

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Současné možnosti kryokonzervace psího ejakulátu**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Zdeňka Vorlíčková**

**Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.**

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Současné možnosti kryokonzervace psího ejakulátu“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. dubna 2016

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D., za jeho vynaložený čas na konzultace, jeho vstřícnost, pomoc a vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Michaele Součkové za podporu, PhDr. Milanovi Vodičkovi za korekturu a v neposlední řadě i mé rodině.

# Současné možnosti kryokonzervace psího ejakulátu

## Souhrn

Inseminace psů čerstvým spermatem je v současném chovatelství poměrně běžnou záležitostí. S rozvojem kynologie stoupá v posledních letech zájem odborné i laické veřejnosti o použití kryokonzervovaného spermatu, ovšem pro zachování potřebných vlastností spermií vyžaduje kryokonzervace vhodné technologické postupy.

Základním principem kryokonzervace biologických materiálů je jejich hluboké zmrazení, čili převedení vody, kterou obsahují, z kapalného skupenství do tuhého. Hlavní kroky zmrazení psích spermií jsou: centrifugace, ředění, ekvilibrace, balení a zmrazování.

Cílem centrifugace je odstranění přebytku prostatické tekutiny, která má negativní vliv na pohyblivost a vitalitu zmrazených a následně rozmrazených spermií. Dále pak standardizovat naředění spermatu do řízené konečné koncentrace spermatu.

Sperma se po centrifugaci naředí vhodným ředidlem, povětšinou se jedná o žloutkokocitrátová ředidla. Součástí ředidel jsou nezbytné kryoprotektanty (glycerol, žloutek) a další komponenty, jako jsou mléko, bovinní sérový albumin, polyvinylalkohol a liposomy. Ty v ředidle poskytnou určitou ochranu pro spermie a minimalizují nepříznivé účinky kryokonzervace.

Před zmrazením se zředěné sperma ochladí na 4 °C a udržuje se v této teplotě proměnlivou dobu v závislosti na použitém protokolu (1 – 4 hodiny). Tento proces se nazývá ekvilibrace a umožňuje vyvinutí vyšší odolnosti spermie vůči chladovému šoku.

V současné době je nejběžněji zmrazené psí sperma baleno do pejet, protože proti jiným metodám balení mají několik výhod. Používají se pejety o objemu 0,25 ml nebo 0,5 ml, je možné využít i aluminiových tub o objemu 5 ml.

Psí sperma je nejběžněji mrazeno v parách tekutého dusíku v polystyrenové krabici a následně se uchovává v kapalném dusíku při teplotě -196 °C. I když zmrazení v polystyrenovém boxu se stále používá v několika variantách, je možné použít počítačem podporované mrazicí zařízení.

Kolísání teploty, především její zvyšování během dlouhodobého uskladňování spermatu, negativně ovlivňuje jeho kvalitu. Pro optimální přežití buněk je potřeba zvolit správnou rychlost pro zmrazování, jež musí být spárováno s vhodnou rychlostí rozmrazování.

**Klíčová slova:** kryokonzervace, pes, zmrazení, ředidlo, centrifugace, kryoprotektanty

# **Current options for cryopreservation of canine semen**

## **Summary**

The insemination of dogs using the fresh semen is currently a fairly common method in breeding. The interest of both professional and lay public in the use of cryopreserved sperm ascends with the development of dog breeding. Cryopreservation requires appropriate technological procedures to maintain the necessary characteristics of sperm, however.

The basic principle of cryopreservation of biological materials is deep freezing i. e. changing of containing water from the liquid to the solid phase. The basic steps of freezing of dog sperm are: centrifugation, dilution, equilibration, packaging and freezing.

The aim of the centrifugation is to remove abundant prostatic fluid, what has a negative effect on the mobility and vitality of frozen and subsequently thawed sperm. Furthermore it ensures standard semen dilution to reach the controlled final concentration of semen.

After the centrifugation, semen is diluted with a suitable diluent, mostly yolk-citrate diluents. Diluents contain cryoprotectants (glycerol, egg yolk) and other components, such as milk, bovine serum albumin, polyvinyl alcohol, and liposomes. The substances contained in diluents provide certain protection of the sperm and minimize the adverse effects of cryopreservation.

The diluted semen is cooled to 4 °C and maintained at this temperature, for a variable period before freezing, depending on the protocol (1-4 hours). This process is called the equilibration and allows the sperm to develop a higher resistance to cold shock.

Packaging sperm in straws is the mostly using packaging method of frozen canine semen, because they provide several advantages comparing to other methods of packaging. Straws of 0,25 ml or 0,5 ml are used or aluminium tubes of 5 ml may be used as well.

Canine semen is most commonly frozen in the vapour of liquid nitrogen in a polystyrene box and then stored in liquid nitrogen at -196 °C. Although freezing in a polystyrene box is still used in several variants, it is possible to use computer-aided freezing equipment.

Temperature fluctuations particularly increases negatively affects its quality of sperm during the long-term storage. Optimal cell survival requires the right speed of freezing, paired with an appropriate thawing speed.

**Key words:** cryopreservation, dog, freezing, diluent, centrifugation, cryoprotectants

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Anatomie pohlavních orgánů.....</b>	<b>2</b>
	<b>3.1 Samčí pohlavní ústrojí.....</b>	<b>2</b>
	3.1.1 Spermatoogeneze .....	4
	3.1.2 Stavba spermie .....	5
	3.1.3 Semeno.....	6
	<b>3.2 Reprodukce u samců.....</b>	<b>7</b>
	Pohlavní dospívání – puberta .....	7
	3.2.1 Přirozená plemenitba .....	7
	3.2.2 Asistovaná reprodukce.....	8
	3.2.2.1 Umělá inseminace klasická .....	9
	3.2.2.2 Umělá inseminace chlazeným semenem .....	9
	3.2.2.3 Umělá inseminace mrazeným semenem .....	9
	<b>3.3 Odběr spermatu .....</b>	<b>9</b>
	3.3.1 Základní metody vyšetřování semene a hodnocení .....	12
	3.3.2 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu .....	15
<b>4</b>	<b>Způsoby uchování spermíí .....</b>	<b>16</b>
	<b>4.1 Krátkodobá konzervace.....</b>	<b>16</b>
	<b>4.2 Dlouhodobá konzervace.....</b>	<b>17</b>
	4.2.1 Centrifugace.....	18
	4.2.2 Ředění ejakulátu pro kryokonzervaci .....	20
	4.2.3 Ekvilibrace .....	24
	4.2.4 Balení .....	25
	<b>4.3 Hluboké zmrazování psího spermatu.....</b>	<b>25</b>
	4.3.1 Pomalé zmrazování psího spermatu .....	26
	4.3.2 Rychlé zmrazování semene .....	26
	4.3.3 Ultra-rychlé zmrazování - vitifikace .....	27
	<b>4.4 Rychlost rozmrazení .....</b>	<b>28</b>
	<b>4.5 Hluboce zmrazené psí sperma a transport .....</b>	<b>32</b>
	4.5.1 Dovoz semene do České republiky.....	35
	4.5.2 Vývoz semene z České republiky .....	36
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>38</b>

# 1 Úvod

Jedním ze základních předpokladů úspěšné kynologické chovatelské práce je zvládnutí reprodukce psů.

U psa hovoříme o reprodukci přirozené nebo asistované. Asistovaná reprodukce zahrnuje metody například cíleného ovlivňování pohlavní aktivity, časování krytí, umělého oplození, zabránění nebo umělého přerušení gravidity a v neposlední řadě také umělou inseminaci.

Umělá inseminace je velmi účinný a cílevědomý rozmnožovací postup, který vychází z vědeckých poznatků biologie a fyziologie reprodukce. Je jednou z prvních metod řízené reprodukce a plní více než 50 let na celém světě velmi efektivně svou úlohu pro zlepšování genofondu užitkových vlastností zvířat.

První oplodnění z kryokonzervovaného psího spermatu ze zmrazeného spermatu v peletě na suchém ledu bylo provedeno před více než 30 lety. Nedílnou součástí inseminace je výroba kvalitní inseminační dávky. I když se psí ejakulát konzervuje za účelem výroby inseminační dávky řadu let, neustále se hledají nové možnosti, jak tento postup zefektivnit. Na kvalitu inseminační dávky má vliv řada faktorů.

## 2 Cíl práce

Cílem této práce je vypracovat literární rešerši shrnující nejnovější poznatky o kryokonzervaci psího ejakulátu.

### 3 Anatomie pohlavních orgánů

Pohlavní ústrojí je soubor orgánů umožňující reprodukci, tedy rozmnožování a zachování druhu (Červený, 2011). Rozeznáváme samčí a samičí pohlavní ústrojí, jejich hlavními funkcemi jsou: produkce pohlavních buněk a hormonů, zprostředkování spojení těchto buněk (oplození), k němuž dochází pohlavním stykem (pářením), a umožnění vývoje nového jedince v těle matky (Červený a kol., 1999). Rozdílné pohlavní orgány jsou základem tzv. pohlavního dimorfismu psa a feny, který je umožňuje rozlišit na první pohled (Procházka, 1989). Pohlavní ústrojí se vyvíjí z indiferentních základů, které se od konce embryonálního období rozlišují na orgány samčí a samičí, četné útvary jsou homologické (Červený a kol., 1999).

#### 3.1 Samčí pohlavní ústrojí

Pohlavní orgány samčí se skládají z pohlavních žláz, vývodných cest, přídatných pohlavních žláz a kopulačních orgánů (Kozumplík, 1992).

Zevní samčí pohlavní orgány jsou patrné na povrchu těla. Jsou to pyj (penis) skrytý v předkožce a šourek, který slouží jako povrchový (ochranný) obal pro samčí pohlavní žlázy varlata, a proximální oddíl vývodných pohlavních cest nadvarlata a chámovody (Červený, 2011).

Varle je párový orgán, ve kterém se formují samčí pohlavní buňky spermie a tvoří se samčí pohlavní hormony (testosteron, androgeny). Má ovoidní tvar, hladký povrch a je ze stran zploštělé (Červený, 2011). Varlata jsou uložena v šourku (Kvapil, 2007). Šourek je vak tvořený kůží šourku a podkožím. Šourek u psa je kulovitý, mírně při bázi zaškrbený a poměrně volně přisedlý do středové roviny v mezistehenní. Je více vzadu, v úrovni pod sedacím obloukem. Hluboká brázda rozděluje šourek na dvě poloviny s varlaty uloženými nestejně vysoko. Kůže je hladká a lesklá (Červený, 2011). Průměrná velikost varlete u dospělého psa střední velikosti je 3 x 2 x 1,5 cm (závisí na velikosti plemene). Kůže šourku je tenká, pigmentovaná, vybavená potními žlázami a pokrytá jemným ochlupením (Doležel a kol., 2001).

Povrch varlete je hladký, krytý tenkou serózní blankou, která představuje útrobní list poševního obalu. Pod ní se nachází bělavý obal, vytvářející pevné pouzdro křehkého parenchymu varlete. Bělavý obal je silná vrstva hustého kolagenního vaziva s bohatě rozvětvenými krevními cévami, které prosvítají přes tenkou serózu a svým zvlňeným



průběhem vytvářejí na varleti typickou kresbu. Od bělavého obalu vybíhají dovnitř varlete slabší vazivové přepážky, které se ve středu varlete spojují v ploché středové vazivo varlete – mediastinum. Vazivovými přepážkami je křehký a žlutohnědý parenchym varlete rozdělen na 100 – 300 lalůček. Mají zhruba jehlanovitý tvar a jsou svou širokou bází obráceny k bělavému obalu a tupým vrcholem k mediastinu.

Parenchym lalůčku má jemně zrnitou strukturu a skládá se z 2 – 4 stočených semenotvorných kanálků. Tyto kanálky začínají slepě při periferii lalůčku, mají silně zvlňný průběh a vzájemně mezi sebou anastomozují. Při vrcholu se všechny stočené semenotvorné kanálky lalůčku spojují v krátký a úzký přímý kanálek, jímž začínají vývodné cesty varlete. U pohlavně dospělého samce vystýlá semenotvorné kanálky zárodečný – spermatogenní epitel. Spermatogenní epitel je vysoký vícevrstevný epitel a skládá se ze dvou základních typů buněk, podpůrných a spermatogenních.

Podpůrné buňky (buňky Sertoliho) jsou v epitelu rozloženy jednotlivě v nepravidelných odstupech (Marvan, 2011). Poskytují „opatrovnickou péči“ (ochranu a výživu) vyvíjejícím se spermiím (Reece, 1998). Spermatogenní buňky jsou v zárodečném epitelu zastoupeny nejpočetněji a představují ve skutečnosti různá vývojová stadia spermií (Marvan, 2011).

Varle patří ke žlázám s dvojitým vylučováním. Exogenně vylučuje spermie, jako žláza s vnitřní sekrecí vylučuje do krve samčí pohlavní hormon testosteron, který má mnohostranný účinek: podněcuje a řídí produkci spermií, prodlužuje jejich životnost v nadvarleti, ovlivňuje sekreci přídatných pohlavních žláz, stimuluje tvorbu vnějších samčích znaků, ovlivňuje pohlavní chování psa aj. (Procházka, 1989).

Součástí varlete je nadvarle, ve kterém se spermie hromadí a dozrávají (Procházka, 1989). Do nadvarlete jsou spermie dopravovány proudem tekutiny ze semenotvorných kanálků (Reece, 1998). Nadvarle je orgán kyjovitého tvaru, na kterém rozlišujeme tři části: hlavu, tělo a ocas. Podstatou těla a ocasu je vývod nadvarlete (Marvan, 2011).

Semenný provazec je protáhlý útvar kuželovitého tvaru. Rozšířenou základnou začíná na hlavě nadvarlete a zúženým pólem zasahuje do poševního kanálu. Jeho hlavní součástí je chámovod, doprovázený varletní tepnou, bohatě rozvětvenou varletní žílou, mízními cévami a nervy. Všechny tyto složky jsou navzájem spojeny řídkým vazivem a hladkým svalstvem a na povrchu jsou obaleny serózou. Po vstupu do břišní dutiny semenný provazec končí. Cévy a nervy pokračují dorzálním směrem, zatímco chámovod se od nich odděluje a zahýbá kaudálně do pánevní dutiny (Marvan, 2011).

Chámovod je tlustostěnná párová trubice tvořená sliznicí, svalovinou a serózou. Vystupuje z ocasu nadvarlete, prochází dutinou šourkovou, tříselným kanálem, po stěnách dutiny břišní do dutiny pánevní až na dorzální plochu močového měchýře (Kozumplík, 1992). Sliznici kryje jednovrstevný nebo pseudovrstevný cylindrický epitel, vybavený místy mikrokly. V úseku ampuly je sliznice chámovodu výrazně ztlustělá přítomností rozvětvených tubulózních žláz. Jejich viskózní hlenovitý sekret je vylučován do lumina chámovodu a stává se součástí ejakulátu. Svalovina tvoří nejsilnější vrstvu stěny chámovodu a je uspořádána v podobě hustých a protáhlých spirál. Při ejakulaci svými prudkými peristaltickými stahy vypuzuje spermie do močové trubice (Marvan, 2011).

Předstojná žláza (prostata) se nachází v pánvi a obklopuje močovou rouru asi 1 cm za jejím vyústěním z močového měchýře (Kvapil, 2007). Je to tuboalveolární žláza, skládající se ze dvou částí a ležící na krčku močového měchýře a začátku močové trubice, do níž vyúsťuje četnými vývody (Kozumplík, 1992). Má za úkol produkovat sekret vytvářející během ejakulace pro spermie příznivé prostředí v chámovodech, v močové rouře a hlavně v pochvě feny (Procházka, 1989).

Penis psa je uložen mezi stehny a na spodině břicha. Pyj psa je kavernózního typu. U velkých psů je v klidové poloze až 25 cm dlouhý a 2 – 3 cm tlustý. Pro psa je charakteristické, že kromě žaludu pyje je při jeho bázi vytvořen z erektilní tkáně bulbus, který se při vzrušení výrazně zvětšuje, aby při kopulaci fixoval penis v pochvě feny v průběhu tzv. svázání. Od bulbu téměř po vrchol žaludu prochází kost penisu, která je zakončena vazivově chrupavčitou částí, asi 0,5 cm dlouhou. Délka kosti pyje se v závislosti na plemeni pohybuje kolem 5-10 cm. Je to štíhlá kost s ventrálně postaveným hlubokým žlábkem a mírně prohnutá (Červený, 2011). Za klidového stavu je pyj zcela schován v předkožkovém vaku. Kůže předkožkového vaku je volná, pendulující a ochlupená. Za normálních okolností ji lze snadno přehrnout přes žalud (Doležel a kol., 2001).

### **3.1.1 Spermatogeneze**

Pod pojmem spermatogeneze rozumíme vznik samčích pohlavních buněk neboli spermií (Kočárek, 2008). Je to proces, který začíná dělením spermatogonií a končí přeměnou spermatidy na spermie (Gamčík a Zibrin, 1992). Spermioogeneze je série změn jádra a cytoplazmy a transformace buněk z nepohyblivých do potenciálně pohyblivých, u nichž se vytvořil bičík (Reece, 1998). Spermie jsou kontinuálně tvořeny v průběhu celého života psa (Kvapil, 2007).

V procesu spermatogeneze se vyskytují dva typy dělení, a to mitóza (dělení buněk, při kterém každá nová buňka zůstává diploidní) a meióza (dělení, kdy každá nová buňka má poloviční – haploidní neboli  $n$  počet chromozomů), takže zralá spermie má poloviční počet chromozomů (Reece, 1998).

Při mitotickém dělení vznikne ze spermatogonie stejná buňka, která zůstává uložena na původním místě, a druhá, která se nazývá spermatogonie typu A (A-spermatogonie). Ta pak migruje přes Sertoliho buněčnou bariéru do vrstvy buněk blízko dutiny kanálku. Spermatogonie typu A prodělávají mitotické dělení, které někdy zahrnuje několik generací buněk. Vzniká tak velké množství spermatogonií typu B (B-spermatogonie). Tyto buňky se naposledy mitoticky dělí a výsledkem je tvorba primárních spermatocytů s počtem chromozomů  $= 2n$ . Primární spermatocyty se dále dělí meioticky a vznikají z nich sekundární spermatocyty, ze kterých po druhém meiotickém dělení vznikají spermie (Reece, 1998). Výsledkem meiotického dělení jednoho primárního spermatocytu jsou čtyři spermie (Kočárek, 2008). Spermioogeneze od stadia primární spermiogonie do zralé spermie trvá 55-70 dní (Doležel a kol., 2001).

### 3.1.2 Stavba spermie

Spermie má při oplození splnit tři základy úlohy: musí aktivně vyhledat vajíčko, proniknout do něho a přinést genetický materiál od otce. Splnit tyto úlohy jí umožňuje morfologické složení: aktivní pohyb zabezpečuje bičík, na penetraci se podílí akrozóm, genetické informace jsou uloženy v jádru. Jakmile se poruší jedna z těchto funkcí, vajíčko se neoploďní (Gamčík a Zibrin, 1992).

Hlavička spermie se během spermioogeneze vytváří především z jádra spermie, takže její základní materiál je jádro. Přední část jádra pokrývá akrozóm, zadní postakrozomální čepička. Celou hlavičku pokrývá cytoplazmatická membrána, která přechází na bičík. Bičík spermie se skládá ze čtyř oddílů: krčku, středního oddílu, hlavního oddílu a koncového oddílu (Gamčík a Zibrin, 1992).

Hlavička tvoří téměř polovinu hmotnosti spermie. Na hlavičku připadá 51 % a na bičík 49 % celkové hmotnosti spermie (Gamčík a Zibrin, 1992).

V procesu oplodnění má hlavička spermie významnou funkci. Její úlohou je přenést dědičný materiál lokalizovaný v nukleoplazmě, přičemž je nevyhnutelný správně vyvinutý a neporušený akrozomální systém a nukleoplazma. Hlavička spermie se skládá z nukleoplazmy

(jádra) a struktur jadrového pôvodu, akrozomálneho systému a postakrozomální čepičky (Gamčík a Zibrin, 1992).

Nukleoplazma vyplňuje celé jadro hlavičky spermie. Její struktura je homogenní a kompaktní, tvar jádra je identický s tvarem hlavičky. V jádře hlaviček spermií se nachází otcovský dědičný materiál v kondenzované formě DNA. Jádru hlaviček spermií se odlišuje od jader somatických buněk tím, že má poloviční (haploidní) obsah DNA a chromatin nemá uspořádaný ve formě vláken, ale tvoří kompaktní hmotu. Jádrová tekutina se v nukleoplazmě spermií nenachází. Jádru obaluje nukleová membrána, která je dvouvrstevná (Gamčík a Zibrin, 1992).

Akrozom pokrývá přední část hlavičky spermie. Je to cytoplazmatický útvar čepičkového tvaru, který se nachází mezi buněčnou a nukleovou membránou. Změny na akrozomu se pak projevují poruchou fertility. Na povrchu je akrozom pokrytý cytoplazmatickou membránou. Pod ní je membránová složka akrozomu – vnější a vnitřní akrozomální membrána. Vnitřek akrozomálního systému tvoří akrozomový materiál, především enzymy, které napomáhají penetraci a rozpouštění obalů vajíčka. Akrozom spermie nemá tak pevnou konzistenci jako ostatní části hlavičky spermie. Je citlivý na osmotické změny vnějšího prostředí podobně jako mitochondrie. Při dlouhotrvajícím uchovávání semena podléhá akrozom degenerativním změnám, které se projevují zvlněním vnější akrozomové membrány, vznikem světlých míst v akrozómě a jeho nabobtnáváním (Gamčík a Zibrin, 1992).

Postakrozomální čepička je útvar, jenž obaluje tu část jádra, kterou nepokrývá akrozom, a je rezistentnější vůči vnějším vlivům než akrozom (Gamčík a Zibrin, 1992).

Bičík jako ústrojí pohybu zprostředkovává transport spermie na místo oplodnění. Důležitou úlohu má přitom mitochondriální aparát, který vyrábí energii (adenozíntrifosfát – ATP), a komplex axiálních vláken jako místo, kde se tato energie mění na mechanickou – na pohyb spermie (Gamčík a Zibrin, 1992).

### **3.1.3 Semeno**

Semeno je tekutina, která se skládá z buněčné části, tj. spermií, a z tekuté části čili prostatické tekutiny (Marvan, 2011). Prostatická tekutina představuje svým objemem hlavní podíl ejakulátu a tvoří ji hlavně výměšky přídatných pohlavních žláz. V malém množství se na jejím složení podílí i tekutina, která má svůj původ ve varleti, nadvarleti, chámovodu a v močové trubici. Svým pestrým chemickým složením (anorganické látky, lipoidy, sacharidy)

vytváří prostatická tekutina pro spermie přirozené prostředí, které je chrání před nepříznivými vlivy, umožňuje jejich pohyb a je zdrojem jejich výživy (Marvan, 2011).

Sperma je sklovitě bílá, vazká tekutina, obsahuje v 1 ml 50 až 150 miliónů spermií a sekrety přídatných pohlavních žláz, které spermie ředí, oživují a přivádějí na místo určení (Procházka, 1989). Barva závisí na hustotě a konzistenci ejakulátu a je v odstínech šedivé až bílé barvy. Jeho objem je velmi variabilní a silně kolísá podle plemene, věku, velikosti psa, frekvence krytí a stupně vydráždění (Kvapil, 2007). Má specifickou barvu, konzistenci a pach (Marvan, 2011).

## **3.2 Reprodukce u samců**

### **Pohlavní dospívání – puberta**

Pohlavní dospívání je proces, jehož výsledkem je morfologická a funkční schopnost samčího organismu vykonávat reprodukční činnost (Gamčík, 1992). Psi obvykle pohlavně dospívají o něco později než feny. Tvorba spermií začíná okolo 5. – 6. měsíce stáří, přičemž mohou být plodní již od 6 měsíců. V pubertě, okolo 9. měsíce stáří, začíná mít pes schopnost krytí fenu. To znamená, že má dobře vyvinutý pohlavní pud a v přítomnosti háravé feny je schopen v přirozené posloupnosti realizovat plnohodnotně pohlavní reflex, tzn. vzeskok, zavedení pyje, svázání a vysemenění (Štourač, Labrousse 2007). Pes patří mezi domácí zvířata, u nichž tvorba spermií probíhá prakticky po celý rok. Znamená to, že pes je schopen nakrýt a oplodnit každou fenu, která hárá (Procházka, 1989).

#### **3.2.1 Přirozená plemenitba**

Reprodukční funkce samců zahrnuje tvorbu spermií a jejich dopravu do samičích pohlavních orgánů (Reece, 1998). Pes při aktu krytí nejprve vysune z předkožky špičku pyje, která je vyztužena kostí, a proto dostatečně pevná k tomu, aby při penisových pohybech pes vyhledal štěrbinu stydkých pysků feny. Při tom často dochází k vystřikování sekretu uretrálních žlázek, který zvlhčí okolí vulvy, čímž se sníží nebezpečí poranění žaludu hrubými chlupy. Po zasunutí špičky pyje začne teprve topoření pyje a zvláště žaludu a pes bez pohybů pyj do pochvy feny zasune natolik, že špička žaludu sahá až k děložnímu krčku. Po zasunutí se pes zklidní a zůstává na feně „zavěšen“. V této etapě se výrazně zvětší všechna topořivá tělesa (zvláště na žaludu). Pyj se zvětší natolik, že jeho průřez je výrazně větší než průřez pochvy feny a dochází k tzv. svázání psa s fenou. Po svázání pes z feny slézá buď do

postavení vedle ní, nebo do tzv. zadní polohy. Již v prvním okamžiku po svázání vstříkují pes k čípku děložního krčku první dávku semene obsahující největší množství spermií. V další fázi následuje sekret prostaty, který spermie ředí svým zásaditým pH, oživuje je a vytvoří optimální prostředí. Ejakulace pokračuje po kapkách po celou dobu svázání. Semeno, které pes vystřikuje do blízkosti děložního krčku, se tímto fyziologickým podtlakem nasává do dělohy, čímž se výrazně pomáhá spermiím dosáhnout co nejdříve svého cíle. Celkový objem spermatu je 3 až 20 ml, podle velikosti plemene. Ukončení ejakulačního reflexu má za následek otevření chlopní žil v topořivých tělesech, zmenšení těles a tím uvolnění svázání. Akt svázání není samoučelný, podobně jako řada jiných jevů v přírodě. Při svázání se natahuje pochva a tím i děloha feny, ve které vzniká podtlak. Podtlak umožňuje nasávání semene vstříkovaného do blízkosti děložního krčku (Procházka, 1989).

Čerstvě ejakulované spermie nemají schopnost okamžitě oplodnit vajíčko. Oplozovací schopnost, tzv. kapacitu, spermie získávají až po určité době pohybu v pohlavním ústrojí feny, tzv. kapacitací (Štourač, Labrousse 2007). Spermie si udržují fertilizační schopnost u feny až 90 hodin. Fertilizace je spojení samčí a samičí pohlavní buňky a vytvoření jedné buňky zvané zygota. První krok fertilizace je penetrace spermie zónou pellucidou. To zahrnuje nejenom aktivitu enzymů hyaluronidázy a akrozinu, ale i pohyblivost spermií. Motilita ustane, jakmile dojde ke kontaktu spermie s oocytem. Po penetraci dochází k tzv. „reakci zóny“, která chrání vajíčko před další penetrací jinou spermií (Reece, 1998).

### **3.2.2 Asistovaná reprodukce**

Pod pojmem asistovaná reprodukce zahrnujeme metody cíleného ovlivňování pohlavní aktivity, časování krytí nebo umělé inseminace, alternativní metody oplození a metody zabránění nebo umělého přerušování gravidity (Doležel a kol. 2001).

Umělá inseminace je velmi účinný a cílevědomý rozmnožovací postup, který vychází z vědeckých poznatků biologie a fyziologie reprodukce. Je jednou z prvních metod řízené reprodukce a plní více než 50 let na celém světě velmi efektivně svou úlohu pro zlepšování genofondu užitkových vlastností zvířat a veterinární péči o reprodukční proces, jako i při využívání biotechnických metod řízené reprodukce (Gamčík a Zibrin, 1992).

Nejběžněji se inseminace používá v případech, kdy pes a fena žijí na vzdálených místech a transport semene je mnohem méně nákladný a mnohem méně stresující než transport samotných zvířat (Kutzler, 2005).

### 3.2.2.1 Umělá inseminace klasická

Čerstvé sperma pro inseminaci může být použito neředěné nebo zředěné. U neředěného čerstvého spermatu je ejakulát ochlazen ve vodní lázni a uskladněn při teplotě 5 - 10 °C, spermie přežívají v nezředěném ejakulátu pouze krátkou dobu, maximálně 21 hodin. Po zředění může být sperma uchováno po několik hodin, aniž by došlo k výraznému poklesu oplozovací schopnosti. Maximální doba pro skladování zředěného semene je 4 - 5 dní (Pašek, 2007).

### 3.2.2.2 Umělá inseminace chlazeným semenem

Po odběru a zpracování se semeno prostřednictvím konvečních metod a laboratorních postupů ochladí na požadovanou teplotu. Nedochozí k inaktivaci spermií, jen ke zpomalení fyziologických aktivit. Uskladnění je časově omezené (48 hod.). Vhodné hlavně na rychlý transport a následnou inseminaci (Pašek, 2007).

### 3.2.2.3 Umělá inseminace mrazeným semenem

Možnost použití kvalitního genetického materiálu prakticky neomezenou dobu od uskladnění (i po smrti psa), možnost opakovaného krytí (ekonomické hledisko), odstranění časového stresu a odstranění rizik spojených se zraněním při kopulaci (Pašek, 2007).

## 3.3 Odběr spermatu

Před samotným odběrem je potřebné vyšetření psa. Pes musí být klinicky zdravý, nezaměnitelně označený a identifikovatelný – čip, tetování – ideálně je kombinace obou těchto způsobů označení. Zároveň musí mít pes vyšetření na genetické vady (jak u kterého plemene, není podmínkou u všech), brucelózu, leptospirózu (jen v některých zemích) (Pašek, 2007).

Odběr semene je prvním krokem ke zjištění jeho kvality a kvantity a proces samotný by měl být proveden tak, aby se maximálně zachovaly fertilizační schopnosti ejakulátu. Jedná se především o sběrnou nádobu, lubrikační gel, mikroskop, podložní a krycí sklíčka, pipetu, chemikálie a další potřebné laboratorní vybavení (Barber, 2010). Všechny pomůcky, které

přicházejí do kontaktu se semenem, musí být důkladně omyté, opláchnuté destilovanou vodou a vysterylizované (Doležel a kol. 2001).

Ejakulát psa je možno získat třemi způsoby: masáží pyje (masturbací), umělou pochvou nebo elektroejakulací (Doležel a kol., 2001). Nejpoužívanější běžnou metodou pro odběr spermatu je digitální stimulace neboli masturbace (Kutzler, 2005).



*Hárající fena k dispozici (Kutzler, 2005)*



*Odběr spermatu (Kutzler, 2005)*

Každý pes reaguje při odběru semene jinak. Někteří jsou schopni odběru v jakémkoli prostředí, jiní pouze ve známém prostředí - doma, v přítomnosti svého majitele atd. U některých psů nastupuje erekce bez jakýchkoliv podnětů estrální feny, zatímco ostatní psi jsou schopni erekce pouze v přítomnosti hárající feny. Někteří psi budou ejakulovat pouze při zaklesnutí předními končetinami do slabin feny, jiní můžou stát vedle feny, jiní za fenou. Někdy nejsou psi schopni odběru za přítomnosti hárající feny kvůli slabosti či ztuhlosti zadních končetin, z důvodu agresivity feny nebo mají negativní vzpomínku z předchozích pokusů. Též hlasitá konverzace a opakované příkazy pro psa jsou nerozumné, musí se jednat klidně. Někdy je zapotřebí pro úspěšný odběr několik pokusů (Christiansen, 1984). Strach a bolest psovi zabrání dosažení erekce a ejakulace (Kutzler, 2005).



Za ideálních podmínek se tento postup provádí v přítomnosti estrální feny. Není-li fena, jsou již dnes komerčně dostupné syntetické feromony estrální feny (methyl p-hydroxybenzoate, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI, USA). Estrální vaginální sekrety ze zdravé, Brucella-negativní feny, mohou být zachovány na tampónech v mrazáku (-20 °C) pro další použití (Christiansen, 1984).

Při masturbaci se psí penis zpočátku silně masíruje přes předkožku na úrovni bulbus glandis až do okamžiku částečné erekce. Poté se provede stažení předkožky za bulbus glandis a na penis je v tomto místě stále vyvíjen pevný tlak, a to stlačením mezi ukazováčkem a palcem. Při odběru může dojít k situaci, kdy pes při úplné erekci demonstruje svázání, kdy pravou nohu přehodí přes pravou paži odebírajícímu, čímž dochází k otočení penisu o 180°. V této části je penis velmi elastický a přetočení o 180° a nezpůsobuje žádné bolesti ani potíže (Kutzler, 2005).

Ejakulace začíná bezprostředně po tlaku za bulbus glandis a je způsobena stimulací sympatických nervů penisu (Kutzler, 2005). Sperma je zpravidla ejakulováno ve třech frakcích. První frakce se také nazývá předspermatická, je to čirá tekutina (Christiansen, 1984) původem z prostaty (Kustritz, 2007). Tato frakce neobsahuje spermie, jsou v ní pouze ojediněle (Doležel a kol., 2001). Druhá frakce pochází z ocasu nadvarlete, má bílé zbarvení a je bohatá na spermie (Kustritz, 2007). Následně dochází k ejakulaci třetí frakce. Ta se skládá z prostatické tekutiny a je za normálních podmínek čirá (Kustritz, 2007).

Obecně se pro hodnocení kvality ejakulátu používá pouze druhá frakce, pokud je z nějakého důvodu potřeba odebrat všechny tři frakce, doporučuje se odebrat každou zvlášť (Barber, 2010).

### **Manipulace s odebraným ejakulátem**

Spermie jsou křehké a náchylné k poškození. Při odběru a manipulaci je velmi důležité vyhýbat se vystavování obzvláště dvěma typům poškození – toxickými chemikáliemi a náhlými teplotními změnami (Barber, 2010). Jak uvádí Kutzler (2005), ejakulát by měl být uchováván v rozmezí mezi tělesnou (37 °C) a pokojovou teplotou (20 °C), jakožto preventivní opatření proti poškození spermií. Barber (2010) dodává, že by měl být takovýmto podmínkám vystavován maximálně jednu až dvě hodiny. Pokud je požadována delší doba uskladnění, je vhodné rozředit ejakulát ochranným a výživným médiem a pomalu jej ochlazovat na teplotu 4 - 5° C (Barber, 2010). Nešetrnou manipulací se zvyšuje procento mrtvých a morfologicky poškozených spermií, snižuje se jejich motilita a závěrečný výsledek vyšetření je pak nesprávný (Doležel a kol., 2001).

### 3.3.1 Základní metody vyšetřování semene a hodnocení

Obecně se dá říci, že se kvalita ejakulátu zjišťuje na úrovni inseminace či krytí, konzervace ejakulátu a z diagnostických důvodů (Kutzler, 2005). Je potřeba zdůraznit, že hodnocení jednoho vzorku může poskytovat nepřesné výsledky, zejména v případě, že pes se v poslední době používá ve velké míře pro chov nebo naopak nevyužívá vůbec. Ovšem je nutné dodat, že u psů doposud neexistují jasně stanovená kritéria kvality ejakulátu (Barber, 2010).

<i>Charakteristika</i>	<i>1. frakce</i>	<i>2. frakce</i>	<i>3. frakce</i>
Objem (ml)	0,1-2 (Ø 0,33)	0,1-3 (Ø 1,17)	1,2 až > 20
Barva	čirá až matná	šedobílá, bílá, mléčně bílá	čirá
Konzistence	vodnatá	mléčná	vodnatá
pH (Ø)	6,37	6,1	7,2
Doba trvání (s)	5-90 (Ø 13,5)	5-300 (Ø 52,4)	60-1200 (Ø3655)

Hlavní charakteristiky tří frakcí ejakulátu u psů (Zdroj: England et al., 1990)

Při základním vyšetření semene se každý čerstvě odebraný ejakulát posuzuje bezprostředně po odběru, a to makroskopicky a mikroskopicky. Makroskopicky se posuzuje objem, barva a vzhled, pH ejakulátu, hustota, pach ejakulátu, konzistence, viskozita, obsah hlenu a cizích příměsí. Mikroskopicky se posuzuje procento spermií s progresivním pohybem, hustota spermií (fotometricky), stanovení živých a mrtvých spermií zbarvením eozínem a nigrozínem, aktivita spermií, morfologické vlastnosti spermií, mikrobiální znečištění.

V inseminační dávce se po rozmrazení hodnotí aktivita spermií (%), počet spermií s progresivním pohybem ( $\times 10^6$ ) a termorezistentní test (T 38 °C), (Gamčík, 1992).

#### Objem spermatu

Objem spermatu není u psů indikátorem jeho kvality, nicméně jeho měření je důležité při výpočtu celkového počtu spermií v získaném vzorku (Barber, 2010). Objem ejakulátu může být hodnocen v kalibrovaném kuželu používaném pro odběr a závisí hlavně na velikosti psa, na velikosti prostaty, stáří psa, frekvenci odběru semene a úrovni erotizace (Dubiel, 2004). Mimo jiné záleží i na způsobu odběru, výživě, ročním období a zdravotním stavu (Gamčík a Kozumplík, 1992). Také se může lišit podle toho, kolik vzorku je odebráno z první, druhé a třetí frakce (Kustritz, 2010). Ejakulát psů ve věku 3 – 5 let obsahuje nejvyšší

počet pohyblivých spermií, a to v souvislosti s nejvyšším podílem morfologicky normálních spermií (Filipčík et al. 2010).

### **Barva a vzhled**

Normální barva zdravého ejakulátu je mléčně bílá (Kustritz, 2010). Zakalení vzorku se běžně hodnotí na stupnici od 0 – 5, kdy vzorek hodnocený číslem 5 je nejméně průsvitný, zbarvený jako mléko (Barber, 2010). Průhledný vzorek neobsahuje žádné spermie. Žluté zbarvení ejakulátu indikuje kontaminaci močí a například u lidí se vyskytuje v případě onemocnění žloutenkou či po požití některých vitamínů. Hnědé zbarvení indikuje přítomnost staré krve a červené zbarvení přítomnost čerstvé krve (Barber, 2010). Zelená barva ejakulátu indikuje infekci (Kustritz, 2010).

### **pH**

Změna pH ovlivňuje životnost a motilitu spermií. Může být způsobena použitím přílišného množství lubrikačního gelu a nevhodného čištění či dezinfekce výbavy pro odběr ejakulátu. Hodnoty pH nezředitelného psího semene se pohybují mezi 6,4 až 6,8 (Barber, 2010).

### **Koncentrace spermií**

Celkový počet spermií v ejakulátu je jedním z parametrů, které ukazují na kvalitu spermatu (Johnston, 1991), a jedná se o násobek jeho koncentrace a objemu, přičemž závisí na velikosti varlat (Barber, 2010). U psů by měla být koncentrace spermií v kvalitním ejakulátu vyšší než 300 miliónů/ejakulát (Kustritz, 2010) do 2000 miliónů (Johnston, 1991). Nicméně tato hodnota je ovlivněna velikostí plemene (Lindforsberg, 1991).

### **Motilita spermií**

Motilita je vyjadřována procentuálním zastoupením motilních nebo progresivně motilních spermií ve vzorku (Johnston et al., 2001), dále charakteristikou pohybu a rychlostí pohybu spermií (Peña et al., 2006). U zdravého psa se v kvalitním ejakulátu vyskytuje 70 – 90 % motilních spermií (Iguer-ouada, Verstegen, 2001a). Motilita může být narušena vystavením vzorku teplotnímu šoku, kontaminací vodou, močí, krví a lubrikačními gely a výskytem infekčního onemocnění (Payan-Carreira et al., 2010). Dále bývá ovlivněna délkou sexuální abstinence (Barber, 2010).

Pohyblivost spermií zjistíme z kapky spermatu, kterou kápneme na podložní sklíčko mikroskopu, to se přikryje krycím sklíčkem a vše zkoumáme při teplotě 38 °C a 100x zvětšení

(Christiansen, 1984). Tato metoda odhadnutí počtu pohyblivých spermií je nejjednodušší, nejrychlejší a finančně nejméně náročná (Martinez, 2004), nicméně je velmi subjektivní a zatížená v mnoha případech významnou systematickou chybou (Payan-Carreira et al., 2010).

Pro objektivní měření motility ejakulátu se začaly hledat jiné metody hodnocení. Výsledkem tohoto hledání bylo vyvinutí počítačové analýzy spermatu (CASA). CASA umožňuje získávat objektivní a velmi přesné informace o poměru pohyblivých buněk v ejakulátu a kvalitě jejich pohybu (Martinez, 2004) a zobrazuje drobné změny v pohybu spermií, které nemohou být identifikovány obvyklými subjektivními metodami. Díky CASA může být velmi rychle (< 1 min) individuálně zanalyzováno najednou několik tisíc spermií, což je při každodenním používání velmi praktické. Jediným problémem tohoto zařízení je relativně vysoká pořizovací cena, potřebná standardizace (minimální velikost komůrek na podložním sklíčku, počet snímků za sekundu, doba trvání analýzy atd.) a ověřování správnosti nastavení před každým použitím (nastavení CASA pro čerstvé semeno není optimální pro měření semene konzervovaného nebo dlouhodobě konzervovaného a naopak (Rijsselaere et al., 2012)).

V dnešní době se ovšem čím dál častěji objevuje názor, že pouze hodnocení motility spermií v ejakulátu jako celku neposkytuje dostatečné informace o jeho kvalitě (Martinez-Pastor et al., 2005).

## **Morfologie**

Morfologické abnormality spermií mohou být klasifikovány jako primární vady, které představují odchylky vyskytující se během spermatogeneze a sekundární vady, které se vyskytují v průběhu dozrávání spermií v nadvarleti nebo po ejakulaci (Oettlé a Soley, 1988). Při morfologickém hodnocení je individuálně zkoumán tvar a struktura spermií. Posuzována je velikost a tvar hlavičky, střední část a bičík spermie (Barber, 2010). Nejdůležitějším zjišťovaným parametrem je procentuální zastoupení morfologicky normálních spermií ve vzorku ejakulátu (Kustritz, 2007). Procento morfologicky normálních spermií v ejakulátu psů by mělo být vyšší než 70 % (Kustritz, 2010). Když je podíl morfologicky normálních spermií nižší než 60 %, bylo zjištěno, že plodnost může být nepříznivě ovlivněna (Oettlé, 1993).

Je možné, že určitou roli ve výskytu morfologicky abnormálních spermií může hrát vyšší věk, např. u lidí klesá procento morfologicky normálních spermií po 45. roku života (Pasqualotto et al., 2005).

Mikroskopické hodnocení morfologie spermií může být provedeno pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem nebo pomocí mikroskopu s procházejícím světlem, kdy je

zapotřebí spermie obarvit. Pro barvení spermií lze využít komerčních přípravků, např. DiffQuick (Kustritz, 2007).

K hodnocení funkčních vlastností spermií lze ve veterinární praxi použít především hypoosmotický test (HOS–test) (Karger et al., 2014) a hodnocení živých a mrtvých spermií (Vník et al., 2001). HOS-test je jednoduchý, levný a lehce aplikovatelný test na hodnocení funkčního stavu membrány spermie (Kumidiaka, 1993), a tudíž ho lze rutinně využívat i ve veterinárních ordinacích (Karger et al., 2014). Tento test je založen na předpokladu, že pokud má spermie neporušenou funkčnost membrány a transport vody přes membránu tudíž probíhá fyziologicky, projeví se schopnost bičíku spermie se zkroutit a nabobtnat (Jeyendran et al., 1984). Posouzení procenta živých a mrtvých spermií vychází z předpokladu, že do mrtvé spermie, u které byla narušena integrita plazmatické membrány, pronikne barvivo. Pro hodnocení spermií psů se ve veterinární praxi nejčastěji využívá kombinace barviv eozín a negrozín (Kustritz, 2007). Nutno však dodat, že ve vědeckých laboratořích zabývajících se veterinární andrologií se již tento způsob barvení nepoužívá (Peňa et al., 2006).

### **3.3.2 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu**

Kvalita ejakulátu je ovlivněna mnoha vnitřními a vnějšími faktory. Mezi nejvýznamnější vnitřní faktor ovlivňující kvalitu spermatu patří pořadí odběrů a úroveň zkušenosti psa (Michael et al. 2008). Zdravý pes se může používat k plemenitbě bez negativního dopadu na kvalitu ejakulátu každých 48 hodin, denně 3 dny s dvoudenním odpočinkem nebo 2x denně se 2 dny odpočinku (Doležel a kol., 2001).

Živá hmotnost psa hraje nepostradatelnou roli. Hmotnost je významným faktorem, který je třeba vzít v úvahu při analýze kvality ejakulátu, protože např. celkový počet spermií závisí na velikosti varlat a velikost varlat závisí na hmotnosti psa (Kutzler, 2005).

Také věk může hrát důležitou roli v kvalitě ejakulátu. Počáteční ejakuláty získané od psů v období puberty obsahují větší množství abnormálních a mrtvých spermií (Doležel a kol., 2001). U šestiletých psů došlo k poklesu tvorby spermií, stejně tak jako ke snížení počtu aktivních spermií a počtu morfologicky normálních spermií (Schäfer et al., 1997). Lze konstatovat, že se zvyšujícím se věkem psa objem ejakulátu klesá (Filipčík et al., 2011).

Nemocný nebo vystresovaný pes zřídka vyprodukuje semeno dobré kvality. Může trvat 3 až 6 měsíců, než se spermatogeneze vrátí zpátky do normálu. Produkci semene též ovlivňují některé medikamenty (Pašek, 2007).

Kvalita ejakulátu může být rovněž ovlivněna vnějšími faktory, mezi které patří zejména typ bydlení, používání nebo pracovní využití psa a v neposlední řadě místo odběru spermatu (Lopes et al., 2009).

Vliv výživy je někdy přehlížen, ale nedostatky ve výživě, jako je podvýživa nebo těžká obezita, mohou mít na kvalitu ejakulátu významný dopad. Vliv výživy jako jeden z ukazatelů kvality spermatu byl popsán v některých publikacích, např. Linde-Forsberger et al., 1993, Michael et al., 2008.

Další faktor, který ovlivňuje kvalitu ejakulátu, je roční období. K poklesu koncentrace spermií v ejakulátu psa dochází v pozdním létě a na podzim, naopak vyšší koncentrace jsou zjišťovány na jaře a v časném létě. Tyto změny jsou pravděpodobně vyvolány změnou délky světelného dne a okolní teplotou (Doležel a kol., 2001).

## **4 Způsoby uchování spermií**

Zmrazení spermií je způsob konzervování spermií, teoreticky pro neomezenou dobu (Pascal, 2012). Při krátkodobé konzervaci lze skladovat semeno do pěti dnů a při dlouhodobé konzervaci neomezeně (Doležel a spol., 2001). Uchování spermií je důležitým nástrojem k zachování genetické rozmanitosti, pomáhá při reprodukci druhu (Farstad, 2000a) a je používáno při přepravě na dlouhé vzdálenosti či po smrti psa (Rijsselaere et al., 2011).

Ke krátkodobé i dlouhodobé konzervaci se používá spermatická frakce ejakulátu (Kozumplík, 1992). Každý druh může mít k postupu zmrazení odlišnou citlivost (Rota et al. 2005).

### **4.1 Krátkodobá konzervace**

Krátkodobá konzervace se provádí ředěním semene a snížením jeho teploty, nejlépe ve skleněných nádobách. Jako příklad složení ředidel lze uvést 3,025g TRIS + 1,7g kyselina citrónová + 1,25g fruktóza + destilovaná voda do 100 ml + 20% žloutek + 1 mg/ml benzylpenicilin a 1 mg/ml dihydrostreptomycinsulfát nebo pasterované mléko s 0,1 % tuku + 20% žloutek + 1 mg/ml benzylpenicilin a 1 mg/ml dihydrostreptomycinsulfát. Snížení teploty má být pozvolné v průběhu 30 – 60 minut. Teplota se obvykle snižuje na teplotu v chladničce (3 – 5 °C) nebo konstantní teplotu mezi 5 – 15 °C. Takto lze semeno skladovat do pěti dnů. Při transportu by semeno mělo být v termoboxu s konstantní teplotou nepřevyšující 10 °C (Doležel a kol., 2001).

## 4.2 Dlouhodobá konzervace

Pro dlouhodobou konzervaci se používají ředidla s přidavkem glycerolu (nejčastěji 6 – 8 %). Doba ekvilibrace při teplotě 4 °C je 2 – 3 hodiny. Tradiční způsob představuje mrazení na suchém ledu ve formě pelet (Doležel a kol., 2001).

Druhá frakce, která je bohatá na semeno, se zředí: TRIS - kyselina citrónová – vaječný žloutek – fruktóza na bázi ředidla s 3% glycerolem. Ochladíme na 4 – 5 °C po dobu 1 – 2 hodiny (= ekvilibrační období). Následně se přidá druhé ředidlo s Equex a vyšším procentem glycerolu (7 %) a semeno se aplikuje do pejet (0,5 nebo 0,25 ml) nebo do pelet. Obě jsou považovány za stejně dobré, ale 0,5 ml pejety jsou praktičtější pro manipulaci a možnost označení etiketou (Schäfer-Somi et al., 2006).

Nověji se mrazení provádí v ampulích nebo 0,5 ml pejetách automaticky řízeným chlazením pomalou (0,5 °C/min do -20 °C a dále 2 °C/min do -70 °C nebo 1 - 2 °C/min do -15 °C a dále 3 - 5 °C/min do -50 °C) nebo rychlou metodou (12 - 30 °C/min do -70 °C). Je možné rovněž po ekvilibraci pejety umístit do kovového válce vychlazeného parami dusíku na -80 až -90 °C a poté přemístit pejety do tekutého dusíku (Doležel a kol., 2001).

Při srovnání různých rychlostí mrazení vzhledem ke kvalitě semene po rozmrazení byla nejlépe označena rychlost 30 °C/min. Po zmrazení je semeno uloženo do tekutého dusíku a zde skladováno do použití. Rozmrazení inseminačních dávek bezprostředně před inseminací se obvykle provádí při teplotě 55 °C po dobu 6 sekund, případně při 70 °C po dobu 5 sekund (Doležel a kol., 2001).

První oplodnění z kryokonzervovaného psiho spermatu bylo vyrobeno před více než 30 lety ze zmrazeného spermatu v peletě na suchém ledu (Seager, 1969).

Základním principem dlouhodobé kryokonzervace biologických objektů je jejich zmrazení, čili převedení vody, kterou obsahují, z kapalného skupenství do tuhého. Konzervační účinek se dosahuje kombinovaným účinkem nízké teploty a snížením obsahu kapalné vody, čímž se výrazně zpomalují až zastavují metabolické procesy. V tkáních se voda nachází ve značně složitých roztocích, váže se biochemicky a koloidně a kromě toho částečně i jako volná voda (Gamčík, 1992).

Ze všech poznatků o tvorbě krystalů je známé, že se stoupající rychlostí celého procesu roste počet krystalů a klesá jejich velikost. Při zmrazování biologických objektů je tato otázka mimořádně důležitá, protože na velikosti krystalů přímo závisí, zda buněčné stěny zůstanou kompaktní anebo se poškodí. Naopak extrémní rychlost může způsobit také vnitřní změny osmotického tlaku, které produkt mechanicky poškodí (Gamčík, 1992).

Hlavní kroky zmrazení psích spermií jsou: centrifugace, ředění, ekvibrace, balení, zmrazování a rozmrazování.

#### 4.2.1 Centrifugace

Cílem centrifugace je odstranění přebytku prostatické tekutiny, která má negativní vliv na pohyblivost a vitalitu zmrazených a následně rozmrazených spermií. Dále pak standardizovat naředění spermatu do řízené konečné koncentrace spermatu a glycerolu (England, Allen 1992). Existuje několik centrifugačních protokolů, přičemž se standardně využívá 720 g/ 5 min. (Rijsselaere et al., 2012).

Cílem studie Gálvez et al. (2015) bylo posoudit, zda provést jednovrstevnou centrifugaci (single layer centrifugation - SLC) před nebo po tom, co je semeno zchlazeno (pro výběr lepších spermií a zhotovení kvalitnější inseminační dávky). Byla hodnocena pohyblivost spermií, morfologie a neporušenost membrány spermie. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při provedení SLC po zchlazení. Bylo prokázáno, že SLC prostřednictvím centrifugace Androcoll-C po zchlazení ejakulátu je efektivní způsob, jak zlepšit kvalitu spermií chlazeného psího ejakulátu (Gálvez et al., 2015). SLC lze tedy použít i pro přípravu spermií pro kryokonzervaci.

Dorado et al. (2013) posuzovali, zda SLC s Androcoll-C zlepší kvalitu zmrazených spermií po rozmrazení. Po rozmrazení byly vzorky psího spermatu rozděleny na dvě části. Jedna byla použita jako kontrolní a druhá zpracovaná SLC. Autoři došli k závěru, že vzorky psího spermatu zpracované SLC s Androcoll-C po rozmrazení, byly parametry kvality spermií včetně pohyblivosti lepší než kontrolní vzorek. Výsledky studie ukazují, že SLC s Androcoll-C může být alternativní a úspěšná metoda pro zlepšení kvality psích spermií poškozených během procesu kryokonzervace (Dorado et al., 2013).

Cílem studie Hidalgo et al. (2014) bylo zhodnotit kombinovaný účinek centrifugace spermií, ředidla a doby uchování před zmrazením na kvalitu rozmrazení spermatu a zmrazitelnosti chlazeného psího spermatu uložených v Neopor boxu (Hidalgo et al., 2014).

Za prvé, účinek centrifugace a dvou komerčních ředidel z Minitübe (Biladyl A a CaniPRO Freeze A) byl hodnocen v chlazeném spermatu po 24 a 45 hodinách skladování v chladu. Ve všech hodnocených parametrech spermií nebyly pozorovány téměř žádné významné rozdíly (Hidalgo et al., 2014).

Za druhé, chlazené sperma bylo zmrazeno po 24 a 45 hodinách skladování v chladu v Neopor boxu. Ukázalo se, že nejlepší výsledky jsou dosaženy, když se sperma centrifuguje,



ochladí v CaniPRO Freeze A a poté zmrazí po 24 hodinách skladování v chladu (Hidalgo et al., 2014).

Závěrem lze říci, že nejlepší výsledky byly dosaženy poté, co semeneo bylo centrifugováno, ochlazen s CaniPRO Freeze A a pak po 24 hodinách v chladničce zmrazeno v Neopor boxu. Tím se získají výsledky podobné jako u spermatu zmrazeném ihned po odběru (Hidalgo et al., 2014).

### **Metoda sperm-washing**

Pro umělé oplodnění se často provádí metoda sperm-washing pro nejlepší kvalitu vzorku (počet a pohyblivost spermií), (Boomsma et al., 2004). Postup spočívá pouze v „praní“ spermatu ve sterilním médiu s lidským albuminem. Po fluidifikaci vzorku je celý objem rozdělen do frakcí po ne více než 2 ml do centrifugačních zkumavek. Do každé zkumavky se přidá stejný objem média jako je objem vzorku ve zkumavce, obsah se jemně promíchá pomocí sterilní pipety. Poté se vzorky odstředí při 300 g po dobu 10 minut a supernatant je velmi opatrně odstraněn pomocí sterilní pipety. Peleta se znovu uvede do suspenze v 1 ml média, jemně promíchá a centrifuguje znovu po dobu 5 minut při 300 g. Supernatant se opět odstraní a konečná peleta se resuspenduje ve sterilním prostředí pro umělou inseminaci. To je velmi důležité pro určení počtu a mobility konečného vzorku před inseminací (Aitken and Clarkson, 1998).

I přes jednoduchost a rychlost postupu je třeba připomenout, že opakované centrifugace bez separace dobrých spermií od leukocytů a mrtvých spermií mohou způsobovat oxidaci a poškození funkcí spermií (Aitken and Clarkson, 1998).

### **Metoda swim-up**

Metoda swim-up je v laboratořích IVF nejběžněji používanou technikou. Tato metoda je preferovaná, má-li vzorek ejakulátu normální počet dobrých spermií. Touto technikou jsou spermie vybírány podle jejich mobility a schopnosti vyplouvat ze semenné tekutiny.

Při použití přímé „swim-up“ metody je celý objem vzorku po fluidifikaci a promíchání rozdělen do centrifugačních zkumavek po 1 ml (upřednostňuje se s kulatým dnem). Přes sperma se v každé zkumavce s velkou opatrností převrství 1,3 ml kultivačního média. Zkumavky se umístí do inkubátoru pod úhlem asi 45° a nechají se inkubovat při 37 °C po dobu 30 – 60 min. Nakloněním tub na 45° zvýšíme plochu mezi médiem a spermatem, a tím selepší schopnost spermií vyplavávat ze spermatu a dosáhnout média. Poté se zkumavky

vrátí zpět do vertikální polohy a z každého horního menisku se sterilní pipetou jemně odsaje 1 ml supernatantu obsahujícího spermie (Henkel and Schill, 2003).

#### 4.2.2 Ředění ejakulátu pro kryokonzervaci

##### **Kryoprotektanty**

Kryoprotektanty rozdělujeme do dvou skupin podle schopnosti prostupovat buněčnou membránou na ty, pro které je plazmatická membrána buněk propustná (permeabilní), a ty, pro které je nepropustná (nepermeabilní), (Sieme, 2011).

Kryoprotektanty permeabilní membránou, jako ethylenglykol, glycerol, propylenglykol, DMSO (dimethylsulfoxid) a různé amidy (např. dimethylformamid, methylformamid) jsou obecně účinnější než kryoprotektanty membránou neprostupující. Kryoprotekce látek prostupujících membránou spočívá ve snížení teploty, při níž jsou buňky vystaveny kritické koncentraci solí (Sieme, 2011). Prakticky nahrazují vodu uvnitř buňky. Dehydratace buňky zabrání tvorbě intracelulárního ledu (Meryman, 2007).

Zvýšením objemu nezamrzlých kanálků v extracelulárních ledových krystalcích dochází ke zvětšení dostupného prostoru pro buňky a zároveň ke snížení koncentrace solí (Amann, 1999). Optimální kryoprotektant rychle prostupuje buňkou bez závislosti na teplotě a není toxický (Harrison et al., 1995).

Pro kryokonzervaci psího semene se jako hlavní kryoprotektant po řadu let úspěšně používá glycerol (Chaveiro et al., 2006), který má smíšenou intracelulární (nitrobuněčnou) a extracelulární (mezibuněčnou) reakci. Glycerol snižuje koncentraci solí a tímto způsobem se snižuje teplota tuhnutí v roztoku a riziko perforace plazmatické membrány spermie (Peña, Linde-Forsberger 2000a). Glycerol se používá v relativně vysoké koncentraci, která může být pro životaschopnost spermií při vyšších teplotách škodlivá. Proto se přidává do spermatu až po ekvilibraci (Fahy, 1986).

Dalším využívaným kryoprotektantem je ethylenglykol. Ethylenglykol má menší molekulární hmotnost než glycerol, což umožňuje rychlejší proniknutí a šíření uvnitř buňky než glycerol (Soares et al., 2002) a ve výsledku může snížit toxicitu a vyšší propustnost buněk (Massip, 2001). Opakovaným přidáváním a odstraňováním ethylenglykolu byly zjištěny minimální změny v buněčném objemu u spermií skotu ve srovnání s glycerolem (Guthrie et al., 2002). Nicméně výsledky prací porovnávající ethylenglykol a glycerol v psím spermatu jsou stále nedostatečné a rozporuplné (Rota et al., 2010).

Kryoprotektanty nepermeabilní membránou jsou cukry (laktóza, rafinóza, sacharóza, manóza a trehalóza), aminokyseliny, různé proteiny (lipoproteiny, včetně vaječných, mléčných a proteinů séra) a další makromolekuly (např. methylcelulóza, polyvinylalkohol a polyvinylpyrrolidon), (Sieme, 2011).

Nejpoužívanějším nepermeabilním kryoprotektantem je vaječný žloutek, který chrání buněčné membrány proti chladovému šoku a zabraňuje či obnovuje ztrátu fosfolipidů z buněčných membrán (Verstegen et al., 2005). Komponenty vaječného žloutku, zdá se, stabilizují membrány spermií, a tím neutralizují škodlivé vlivy během ředění a chlazení (Aurich, 2005). Je to komplexní biologická sloučenina obsahující bílkoviny, vitamíny, fosfolipidy, glukózu, antibakteriální látky a antioxidanty, z nichž většina jsou pro buněčnou membránu potenciálně užitečná (Huopalathi et al., 2007). Za pozitivními vlastnostmi žloutku stojí složka LDL – nízko denzitní lipoprotein (Moussa et al., 2002), která je tvořena především fosfolipidy, triglyceridy a proteiny (Anton et al., 2003). Mezi vlastnosti LDL patří například zvyšování antioxidantní aktivity, respektive snižování tvorby volných radikálů (Hu et al., 2011), či interakce s proteiny semenné plazmy, které mohou negativně ovlivnit stabilitu plazmatické membrány spermií v průběhu kryokonzervace, (Bergeron et al., 2003, Manjunath et al., 2002). V neposlední řadě je také možná interakce LDL s plazmatickou membránou spermií, a tím vytvoření ochranné vrstvy a její stabilizace (Bergeron et al., 2004). Vaječný žloutek má však mimo pozitivních účinků také negativní dopady na samotné spermie (Watson, 1981), existuje riziko mikrobiální kontaminace (Bousseau et al., 1998), a může interferovat při hodnocení spermií (Wall and Foote, 1999). Aktuálně byla prověřována možnost náhrady vaječného žloutku v ředidlech pro kryokonzervaci spermií jeho účinnou složkou – LDL (např. Bencharif et al., 2013). Samotná příprava frakce LDL, její následná konzervace a dialýza konzervačních látek před jejím použitím ale představují složitý proces (Moussa et al., 2002).

Přidání kryoprotektantů jako je glycerol nebo jiných komponentů, jako jsou vaječný žloutek, mléko, bovinní sérový albumin, polyvinylalkohol a liposomy v ředidle poskytne určitou ochranu pro spermie a minimalizuje nepříznivé účinky kryokonzervace (Katila, 1997). Úspěch kryokonzervace však závisí na mnoha dalších faktorech včetně interakce mezi kryoprotektanty, druhu ředidla, rychlosti chlazení, rychlosti rozmrazení a balení (Andrabi, 2007).

## **Lecitin**

Nízkodenzitní lipoproteiny (LDL) obsažené ve žloutku a lecitin by mohly být použity k nahrazení celého vaječného žloutku (Farstad, 2009). Optimální koncentrace LDL v ředidle je 8 % obj. (Briand-Amirat et al., 2007).

Aby se zabránilo použití látky živočišného původu, je v současné době zkoumán rostlinný lecitin (Farstad, 2009). Nadějný kandidát mezi lipidy na rostlinné bázi se jeví lecitin ze sójových bobů, mastná látka s vlastnostmi emulgátorů a složený z kyseliny fosforečné, cholinu, mastné kyseliny, glycerolu, glykolipidů a fosfolipidů. Pozitivní efekt lipidů není v žádném případě novým poznatkem. Již v roce 1946 některé studie na býčích spermích ukázaly, že lecitin by mohl být použit jako náhrada vaječného žloutku v ředidle pro býčí sperma (Phillips and Spitzer, 1946).

V poslední době bylo ředidlo na bázi sójového lecitinu použito například ke kryokonzervaci semene berana a výsledky plodnosti po umělé inseminaci se významně nelišily od výsledků dosažených při použití zmrazených spermií v ředidle BSA nebo vaječného žloutku (Fukui et al., 2008).

## **Ředidla**

Ředidla ke konzervaci semene obsahují především složky, které vykazují ochranný účinek na spermie, dodávají energii a udržují konstantní pH, osmotický tlak i koncentraci elektrolytů. Jak již bylo uvedeno výše, pro mrazení jsou nezbytné látky s kryoprotektivním účinkem, které chrání spermie před poškozením zmrazováním a rozmrazováním. K ředění semene psa se používají nejčastěji žloutkocitrátová ředidla, případně s přídavkem bikarbonátu, glukózy nebo fruktózy (nebo laktózy především v případě mrazení), dále ředidlo TRIS se žloutkem nebo pasterované mléko (Doležel a kol., 2001).

Používá se mnoho různých ředidel. Některá ředidla jsou komerční, jejich receptura je neznámá. Běžná ředidla pro zmrazení psiho spermatu obsahuje TRIS jako pufr, kyselinu citrónovou, glukózu nebo fruktózu jako zdroje energie, vaječný žloutek jako ochranu membrány a glycerol jako kryokonzervační činidlo (Peňa et al., 2003).

Bohužel, v mnoha publikacích se receptura na ředidla udává v gramech, což vede k záměně a chybám při stanovení konečné pH nebo osmolarity ředidla. Je důležité poznamenat, že například molekulární hmotnost TRIS se může lišit v závislosti na popisu produktu. Je-li zakoupen jako Trizma báze M. W., je 121,1, pokud je tris hydrochloridu M. W., je 157,6. V případě, že v receptuře je uvedena jednotka množství v mmol, je možné se této chybě vyhnout (Peňa et al., 2003).

Equex STM pasta se přidává k ředidlu k maximalizaci membránového ochranného účinku vaječného žloutku. Nicméně je důležité poznamenat, že tyto účinky jsou různé v závislosti na zdroji produktu. Maximálního příznivého účinku se dosáhne použitím zmíněného produktu od Nova Chemicals Inc., Sales Scituate, MA, USA (Peňa et al., 2003a).

### **Mléko a ředidla na bázi mléka**

Mléko a ředidla na bázi mléka jsou známa pro praktickou a efektivní ochranu spermií různých druhů. Na základě složení a dynamiky spermatické membrány jsou některé látky jako lipidy, mastné kyseliny a proteiny zapracovány do spermatu s cílem snížení poškození spermií v souvislosti s kryokonzervací (Curry, 2000).

Cílem studie Yasuyuki Abe et al. (2008) bylo umělé oplodnění psím spermatem zmrazeným s použitím ředidla odstředěného mléka a glukózy. Svůj výzkum navrhl na základě propuknutí ptačí chřipky a přepravy mrazeného psího spermatu s vaječným žloutkem. Se svým kolektivem zkoumal účinek použití odstředěného mléka a glukózy bez vaječného žloutku na motilitu a oplozovací schopnost kryokonzervovaného psího spermatu. Výsledkem studie bylo zjištění, že jednoduché ředidlo složené z odstředěného mléka, glukózy a glycerolu je pro kryokonzervaci psího spermatu stejně použitelné jako žloutkové ředidlo (Abe et al., 2008).

### **Vliv odstředěného mléčného ředidla a TRIS po zmrazení a rozmrazení na v morfologii psích spermií**

Baran et al. (2012) zaměřili svou studii na srovnání účinků zmrazení psího spermatu v pejetách v 0,1% v ředidle odstředěného mléka (SMG) s běžně používaným ředidlem TRIS-Fruktóza-kyselina citrónová (TFC). Bylo použito dvou ředidel 20% vaječného žloutku obsažených v TFC a 10% vaječného žloutku obsažených v SMG. Ke vzorkům chlazeného spermatu bylo dále přidáno 10% obj. glycerolu obsaženého v ředidle (za hodinu) při stejném poměru (konečný poměr glycerolu 5 %). Hodnocení bylo založeno na vlastnostech spermií v pejetách po rozmrazení, kdy použití ředidla SMG bylo stejně úspěšné jako použití ředila TFC (Baran et al., 2012).

<b>Ředidla</b>	<b>TFC</b>	<b>SMG</b>
<b>Motilita</b>	48,54 ± 8,27 %	51,97 ± 7,51 %
<b>Defekty akrozomu</b>	41,04 ± 9,44 %	51,17 ± 9,05 %
<b>Celkové morfologické defekty</b>	38,04 ± 11,60 %	46,67 ± 12,68 %

## **Kryokonzervace psího spermatu pomocí glukózy v TRIS – bez glycerolu**

Yu et al. (2014) se zabývali vývojem kryokonzervačního ředidla psího spermatu bez glycerolu za použití různých koncentrací glukózy. TRIS bylo srovnáváno s IRIS ředidly s 5% glycerolem. Progresivní motilita a životaschopnost (42 % a 41 %, v tomto pořadí) byly signifikantně vyšší u skupiny s 300 mmol glukózy než u ostatních skupin s nižší koncentrací glukózy ( $p < 0,05$ ). PS (phosphatidylserin) translokační index byl signifikantně nižší při použití 300 mmol glukózy a TRIS než u ředidel s glycerolem (85 vs 93,  $p < 0,05$ ), (Yu et al., 2014).

### **4.2.3 Ekvilibrace**

Předtím než dojde k zmrazení, se zředěné sperma ochladí na 4 °C a udržuje se v této teplotě proměnlivou dobu v závislosti na použitém protokolu (1 – 4 hodiny). Tento proces se nazývá ekvilibrace a umožňuje vyvinutí vyšší odolnosti spermií vůči chladovému šoku (Yu et al. 2002).

Mnoho studií nemá zcela vyhodnocené poměry chlazení nebo čas ekvilibrace před mrazením a použili libovolných hodnot. Seager (1969) navrhoval, že čas ekvilibrace nebyl důležitý, ale zamrazil pelety semene 3 h po odběru. Olar (1984) navrhoval, že pro skladování v pejetách by mělo být 1 h chlazení a 1 h ekvilibrováno nebo 2 h chlazení a 2 h před mrazením ekvilibrováno (Olar, 1984).

Cílem studie Suhee Kim et al. (2012) bylo vyvinout rychlý způsob zmrazení psího spermatu bez ekvilibrace za použití různých koncentrací kryoprotektantů a zmrazení v kapalném dusíku v 0,5 ml pejetách pomocí modifikační vitrifikace. Autoři došli k závěru, že zmrazování po dobu delší než 2 minuty v parách kapalného dusíku zvyšuje celkové abnormality v porovnání s přímým ponořením do kapalného dusíku. Nejvhodnější pro rychlé zmrazení psího spermatu bez ekvilibrace se jevila 5% koncentrace glycerolu. Držení pejet v parách kapalného dusíku po dobu 2 minut bylo pro úspěšné rychlé zmrazení dostačující. Tato metoda rychlého zmrazení psího spermatu je jednoduchá a efektivní a může pomoci získat znalosti pro pokusy vitrifikace ve velkých objemech psího spermatu (Suhee et al., 2012).

Dále bylo zjištěno, že spermie ponořené přímo do tekutého dusíku nepřežily po rozmrazení. V tomto experimentu bylo pozorováno pozoruhodného zlepšení v pohyblivosti, životaschopnosti a neporušenost membrány dokonce po vystavení tekutému dusíku po

krátkou dobu (1 min.) a pozoruhodné zlepšení bylo pozorováno při vystavení tekutému dusíku po dobu 2 minut (Suhee et al., 2012).

Závěrem studie bylo zjištěno, že nízká koncentrace glycerolu a krátké vystavení tekutému dusíku stabilizovalo rychlé mrznutí velkého objemu psího spermatu bez chlazení na 4 °C a poskytuje nejlepší vlastnosti spermie po mrazení a rozmrazení. Tato metoda je rychlá a jednoduchá a nevyžaduje zvláštní kryobiologické zařízení, což svědčí o její použitelnosti při technikách umělé reprodukce. Navíc výsledky naznačují přiblížení pro nové metody mrazení včetně vitifikace psího spermatu (Suhee et al., 2012).

#### **4.2.4 Balení**

Spermie se ukládají ve snadno identifikovatelných inseminačních dávkách. Jako obalu se využívá pejet o objemu 0,25 ml nebo 0,5 ml nebo je možné využít i aluminiových tub o objemu 5 ml (Strzezek et al., 2015).

V současné době je však nejběžněji zmrazené psí sperma baleno do pejet, protože představují několik výhod oproti jiným metodám balení. Jednak je to malé množství (zvyšují kapacitu ukládání), jednotné zmrazení, možnost značení důležitých informací pro identifikaci (jméno psa a identifikační číslo, datum odběru, název firmy, která provedla kryokonzervaci psího ejakulátu, či jiná důležitá data). V případě pohybu ID (příjem a výdej) je nutné tyto skutečnosti evidovat a evidenci zálohovat (Yu et al., 2002).

### **4.3 Hluboké zmrazování psího spermatu**

O hluboké zmrazení psího spermatu je velký zájem zejména ze dvou důvodů. Umožňuje jednak mezinárodní obchodování se spermatem a jednak zřízení genových bank plemenů z nadřazené genetické hodnoty. I když chlazené sperma umožňuje zajištění prvního cíle v mnoha případech, druhého cíle je možné dosáhnout pouze prostřednictvím hluboce zmrazeného spermatu. Kromě toho jsou mrazicí technologie důležitým nástrojem pro zachování ohrožených volně žijících druhů (Zindl et al., 2006).

Pokud je sperma hluboce zmrazeno, může být skladováno po mnoho let, aniž by došlo ke ztrátě oplozovací schopnosti; k zabřeznutí došlo po inseminaci spermatem, které bylo hluboce zmrazené po dobu 35 měsíců (Seager, 1976).

Stejně míry zabřeznutí lze dosáhnout jak při použití čerstvého, tak při použití hluboce zmrazeného semene. Při skladování semene při teplotě -196 °C po dobu 8 let bylo zaznamenáno pouze nepatrné snížení pohyblivosti spermií (Seager, 1975).

Při ochraně zmrazeného spermatu je nevyhnutelné zabezpečit konstantní teplotu. Musí se zabránit odpaření tekutého dusíku a mechanickým otřesům. Kolísání teploty, především její zvyšování během dlouhodobého uskladňování spermatu, negativně ovlivňuje jeho kvalitu (Gamčík, 1992).

I když v poslední době byly popsány i jiné metody (Alamo et al., 2005), psí sperma je nejlépe zmrazeno a udržováno v parách tekutého dusíku na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bylo zjištěno, že psí spermie mohou být zmrazeny po 2 - 3 dnech skladování při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bez významného snížení kvality ve srovnání se spermatem zmrazeným ihned po odběru (Hermansson and Linde Forsberg, 2006).

#### **4.3.1 Pomalé zmrazování psího spermatu**

Při pomalé mrazící metodě se spermatická frakce ejakulátu ředí žloutkokitrátem v poměru 4:1 a naředěné sperma se nechá 1 h při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pak se doředí stejným ředidlem s 20% glycerolem na konečné ředění 1:8. Naředěný ejakulát se ponechá další 2 hod při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a potom se zmrazuje ve zkumavkách pomalou metodou ( $1 - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  za min do  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dále  $3 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  za minutu do  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a přenese se do tekutého dusíku. Sperma psa je možné též mrazit v laktózoglycerolžloutkovém ředidle ve formě pelet. Nejlepších výsledků je dosahováno s ředidly obsahujícími TRIS (Kozumplík, 1992).

#### **4.3.2 Rychlé zmrazování semene**

Při těchto metodách se semeno zmrazuje hlavně v pejetách. Tekutý dusík slouží jako zmrazovací médium a celý proces zmrazování trvá 7 - 12 min (Gamčík, 1992).

Rychlost chlazení/mrazení v kritickém rozsahu teplot má značný význam při kryokonzervaci, protože určuje, zda spermie zůstanou v rovnováze s jejich extracelulárním prostředím, nebo se postupně „přechladí“ s rostoucí možností intracelulární tvorby ledu (Kumar et al., 2003).

V případě, že je rychlost ochlazování příliš vysoká, velké množství vody je ponecháno v buňce, což vede k intracelulární tvorbě ledu a buněčné smrti v důsledku poškození membrány. Na druhou stranu, v případě, že rychlost chlazení je příliš pomalá, se mohou buňky nadměrně smrštít a může dojít k velkému rozpuštění látky (Mazur, 1984).

Jedním z hlavních faktorů, které rozhodují o optimální rychlosti chlazení, je koncentrace glycerolu, které spermie snesou. Například se předpokládá, že optimální koncentrace glycerolu pro spermie prasat je přibližně 3 %, což vyžaduje poměrně vysokou



rychlost zmrazování (přibližně  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Psí spermie „tolerují“ vyšší koncentrace (4 – 5 %) a tím jsou zmrazovací poměry nižší ( $20 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), (Peña et al., 2005 a, b).

Chlazení psího spermatu je úspěšné mírným tempem ( $2 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) od  $4 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  pod bodem mrazu, (tedy od  $-7$  do  $-15$  nebo  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a mrazení je úspěšné rychlým tempem od  $-20$  do  $-50$  nebo  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (England, 1992).

Nicméně Dobrinski et al. (1993) ve své práci tvrdí, že celkově pomalejší chladicí a mrazicí rychlost od  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  z  $+3$  do  $-157\text{ }^{\circ}\text{C}$  zajistily lepší hodnoty motility než střední rychlosti od  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  od  $+3$  do  $-164\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo rychlé tempo od  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  z  $+3$  až  $-191\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro všechna ředidla testovaná při rozmrazení při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 2 min (Farstad et al., 1993).

Hay et al. (1997) porovnávali velmi rychlé zmrazení při  $-99\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , což mělo negativní dopad s velmi pomalým tempem zmrazení  $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , které mělo také negativní dopad, zatímco zmrazení tempem  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$  nebo  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$  mělo velmi dobré výsledky. Bylo testováno několik mrazících křivek využitelných pro zmrazování psího spermatu a má se za to, že zatímco chlazení tempem  $10$  až  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  za minutu v kritickém rozsahu  $-15/-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  je optimální obecně, chlazení tempem  $20$  až  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  za minutu je ideální pro psy (Peña, Linde-Forsberg, 2000b).

I když zmrazení v dusíku se stále používá v několika variantách kvůli jeho levnějšímu zařízení, několik studií ukázalo, že počítačem podporované mrazicí zařízení zlepší po rozmrazení životnost a rychlou pohyblivost (rychlé rozpohybování) spermií, protože umožňuje nastavení dvoustupňové ochlazovací křivky s rychlejším snížením teploty v průběhu prvního kroku, než postup za použití polystyrenové krabice (Schäfer-Somi et al., 2006).

### **4.3.3 Ultra-rychlé zmrazování - vitrifikace**

Vitrifikace je způsob kryokonzervace, který umožňuje průchod z kapalného do pevného stavu extrémním převýšením viskozity v důsledku vysoké koncentrace kryoprotektantů a velmi rychlým ochlazením. Existuje několik vitrifikačních roztoků, které jako základní kryoprotektanty obsahují dimethylsulfoxid, glycerol, ethylenglykol nebo jejich směsi (Massip, 2001).

### **Hodnocení kvality psího spermatu po pomalém a rychlém zmrazení**

Rota et al. (2005) se zabývali hodnocením kvality psího spermatu po pomalém a rychlém zmrazení. Polovina z  $0,5\text{ ml}$  pejet získaných z každého ejakulátu byla zmrazena v

parách kapalného dusíku (4 cm nad hladinou kapaliny), („rychlé zmrazení“), zatímco druhá polovina byla zmrazena v biologickém mrazáku rychlostí 0,5 °C/min. v rozmezí od 5 °C do -10 °C a 8 °C/min mezi -10 °C a -60 °C, a následně ponořena do kapalného dusíku („pomalé zmrazení“), (Rota et al., 2005).

Pomalé zmrazení výrazně zlepšilo celkovou motilitu, která vykazovala pomalejší pokles v čase, i když průměrná dráha a rychlostní přímka spermií byla nižší ve srovnání s vysokou rychlostí. Také počet intaktních membrán spermií byl výrazně vyšší v pomalém zmrazení vzorků, zatímco podíl spermií v jednořetězové DNA byl minimální po obou mrazicích postupech (Rota et al., 2005).

Batista et al. (2006) posuzoval vliv dvou mrazicích technik na kvalitu semene (motilitu, živé spermie a procento abnormalit spermií) po 1, 30, 60, 120 a 360 dnech po zmrazení. Při první byly spermie zmrazeny a skladovány v páře dusíku, při druhé byly zmrazeny a skladovány v ultra mrazáku při teplotě -152 °C (Batista et al., 2006).

Po zmrazení a rozmrazení se neukázaly žádné významné rozdíly v pohyblivosti spermií a v procentu živých a abnormálních spermií. Na druhou stranu, mikroskopické vlastnosti čerstvého spermatu byly ve vzorcích od jednotlivých mužů podobné, zatímco po zpracování a zmrazení spermatu byly u jednotlivých mužů pozorovány významné rozdíly ( $p < 0,05$ ), zejména motility. Tato inter-individuální variabilita byla zjištěna v obou mrazicích protokolech, což ukazuje, že „male-to-male“ variace v kvalitě spermatu po rozmrazení nezávisí na použité technice mrazení (Batista et al., 2006).

#### **4.4 Rychlost rozmrazení**

Rozmrazování představuje pro kvalitu zmrazeného spermatu kritický proces. Některé studie ukázaly, že tání je interval zodpovědný za většinu buněčných smrtí (Holt and North, 1994). Rychlost rozmrazení by se měla vyhnout smrtící rekrystalizaci intracelulárního ledu a hypotonickému stresu (Gilmore et al., 1996).

Optimální rychlost rozmrazování spermií je v korelaci s rychlostí tuhnutí. Psí spermie chlazené při 10 °C/min a rozmražené při 37 °C/min. po dobu 30 s (rychlé rozmrazování), (Yu et al., 2002) nebo 60 s ve vodní lázni při teplotě 70 °C po dobu 6 – 7 s (Linde-Forsberg, 2010) mají lepší pohyblivost po rozmrazení než ty, které jsou rozmrazeny pomalejším tempem (Yu et al., 2002). V této souvislosti je velmi důležité dodržet pokyny z centra, (kde proběhlo zmrazení) k rozmrazování, které by měly vždy doprovázet zásilku (Linde-Forsberg, 2010).

Je prokázáno, že spermie jsou zvláště citlivé na osmotický šok (Songsasen et al., 2002). K tomuto šoku dochází, když se buňky z hypertonického roztoku zprudka dostanou do izotonického roztoku, např. během rychlého rozmrazení. Zranění se vyskytují v určitých úrovních smrštění a otoky (Petrunkina et al., 2005).

Je dobře známo, že pro optimální přežití buněk je potřeba zvolit správnou rychlost pro zmrazování, jež musí být spárována s vhodnou rychlostí rozmrazování (Mazur, 1984). Obecně se předpokládá, že rychlé zmrazování vyžaduje rychlé rozmrazení pro ustálení osmotické rovnováhy, rehydrataci a obnovení lipidů konfigurace proteinu membrány. Při použití stejných metod balení a ředidel byly zaznamenány různé režimy zmrazování a rozmrazování psího spermatu. Byl popsán režim rozmrazování ve vodní lázni pro 0,5 ml PVC pejet, při teplotě 70 °C po dobu 6,5 s (Andersen, 1972), 70 °C po dobu 8 s (Farstad, 1984), 50 °C po dobu 30 s (Silva et al., 1995), 30 °C po dobu 30 s (Oettlé, 1982), 37 °C po dobu 2 minut a 55 °C po dobu 5 s (Dobrinski et al., 1993).

Kryokonzervace psích spermií s dostupnými technikami stále podstatně snižuje přežití spermií v pohlavních orgánech feny ze sedmi dnů (Doak et al., 1967) na 12 h nebo méně (Concannon and Battista, 1989), což je zvláště kritické. Vysoká variabilita kvality rozmrazeného spermatu a krátká životnost rozmrazených spermií in vitro ukazují, že současné metody nejsou optimální, což může částečně odpovídat za snížený výskyt březosti získané po umělé inseminaci ze zmrazeného spermatu (Peña et al., 2003).

### **Hodnocení kvality psích spermií po rozmrazení**

Cílem studie Corcini et al. (2016) bylo zhodnotit vliv přídavku plazmy vaječného žloutku (EYP) na kvalitu psích spermií po rozmrazení. V experimentu vyšly lepší výsledky motility spermií po rozmrazení (MOT), integrity membrány (INT) a kvality akrozómu (ACR) s 20% EYP než s 20% vaječným žloutkem ( $P < 0,05$ ), (Corcini et al., 2016).

### **Faktory ovlivňující kvalitu inseminační dávky**

Je dobře známo, že kryokonzervace způsobuje pokles pohyblivosti a životaschopnost spermií (Rota et al., 1999). Na úspěšnou kryokonzervaci mají vliv složení ředidla (Martins et al., 2012), centrifugace vzorku (Risopatrón et al., 2012) a použití různých kryoprotektivních látek (Bencharif et al., 2012).

### **Vliv koncentrace kryoprotektantu**

K dispozici je pouze omezený počet studií použití ethylenglykolu (EG) jako kryoprotektantu pro zmrazení psích spermií. Vanucchi et al. (1999) uvádí progresivní pohyblivost 62,9 % pro zmrazené sperma s použitím 5% EG jako kryoprotektantu. Soares et al. (2002) se dopracoval k podobným výsledkům se semenem, které bylo zmrazeno v ředidlech, jež obsahovala 0,25 nebo 0,5 molární EG. Studie prokázala, že 0,5 molární koncentrace EG zachovala lepší konstrukční celistvost plasmatické membrány (Vanucchi et al. 1999).

### **Vliv ředidla**

Oliveira et al. (2006) hodnotili in vitro psí sperma kryokonzervované v různých ředidlech. Hodnotil se vliv ředidel TRIS - vaječný žloutek 5% ethylenglykol, laktóza – vaječný žloutek 5% ethylenglykol a laktóza – vaječný žloutek 5% dimethylformamide na zachování životaschopnosti psích spermií po rozmrazení. Od každého z pěti psů byly získány tři ejakuláty. Sperma bylo balené v 0,5 ml pejetách a zchlazeno na 4 °C po dobu 120 min. Pejety byly zmrazeny 4 cm nad hladinou tekutého dusíku po dobu 15 min. a rozmrazeny ve vodní lázni při 37 °C po dobu 60 s a při teplotě 75 °C po dobu 7 s. Ihned po rozmrazení (čas 0) a za 30, 60, 90 a 120 min. byla hodnocena progresivní pohyblivost a vitalita psích spermií. Jako nejlepší varianta pro zachování kvality mrazeného ejakulátu se jevílo ředidlo na bázi laktózy a vaječného žloutku. Současně lze jako alternativní kryoprotektant doporučit dimethylformamid (Oliveira et al., 2006).

Peňa se svými spolupracovníky poukázal na příznivý účinek přidání Equex STM pasty do ředidla TRIS s vaječným žloutkem. Aktivní sloučenina v Equex STM pastě je dodecylsulfát sodný (SDS), ve vodě rozpustný aniontový detergent, který pravděpodobně působí snížením propustnosti lipidové fáze anebo ochranou funkce membrán řízením průtoku vápníku (Peňa et al., 2003a, Peňa a Linde Forsberg 2000b).

Součástí ředidla na bázi laktóza – vaječný žloutek byl ethylendiamin kyseliny tetraoctové (EDTA), ne však v TRIS – vaječném žloutku. EDTA působí jako chelatační činidlo omezující pohyb dvojmocných iontů přes plazmatickou membránu vázající vápník a hořčík. Výsledkem působení je snížení intracelulární koncentrace vápníku (Graham, 1996). To zabrání nebo zpozdí průběh kapacity podobných změn v rozmrazených spermiích, prodlouží dobu jejich dlouhověkosti při rozmrazování (Peňa et al., 2003).

**Složení mrazících ředidel používaných pro kryokonzervaci psího ejakulátu**

	TRIS vaječný žloutek 5% ethylen glykol	Laktóza – vaječný žloutek 5% ethylen glykol*	Laktóza – vaječný žloutek 5% dimethylformamid**
<i>TRIS</i>	3,025 g	-	-
<i>Kyselina citrónová, monohydrát</i>	1,7 g	-	-
<i>Fruktóza</i>	1,25 g	-	-
<i>Laktóza 11%</i>	-	50 ml	50 ml
<i>Glukóza-EDTA</i>	-	25 ml	25 ml
<i>Vaječný žloutek</i>	20 ml	20 ml	20 ml
<i>Ethylenglykol</i>	5 ml	5 ml	-
<i>Dimethylformamid</i>	-	-	5 ml
<i>Síran streptomycin</i>	0,10 g	-	-
<i>Equex STM Pasta**</i>	-	0,5 ml	0,5 ml
<i>Destilovaná voda</i>	do 100 ml	-	-
<i>pH</i>	6,86	6,91	6,97
<i>Osmolarita</i>	1220	1365	1289

\*Martin et al. (1979)

\*\* Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA

**Parametry spermií u bezprostředně rozmrazených spermií kryokonzervované ve třech ředidlech a rozmrazené při dvou teplotách**

Freezing extender	TR	PM (%)	NOR (%)	INT (%)	HOS (%)
TRIS 5% EG (T1)	1	34,8 ±7,4bA	84,4±8,9aA	49,7±4,7bA	55,5±7,0aB
	2	28,7 ±6,6bA	88,4±7,0aA	52,5±8,7bA	62,4±8,6aA
LAC 5% EG (T2)	1	37,7±8,4abA	78,0±5,2aA	67,6±4,1aA	58,8±7,8aA
	2	28,5 ±10,4bB	75,6±6,9bA	70,8±7,2Aa	65,0±9,6aA
LAC 5% DMF (T3)	1	45,5±11,3aA	65,3±14,2aA	56,7±7,5bA	49,2±6,6aA
	2	43,3±6,4aA	69,5±11,2bA	56,5±5,3bA	51,2±7,9bA

PM – progresivní pohyblivost, NOR – morfologicky normální spermie, INT - Normální strukturní integrita plazmatické a akrozomální membrány, HOS - funkční integrita plazmatické membrány, TR – rozmrazování, 1. 37 °C po dobu 1 min, 2. 75 °C po dobu 7 sekund a následně minimálně 1 min ve 37 °C ve vodní lázni, LAC – laktóza, EG – ethylenglykol, DMF – dimethylformamid

## **Antibiotika**

Protože většina ejakulátů ze zdravých zvířat je do určité míry kontaminována bakteriemi, přidávají se do ředidla antibiotika (Smole et al., 2010).

Nicméně mnoho antibiotik a antimikrobiálních látek má nepříznivý vliv na spermie (Aurich and Sparger, 2007) a navíc existují značné obavy o vzniku rezistence vůči antibiotikům (Catry et al. 2010).

Antibiotika se přidávají do ředidla například 0,1g/100ml dihydrostreptomycin nebo penicilin a streptomycin v poměru ředění 1:3 až 1:8. Závisí na koncentraci, která by měla být po naředění 100 až 150 milionů pohyblivých spermií na 1 ml (Seager, 1969).

## **Antioxidanty**

Bylo prokázáno, že kryokonzervace je doprovázena zvýšeným množstvím reaktivního kyslíku, pravděpodobně v důsledku změn v antioxidační bilanci spermií (Strzezek et al., 2012). Tato skutečnost může vyvolat změny ve struktuře a funkci plazmatické membrány spermie, což způsobí nižší citlivost, a tím i ztrátu plodnosti (Rota et al., 1995). V tomto směru je akrozomální membrána chráněna vaječným žloutkem proti výskytu spontánní aktivace (Iguer-Ouada and Verstegen, 2001). Celý vaječný žloutek obsahuje několik antioxidantů, mimo jiné fosvitin (fosfoprotein), vitamín E a C, které brání spermie před oxidačním poškozením (Michael et al., 2007).

## **4.5 Hluboce zmrazené psí sperma a transport**

Přeprava a umělé oplodnění hluboce zmrazeným spermatem (-196 °C) získaly roustoucí celosvětový zájem a začínají být velmi populární mezi chovateli (Iguer-ouada, Verstegen, 2001).

Použití zmrazeného psího semene je indikováno zejména, když je nutný transport na větší vzdálenost nebo pokud se použije genetický materiál psa v pozdější době. Zmrazení psího semene je poněkud složité a časově náročné. V belgickém chovatelském klubu Sing-Hubertus umožňují zamrazení psího semene pouze na Fakultě veterinárního lékařství v Gentu nebo Liège a teprve po schválení psa podle chovatelského klubu (Linde-Forsberger, 2010).

V roce 2010 bylo v Evropě k umělému oplodnění použito 50 – 55 % čerstvého, 10 % chlazeného a 35 – 40 % hluboce zmrazeného spermatu (Linde-Forsberger et al., 2010). Umělá inseminace z chlazeného či zmrazeného – rozmrazeného spermatu poskytuje hodnotný

genetický materiál v pozdější době a má řadu ekonomických a sanitárních výhod (Rijsselaere, Vam Soom, 2010).

Pejety by měly být důsledně označeny datem, jménem psa, plemenem, tetováním nebo číslem čipu a místem zmrazovacího centra. Nakonec jsou pejety umístěny do stojanu, který se nachází několik centimetrů nad hladinou kapalného dusíku (Schafer-Somi et al., 2006).

Změnou vzdálenosti pejet se semenem od hladiny tekutého dusíku, se vytvářejí různé mrazící poměry. Tuto „statickou metodu“ je snadné provádět, ale umožňuje pouze malou kontrolu nad skutečnou rychlostí tuhnutí. Opakovatelnost zmrazování se může zlepšit, použijeme-li programovatelné automatické zařízení zmrazení (= dynamická metoda), jako je malá digitální lednička Planer 10 TM nebo kostky ledu (Sy-Lab), které mohou být vhodné, má-li být současně zmrazen velký počet pejet (automatické programovatelné mrazničky jsou velmi drahé), (Schafer-Somi et al., 2006).

Podle způsobu kryokonzervace mohou být uloženy pejety v kapalném dusíku (obr. D) v případě potřeby po celá léta, dokud se nerozmrazí a neužijí k inseminaci feny, nebo mohou být přepravovány do zahraničí v nádobě „dry shipper“ (obr. C). Náklady na přepravu jsou však obecně vysoké v důsledku váhy nádoby, která činí 10 až 20 kg. Navíc mnoho leteckých společností a dopravních podniků se zdráhá je dopravovat. V poslední době byl představen nový, pro použití jednoduchý, „dry shipper 3L“ (ST Technologie, USA). Tato nádoba po naplnění váží pouze 4,5 kg. Vydrží zhruba čtyři dny a je určena pro jednosměrnou přepravu. Ve srovnání s normální přepravní nádobou dojde ke snížení nákladů na zhruba jednu čtvrtinu. Navíc u některých leteckých společností je možné tento nový „dry shipper“ vzít jako příruční zavazadlo (Linde-Forsberg, 2010).



Obrázek C: Kontejner s kapalným dusíkem „dry shipper“ používaný pro mezinárodní transport psího spermatu



Obrázek D: Kontejner s kapalným dusíkem používaný pro dlouhodobé skladování psího spermatu

Pravidla pro přepravu mrazeného psího semene jsou poměrně komplikovaná a v konkrétních zemích se liší. V některých státech, jako je Belgie, je převoz jednoduchý, zatímco jinde, například v Austrálii, jsou pravidla pro dovoz psího semene velmi přísná. Původní dovozní povolení, osvědčení o zdravotní nezávadnosti a několik sérologických testů (Brucella a Leptospiróza), tvoří jen část z řady požadavků. Dovoz chlazeného nebo hluboce zmrazeného psího semene do Belgie však v současné době nepodléhá žádným omezením vzhledem k nedostatku předpisů. Navíc pravidla pro import chlazeného semene mohou být odlišná od těch, která se vztahují na zmrazené sperma. Vynikající přehled předpisů a doporučení pro přepravu chlazeného a mrazeného semene pro mnoho zemí světa je zveřejněn na webových stránkách iVIS (<http://www.ivis.org/home.asp>). Je proto velmi důležité poradit dovozci či majiteli psa kontaktovat ministerstvo zemědělství (nebo místní orgán) a informovat je o současných pravidlech a nařízeních dané země. To by mělo být provedeno v dostatečném předstihu před plánovaným odběrem semene a přepravou, aby bylo možné provést všechny potřebné krevní testy a vyřídit zdravotní požadavky a dokumentaci (Rijsselaere et al., 2010).



## **Co by se mělo vědět o dovozu zmrazeného semene psa do ČR**

Je potřeba splnit požadavky Státní veterinární správy ČR pro import semene ze zahraničí, jež jsou uvedeny na stránkách [www.svscr.cz](http://www.svscr.cz). Při dovozu semene ze třetích zemí je nutné minimálně . 15 dní přede dnem předpokládaného dovozu podat na SVS ČR žádost o sdělení dovozních podmínek.

### **4.5.1 Dovoz semene do České republiky**

Jelikož dovoz spermatu psů ze třetích zemí není v rámci Evropské unie harmonizovaný, každý členský stát si dovozní podmínky stanovuje sám. Česká republika vyžaduje, aby zásilka spermatu byla při dovozu doprovázena stanovenými veterinárními podmínkami a veterinárním osvědčením (VO). Součástí osvědčení je potvrzení, že pes byl vyšetřen na leptospirózu a brucelózu a zároveň očkovan proti leptospiróze.

Veterinární podmínky se na základě žádosti vystaví do 14 dnů.

Nejdříve se musí poslat žádost o stanovení veterinárních podmínek pro dovoz spermatu psa například z USA do ČR na [epodatelna@svscr.cz](mailto:epodatelna@svscr.cz). V žádosti se uvede:

- počet dávek spermatu
- zda se jedná o chlazené či mražené sperma
- plemeno psa
- adresu vývozce
- adresa kliniky, resp. veterináře, u kterého bude zásilka spermatu po dovozu uložena
- místo vstupu do EU, tj. Pohraniční Veterinární Stanice, kde bude zásilka předložena ke kontrole
- tel. kontakt na příjemce a adresa, kam se má dovozní povolení zaslat.

Veterinární osvědčení musí být řádně vyplněné a potvrzené úředním veterinárním lékařem USA, tj. veterinářem, který má kulaté razítko. Na pohraniční veterinární stanici místa vstupu se musí minimálně jeden den předem zaslat vyplněná 1. část SVVD, která je na webových stránkách: <http://eagri.cz/public/web/svs/portal/obchodovani-vet-zbozi/svvd-ous/> (Zbořil, 2016).

#### **4.5.2 Vývoz semene z České republiky**

Pro vývoz spermatu mimo území EU musí být obecně splněny dovozní podmínky, které si stanovuje konkrétní třetí země. Zjištění příslušných dovozních podmínek, které se u různých států liší, není v kompetenci Státní veterinární správy (SVS stanovuje jen podmínky dovozu do ČR), dle veterinárního zákona je to povinnost vývozce. Aktuální veterinární podmínky pro dovoz (tranzit) lze získat od příslušného veterinárního úřadu v dané zemi (Zbořil, 2016).

## 5 Závěr

Při krátkodobé konzervaci lze skladovat semeno do pěti dnů a při kryokonzervaci prakticky neomezeně. Hlavní kroky zmrazení odebraného psího ejakulátu jsou: centrifugace, ředění, ekvilibrace, balení, zmrazování a rozmrazování.

- \* Standardně se využívá centrifugace při nastavení 700 g/ 5 min. Jako alternativu lze využít jednovrstevnou centrifugaci, díky níž lze pro kryokonzervaci vybrat nejkvalitnější spermie z ejakulátu.
- \* Ředidlo se používá žloutkocitrátové, případně s přídavkem bikarbonátu, glukózy nebo fruktózy (nebo laktózy především v případě mrazení), dále ředidlo TRIS se žloutkem nebo pasterované mléko.
- \* Jako hlavní kryoprotektant se nejčastěji využívá glycerol, alternativně lze doporučit dimethylformamid.
- \* V současné době je nejběžněji zmrazené psí sperma baleno do pejet, protože představují několik výhod oproti jiným metodám balení. Výhody: malé množství, jednotné zmrazení, možnost značení důležitých informací pro identifikaci. Používají se pejety o objemu 0,25 ml nebo 0,5 ml. Je možné využít i aluminiových tub o objemu 5 ml.
- \* Poměr chlazení nebo čas ekvilibrace: před mrazením pro skladování v pejetách by mělo být psí sperma 1 h chlazeno a 1 h ekvilibrováno nebo 2 h chlazeno a 2 h před mrazením ekvilibrováno. Ovšem s výbornými výsledky lze zmrazit psí sperma bez ekvilibrace za použití různých koncentrací kryoprotektantů a zmrazení v kapalném dusíku v 0,5 ml pejetách pomocí modifikační vitrifikace.
- \* Nízká koncentrace glycerolu a krátké vystavení tekutému dusíku stabilizuje rychlé mrznutí velkého objemu psího spermatu bez chlazení na 4 °C a poskytuje nejlepší vlastnosti spermie po mrazení a rozmrazení.
- \* Kvalita psích spermií s přídavkem 20% plazmy vaječného žloutku po rozmrazení má lepší výsledky na motilitu spermií, integritu membrány a kvalitu akrozómu než s 20% vaječným žloutkem.

## 6 Použitá literatura

- Abe, Y., Lee, D. S., Sano, H., Akiyama, K., Yanagimoto-Ueta, Y., Asano, T., Suwa, Y., Suzuki, H. 2008. Artificial Insemination with Canine Spermatozoa Frozen in a Skim Milk/Glucose-Based Extender. *Journal of Reproduction and Development*. 54 (4). 290 – 294.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. 1998. Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. *Journal of Andrology*. 9 (6). 367 – 376.
- Álamo, D., Batista, M., González, F., Rodríguez, N., Cruz, G., Cabrera, F., Gracia, A. 2005. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 °C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*. 63. 72 - 78.
- Amann, R. P. 1999. Cryopreservation of sperm. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds). *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1. New York. Academic Press. 773 – 783.
- Andersen, K. 1972. Fertility of frozen dog semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 13. 128 – 130.
- Andersen, K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*. 10. 1 – 4.
- Andrabi, S. M. H. 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos Taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Mini Review. *International Journal of Agriculture and Biology*. 9. 367 – 369.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beauréal, V., David-Briand, E., Rabesona, H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*. 83. 175 - 183.
- Aurich, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal reproduction science*. 89. 65 – 75.
- Aurich, C., Sperser, J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 67. 912 – 918.
- Baran, A., Ozdas, O. B., Sandal, A. I., Ak, K. 2012. Effects of Skim Milk Extender on Frozen-Thawed Canine Sperm Morphology. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11 (17). 3242 – 3246.

- Barber, J. Canine semen collection and evaluation (Proceedings) [online]. 1. 4. 2010 [cit. 2015-11-13]. Dostupné z <<http://veterinarycalendar.dvm360.com/canine-semen-collection-and-evaluation-proceedings>>.
- Batista, M., Alamo, D., González, F., Cruz, M. G., Gracia, A. 2006. Influence of the Freezing Technique (Nitrogen Liquid vs Ultrafreezer of -152 °C) and Male-to-Male Variation Over the Semen Quality in Canarian Mastiff Breed Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. 41. 423 – 428.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M-L., Barrière, P., Larrat, M., Tainturier, D. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70. 1478 - 1488.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barrière, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex<sup>®</sup> STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Research in Veterinary Science*. 93. 440 – 447.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Le Guillou, J., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Barriere, P., Tainturier, D. 2013. Canine-chilled Sperm: Study of a Semen Extender Made with Low-density Lipoproteins from Hen Egg Yolk Supplemented with Glutamine. *Reproduction in Domestic Animals*. 48 (2). 258–266.
- Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y., Manjunath, P. 2003. Low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk prevents binding of major proteins of bovine seminal plasma to sperm and lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 68. 170 - 170.
- Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y., Manjunath, P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 70. 708 - 717.
- Blach, E. L., Amann, R. P., Bowen, R. A., Frantz, D. 1989. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology*. 31. 283 – 298.

- Boomsma, C. M., Heineman, M. J., Cohlen, B. J., Farquhar, C. 2004. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 3. CD004507.
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guerin, B., Camus, A., Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50. 699 - 706.
- Briand-Amirat, L., Tainturier, D., Anton, M. 2007. Use of egg compounds for cryoprotection of spermatozoa. In: Huopalahti, R., Lopez-Fandino, R., Anton, M., Schade, R. (eds.). 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. 259 - 264.
- Catry, B., Van Duijkere, E., Pomba, M. C., Greko, C., Moreno, M. A., Pyörälä, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E. J., Ungemach, F., Törnele, K., Munoz-Madero, C., Torren-Edo, J. 2010. Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM), Reflection paper on MRSA in foodproducing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol Infect.* 138. 626 – 644.
- Cerolini, S., Pizzi, F., Gliozzi, T., Maldjian, A., Zaniboni, L., Parodi, L. 2003. Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. *World's Poultry Science Journal*. 59. 65 – 75.
- Clulow, J. R., Mansfield, L. J., Morris L. H. A., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 108. 298 – 308.
- Concannon, P. W., Battista, M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R. W. (Ed.). *Current veterinary therapy*. Philadelphia: W. B. Saunders. 1247 – 1259.
- Corcini, C. D., Goularte, K. L., Bongalhardo, D. C., Lucia Jr, T., Jardim, R. D., Varela Junior, A. S. 2016. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *First International Journal of Andrology*. 48. 114 – 115.
- Curry, M. R., 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 5. 46 – 52.
- Červený, Č., Komárek, V., Štěrba, O. 1999. *Koldův atlas veterinární anatomie*. Vydání 1. Grada. Praha. 701 s. ISBN: 80-7169-352-9.

- Červený, Č. 2011. Vademecum anatomie domácích savců pro studium a veterinární praxi. Nakladatelství Brázda, s.r.o. Praha. 272 s. ISBN 978-80-209-0389-1.
- Doak, R. L., Hall, A., Dale, H. E. 1967. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *Journal of Reproduction Fertility*. 13. 51 – 58.
- Dobrinski, I., Lulai, C., Barth, A. D., Post., K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post thaw viability of dog semen. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*. 47. 291 – 296.
- Doležel, R., Vitásek, R., Svoboda, D. F. 2001. Nemoci psa a kočky II. díl. In: Svoboda, M., F. Senior., D., Doubek, J., Klimeš, J. a kolektiv. Noviko, a. s. Brno. 1021 s. ISBN: 80-902595-3-7.
- Dorado, J., Gálvez, M. J., Morrell, J. M., Alcaráz, L., Hidalgo, M. 2013. Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*. 80. 955 – 962.
- Dubiel, A. 2004. Plan badania psa reproduktora w kierunku płodności. (Andrological examination of the stud dog-in polish). In: Dubiel A. (ed.). *Rozród psów*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej. Wrocław. 348 - 358.
- England, G. C. W., Allen, W. E. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*. 37. 373 - 381.
- Fahy, G. M. 1986. The relevance of cryoprotectant „toxicity“ to cryobiology. *Cryobiology*. 23. 1 – 13.
- Farstad, W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *Journal of Small Animal Practise*. 25. 561 – 565.
- Farstad, W. Semen cryopreservation in dog and foxes. 1996. *Animal Reproduction Science*. 12. 145 – 150.
- Farstad, W. 2000a. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53. 175 - 186.
- Farstad, W. 2009. Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (2). 336 – 341.
- Filipčík, R., Vágenknechtová, M., Hošek, J., Jarinkovičová, L. 2011. The effect of the age of dogs on their ejaculate. *ACTA UNIVERSITATIS AGRICULTURAE ET SILVICULTURAE MENDELIANAE BRUNENSIS*. Volume LIX (6). 45 - 50.
- Foote, R. H. 1964. Extenders for freezing dog semen. *American Journal of Veterinary Research* 104. 37 – 40.

- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., Okabe, K. 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean based semen extender (AndroMed) in sheep. *Journal of Reproduction and Development*. 54. 286 – 289.
- Gálvez, M. J., Ortiz, I., Hidalgo, M., Morrell, J. M., Dorado, J. 2015. Should single layer centrifugation of dog semen be done before or after the semen is colled? *Veterinary Record*. 176.
- Gamčík, P., Kozumplík, J., Mesároš, P., Schvarc, F., Vlček, Z., Zibrin, M. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda a. s. Bratislava SK*. 299 s. ISBN: 80-07-00540-4.
- Gamčík, P., Zibrin M. 1992. Semeno. In: Gamčík, P., Kozumplík, J., Mesároš, P., Schvarc, F., Vlček, Z., Zibrin, M. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda a. s. Bratislava SK*. 299 s. ISBN: 80-07-00540-4.
- Gamčík, P. 1992. Laboratórne vyšetovanie ejakulatu. In: Gamčík, P., Kozumplík, J., Mesároš, P., Schvarc, F., Vlček, Z., Zibrin, M. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda a. s. Bratislava SK*. 299 s. ISBN: 80-07-00540-4.
- Gilmore, J. A., Du, J., Tao, J., Peter, A. T., Critser, J. K. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 107. 87 – 95.
- Graham, J. K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 131 – 147.
- Guthrie, H. D., Liu, J., Critser, J. K. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 67. 1811 – 1816.
- Harrison, R. A. P., Ashworth, P. J. C., Miller, N. G. A. 1995. Assessment of sperm function under fertilizing conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 31. 25 – 30.
- Hay, M. A., King, W. A., Gartley, C. J., Leibo, S. P., Goodrowe, K. L. 1997. Canine spermatozoa – Cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*. 48. 1329 - 1342.
- Henkel, R. R., Schill, W. B. 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1. 108.
- Hermasson, U., Linde Forsberg, C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 65. 584 – 593.



- Hidalgo, M., Portero, J. M., Ortiz, I., Dorado, J. 2014. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. *Veterinary Record*. 175 (1). 1 – 6.
- Holt, W. V., North, R. D. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damaged in cryopreserved ram spermatozoa. 1994. *Biology of Reproduction*. 51. 414 – 424.
- Hu, J. H., Jiang, Z. L., Lv, R. K., Li, Q. W., Zhang, S. S., Zan, L. S., Li, Y. K., Li, X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 62. 83 - 87.
- Huopalathi, R., Lopez Fanadino, R., Rüdiger Schade MA (eds). 2007. *Bioactive Egg Compounds*. Springer – Verlag Berlin. Heidelberg. 259 – 262.
- Chaveiro, A., Liu, J., Engel., B., Critser, J. K., Woelders, H. 2006. Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability of water and glycerol: possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*. 53. 349 – 359.
- Christanelli, M. J., Squires, E. L., Amann, R. P., Pickett, B. W. 1984. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology*. 22. 39 – 45.
- Christiansen, Ib J. 1984. *Reproduction in the Dog and Cat*. British Library Cataloguing in Publication Data. London. 153 p. ISBN: 0-7020-0918-0.
- Iguer-ouada, M., Verstegen, J. P. 2001a. Evaluation of the „hamilton thorn computer-based automated system“ for dog semen analysis. *Theriogenology* 55 (3). 733 - 749.
- Iguer-ouada, M., Verstegen, J. P. 2001. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*. 55. 671 – 684.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Mongat, M., Zaeva, V., Krivokharchenko, I., Nawroth, F., Dessole, S., Katkov, I. I., van der Ven, H. 2005. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*. 10. 350 – 354.
- Jeyendran, R. S., Vandervan, H. H., Perezpelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human-sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70 (1). 219.

- Johnston, S. D. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Veterinary Clinic. North America.* 21. 545 - 551.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., Olson, P. N. S. 2001. *Canine and Feline Theriogenology.* W. B. Saunders Company. Philadelphia. 287 – 306.
- Karger, S., Arlt, S., Haimerl, P., Heuwieser, W. 2014. A systematic review of studies performing the hypo-osmotic swelling test to evaluate the quality of canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals.* 49 (1). 1 – 6.
- Katila, T., Combes, G. B., Varner, D. D., Blanchard, T. L. 1997. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology.* 48. 1085 – 1092.
- Katkov, I. I., Katkova, N., Critser, J. K., Mazur, P. 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology.* 37. 325 – 338.
- Katkov, I. I., Isachenko, V., Isachenko, E., Kim, M. S., Lulat, A. G. M. I., Mackay, A. M., Levine, F. 2006. Low- and high- temperature vitrification as a new approach to bio stabilization of reproductive and progenitor cells. *International Journal of Refrigeration: Revue Int. Du Froid.* 29. 346 – 357.
- Kim, S. H., Yu, D. H. Kim, Y. J. 2010. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology.* 73. 282 – 292.
- Kočárek, E. 2008. *Genetika.* Nakladatelství SCIENTIA, spol. s r. o. Praha 5. 211 s. ISBN: 978-80-86960-36-4.
- Kozumplík, J. 1992. Anatomie a fyziologie pohlavních orgánů plemeníků. In: Gamčík, P., Kozumplík, J. a kolektiv. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat.* Príroda a.s. Bratislava SK. 299 s. ISBN: 80-07-00540-4.
- Kuleshova, L. L., Lopata, A. 2002. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility.* 78. 449 – 454.
- Kumar, S., Millar, J. D., Watson, P. F. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.* 46. 246 – 253.
- Kumidiaka, J. 1993. Subjecting canine semen to the hypoosmotic test. *Theriogenology* 39 (6). 1279 - 1289.

- Kustritz, M. V. R. 2007. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology* 68 (3). 329 – 37.
- Kustritz, M. V. R. 2010. *Clinical Canine and Feline Reproduction: Evidence-Base Answers*. Wiley-Blackwell, Iowa. 246 - 249.
- Kutzler, M. A. 2005. Semen collection in the dog. *Theriogenology*. 64. 747 - 754.
- Kvapil, R., Kvapilová, R. 2007. *Průvodce psí reprodukci. J. Špičák – Tok*. Praha. 78 s. ISBN: 978-80-86177-21-2.
- Liebermann, J., Tucker, M. J., Graham, J. R., Han, T., Davis, A., Levy, M. J. 2002. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive BioMedicine Online*. 4. 146 – 150.
- Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practise* 21 (3). 467 - 485.
- Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. 1993. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 47. 313 – 323.
- Linde-Forsberger., C. 2010. Canine artificial insemination: State of the Art. In: *Proceeding 7<sup>th</sup> EVSSAR Congress*, Louvain-La-Neuve, Belgium. 22 – 26.
- Lopes, G., Simoes, A., Ferreira, P., Martins-Bessa, A., Rocha, A. 2009. Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Animal Reproduction Science*. 112. 158 – 163.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Menard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*. 67. 1250 - 1258.
- Martin, J. C., Klug, E., Gunzela, A. R. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction Fertility*. 27. 47 – 51.
- Martinez, A. I. P. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science* 82 (3). 209 - 224.
- Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Herraez, P., Anel, L., de Paz P. 2005. Sperm subpopulations in iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation proces. *Biology of Reproduction* 72 (2). 316 - 327.
- Martins, M. I. M., Justino, R. C., Sant'anna, M. C., Trautwein, L. G. C., Souza, E. E. 2012. Comparison of two different extenders for cryopreservation of epididymal dog sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 47. 293 – 294.

- Marvan, F. 2007. Morfologie hospodářských zvířat. 304 s. ISBN: 978-80-213-1658-4.
- Massip, A. 2001. Cryopreservation of Embryo of Farm Animals. *Reproduction in Domestic Animals*. 36 (2). 49 -55.
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*. 247. 125 – 142.
- Meryman, H. T. 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practise. *Transfusion*. 47. 935 – 945.
- Michael., A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P., Bosc., C. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 68. 204 - 212.
- Michael, A. J., Alexopoulos, C., Pontiki, E. A., Hadjipavlou-Litina, D. J., Saratsis, PH., Ververidis, H. N., Bosc., C. M. 2008. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology*. 70. 827 – 835.
- Miller, R. R. Jr., Cornett, C. L., Waterhouse, K. E., Farstad, W. 2005. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. *Cryobiology*. 51. 66 – 75.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 57. 1695 - 1706.
- Oettlé, E. E. 1982. Preliminary report: A pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *Journal of the South African Veterinary Association*. 53. 269 – 270.
- Oettlé, E. E., Soley, J.T. 1988. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Veterinary Medicine*. 59. 28 - 70.
- Oettlé, E. E. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reproduction Fertility* 47. 257 - 260.
- Olar, T. T. 1984. Cryopreservation of Dog Spermatozoa. 158 p. MS Thesis, Colorado University, Fort Collins.
- Olar, T. T., Bowen, R. A., Pickett, B. W. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*. 31. 451 – 461.

- Oliveira, E. C. S., Juliani, G. C., Marques Jr., A. P., Henry, M. 2006. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. (58) 6. 1116 - 1122.
- Olson, P. N., Behrendt, M. D., Amann, R. P., Weiss, D. E., Bowen, R. A., Nett, T. M., McGarry, J. D. 1987. Concentrations of carnitine in the seminal fluid of normospermic, vasectomized and castrated dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 48. 1211 – 1215.
- Pascal, M., Birțoiu, A. I. 2012. Freezing of dog's sperm: a review. *Romanian Biotechnological Letters*. 17 (5). 7709 - 7716.
- Pasqualotto, F. F., Sobreiro, B. P., Hallak, J., Pasqualotto, E. B., Lucon, A. M. 2005. Sperm concentration and normal sperm morphology decrease and follicle-stimulating hormone level increases with age. *Bju International* 96 (7). 1087-1091.
- Pašek, I. 2007. Zborník abstraktov, Komora veterinárnych lekárov, Demänovská dolina, 23. 22 s.
- Paulenz, H., Taugbøl, O., Hofmo, P. O., Skaarem, K. 1995. A preliminary study on the effect of dietary supplementation with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. *Veterinary Research Communications*. 19. 273 – 284.
- Payan-Carreira, R., Miranda, S., Nizanski, S. 2010. Artificial insemination in dogs. In: Manafí, M. (ed.). *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech. Rijeka. 51-78.
- Peña, A., I. Linde-Forsberger, C. 2000a. Effect of spermatozoal concentration and postthaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 54. 703 - 718.
- Peña, A. I., Linde-Forsberg, C. 2000b. Effects of Equex, one- or two- steps dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 53. 859 - 875.
- Peña, A. I., López-Lugilde, L., Barrio, M., Becerra, J. J., Quintella, L. A., Herradon, P. G. 2003. Studies on the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. *Reproduction of Domestic Animals*. 38. 27 – 35.
- Peña, A. I., Lugilde, L. L., Barrio, M., Herradon, P. G., Quintela, L. A. 2003a. Effects of equex from different sources on post thaw survival, longevity and intracellular  $Ca^{++}$  a concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 15. 1725 – 1739.

- Peña, F. J., Saravia, F., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez Martínez, H. 2005 a. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 28. 107 – 114.
- Peña, F. J., Saravia, F., Núñez – Martínez, I., Garía Herreros, M., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez Martínez, H. 2005b. Identifications of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post-thaw quality. *Journal of Andrology*. 26. 716 – 723.
- Peña, F. J., Nunez-Martinez, I., Moran J. M. 2006. Semen technologies in dog breeding: An update. *Reproduction in Domestic Animals* 41. 21-29.
- Petrunkina, A. M., Gröppler, B., Töpfer-Petersen, E., Günzel-Apel, A. R. 2005. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology*. 63. 1390 - 1406.
- Phillips, P. H., Spitzer, R. R. 1946. A Synthetic Pabulum for the Preservation of Bull semen. *Journal of Dairy Science*. 29 (7). 407 – 414.
- Pillich, R. T., Scarsella, G., Risuleo, G. 2005. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Experimentall Cell Research*. 306. 1 – 8.
- Procházka, Z. 1989. *Chov psů*. 256 s. ISBN: 80-209-0015-2.
- Rajmakers, M. T. M., Roelofs, H. M. J., Steegers, E. A. P., Steegers-Theunissen, R. P. M., Mulder, T. P. J., Knapen-Marten, F. C.M., Wong, W. Y., Peters, W. H. M. 2003. Gluthatione and gluthatione S-transferase A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 79. 169 – 172.
- Reece, W. O. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Praha. Grada Publishing spol. s r.o. 456 s. ISBN: 80-7169-547-5.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A. 2010. Technieken voor kunstmatige inseminatie bij de hond. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79. 464 – 468.
- Rijsselaere, T., Maes, D., Van den Berghe, F., Van Soom, A. 2011. Preservation and shipment of chilled and cryopreserved dog semen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 80. 248 – 253.

- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A. 2012. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*. 57 (6). 1669 – 1681.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Nizanski, W. 2012. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: An update after 10 years. *Reproduction in Domestic Animals*. 47. 204 - 207.
- Risopatrón, J., Muñoz, M., Sánchez, R., Sepúlveda, N. 2012. Cryopreservation of canine semen with different protein fractions of seminal fluid. *Criopreservación de semen canino noc diferentes fracciones proteicas del fluido seminal*. 22. 145 – 153.
- Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C. 1995. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C. *Theriogenology*. 44. 885 – 900.
- Rota, A., Peña, A. I., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science*. 57. 199 – 215.
- Rota, A., Rota, A., Martine, M., Milani, C., Romagnoli, S. 2005. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reproduction Nutrition Development*. 45. 29 – 37.
- Rota, A., Milani, C., Romagnoli, S., Zucchini, P., Mollo, A. 2010. Pregnancy and conception rate after two intravaginal inseminations with dog semen frozen either with 5% glycerol or 5% ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*. 118. 94 – 97.
- Salamon, L., Cremonesi, F., Groppetti, D. and Pecile, 2007. A Results of a Single Transcervical Endoscopic Insemination Using Frozen Semen in the Bitch. 29 (2). 187 – 189.
- Seager, S. W. J. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A.I. Digest*. 17. 6 – 16.
- Seager, S. W. J. 1976. Freezing and transportation of dog semen. VIII Int. Congr. Anim. Reprod., Krakow. 1251 - 1252.
- Seager, S. W. J., Platz, C. C., Fletcher, W. S. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility*. 45. 189 – 192.
- Schäfer, S., Holzmann, A., Arbiter, K. 1997. The influence of frequent semen collection on the semen quality of beagle-dogs. *Deutsche tierärztliche wochenschrift*. 104 (1). 26 – 29.

- Schäfer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D., Aurich, C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and membrane integrity of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*. 66. 173-182.
- Sieme, H. 2011. Semen Extenders for Frozen Semen. In: McKinnon, A. O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. 2964 - 2971. ISBN: 9780813819716.
- Silva, L. D. M., Verstegen, J. P. 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 44. 571 – 579.
- Silva, A. R., De Cássia Soares Cardoso, R., Uchoa, D. C., Machado, D. A., Silva, L. D. 2002. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Veterinary Journals*. 164 (3). 244 - 246.
- Smole, I., Thomann, A., Frey, J., Perreten, V. 2010. Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *Pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. *Reproduction in Domestic Animals*. 45. 737-742.
- Soares, J. M., Rossi, C. A. R., Mezzalira, A. Cecim, M. 2002. Etileno glycol na criopreservação de semen canino [[n1]] Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural*. 32. 649 – 655.
- Songsasen, N., Yu, I., Murton, S., Paccamonti, D. L., Eilts, B. E., Godke, R. A., Leibo, S. P. 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology*. 44 (1). 79 - 90.
- Squires, E. L. 2007. The role of omega-3 and -6 fatty acids in regulation of reproductive function in horses. The joint ADSA PSA AMPA ASAS Meeting Symposia, San Antonio, Texas, USA, July 8-12, 2007. *Journal of Animal Science*. 85. 492.
- Strom, B., Rota, A., Linde-Forsberg, C. 1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*. 48. 247 – 256.
- Strom Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Journal of Reproduction and Fertility*. 119. 201 – 206.



- Strzezek, R., Kozirowska-Gilun, M., Stawiszyńska, M. 2012. Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 15. 721 – 726.
- Strzezek, R., Polakiewicz, P., Kordan, W. 2015. The effect of two packaging systems on the post-thaw characteristics of canine sperm. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 18 (2). 249 – 253.
- Suhee, K., Yongcheol, L., Honghyun, Y., Young-Jun, K. 2012. Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. *Animal Reproduction Science*. 130. 111 – 118.
- Štourač, M., Labrousse, M. J. 2007. *Německá doga*. Milan Štourač. 239 s. ISBN: 978-80-239-8917-5.
- Vannucchi, C. F., Santos, S. E. C., Visintin, J. A. 1999. In vitro viability of canine spermatozoa frozen in tris-fructose-citric acid extender with ethylene glycol. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 36. 205 – 211.
- Verstegen, J. P., Onclin, K., Iguer-Ouada, M. 2005. Long term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology*. 64. 720 – 733.
- Wall, R. J., Foote, R. H. 1999. Fertility of Bull Sperm Frozen and Stored in Clarified Egg Yolk-Tris-Glycerol Extender. *Journal of Dairy Science*. 82 (4). 817 – 821.
- Watson, P. F. 1981: THE ROLES OF LIPID AND PROTEIN IN THE PROTECTION OF RAM SPERMATOZOA AT 5-DEGREES-C BY EGG-YOLK LIPOPROTEIN. *Journal of Reproduction and Fertility*. 62. 483 – 492.
- Webel, S. K., Spencer, J. D., Gaines, A. M. 2007. The role of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids in swine reproduction. The Joint ADSA PSA AMPA ASAS Meeting Symposia, San Antonio, Texas, USA, July 8-12, *Journal of Animal Science*. 85. 497 - 401.
- Yu, I., Songsasen, N., Godke, R. A., Leibo, S. L. 2002. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*. 44. 62 - 78.
- Yu, Il-Jeoung. 2014. Canine sperm cryopreservation using glucose in glycerol-free TRIS. *CRYOLETTERS*. 35 (2). 101 – 107.
- Zbořil, R. 24. 3. 2016. „písemné sdělení“.

- Zindl, C., Asa, C. S., Günzel-Apel, A. R. 2006. Influence of cooling rates and addition of Equex pasta on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (Canis lupus) and Mexican gray wolves (C. l. bailey). Theriogenology. 66 (6 - 7). 1797 – 1802.