být ze vzorku před analýzou vymyty. Obecně se však doporučuje vzorek před analýzou promýt, jelikož se tím sníží tzv. signál pozadí. Signál pozadí znamená jeho fluorescenci, kterou při analýze vidět nechceme. Průtoková cytometrie je založena na objektivním měření fluorescenčního barvení spojeného s buňkami (Graham 2001).

### **3.3.3 Hodnocení jednotlivých parametrů**

#### **3.3.3.1 Hodnocení životnosti spermií**

V rámci průtokové cytometrie lze využít postupů, při kterých lze vyhodnotit několik parametrů současně. Současně mohou být vyhodnoceny parametry jako je životaschopnost spermií, neporušenost cytoplazmatické membrány, neporušenost akrozomu a mitochondriální aktivita. Při analýze jsou životaschopné spermie definovány jako buňky, které nemají poškozenou cytoplazmatickou membránu. Pro hodnocení neporušenosti cytoplazmatické membrány je využito např. propidium jodidu (PI). Propidium jodid je interkalační činidlo, které prochází do buněk, u nichž je cytoplazmatická membrána poškozená. Buňky s intaktní cytoplazmatickou membránou zabrání průniku PI do buňky a barvit jádro (Gillan et al. 2005). U buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou dochází k průniku PI do jádra, kde se váže na DNA. Po navázání PI na DNA buňky červeně fluoreskují. (Graham 2001) Mezi další barviva, která se používají pro hodnocení životaschopnosti spermií patří ethidium homodimer (EH), který stejně jako propidium jodid proniká do buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou a váže se na DNA. Navázání ethidium homodimer na DNA rovněž způsobuje červenou fluorescenci. Mezi nejrozšířenější barvení patří kombinace PI a SYBR-14. Činidlo SYBR-14 proniká i do buněk s neporušenou membránou a je tedy membránově propustný. SYBR-14 způsobuje, že všechny buňky fluoreskují zeleně. Pokud mají buňky poškozenou cytoplazmatickou membránu vytěsní PI z buňky SYBR-14 a tím zhasne zelenou fluorescenci (Anel & Paz, 2010).

#### **3.3.3.2 Hodnocení mitochondriální funkce**

Mezi základní posuzované parametry spermií průtokovou cytometrie patří mitochondriální aktivita. Mitochondriální aktivita je u spermií hodnocena pomocí barviva rhodaminu123. Rhodamin123 je transportován do mitochondrií, které aktivně dýchají. Akumulace rhodaminu123 způsobí zelenou fluorescenci mitochondrií. Při použití této metody není však možné rozlišit různou respirační aktivitu jednotlivých mitochondrií (Anel & Paz 2010). V další studii byla použito mitochondriální barvivo JC-1, která slouží k separaci spermií s vysoce funkčními mitochondriemi od spermií se špatnou funkcí mitochondrií. JC-1 proniká do mitochondrií a způsobuje fluorescenci funkčních spermií. JC-1 fluoreskuje v monomerním stavu monomerním stavu zeleně stejně jako rhodamin123, avšak se zvyšující se koncentrací JC-1 uvnitř buňky dochází ke vzniku agregátů, které fluoreskují oranžově. Buňky s vysokou

mitochondriální aktivitou fluoreskují oranžově a buňky s nízkou mitochondriální aktivitou zeleně (Gravance et al. 2000).

Nedávno vyvinutou skupinu barviv představují barviva MitoTracker. Barviva skupiny MitoTracker akumulují a barví aktivní mitochondrie a jsou vysoce specifická. Tato skupina barviv je dostupná v širokém rozsahu emisní fluorescence. Několik druhů barviv je fixovatelných, čímž je umožněno oddálení analýzy mitochondriální aktivity (Anel & Paz, 2010).

### 3.3.3.3 Hodnocení akrozomu spermií

Akrozomální reakce jsou schopné pouze spermie po kapacitaci. Kapacitaci spermie prodělávají v samičím pohlavním ústrojí a pouze spermie schopné akrozomální reakce mají schopnost penetrovat zonu pellucidu vajíčka (Tulsiani et al. 1998). Mezi časté příčiny neplodnosti samců je nedostatek, či absence spermií s neporušenými akrozomy (Carretero et al. 2015). Posouzení akrozomu může být realizováno na živých buňkách nebo na obarveném nátěru. Při posouzení akrozomu živých spermií dochází k jejich obarvení a poté může ihned dojít k jejich hodnocení pomocí průtokové cytometrie či mikroskopu. Pro barvení akrozomální oblasti existuje několik barvicích metod, přičemž nedochází k obarvení postakrozomální části hlavičky spermie. Barvení akrozomální oblasti lze realizovat při použití Giemsova barvení či Schiffovo činidlo. Giemsovo barvení i Schiffovo činidlo jsou vhodná pro spoustu živočišných druhů. Při použití Giemsova barvení mohou být pozorovány čtyři různé modely spermií v případě obrazové průtokové cytometrie, model LAR (neobarvená oblast akrozomu a postakrozomální oblast), živé spermie s nepoškozeným akrozomem (LAI: růžový akrozom a neobarvená postakrozomální oblast), mrtvé spermie s akrozomem, u nichž proběhla akrozomální reakce (DAR: neobarvený akrozom, a tmavá postakrozomální oblast), mrtvé spermie s neporušeným akrozomem (obarvený akrozom a tmavá postakrozomální oblast). K diferenciaci dochází i v oblasti bičíku spermií, přičemž u živých spermií jsou bičíky zbarveny růžově u mrtvých mají bičíky tmavé zbarvení. Výše uvedené metody odhalují pouze přítomnost či nepřítomnost akrozomálního obsahu, proto je jejich pomocí možné vyhodnotit pouze dokončené akrozomální reakce. Metoda trojitého fluorescenčního barvení umožňuje současné hodnocení životaschopnosti spermií a intaktnosti akrozomu pomocí průtokové cytometrie. Při průtokové cytometrie existuje riziko diskriminace živých spermií s porušenou cytoplazmatickou membránou, chybnému rozlišení spermií s nepoškozeným či poškozeným akrozomem a k chybnému odlišení spermatických částic od nespermatických (Budai et al. 2014).

## 3.4 Metody mražení spermatu

Odolnost spermií vůči mrazení se liší dle jejich specifických vlastností, mezi které patří tvar, velikost, složení lipidů a další. Z tohoto důvodu není možné vyvinout jednotný standardizovaný postup mrazení ejakulátu pro všechna hospodářská zvířata. Proces kryokonzervace ejakulátu umožňuje dlouhodobou ochranu genetických zdrojů u malých přežvýkavců a rozšíření umělé inseminace v denní produkci. Jako alternativa tradičního

způsobu mrazení ejakulátu může být použita metoda ultra rychlé zmrazení (ultra-rapid freezing) či lyofilizace (Dessole et al. 2010).

Při lyofilizaci dochází k sušení buněk mrazem. Sublimace ledových krystalků ve vzorku je základním principem lyofilizace. Při lyofilizaci nedochází k přímému přechodu mezi kapalným a plynným skupenstvím, což je často příčinou poškození buněk. Mrazení spermatu probíhá v lyofilizátoru, přičemž, během prvotního sušení dochází ke snížení tlaku a aplikaci tepla na vzorek čímž je iniciována sublimace. Výpary během sublimace procházejí otvorem v uzávěru. Primární sušení končí, pokud jsou ze vzorku odstraněny všechny ledové krystalky. Sekundární sušení se uskutečňuje zvýšením teploty a snížením parciálního tlaku vodní páry v nádobě. Výsledným produktem je lyofilizát spermií (Luño et al. 2014). Výhodou lyofilizace jsou nižší náklady, absence tekutého dusíku a malý prostor pro skladování spermií (Shahba et al. 2016). Lyofilizace způsobuje absenci motility u spermií a poškození jejich cytoplazmatické membrány, což je značnou nevýhodou této metody. Spermie, které jsou nepohyblivé mohou být transportovány do vajíčka pomocí intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI), a tím je zahájen proces oplodnění. Použití intracytoplazmatické injekce představuje vysoce komplikovanou metodu, a proto ji nelze chápat jako alternativu umělé inseminace (Keskintepe & Eroglu, 2014).

Ultra rychlé mrazení představuje další možnou alternativu tradičního procesu kryokonzervace. Ultra rychlé mrazení ejakulátu nevyžaduje použití kryoprotektantů, které jsou nutné pro konvenčně používanou kryokonzervaci. Metoda spočívá v šokovém zmrazení suspenze spermií přímým ponořením do tekutého dusíku (-196 °C). Při ultra rychlém mrazení dochází k tuhnutí živých buněk s absencí tvorby ledových krystalků, což dává předpoklad pro menší poškození spermií (Slabbert et al. 2015). Ve studii byla porovnávána motilita spermií, neporušenost DNA a akrozomu u čerstvého ejakulátu, ejakulátu rozmrazeného a ultra rychle mrazeného. Bylo prokázáno, že po ultra rychlém mrazení ejakulátu výrazně klesá motilita spermií. Motilita spermií se po ultra rychlém mrazení pohybovala v rozmezí od 2 do 7 %. U čerstvého ejakulátu byla motilita nejvyšší a průměrná hodnota byla 92,2 %, u rozmrazeného ejakulátu bylo dosaženo průměrné motility 42,2 % (Arando et al. 2019). Neporušenost akrozomu spermií byla u ultra rychle mrazeného ejakulátu téměř nulová, u rozmrazeného ejakulátu se výrazně snížila a nejlepších výsledků bylo dosaženo u čerstvého ejakulátu. U jednotlivých vzorků nebyly zjištěny významné rozdíly v DNA. Proces mrazení ejakulátu u malých přežvýkavců není doposud optimalizován, jelikož jsou jejich spermie vysoce náchylné k velmi nízkým teplotám (Lv et al. 2018).

Mrazení beraního ejakulátu je komplexní proces, který je ovlivněn rozsáhlou řadou faktorů ovlivňujících výslednou kvalitu ejakulátu, a tím i úspěšnost následné umělé inseminace. Pouze 50-60 % populace spermií přežije proces kryokonzervace (Bispo et al., 2011).

### **3.4.1 Obecný postup**

Posouzení kvality ejakulátu předchází procesu mrazení beraního ejakulátu. Po posouzení kvality ejakulátu, dochází k jeho ředění pomocí ředidel. Ředidla mohou být na bázi fruktózy, kyseliny citronové, fruktózy, Tris, antibiotik či žloutku. Ejakulát může být zředěn jednostupňovou nebo dvoustupňovou metodou. V případě dvoustupňového ředění je nejprve

přidáno ředidlo, které neobsahuje glycerol a až ve druhé fázi je přidáno ředidlo, které glycerol obsahuje. U jednostupňové metody je již před ekvilibrací jednorázově přidáno ředidlo, které již glycerol obsahuje. Po zředění ejakulátu následuje pomalé ochlazení spermatu beranů na teplotu 5 °C, během minimálně 1,5 až 2 hodin. Ochlazené sperma je po dobu 2 až 4 hodin ekvilibrováno při teplotě 5 °C. Účelem ekvilibrace je přizpůsobení spermií na redukovaný metabolismus. Během fáze ekvilibrace také dochází k průniku kryoprotektantů do buněk, čímž vzniká rovnovážný stav mezi intracelulární a extracelulární koncentrací glycerolu a jiných osmoticky aktivních látek. Po ekvilibraci je zředěný ejakulát uchováván v peletách o objemu 0,1 – 0,2 ml a mrazen po dobu 2–4 minut na povrchu suchého ledu (79 °C). Chlazené sperma může být dále zamrazené v pejetách při použití automatického mrazicího stroje, kdy je rychlost mrazení -8 °C/ min. Pro mrazení v pejetách mohou být použity různé modifikace, kdy jsou použity chlazené nosiče. Chlazené nosiče se umístí 4 až 6 mm (-75 až -125 °C) nad hladinu kapalného dusíku a takto se mrazí po dob 7 až 10 minut. Rozmrazení pejet většinou probíhá ve vodní lázni o teplotě 30 až 40 °C po dobu 20 až 60 sekund v případě použití pelet dochází k rozmrazení buď suchou cestou za použití suchých skleněných tub nebo mokrou cestou, kdy jsou pelety rozmrazeny v přehřátém rozmrazovacím roztoku. Konečná koncentrace glycerolu je u berana 4–6 % (Lv et al., 2018).

### 3.4.2 Ředidla a komponenty používané při mražení ejakulátu

Nunes et al. (2007) uvedli protein (SBU III) bulbouretrálního původu, který snižuje schopnost kryokonzervace spermií při použití ředidel na bázi mléka. Pro mražení ejakulátu se ukázalo jako optimální použití ředidla na bázi Tris, s obsahem 6 % glycerolu. Jako alternativa byla navržena ředidla, která minimalizují interakci spermií a semenné plazmy, kravské mléko bez lipidů, ředění bez triglyceridů. Následně bylo prokázáno, že neexistuje znatelný rozdíl mezi celistvým ejakulátem, či ejakulátem zbaveným určitých složek. Ředidla používaná při kryokonzervaci jsou látky, které dodávají spermiím energii, zajišťují ochranu před biochemickým a fyzikálním poškozením a udržují vhodné podmínky pro přežití. Ředidlo používané ke kryokonzervaci zahrnuje nepropustný kryoprotektant (mléko, žloutkové médium), penetrační kryoprotektant (glycerol, propylenglykol, dimethylsulfoxid), pufr (Tris), jeden či více cukrů (glukóza, laktóza, trehalóza), sůl (citrát sodný), organickou kyselinu (kyselina citronová), antibiotika jako penicilin a streptomycin (Purdy, 2006).

Pro mražení ejakulátu se nejčastěji používá ředidlo bez sušeného mléka a ředidlo na bázi Tris obsahující glukózu. Různé modifikace těchto ředidel byly zkoumány s různými výsledky. Bylo zjištěno, že komerčně dostupné ředidlo na bázi sóji (Bioxcell®) je lepší než ředidlo na bázi vaječného žloutku (Irvine TYB) a to především z hlediska zachování motility mražených spermií při použití dvoustupňové metody (Roof et al., 2012). Jiménez-Rabadán et al. (2012) porovnávali účinky ředidel u rozmraženého ejakulátu. Bylo porovnáváno komerčně vyráběné ředidlo na bázi vaječného žloutku Biladyl (20 % vaječného žloutku, 7% glycerol) a ředidlo na bázi sóji Andromed (přísada na bázi sóji a 7% glycerol) s odstředěným mlékem (7% glycerol). Zjistili, že ředidlo na bázi přípravku vaječného žloutku Biladyl a ředidlo na bázi sóji Andromed je lepší než ředidlo na bázi odstředěného mléka. Nejnížší procento pohyblivých spermií v rozmraženém ejakulátu bylo při použití odstředěného mléka (17,7 %), nejvyšší hodnoty

vykazoval vzorek s komerčně vyráběným přípravkem Biladyl (45,3 %) a střední hodnota byla zjištěna u přípravku Andromed (38,8 %). Při použití ředidla na bázi sóji (Andromed) bylo zjištěno nejvyšší procento spermií s neporušeným akrozomem (67,6 %), o něco méně spermií s neporušeným akrozomem vykazovalo ředidlo na bázi vaječného žloutku (61,3 %) a nejméně neporušených spermií bylo u odstředěného mléka (53,5 %). Výsledky několika studií ukazují, že Tris – kyselina citronová poskytuje nejvýhodnější pufovací systém a je nepřizpůsobivější ke spermiím kozlů. Významným faktorem ovlivňujícím spermie je pH. Změny pH semene mohou vést k buněčnému a subbuněčnému poškození spermií. Pro zachování životaschopnosti a oplození schopnosti je nezbytné udržovat vhodné prostředí. Důležitou roli hraje v tomto ohledu pufr obsažený v kryokonzervačních prostředcích. Ideální pufr by měl mít neutrální pH, vysokou rozpustnost ve vodě, minimální rozpustnost v ostatních rozpouštědlech, minimální účinky na soli, vyšší iontové síly a chemickou stabilitu. Pufr zvyšuje fyzikální a chemickou stabilitu plazmatické membrány, přičemž neutralizuje kyseliny vznikající během skladování. (Gangawar et al. 2016) Bylo zjištěno, že hodnota pH má významný vliv na motilitu a dýchání spermií, přičemž optimální hodnota pro spermie beranů je 6 – 6,5, kdy spermie vykazují nejvyšší příjem kyslíku a největší pohyblivost (Purdy 2006; Fukushara & Nishikawa 2011; Bartoov et al. 1980).

### **3.4.3 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu po rozmrazení**

#### **3.4.3.1 Vliv ředidel**

Lopez Saez et al. (2002) zkoumali různé účinky tří různých typů ředidel na kvalitu ejakulátu u beranů při skladování 5 °C po dobu šestnácti dní. Jako ředidlo bylo použito odstředěné mléko (M), TesT (TE) a ředidlo Tris-trehalosa (TR). Z parametrů ejakulátu byla zkoumána pohyblivost spermií a procento nepoškozených akrozomů. Hodnocení bylo prováděno každých 24 hodin, přičemž bylo zjištěno, že nejvyšší pohyblivost byla zachována u vzorku ejakulátu s použitím ředidla TR (94,7 ± 1,36 %), menší hodnota byla naměřena u ředidla TE (82,4 ± 3,08 %) a středních hodnot potom dosáhl vzorek s použitím ředidla M (89,3 ± 2,17 %). Nejvyšší procento spermií s neporušeným akrozomem bylo prokázáno u ředidla M (98,3 ± 0,83 %), zatímco nejnižší procento bylo zjištěno při použití ředidla TR, kde bylo o více než 6 % spermií s nepoškozeným akrozomem méně, střední hodnotu potom vykazovalo ředidlo TE (93,4 ± 2,5 %). Do média určeného ke konzervaci se přidávají sloučeniny různého charakteru, jednou z nich je trehalóza, což je syntetizovaný disacharid používaný zdroj energie pro spermie a jako kryoprotektantů. Ve studii byl prokázán i významný vliv teploty skladování na kvalitu ejakulátu, přičemž bylo zjištěno, že spermie skladované při teplotě 5 °C vykazují vyšší parametry životaschopnosti a pohyblivosti po delší dobu oproti spermiím skladovaným při teplotě 15 °C.

Soltanpour & Moghaddam (2014) zkoumali vliv ředidel, u kterých se lišilo procentuální zastoupení glycerolu a žloutku. Studie byla provedena na čtyřech dospělých beranech, přičemž ejakulát byl odebírán s pomocí umělé vagíny. Po odběru byly vzorky smíchány s ředidly. První ředidlo bylo naředěno v poměru 1:3, obsahovalo 3,786 g Tris, 2,172 g kyseliny citronové a 1 g fruktózy ve 100 ml destilované vody, následně bylo doplněno 5% (v/v) glycerolu a 5% vaječného žloutku, penicilinem (100 000 IU) a streptomycinem (100mg) – vzorek 2, další

ředidlo bylo naředěno také v obsahu 1:3, přičemž obsahovalo 2,71 g Tris, 1 g kyseliny citrónové a 1,4 g fruktózy ve 100 ml destilované vody a dále doplněno o 7% (v/v) a 20% vaječného žloutku, penicilin (100 000 IU) a streptomycin (100 mg) – vzorek 2. Naředěné vzorky byly zamrazeny a v tekutém dusíku a po rozmrazení při 37 °C bylo posouzeno pH, životaschopnost spermií a pohyblivost v průběhu 3 dnů skladování po rozmrazení. Tris působil jako pufr zabráňující výkyvům pH, fruktóza a kyselina citronová představovali zdroj energie. U vaječného žloutku bylo prokázáno, že ochraňuje buněčnou membránu během chlazení a glycerol chrání spermie před poškozením membrány během procesu zmrazování. Z výsledků studie vyplynulo, že ředidlo obsahující 7 % glycerolu a 20 % vaječného žloutku prokázalo vyšší stupeň ochrany spermií než ředidlo obsahující 5 % glycerolu a 5 % vaječného žloutku. Přesnější výsledky jsou znázorněny v tabulce 7. Dále bylo prokázáno, že u rozmrazených ejakulátů klesá procento životaschopných spermií a snižuje se pohyblivost spermií s dobou skladování, což uvádí i Lopez Saez et al. (2002).

### **3.4.3.2 Vliv přídavku aditiv**

V rámci mražení ejakulátu byly vyzkoušeny různé typy aditiv za účelem delší doby skladovatelnosti a vyšší přežitelnosti spermií po rozmrazení. Azawi & Hussein (2013) zkoumali vliv přídavku vitamínu C a vitamínu E do ředidla na bázi Tris na délku skladování spermatu beranů plemene awassi při teplotě 5 °C, přičemž byly použity vzorky od šesti dospělých samců. Každý vzorek byl rozdělen na tři části, přičemž jedna část byla obohacena přídavkem 0,9 mg/ml vitamínu C, druhá část byla obohacena o 1 mg/ml vitamínu E a třetí část představovala kontrolu, tedy byla bez jakéhokoli přídavku. Vzorky byly skladovány po dobu pěti dnů a každých 24 hodin byly spermie obsažené ve vzorcích testovány na motilitu, vitalitu, abnormality spermií a defekty akrozomů. Výsledky studie ukázaly, že vzorky s přídavkem vitamínů C a E vykazovaly vyšší životaschopnost po dobu 120 hodin ve srovnání s kontrolní skupinou. Vyšší procento abnormálních spermií a defektů akrozomů vykazoval vzorek bez přídavků vitamínu C, kde se hodnoty pohybovaly od 37,6 do 71,5 %, oproti tomu u vzorku obohaceného o vitamin C bylo procento výskytu abnormálních spermií a defektů akrozomu pouze 18,8 – 52,8 %. Z výsledků je zřejmé, že přídavek antioxidantů jako jsou vitaminy C a E do médií používaných pro uchování spermatu by mohlo zlepšit kvalitu a životnost spermií. Stejně tak byl zjištěn pozitivní vliv přídavku selenu buď individuálně či v kombinaci s vitamínem E na parametry ejakulátu po rozmrazení (Zubair et al., 2015).

### **3.4.3.3 Vliv metody rozmrazení**

Byrne et al. (2000) zkoumali vliv rychlosti mražení na kvalitu ejakulátu u šesti dospělých beranů. Spermie beranů jsou nejvíce náchylné k poškození mezi teplotami -10 °C až -25 °C, přičemž cílem studie bylo zjistit, jak rychlost mražení v tomto kritickém teplotním rozpětí ovlivní fertilitu spermií. Byly použity dvě různé rychlosti mražení, rychlá 5 °C/min od 5 °C do -25 °C a pomalá 0,5 °C/min od 5 °C do -25 °C. Přičemž i v této studii byly lepší výsledky spojené vyšší rychlostí mražení spermií.

Další z faktorů, který může ovlivnit kvalitu ejakulátu po procesu kryokonzervace je metoda rozmrazení. Nicolae et al. (2014) zkoumali vliv různých rozmrazovacích metod na kvalitu

ejakulátu u pěti dospělých beranů. Optimalizace postupu rozmrazení ejakulátu je důležitá pro zajištění co nejvyššího procenta životaschopných spermií. Při experimentu bylo použito pět variant rozmrazování, rozmrazení při teplotě 90 °C po dobu 2 sekund, rozmrazení při teplotě 75 °C po dobu 10 sekund, rozmrazení při teplotě 75 °C po dobu 5 sekund, rozmrazení při teplotě 50 °C po dobu 30 sekund a rozmrazení při 39 °C po dobu 120 sekund. Výsledky studie ukázali, že motilita a životaschopnost spermií byla významně vyšší při použití nižších teplot po delší dobu. Lepší výsledky vykazovaly ejakuláty rozmražené při teplotách 39 °C a 50 °C (pohyblivost  $39 \pm 2,08$  % pro 39 °C a  $45 \pm 2,24$  % pro 50 °C; životaschopnost pro 39 °C  $45,61 \pm 1,83$  % a  $52,47 \pm 2,25$  %) oproti ostatním způsobům rozmrazení, kde se pohyblivost spermií pohybovala od 10 do 20 % a procento životaschopných spermií kolísalo od 7 do 30 %.

Rychlost rozmrazování ejakulátu je jeden z velice důležitých faktorů ovlivňujících životaschopnost spermií. U tříletých beranů byli testovány různé rychlosti rozmrazení ejakulátu při různých teplotách. Semeno bylo rozmrazeno po sedmi dnech uskladnění v tekutém dusíku. Bylo testováno rozmrazení ejakulátu berana na vzduchu při teplotě 20 °C po dobu 8 min, ve vodě při teplotě vody 0-2 °C po dobu 2 minut. Dále bylo testováno rozmrazení ejakulátu při teplotě 20 °C za 1 minutu, 40 °C za 30 sekund, 60 °C za 8 sekund a 80 °C po dobu pěti sekund. Po rozmrazení ejakulátu byla hodnocena motilita spermií a neporušenost akrozomu spermií. Účinek rychlosti rozmrazení ejakulátu byl velmi významný v závislosti na mrazící křivce. Při optimálním způsobu mražení (20 °C/ min) byla rychlostí rozmrazení významně ovlivněna pouze motilita spermií (FMP-freeze-thawed percentage motility), ale při suboptimálním způsobu mražení (2 °C/ min) byla ovlivněna i intaktnost akrozomu spermií. Nebyly zjištěny rozdíly v motilitě spermií po rozmrazení ejakulátu ve vodě o teplotě 60 °C a 80 °C. Velký vliv měla rychlost rozmrazení na intaktnost akrozomu. Intaktnost akrozomu u pomalých způsobů rozmrazování se pohybovala od 33-37 % v porovnání s intaktností akrozomů spermií, které byly rozmrazeny ve vodě při teplotě 80 °C, kde se intaktnost akrozomu pohybovala okolo 67 %. Intaktnost akrozomu úzce souvisí s rychlostí rozmrazení ejakulátu, ale nebyly zjištěny významné rozdíly mezi rozmrazením ejakulátu ve vodě o teplotě 60 °C a teplotě 80 °C. Optimální teplota vodní lázně pro rozmrazení ejakulátu je 60–80 °C (Fiser et al., 1986).

Multifaktoriální studie analyzovala vliv metody mražení ejakulátu, použití kryoprotektantů a jejich poměr při ředění ejakulátu a rychlost rozmrazování ejakulátu na pohyblivost spermií a intaktnost akrozomu. Vyšší rychlost rozmrazení ejakulátu (60 °C/ 8 sekund) neměla vliv na pohyblivost a intaktnost akrozomu v porovnání s nižší rychlostí rozmrazení (37 °C/ 20 sekund). Ejakulát byl hodnocen ihned po rozmrazení a následně po 3 a 6 hodinách od rozmrazení. Motilita a intaktnost akrozomu nebyla časem ovlivněna při porovnání dvou metod rozmrazení. Podrobnější výsledky viz. tabulka č. 5 (Pontbriand et al., 1989). Vyšší rychlost rozmrazování ejakulátu zlepšuje životaschopnost spermií ve srovnání s pomalým způsobem rozmrazení ejakulátu (Robbins et al., 1976).



**Tabulka č. 3 :** Vliv různých způsobů rozmrazování na parametry ejakulátu (Nicolae et al., 2014)

Teplota čas rozmrazení	Charakteristiky ejakulátu			
	Motilita (%)	Životaschopnost (%)	Mitochondriální aktivita (%)	Integrita plazm. membr. (%)
39 °C/ 120 s	39 ± 2,08	45,61 ± 1,83	37,03 ± 1,66	38,97 ± 1,84
50 °C/ 30 s	45 ± 2,24	52,47 ± 2,25	40,66 ± 2,36	46,35 ± 2,55
75 °C/ 10 s	20 ± 1,83	27,16 ± 1,86	22,07 ± 2	19,3 ± 2,07
75 °C/ 5 s	30 ± 1,83	34,48 ± 1,82	28,52 ± 1,81	31,97 ± 1,41
90 °C/ 2 s	10 ± 1,29	15,34 ± 1,32	7,1 ± 1,37	11,36 ± 1,36

**Tabulka č. 4 :** Vliv způsobu rozmrazení na kvalitu ejakulátu (Pontbriand et al., 1989)

Metoda rozmrazení	Motilita (%)			% neporušenosti akrozomu
	čas po rozmrazení			
	0 hod.	3 hod.	6 hod.	0 hod.
37 °C	46,0 ± 2,2	45,0 ± 2,4	43,5 ± 2,7	62,2 ± 3,3
60 °C	47,5 ± 2,1	43,0 ± 2,7	38,5 ± 1,8	68,3 ± 4,0
37 °C	46,5 ± 2,5	42,5 ± 1,7	39,0 ± 1,9	59,4 ± 3,7
60 °C	49,0 ± 3,0	46,0 ± 3,6	40,0 ± 3,6	56,6 ± 2,9

Pro hodnocení plodnosti byly použity různé metody rozmrazení ejakulátu berana. Pejety byly rozmrazovány při teplotě 70 °C/ 5sekund, 50 °C/ 9 sekund, 35 °C/ 12 sekund. Významně vyšší plodnost byla odhalena pro sperma rozmražené při teplotě 70 °C/ 5 sekund ve srovnání se spermatem rozmraženým při teplotě 35 °C/ 12 sekund. Nebyl však zjištěn statisticky významný rozdíl mezi spermatem rozmraženým při 70 °C a spermatem rozmraženým při 50 °C (Paulenz et al., 2004).

Spermie rozmražené při vyšší teplotě 70 °C/ 8 nebo 12 sekund ve srovnání s nižší teplotou 35 °C/ 15 nebo 30 sekund vykazují vyšší motilitu, celistvost plazmatické membrány a obecně vyšší kvalitu (Aamdal & Andersen, 1968).

Paulenz et al., 2007 zkoumali vliv různých postupů rozmrazování ejakulátu beranů na plodnost ovcí. Byly použity tři odlišné teploty rozmrazování ejakulátu 70 °C/ 8 sekund; 50 °C/ 9 sekund a 35 °C/ 12 sekund. Bylo zjištěno, že k číselně nejvyššímu počtu jehňat (59,2 %) vedlo sperma rozmražené při teplotě 35 °C/ 12 sekund. Bylo testováno sedm dospělých beranů se známou plodností. Sperma bylo odebíráno třikrát až čtyřikrát za týden během připouštěcí sezóny. Při experimentu hrál významnou roli i typ použité slámky. Lepší výsledky byly dosaženy pro minitubes oproti mini straws bez ohledu na způsob rozmrazení.

Nordstoga et al., 2009 zkoumali vliv dvou metod rozmrazování ejakulátu na plodnost ovcí. Sperma bylo odebíráno od devíti dospělých beranů ve věku 2,5 a 3,5 let. Semeno bylo odebíráno třikrát až pětikrát týdně během připouštěcí sezóny. Použita byla teplota 35 °C/ 20 sekund a 70 °C/ 8 sekund.

**Tabulka č. 5:** Vliv způsobu rozmrazování na plodnost ovcí (Nordstoga et al., 2009)

Metoda rozmrazení	Počet inseminací	Nepřeběhlí	Obahnění		
		počet	procento	počet	procento
35 °C/ 20 sec	275	146	53,1	137	49,8
70 °C/ 8 sec	250	127	50,8	117	46,8

Stuart et al., 2019 použili pro rozmrazení ejakulátu teplotu 37 °C/ 1 min a 42 °C/ 20 sec. Uvedli, že pomalá metoda rozmrazení ejakulátu měla vyšší životaschopnost oproti rychlejší metodě rozmrazení ( $36.88 \pm 0.75$  vs.  $33.82 \pm 1.03$ ;  $P = 0.003$ ).

Bylo hodnoceno sperma od pěti 2,5ročních beranů. Sperma bylo odebíráno po dobu tří po sobě jdoucích dní. Zkoumány byly tři metody rozmrazení ejakulátu 70 °C/ 5 sekund; 50 °C/ 9 sekund; 35 °C/ 12 sekund. Bylo zjištěno, že motilita spermií a intaktnost plazmatické membrány po rozmrazení byla výrazně vyšší u ejakulátu, který byl rozmražen vyšší teplotou za kratší dobu. Významně vyšší byla motilita pro pejetý rozmražený při 70 °C ve srovnání s pejetými rozmraženými při 35 °C. Při porovnání teplot 70 °C a 50 °C však nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl (Söderquist et al., 1997).

Technika AI u ovcí musí být zvolena na základě typu použitého spermatu. Zmražené sperma se nedoporučuje používat pro intravaginální inseminaci, zatímco může být použito pro inseminaci intracervikální. Výsledky plodnosti po intracervikální inseminaci jsou relativně malé, protože při použití intracervikální inseminace se pouze malé procento spermií dostane k vajíčku. Většina spermií aplikovaných do krčku dělohy je vlivem tlaku vyloučena přes vulvu nebo fagocytována v reprodukčním traktu samic (O'Meara et al., 2005). Vzhledem k anatomii děložního hrdla ovcí se pro umělou inseminaci dá použít pouze velmi malý objem ejakulátu. Děložní hrdlo u ovce je dlouhé a je tvořeno převážně pojivovou tkání, lumen je velmi spletitý vlivem přítomnosti cervikálních kroužků (4-7), které poskytují fyzickou bariéru pro vnější kontaminanty. Cervikální kroužky představují hlavní bariéru pro intracervikální inseminaci, jelikož vlivem jejich zvrásnění dochází často k nesprávnému nasměrování pipety a pipeta je zřídka zavedena do cervikálního kanálu na více než 1 cm (Kershaw et al., 2005). Objem ejakulátu používaný pro intracervikální inseminaci je menší než 0,25 ml a obsahuje relativně malý počet spermií ( $0,2 \times 10^9$  spermií), z důvodu zabránění zpětnému výtoku ejakulátu. Velikost ředění je v případě intracervikální inseminace omezena na 1:1 až 1:4 což představuje nedostatečnou ochranu ejakulátu vůči chladovému šoku, či mrazovému poškození. Největší význam má v dnešní době laparoskopická intrauterinní inseminace, kdy je sperma aplikováno přímo do lumen děložních rohů, což je místo bližší místu oplodnění v porovnání s předchozími metodami. Díky laparoskopické inseminaci je možné obejít bariéru představovanou krčkem děložním a snížit množství ejakulátu používaného po AI. Počet spermií potřebných pro inseminaci je menší, přičemž objem dávky je vyšší, což umožňuje ředění ejakulátu ve vyšším poměru a tím lepší ochranu spermií. Při použití laparoskopické AI je používán mražený ejakulát což má potenciál při šíření cenných genotypů. Při správném provedení se úspěšnost této metody pohybuje v rozmezí 60–75 % (Solti et al., 2012).

**Tabulka č. 6:** Výsledky hodnocení rozmrazeného ejakulátu při použití dvou různých ředidel (Soltanpour & Moghaddam 2014)

	pH	životaschopnost (%)	progresivní pohyb (%)
vzorek 1	6,8 ± 0,08	60,33 ± 2,79	57,2 ± 2,76
vzorek 2	6,9 ± 0,07	65,5 ± 2,44	61,45 ± 2,43

#### 3.4.3.4 Vliv přídavku glycerolu

Glycerol je látka, která se používá jako kryoprotektant. Navzdory této své hodnotné vlastnosti je glycerol pro spermie metabolicky toxický a nepříznivě ovlivňuje neporušenost plazmatické membrány v souvislosti s teplotou a jeho koncentrací (Fiser & Fairfull, 1986).

Watson & Martin (1975) zkoumali vliv vaječného žloutku, glycerolu a rychlosti mražení na počet přeživších spermií, na jejich motilitu a porušení akrozomu. Použito bylo šest různých ejakulátů beranů. V případě glycerolu byl zkoumán vliv přídavku 2,5 % glycerolu, 7,5 % glycerolu a vliv ředidla bez použití glycerolu. Bylo zjištěno, že celková přežitelnost spermií byla vyšší v přítomnosti glycerolu oproti jeho nepoužití. V případě přežitelnosti nebyl prokázán významný rozdíl mezi přídavkem 7,5 % či 2,5 % glycerolu. Oproti tomuto bylo poškození akrozomu v případě glycerolu podstatně vyšší než bez jeho použití. Stupeň poškození akrozomu přímo souvisel s hladinou glycerolu. Výsledky naznačily, že zlepšení kvality může spočívat v přídavku menšího množství než 7 % glycerolu, který je běžně používán pro býčí spermie.

Glycerol jako kryoprotektivum zkoumal i Morrier et al. (2002). Zkoumali vliv přídavku glycerolu v různou dobu zpracování ejakulátu před mražením. Byl použit ejakulát od tří beranů plemene Poll Dorset a ejakulát od jednoho berana plemene Hampshire. Berani byli ve věku 2 až 7 let. Každý beran byl použit jednou či dvakrát ( $n = 7$ ). Po odběru bylo sperma rozděleno na dva stejné alikvóty. Alikvóty byly následně rozšířeny o Biladyl či Triladyl. V případě použití triladylu byla použita koncentrace 7 % glycerolu (jednokrokové ředění). V případě Biladylu bylo nejprve sperma zředěno roztokem s koncentrací 0 % glycerolu. Všechny alikvóty byly následně pomalu ochlazeny na 5 °C během 3 hodin. Po ochlazení bylo do alikvótů s Biladylem přidán roztok B, který obsahoval 14 % glycerolu a doplněn vaječný žloutek. Konečná koncentrace glycerolu byla potom 7 %. -Alikvóty s Triladylem i Biladylem byly zmrazeny v pejetách o objemu 0,25 ml přímým ponořením do kapalného dusíku (-196 °C). Sperma bylo skladováno v tekutém dusíku po dobu 4 až 8 týdnů. Semeno bylo potom rozmrazeno ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C po dobu 30 sekund a následně zředěno. Kvalita ejakulátu byla hodnocena bezprostředně po naředění ( $T_0$ ), 4 hodiny po naředění ( $T_4$ ) a 8 hodin po naředění ( $T_8$ ). Výsledky ukázaly, že způsob přidání kryoprotektantů (glycerolu) významně neovlivnil kvalitu rozmrazeného spermatu z hlediska životaschopnosti a motility spermií. Nebyly tedy prokázány významné rozdíly v kvalitě ejakulátu mezi ejakulátem, u kterého byl přidán glycerol ihned po odběru, nebo ejakulátem, u kterého byl glycerol přidán až po ochlazení na 5 °C. Dále byl zkoumán vliv tří různých ředidel s rozdílným přídavkem glycerolu. Bylo použito sperma od pěti beranů různých plemen ve věku 20–24 měsíců. Berani byli zapojeni do každodenního odběru ejakulátu během reprodukčního období na severní polokouli (říjen–listopad). K experimentu byli použity vždy pouze druhé ejakuláty, přičemž byly odebírány dva po sobě jdoucí ejakuláty během 10 minut. Jeden extender obsahoval 6,4 % glycerolu, druhý

12,8 % glycerolu a třetí byl bez přídavku glycerolu. Všechny ejakuláty použité v experimentu vykazovaly normální parametry. Byly použity ejakuláty o objemu 0,75-2 ml, koncentraci vyšší než  $2,5 \times 10^9$  spermií/ml, motilitou vyšší nebo rovnou 70 % a s obsahem menším či rovným 10 % patologických spermií. Byl zkoumán vliv těchto extenderů na motilitu spermií, jejich kapacitační status a neporušenost plazmatické membrány. Výsledky ukázaly, že celková pohyblivost spermií byla významně ovlivněna použitými extendery. Subjektivní motilita vykazovala významné rozdíly mezi extenderem s obsahem glycerolu 6,4 % ( $26 \pm 2,9$  %) oproti extenderům s obsahem 0 % glycerolu a 12,8 % glycerolu ( $58 \pm 2,9$  a  $53 \pm 2,9$  %). Absolutní motilita byla významně nižší u extenderu s přídavkem 6,4 % glycerolu ( $28 \pm 4,2$  %) než u extenderu s přídavkem 0 % glycerolu ( $67 \pm 4,2$  %) a u extenderu s přídavkem 12,8 % glycerolu ( $63 \pm 4,2$  %). Podíl spermií s intaktní plazmatickou membránou byl u extenderu s přídavkem 0 % glycerolu vyšší ( $57 \pm 3,1$  %) než u extenderů s přídavkem 12,8 % a 6,4 % glycerolu ( $46 \pm 3,1$  % a  $33 \pm 3,1$  %). Podíl spermií, které neprodělaly kapacitaci byl významně vyšší u extenderu bez přídavku glycerolu ( $44 \pm 2,4$  %) oproti extenderům s přídavkem 12,8 % a 6,4 % glycerolu ( $50 \pm 1,8$  % a  $58 \pm 1,8$  %). Byly prokázány významné rozdíly z hlediska hodnocených parametrů mezi použitými extendery (Gil et al., 2003).

Fiser et al. (1986) zkoumali vliv různých koncentrací glycerolu a různých rychlostí zmrazení ejakulátu na kvalitu rozmrazeného ejakulátu beranů. Použity byly koncentrace glycerolu v rozmezí od 0 % do 16 %. Ejakulát byl hodnocen po rozmrazení, které probíhalo vždy stejným způsobem, a to ve vodě při 39 °C po dobu 30 sekund. Nejlepší míru přežitelnosti vykazovali ejakuláty, kde byla použita koncentrace glycerolu 4 nebo 6 % a rychlost mrazení se pohybovala od 10 do 100 °C/ min. Použity byly rychlosti zmrazení od 1 do 100 °C/min. Pokud nebyl před zmrazením přidán glycerol nepřežily zmrazení ponořením do tekutého dusíku žádné spermie. Toxický účinek zvyšování koncentrace nad 8 % přispívá k postupnému snížení přežitelnosti rozmrazených spermií při těchto konkrétních koncentracích.

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Plemeníci

Vzorky ejakulátu byly pro účely diplomové práce odebírány v rámci 8 jednotlivých odběrových dní. Ejakulát byl získáván odběrem dvou beranů plemene valašská ovce, přičemž ejakulát získaný jednotlivé odběrové dny byl od obou jedinců smíchán. Berani byli označeni ušními známkami (ušní známka 77808/072, linie Beskyd, narozen 14.1. 2014; ušní známka 74801/081, linie Juras, narozen 31. 3. 2016). Berani byli ustájeni v zázemí Demonstrační a pokusné stáje České zemědělské univerzity v Praze. Ustájení bylo realizováno ve skupinovém kotci s permanentním přístupem do navazujícího pastevního výběhu. Ustájovací prostory, venkovní plochy a technologické vybavení vyhovovaly platné legislativě podle zákona č. 208/2004 Sb. Základ krmné dávky během celého roku tvořil pastevní porost v kombinaci s lučním senem z vlastní produkce, které bylo zkrmováno ad libitum. Další složku krmné dávky tvořily granule (1580 OVCE UNI, De Heus a.s., Bučovice, ČR) v množství 300–500 g/ks/den dle kondičního stavu zvířat. Ad libitně byly k dispozici také pitná voda a minerální lizy. Plemeníci byli po celou dobu pod veterinárním dohledem a po čas experimentu nevykazovali příznaky žádných onemocnění. V průběhu byl průběžně monitorován výživný stav obou beranů a tělesná kondice se pohybovala v rozmezí 3,5 – 4 body.

### 4.2 Odběr ejakulátu a zpracování vzorků

Vzorky ejakulátu byly odebírány v pravidelných časových intervalech, v 8 jednotlivých odběrových dnech. Pro odběr byla použita umělá vagína určena pro odběr ejakulátu malých přežvýkavců (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo). Jako sběrač umělé vagíny pro odběr ejakulátu sloužila suchá nespermicidní ochrana vaginální sondy, která byla vyrobena z přírodního latexu. Před odběrem byla nespermatická ochrana nalubrikována vazelínou. Po odběru byl ejakulát ihned naředěn. Ředění bylo realizováno ředidlem AndroMed (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) určeného pro kryokonzervaci býčího ejakulátu s obsahem glycerolu 6-7 %. Polovina vzorků byla ředěna glycerolovaným AndroMedem a druhá polovina vzorků byla ředěna AndroMedem bez glycerolu. Ředidlo bylo vytemperováno na teplotu 38 °C a ředění bylo uskutečněno v poměru 1:4 (spermie : AndroMed). Po naředění byly vzorky přeneseny do laboratoře, kde došlo k následnému zhodnocení vzorku. Vzorky byly exportovány pomocí přenosného termoboxu z polystyrenu. V laboratoři byly vzorky uchovány při pokojové teplotě a hodnocení probíhalo rovněž při této teplotě.

V laboratoři došlo ještě k případnému doředění ejakulátu s použitím AndroMedu bez glycerolu po zjištění koncentrace pomocí předkalibrovaného spektrofotometru (Genesys 10S Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Požadovaná finální koncentrace byla cca 200 mil. spermií/ ml.

Tímto způsobem naředěný ejakulát byl naplněn do pejet o objemu 0,25 ml. Pejety byly následně uzavřeny polyvinyl alkoholem – PVA (IMV Technologies, L'Aigle, Francie).

Pejety se vzorky ředěnými komerčním ředidlem Andromed bez glycerolu byly přeneseny v termoboxu, který byl opatřen vyhřevnými bloky pro udržení pokojové teploty, do chladicí místnosti. Teplota v chladicí místnosti se pohybuje v rozmezí 4 až 8 °C. Pejety byly v chladicí

místnosti umístěny v gobletě a položeny na nerezové desce. Tímto způsobem byly ponechány po dobu cca 2 hodin ekvilibrace.

Pejety se vzorky, kde již od fáze ředění ejakulátu byl použit AndroMed obsahující 6–7 % glycerolu, byly uskladněna v lednici v laboratoři při teplotě v rozmezí 4 až 8 °C po dobu cca 2 hodin ekvilibrace.

### 4.3 Hodnocení vzorků před mrazením

Po ukončení ekvilibrace (ale před mrazením) bylo provedeno kontrolní hodnocení spermatu pomocí CASA a průtokového cytometru.

Hodnocení pomocí CASA (model iSperm, Aidmics Biotechnology Co., LTD, Taipei City, Taiwan) spočívalo v hodnocení celkové a progresivní motility spermií. Optická čočka zabudovaná v přístroji byla zahřáta pomocí speciálního USB ohříváče na teplotu 38 °C. Ejakulát byl naředěn příslušným ředidlem na koncentraci 20 mil. spermií/ ml (odpovídá zhruba ředění 10 x). Takto zředěný ejakulát byl kápnut v objemu 7 µl na speciální analyzační jednorázovou komůrku, která byla upevněna na čočku, potom došlo k vyhodnocení motility pomocí softwaru.

Pro hodnocení pomocí průtokového cytometru byl použit cytometr Novocyte 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA. Cytometr byl vybaven lasery emitující fialové (405 nm), modré (488 nm) a červené (640 nm) záření. Vzorek spermatu o finální koncentraci cca koncentraci cca 20 mil. spermií/ ml byl obarven fluorescenčními barvivy Hoechst-33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 10 µg/ mL, PNA-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) o finální koncentraci 0,5 µg/ mL, PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 8 µg/ mL a fluorescenčním barvivem MitoTracker Deep Red (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 80 nM. Vzorky byly po obarvení fluorescenčními barvivy inkubovány po dobu 10 minut ve tmě při teplotě 38 °C.

Při hodnocení vzorku bylo nízkou rychlostí analyzováno minimálně 20 000 částic. Pro analýzu dat a jejich následný sběr byl použit software NovoExpress 1.3.0 (Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA). Pro oddělení signálu nespermatických částic bylo využito parametrů forward scatter, side scatter a barviva Hoechst-33342. Při hodnocení vzorku byla monitorována celková viabilita buněk (Hoechst-33342<sup>+</sup>/PI/PNA-FITC<sup>-</sup>/MitoTracker Deep Red<sup>+</sup>,%), a pak, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou pomocí PI, podíl buněk s poškozeným akrozomem pomocí PNA-FITC a v neposlední řadě podíl buněk s vysokou a nízkou mitochondriální aktivitou pomocí MitoTracker Deep Red<sup>+</sup>.

Pro mrazení byly následně použity vzorky ejakulátu, které vykazovaly více než 50% životaschopnost. Za oplození schopnou spermii byla považována buňka, která neměla porušenou plazmatickou membránu, neměla porušený akrozom a vykazovala vysokou mitochondriální aktivitu ((Hoechst-33342<sup>+</sup>/PI/PNA-FITC<sup>-</sup>/ MitoTracker Deep Red<sup>+</sup>).

#### 4.4 Mrazení vzorků ejakulátu

Po ukončení ekvilibrace, by pejety se vzorky ředěnými komerčním ředidlem Andromed bez glycerolu a ekvilibrovány v chladicí místnosti těsně před mrazením otevřeny a jejich obsah smíchán s glycerolem (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 6-7 %. Takto obohacené vzorky o glycerol byly znovu uzavřeny do nových pejet pro následné mrazení. Vše probíhalo v chladicí místnosti při teplotě 4 až 8 °C, celá procedura trvala méně než 5 min.

Pejety, ekvilibrované v laboratorní lednici se vzorky, kde již od fáze ředění ejakulátu byl použit Andromed obsahující 6–7 % glycerolu, byly mrazeny hned po ukončení ekvilibrace.

Samotné mrazení vzorků ejakulátu probíhalo v parách tekutého dusíku. Pejety byly mrazeny při použití termoboxu z polystyrenu, který umožnil kontrolovat vzdálenost vzorků nad hladinou tekutého dusíku, čímž bylo možné regulovat rychlost mrazení (Ptáček et al., 2019).

Savvulidi et al. 2021 ve své práci několik modifikací mrazení pejet naplněných ejakulátem. Pro mou práci byla využita modifikovaná mrazicí křivka II, při které byly pejety postupně přibližovány k hladině tekutého dusíku. Po dobu prvních třech minut byly pejety umístěny 15 cm nad hladinou tekutého dusíku, potom byly přiblíženy na vzdálenost 9,5 cm od hladiny tekutého dusíku, kde byly umístěny po dobu 2 minut. Následně byly pejety přiblíženy do vzdálenosti 5 cm od hladiny tekutého dusíku po dobu 1 minuty. Po uplynutí této doby byly pejety umístěny na vzdálenost menší než 0,5 sm od hladiny tekutého dusíku. Průměrná rychlost poklesu teploty u námi použité mrazicí křivky II činila 17 °C/min.

#### 4.5 Hodnocení ejakulátu po rozmrazení

Zamrazené vzorky ejakulátu byli po minimálně 24 hodinách rozmrazeny pro následné hodnocení pomocí průtokového cytometru a softwaru CASA.

Rozmrazení probíhalo za použití vodní lázně o teplotě 38 °C po dobu 30 sekund. Pro hodnocení byly vždy rozmrazeny 2 pejety z chladicí místnosti, kde byl přidáván glycerol těsně před mrazením a 2 pejety z lednice v laboratoři, kde již od fáze ředění ejakulátu byl použit Andromed s glycerolem. Rozmrazené vzorky byly nejprve hodnoceny pomocí CASA a následně proběhlo hodnocení na průtokovém cytometru. Hodnocení po rozmrazení probíhalo stejným způsobem jako hodnocení vzorků před mrazením.

Hodnocení po rozmrazení probíhalo ve třech časových intervalech. První bylo uskutečněno ihned po rozmrazení (THW0), druhé 1 hodinu po rozmrazení (THW1) a poslední 2 hodiny po rozmrazení (THW2). V rámci jednotlivých časových intervalů byla hodnocena celková motilita spermií a progresivní motilita spermií pomocí CASA a pomocí průtokového cytometru celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl buněk s poškozeným akrozomem a dále podíl buněk s nízkou a vysokou mitochondriální aktivitou.

## 5 Statistická analýza dat

Veškerá statistická vyhodnocení probíhala ve statistickém programu SAS (SAS/STAT, 2011). Základní statistiky souboru dat CASA a průtokové cytometrie byly analyzovány pomocí procedury UNIVARIATE. Následná analýza variance byla provedena za použití generalized linear model procedury. Jako závislé proměnné byly vyhodnocovány jednotlivé parametry průtokové cytometrie (celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozenou plasmatickou membránou, podíl buněk s poškozením akrozomu, a dále podíl buněk s vysokou a s nízkou mitochondriální aktivitou).

Statistické modely pro vyhodnocení parametrů průtokové cytometrie po ekvilibraci hodnocené v definovaných časových intervalech jsou uvedeny níže:

- 1)  $VIAeq_{ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + e_{ijk}$
- 2)  $PMeq_{ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + e_{ijk}$
- 3)  $AKReq_{ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + e_{ijk}$
- 4)  $VMAeq_{ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + e_{ijk}$
- 5)  $NMAeq_{ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + e_{ijk}$

kde  $VIAeq_{ijk}$  = celková viabilita buněk po ekvilibraci,  $PMeq_{ijk}$  = podíl buněk s poškozenou plasmatickou membránou po ekvilibraci,  $AKReq_{ijk}$  = podíl buněk s poškozením akrosomu po ekvilibraci,  $VMAeq_{ijk}$  = podíl buněk s vysokou mitochondriální aktivitou po ekvilibraci,  $NMAeq_{ijk}$  = podíl buněk s nízkou mitochondriální aktivitou po ekvilibraci;  $DEN_i$  = fixní efekt i-tého odběrového dne ( $i = 1$ . odběrový den,  $n = 8$ ;  $i = 2$ . odběrový den,  $n = 8$ ;  $i = 3$ . odběrový den,  $n = 8$ ;  $i = 4$ . odběrový den,  $n = 6$ ;  $i = 5$ . odběrový den,  $n = 6$ ,  $i = 7$ . odběrový den,  $n = 7$ );  $VAR_j$  = fixní efekt j-té varianty přídatku glycerolu ( $j =$  varianta s přídatkem glycerolu těsně před mrazením,  $n = 29$ ;  $j =$  varianta s glycerolem v průběhu celé doby ekvilibrace,  $n = 28$ );  $DEN * VAR_{ij}$  = interakce variant přídatku glycerolu mezi jednotlivými odběrovými dny;  $e_{ijk}$  = residuální chyba.

Statistické modely pro vyhodnocení parametrů průtokové cytometrie po ekvilibraci hodnocené v definovaných časových intervalech jsou uvedeny níže:

- 6)  $VIA_{t0,t1,t2ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + b * VIAeq + e_{ijk}$
- 7)  $PM_{t0,t1,t2ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + b * PMeq + e_{ijk}$
- 8)  $AKR_{t0,t1,t2ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + b * AKReq + e_{ijk}$
- 9)  $VMA_{t0,t1,t2ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + b * VMAeq + e_{ijk}$
- 10)  $NMA_{t0,t1,t2ijk} = \mu + DEN_i + VAR_j + DEN * VAR_{ij} + b * NMAeq + e_{ijk}$

kde  $VIA_{t0,t1,t2ijk}$  = celková viabilita buněk po rozmrazení, po 1 hodině a po 2 hodinách termického testu přežitelnosti,  $PM_{t0,t1,t2ijk}$  = podíl buněk s poškozenou plasmatickou membránou po rozmrazení, po 1 hodině a po 2 hodinách termického testu přežitelnosti,  $AKR_{t0,t1,t2ijk}$  = podíl buněk s poškozením akrozomu po rozmrazení, po 1 hodině a po 2 hodinách termického testu přežitelnosti,  $VMA_{t0,t1,t2ijk}$  = podíl buněk s vysokou mitochondriální aktivitou po rozmrazení, po 1 hodině a po 2 hodinách termického testu



přežitelnosti;  $NMA_{t0,t1,t2_{ijk}}$  = podíl buněk s nízkou mitochondriální aktivitou po rozmrazení, po 1 hodině a po 2 hodinách termického testu přežitelnosti;  $DEN_i$  = fixní efekt i-tého odběrového dne ( $i = 1$ . odběrový den,  $n = 8$ ;  $i = 2$ . odběrový den,  $n = 8$ ;  $i = 3$ . odběrový den,  $n = 8$ ;  $i = 4$ . odběrový den,  $n = 6$ ;  $i = 5$ . odběrový den,  $n = 6$ ;  $i = 7$ . odběrový den,  $n = 7$ );  $VAR_j$  = fixní efekt j-té varianty přídavku glycerolu ( $j =$  varianta s přídavkem glycerolu těsně před mrazením,  $n = 29$ ;  $j =$  varianta s glycerolem v průběhu celé doby ekvilibrace,  $n = 28$ );  $DEN * VAR_{ij}$  = interakce variant přídavku glycerolu mezi jednotlivými odběrovými dny;  $b*VIA_{eq}$  = celková viabilita buněk po ekvilibraci jako kovariáta,  $b*PME_{eq}$  = podíl buněk s poškozenou plasmatickou membránou po ekvilibraci jako kovariáta,  $b*AKR_{eq}$  = podíl buněk s poškozením akrosomu po ekvilibraci jako kovariáta,  $b*VMA_{eq}$  = podíl buněk s vysokou mitochondriální aktivitou po ekvilibraci jako kovariáta,  $b*NMA_{eq}$  = podíl buněk s nízkou mitochondriální aktivitou po ekvilibraci jako kovariáta;  $e_{ijk}$  = residuální chyba.

Statistické rozdíly mezi odhadnutými průměry byly detekovány na hladině významnosti  $P < 0,05$ .

## 6 Výsledky

### 6.1 Výsledky CASA

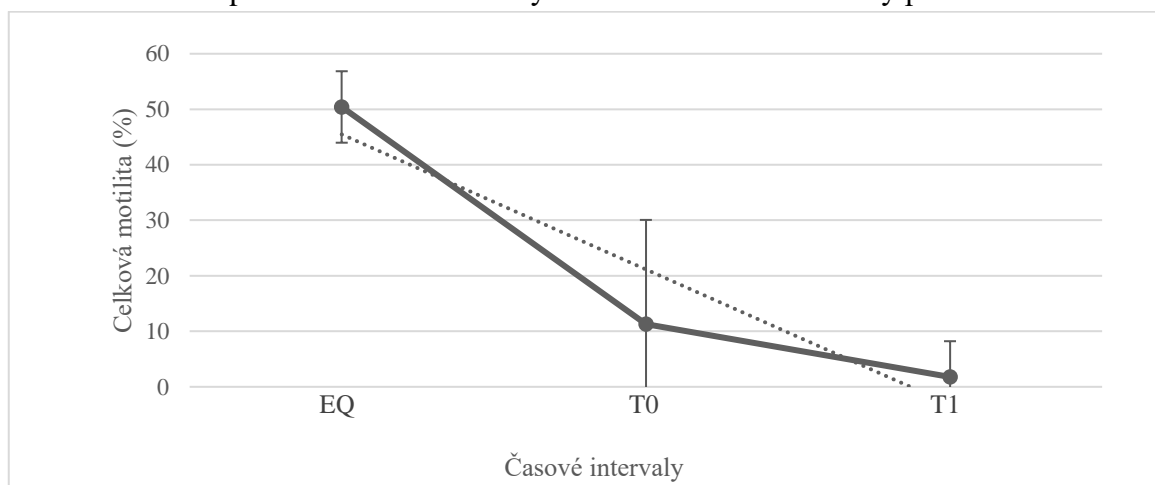
#### 6.1.1.1 Základní charakteristiky – CASA

V tabulce č. 7 jsou uvedeny veškeré základní statistické charakteristiky. Celková motilita spermií a progresivní motilita spermií. Hodnocené byly vzorky odebírané v 8 různých odběrových dnech. Hodnoty celkové motility a progresivní motility byly měřeny ihned po ekvilibraci, ihned po rozmrazení a hodinu po rozmrazení. Ze získaných výsledků je patrné, že celková motilita a progresivní motilita se během procesu kryokonzervace radikálně snižuje. Pokles celkové motility je prezentován grafem č.1 a pokles progresivní motility grafem č.2.

**Tabulka č. 7:** Základní statistické charakteristiky – CASA

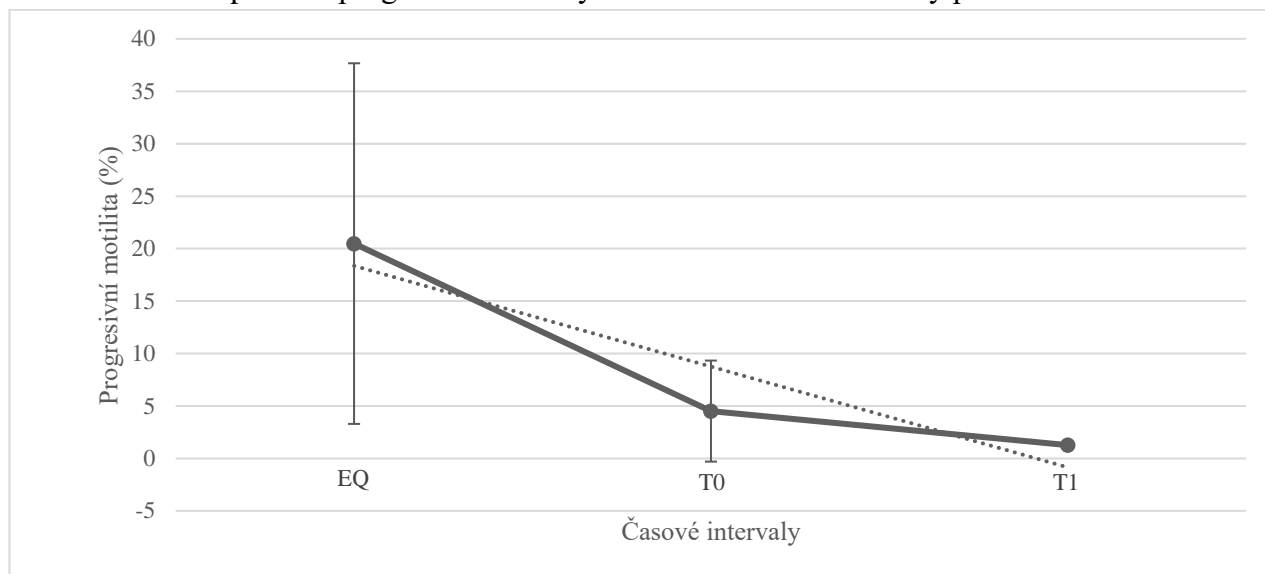
	Proměnná	Četnost (N)	Průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
po ekvilibraci	Celková motilita	12	50,41	18,80	22,19	81,85
	Progresivní motilita	12	20,48	17,19	2,81	61,28
po rozmrazení	Celková motilita	10	11,27	6,44	1,06	22,45
	Progresivní motilita	9	4,51	4,81	0,21	14,70
1 hod. po rozmrazení	Celková motilita	10	1,78	1,83	0,22	4,57
	Progresivní motilita	1	1,26	x	1,26	1,26

**Graf č. 1:** Trend poklesu celkové motility od ekvilibrace do 1 hodiny po rozmrazení



**Zkratky:** EQ – ekvilibrované vzorky; T0 – ihned po rozmrazení; T1 – 1 hodina po rozmrazení

**Graf č. 2:** Trend poklesu progresivní motility od ekvilibrace do 1 hodiny po rozmrazení



**Zkratky:** EQ – ekvilibrované vzorky; T0 – ihned po rozmrazení; T1 – 1 hodina po rozmrazení

## 6.2 Výsledky průtokové cytometrie

### 6.2.1 Základní charakteristiky – průtoková cytometrie

V tabulce č. 8 jsou uvedeny základní statistické charakteristiky pro průtokovou cytometrii. Uvedeno je procentuální zastoupení spermií, které byly vyhodnoceny jako životaschopné, respektive oplození schopné. Zastoupení životaschopných spermií, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu a mitochondriální aktivita byla hodnocena u 51 vzorků po ekvilibraci, 54 vzorků ihned po rozmrazení, 54 vzorků 1 hodinu po rozmrazení a 53 vzorků 2 hodiny po rozmrazení. Průměrné zastoupení životaschopných spermií v inseminační dávce po ekvilibraci bylo  $62,61 \pm 12,94$  %. Ihned po rozmrazení došlo k zhruba třináásobnému poklesu počtu životaschopných spermií na průměrnou hodnotu  $24,59 \pm 6,23$  %. K dalšímu poklesu počtu životaschopných spermií došlo i hodinu a dvě hodiny po rozmrazení. Poškození akrozomu vzrostlo po rozmrazení na dvojnásobek, z  $15,38 \pm 7,86$  % na  $30,19 \pm 14,01$  % (hodinu po rozmrazení). Po kryokonzervaci došlo také k významnému poklesu mitochondriální aktivity. Vysoká mitochondriální aktivita představovala ihned po rozmrazení  $57,14 \pm 29,69$  % a po dvou hodinách po rozmrazení činila pouze  $9,33 \pm 7,94$  %.

**Tabulka č. 8:** Základní statistické charakteristiky – Průtoková cytometrie

Varianta	Ukazatel	Četnost	Aritmetický průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
po ekvilibraci	PAI	51	62,61	12,94	27,23	81,72
	PM	51	36,31	12,93	18,06	72,26
	ACR	51	15,38	7,86	4,94	40,12
	HMTR	51	57,14	29,69	15,97	91,82
	LMTR	51	42,39	29,30	7,83	83,59
ihned po rozmražení	PAI	54	24,59	6,23	9,14	34,01
	PM	54	74,82	6,36	65,80	90,57
	ACR	54	23,79	12,48	7,11	60,78
	HMTR	54	38,97	16,15	7,24	83,02
	LMTR	54	58,41	16,74	16,92	92,76
1 hodina po rozmražení	PAI	54	19,31	7,97	4,86	33,54
	PM	54	79,43	7,91	65,97	93,80
	ACR	54	30,19	14,10	8,95	60,98
	HMTR	54	16,18	11,28	1,48	38,77
	LMTR	54	80,60	10,90	60,59	98,52
2 hodiny po rozmražení	PAI	53	16,61	8,49	3,29	33,20
	PM	53	82,61	8,58	66,11	96,47
	ACR	53	29,27	14,06	7,80	66,37
	HMTR	53	9,33	7,94	1,19	34,81
	LMTR	53	86,06	7,27	65,19	93,29

**Zkratky:** PAI – životaschopnost spermií; PM – poškození cytoplazmatické membrány; ACR – poškození akrozomu; HMTR – vysoká mitochondriální aktivita; LMTR – nízká mitochondriální aktivita

## 6.2.2 Procentuální zastoupení životaschopných spermií po rozmražení

### 6.2.2.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval proměnlivost ukazatele z 97,72 % a byl průkazný ( $P < 0,001$ ). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv obou sledovaných faktorů, tedy vliv odběrového dne ( $P < 0,001$ ) a vliv metody přidavku glycerolu ( $P < 0,001$ ). Detailní popis statistického modelu je uveden v příloze č. 11.2.1. Taktéž výsledky vlivu interakce odběrového dne a metody přidavku glycerolu jsou prezentovány v samostatné příloze č. 11.3. Níže jsou uvedeny fixní vlivy odběrového dne a použité metody mrazení.

### 6.2.2.2 Vliv odběrového dne

V rámci jednotlivých odběrových dní byly shledány významné statistické rozdíly mezi jednotlivými odběrovými dny. Nejvyšší viabilita u ekvilibrovaných vzorků vykazoval ejakulát, který byl odebraný 6. odběrový den. Ejakulát odebraný 6. odběrový den vykazoval nejlepší

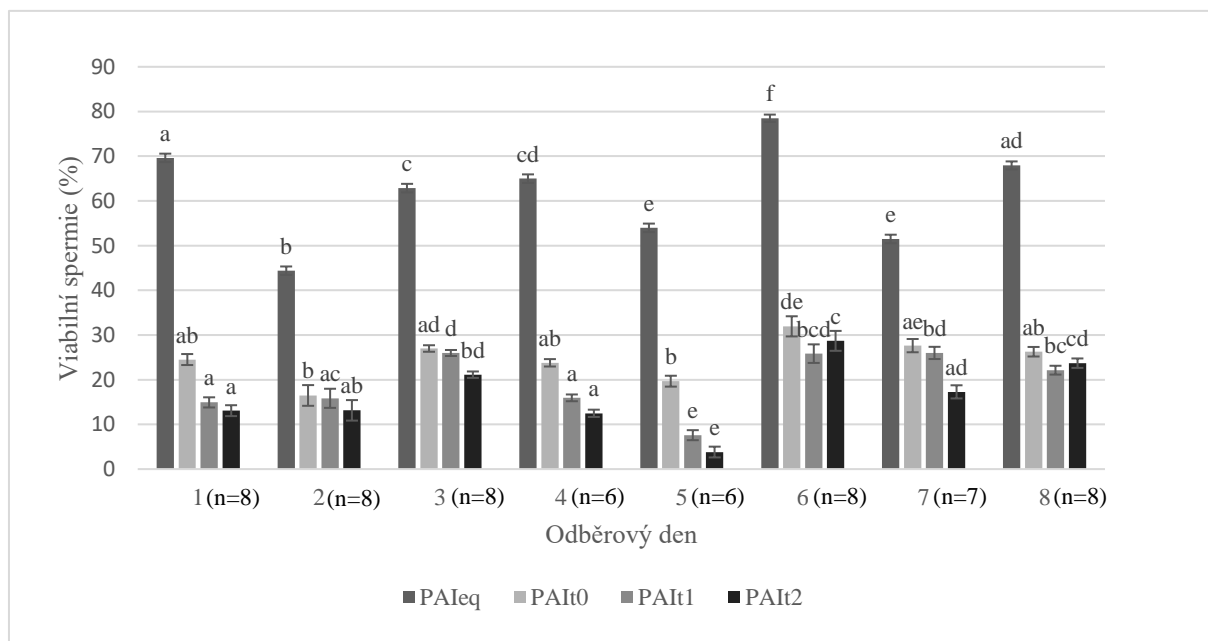
hodnoty v porovnání se všemi ostatními odběrovými dny, což bylo podloženo statisticky průkaznými rozdíly.

Nejnižší hodnoty naopak dosahoval ejakulát odebraný 2. odběrový den, což bylo statisticky průkazné ve srovnání se všemi ostatními odběrovými dny. Ihned po rozmrazení vykazoval nejlepší výsledky ejakulát odebraný rovněž 6. odběrový den, avšak výsledky nebyly statisticky prokazatelně lepší ve srovnání s 3. a 7. odběrovým dnem. Nejhorších hodnot dosáhl ihned po rozmrazení ejakulát odebraný 2. odběrový den, nebyly však statisticky horší, než vzorky z 1., 4., 5. a 8. dne.

Hodinu po rozmrazení vykazoval nejlepší hodnoty ejakulát odebraný 7. odběrový den, rozdíl však nebyl statisticky prokazatelný ve srovnání s 3., 6. a 8. dnem. Nejnižší hodnoty byly zjištěny u ejakulátu odebraného 5. odběrový den, tento výsledek byl statisticky průkazný vzhledem ke všem ostatním odběrovým dnům.

Dvě hodiny po rozmrazení dosahoval nejvyšších hodnot viabilita ejakulát odebraný 6. odběrový den, nebyla však statisticky lepší než u ejakulátu odebraného 8. den. Nejnižší hodnoty 2 hodiny po rozmrazení statisticky prokazatelně vykazoval ejakulát odebraný 5. den. Procentuální zastoupení viabilních spermií v rámci jednotlivých odběrových dní je prezentováno v grafu č. 3.

**Graf č. 3:** Procentuální zastoupení viabilních spermií v jednotlivých odběrových dnech (LSM ± SEM)



**Zkratky:** PAI – životaschopné spermie; eq – vzorky hodnocené po ekvilibraci; t0 – vzorek hodnocené ihned po rozmrazení; t1 – vzorky hodnocené hodinu po rozmrazení; t2 – vzorky hodnocené 2 hodiny po rozmrazení; a-f = rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) v rámci jednotlivě hodnocených znaků (PAIeq; PAIt0; PAIt1; PAIt2) napříč jednotlivými odběrovými dny.

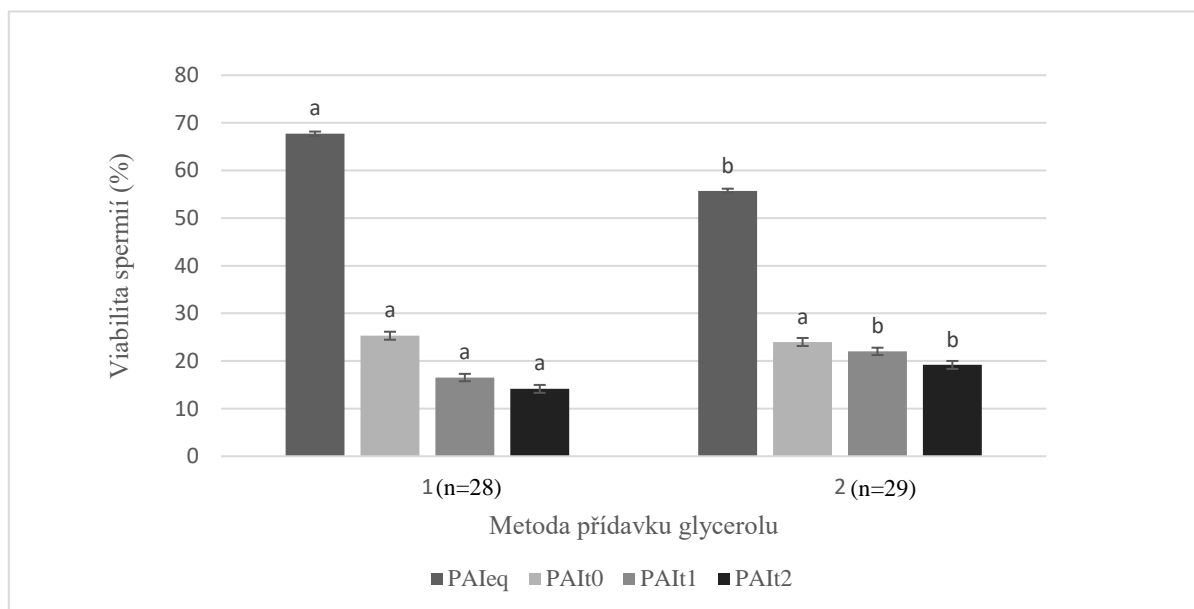
### 6.2.2.3 Vliv použité metody přidavku glycerolu

V experimentu byl zkoumán vliv pozdějšího přidavku glycerolu oproti tradičnímu způsobu ředění, kdy je ejakulát ředěn před ekvilibrací Andromedem s obsahem glycerolu stanoveným výrobcem. U ekvilibrovaných vzorků byly zjištěny lepší hodnoty u rutinního způsobu přidavku glycerolu ( $67,72 \pm 0,46$  %) oproti pozdějšímu přidavku glycerolu ( $55,71 \pm 0,47$  %). Mezi jednotlivými metodami přidavku glycerolu byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl.

Při hodnocení vzorků ihned po rozmrazení došlo k poklesu viabilních spermií zhruba na polovinu bez ohledu na použitou metodu přidavku glycerolu. I po rozmrazení byly zjištěny lepší výsledky u vzorku, kde byla použita s metoda s rutinním přidavkem glycerolu ( $25,32 \pm 0,84$  %) oproti metodě s pozdějším přidavkem glycerolu ( $24,00 \pm 0,84$  %). Mezi jednotlivými metodami však nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl.

Hodinu po rozmrazení vykazovaly lepší výsledky vzorky, kde byla použita metoda pozdějšího přidavku glycerolu ( $22,03 \pm 0,77$  %) vůči metodě s rutinním způsobem přidavku glycerolu ( $16,53 \pm 0,77$  %). Tyto rozdíly byly statisticky průkazné. Stejně tomu tak bylo i dvě hodiny po rozmrazení, kdy vyšší procento viabilních buněk vykazovaly vzorky, kde byla použita metoda pozdějšího přidavku glycerolu ( $19,18 \pm 0,83$  %) oproti metodě s rutinním způsobem přidavku glycerolu ( $14,15 \pm 0,83$  %). I v tomto případě byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl mezi použitými metodami.

**Graf č. 4:** Vliv metody přidavku glycerolu na viabilita spermií; LSM  $\pm$  SEM



**Zkratky:** 1- rutinní způsob přidavku glycerolu; 2 – modifikovaná varianta s přidavkem glycerolu těsně před mrazením; a-b= rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) parametrů (PAIeq, PAIt0; PAIt1, PAIt2) mezi použitými metodami přidavku glycerolu

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

#### **6.2.3.1 Popis modelu**

Použitý model vysvětloval proměnlivost ukazatele poškození cytoplazmatické membrány z 97,83 % a byl průkazný ( $P < 0,0001$ ). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv obou sledovaných faktorů, vliv odběrového dne ( $P < 0,0001$ ) i vliv použité metody přidavku glycerolu ( $P < 0,0001$ ). Proměnlivost ukazatele poškození akrozomu byla vysvětlena z 92,47 % a byl statisticky průkazný ( $P < 0,0001$ ). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv obou sledovaných faktorů, vliv odběrového dne ( $P < 0,0001$ ) i vliv použité metody přidavku glycerolu ( $P < 0,0001$ ). Použitý model dále vysvětloval proměnlivost ukazatele nízká mitochondriální aktivita z 98,12 % a byl průkazný ( $P < 0,0001$ ). v modelové rovnici byl taktéž statisticky průkazný vliv obou sledovaných faktorů, odběrového dne ( $< 0,0001$ ) a použité metody přidavku glycerolu ( $P < 0,0001$ ). Detailní popis použitého modelu je v samostatné příloze 11.2.2. Taktéž výsledky vlivu interakce odběrového dne a metody přidavku glycerolu jsou prezentovány v samostatné příloze č. 11.3. Níže jsou uvedeny fixní vlivy odběrového dne a použité metody mrazení.

#### **6.2.3.2 Vliv odběrového dne**

V rámci jednotlivých odběrových dní byly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly u vzorků ekvilibrovaných, vzorků ihned po rozmrazení, hodinu po rozmrazení i vzorků hodnocených 2 hodiny po rozmrazení.

Průměrné hodnoty naměřené ihned po rozmrazení jsou uvedeny v tabulce č. 9. Po rozmrazení bylo naměřeno nejvyšší poškození cytoplazmatické membrány spermií u vzorků odebraných 5. ( $80,19 \pm 1,41$  %) a 2. ( $83,55 \pm 2,49$  %) odběrový den. Nejlepších výsledků bylo dosaženo 6. odběrový den ( $67,14 \pm 2,31$ ). Tento výsledek však nebyl statisticky průkazný ve srovnání s 3. a 7. odběrovým dnem, ale v porovnání s ostatními odběrovými dny byly prokázány signifikantní rozdíly. Po rozmrazení vykazovaly největší poškození akrozomu vzorky odebrané 1. odběrový den ( $45,78 \pm 2,22$  %), které však byly statisticky průkazné ve srovnání se všemi odběrovými dny vyjma 2. odběrového dne ( $27,05 \pm 5,29$  %). Nejlepších výsledků z hlediska poškození akrozomu bylo dosaženo 3. ( $17,27 \pm 2,51$  %), 4. ( $17,44 \pm 2,40$  %) a 7. ( $17,90 \pm 3,02$  %) odběrový den. Rozdíly v poškození akrozomu mezi jednotlivými odběrovými dny byly ve většině případů statisticky neprůkazné. Nejnižší mitochondriální aktivitu vykazovaly vzorky odebrané 5. ( $86,37 \pm 8,17$  %) a 8. ( $73,26 \pm 6,85$  %) odběrový den. Nejlepších výsledků s ohledem na mitochondriální aktivitu bylo dosaženo 2. ( $41,52 \pm 10,81$  %) a 7. ( $45,25 \pm 7,11$  %) den.

**Tabulka č. 9:** Procentuální zastoupení spermií v průběhu jednotlivých odběrových dní v čase t= 0 po rozmrazení; LSM ± SEM

odběrový den	poškození membrány %	poškození akrozomu %	nízká mitochondriální aktivita %
1 (n=8)	74,80 ± 1,23 ab	45,78 ± 2,22 a	55,01 ± 3,35 abc
2 (n=8)	83,55 ± 2,49 a	27,05 ± 5,29 ab	41,52 ± 10,81 bc
3 (n=8)	72,88 ± 0,75 bc	17,27 ± 2,51 b	59,75 ± 5,57 abc
4 (n=6)	75,50 ± 0,85 ab	17,44 ± 2,40 b	54,68 ± 3,14 bc
5 (n=6)	80,19 ± 1,41 a	25,06 ± 3,01 b	86,37 ± 8,17 ad
6 (n=8)	67,14 ± 2,31 c	23,13 ± 4,16 b	59,27 ± 3,11 abc
7 (n=7)	71,29 ± 1,43 bc	17,90 ± 3,02 b	45,25 ± 7,11 ab
8 (n=8)	72,47 ± 1,40 ab	19,24 ± 2,17 b	73,26 ± 6,85 cd

**Zkratky:** a-d= odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P<0,05); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými odběrovými dny

V tabulce č. 10 jsou uvedeny průměrné hodnoty naměřené 1 hodinu po rozmrazení. Hodinu po rozmrazení bylo s ohledem na poškození plazmatické membrány spermií bylo nejlepších výsledků dosaženo u vzorků odebraných 6. (71,87 ± 2,09 %), 7. (72,41 ± 1,30 %) a 3. odběrový den (73,54 ± 0,68 %). Tyto hodnoty byly statisticky průkazné v porovnání s 1., 4. a 5. odběrovým dnem. Největší poškození akrozomu vykazovaly vzorky získané 1. odběrový den (51,00 ± 2,55 %), které vykazovaly statisticky významný rozdíl vůči všem jednotlivým odběrovým dnům. Dle hodnocení mitochondriální aktivity bylo nejhorších výsledků dosaženo 5. odběrový den, kde nízká mitochondriální aktivita představovala 95,61 ± 4,52 %. Statisticky průkazný rozdíl byl však zjištěn pouze mezi 2. a 5. odběrovým dnem, mezi ostatními odběrovými dny nebyl statisticky významný rozdíl průkazný.

**Tabulka č. 10:** Procentuální zastoupení spermií v průběhu jednotlivých odběrových dní v čase t= 1 po rozmrazení; LSM ± SEM

odběrový den	poškození membrány %	poškození akrozomu %	nízká mitochondriální aktivita %
1 (n=8)	83,27 ± 1,11 a	51,00 ± 2,55 a	78,86 ± 1,86 ab
2 (n=8)	84,27 ± 2,25 acf	16,27 ± 6,07 bc	74,63 ± 5,99 a
3 (n=8)	73,54 ± 0,68 be	14,39 ± 2,88 c	80,44 ± 3,08 ab
4 (n=6)	82,21 ± 0,77 a	32,90 ± 2,75 b	86,55 ± 1,74 ab
5 (n=6)	91,63 ± 1,27 d	35,16 ± 3,46 b	95,61 ± 4,52 b
6 (n=8)	71,87 ± 2,09 bc	32,54 ± 4,78 b	82,36 ± 1,72 ab
7 (n=7)	72,41 ± 1,30 be	28,63 ± 3,47 bc	72,79 ± 3,94 ab
8 (n=8)	76,28 ± 1,27 ef	28,65 ± 2,49 b	78,79 ± 3,80 ab

**Zkratky:** a-f= odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P<0,05); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými odběrovými dny

Dvě hodiny po rozmrazení vykazovaly nejvyšší poškození plazmatické membrány vzorky získané 5. odběrový den (95,78 ± 1,36 %), nejlepší výsledek byl naopak zjištěn u vzorků, které byly získány 6. odběrový den (70,28 ± 2,23). Podrobné výsledky hodnocených parametrů 2 hodiny po rozmrazení jsou prezentovány v tabulce č. 11.



**Tabulka č. 11:** Procentuální zastoupení spermií v průběhu jednotlivých odběrových dní v čase t= 2 po rozmrazení; LSM ± SEM

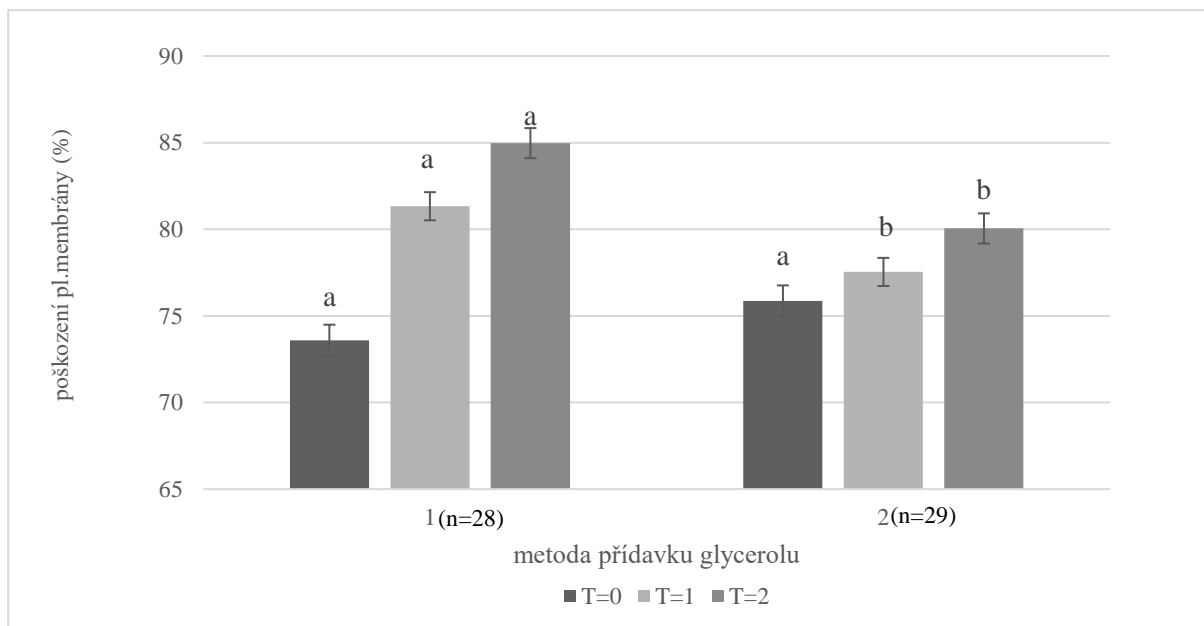
odběrový den	poškození membrány %	poškození akrozomu %	nízká mitochondriální aktivita %
1 (n=8)	86,65 ± 1,19 ac	50,5 ± 3,51 a	81,07 ± 1,54 a
2 (n=8)	86,05 ± 2,41 bc	31,35 ± 8,37 ab	85,81 ± 4,95 ab
3 (n=8)	78,84 ± 0,72 be	12,01 ± 3,97 b	85,47 ± 2,55 ab
4 (n=6)	86,16 ± 0,83 ac	36,76 ± 3,79 ac	91,16 ± 1,44 b
5 (n=6)	95,78 ± 1,36 f	26,59 ± 4,77 bc	85,70 ± 3,74 ab
6 (n=8)	70,28 ± 2,23 dg	23,22 ± 6,59 bc	89,03 ± 1,43 b
7 (n=7)	81,09 ± 1,39 aegh	36,75 ± 4,79 ac	84,67 ± 3,26 ab
8 (n=8)	75,23 ± 1,36 bh	20,22 ± 3,43 bc	90,46 ± 3,14 ab

**Zkratky:** a-h= odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly (P <0,05); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými odběrovými dny

### 6.2.3.3 Vliv metody přidavku glycerolu

Metoda přidavku glycerolu neměla statisticky významné rozdíly ihned po rozmrazení v případě hodnocení poškození plazmatické membrány. Lepších hodnot však bylo dosaženo při použití tradičního způsobu ředění ejakulátu, kdy bylo dosaženo průměrné hodnoty poškození cytoplazmatické membrány 73,59 ± 0,90 % oproti metodě s pozdějším přidavkem glycerolu, při které bylo dosaženo průměrných hodnot poškození cytoplazmatické membrány 75,86 ± 0,90 %. Hodinu a 2 hodiny po rozmrazení byly však zjištěny statisticky významné rozdíly z hlediska poškození plazmatické mezi jednotlivými metodami přidavku glycerolu. Hodinu po rozmrazení bylo dosaženo lepších výsledků u modifikované metody s pozdějším přidavkem glycerolu, kdy průměrná hodnota byla 77,53 ± 0,81 %, ale u tradiční metody bylo dosaženo průměrné hodnoty 81,33 ± 0,81 %. I dvě hodiny po rozmrazení byly zjištěny prokazatelně lepší výsledky u modifikované metody přidavku glycerolu, kdy průměrná hodnota poškození cytoplazmatické membrány spermií činila 80,05 ± 0,87 %, avšak tradiční metoda dosahovala průměrných hodnot poškození cytoplazmatické membrány až 84,97 ± 0,87 %. Je tedy patrné, že lepších výsledků 1 hodinu a 2 hodiny po rozmrazení vykazovaly vzorky, u nichž byla použita modifikovaná metoda přidavku glycerolu, což prezentuje graf č. 5.

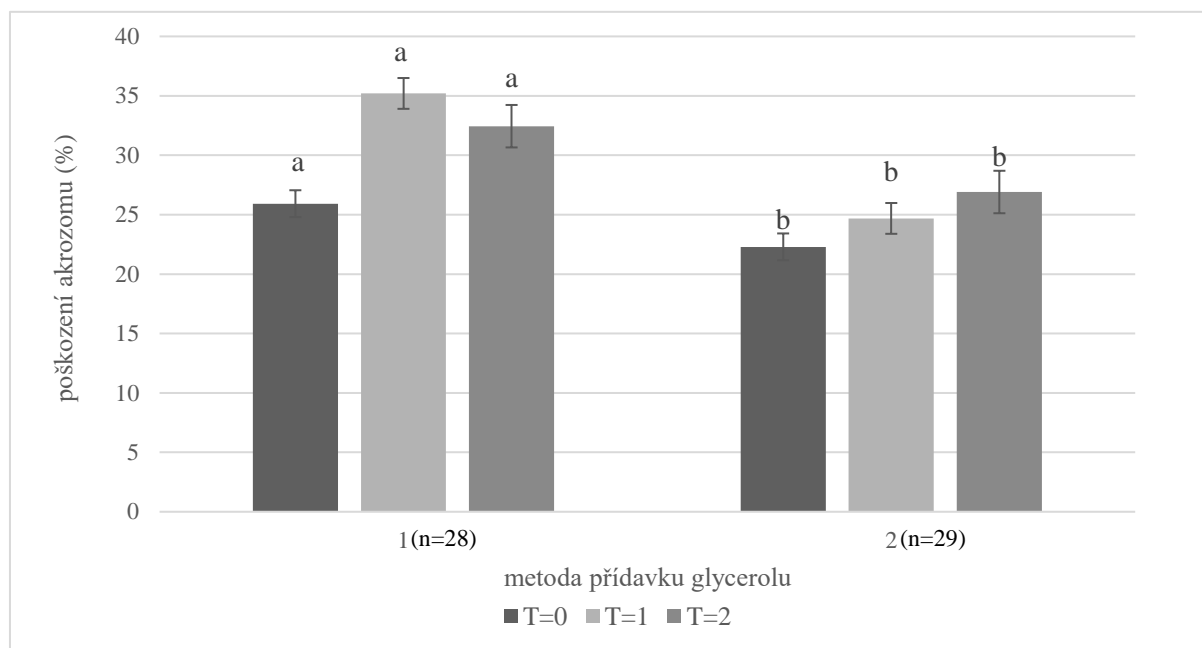
**Graf č. 5:** Vliv metody přidavku glycerolu na poškození plazmatické membrány spermií po kryokonzervaci LSM ± SEM



**Zkratky:** 1- rutinní způsob přidavku glycerolu; 2 –modifikovaná varianta s přidavkem glycerolu těsně před mrazením; a-b= rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) stejných časových intervalů mezi použitými metodami přidavku glycerolu

Dalším hodnoceným parametrem bylo poškození akrozomu, přičemž metoda přidavku glycerolu měla statisticky významný vliv na poškození akrozomu, kde ve všech hodnocených časových intervalech dosáhly statisticky lepších výsledků vzorky, při použití metody s pozdějším přidavkem glycerolu. Ihned po rozmrazení bylo u vzorků s rutinní metodou přidavku glycerolu průměrně  $25,93 \pm 1,13$  % spermií s poškozeným akrozomem, naproti tomu při použití metody s pozdějším přidavkem glycerolu pouze  $22,29 \pm 1,13$  %. I 1 hodinu po rozmrazení vykazovaly lepší výsledky vzorky u nichž byla použita modifikovaná metoda přidavku glycerolu. Průměrná hodnota poškození akrozomu činila pro modifikovanou metodu  $24,69 \pm 1,30$  %, oproti tomu u vzorků s tradičním způsobem ředění bylo poškození akrozomu zhruba o 10 % vyšší. Dvě hodiny po rozmrazení byla zjištěna průměrná hodnota poškození akrozomu u tradiční metody  $32,44 \pm 1,79$  %, oproti tomu vzorky, u nichž byla použita modifikovaná metoda dosahovali o zhruba 6 % lepších hodnot ( $26,91 \pm 1,79$  %). Podrobnější výsledky z jednotlivých hodnocených časů po rozmrazení jsou prezentovány v grafu č. 6.

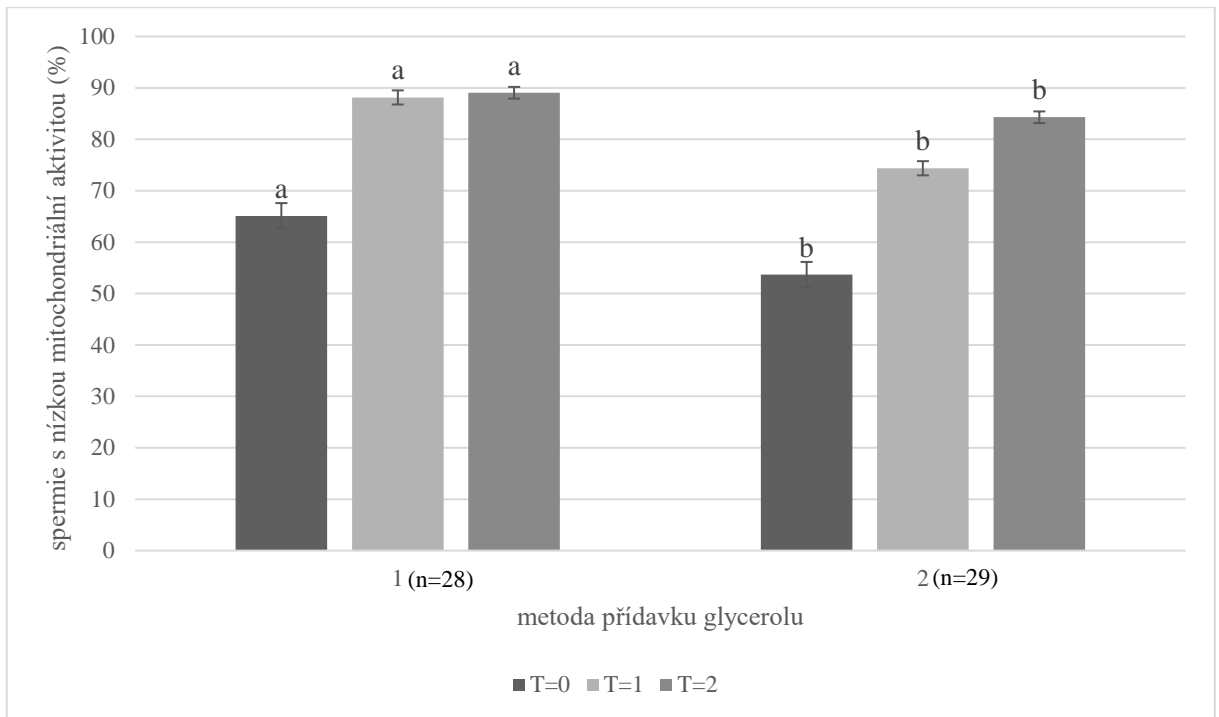
**Graf č. 6:** Vliv metody přidavku glycerolu na poškození akrozomu spermií po kryokonzervaci; LSM  $\pm$  SEM



**Zkratky:** 1- rutinní způsob přidavku glycerolu; 2 –modifikovaná varianta s přidavkem glycerolu těsně před mrazením; a-b= rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) u stejných časových intervalů mezi použitými metodami přidavku glycerolu

Metoda přidavku glycerolu měla také statisticky významný vliv na mitochondriální aktivitu. Mitochondriální aktivita byla ve všech hodnocených časech statisticky průkazně lepší v případě pozdějšího přidavku glycerolu oproti tradičnímu způsobu ředění. Ihned po rozmrazení činila nízká mitochondriální aktivita průměrně  $53,67 \pm 2,48$  %, ale u modifikované metody přidavku glycerolu byla hodnota nízké mitochondriální aktivity o více než 10 % nižší. Stejně tomu tak bylo i v případě hodnocení vzorků 1 hodinu po rozmrazení, kdy byly zjištěny průměrné hodnoty pro metodu tradičního způsobu přidavku glycerolu  $88,14 \pm 1,38$  % a pro modifikovanou metodu ředění  $74,37 \pm 1,38$  %. Při posouzení nízké mitochondriální aktivity dosáhla horších výsledků, metoda tradičního ředění spermatu ( $89,05 \pm 1,14$  %), oproti metodě s pozdějším přidavkem glycerolu ( $84,28 \pm 1,14$  %). Přičemž podrobné výsledky jsou patrné z grafu č. 7.

**Graf č. 7:** Vliv metody přidavku glycerolu na mitochondriální aktivitu spermií po kryokonzervaci; LSM ± SEM



**Zkratky:** 1- rutinní způsob přidavku glycerolu; 2 –modifikovaná varianta s přidavkem glycerolu těsně před mrazením; a-b= rozdílná písmena vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) u stejných časových intervalů mezi použitými metodami přidavku glycerolu

## 7 Diskuse

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat proces kryokonzervace ejakulátu beranů. Proces kryokonzervace ejakulátu je úspěšně používanou metodou u řady živočišných druhů. Existují však druhy zvířat, u nichž může být aplikace metody problematická. Mezi silné determinanty plodnosti dosažené po kryokonzervaci můžeme zařadit rozdíly v anatomii samičího pohlavního ústrojí, mechanismus transportu spermií a účinnost dodávání spermií. Špatná přežitelnost spermií a poškození cytoplazmatické membrány po kryokonzervaci představuje jeden z hlavních aspektů úspěšnosti oplodnění mrazeným spermatem u mnoha živočišných druhů Holt (2000). Awad (2011) uvádí, že udržování motility spermií, jejich životaschopnosti a neporušenosti akrozomu berana po delší dobu po kryokonzervaci je důležité pro dosažení vysoké míry březosti po použití zmrazeného a následně rozmrazeného spermatu. Jako nejčastěji používaný glycerol uvádí glycerol, který je podle nich vzhledem ke své potenciální toxicitě nutné používat v nízkých koncentracích (pod 4 %).

U beranů je obecně známá malá odolnost spermií vůči nízkým teplotám. Andreeva et al., (2019) proto zkoumali vliv plemene na kvalitu spermií po kryokonzervaci, přičemž byla hodnocena morfologie spermií. V rámci jednotlivých plemen byl prokázán významný rozdíl z hlediska hodnocení morfologie spermií. Je tedy jasné, že kvalitu ejakulátu ovlivňuje spousta genetických faktorů i faktorů prostředí. V řadě studií byl hodnocen vliv genetických faktorů na kvalitu ejakulátu, mezi které patří obvod šourku (Pezzanite et al., 2010, Braun et al., 1980), věk (Dowsett & Knott, 1996, Bongso et al., 1982), plemeno (Karagiannidis, Varsakeli, et al., 2000, Štolc et al., 2009). Naproti tomu byl i prokázán vysoký vliv jednotlivých faktorů prostředí. Přičemž mezi nejvýznamnější patří výživa, jejíž vliv ve své studii zmiňuje (Widiyono et al., 2017) a metoda odběru ejakulátu, kdy byl prokázán významný vliv na jednotlivé parametry ejakulátu v porovnání odběru pomocí umělé vagíny a elektroejakulace, což ve své studii popisuje Jiménez-Rabadán et al. (2016). Kvalita čerstvého ejakulátu přímo ovlivňuje kvalitu ejakulátu po kryokonzervaci. Pokud čerstvý ejakulát vykazuje nízké hodnoty v jednotlivých ukazatelích, tak po následné kryokonzervaci dochází ještě k rapidnějšímu poklesu kvality než u čerstvého ejakulátu, který vykazuje vysokou kvalitu před kryokonzervací dle jednotlivých hodnocených parametrů. Tento fakt je v naší práci patrný v rámci srovnání kvality ejakulátu mezi jednotlivými odběrovými dny. Proces kryokonzervace u malých přežvýkavců, a tím i u berana, není doposud optimalizován, proto jsem se snažili prostřednictvím naší práce přispět ke zlepšení jednotlivých parametrů ejakulátu po kryokonzervaci. Optimalizace spočívala ve vhodném načasování přídatku kryoprotektantu (glycerolu) před mrazením. Příklad glycerolu byl realizován dvěma metodami, kdy v jednom případě byl glycerol již součástí ředidla Andromed a ve druhém byl glycerol přidán těsně před mrazením. Ideální postup přídatku glycerolu byl definován na základě spermií, které si po kryokonzervaci zachovaly oplozovací schopnost. Přičemž jako spermie se zachovanou oplozovací schopností byly definovány ty, které měly neporušenou plazmatickou membránu, neporušený akrozom a vysokou mitochondriální aktivitu (Jha, Golam Shahi Alam, et al., 2018).

Podle výsledků této práce existuje statisticky průkazný rozdíl mezi použitými metodami přídatku glycerolu při hodnocení jednotlivých parametrů pomocí průtokového cytometru. Oproti tomu nebyl zjištěn významný rozdíl mezi jednotlivými metodami v případě hodnocení celkové a progresivní motility pomocí CASA. Gil et al. (2003) se zabývali použitím vhodných

ředidel k zachování adekvátního počtu spermií se všemi potřebnými ukazateli, které jsou potřebné pro překonání cervikální bariéry v pohlavním ústrojí ovcí a k dosažení oplodnění při použití rozmrazeného ejakulátu. Glycerol prezentují jako kryoprotektivum, který má toxický vliv na spermie a nepříznivě ovlivňuje integritu plazmatické membrány v závislosti na jeho koncentraci a teplotě při jeho přidavku. Ve studii byl hodnocen vliv ředidla s rozdílnou koncentrací glycerolu (12,8 % a 6,4 %). U obou koncentrací byl přídavek glycerolu realizován dvoustupňovou metodou. V prvním stupni přidáno ředidlo bez glycerolu a ve druhé fázi ředidlo s obsahem glycerolu dle použité koncentrace). Hodnoceny byly parametry motility prostřednictvím CASA. V rámci studie existovaly statisticky významné rozdíly mezi ředidly s rozdílnou koncentrací glycerolu. Hodnocena byla celková i progresivní motilita. Celková motilita a progresivní motilita byla prokazatelně nižší u ředidla s koncentrací glycerolu 6,4 % oproti ředidlu s koncentrací glycerolu 12,8 %. V naší práci jsme se zabývali pouze dobou přidavku glycerolu, ale vliv jeho finální koncentrace v ředidle jsme neuvažovali. V rámci hodnocení motility v naší práci prostřednictvím CASA nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými parametry. Při použití metody s přidavkem glycerolu těsně před mrazením bylo po kryokonzervaci dosaženo průkazně lepších výsledků u pejet hodnocených 1 hodinu a 2 hodiny po rozmrazení. Ihned po rozmrazení nebyly mezi jednotlivými metodami přidavku glycerolu zjištěny statisticky signifikantní rozdíly při hodnocení oplození schopnosti spermií.

Při použití metody s pozdějším přidavkem glycerolu obsahovaly pejety ihned po rozmrazení průměrně  $24,997 \pm 0,84$  % životaschopných spermií a pejety s přidavkem glycerolu již po ředění  $25,315 \pm 0,84$  %. Jednu hodinu po rozmrazení obsahovaly pejety s pozdějším přidavkem glycerolu průměrně  $22,028 \pm 0,774$  % životaschopných spermií, ale pejety s přidavkem glycerolu již při ředění obsahovaly pouze  $16,530 \pm 0,774$  % životaschopných spermií. Stejný trend byl pozorován i při hodnocení ejakulátu dvě hodiny po rozmrazení. Také Watson & Martin (1975) zkoumali vliv přidavku glycerolu. Přičemž porovnávali ředidlo bez přidavku glycerolu, ředidla s obsahem glycerolu 2,5 % a obsahem glycerolu 7,5 %. Byl zkoumán vliv přidavku glycerolu na přežitelnost spermií, jejich motilitu a poškození akrozomu. Celková přežitelnost byla podstatně vyšší v případě použití ředidel s přidavkem glycerolu oproti jeho nepoužití. Naopak při vyhodnocení poškození akrozomu bylo dosaženo lepších výsledků u ředidla, které neobsahovalo glycerol, avšak poškození akrozomu bylo přímo úměrné obsahu glycerolu v ředidle. Dle jejich výsledků by bylo možné zlepšit kvalitu semene přidavkem ředidla s glycerolem o nižší koncentraci než 7 %, která se používá u býčího spermatu. Vliv různých koncentrací přidavku glycerolu zkoumali také Fiser & Fairfull, 1984, přičemž dopěli k podobným výsledkům jako Watson & Martin, (1975), přičemž i v jejich studii měl pozitivní vliv na kvalitu ejakulátu přídavek ředidla s obsahem glycerolu menším než 7 %. Awad (2011) ve své studii hodnotil také přídavek dvou různých koncentrací glycerolu (6 % a 3 %). Zkoumal vliv koncentrace glycerolu v ředidle na životaschopnost spermií, motilitu a neporušenost akrozomu. Přičemž zjistil, že na životaschopnost spermií, neporušenost akrozomu má pozitivní vliv ředidlo s obsahem glycerolu 3 % oproti přidavku glycerolu s obsahem 6 %. Byly prokázány podobné výsledky jako u předchozích zmíněných studií. Farshad et al. (2009) ve své práci také zkoumali vliv různých koncentrací glycerolu na výslednou kvalitu ejakulátu. Použity byly čtyři různé koncentrace glycerolu (1, 3, 5 a 7 %). Celková motilita spermií, progresivní motilita a životaschopnost spermií vykazovaly prokazatelně lepší výsledky ( $p < 0,05$ ) ředidla s vyšší koncentrací glycerolu (7 %). Při hodnocení akrozomu byl prokázán

opačný trend. Nejlepších výsledků z hlediska poškození bylo dosaženo při přidavku glycerolu o koncentraci 1 %.

Ntemka et al. 2018 ve své studii uvádějí glycerol jako jeden z nejpoužívanějších kryoprotektantů vůbec, který je schopen proniknout do spermií, vyvolat osmózu a zabránit tvorbě ledových krystalků. Anel et al. (2003) ve své studii zkoumali tři různé způsoby přidavku glycerolu před mrazením, přičemž konečná koncentrace spermií v pejetách (0,25 ml) byla  $100 \times 10^6$ /ml. V případě první metody byly přidány 2/3 konečného objemu ředidla jako roztok A (bez glycerolu) do čistého ejakulátu při teplotě 35 °C a následně byl vzorek ochlazen na 5 °C (-0,30 °C/min), po ochlazení byla přidána 1/3 konečného objemu ředidla jako roztok B (konečná koncentrace glycerolu 4 %). Takto naředěný vzorek ejakulátu byl skladován po dobu 2 hodin při teplotě 5 °C a následně zamrazen v programovatelném mrazáku (-20 °C/min až na -100 °C). V případě druhé metody byl vzorek ejakulátu zředěn specifickým roztokem při 35 °C (konečná koncentrace glycerolu 3 %), následně byl vzorek ochlazen na 5 °C (-0,20 °C/min) a při této teplotě ponechán 2 hodiny. Poté byl vzorek zamrazen v parách tekutého dusíku. U třetí metody bylo semeno zředěno 1:1 ve specifickém roztoku (koncentrace glycerolu 2 %), vzorek byl poté ochlazen na 5 °C (-0,25 °C/min). Následně byl vzorek znovu zředěn ve stejném roztoku na konečnou buněčnou koncentraci (konečná koncentrace glycerolu 4 %). Směs byla ponechána po dobu 1 hodiny při 5 °C a následně zamrazena v programovatelném mrazáku (-20 C/min až na -100 °C). Nejlepší celková motilita a progresivní motilita (75,8 % a 55,18 %) byly získány pomocí třetí metody. Metoda 1 a metoda 3 poskytly významně vyšší hodnoty pro kinetické parametry (VSL, VAP, LIN) oproti druhé metodě. V rámci naší práce byly lepší výsledky získány pomocí metody s tradičním přidavkem glycerolu oproti výsledkům získaným pomocí metody s přidavkem glycerolu těsně před mrazením, což je v rozporu s tím co uvádí Ntemka et al. (2018). Lepších výsledků u tradiční metody přidavku glycerolu bylo dosaženo u obou hodnocených parametrů pomocí CASA, celková motilita spermií a progresivní motilita. Mezi jednotlivými metodami však nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. První metoda poskytla nejhorší výsledky v životaschopnosti a stavu akrozomu (31,3 % mrtvé buňky s poškozenými akrozomy oproti 25,4 % v případě druhé metody a 23,3 % v případě třetí metody). Ukázalo se, že použití jednoduchého ředícího média s přidavkem glycerolu ve dvou krocích působí produktivně na kvalitu zmrazeného beraního ejakulátu. V naší práci, stejně jako ve studii Anel et al. (2003) se jeví dvoustupňové přidání ředidla (bez glycerolu, s glycerolem) jako vhodnější metoda než metoda s přidavkem glycerolu ihned při ředění, ačkoli byl v této práci kombinován přidavek glycerolu v různých koncentracích. Použití jednostupňové či dvoustupňové metody přidavku glycerolu již dříve uvedli Salamon & Maxwell (1995), kteří zkoumali jak několika stupňové přidání glycerolu, tak metodu, kdy byl glycerol jednorázově přidán až při teplotě 5 °C.

Entwistle & Martin (2006) také zkoumali vliv různých metod přidavku glycerolu při teplotě 5 °C, avšak nezjistili žádný významný rozdíl mezi několikastupňovým (konkrétně tříkrokovým) přidáním glycerolu v porovnání přidavku glycerolu jednorázově při této teplotě. Při použití jednostupňového přidavku glycerolu byla naměřena průměrná motilita 31,4 % a v případě třístupňového přidavku glycerolu byla zjištěna průměrná motilita spermií na úrovni 32,6 %. Neexistoval tedy statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými metodami přidavku glycerolu. Lightfoottt & Salamont (1969) pozorovali vliv různých teplot, během kterých je

glycerol přidáván do ejakulátu, přičemž nebyly zjištěny významné rozdíly mezi přidavkem glycerolu při 30 °C nebo při přidavku glycerolu při teplotě 5 °C.

Morrier et al. (2002) ve své studii také zkoumali vliv přidavku glycerolu na kvalitu spermií po kryokonzervaci. Cílem jejich studie bylo prokázat vliv doby a způsobu přidání glycerolu na kvalitu ejakulátu spermií po rozmrazení. Ve svém experimentu zkoumali vliv doby přidavku glycerolu, kdy byl sledován rozdíl mezi jednostupňovým ředěním 7% glycerolovaným ředidlem a dvoustupňovým způsobem ředění. Pro jednostupňové ředění byl použit extender Triladylu (7% glycerol), zředěné vzorky byly ochlazeny na 5 °C během 3 hodin v chladicí místnosti, poté byly zamrazeny přímým ponořením do kapalného dusíku. V případě dvoustupňového ředění byl použit ředidlo Biladyl, přičemž byl přidán při pokojové teplotě. Naředěné vzorky Biladylem byly pomalu ochlazeny na 5 °C v chladicí místnosti stejně jako u alikvótů s obsahem Triladylu, potom byl přidán glycerol na finální koncentraci 7 % glycerolu. Zmrazení proběhlo stejně jako u vzorků s Triladylem. Rozmrazení semene před hodnocením proběhlo ve vodní lázni o teplotě 37 °C/ 30 sec. Autoři dospěli k výsledku, že způsob přidavku glycerolu nemá vliv na kvalitu kryokonzervovaných spermií v porovnání obou metod, jelikož nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi oběma použitými metodami, což téměř odpovídá našim výsledkům v případě hodnocení kvality ejakulátu v čase T=0 při porovnání obou metod, kdy byly signifikantně významné rozdíly zjištěny pouze u poškození akrozomu, ale v jiných parametrech statisticky významné rozdíly nebyly. Avšak Morrier et al., (2002) provedli hodnocení kvality ejakulátu po rozmrazení pouze v čase T=0, přičemž v našem experimentu byly prokázány signifikantní výsledky až v čase T=1 a T=2 po rozmrazení, přičemž například míra viability byla prokazatelně lepší u ejakulátu, kde byl přidán glycerol těsně před mrazením, proti metodě s přidavkem glycerolu, kdy byl součástí ředidla Andromed. Molinia et al., (1994) zkoumali účinek glycerolu na kvalitu beraního ejakulátu jako potenciálně toxického kryoprotektantu, který snižuje fertilizační schopnost spermií. Ve studii porovnávali účinek vybraných látek na kvalitu spermií po rozmrazení (ethylenglykol, glycerol, dimethyl sulfoxid, propandiol), avšak i oni došli k závěru, že glycerol zůstává i nadále nejúčinnějším kryoprotektantem. Ke stejnému závěru došli ve své studii i Salamon & Maxwell, (2000) Colas, (1975) navrhl, že glycerol patří k mírně toxickým kryoprotektantům, kdy je možné jeho toxicitu snížit jeho přidavkem při teplotách blízcích se 0°C. Uvádí jako významný faktor teplotu při, které je glycerol přidáván, přičemž porovnával přidání glycerolu při teplotě 30 °C ve srovnání s přidáním glycerolu při teplotě 4 °C, přičemž došel k závěru, že teplota při které je glycerol přidáván má signifikantní vliv na pohyblivost spermií, kdy lepších výsledků bylo dosaženo při metodě přidavku glycerolu při 4 °C oproti 30 °C. Dále zkoumal vliv doby expozice glycerolu, přičemž došel k závěru, že doba expozice nemá signifikantní vliv na kvalitu beraního ejakulátu.

Vliv odběrového dne na životaschopnost, a tím potenciální oplozeníschopnost byl značný. V rámci jednotlivých odběrových dní se kvalita ejakulátu lišila a mezi některými odběrovými dny bylo dosaženo statisticky významných rozdílů. Průměrná hodnota životaschopných spermií v rámci jednotlivých odběrových dní kolísala od 16 % do 32 % v případě hodnocení spermatu ihned po rozmrazení. Přičemž s prodlužující se dobou od rozmrazení (T1, T2) došlo v rámci všech odběrových dní ke snížení životaschopnosti spermií. Ihukwumere & Okere (1990) prováděli dvakrát týdně odběr ejakulátu u beranů po dobu 12 týdnů pomocí elektroejakulace. Odběr ejakulátu byl realizován vždy v pondělí a ve čtvrtek. Následně došlo k posouzení ejakulátu z hlediska barvy, konzistence, hustoty, progresivní pohyblivosti, koncentrace spermií



a podílu živých spermií v ejakulátu. Den odběru ejakulátu měl významný vliv na podíl pohyblivých spermií, přičemž průměrná hodnota pohyblivých spermií získaných z odběru v pondělí byla  $40,1 \pm 8,3$  %, kdežto průměrná hodnota motilních spermií u ejakulátu odebraných ve čtvrtek činila pouze  $36,6 \pm 4,6$  %. Mezi dny odběru tedy existoval statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ), v rámci odběrových dní existoval významný rozdíl i z hlediska morfologie spermií, kdy při odběru v pondělí bylo průměrné zastoupení morfologicky normálních spermií  $83,0 \pm 2,4$  %, ale při odběru ve čtvrtek pouze  $75,1 \pm 5,3$  %. Nebyl však zjištěn rozdíl mezi objemy ejakulátu v porovnání odběru v pondělí a ve čtvrtek.

César et al. (2017) zkoumali vliv sezónnosti na kvalitu ejakulátu, přičemž zjistili, že během jednotlivých ročních období dochází k významným změnám v rámci jednotlivých hodnocených parametrech ejakulátu. Přičemž nejlepší výsledky při hodnocení jednotlivých parametrů ejakulátu byly získány v období během reprodukční sezóny. Vzorky byly od beranů získávány v průběhu podzimu a zimy, což mohlo vést k potenciálně lepším výsledkům v naší práci. Ptáček et al. (2019) ve své studii prováděli odběr ejakulátu v průběhu roku. Odběr byl realizován v srpnu, v říjnu a prosinci. Při hodnocení motility po kryokonzervaci dosáhli lepších výsledků u vzorků, které byly odebírány během reprodukčního období, tedy října. V naší práci byl odběr ejakulátu realizován jednou týdně (úterý), přičemž Ari et al. (2011) porovnávali kvalitu ejakulátu ale frekvence jeho odběru. Ve své studii porovnávali jednodenní interval odběru ejakulátu se čtyřdenním intervalem odběru ejakulátu. Zjistili, že frekvence odběru ejakulátu v jednodenním intervalu má prokazatelně lepší vliv na jeho kvalitu než odběr ve čtyřdenním intervalu. Tím, že v rámci naší práce byl odběr realizován pouze jednou týdně mohlo dojít k potenciálnímu ovlivnění našich výsledků.

Pontbriand et al. (1989) ve své studii provedli multifaktoriální analýzu. Zkoumaly metodu mrazení, několik kryoprotektivních látek a rychlost rozmrazování. Vliv všech faktorů byl pozorován vzhledem k životaschopnosti, progresivní motilitě a neporušenosti akrozomu. Bylo zjištěno, že významný vliv na životaschopnost spermií má metoda mrazení a použitý kryoprotektant. Dále zkoumali rozdíl v kvalitě ejakulátu v porovnání mrazení ejakulátu suchým ledem (pelety) a mrazení ejakulátu pomocí tekutého dusíku (pejety). Bylo zjištěno, že lepších výsledků pro hodnocené parametry bylo dosaženo metodou mrazení pomocí tekutého dusíku. Mezi další významný faktor mající vliv na kvalitu ejakulátu po rozmrazení patří způsob metody mrazení a rozmrazení ejakulátu. Metodu rozmrazení ejakulátu uvedli jako významný faktor mající vliv na kvalitu ejakulátu po rozmrazení také Nicolae et al. (2014). Pozorovali pět různých teplot rozmrazení ejakulátu ( $90^{\circ}\text{C}/ 2$  s;  $75^{\circ}\text{C}/ 10$  s;  $75^{\circ}\text{C}/ 5$  s;  $50^{\circ}\text{C}/ 30$  s;  $39^{\circ}\text{C}/ 120$  s), přičemž zjistili, že při nižších teplotách, konkrétně při  $50^{\circ}\text{C}$  a  $39^{\circ}\text{C}$  bylo dosažení lepších parametrů z hlediska hodnocených parametřů oproti použití vysokých teplot. Podobnou studii zaměřenou na metodu rozmrazení ejakulátu z hlediska použité teploty provedl také Fiser et al. (1986), který však uvádí jako optimální teplotu pro rozmrazení  $60 - 80^{\circ}\text{C}$ .

Mezi další významné faktory mající vliv na kvalitu ejakulátu uvádí spousta autorů přidavek různých aditiv. Azawi & Hussein (2013) zkoumali vliv přídavku vitamínu C a vitamínu E do ředidla na bázi Tris, přičemž prováděli test přežitelnosti spermií při teplotě  $5^{\circ}\text{C}$ . Hodnocena byla motilita, životaschopnost, morfologie spermií a poškození akrozomu. Výsledky ukázaly, že přídavek vitamínu C a E měl pozitivní vliv na přežitelnost spermií. Vzorky s přídavkem vitamínu C a E měly prokazatelně lepší výsledky než vzorky, kde nebyl požit žádný přídavek

vitaminů. Zubair et al. (2015) se také věnovali vlivu přísady aditiv na výslednou kvalitu ejakulátu, přičemž v jejich studii hodnotili přísadu vitamínu E a selenu.

Dle výsledků naší práce, lze doporučit přísadu glycerolu těsně před mrazením, jelikož vzorky, u kterých byla použita metoda s pozdějším přísadkem glycerolu vykazují prokazatelně lepší parametry kvality ejakulátu jednu a dvě hodiny po rozmrazení, i když výsledky v čase  $T=0$  zlepšení vlivem této metody prokazatelně neukazují. Během inseminace není semeno deponováno do pohlavních orgánů samice ihned po rozmrazení, ale s určitou časovou prodlevou, čímž může výsledek naší práce, kdy 1 a 2 hodiny po rozmrazení si ejakulát zachovávat lepší výsledky hodnocených parametrů u metody s přísadkem glycerolu těsně před mrazením, pozitivně ovlivnit procento zabřezávání při použití umělé inseminace.

O'Meara et al., 2005 uvádí, že použitá technika inseminace je ovlivněna typem použitého spermatu. Uvádí, že zmrazené sperma by se nemělo používat pro intravaginální inseminaci. Je však vhodné jeho použití pro inseminaci intracervikální. Značnou nevýhodou je, že při intracervikální inseminaci se pouze malé procento spermií dostane k vajíčku. Spermie jsou totiž vlivem tlaku vytlačeny přes vulvu. Další nevýhodou inseminace je, že se dá použít pouze malý objem ejakulátu a to především díky anatomickému uzpůsobení děložního hrdla.

Jelikož je kvalita ejakulátu po rozmrazení ovlivněna velkým počtem faktorů bude důležité se do budoucna optimalizaci procesu kryokonzervace nadále věnovat. Optimalizace procesu kryokonzervace bude pravděpodobně zahrnovat optimalizaci přípravných metod v rámci povahy ředidel, rychlosti přísavku glycerolu, či teploty při, kterých se do směsi glycerol přidává. V budoucnu by tedy bylo vhodné nadále se optimalizací metody přísavku glycerolu zabývat, ať už z hlediska doby přísavku, či teploty, při které je glycerol přidáván. Výsledky naší práce naznačují lepší kvalitu ejakulátu při použití metody s přísadkem glycerolu těsně před mrazením, i když jsou prokazatelné pouze při hodnocení 1 a 2 hodiny po rozmrazení. Přičemž námi navržená modifikace by mohla vést ke zlepšení kvality ejakulátu oproti tradičně používané metodě jednostupňového přísavku glycerolu.

## 8 Závěr

Cílem práce bylo optimalizovat postup přidavku glycerolu před mrazením inseminačních dávek malých přežvýkavců. V rámci experimentu byly zkoumány dvě metody přidavku glycerolu. Přídavek glycerolu byl realizován tradičním způsobem a způsobem kdy byl přidán těsně před mrazením.

U vyšetřovaných vzorků byla hodnocena celková a progresivní motilita, viabilita buněk, poškození cytoplazmatické membrány, poškození akrozomu a stupeň mitochondriální aktivity.

Jako oplození schopná buňka byla vyhodnocena ta, která nevykazovala poškození cytoplazmatické membrány, neměla poškozený akrozom a vykazovala dostatečnou mitochondriální aktivitu.

Hodnocení motility probíhalo pomocí CASA a zbylé parametry byly hodnoceny za použití průtokové cytometrie.

Ohledně po rozmrazení nebyly zjistitelné prokazatelně významné rozdíly mezi metodou tradičního přidavku glycerolu a metodou přidavku glycerolu těsně před mrazením.

Statisticky signifikantních výsledků bylo dosaženo při hodnocení ejakulátu 1 a 2 hodiny po rozmrazení, kdy byly lepší výsledky zjištěny u námi vytvořené modifikované metody přidavku glycerolu.

Námi získané výsledky prostřednictvím analytických metod daly jisté předpoklady pro lepší kvalitu ejakulátu prostřednictvím optimalizace přidavku glycerolu před procesem kryokonzervace. Přičemž proces kryokonzervace hraje významnou roli v zachování cenných geneticky ohrožených druhů zvířat, mezi které patří i v naší diplomové práci použité valašské ovce. V budoucnu by bylo vhodné tyto získané předpoklady ověřit prostřednictvím inseminace.

## 9 Literatura

- Aamdal, J., & Andersen, K. (1968). Fast Thawing of Semen Frozen in Straws. *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1968.tb00041.x>
- Abecia, J. A., Forcada, F., & González-bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants &. *Animal Reproduction Science*, *130*(3–4), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.011>
- Aguiar, G. V., & Tilburg, M. F. Van. (2013). *Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast : the season ' s influence on the cooling of semen*. 6–12.
- Al-ghalban, A. M., Tabbaa, M. J., & Kridli, R. T. (2004). Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small Ruminant Research*, *53*(1–2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.10.003>
- Almeida, A. M., Schwalbach, L. M. J., Cardoso, L. A., & Greyling, J. P. C. (2007). Scrotal, testicular and semen characteristics of young Boer bucks fed winter veld hay: The effect of nutritional supplementation. *Small Ruminant Research*, *73*(1–3), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.02.001>
- Amann, R. P., & Katz, D. F. (2004). *Reflections on CASA After 25 Years Andrology Lab Corner* \*. 25(3).
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Theriogenology Computer-assisted sperm analysis ( CASA ): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, *81*(1), 5-17.e3. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Andreeva, M., Metodiev, N., Cekic, B., & Stefanov, R. (2019). *STUDY OF THE EFFECTS OF LOW TEMPERATURES ON THE MORPHOLOGICAL STUDY OF THE EFFECTS OF LOW TEMPERATURES ON THE MORPHOLOGICAL STATUS OF RAM. November*.
- Anel, L., De Paz, P., Álvarez, M., Chamorro, C. A., Boixo, J. C., Manso, A., González, M., Kaabi, M., & Anel, E. (2003). Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, *60*(7), 1293–1308. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00140-7)
- Anel, L., & Paz, P. De. (2010). Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*, 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Arando, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., León, J. M., Alcalá, C. J., & Pérez-Marín, C. C. (2019). Vitriification induces critical subcellular damages in ram spermatozoa. *Cryobiology*, *87*(February), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.005>
- Ari, U. Ç., Lehimcioğlu, N. C., Yildiz, S., Kulaksiz, R., & Öztürkler, Y. (2011). Effects of semen collection interval on fresh and frozen semen parameters in Tushin rams. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *55*(1), 67–70.
- Awad, M. M. (2011). Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal integrity. *Small Ruminant Research*, *100*(2–3), 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.05.011>
- Azawi, O. I., & Hussein, E. K. (2013). Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at C. *Veterinary Research Forum*, *4*(3), 157–160. [https://pdfs.semanticscholar.org/d1da/7631d299601553237515c3a8d40f77530c18.pdf?\\_ga=2.136222129.1234619587.1497014698-2075098170.1497014698](https://pdfs.semanticscholar.org/d1da/7631d299601553237515c3a8d40f77530c18.pdf?_ga=2.136222129.1234619587.1497014698-2075098170.1497014698)
- Barszcz, K., Wiesetek, D., Wasowicz, M., & Kupczynska, M. (2011). Bull Semen Collection

- and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science*, 4(3).  
<https://doi.org/10.5539/jas.v4n3p1>
- Bartoov, B., Bar-Sagie, D., & Mayevsky, A. (1980). The Effect of pH on Ram Sperm Collective Motility Driven by Mitochondrial Respiration. *International Journal of Andrology*, 3(1–6), 602–612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1980.tb00148.x>
- Bispo, C. A. S., Pugliesi, G., Galvão, P., Rodrigues, M. T., Ker, P. G., Filgueiras, B., & Carvalho, G. R. (2011). Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 100(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.05.003>
- Boland, M. P., Al-Kamali, A. A., Crosby, T. F., Haynes, N. B., Howles, C. M., Kelleher, D. L., & Gordon, I. (1985). The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. *Animal Reproduction Science*, 9(3), 241–252.
- Bongso, T. A., Jainudeen, M. R., & Siti Zahrah, A. (1982). Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. *Theriogenology*, 18(5), 513–524. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(82\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(82)90184-4)
- Braun, W. F., Thompson, J. M., & Ross, C. V. (1980). Ram scrotal circumference measurements. *Theriogenology*, 13(3), 221–229.
- Bravo, J. A., Montanero, J., Calero, R., & Roy, T. J. (2014). Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Ruminant Research*, 119(1–3), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.02.015>
- Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., & Waberski, D. (2016). Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, 85(9), 1507–1527. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002>
- Budai, C., Egerszegi, I., Oláh, J., Jávör, A., & Kovács, A. (2014). Application of semen evaluation techniques. *Agrártudományi Közlemények*, 59, 5–12.
- Byrne, G. P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J. P., & Boland, M. P. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*, 62(4), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00121-4)
- Cardeal, C., Alberton, L. R., Boscarato, A. G., Rocha, M. V., Marchetti, L. G. L., Macedo, G. G., Lourenço, E. L. B., & Martins, L. F. (2017). Comparative study between the hemocytometric and spectrophotometric methods for measuring the sperm concentration of young Nelore bulls. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(6), 3605–3612. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n6p3605>
- Carretero, M. I., Fumuso, F. G., Neild, D. M., Giuliano, S. M., Cetica, P., & Miragaya, M. H. (2015). Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Animal Reproduction Science*, 160, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.014>
- Catunda, A. G. V., Aguiar, G. V., Lima, Í. C. S., Pereira, J. F., Pitombeira, R. S. S., Andrade, I. R. A., Martins, G. A., Souza, C. E. A., Nunes, J. F., Moura, A. A. A. N., & Campos, A. C. N. (2011). Characterization of ejaculates from crossbreed male goats raised in tropical environment. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 110(106), 59–67.
- César, J., Dias, O., Veloso, C. M., Christilis, M., Thiago, C., Alvim, S., Oliveira, M. De, Silveira, C. O., Iglesias, E., Maitan, P. P., Maria, L., & Sanglard, P. (2017). Revista Brasileira de Zootecnia Seasonal variation in the reproductive activity of male goats raised under tropical climate conditions. *Brazilian Journal of Animal Science*, 46(3), 192–201.
- Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on

- the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 42(2), 277–285. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420277>
- Constantinescu, G. C. I. (2010). Functional anatomy of the goat. In *Goat science and production* (pp. 89–137). <http://enooriyan.persiangig.com/Book/Goat Science and Production.pdf>
- Cosma, A., Nolan, G., & Gaudilliere, B. (2017). Mass cytometry: The Time Settle Down. *Cytometry A*, 91(1), 12–13. <https://doi.org/10.1038/nm.2451.A>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.006>
- Dessole, S., Isachenko, E., Nawroth, F., Isachenko, V., & Katkov, I. I. (2010). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), 191–200. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61710-5)
- Dhurvey, M., Gupta, V. K., Nema, S. P., Patidar, A., Shivhare, M., Singh, N., & Shakya, V. (2012). Modern semen evaluation techniques in domestic animals : A review. *Dhr-Ijbls*, 3(1), 62–83. <https://doi.org/10.1109/TWC.2009.071129>
- Díaz, M., Herrero, M., García, L. A., & Quirós, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 385–407. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.013>
- Domínguez, M. P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A., & Alberio, R. H. (2008). Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, 69(5), 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.010>
- Dowsett, K. F., & Knott, L. M. (1996). The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, 46(3), 397–412. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00162-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00162-8)
- Drummond, M. (2013). Principles of Flow Cytometry. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*, 16(4), 3–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-451-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-451-3_1)
- Entwistle, K. W., & Martin, I. C. A. (2006). Glycerol , Freezing Rate , and Storage Temperature on the Revival of Ram Spermatozoa After Deep-Freezing. *Australian Journal of Biological Sciences*, 25 (2)(September 1971), 379–386.
- Erikson, D. W., & Health, O. (2006). *Role of osteopontin in bovine sperm capacitation and fertilization /*. January, 1–124.
- Farshad, A., Khalili, B., & Fazeli, P. (2009). The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. In *Pakistan Journal of Biological Sciences* (Vol. 12, Issue 3, pp. 239–245). <https://doi.org/10.3923/pjbs.2009.239.245>
- Ferdinand, N., Thomas, T. T., Augustave, K., Henry, D. F., Fernand, T., & Etienne, P. T. (2012). Effects of Buck Age , Storage Duration , Storage Temperature and Diluent on Fresh West African Dwarf Buck Semen. *Journal of Reproduction and Infertility*, 3(3), 58–66. <https://doi.org/10.5829/idosi.jri.2012.3.3.66216>
- Fiser, P. S., & Fairfull, R. W. (1984). The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, 21(5), 542–551. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90053-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90053-1)
- Fiser, P. S., & Fairfull, R. W. (1986). Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology*, 25(3), 473–484. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90057-9)
- Fiser, P. S., Fairfull, R. W., & Marcus, G. J. (1986). The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology*, 23(2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/0011->

2240(86)90005-2

- Fraser, L., & Group, S. I. (1998). *Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa*. *13*(1), 142–145.
- Fukushara, R., & Nishikawa, Y. (2011). Effects of pH, Sperm Concentration, Washing and Substrate Concentration on Respiration and Motility of Goat Spermatozoa. *Nihon Chikusan Gakkaiho*, *44*(5), 266–270. <https://doi.org/10.2508/chikusan.44.266>
- Gadella, B. M., & Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, *81*(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.005>
- Gangawar, C., Kharche, S., Kumar, S., & Jindal, S. (2016). Cryopreservation of goat semen : status and prospects. *Indian Journal of Small Ruminants*, *22*(January), 1–10. <https://doi.org/10.5958/0973-9718.2016.00005.2>
- Garner, D. L. (2006). Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, *65*(5), 943–957. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.009>
- Gebre, Y. M. (2007). *Reproductive traits in Ethiopian male goats With special reference to breed and nutrition*. Yoseph Mekasha.
- 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*(5–6), 1241–1255. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01177-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01177-9)
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, *63*(2), 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Graham, J. (2001). Assessment of sperm quality : a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, *68*(3–4), 239–247.
- Gravance, C., Garner, D., Baumber, J., & Ball, B. (2000). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, *53*(9), 1691–1703. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00308-3)
- Hansen, P. J. (2011). Use of a Hemacytometer. *Animal Sciences*, 11–12.
- Harder, R. R., Lunstra, D. D., & Johnson, R. K. (1995). Growth of testes and testicular morphology after eight generations of selection for increased predicted weight of testes at 150 days of age in boars. *Journal of Animal Science*, *73*(8), 2186–2192. <https://doi.org/10.2527/1995.7382186x>
- Hernández, P. J. E., Fernández, R. F., Rodríguez, S. J. L., Juárez, R. E., Soto, M. Y. G., & García, R. A. D. (2012). Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Revista de Salud Animal*, *34*(2), 78–83.
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). <The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry.pdf>. *Clinical Chemistry*, *48*(10), 1819–1827.
- Hidalgo, M., & Dorado, J. (2009). Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Ruminant Research*, *87*(1–3), 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.006>
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, *53*(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Ihukwumere, F. C., & Okere, C. (1990). Effects of Frequent Ejaculations on Semen Characteristics of Nigerian Yankasa Rams. *Small Ruminant Research*, *3*(1), 77–83.
- Jayme Barbedo. (2013). *Automatic Object Counting in Neubauer Chambers*. September 2013. <https://doi.org/10.14209/sbrt.2013.34>

- Jha, P. K., Golam Shahi Alam, M., Abdullah Al Mansur, M., Taohidul Islam, M., & Yeasmin Bari, F. (2018). Selection of breeding rams by evaluating semen quality. *Journal of Applied Animal Science*, 11(1), 9–20.
- Jha, P. K., Shahi, G., Abdullah, A., & Mansur, A. (2018). *Selection of breeding rams by evaluating semen quality*. January.
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-álvarez, O., Maroto-morales, A., Olmo, E., Pérez-Guzmán, M. D., Bisbal, A., Fernández-Santos, M., Garde, J., & Soler, A. (2012). Effect of semen collection method ( artificial vagina vs . electroejaculation ), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science*, 132(1–2), 88–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.04.005>
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., & Garde, J. J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 167, 103–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
- Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2011). Seminal Plasma : An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(October), 536–551. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583>
- Karagiannidis, A., Karatzas, G., & Varsakeli, S. (2000). Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks and raised in Greece. *Theriogenology*, 53(6), 1285–1293.
- 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(1–2), 125–130. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(99\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(99)00143-1)
- Kendall, L. O. N. V, & Riley, L. K. (2002). *Flow Cytometry Method* : 41(5), 2002.
- Kershaw, C. M., Khalid, M., McGowan, M. R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., & Scaramuzzi, R. J. (2005). The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64(5), 1225–1235. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.017>
- Keskintepe, L., & Eroglu, A. (2014). Freeze-Drying of Mammalian Sperm. In *Methods in molecular biology* (Vol. 1257, Issue 1). <https://doi.org/10.1385/0896032965>
- Lasiene, K., Gedrimas, V., Vitkus, A., Gliniskyte, S., Lasys, V., Valanciute, A., & Sienkiewicz, W. (2013). Evaluation of morphological criteria of sperm quality before in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 773–785. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0112>
- Lichtman, J. W., & Conchello, J. (2005). Fluorescence Microscopy. *Nature Methods*, 2(December), 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>
- Lightfoottt, R. J., & Salamont, S. (1969). Freezing Ram Spermatozoa By the Pellet Method. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(6), 1547–1560.
- Lipenský, J., Lustyková, A., Roztok, M., Václavková, E., Přinosilová, P., Šípek, J., Kunetková, M., & Kopecká, V. (2014). Základy hodnocení morfologického obrazu spermií kance. In □□□□□□: Vol. □□□□ □ (Issue □□□□□□). □□□□□□□□.
- Lopez Saez, A., Ortiz, N., Gallego, L., & Garde, J. . (2002). Liquid Storage (5 0 C) of Ram Semen in Different Diluents . *Archives of Andrology*, 44(2), 155–164.  
<https://doi.org/10.1080/014850100262335>
- Luño, V., Gil, L., Martínez, F., González, N., Malo, C., & Olaciregui, M. (2014). Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 72–81. <https://doi.org/10.1111/rda.12396>
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2018). Spermatozoa Cryopreservation : *Biopreservation and Biobanking*, 00(November), 1–11.



<https://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>

- Magistrini, M., Guitton, E., Levern, Y., Nicolle, J. C., Vidament, M., Kerboeut, D., & Palmer, E. (1997). New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology*, *48*(7), 1229–1235.
- 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*(1), 26. <https://doi.org/10.4314/sajas.v44i1.4>
- Malo, A. F., Soler, A. J., Roldan, E. R. ., Gomendio, M., Lang-Lenton, B., & Garde, J. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology Letters*, *2*(2), 246–249. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0449>
- Mickelsen, W. D., Paisley, L. G., & Dahmen, J. J. (1981). The effect of scrotal circumference, sperm motility and morphology in the ram on conception rates and lambing percentage in the ewe. *Theriogenology*, *16*(1), 53–59.
- Mieusset, R., Casares, P. Q., Partida, L. G. S., Sowerbutts, S. F., Zupp, J. L., & Setchell, B. P. (2004). Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Reproduction*, *94*(2), 337–343. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0940337>
- Molinia, F. C., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (1994). Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, *42*(5), 849–858. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90453-P](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90453-P)
- Morrier, A., Castonguay, F., & Bailey, J. L. (2002). Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science*, *82*(3), 347–356. <https://doi.org/10.4141/A01-045>
- Muiño-Blanco, T., Fernández-Juan, M., Cebrián-Pérez, J. A., Forcada, F., Abecia, A., & Cardozo, J. A. (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, *66*(4), 841–850. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.058>
- Nicolae, D., Stela, Z., Dragomir, C., & Hortanse, A. A. (2014). Effect of thawing time and temperature variation on the quality of frozenthawed ram semen. *Romanian Biotechnological Letters*, *19*(1), 8935–8940.
- Nordstoga, A., Söderquist, L., Ådnøy, T., & Paulenz, H. (2009). Effect of different packages and freezing/thawing protocols on fertility of ram semen. *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(3), 527–531. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01284.x>
- Ntemka, A., Tsakmakidis, I. A., Kiossis, E., Milovanovic, A., & Boscós, C. M. (2018). Current status and advances in ram semen cryopreservation. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *69*(2), 911–924. <https://doi.org/10.12681/jhvms.18014>
- Nunes, J. F., Corteel, J.-M., Combarnous, Y., Baril, G., & Leboeuf, B. (2007). Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction Nutrition Développement*, *22*(4), 611–620. <https://doi.org/10.1051/rnd:19820503>
- O'Meara, C. M., Hanrahan, J. P., Donovan, A., Fair, S., Rizos, D., Wade, M., Boland, M. P., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2005). Relationship between in vitro fertilisation of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, *64*(8), 1797–1808. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.009>
- Ogundele, O. M., Adekeye, A. O., Adeniyi, P. A., Ogedengbe, O. O., Enye, L. A., Saheed, S., Omotosho, D. R., & Anglaises, A. E. (2013). Basic Principles of Fluorescence Microscopy. *World J Young Researchers*, *3*(January), 17–21.
- Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., & Yáñez, J. L. (2013). Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.014>

- Paulenz, H., Ådnøy, T., & Söderquist, L. (2007). Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-26>
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A., Gulbrandsen, B., & Andersen Berg, K. (2004). Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology*, 61(9), 1719–1727. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.001>
- Peña, F. (2015). Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. *Animal Reproduction*, 12(3), 351–355.
- Pezzanite, L., Bridges, D. A., Neary, D. M., & Hutchens, T. (2010). Breeding Soundness Examination of Rams and Bucks. *Purdue Extension*, 2, 1–4. <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/as/as-599-w.pdf>
- Pontbriand, D., Howard, J. G., Schiewe, M. C., Stuart, L. D., & Wildt, D. E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26(4), 341–354. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(89\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(89)90058-8)
- 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(2), 96–103. <https://doi.org/10.2478/sab-2019-0014>
- Purdy, P. H. (2006). Review article A review on goat sperm cryopreservation & *Small Ruminant Research*, 63(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015>
- Qureshi, M. S., Khan, D., Mushtaq, A., & Afridi, S. S. (2013). Effect of extenders, postdilution intervals, and seasons on semen quality in dairy goats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37(2), 147–152. <https://doi.org/10.3906/vet-1110-24>
- Robbins, R. K., Saacke, R. G., & Chandler, P. T. (1976). Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.2527/jas1976.421145x>
- Roof, D. J., Bowley, S., Price, L. L., & Matsas, D. J. (2012). Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, 77(2), 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.015>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3–4), 185–249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I)
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Sanderson, J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, D. (2014). Fluorescence Microscopy. *Fluorescence Microscopy*, November, 85–132. <https://doi.org/10.1002/9783527687732.ch3>
- Santolaria, P., Palacin, I., & Yániz, J. (2011). Management factors affecting fertility in sheep. In *Artificial insemination in farm animal* (Issue 11, pp. 167–190). <https://doi.org/10.5772/18013>
- Savvulidi, F. G., Ptacek, M., Malkova, A., Beranek, J., & Stadnik, L. (2021). Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science*, 66(No. 2), 55–64. <https://doi.org/10.17221/226/2020-cjas>
- Schmid, I. (2012). How to develop a Standard Operating Procedure for sorting unfixed cells. *Methods*, 57(3), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.02.002>
- Shahba, M. I., El-Sheshtawy, R. I., El-Azab, A. S. I., Abdel-Ghaffar, A. E., Ziada, M. S., & Zaky, A. A. (2016). The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal*

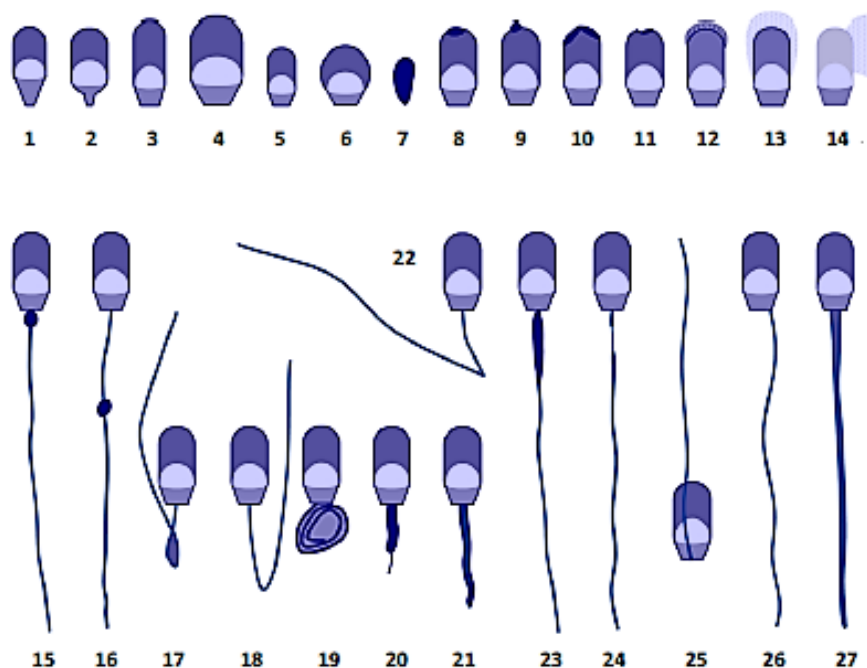
- of Reproduction*, 5(6), 524–535. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.11.002>
- Shahsavani, M. B., & Yousefi, R. (2018). *Fluorescence Microscopy*. June, 2–3.
- Slabbert, M., du Plessis, S. S., & Huyser, C. (2015). Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, 47(5), 594–599. <https://doi.org/10.1111/and.12307>
- Smith, N. A., McAuliffe, F. M., Quinn, K., Lonergan, P., & Evans, A. C. O. (2010). The negative effects of a short period of maternal undernutrition at conception on the glucose-insulin system of offspring in sheep. *Animal Reproduction Science*, 121(1–2), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.05.001>
- Söderquist, L., Madrid-Bury, N., & Rodriguez-Martinez, H. (1997). Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, 48(7), 1115–1125. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00344-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00344-0)
- Soltanpour, F., & Moghaddam, G. (2014). Effect of diluents on storage of ram semen. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(6), 179–183.
- Solti, L., Jávora, A., Vass, N., Amiridis, G., Kulcsár, M., Cseh, S., & Faigl, V. (2012). Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115–129. <https://doi.org/10.1556/avet.2012.010>
- Stafford, K. J. (1995). Electroejaculation : a welfare issue ? *Surveillance*, 22(2), 15–17.
- Štolc, L., Ježková, A., Stádník, L., & Louda, F. (2009). *Effect of rams ' breeds and ages on quantitative and qualitative traits of their sperm*. ResearchGate.
- Stuart, C. C., Vaughan, J. L., Kershaw, C. M., de Graaf, S. P., & Bathgate, R. (2019). Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49203-z>
- Tulsiani, D. R. P., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., & Pereira, B. M. J. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell Research*, 240(2), 151–164. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.3943>
- Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, T. M., Gandini, G., & Pizzi, F. (2016). Relationship between body weight, sexual secondary traits and epididymal semen quality in the Alpine goat. *Small Ruminant Research*, 135(February), 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.017>
- Watson, P. F., & Martin, I. C. A. (1975). Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 28(2), 153–159. <https://doi.org/10.1071/B19750153>
- Widiyono, I., Sarmin, Putro, P. P., & Astuti, P. (2017). Effects of nutritional status on semen characteristics of Kacang goats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16(9), 678–683. <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.678.683>
- Wulster-Radcliffe, M. C., Williams, M. A., Stellflug, J. N., & Lewis, G. S. (2001). Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science*, 79(12), 2964–2967. <https://doi.org/10.2527/2001.79122964x>
- Zubair, M., Ali, M., Ahmad, M., Sajid, S. M., Ahmad, I., Gul, S. T., & Sajid, M. (2015). Effect of Selenium and Vitamin E on cryopreservation of semen and reproductive performance of animals (a review). ~ 82 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(1), 82–86.

## 10 Seznam použitých zkratek a symbolů

- AV – umělá vagína
- CASA – počítačem asistovaná analýza spermií
- VCL – křivočará rychlost
- VAP – průměrná rychlost
- VSL – přímočará rychlost
- ALH – amplituda laterárního posunu hlavy
- LIN – linearita křivočaré dráhy
- STR – přímota dráhy
- BCF – kmtočtová frekvence
- IFC – zobrazovací průtoková cytometrie
- FACS – fluorescenčně aktivovaný buněčný tříděč
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- EH – ethidium homodimer
- PI – propidium jodid
- LAR – neobarvená oblast akrozomu a postakrozomální oblast
- LAI – růžový akrozom a neobarvené postakrozomální oblast
- DAR – neobarvený akrozom a tmavá postakrozomální oblast
- AI – umělá inseminace
- ICSI – intracytoplazmatická injekce spermií
- M – ředidlo, odstředěné mléko
- TE – ředidlo, TestT
- TR – ředidlo, Tris – trehalosa

# 11 Samostatné přílohy

## 11.1 Vzorník možných abnormalit vyskytujících se u spermii (Lipenský et al., 2014)



- |  |   |
|--|---|
| 1. Změněná báze - zúžená                     | 20. Hypogeneze bičíku                                 |
| 2. Změněná báze - zúžená                     | 21. Hypogeneze bičíku                                 |
| 3. Zúžená hlavička                           | 22. Zlomený bičík                                     |
| 4. Makrocefalie (gigantická hlavička)        | 23. Ztluštělá spojovací část                          |
| 5. Mikrocefalie (zmenšená hlavička)          | 24. Parciální absence mitochondriální spirály         |
| 6. Kulovitá hlavička                         | 25. Abnormální inzerce bičíku – retroaxiální nasazení |
| 7. Amorfní hlavička                          | 26. Abnormální inzerce bičíku – abaxiální nasazení    |
| 8. Perzistující akroblast                    | 27. Zdvojený bičík                                    |
| 9. Perzistující akroblast                    |   |
| 10. Kondenzace akrozomu                      |   |
| 11. Defekt akrozomu                          |   |
| 12. Zbobjtnání akrozomu - počínající         |   |
| 13. Zbobjtnání akrozomu - pokročilé          |   |
| 14. Uvolnění akrozomu                        |   |
| 15. Proximální cytoplazmatická kapénka       |   |
| 16. Distální cytoplazmatická kapénka         |   |
| 17. Ohnutý bičík o distální kapénku (smyčka) |   |
| 18. Ohnutý bičík                             |   |
| 19. Primární svinutí bičíku - Dag defekt     |   |

## 11.2 Použité modely

### 11.2.1 Životaschopnost spermií

**Tabulka č.12:** Popis modelu pro životaschopnost spermií

		R2	P-model	Odběrový den	Použitá metoda přidavku glycerolu	Interakce odběrového dne a použité metody	bPAIeq
Ekvilibrované vzorky	PAI	0,98	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	
Ihned po rozmrazení	PAI	0,95	<,0001	<,0001	0,4171	<,0001	0,248
1 hodinu po rozmrazení	PAI	0,97	<,0001	<,0001	0,0008	<,0001	0,716
2 hodiny po rozmrazení	PAI	0,97	<,0001	<,0001	0,0034	<,0001	0,053

**Zkratky:** PAI-životaschopnost; r2-koeficient spolehlivosti; b-korekce na výchozí stav po ekvilibraci

### 11.2.2 Poškození cytoplazmatické membrány, poškození akrozomu, nízká mitochondriální aktivita

**Tabulka č. 13:** Popis modelu pro poškození cytoplazmatické membrány, poškození akrozomu, nízkou mitochondriální aktivitu

		R2	P-model	Odběrový den	Použitá metoda přidavku glycerolu	Interakce odběrového dne a použité metody	bPMeq	bACReq	bLMTReq
Ekvilibrované vzorky	PM	0,978	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001			
	ACR	0,924	<,0001	<,0001	<,0001	0,05			
	LMTR	0,981	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001			
Ihned po rozmrazení	PM	0,943	<,0001	<,0001	0,1961	<,0001	0,226		
	ACR	0,884	<,0001	<,0001	0,0386	0,1316		0,007	
	LMTR	0,855	<,0001	<,0001	0,0152	0,99			0,904
1 hodinu po rozmrazení	PM	0,972	<,0001	<,0001	0,0204	<,0001	0,588		
	ACR	0,871	<,0001	<,0001	<,0001	0,0058		0,667	
	LMTR	0,901	<,0001	<,0001	<,0001	0,0183			0,655
2 hodiny po rozmrazení	PM	0,972	<,0001	<,0001	0,0058	<,0001	0,09		
	ACR	0,769	<,0001	<,0001	0,046	0,0395		0,485	
	LMTR	0,827	<,0001	<,0001	0,0264	<,0001			0,919

**Zkratky:** PM – poškození cytoplazmatické membrány; ACR – poškození akrozomu; LMTR – nízká mitochondriální aktivita; r2-koeficient spolehlivosti; b-korekce na počáteční stav po ekvilibraci

### 11.3 Interakce mezi odběrovými dny a použitými variantami přidavku glycerolu

**Tabulka č. 14:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u ekvilibrovaných vzorků

Den	Varianta	Životaschopnost spermií (%)	Průkaznost
1	1	71,77 ± 1,35	a
	2	67,47 ± 1,35	a
2	1	56,31 ± 1,35	a
	2	32,46 ± 1,35	b
3	1	73,29 ± 1,35	a
	2	52,45 ± 1,35	b
4	1	71,09 ± 1,35	a
	2	58,87 ± 1,35	b
5	1	55,35 ± 1,35	a
	2	52,59 ± 1,35	a
6	1	81,29 ± 1,67	a
	2	75,69 ± 1,67	a
7	1	59,05 ± 1,35	a
	2	43,93 ± 1,35	b
8	1	73,62 ± 1,67	a
	2	62,27 ± 1,35	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 15:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků ihned po rozmrazení

Den	Varianta	Životaschopnost spermií (%)	Průkaznost
1	1	25,48 ± 1,63	a
	2	23,54 ± 1,25	a
2	1	9,41 ± 1,22	a
	2	23,54 ± 3,85	b
3	1	32,91 ± 1,78	a
	2	21,06 ± 1,55	b
4	1	28,22 ± 1,56	a
	2	19,35 ± 1,07	b
5	1	25,21 ± 1,29	a
	2	14,14 ± 1,54	b
6	1	32,01 ± 2,67	a
	2	31,87 ± 2,07	a
7	1	28,50 ± 1,07	a
	2	26,75 ± 2,48	a
8	1	20,78 ± 1,83	a
	2	31,73 ± 1,01	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 16:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 1 hodinu po rozmrazení

Den	Varianta	Životaschopnost spermií (%)	Průkaznost
1	1	71,77 ± 1,35	a
	2	67,47 ± 1,35	a
2	1	56,31 ± 1,35	a
	2	32,46 ± 1,35	b
3	1	73,29 ± 1,35	a
	2	52,45 ± 1,35	b
4	1	71,09 ± 1,35	a
	2	58,87 ± 1,35	b
5	1	55,35 ± 1,35	a
	2	52,59 ± 1,35	a
6	1	81,29 ± 1,67	a
	2	75,69 ± 1,67	a
7	1	59,05 ± 1,35	a
	2	43,93 ± 1,35	b
8	1	73,62 ± 1,67	a
	2	62,27 ± 1,35	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 17:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 2 hodiny po rozmrazení

Den	Varianta	Životaschopnost spermií (%)	Průkaznost
1	1	14,4 ± 1,61	a
	2	11,75 ± 1,23	a
2	1	4,13 ± 1,21	a
	2	22,16 ± 3,81	b
3	1	23,13 ± 1,76	a
	2	19,12 ± 1,54	a
4	1	12,8 ± 1,54	a
	2	12,17 ± 1,06	a
5	1	2,63 ± 1,28	a
	2	5,01 ± 1,52	a
6	1	23,77 ± 2,64	a
	2	33,62 ± 2,05	b
7	1	15,83 ± 1,05	a
	2	18,73 ± 2,45	a
8	1	16,51 ± 1,81	a
	2	30,89 ± 1,00	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů



**Tabulka č. 18:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků po ekvilibraci

Den	Varianta	Poškození plazmatické membrány (%)	Průkaznost
1	1	27,93 ± 1,31	a
	2	32,17 ± 1,31	a
2	1	41,98 ± 1,31	a
	2	67,21 ± 1,31	b
3	1	26,55 ± 1,31	a
	2	47,43 ± 1,31	b
4	1	27,71 ± 1,31	a
	2	40,71 ± 1,31	b
5	1	44,54 ± 1,31	a
	2	47,35 ± 1,31	a
6	1	18,45 ± 1,14	a
	2	24,13 ± 1,14	a
7	1	39,37 ± 1,31	a
	2	52,97 ± 1,31	b
8	1	23,06 ± 1,14	a
	2	33,79 ± 1,31	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 19:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků ihned po rozmrazení

Den	Varianta	Poškození plazmatické membrány (%)	Průkaznost
1	1	73,35 ± 1,65	a
	2	76,26 ± 1,26	a
2	1	90,16 ± 1,24	a
	2	76,95 ± 4,23	a
3	1	66,55 ± 1,80	a
	2	79,22 ± 1,75	b
4	1	70,38 ± 1,67	a
	2	80,61 ± 1,16	b
5	1	74,30 ± 1,46	a
	2	86,08 ± 1,74	b
6	1	66,55 ± 2,76	a
	2	67,74 ± 2,11	a
7	1	69,96 ± 1,10	a
	2	72,62 ± 2,40	a
8	1	77,52 ± 2,18	a
	2	67,42 ± 1,16	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 20:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 1 hodinu po rozmrazení

Den	Varianta	Poškození plazmatické membrány (%)	Průkaznost
1	1	78,34 ± 1,49	a
	2	88,21 ± 1,14	b
2	1	90,91 ± 1,12	a
	2	77,64 ± 3,83	b
3	1	71,59 ± 1,63	a
	2	75,49 ± 1,58	a
4	1	82,57 ± 1,51	a
	2	81,85 ± 1,05	a
5	1	92,73 ± 1,32	a
	2	90,53 ± 1,58	a
6	1	76,50 ± 2,49	a
	2	67,24 ± 1,90	b
7	1	74,37 ± 0,99	a
	2	70,45 ± 2,17	a
8	1	83,65 ± 1,97	a
	2	68,90 ± 1,05	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 21:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 2 hodiny po rozmrazení

Den	Varianta	Poškození plazmatické membrány (%)	Průkaznost
1	1	84,89 ± 1,60	a
	2	88,40 ± 1,22	a
2	1	95,44 ± 1,20	a
	2	76,67 ± 4,10	b
3	1	76,92 ± 1,74	a
	2	80,76 ± 1,70	a
4	1	85,60 ± 1,62	a
	2	86,72 ± 1,12	a
5	1	97,01 ± 1,41	a
	2	94,55 ± 1,69	a
6	1	74,76 ± 2,67	a
	2	65,79 ± 2,04	b
7	1	82,58 ± 1,06	a
	2	79,60 ± 2,32	a
8	1	82,58 ± 2,11	a
	2	67,89 ± 1,12	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 22:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků po ekvilibraci

Den	Varianta	Poškození akrozomu (%)	Průkaznost
1	1	11,58 ± 1,49	a
	2	16,31 ± 1,49	a
2	1	26,65 ± 1,49	a
	2	33,11 ± 1,49	a
3	1	11,46 ± 1,49	a
	2	12,37 ± 1,49	a
4	1	16,76 ± 1,49	a
	2	21,23 ± 1,49	a
5	1	11,09 ± 1,49	a
	2	8,06 ± 1,49	a
6	1	5,69 ± 1,29	a
	2	5,09 ± 1,29	a
7	1	20,48 ± 1,49	a
	2	23,62 ± 1,49	a
8	1	14,22 ± 1,29	a
	2	15,43 ± 1,49	a

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 23:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků ihned po rozmrazení

Den	Varianta	Poškození akrozomu (%)	Průkaznost
1	1	48,03 ± 3,34	a
	2	43,52 ± 3,01	a
2	1	35,22 ± 4,79	a
	2	18,89 ± 6,66	a
3	1	19,87 ± 3,36	a
	2	14,67 ± 3,23	a
4	1	19,04 ± 3,03	a
	2	15,83 ± 3,54	a
5	1	21,74 ± 3,41	a
	2	28,39 ± 4,01	a
6	1	23,09 ± 4,58	a
	2	23,16 ± 4,77	a
7	1	19,29 ± 3,41	a
	2	16,51 ± 4,03	a
8	1	21,12 ± 3,09	a
	2	17,36 ± 3,01	a

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 24:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 1 hodinu po rozmrazení

Den	Varianta	Poškození akrozomu (%)	Průkaznost
1	1	48,16 ± 3,83	a
	2	53,84 ± 3,46	a
2	1	18,38 ± 5,50	a
	2	14,17 ± 7,65	a
3	1	17,90 ± 3,86	a
	2	10,88 ± 3,71	a
4	1	37,47 ± 3,48	a
	2	28,33 ± 4,07	a
5	1	43,25 ± 3,92	a
	2	27,07 ± 4,61	a
6	1	46,34 ± 5,26	a
	2	18,74 ± 5,48	b
7	1	32,29 ± 3,92	a
	2	24,96 ± 4,63	a
8	1	37,80 ± 3,55	a
	2	19,50 ± 3,45	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 25:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 2 hodiny po rozmrazení

Den	Varianta	Poškození akrozomu (%)	Průkaznost
1	1	46,79 ± 5,28	a
	2	54,21 ± 4,77	a
2	1	23,86 ± 7,59	a
	2	38,84 ± 10,55	a
3	1	15,55 ± 5,31	a
	2	8,47 ± 5,11	a
4	1	42,64 ± 4,79	a
	2	30,88 ± 5,61	a
5	1	32,89 ± 5,41	a
	2	20,29 ± 6,35	a
6	1	32,97 ± 7,25	a
	2	13,48 ± 7,55	a
7	1	42,90 ± 5,40	a
	2	30,60 ± 6,39	a
8	1	21,95 ± 4,89	a
	2	18,49 ± 4,77	a

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 26:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků po ekvilibraci

Den	Varianta	Nízká mitochondriální aktivita (%)	Průkaznost
1	1	12,84 ± 2,77	a
	2	64,50 ± 2,77	b
2	1	79,26 ± 2,77	a
	2	81,14 ± 2,77	a
3	1	8,73 ± 2,77	a
	2	44,45 ± 2,77	b
4	1	76,94 ± 2,77	a
	2	12,3 ± 2,77	b
5	1	71,53 ± 2,77	a
	2	68,82 ± 2,77	a
6	1	10,69 ± 2,40	a
	2	74,02 ± 2,40	b
7	1	18,24 ± 2,77	a
	2	22,21 ± 2,77	a
8	1	11,91 ± 2,40	a
	2	30,82 ± 2,77	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 27:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků ihned po rozmrazení

Den	Varianta	Nízká mitochondriální aktivita (%)	Průkaznost
1	1	61,41 ± 9,53	a
	2	48,61 ± 7,41	a
2	1	47,80 ± 11,00	a
	2	35,24 ± 11,49	a
3	1	62,82 ± 10,56	a
	2	56,68 ± 4,42	a
4	1	60,87 ± 10,41	a
	2	48,48 ± 9,66	a
5	1	92,04 ± 9,07	a
	2	80,71 ± 8,42	a
6	1	66,07 ± 10,17	a
	2	52,48 ± 10,24	a
7	1	49,89 ± 8,22	a
	2	40,61 ± 7,31	a
8	1	79,98 ± 9,82	a
	2	66,53 ± 5,58	a

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 28:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 1 hodinu po rozmrazení

Den	Varianta	Nízká mitochondriální aktivita (%)	Průkaznost
1	1	86,89 ± 5,28	a
	2	70,84 ± 4,11	a
2	1	78,69 ± 6,10	a
	2	70,57 ± 6,36	a
3	1	87,30 ± 5,85	a
	2	73,58 ± 2,45	a
4	1	94,12 ± 5,77	a
	2	78,99 ± 5,35	a
5	1	97,10 ± 5,02	a
	2	94,12 ± 4,66	a
6	1	89,06 ± 5,63	a
	2	75,66 ± 5,67	a
7	1	83,43 ± 4,56	a
	2	62,16 ± 4,05	b
8	1	88,54 ± 5,44	a
	2	69,03 ± 3,09	b

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů

**Tabulka č. 29:** Interakce mezi odběrovými dny a variantou přidavku glycerolu u vzorků 2 hodiny po rozmrazení

Den	Varianta	Nízká mitochondriální aktivita (%)	Průkaznost
1	1	91,62 ± 4,37	a
	2	70,52 ± 3,40	a
2	1	83,03 ± 5,04	a
	2	88,58 ± 5,26	a
3	1	90,07 ± 4,84	a
	2	80,87 ± 2,02	a
4	1	93,03 ± 4,77	a
	2	89,29 ± 4,43	a
5	1	80,74 ± 4,16	a
	2	90,66 ± 3,86	a
6	1	92,47 ± 4,66	a
	2	85,58 ± 4,69	a
7	1	89,92 ± 3,77	a
	2	79,41 ± 3,35	a
8	1	91,51 ± 4,50	a
	2	89,40 ± 2,56	a

**Vysvětlivky:** varianta 1 – tradiční způsob přidavku glycerolu; varianta 2 – metoda pozdějšího přidavku glycerolu; a-b: rozdílná písmena prezentují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly se týkají variant v rámci odběrových dnů