

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Vliv ředidla ejakulátu býků na životaschopnost
kryokonzervovaných inseminačních dávek hodnocenou
průtokovou cytometrií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Simona Doležalová

Obor studia: Živočišná produkce

Vedoucí práce: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv ředidla ejakulátu býků na životaschopnost kryokonzervovaných inseminačních dávek hodnocenou průtokovou cytometrií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala zejména doc. Ing. Ludřku Stádníkovi, Ph.D. za ochotu a trpělivost při vedení této diplomové práce, dále Ing. Filippovi Savvulidimu za cenné rady a veškerou pomoc při vedení výzkumu, Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků, Ing. Martině Stádníkové, Ph.D. za její věcné rady a pomoc při zpracování a spolupracovníkům ze společnosti Natural s. r. o., kteří se účastnili výroby a zpracování inseminačních dávek. Dále děkuji celé své rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

Vliv ředidla ejakulátu býků na životaschopnost kryokonzervovaných inseminačních dávek hodnocenou průtokovou cytometrií

Souhrn

Diplomová práce je zaměřena na hodnocení vlivu ředidel na životaschopnost kryokonzervovaných inseminačních dávek, která byla posuzována pomocí průtokové cytometrie. V teoretické části jsou shrnuty základní informace o reprodukci skotu, fyziologické a morfologické vlastnosti ejakulátu býků a základní aspekty jeho hodnocení, dále také metody jeho zpracování, brané především z hlediska přídavku LDL do ředidel užívaných při kryokonzervaci. V praktické části je zjišťován vliv přídavku LDL (v koncentraci 0 %, 4 %, 6 % a 8 %) do ředidla na bázi sojového lecitinu Andromed[®]. Hypotézou této práce je předpoklad, že lze detekovat a kvantifikovat průkazné rozdíly v kvalitě parametrů spermií, úzce spojených s jejich životaschopností (tj. integrita buněčných membrán, funkčnost akrozomu, aktivita mitochondrií), v inseminačních dávkách po rozmrazení ve vztahu k typu aplikovaného ředidla. Na vybrané inseminační stanici byl odebírán ejakulát od předem vybrané skupiny plemenných býků (n = 5), a to s důrazem na jejich stejný věk, plemeno a podmínky výživy, ustájení a ošetřování. Odebraný ejakulát, splňující vstupní podmínky, byl podle daného schématu rozdělen na několik částí tak, aby vznikly různé kombinace přídavku LDL, délky ekvilibrace (120 nebo 240 minut) a typu mrazicí křivky (standardní 3-fázová nebo modifikovaná 2-fázová mrazicí křivka). Takto vyrobené inseminační dávky byly zmrazeny pomocí automatického mrazicího boxu a uloženy v kontejnerech s tekutým dusíkem (- 196 °C). Po rozmrazení (vodní lázeň 38 °C, po dobu 30 sekund) byly hodnoceny parametry životaschopnosti pomocí průtokového cytometru.

Statisticky průkazné výsledky dokumentují nejvyšší průměrné procento spermií s funkčními mitochondriemi při použití ředidla s 8 % přídavkem LDL (78,67 %), poté při 6 % přídavku (74,59 %) a 4 % přídavku (64,44 %). Nejnižší průměrné procento spermií s funkčními mitochondriemi bylo nalezeno při použití ředidla bez přídavku LDL (48,35 %).

Při hodnocení intaktnosti membrány a akrozomu ve vztahu k přídavku LDL dosáhl nejvyššího průměrného procenta spermií 6% přídavek LDL (34,17 %), poté 8 % přídavek (34,06 %) a následně 4 % přídavek (33,07 %). Nejnižší průměrné procento spermií s intaktní membránou a akrozomem bylo opět zaznamenáno u ředidla bez přídavku LDL (32,21 %). Tyto rozdíly však nebyly statisticky významné.

Při hodnocení parametrů životaschopnosti spermií byly navíc nalezeny statisticky významné rozdíly mezi býky ($P < 0,01$), je tudíž patrná jejich vzájemná individualita v odpovědi na metodiku zpracování ejakulátu. Taktéž byly nalezeny statisticky významné rozdíly v aktivitě mitochondrií a intaktnosti membrány a akrozomu ve vztahu k délce ekvibrace ($P < 0,01$) a v aktivitě mitochondrií ve vztahu k použité mrazicí křivce ($P < 0,05$).

Klíčová slova: býk, ejakulát, ředidlo ejakulátu, LDL, průtoková cytometrie, životaschopnost

Effect of bulls' semen extender on viability of cryopreserved insemination doses assessed by flow cytometry

Summary

This thesis is focused on the evaluation of the bulls' semen extender's effect on the viability of cryopreserved insemination doses as assessed by flow cytometry. The theoretical part summarizes basic information about reproduction in cattle, physiological and morphological properties of bull semen and basic aspects of its evaluation and methods as well as methods of its processing, especially the addition of low density lipoproteins (LDL) into extenders used for cryopreservation. The practical part presented the effect of LDL addition (at a concentration of 0 %, 4 %, 6 % and 8 %) into an extender based on soy lecithin Andromed[®]. The hypothesis of this work is the assumption that it is possible to detect significant differences in the post-thaw quality parameters of spermatozoa, closely related to its viability (i.e. integrity of cell membrane, acrosome intactness, mitochondrial activity), in insemination doses in relation to applied extenders. Semen was collected at the insemination station from a pre-selected group of breeding bulls (n = 5) with emphasis on their age, breed and nutritional conditions, housing and treatment. After initial evaluation, the collected semen was divided into several parts, according to the given scheme so as to produce different combinations of LDL addition, equilibration length (120 or 240 minutes) and type of freezing curve (standard 3-phase or modified 2-phase freezing curve). Insemination doses produced in this way were frozen using an automatic freezer and stored in containers with liquid nitrogen (- 196 °C). After thawing (38 °C water bath, for 30 seconds), parameters of viability were evaluated using a flow cytometer.

Statistically significant results documented the highest average percentage of spermatozoa with active mitochondria (calculated out of population of sperm cell with membrane and acrosome intactness) using an extender with 8 % addition of LDL (78.67 %), then with 6 % addition (74.59 %), and 4 % addition (64.44 %). The lowest average percentage of spermatozoa with active mitochondria was observed in the diluent without LDL addition (48.35 %).

When evaluating membrane and acrosome intactness related to LDL addition, the highest average percentage of spermatozoa with intact membrane and acrosome was observed in the

diluent with 6 % addition of LDL (34,17 %), then 8 % addition (34.06 %) and 4 % addition (33.07 %). The lowest average percentage of spermatozoa with intact membrane and acrosome was again recorded with the extender without addition of LDL (32.21 %). However, these differences were not statistically significant.

Furthermore, when evaluating the parameters of spermatozoa viability, statistically significant differences were found between bulls ($P < 0.01$), so their mutual individuality in the response to the semen processing is evident. There were also statistically significant differences in mitochondrial activity and membrane and acrosome intactness in relation to the length of equilibration ($P < 0.01$) and in mitochondrial activity in relation to the freezing curve used ($P < 0.05$).

Keywords: bull, sperm, semen extender, LDL, flow cytometry, viability

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
2.1	Hypotéza práce	11
2.2	Cíl práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Reprodukce, plodnost a hodnocení reprodukčních ukazatelů	12
3.1.1	Reprodukce.....	12
3.1.2	Plodnost.....	12
3.1.3	Reprodukční ukazatelé	13
3.2	Inseminace	16
3.3	Složení býčího ejakulátu	17
3.3.1	Semenná plazma.....	17
3.3.2	Spermie.....	18
3.3.3	Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu	19
3.4	Hodnocení ejakulátu	21
3.4.1	Makroskopické posouzení	21
3.4.2	Mikroskopické posouzení.....	21
3.4.3	Průtoková cytometrie	22
3.4.3.1	Princip průtokového cytometru.....	23
3.4.3.2	Uplatnění průtokového cytometru.....	23
3.5	Ředidla ejakulátu	26
3.5.1	Obecné složení ředidel	26
3.5.2	Bezžloutková ředidla	28
3.5.3	Žloutková ředidla	29
3.6	LDL – low density lipoprotein	30
3.7	Konzervace ejakulátu	31
3.7.1	Krátkodobá konzervace (+5 °C).....	31
3.7.2	Dlouhodobá konzervace (-196 °C).....	31
3.8	Mrazící křivky	33
4	Metodika	35
4.1	Inseminační stanice býků	35
4.2	Krmení býků	36
4.3	Odběr ejakulátu býků a jejich vstupní parametry	36
4.3.1	Vstupní parametry ejakulátu býků	37
4.4	Technologie výroby inseminačních dávek	37
4.4.1	Ředění a zpracování ejakulátu.....	37
4.4.2	Ekvilibrace a mrazení	38

4.5	Metoda hodnocení.....	39
4.5.1	Rozmrazování ID a jejich příprava pro cytometrickou analýzu.....	40
4.5.2	Hodnocení průtokovým cytometrem.....	41
4.6	Statistické vyhodnocení výsledků	43
5	Výsledky	45
6	Diskuze	53
7	Závěr	57
8	Literatura.....	58
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	65

1 Úvod

Skot je jedním z nejčastěji chovaných hospodářských zvířat. Jeho reprodukce patří mezi základní užitkové vlastnosti, které významně ovlivňují jak jeho masnou, tak i mléčnou užitkovost. Je to tedy komplexní vlastnost, která podmiňuje ekonomiku a celou podstatu chovu zvířat. Chovy v České republice se potýkají se zhoršujícími se reprodukčními ukazateli, průměrná úroveň plodnosti dojnice je nedostatečná a situace se tak stává dlouhodobě ekonomicky neudržitelnou. Plodnost ovlivňují jak genetické faktory, tak i faktory vnějšího prostředí. Na výsledku plodnosti dojnic se z velké části podílí i oplozovací schopnost spermie, která je dána parametry její životaschopnosti. Plodnost býka je reprezentována vstupní kvalitou jeho ejakulátu a výslednou inseminační dávkou. Hlavní ekonomická ztráta spočívá v tom, že se zvyšují náklady na ustájení, výživu a ošetřování právě těch býků, kteří toto kritérium nesplňují a jejich inseminační dávky nejsou schopné oplození, s čímž se poté zvyšují i náklady na ustájení nezabřezlých samic.

Nejrozšířenější biotechnologickou metodou u skotu je umělá inseminace (AI), která se nyní celosvětově využívá pro genetické zlepšení stád, a to hlavně v chovech mléčného skotu. Při využívání této metody se využívá hlavně kryokonzervovaných inseminačních dávek, které mohou být skladované po dlouhou dobu v tekutém dusíku (- 196 °C), čímž je velmi usnadněná jejich distribuce do celého světa. Proces výroby a konzervace těchto inseminačních dávek s sebou však přináší velké riziko poškození spermií, hlavně poškození jejich strukturální integrity a následné snížení motility. Ke všem těmto poškozením dochází hlavně kvůli chladovému šoku, ke kterému během kryokonzervace dochází. Proto je důležité vhodně vybrat ředící médium, zvolit správný postup chlazení, délku ekvilibrace a její teplotní podmínky a v neposlední řadě také zvolit správnou rychlost mrazení, čímž lze zajistit co nejvyšší počet spermií s kvalitními parametry životaschopnosti. Najít však optimální podmínky pro co nejkvalitnější zpracování ejakulátu je velmi obtížné, vzhledem k interakcím mezi různými aspekty jeho zpracování.

Životaschopnost spermií je účinným parametrem hodnocení ejakulátu. Ačkoliv normální ejakulát obsahuje obrovské množství spermií, ne všechny tyto spermie jsou životaschopné. Pojem „životaschopný“ ve svém nejzákladnějším smyslu znamená „živý“, ačkoliv existují i jisté faktory, kterou mohou životaschopnost spermií ovlivnit, nehledě na to, zda jsou spermie živé či mrtvé – čili ne každá spermie, která je živá, je životaschopná a má dostatečnou fertilizační schopnost. Primárním cílem analýzy spermií, ať už klasickou či novou inovativní technologií, je levně, rychle, a především objektivně předpovídat fertilizační kapacitu jakéhokoliv daného ejakulátu. Tato fertilizační kapacita lze předvídat na základě parametrů životaschopnosti spermií, kterými jsou hlavně funkčnost akrozomu, integrity plazmatické membrány a aktivita mitochondrií.

V současné době se stále více začíná k těmto analýzám využívat průtokového cytometru. Hodnocení průtokovou cytometrií bylo poprvé použito v 50. letech 20. století. Stává se více populární, a to hlavně kvůli rychlosti hodnocení – dnešní přístroje nabízejí možnost hodnocení několika detekovatelných fluorescenčních parametrů měřených v jedné buňce současně v jednu chvíli. I přes to, že je tato metoda nákladnější, nabízí průtoková cytometrie v laboratořích rychle kvalitně analyzovat a charakterizovat miliony buněk, čímž lze také docílit kvalitnější výsledné inseminační dávky.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Hypotéza práce

Hypotézou práce je předpoklad, že lze detekovat a kvantifikovat průkazné rozdíly v životaschopnosti spermií v inseminačních dávkách býků po rozmrazení ve vztahu k typu aplikovaného ředidla.

2.2 Cíl práce

Cílem práce je vyhodnotit vliv vybraných ředidel na parametry životaschopnosti spermií (integrita buněčných membrán, funkčnost akrozomu, aktivita mitochondrií) v inseminačních dávkách býků po rozmrazení.

3 Literární rešerše

3.1 Reprodukce, plodnost a hodnocení reprodukčních ukazatelů

3.1.1 Reprodukce

Reprodukce je biologický proces, při kterém organismus reprodukuje potomka, který je mu biologicky podobný. Reprodukce tak umožňuje a zajišťuje kontinuitu druhu, generaci po generaci. Je to životně důležitý faktor při určování efektivity živočišné produkce. V produkci skotu je dobrá reprodukční výkonnost nezbytná pro efektivní management a produkci jako celku, i když specifické reprodukční cíle mohou do určité míry záviset na místních podmínkách a na jednotlivých zemědělských systémech a cílech (Ball & Peters 2004). Je tedy ovlivněná jak genetickými vlivy, tak vlivy okolního prostředí (Bezdíček & Louda 2016). Z 30 % je reprodukční management ovlivněn poruchami reprodukce, z 20 % ošetřováním a krmením, inseminační technici ovlivňují reprodukci z 20 %, 10 % připadá na kvalitu ejakulátu a jeho oplozovací schopnost, 10 % na genetické vlivy samce a 5 % připadá na infekce a klimatické vlivy (Říha et al. 2003).

Reprodukční schopnost dojnic se v posledních desetiletích postupně snižuje, a to hlavně kvůli selekci na zvýšení produkce mléka a zlepšení chovného prostředí dojnic. Problémy s reprodukcí krav byly v posledních letech průběžně zkoumány, ale pouze z hlediska samic, výsledky rozmnožování krav jsou však kromě jiných faktorů ovlivněné také samčí složkou, kterou představuje hlavně oplozovací schopnost býčího ejakulátu (Beran et al. 2011).

3.1.2 Plodnost

Plodností rozumíme schopnost produkovat životaschopné potomstvo (Louda et al. 2008). Je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících rozmnožování a vývoj savců. Plodnost býků je definována jako schopnost spermií oplodnit a aktivovat vajíčko, udržet embryonální vývoj a obvykle je hodnocena určením vlastností spermií, jako je jejich morfologie a motilita (de Oliveira et al. 2013). U skotu se plodnost měří pomocí řady metrik, jako je například věk při dosažení puberty, interval telení, test nepřeběhlých (non-return test) a pregnancy rate dcer. Nejužitečnější metrikou pro hodnocení plodnosti u obou pohlaví je pravděpodobnost zabřeznutí v důsledku jediného páření s náhodně zvoleným, avšak plodným jedincem opačného pohlaví v době od 4 do 16 hodin po nástupu estru u samice (Taylor et al. 2018).

Plodnost lze chápat jako takzvaný smíšený efekt sestávající se ze samičí a samčí složky. Samičí složka, jinak zvaná mateřská nebo představující narozeného potomka, je závislá na vývinu dělohy, vaječníků a vejcovodů, počátku cyklicity ovulace po narození a v neposlední řadě také na projevu říje (Říha et al. 2000). Spočívá tedy ve schopnosti zabřeznout a ukončit tuto březost porodem životaschopného potomka. Samčí složka plodnosti, zvaná otcovská, zahrnuje úspěšné oplození vajíčka, které ovulovalo, a přenesení otcovské poloviny genetické informace na potomka (Bezdíček & Louda 2016). Oplozovací schopnost býka závisí na kvalitě jeho ejakulátu, která je dána objemem ejakulátu, hustotou spermií, jejich pohyblivostí a anatomickými a morfologickými faktory, a dále na schopnosti oplození krávy a přežití embrya,

čímž je jasně dána vzájemná souvislost mezi samčí a samičí složkou plodnosti (Říha et al. 2000).

Dědivost plodnosti je velmi nízká, pohybuje se v rozmezí 0,10 – 0,20, což vypovídá o tom, že podmínky prostředí ji ovlivňují více než genetické faktory jedince (Taylor et al. 2018). Nevyhovující plodnost je až z 60 % způsobena nedostatky v managementu a ze 40 % ve výživě a krmení dojníc. Často je možno plodnost zlepšit pomocí ekonomicky méně náročných opatření, jako je zlepšení organizace a řízení práce a sledování a evidence příznaků říje (Kvapilík et al. 2019). I přesto, že je heritabilita nízká, se se zkrácením generačního intervalu, kterého se docílilo zavedením genomické selekce, postupně opět dosahuje zlepšení plodnosti samic. A protože je genetická korelace mezi samčí a samičí plodností nízká, očekává se malé zlepšení samčí plodnosti jako korelační reakce na selekci plodnosti samic (Taylor et al. 2018). Z důvodu nízké heritability se tedy plodnost nemůže selektovat pouze u samic, ale musí se zaměřovat i na selekci býků. Ta se provádí především s ohledem na jejich schopnosti použití k plemenitbě, tj. na fyzickou schopnost krýt krávu, přizpůsobivost při odběru ejakulátu přes umělou vagínu a schopnost poskytnout velké množství ejakulátu (Říha et al. 2000).

3.1.3 Reprodukční ukazatelé

Výsledky reprodukce, které představují hlavně zabřezávání plemenic, jsou nezbytné při realizaci selekčních programů (Louda et al. 2008). Výsledky reprodukce lze hodnotit dle celé řady kritérií (Říha et al. 2003), avšak tyto ukazatelé se podchycují teprve po zařazení samic i samců do plemenitby (Říha et al. 2000).

Úroveň managementu reprodukčního procesu ve stádě a úroveň práce inseminačního technika a inseminační služby vyjadřují základní reprodukční ukazatelé (Louda et al. 2008). Mezi tyto ukazatele patří například test nepřeběhlých plemenic (non return test), zabřezávání po první inseminaci, zabřezávání po všech inseminacích, inseminační interval, servis perioda (SP), délka mezidobí, interinseminační interval, inseminační index, natalita krav (čistá i hrubá) a počet živě odchovaných telat od 100 krav (Říha et al. 2003).

Za ideální se považuje získání jednoho zdravého telete od krávy za 1 rok, a proto se reprodukce skotu méně efektivní než u ostatních druhů hospodářských zvířat, např. ovcí a prasat (Ball & Peters 2004). Dobré plodnosti krav odpovídají délka inseminačního intervalu do 75 dní, březost po první inseminaci nad 50 %, inseminační index do 1,5, délka servis periody do 100 dnů a délka mezidobí do 385 dnů. Při vysoké užitkovosti lze tolerovat prodloužení mezidobí na 400 dnů spolu s adekvátním prodloužením inseminačního intervalu a servis periody (Kvapilík et al. 2019).

Tab. 1 Počty prvních inseminací a zabřezávání po všech inseminacích (2000 – 2018)

Rok	První inseminace (tis.)			Březích po všech inseminacích (tis.)		
	Krávy	jalovice	celkem	krávy	jalovice	celkem
2000	466	185	651	426	177	603
2005	398	163	561	363	157	520
2015	349	154	503	321	149	470
2016	348	153	501	317	147	464
2017	342	151	493	315	146	461
2018	340	150	490	308	144	452

(ČMSCH, a.s., 2006; ČMSCH, a. s., 2019)

V Tabulce č. 1 jsou uvedeny údaje o počtech prvních inseminací a zabřezávání po všech inseminacích v letech 2000 – 2018. Počty prvních inseminací krav klesly během těchto let klesly z 466 tisíc na 340 tisíc. U jalovic nejdříve počty inseminací postupně klesaly, poté se mezi roky 2015 – 2018 držely na přibližně stejné hranici. V souladu s vývojem počtu prvních inseminací u krav i jalovic byly i výsledky zabřezávání u těchto dvou skupin – celkově se u krav i jalovic počty březostí po všech inseminacích snížily.

Z celkového počtu prvních inseminací v roce 2000 připadalo 48,1 % na holštýnské plemeno (H), 41,3 % na český strakatý skot (C) a 10,6 % na masný skot. V průběhu let 2000 – 2018 se u holštýnského plemene postupně procento zvyšovalo na 57,1 %, český strakatý skot klesl na 36,7 % a u masného skotu se procento z prvních inseminací snížilo na 6,2 % (viz. Tabulka č. 2). Přičemž nízký podíl inseminací krav masných plemen poukazuje na převažující podíl přirozené plemenitby u krav chovaných v systému bez tržní produkce mléka (Kvapilík et al. 2019).

Tab. 2 První inseminace podle plemenné příslušnosti býků (%)

Rok	1.insem. celk. (tis.)	Plemena – užitkové typy (% z prvních inseminací)				
		H	C	H + C	masná	celkem
2000	651	48,1	41,3	89,4	10,6	100,0
2005	561	53,2	40,6	93,8	8,0	100,0
2015	503	56,1	37,7	93,8	6,2	100,0
2016	501	56,2	37,0	93,2	6,8	100,0
2017	493	56,5	37,1	93,6	6,4	100,0
2018	490	57,1	36,7	93,8	6,2	100,0

(ČMSCH, a. s., 2006; ČMSCH, a. s., 2019)

Tab. 3 Mezidobí, servis perioda a inseminační interval

Rok	Délka (dnů)		
	insem. interval	servis perioda	mezidobí
2000	82,1	117,1	399
2005	83,7	124,3	404
2015	75,4	118,8	404
2016	74,2	116,6	401
2017	73,7	116,6	401
2018	74,5	116,5	397

(ČMSCH, a. s., 2006; ČMSCH, a. s., 2019)

V Tabulce č. 3 je porovnání základních ukazatelů reprodukce v průběhu let 2000 – 2018. Vzhledem k ekonomickému významu plodnosti by měly být krávy v současné době inseminovány po otelení poprvé v průměru o 10 dnů dříve a servis perioda a mezidobí by měly být o 10 – 15 dnů kratší. Výsledky chovů s vysokou užitkovostí a dobrou reprodukcí potvrzují, že lze tyto dva základní ukazatele v praxi úspěšně skloubit. Ztrátu z prodloužení servis periody nebo mezidobí nad optimální délku lze odhadnout na 50 – 70 Kč/den, resp. 1000 – 1400 Kč/pohlavní cyklus (Kvapilík et al. 2019).

Jelikož základní ukazatelé nedokázaly včas odhalit pokles výkonu reprodukce, bylo důležité tyto ukazatele doplnit o ukazatele novější, které by zjišťovaly míru výskytu březosti u krav. To představuje pregnancy rate (míra březosti) a průměrný laktační den stáda (DIM – days in milk). Pregnancy rate lze definovat jako podíl krav zabřezlých během určitého časového rámce z počtu krav vhodných k inseminaci. Logicky by tento časový rámec měl být 21 dní, a to proto, že je to typická délka estrálního cyklu. Výpočet pregnancy rate umožňuje posoudit nejen to, jak dobře krávy zabřezly, ale také jak rychle zabřezly (Niles et al. 2001). Výpočet pregnancy rate se dle Syrůčka & Burdycha (2015) provádí pomocí součinu poměru vyhledaných říjí (HDR – head detection rate) a procenta zabřezávání (CR – conception rate) dle vzorce:

$$PR_{21} = HDR \times CR$$

$$HDR = \frac{\text{počet dojnic inseminovaných po dobu 21 dnů}}{\text{počet dojnic schopných zabřeznout po dobu 21 dnů}}$$

$$CR = \frac{\text{počet březích dojnic}}{\text{počet inseminovaných dojnic}}$$

Dalším doplňkovým reprodukčním ukazatelem je průměrný laktační den stáda (DIM). Je jedním z nejdůležitějších kritérií stáda. Na úrovni jedince DIM vyjadřuje počet dní laktace, tedy od otelení pro jedno konkrétní zvíře, respektive konkrétní den laktace v aktuální den sledování/hodnocení. Nicméně, průměrný DIM stáda dokumentuje průměrný počet dnů od otelení v celém stádě, a tedy dokumentuje složení stáda z hlediska fáze laktace a tím efektivity produkce mléka. Ve stádech s dobrou úrovní managementu by měl být DIM kolem 160 – 170 dní (Boztepe & Aytakin 2017).

3.2 Inseminace

V systému chovu krav bez tržní produkce mléka jsou krávy zapouštěny býkem zařazeným do stáda. V přirozené plemenitbě je tento býk, na rozdíl od býků chovaných na inseminačních stanicích, více zatěžován pohybem na pastvině, a proto je frekvence připarování plemenic nepravděelná. Díky této skutečnosti navíc býci produkují menší množství ejakulátu, přičemž zabřezávání plemenic není nijak výrazně negativně ovlivňováno (Louda et al. 2007), a to hlavně proto, že v přirozené plemenitbě má ejakulát vyšší oplozovací schopnost oproti ejakulátu konzervovanému, používaném při umělé inseminaci (Juyena & Stelletta 2012).

Umělá inseminace je jednou z nejdůležitějších technik, která umožňuje využívat ty nejlepší jedince (Brito et al. 2012), díky čemuž lze usnadnit genetické zdokonalení zvířat v moderních chovech mléčeného skotu (Rehman et al. 2013; Murphy et al. 2018), dále zlepšit znaky reprodukce (Beran et al. 2011), předcházet pohlavním chorobám (Ball et Peters 2004) a zvýšit tak i rentability chovu skotu (Brito et al. 2012). V počátcích inseminace byly inseminační dávky, před jejich samotným použitím, uchovávané po krátkou dobu. Avšak implementace technologie hlubokého zmrazení zcela změnila selekční a šlechtitelské procesy. Vyšší intenzita páření a míra březosti krav a jalovic přinesly trvalý nárůst počtu narozených telat, v čemž hrála nezastupitelnou roli právě inseminace. Její celosvětové uplatnění bylo hlavním impulsem pro následné rozšíření dalších procesů, jako je například řízení estru, mrazení ejakulátu, sexování spermii, odběr, zmrazení, kultivace a přenos embryí a klonování (Beran et al. 2011).

Aby došlo k oplození vajíčka, musí se inseminace provést ve správném stádiu estrálního cyklu krávy. Je důležité, aby spermie kondenzovaly a staly se tak schopnými oplození a životaschopnými po dobu alespoň 24 hodin. Na to, aby se spermie do tohoto stavu dostaly, potřebují být v reprodukčním traktu samice alespoň několik hodin. Vajíčko se s největší pravděpodobností oplodní, pokud se do 6 hodin po ovulaci dostane do kontaktu se životaschopnými spermii. Optimální doba pro inseminace je tedy 12 – 24 hodin po začátku prvních projevů říje, čímž se zajistí, že spermie dorazí na místo oplodnění (většinou 1/3 vejcovodu) několik hodin před ovulací, která se obvykle objevuje přibližně 30 hodin po nástupu estru (Ball & Peters 2004). Období říje je charakterizováno zpočátku aktivním chováním plemenic, poté se chování mění na pasivní, kdy na sebe plemenic nechává skákat ostatní. Sliznice poševní předsíně je v tomto období zarudlá, vulva je edematická a vytéká z ní sklovitý hlen, který ulpívá na ocase a zádi (Říha et al. 2003). Dobrého načasování lze v praxi dosáhnout vyhledáváním říjí u krav alespoň 3x denně kromě doby dojení a krmení (Ball & Peters 2004).

Dnes je ejakulát využíván při inseminaci uchovávan a distribuován v plastových pejetách se zapečetěným koncem o objemu 0,25 ml nebo 0,5 ml, přičemž větší objem je dnes již méně častý (Ball & Peters 2004). Nejčastěji používanou metodou inseminace je rektální metoda (Říha et al. 2003). Při této metodě se používá speciální inseminační „pistole“ (Ball & Peters 2004), díky které se dá přímo obejít cervikální bariéra (Verberckmoes et al. 2004). Při této metodě inseminační technik uchopí děložní čípek skrz stěnu konečníku, přitáhne ho směrem k sobě a udržuje ho na takové úrovni, aby mohl druhou rukou zavádět inseminační „pistoli“ skrz vagínu přímo do uchopeného děložního čípku. Špička „pistole“ je zavedena pouze skrz děložní hrdlo, takže ejakulát je vpraven přímo do děložního těla. Pokud by špička „pistole“ nebyla v přesné linii s předním koncem děložního čípku, ale byla by vložena příliš daleko,

všechny ejakuláty by byly deponovány do děložního rohu, což je v případě inseminace nežádoucí (Ball & Peters 2004).

Pro potřeby inseminace je nejvhodnější kryokonzervovaný ejakulát, protože jeho způsob uchovávání umožňuje uskladnění inseminačních dávek po prakticky neomezenou dobu a genetický materiál od nejlepších býků je dostupný bez zeměpisných omezení. I při využití nejlepších technik během procesu kryokonzervace je nepříznivě ovlivňována přežitelnost a životaschopnost spermií, což znamená, že pro úspěch inseminace je také velmi důležitá i kvalita samotného ejakulátu (Lemma & Shemsu 2015).

3.3 Složení býčího ejakulátu

Ejakulát se skládá ze spermií suspendovaných v tekutém médiu zvaném semenná plazma (Juyena & Stelletta 2012).

3.3.1 Semenná plazma

Semenná plazma je komplexní tekutá část ejakulátu (Juyena & Stelletta 2012) druhově specifického množství a barvy (Jelínek et al. 2003) a pH, které se liší podle druhů, u býků a beranů je mírně kyselé (6,2 – 7,5). Složky, které plazma obsahuje, se vylučují ze sítě kanálků na zadní stěně varlete (*rete testis*), nadvarlat (*epididymis*) a přídatných pohlavních žláz samčího pohlavního ústrojí, do kterých patří měchýřkovité žlázy (semenné vázky), bulbouretrální žlázy a předstojná žláza (prostata). Hlavní část ejakulátu uvolněného při ejakulaci tvoří právě složky vyloučené z těchto přídatných žláz (Juyena & Stelletta 2012).

Plazma se skládá z minerálních látek, iontů (Na^+ , K^+ , Zn^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), energetických substrátů (fruktóza, sorbitol, glycerylfosfocholin), organických sloučenin (bílkoviny včetně cytokinů, kyselina citrónová, aminokyseliny, lipidy), alkalické fosfatázy, asparátu aminotransferázy, alaninu aminotransferázy, laktátu dehydrogenázy (Juyena & Stelletta 2012), biologicky aktivních látek (androgeny, estrogeny a prostaglandiny) (Jelínek et al. 2003) a v neposlední řadě se v semenné plazmě mohou vyskytovat i dusíkaté sloučeniny, jako například amoniak, močovina, kyselina močová, kreatinin, kyselina askorbová (Juyena & Stelletta 2012). Chemické složení a funkce výměšků přídatných pohlavních žláz se liší mezi jednotlivými druhy (Jelínek et al. 2003), mezi samotnými jednotlivci v rámci jednoho druhu, a dokonce i mezi různými ejakuláty od jednoho samce. Rozdíly v koncentracích některých prvků v semenné plazmě mohou být navíc způsobeny odchylkami ve výživě, managementem, hodnotícími metodami, působením enzymů přítomných v semenné plazmě a metabolickou aktivitou spermií rozptýlených v semenné plazmě (Juyena & Stelletta 2012).

S nástupem reprodukčních technologií bylo objeveno, že použití konzervovaného ejakulátu pro potřebu inseminace, která často zahrnuje rozsáhlé ředění nebo celkové odstranění semenné plazmy, vede k nižší míře plodnosti než při přirozeném páření. Tento důkaz naznačuje, že semenná plazma funguje jako médium usnadňující transport spermií a že její komponenty se účastní klíčových situací souvisejících s funkcí ejakulátu, oplozením a s vývinem embrya v reprodukčním traktu samic. Semenná plazma plní plno důležitých rozmanitých funkcí, mezi které například patří aktivace spermií a zvýšení jejich motility, prevence předčasné aktivace spermií během jejich fyziologické přepravy, stabilizace

plazmatické membrány pomocí inhibitorů kondenzace, zajištění ochrany ejakulátu před fagocytózou a destrukcí v zánětlivém prostředí, regulace transportu a eliminace spermií, působí jako pufr po zajištění optimálního osmotického tlaku a výživného média, pomáhá při interakci spermií a vajíček a při přípravě samičího reprodukčního traktu na vyvíjející se embryo, zejména usnadněním imunitních změn nutných pro přizpůsobení březosti (Juyena & Stelletta 2012). Je ale však známo, že semenná plazma má na oplozovací schopnost spermií i škodlivé účinky. Za tyto škodlivé účinky jsou zodpovědné dekonzenzační faktory a faktory inhibující motilitu. Kromě toho je semenná plazma škodlivá při uchování spermií, protože obsahuje faktory, které negativně ovlivňují životaschopnost spermií. Semenná plazma bývá totiž obsahuje skupinu úzce příbuzných bílkovin vázajících fosfolipidy (souhrnně zvaných BSP – phospholipid-binding proteins). Tyto BSP představují 65 % z celkového obsahu proteinů v plazmě, při ejakulaci se vážou na cholinové fosfolipidy plazmatické membrány spermií a umocňují kapacitaci spermií vyvolanou lipoproteinem s vysokou hustotou (HDL – high density lipoproteins) a heparinem, čímž se stimuluje snižování obsahu cholesterolu a fosfolipidu z membrány spermií. I přesto, že jsou v určité míře BSP pro spermie prospěšné, snižování obsahu lipidů je závislé na čase a koncentraci BSP, a proto může nepřetržitá expozice spermií semenné plazmě poškodit jejich membránu (Bergeron et al. 2004).

3.3.2 Spermie

Nejdůležitější složkou ejakulátu jsou spermie (Jelínek et al. 2003). Vyvíjí se uvnitř stěn semenotvorných kanálků varlat při procesu zvaném spermatogeneze. U býka tento proces trvá 65 dní, během této doby podstupují spermatogoniální kmenové buňky nejprve mitózu, pak meiózu a následně fyziologické a morfologické změny (Parisi et al. 2014). Velikost a tvar spermií jsou druhově rozdílné, jejich společným znakem je však jejich pohyblivost a schopnost oplození. Spermie má dvě hlavní části – hlavičku a bičík. Všechny její části jsou pokryty nepřerušovanou dvojitou cytoplazmatickou membránou, která spermii ochraňuje před vnějšími vlivy. Tato vrstva má charakter trilayeru, je acidorezistentní a vysoce permeabilní, čímž je umožněna látková výměna a také je i zvýšena citlivost na změny osmotického tlaku (Jelínek et al. 2003). Savčí spermie jsou příkladem polarizovaných buněk s vysoce členěnou plazmatickou membránou, která se dále dělí do tří oddílů – jeden pokrývající akrozom a další dva pokrývající bičík (respektive jeho střední a hlavní část), přičemž každý z těchto oddílů má různý obsah proteinů a lipidů. Většinou se tyto oddíly jeví jako relativně stabilní, existují však důkazy o tom, že mezi nimi probíhá výměna membránových komponentů jako reakce na působení vnějších podnětů. Tato reorganizace membránových složek během procesů vývoje, jako je zrání a kapacitace, je pro spermie klíčová, protože představuje mechanismus, který zajistí, že klíčové molekuly jsou ve správnou dobu na správném místě pro zprostředkování úspěšného oplození (James et al. 2004).

Hlavička spermie je ze stran oploštělá a má oválný tvar (Jelínek et al. 2003). Její přední část je kryta čepičkovitě utvářeným akrozomem (Věžník et al. 2004), což je struktura vázaná na membránu, přítomná nad jádrem spermií (Kumar et al. 2019), obsahující mukopolysacharidy a četné enzymy (Jelínek et al. 2003), které hrají zásadní roli při pronikání spermií skrz zonu pelucidu (ZP). Vazba spermií na zonu pelucidu vyvolává akrozomální reakci vedoucí k fúzi vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou vyústující v následnou vezikulaci

(Kumar et al. 2019). Akrozom je dobře barvitelný díky sníženému obsahu akrozomální hmoty mezi dvěma listy akrozomové čepičky (Věžník et al. 2004). Hlavička v sobě nese genetický materiál, který je lokalizovaný v nukleoplazmě, která vyplňuje celé jádro hlavičky. Nukleoplazma má kompaktní a homogenní strukturu, která se ze 45 % sestává z chromatinu (Gamčík et al. 1984). Chromatin je ve zralých spermích složen z DNA, která je obalená okolo nukleoproteinů, především protaminů, ale také některých histonů. Integrita chromatinu spermií je nezbytná také pro správnou fyziologii spermií a raný embryonální vývoj (de Oliveira et al. 2013). Jádra hlaviček spermií se od jader somatických buněk liší tím, že mají poloviční obsah deoxyribonukleové kyseliny a jejich chromatin je ve forma kompaktní hmoty, ne ve formě vláken (Gamčík et al. 1984).

Bičík a hlavička jsou spojeny krčkem (centriolovou částí), který je velmi krátký (2 – 3 μm) a jsou v něm uloženy dvě centrioly za sebou (Jelínek et al. 2003).

Pohybové ústrojí spermie představuje bičík, který je tvořen spojovacím oddílem, hlavním oddílem a terminálním oddílem (Jelínek et al. 2003). Spojovací oddíl je pokryt spirálním obalem tvořeným mitochondriemi. Mitochondrie tvoří závitnici o 70 – 80 závitích s pravotočivým směrem vinutí, přičemž 1 mitochondrie tvoří přibližně $\frac{3}{4}$ vinutí (Věžník et al. 2004). Celkem má býk v této části bičíku přibližně 90 mitochondrií (Jelínek et al. 2003). Tvoří se v nich ATP, a proto jsou tyto mitochondrie zřejmě zodpovědné za pohyb bičíku spermie (Rehman et al. 2013). Zdroj ATP na podporu motility spermií se však v oblasti výzkumu dlouhodobě diskutuje. Byly zvažovány dva hlavní mechanismy na výrobu energie, a to oxidativní fosforylace probíhající právě uvnitř mitochondrií uložených ve střední části bičíku nebo glykolýza probíhající v hlavním oddílu bičíku (Hung et al. 2008). Hlavní oddíl bičíku je 40 – 50 μm dlouhý (Jelínek et al. 2003) a pokrývá ji fibrózní pochva, která se skládá ze dvou longitudinálních prvků probíhajících souběžně s osovými vlákny. Tato pochva podporuje pružnost bičíku při jeho kmitavém a rotačním pohybu. Terminální část je dlouhá přibližně 4 μm a je tvořena volným ukončením nepropojených, na povrchu nefixovaných osobých mikrotubulů a volných dubletů (Věžník et al. 2004).

3.3.3 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu

Stejně jako u jiných druhů hospodářských zvířat, je i u býků plodnost výsledkem vzájemného působení fyziologických procesů, mezi které patří vývoj reprodukčního traktu, spermatogeneze, ejakulace, libido a kopulace (Kubovičová et al. 2015). Kvalitu ejakulátu lze popsat jako schopnost spermií přesunout se z místa deponace ejakulátu do místa oplodnění, dále jako schopnost proniknout oocytem a aktivovat jej k vývoji embrya. Lze ji definovat z hlediska motility, morfologie, integrity plazmatických membrán, metabolické aktivity a schopnosti akrozomu reagovat. Všechny tyto vlastnosti spermií jsou náchylné k mnoha faktorům (Sabés-Alsina et al. 2019), jako je například genetika, epigenetika a okolní prostředí (Parisi et al. 2014). Mezi tyto faktory patří plemenná příslušnost býka, kryptorchismus, věk jedince, jeho zdraví, výživa, ošetřování, podmínky prostředí nebo četnost sběru ejakulátu a jeho následné zpracování (Karoui et al. 2011; Stádník et al. 2015b). Další potenciální rizikové faktory pro sníženou kvalitu spermií jsou odběr ejakulátu a jeho následné zpracování, jelikož postupy při výrobě inseminačních dávek, hlavně výběr vhodného ředidla a metody mrazení, mají významný vliv na motilitu spermií po rozmrazení (Siddique et al. 2006).

Mezi vnitřní faktory řadíme hlavně faktory týkající se individuality plemeníka, jako je například jeho věk, genotyp a obvod varlat (Kubovičová et al. 2015). Primárními orgány, které produkují potřebné hormony a regulátory podílející se na tvorbě spermií, jsou hypotalamus, hypofýza a varlata. Tyto orgány produkují klíčové hormony – gonadotropin uvolňující hormon (GnRH), folikulostimulační hormon (FSH), luteinizační hormon (LH), testosteron a inhibin. Pokud mezi těmito hormony není udržena rovnováha, přestanou se produkovat normální spermie, s čímž by se mohla objevit neplodnost (Parisi et al. 2014). Beran et al. (2011) ve své studii došli k závěru, že aktivita spermií byla po odběru a zředění vyšší u holštýnského plemene, naopak po zmrazení a rozmrazení byla aktivita vyšší u českého strakatého skotu. Co se týká věku jedinců určitého plemene, je všeobecně známo, že objem ejakulátu a koncentrace a motilita spermií se zvyšuje s věkem býků (Kubovičová et al. 2015). Postupující věk u dospělých býků ale postupně přispívá ke zvýšení podílu abnormálních spermií jak v čerstvém, tak i v mraženém ejakulátu (Ahmed et al. 2014). Ve vysoké korelaci s věkem (Brito et al. 2012), produkcí spermií a jejich kvalitou hlavně u mladých býků je obvod varlat (Kubovičová et al. 2015). Existuje pozitivní korelace mezi objemem ejakulátu a obvodem varlat, naopak mezi motilitou spermií a frekvencí výskytu defektů spermií a obvodem varlat je korelace negativní (Brito et al. 2012)

Mezi vnější faktory řadíme složení krmné dávky, přídavek aditiv do krmiv, podmínky vnějšího prostředí, frekvence odběru ejakulátu, roční období a u druhů se sezónní pohlavní aktivitou i měsíc v roce (Kubovičová et al. 2015). Podnebí (teplo, chlad, vítr, vlhkost) může ovlivnit počet spermií, jejich morfologii i fyziologii (Parisi et al. 2014). Reprodukce skotu může být také ovlivněna tepelným stresem – při vysoké okolní teplotě nebo vlhkosti nejsou termoregulační mechanismy těla schopny zvýšit jeho tepelné ztráty a vnitřní tělesná teplota se tak zvyšuje nad fyziologické limity, což výrazně snižuje kvalitu ejakulátu (Brito et al. 2012). Proto byla teplota od 5 °C do 15 °C stanovena jako optimální pro produkci spermatu (Parisi et al. 2014). Je třeba také věnovat pozornost tělesné kondici býků (BCS – body condition score) – bylo zjištěno, že spermie býků s vyšším BCS (> 2,75) vykazovaly vyšší úroveň motility ihned po odběru a také nižší pokles motility po mrazení a následném rozmrazování (Beran et al. 2011). Dalším velmi důležitým faktorem ovlivňujícím množství a kvalitu odebraného ejakulátu je frekvence jeho odběru. Bylo zjištěno, že odběry ve dvoudenních intervalech ve srovnání s intervalem 3,5 dnů měly za následek snížení motility spermií, jejich koncentrace a zvýšení procenta výskytu abnormálních spermií a spermií s poškozenou membránou (Ahmed et al. 2014)

Velmi důležitým faktorem ovlivňujícím kvalitu ejakulátu je výživa, přičemž za zhoršení motility spermií, jejich morfologie, životaschopnosti a koncentrace může hlavně nedostatek kobaltu, zinku, jódu, vitamínu A, vitamínu E a některých jiných minerálních látek (Kubovičová et al. 2015). Vyvážená výživa je tedy důležitá hlavně během vývoje telat samců, protože má významný vliv na steroidogenezi varlat v důsledku zvýšené funkce Leydigových buněk (Parisi et al. 2014).

V neposlední řadě mají vliv na kvalitu ejakulátu i výrobní technologie inseminačních dávek, respektive použitá ředidla a proces a technologie uchovávání inseminačních dávek (Siddique et al. 2006).

3.4 Hodnocení ejakulátu

Při klinických andrologických vyšetřeních má hodnocení spermií prvořadý význam, neboť kvalita spermií poskytuje indikaci normality funkce varlat z hlediska počtu spermií, jejich životaschopnosti a normality morfologických znaků. Stejně tak poskytuje představu o normalitě epididymální funkce, tj. zrání spermií, se zobrazením správných morfologických znaků, a o aktivované motilitě po ejakulaci (Hossain et al. 2011). Při procesu hodnocení plodnosti samců, diagnostikování zdravotního stavu samčích reprodukčních orgánů (Hossain et al. 2011) nebo při posuzování metod uchovávání ejakulátu jsou nejdůležitějšími parametry životaschopnost spermií spolu s akrozomální integritou (Kumar et al. 2019). Nicméně úspěšné oplození a tvorba zygoty u savčích spermií do značné míry závisí na kapacitě a následné akrozomální reakci (Kumar et al. 2019).

3.4.1 Makroskopické posouzení

Vzhledem k tomu, že vzorky ejakulátu mohou vykazovat podstatnou odchylku, měly by být při teplotě 37 °C (aby se zabránilo teplotnímu šoku) vyšetřeny minimálně 2 řádně odebrané a přepravované vzorky, ideálně odebrané během 2 spermatogenních cyklů (Vasan 2011). Počáteční hodnocení vzorků ejakulátu se provádí ihned po odběru a zahrnuje hlavně posouzení jeho objemu a vzhledu, který by měl být u většiny druhů jednotný, tzn. téměř bílý vzhled (Cenariu et al. 2018; Mocé & Graham 2008). Patologicky může být seminální zabarvení způsobeno čerstvou krví, léky, žloutenkou nebo kontaminací ejakulátu močí. Fyziologicky nažloutlý nádech vzorků i po delší abstinenci je způsoben větším množstvím riboflavinu, zápach poté v tomto případě způsobuje oxidace spermií (Mocé & Graham 2008; Vasan 2011). Objem ejakulátu lze zjistit buď pomocí odměrných značek na sběrné zkumavce, přelitím ejakulátu do odměrného válce nebo zvážením vzorku (Mocé & Graham 2008).

3.4.2 Mikroskopické posouzení

Základní mikroskopická hodnocení jednoduše vyhodnocují základní proměnné vzhledu a životaschopnosti spermií, nemohou však odhalit strukturální detaily, biochemické a metabolické detaily nebo schopnost spermie integrovat s okolím (Hossain et al. 2011).

Mikroskopicky se posuzuje koncentrace spermií, aktivita, intenzita pohybu a morfologie spermií (Rodriguez-Martinez 2006). Dalším významným bodem během hodnocení ejakulátu je různá odolnost ejakulovaných spermií vydržet manipulační postupy (včetně ředění, chlazení, mražení a rozmrazování atd.), kterým jsou dnes spermie podrobovány během technologií užívaných při asistované reprodukci, jako je umělé oplodnění nebo *in vitro* oplodnění chlazeného, mraženého nebo sexovaného ejakulátu (Hossain et al. 2011).

Integrita membrány spermie je během mikroskopického hodnocení hodnocena intravitálními barvicími testy, které zaznamenávají změnu propustnosti membrány a odolnosti vůči hypoosmotickým stavům (HOS – hypoosmotic swelling). Princip tohoto testu vychází z předpokladu, že po průchodu tekutiny skrz nepoškozenou membránu živé spermie dochází, za hypoosmotických podmínek, ke zvětšování objemu a ke stáčení bičíků spermií. V tomto testu však mohou i spermie s hraniční celistvostí membrány vykazovat falešně pozitivní

výsledky, čemuž se dá vyvarovat pomocí kombinace tohoto testu se supravitálním barvením založeným na eosin-nigrosinovém zabarvení vzorků ejakulátu (Přinosilová et al. 2014).

Jako běžný nástroj analýzy ejakulátu v klinických laboratořích na celém světě je uznána pokročilejší počítačová analýza ejakulátu (Computer assisted semen analysis – CASA) popisující pohyby spermií prostřednictvím specifických parametrů motility. Tyto parametry jsou podrobnější a jejich objektivita má zásadní význam (Cenariu et al. 2018). CASA je vlastně automatický systém, který je navržen tak, aby poskytoval přesné, podrobné a smysluplné informace o koncentraci spermií, jejich životaschopnosti, dynamice nebo morfologii, a aby prováděl statistickou analýzu populace spermií založenou na vývoji kontinuálních snímků spermií, digitálním zpracování a analýze informací pomocí videokamery, videozáznamu a počítače (Le et al. 2014).

Většina rutinních hodnocení ejakulátu zahrnuje malé podvorky velkého heterogenního počtu spermií v ejakulátu. Z toho vyplývá, že získané výsledky mají vlastní velkou variabilitu, a je tedy potřeba analýzy většího počtu spermií. Pokračující inovace nových fluorescenčních technik usnadnily tento vývoj a se zjednodušením přístrojové techniky se zavádí průtoková cytometrie (Gillan et al. 2005; Hossain et al. 2011).

3.4.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technologie, která pomocí jednoho či více laserů rychle analyzuje jednotlivé protékající buňky nebo částice suspendované v pufovaném solném roztoku (McKinnon 2018). Je uznávanou metodologií a stala se výzkumným nástrojem při hodnocení ejakulátu zvířete určeného k chovu (Hossain et al. 2011). Práce s průtokovými cytometry vedla k umožnění měřit a hodnotit najednou více parametrů spermií, jako například jejich životaschopnost (integrita plazmatické membrány, akrozomální integrita, mitochondriální aktivita, struktura DNA a jiné) nebo reaktivita při vystavení exogenním podnětům, což jsou vlastnosti, které jsou v přímé vazbě s individuálním potenciálem plodnosti jedince (Hossain et al. 2011; Cenariu et al. 2018). Využití průtokových cytometrů tedy vede ke zvýšení našich schopností třídít spermie dle potenciální fertilizační kapacity nebo dle chromozomálního pohlaví (Hossain et al. 2011). Další výhodou při hodnocení průtokovým cytometrem je fakt, že lze analyzovat velké množství spermií ve velmi krátkém časovém úseku – až 10 000 – 15 000 spermií/sekundu, což je podstatně více než při hodnocení mikroskopickou analýzou (Gillan et al. 2005). Průtoková cytometrie (s možností třídění částic) má proto uplatnění ve více oborech, jako je imunologie, virologie, molekulární biologie a také při sledování infekčních chorob (McKinnon 2018).

Průtokové cytometry využívají lasery (LASER – akronym z anglického Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, tj. „zesilování světla stimulovanou emisí záření“) jako zdroje světla k produkci rozptýlených a fluorescenčních světelných signálů, které jsou čteny detektory, jako jsou například fotodiody nebo fotonásobiče. Tyto signály jsou převedeny na elektronické signály, které jsou analyzovány počítačem (McKinnon 2018).

Cytometry můžeme rozdělit na několik typů, z nichž jsou nejvyužívanější analytické a třídící. Analytické cytometry se používají výhradně pro analýzu buněk nebo jiných částic, zatímco třídící cytometry jsou schopny na základě výsledků analýzy fyzicky izolovat potřebné buňky nebo částice (Hossain et al. 2011).

3.4.3.1 Princip průtokového cytometru

Průtokový cytometr je v podstatě složen ze čtyř hlavních systémů – fluidiky, laseru, detektoru světla, řídicí elektroniky a softwaru. Suspenze buněk proudí skrz tubulární systém, na určitých místech (konkrétně v kyvetě) je vystavena laserovému osvětlení a zaznamenané emise (záření) z tohoto osvětlení jsou digitalizované a zpracované počítačem, díky kterému jsou poskytnuty srozumitelné výsledky (Hossain et al. 2011). Nejčastějšími lasery používanými v tradičních průtokových cytometrech jsou 405 nm (fialový), 488 nm (modrý) a 640 nm (červený). Existují však i jiné typy laserů, jako například ultrafialový s vlnovou délkou 355 nm (UV), poté 532 nm (zelený), 552 nm (zelený) a 561 nm (zelenožlutý) (McKinnon 2018).

Nosní tekutina, která protéká přes kyvetu průtokového cytometru v laminárním proudění, určuje směr a rychlost, kterou mají buňky mít při průchodu kyvetou. Během tohoto transportu je možné detekovat několik parametrů buněk, jako fluorescence, absorbance a světelný rozptyl, přičemž se využívá jednoho či více zdrojů světla (laserů) (Hossain et al. 2011). Rozptyl viditelného světla se měří dvěma různými směry – dopředným směrem (Forward Scatter = FSC), který udává relativní velikost buňky, a 90° směrem (Side Scatter = SSC), který udává vnitřní komplexitu nebo zrnitost buňky. Vzorky jsou pro fluorescenční měření připravovány pomocí barvení několika fluorescenčními barvivy, fluorescenčně konjugovanými protilátkami nebo pomocí transfekce a exprese fluorescenčních proteinů (McKinnon 2018), takže může být posuzováno více atributů spermií současně, což zvyšuje schopnost korelovat tyto atributy například na potenciální oplozovací schopnosti. Navíc to umožňuje získávat data z různých subpopulací v rámci vzorku, čímž vyhodnocuje heterogenní populace v různých stádiích aktivace. Analýza se tak stává objektivní, má vysokou úroveň experimentální opakovatelnosti a má tu výhodu, že dokáže pracovat buď s malými, nebo velkými vzorky (Hossain et al. 2011).

3.4.3.2 Uplatnění průtokového cytometru

3.4.3.2.1 Stanovení počtu spermií

Celkový počet spermií v ejakulátu a celkový počet spermií v pejetě jsou velmi důležitými ukazateli kvality a oplozovací schopnosti ejakulátu. Nicméně přesně určit počet spermií v celkovém objemu je velmi náročné a časově nákladné. Průtokové cytometry se v tomto případě jeví jako dobrá alternativa k určení celkového počtu spermií, a to hlavně proto, že dokáží rozlišit spermatické buňky od jejich pozůstatků, ale také i jiné buňky než spermie (Hossain et al. 2011).

3.4.3.2.2 Neporušenost spermií

Životaschopnost spermií a integrita plazmatické membrány. Životaschopnost je klíčová vlastnost určující kvalitu ejakulátu a také předpokládající úspěšné oplození. Životaschopnost je vhodný, nicméně nepřesný termín, protože neexistuje jasné vymezení mezi živou a neživou spermii. Pohyblivou spermii lze definovat jako životaschopnou, avšak termín „životaschopná spermie“ je často spojen s přítomností neporušené plazmatické membrány, která je klíčová pro interakce spermií s jinými buňkami a jejich prostředím. Většina testovacích souprav životaschopnosti tedy pouze vyhodnocuje, zda je plazmatická membrána porušená

nebo ne, a to pomocí barviv, která nemohou proniknout skrz neporušenou membránu (Hossain et al. 2011).

Membrána spermií je přímo nebo nepřímo spjata s mnoha funkcemi spermií, což zaručuje její schopnost udržet homeostázu, vykazovat pohyblivost a schopnost integrovat s okolním prostředím. Ačkoliv plazmatická membrána kryje celou buňku, skládá se z několika odlišných membránových oddílů – oddíl pokrývající vnější akrozómovou membránu, oddíl pokrývající post-akrozomální část hlavičky spermie a oddíl pokrývající celý bičík spermie. Nejčastější barvivo pro kontrolu membránové integrity používané při průtokové cytometrii je propidium jodid (PI), který rychle proniká do neživých spermií, a to hlavně kvůli jejich narušené plazmatické membráně. Nejčastěji používaná kombinace barviv určených pro kontrolu integrity membrány je SYBR-14 (Hossain et al. 2011), nově vyvinuté fluorescenční barvivo nukleových kyselin (Garner & Johnson 1995), a propidium jodid (PI), při jejichž použití jádra životoschopných spermií fluoreskují zeleně, zatímco ty s porušenou plazmatickou membránou jsou zbarveny červeně (Hossain et al. 2011).

Posouzení propustnosti a stability membrány spermií. Stabilita membrány a propustnost jsou dvě úzce propojené funkce. Hodnocení propustnosti membrány tedy objasňuje její organizaci a její schopnost podstoupit biofyzikální změny, jako je například i pohyb kryoprotekčních látek během kryokonzervace, která způsobuje nevratné poškození plazmatické membrány a následnou smrt buněk spermií. Při zjišťování membránové propustnosti se využívá nové fluorescenční barvivo YO-PRO-1 (Hossain et al. 2011), které za normálních okolností membránou neprostoupí, avšak po její destabilizaci může prosáknout skrz (Wronski et al. 2002). Dále se využívá barvivo zvané Annexin V, které je závislé na vápníku, a které se v poslední době používá pro detekci apoptotických buněk sledováním externalizace fosfolipidu fosfatidylserin (FS) v membráně spermie. V normálních zdravých buňkách se fosfatidylserin nachází na vnitřní okraji lipidové dvojvrstvy buněčné membrány, během procesu apoptózy však buněčná membrána prochází strukturálními změnami, které zahrnují translokaci fosfatidylserinu z nitrobuněčné strany plazmatické membrány na její extracelulární stranu. Při hodnocení integrity plazmatické membrány u kryokonzervovaných dávek se využívá kombinace barviv Annexin V a propidium jodid (PI), ale vzhledem k přítomnosti rozpadlých buněk a částic vaječného žloutku z ředidla by tato kombinace barviv mohla při použití průtokového cytometru nadhodnotit neobarvené subpopulace. A proto se využívají jiné kombinace barviv (Hossain et al. 2011).

Integrita akrozomu. Akrozom je membránou uzavřená struktura pokrývající přední část jádra spermie. Základním rysem spermií všech savců je fakt, že akrozom obsahuje silné hydrolyzující enzymy (Hossain et al. 2011), které hrají klíčovou roli při pronikání spermií přes zónu pelucidu (ZP) vajíčka (Kumar et al. 2019), proto je neporušený akrozom předpokladem pro úspěšné oplození (Rodriguez-Martinez et al. 1997). Dříve byla akrozomální integrita hodnocena *in vitro* pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem nebo pomocí světelné mikroskopie. Nedávno však byly vyvinuty barvicí techniky na bázi fluorescenční mikroskopie – barvení chlortetracyklinem (CTC) (Rodriguez-Martinez et al. 1997), kombinací lektinu z rostliny *Pisum Sativum* (PSA) konjugovaného s fluoresceinem isothiokyanátu (FITC) nebo kombinací rostlinného lektinu odvozeného z plodů rostliny *Arachis hypogaea* (PNA) a konjugovaného opět s fluoresceinem isothiokyanátu (FITC) (Hossain et al. 2011). PSA nemůže proniknout neporušenou membránou akrozomu, což znamená, že se obarví pouze spermie

s aktivovaným nebo poškozeným akrozomem. Váže se na manóзовé a galaktózové skupiny matrixu akrozomu, má několik nescifických vazebných míst na povrchu spermatických buněk a nescifickou vazebnou afinitu k částicím vaječného žloutku, které mají slabou fluorescenci a mohou tak být vyhodnoceny jako živé spermie s nepoškozeným akrozomem. O PNA se věří, že má méně nescifickou vazebnou afinitu na jiných oblastech spermie, a proto se považuje za vhodnou volbu při hodnocení spermií v ejakulátu, který byl naředěn médiem s přídatkem vaječného žloutku (Hossain et al. 2011; Rodriquez-Martinez et al. 1997).

3.4.3.2.3 Stav mitochondrií

Mitochondrie, umístěná ve střední části spermie, vytváří zřejmě hlavní část ATP potřebnou pro metabolismus a pohyblivost spermie. Kromě toho jsou mitochondrie v řadě buněčných systémů koordinátory mechanismu apoptózy, jsou zapojeny do procesu zrání spermií a hrají důležitou roli i při ochraně před poškozením indukovaným kryokonzervací (Hossain et al. 2011). K vyhodnocení mitochondriální funkce spermií se nejčastěji používají barviva JC-1, rhodamine 123 (R123) a MitoTrackerTM, která jsou transportována do aktivně respirujících mitochondrií a jejich nahromadění uvnitř těchto mitochondrií způsobuje, že spermie fluoreskují (Gillan et al. 2005). Intenzita této fluorescence závisí na celkovém počtu funkčních mitochondrií (Hossain et al. 2011).

3.4.3.2.4 Neporušenost chromatinu

Hodnocení integrity DNA spermie je nanejvýš důležité vzhledem k ranému vývoji embrya v závislosti na jeho normalitě (Hossain et al. 2011). Při normálním vývoji spermií je DNA uložena ve stabilní struktuře chromatinu, kde je plně odolná vůči denaturaci (Gillan et al. 2005). Během spermiogeneze, kdy je DNA do této struktury formována, nebo během dalšího formování chromatinu během epididymálního zrání nebo vlivem apoptózy může docházet k chromatinovým abnormalitám, čímž se může chromatinová struktura stát náchylnější k denaturaci a tím pádem může dojít i k poškození DNA (Hossain et al. 2011). Stav DNA spermie může být vyhodnocen pomocí metachromatických vlastností barviva zvaného akridinová oranž (AO) (Gillan et al. 2005), které při navázání na dsDNA (dvouvláknová DNA) produkuje zelené záření a při navázání na ssDNA (jednovláknová DNA) nebo na RNA produkuje záření červené. V živých buňkách akridinová oranž difúzně proniká cytoplazmatickou membránou a je uchovávána v buněčných částech s nízkým pH, tj. lyzozomech, což při vzrušení modrým světlem vede k jejich jasně oranžové fluorescenci. U buněk, které procházejí apoptózou, dochází ke ztrátě členění dle pH, proto akridinová oranž prosakuje z kyselých lyzozomů a difúzně se váže na molekuly RNA a DNA, což má za následek žluto-oranžovou fluorescenci v celé buňce (Byvaltsev et al. 2019).

Obarvování DNA je také základem při testech analýzy buněčného cyklu pomocí saturačního množství barviva vázajícího DNA. Ve většině případů jsou buňky fixovány 70% roztokem ethanolu. Teprve až poté jsou buňky obarveny barvivem. Existují však barviva, která se mohou dostat do živých buněk a obarvit DNA, aniž by buňku samotnou nějak poškodila. Takovýmto barvivem je například Hoechst 33342 (McKinnon 2018). Toto barvivo se také používá při sexování spermií, kde proniká skrz membránu spermií a váže se na jejich DNA (Hossain et al. 2011).

3.5 Ředidla ejakulátu

Spermie se vyznačují fluiditou plazmatické membrány a nízkým obsahem vody, díky čemuž jsou, vůči jiným buňkám, odolnější vůči poškození způsobené kryokonzervací. Ukázalo se však, že kryokonzervace i přes tento fakt vyvolává škodlivé změny struktury a funkce spermií. Tyto změny zahrnují tepelný stres způsobený změnami teplot (při chlazení, mrazení a rozmrazování), dále také osmotický stres způsobený přidáním kryoprotektivních činidel ve vysoké koncentraci nebo krystalizaci. To má za následek denaturaci bílkovin, smrštění buňky a nevratné poškození membrány (Khalil et al. 2018) způsobené ztrátou cholesterolu (Šimoník et al. 2019). Proto jsou zapotřebí fosfolipidy a kryoprotektivní látky, stejně tak i optimální ředění, ekvibrace a postupy chlazení, aby se předešlo chladovému šoku, omezila se krystalizace a minimalizovalo se tak poškození spermií (Khalil et. al 2018).

Ředění ejakulátu je proces, který vede ke zvýšení objemu zpracovávaného ejakulátu a tím ke zvýšení množství vyrobených inseminačních dávek, současně se ředěním vytváří podmínky pro přežívání spermií *in vitro* (Mutalík et al. 2014; Louda et al. 2007). Ředidlo je chemické médium používané pro konzervaci, ochranu a prodloužení životnosti spermií během zpracování, skladování a přepravy inseminačních dávek. Dobré ředidlo by mělo spermiím poskytovat energii pro jejich metabolismus, musí zajistit správný osmotický tlak, musí udržet stálou hodnotu pH vhodného pro býčí ejakulát (Rehman et al. 2013), musí mít dobrou pufrovací schopnost a musí obsahovat malé množství elektrolytu (Beran et al. 2014). Ředidlo také zabraňuje kontaminaci, a tak poskytuje spermiím ochranu před mikrobiálním růstem. Při kryokonzervaci ředidlo ochraňuje spermie před chladovým šokem, což umožňuje efektivněji využívat reprodukční potenciál samce (Rehman et al. 2013).

Jeden z hlavních způsobů, jak snížit negativní dopad kryokonzervace a zvýšit kvalitu inseminačních dávek je úprava nebo modifikace složení ředidel ejakulátů (Šimoník et al. 2019) a použití vhodné metody mrazení (Stádník et al. 2015a). Navzdory velkému významu přisuzovaného použitému ředidlu, nemáme však ani dnes ideální kryoprotektivní médium, které by mohlo zabránit ztrátě funkčnosti spermií během procesu mrazení a rozmrazování (Mutalík et al. 2014).

Všechna komerčně dostupná ředidla můžeme rozdělit na dvě velké skupiny – ředidla na bázi živočišných produktů, tzn. ředidla žloutková, a na ředidla na bázi rostlinných produktů, tzn. ředidla bezžloutková (Rehman et al. 2013; Kubovičová et al. 2015), mezi které patří ředidla s přísadkou sójového lecitinu (Nehring et al. 2005). Podrobněji se ředidla dají rozdělit dle použitých kryoprotektivních látek na ředidla s obsahem odstředěného mléka, ředidla na bázi rostlinných fosfolipidů a na ředidla s obsahem vaječného žloutku (Siddique et al. 2006). V posledních letech se do popředí dostávají i lipoproteiny s nízkou hustotou, jakožto komponenty vaječného žloutku, které měly výrazný vliv při zlepšení oplozovací schopnosti inseminační dávky uchovávané pomocí kryokonzervace (Amirat et al. 2005).

3.5.1 Obecné složení ředidel

Mezi základní stavební kameny ředidla v současné době patří Bi-destilovaná voda sloužící jako nosič ostatních komponent, kryoprotektiva, pufr, cukry, antibiotika, aminokyseliny a mastné kyseliny (Beran et al. 2014).

Kryoprotektiva se dělí na dvě skupiny – kryoprotektanty penetrující do spermie skrz plazmatickou membránu působící extracelulárně i intracelulárně a kryoprotektanty neprostupující do spermie, které působí pouze extracelulárně (Swain & Smith 2010). Jako konvenční penetrující kryoprotektant se v ředidlech používá glycerol, který brání nitrobuněčné krystalizaci, navíc bylo zjištěno, že s přidavkem glycerolu do ředidla se o 15 % zvýšila kvalita parametrů spermií po rozmrazení. Nicméně glycerol zvyšuje přechodný osmotický tlak vyskytující se před ekvilibrací, což ovlivňuje oplozovací schopnost spermií a tím i celkovou kvalitu ejakulátu (Rehman et al. 2013). Celkově kryoprotektivní látky zvyšují fluiditu membrány a částečně i dehydrataci buňky, snižují bod mrazu a tím snižují počet a velikost intracelulárních ledových krystalů vzniklých během procesu ochlazování, mrazení a opětovného zahřívání (Rosato & Iaffaldano 2013). Nepenetrující kryoprotektanty, mezi které ředíme cukry, aminokyseliny a bílkoviny, působí jako osmoprotektanty a zmírňují poškození způsobené pronikáním penetrujících kryoprotektantů do buňky. Navíc potlačují růst intracelulárních ledových krystalů, a to hlavně díky osmotickému tlaku, který vytvářejí díky své neschopnosti proniknout skrz plazmatickou membránu (Aisen et al. 2002). Mezi kryoprotektanty se řadí i „anti-freezing“ proteiny (AFPs), které byly poprvé extrahovány z krevního séra ryb z oblasti Antarktidy. Tyto makromolekuly mají extrémně vysokou afinitu k povrchu ledových krystalů, a proto se na ně specificky váží a inhibují tak jejich růst (Qadeer et al. 2015). Navíc jsou i schopny zabránit rekrystalizaci (Prathalingam et al. 2006). Díky této vlastnosti AFP chrání organismy tolerující nízké teploty. Tyto molekuly byly testovány během kryokonzervace býčího a beraního ejakulátu (Qadeer et al. 2015).

Pro zajištění energie v *in vitro* podmínkách a pro dosažení lepších výsledků po rozmrazení slouží spermiím kyselina citrónová, monosacharidy (glukóza, fruktóza) nebo disacharidy (sacharóza, trehalóza) (Uçan et al. 2016; Amirat et al. 2005). Přítomnost cukrů pravděpodobně zvyšuje odolnost membrán vůči morfologickým a fyzikálním změnám, čehož je dokázáno vznikem vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami cukrů a polárními konci fosfolipidů, čímž v podstatě nahrazují molekuly vody při dehydrataci spermií (Beran et al. 2014). Disacharidy jsou oproti monosacharidům výhodnější díky lepší osmotické dehydratační indukci a díky snížené tvorbě intracelulárních ledových krystalů. Disacharid trehalóza poskytuje ochranu tím, že interaguje se skupinami polárních částí fosfolipidů plazmatické membrány a snižuje van der Waalsovy interakce mezi uhlovodíkovými řetězci. Kromě toho trehalóza zvyšuje celistvost plazmatické membrány, osmotickou toleranci a snižuje předčasnou akrozomální reakci (Uçan et al. 2016; Ahmad et al. 2015).

Základní složkou jsou i pufrы, jako například citrát sodný, fosfáty nebo tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS). Tyto sloučeniny mají za úkol udržovat hodnotu pH v rozmezí 6,4 – 6,8, čímž se zabrání aglutinaci spermií. K aglutinaci dochází právě při sníženém pH, ke kterému dojde vlivem kyseliny mléčné, jakožto konečného produktu metabolismu spermií (Ball & Peters 2004). Jako nejlepší a nevhodnější ředidlo pro čerstvý i zmrazený ejakulát bylo zvoleno to, které obsahovalo TRIS, vaječný žloutek a glycerol. Dříve se používaly jako pufr fosfáty, ovšem kvůli své omezené viditelnosti pod mikroskopem byly omezeny (Rehman et al. 2013).

Obecně je čerstvý ejakulátu fyzicky zdatného býka prostý mikroorganismů. Ale, i za nejlepších hygienických podmínek, může dojít k určité mikrobiální kontaminaci ejakulátu, a to hlavně během fáze jeho odběru a zpracování (Meena et al. 2017). Při ředění růst bakterií

podporuje přítomnost cukru v ředidle a pokojová teplota (20 °C) během zpracování. Nejčastějšími kontaminujícími látkami jsou grampozitivní bakterie spolu s *E. Coli* a *Salmonella spp.* (Rehman et al. 2013). Před bakteriálními nebo virovými infekcemi chrání ejakulát antibiotika (Ball & Peters 2004). Bylo prokázáno, že některé bakterie v ejakulátu jsou odolné vůči jednotlivým antibiotikům, proto se začaly prosazovat různé kombinace více druhů antibiotik (Meena et al. 2017). Tyto nové kombinace by měly mít vysokou úroveň antimikrobiální účinnosti, ale zanedbatelný účinek na spermie (Gloria et al. 2014), protože přidavek antibiotik může ovlivňovat životaschopnost a oplozovací schopnost spermie (Meena et al. 2017). Směrnice 2003/43/EC stanovila obsah antibiotik do zředěného ejakulátu na tyto hodnoty: Streptomycin 500 µg/ml, Penicilin 500 IU/ml, Lincomycin 150 µg/ml a Spektinomycin 300 µg/ml (Gloria et al. 2014). Díky narůstající bakteriální rezistenci vůči antibiotikům se začínají stále více používat antimikrobiální peptidy (AMP – antimicrobial peptides). Jsou to pozitivně nabitě polypeptidy s až 100 aminokyselinami ve své molekule způsobující destabilizaci bakteriální buněčné membrány. Mají proto potenciál k tomu být nová generace antibiotik, a to hlavně díky svému širokému spektru působení, rychlému ničení bakterií a absenci vzniku a vývoje rezistence vůči nim. Avšak i tyto látky mohou být ve vysokých koncentracích pro spermie škodlivé z hlediska jejich motility a životaschopnosti. To lze přičíst nízké hladině cholesterolu v plazmatické membráně spermii. Je totiž známo, že přítomnost cholesterolu v membránách eukaryotických buněk snižuje potenciální cytotoxicitu antimikrobiálních peptidů (Wojcik et al. 2000). Proto by mohlo být zajímavé vyzkoušet kombinaci AMP spolu s cyklodextriny, navázané s cholesterolem, k určení, zda AMP mohou nahradit běžná antibiotika (Savvulidi et al. 2018).

3.5.2 Bezžloutková ředidla

Poptávka po alternativě vaječného žloutku v ředidlech se v posledních letech zvýšila kvůli variabilitě složení žloutku, riziku mikrobiální kontaminace a přítomnosti steroidních hormonů. Alternativou mohou být ředidla na bázi sóji nebo na bázi liposomů (Kumar et al. 2015). Další živočišnou alternativou může být homogenizované plnotučné mléko a čerstvé nebo rekonstituované odstředěné mléko. Jako náhrada mléka živočišného původu může posloužit mléko kokosové (Vishwanath & Shannon 2000).

Sójový lecitin je přírodní směs fosfatidylcholinu, mastných kyselin (stearová, olejová a palmitová) (Kumar et al. 2015), glycerolu, glykolipidů a fosfolipidů (Farstad 2009). Předpokládaný účinek sójového lecitinu je nahrazení fosfolipidů z plazmatické membrány, které se z ní ztrácejí během chlazení/mrazení/opětvném rozmrazování, anebo vytvoření ochranné vrstvy na povrchu plazmatické membrány (Šimoník et al. 2019). Bezžloutková ředidla na bázi kombinace lecitinu a glycerolu neobsahují žádné živočišné proteiny, tím se při jejich použití snižuje riziko přenosu patogenů a virů při udržení stejné oplozovací schopnosti spermie (Beran et al. 2014).

Průlomovou technologií při vývoji vhodného ředidla určeného pro kryokonzervaci je použití liposomů. Pro přípravu liposomů se používá optimální složení a koncentrace fosfolipidů a aktivní složky vaječného žloutku, které zajišťují aktivní ochranu buňky při kryokonzervaci. Lipidy, které tvoří lipozomy, nejsou na rozdíl od živočišných bílkovin vaječného žloutku

přenašečem infekčních látek. Přidání lipozomů do ředidel má velký význam kvůli tomu, že mají přesně stanovené složení a strukturu, přičemž obě tyto vlastnosti lze optimalizovat pomocí modifikace jejich fosfolipidového složení nebo jejich velikosti (Kumar et al. 2015)

Ředidla s přídavkem mléka obsahují laktózu, která nemůže procházet skrz plazmatickou membránu buňky, čímž se vytváří osmotický tlak v okolí buňky, který zabraňuje vnitřní buněčné krystalizaci. Díky mléčnému kaseinu jsou navíc redukovány i škodlivé proteiny vázající fosfolipidy (BSP), takže se snižuje i poškození lipidů buněčné membrány a zlepšuje se motilita a životaschopnost spermií. Z výzkumů z poloviny 20. století vyplývá, že ředidla obsahující glycerol a mléčnou složku, tj. ředidla na bázi mléčného glycerolu, učinila revoluci v kryokonzervaci ejakulátu (Rehman et al. 2013).

3.5.3 Žloutková ředidla

Náhly pokles teploty z +5 °C na -196 °C způsobuje poškození pohybového aparátu spermie a akrozomové čepičky (Shahverdi et al. 2013) a navíc snižuje celistvost plazmatické membrány a zvyšuje tak její propustnost, čemuž lze zabránit hlavně použitím ředidla s přídavkem glycerolu a vaječného žloutku (Rehman et al. 2013). Sušený vaječný žloutek slepice se skládá z 63 % lipidů a 33 % bílkovin. Čerstvý vaječný žloutek lze rozdělit ultracentrifugací na plazmu (78 %) a granula (22 %). Granula obsahují 16 % lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL), 4 % fosvitinu a 2 % lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL – low density lipoproteins). Naopak v plazmě žloutku je hlavní složkou právě LDL (66 %), vedlejší složkou jsou livetiny (10 %) (Anton 2007a).

HDL byly dříve známé jako lipoviteliny, spojují se dohromady s fosvitiny a tvoří tak granula. Ty jsou složena z bílkovin (75 – 80 %) a lipidů (20 – 25 %), z nichž je 65 % fosfolipidů, 30 % triglyceridů a 5 % cholesterolu (Anton 2007c). HDL způsobují vylučování cholesterolu z plazmatických membrán spermií, a tím dochází ke zvýšení citlivosti vůči chladovým šokům (Amirat et al. 2005).

Vaječný žloutek a lipoproteiny s nízkou hustotou jsou považovány za nepenetrující kryoprotektanty – působí extracelulárně, neprocházejí tedy plazmatickou membránou spermií. Mohou tedy buď chránit plazmatickou membránu, nebo působit jako rozpuštěná látka snižující bod mrazu média, čímž se snižuje možnost výskytu formování extracelulárních ledových krystalů (Vera-Munoz et al. 2010). Při kryokonzervaci se doporučuje maximální koncentrace vaječného žloutku do 20 % (Beran et al. 2014), protože v případě vyšší koncentrace může být žloutek pro spermie toxický (Vishwanath & Shannon 2000).

Bylo prokázáno, že vaječný žloutek zvyšuje oplozovací schopnost spermií uchovávaných v ředidlech při teplotě okolí, stejně tak i zabraňuje poškození spermií při chlazení a mrazení (Bergeron & Manjunath 2006). Nicméně kvůli svému živočišnému původu a obsahu HDL může vaječný žloutek představovat hygienické riziko a tím pádem i potenciálně negativní dopad na strukturu plazmatické membrány spermií (Stádník et al. 2015b). Navíc jsou ve žloutku přítomné substance, které inhibují respiraci spermií nebo snižují jejich motilitu, což zvyšuje požadavky na jeho nahrazení (Moussa et al. 2002). Proto se zvýšily snahy o nahrazení živočišných přísad ředidel za rostlinné nebo například za aktivní frakci LDL, což může všem výše uvedeným rizikům zabránit (Matalík, 2014; Stádník et al. 2015b).

3.6 LDL – low density lipoprotein

Vaječný žloutek se ze 2/3 skládá z LDL, které jsou obsaženy hlavně v tekuté části žloutku (v tzv. plazmě). Jsou to kulovité částice o průměru 17 – 60 nm a pH 6,3 – 7,5. LDL obsahují 83 – 89 % lipidů a 11 – 17 % proteinů. Lipidy LDL se skládají přibližně z 69 % triglyceridů, 26 % fosfolipidů a 5 % cholesterolu (Moussa et al. 2002).

LDL jsou sféricky tvarované a mají tekuté lipidové jádro, které se skládá z triglyceridů a esterů cholesterolu. Toto jádro je obklopené jednou vrstvou fosfolipidů, do které jsou začleněny apoproteiny a část cholesterolu (Moussa et al. 2002; Anton 2007b). Fosfolipidy hrají zásadní roli ve stabilitě struktury LDL, protože asociační síly jsou v podstatě hydrofobní (Moussa et al. 2002). Proto jsou LDL zodpovědné za kryoprotektivní vlastnosti vaječného žloutku a mohou tak chránit býčí spermie před chladovým šokem způsobeným během mrazení (Amirat et al. 2004; Pace & Graham 1974). Nejvyšší procento motility, akrozomální integrity i integrity membrány vykazovaly po rozmrazení spermie takového ejakulátu, který byl nařazen ředidlem s přídavkem LDL o koncentraci 8 % (Hu et al. 2011). Navíc LDL obsahují lipofilní antioxidanty, jako je α -tokoferol a ubichinol, sloužící jako ochrana proti zvyšování obsahu reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) během procesu kryokonzervace (Šimoník et al. 2019).

Extrakční proces získání LDL z vaječného žloutku zahrnuje z počátku nařazení získaného žloutku izotonickým solným roztokem (0,17 M NaCl), míchání této směsi po dobu 1 hodiny a odstředění při $10000 \times g$ po dobu 45 minut při 10 °C, přičemž po odstranění supernatantu je proces vždy opakován. Hlavním účelem této centrifugace je oddělení granulí vaječného žloutku od plazmy, která je následně uchovávána při 4 °C. Poté se do 100 ml plazmy přidá 20,5 g síranu amonného, čímž dojde k vysrážení livetinů, které jsou následně po dobu 45 minut odstřeďovány při $10000 \times g$. V tomto případě se vzniklý supernatant dialyzuje po dobu 10 hodin, a to za účelem eliminace síranu amonného a selektivní koagulace LDL. Na konci této dialýzy se směs opět odstřeďuje na $10000 \times g$ po dobu 45 minut a výsledný sediment (pelety) představuje LDL s čistotou 97 % (Amirat et al. 2004; Moussa et al. 2002).

Mechanismus ochrany spermií pomocí LDL však není plně objasněný. Spekuluje se o tom, že se LDL spojují s membránou spermie a poskytují spermiím ochranu stabilizací membrány. Další hypotéza je založena na tom, že fosfolipidy přítomné v LDL vytvoří na povrchu spermie ochranný film, nebo že nahradí fosfolipidy plazmatické membrány spermie, které se poškodily během procesu kryokonzervace (Hu et al. 2011; Bergeron & Manjunath 2006; Stádník et al. 2015b). Navíc, jak již bylo zmíněno, skupina proteinů vázajících fosfolipidy (BSP), přítomných v seminální plazmě, je škodlivá pro spermie při konzervaci, protože tyto proteiny indukují snižování obsahu cholesterolu a fosfolipidů z membrány spermií (Bergeron & Manjunath 2006). Tím může dojít k předčasné kapacitaci spermií nebo jejich vyšší citlivosti na chladový šok (Šimoník et al. 2019). Tyto proteiny však vzájemně interagují s LDL přítomnými ve vaječném žloutku, což minimalizuje odstraňování lipidů z membrány spermií a tím teoreticky snižují jejich poškození během kryokonzervace (Bergeron & Manjunath 2006).

Šimoník et al. (2019) zjistili, že LDL i sójový lecitin mají podobný vliv na zachování celistvosti plazmatické membrány spermie. Tím lze předpokládat, že by tyto dvě sloučeniny mohly působit synergicky.

3.7 Konzervace ejakulátu

V počátcích inseminace byly používány dávky uchovávané po krátkou nebo střední dobu, byly však prokázány negativní změny v membránách spermií ve vztahu k době skladování a použitému ředidlu (Beran et al. 2011). V současné době je více než 95 % inseminačních dávek uchováváno dlouhodobě, zatímco v ostatních případech se využívá čerstvý zchlazených ejakulátu, uchovávaný krátkodobě (Murphy et al. 2018; Verberckmoes et al. 2004). Obvykle obsahuje jedna inseminační dávka chlazeného ejakulátu 5×10^6 spermií, zatímco kryokonzervovaná dávka obsahuje 15×10^6 spermií. Zpracování chlazeného ejakulátu tedy přináší více oplození schopných inseminačních dávek z jednoho odběru, což usnadňuje větší využití geneticky lepších býků. Na rozdíl od mrazeného ejakulátu, která musí v Evropské unii projít třicetidenní karanténou, může být chlazený ejakulátu použit v den odběru, maximálně však po dobu 3 dnů po odběru (Murphy et al. 2018). Při inseminaci čerstvým ejakulátem lze, oproti kryokonzervovanému ejakulátu, použít inseminační dávky s menším objemem (Verberckmoes et al. 2004). Tento fakt je způsoben hlavně kvůli procesům probíhajícím během kryokonzervace, které mají negativní dopady na spermie. V důsledku toho spermie ztrácí svou oplozovací schopnost, díky čemuž klesá i celková kvalita inseminační dávky (Holt 2000).

3.7.1 Krátkodobá konzervace (+5 °C)

Použití čerstvého ejakulátu je převážně omezeno na Nový Zéland, dále se také používá v Africe, Francii, Austrálii, Německu a východní Evropě, přičemž při použití chlazeného ejakulátu v Evropě, jsou inseminační dávky obvykle skladovány při teplotě 5 °C v ředidle na bázi TRIS-glycerolu, které se standardně používá při kryokonzervaci ejakulátu. Na Novém Zélandu jsou dávky naopak kvůli dobrým výsledkům plodnosti skladovány při pokojové teplotě (15 – 27 °C), pod plynným dusíkem v Caprogenovém® ředidle (Verberckmoes et al. 2004), které je na bázi vaječného žloutku (Murphy et al. 2018). Verberckmoes et al. (2004) ve své studii uvedli, že inseminační dávky chlazeného ejakulátu by měly být použity nejpozději do 3 dnů, avšak dosáhli skladování až po dobu 8 dnů bez výrazné snížení míry plodnosti, a to hlavně v ředidlech připomínajících iontové složení plazmy ocasu nadvarlete a v TRIS ředidle s 10 % obsahem vaječného žloutku. Al Naib et al. (2011) ve své práci navíc zjistili, že si ejakulát skotu uchovávaný po dobu 7 dnů při teplotě okolí zachovává svou schopnost oplodnit oocyt *in vitro*, nicméně však klesá schopnost spermií migrovat skrz hlen *in vitro*.

Díky všem těmto faktům je největší nevýhodou inseminačních dávek chlazeného ejakulátu právě jejich krátká skladovatelnost a životnost. Prodloužení doby skladovatelnosti by bylo zajímavé hlavně proto, že z chlazeného ejakulátu lze, díky menší potřebě počtu spermií (2 – 4 miliony), vyrobit více inseminačních dávek, dále by se také snížila pracovní obtížnost odběru a zpracování ejakulátu a v neposlední řadě by se také zjednodušila jeho distribuce (Verberckmoes et al. 2004).

3.7.2 Dlouhodobá konzervace (-196 °C)

Kryokonzervovaný býčí ejakulát je k inseminaci mléčného skotu používán již od roku 1950 (Guthrie et al. 2002). Kryokonzervace je běžná biotechnologie, která umožňuje uchovávat živé buňky, organismy a tkáně po delší dobu. Tato technologie však má na uchovávané

materiály škodlivé účinky, a to hlavně z hlediska tepelých, mechanických, chemických a osmotických stresorů. Tato poškození jsou obecně spojena s fázovou změnou vody v extra i intracelulárním prostředí během všech fází (Uçan et al. 2016). Nezbytnou součástí technologického procesu výroby kryokonzervovaných inseminačních dávek je tedy způsob chlazení, ekvibrace i mrazení (Stádník et al. 2015a). Aby byly překonány škodlivé účinky kryokonzervace a tím se zlepšila kvalita spermií po rozmrazení, musí být tyto technologie mnohokrát optimalizovány (Uçan et al. 2016).

Chlazení je fáze adaptace spermií na zpomalení metabolismu, přičemž při poklesu o 10 °C se metabolismus spermie sníží asi na 10 % původní úrovně (Stádník et al. 2015a). Jedním z hlavních problémů s chlazením ejakulátu na 4 °C je možnost výskytu chladového šoku, který však může být minimalizován díky postupnému chlazení ejakulátu za přítomnosti kryoprotektivních látek (Vera-Munoz et al. 2011).

Ekvibrace je proces, která následuje po zchlazení inseminačních dávek, je to tedy celková doba, po kterou je spermie v kontaktu s kryoprotektivem před zmrazením (Doležalová et al. 2016), kterým může být například vaječný žloutek, lecitin nebo glycerol (Vera-Munoz et al. 2011). Během této doby spermie zůstávají v kontaktu se zvoleným osmoticky aktivním kryoprotektivem, který do nich proniká a ustanovuje rovnováhu koncentrací mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím (Shahverdi et al. 2013). Vhodně zvolené ředidlo pomáhá udržet integritu plazmatické membrány spermií a zvyšuje jejich procento přežití (Doležalová et al. 2016). Nicméně například glycerol proniká do buněk velmi rychle, tudíž dostatečně dlouhé ekvibrační období je nutné spíše pro adaptaci membrán na nízké teploty během mrazení, než pro prostup glycerolu do buněk (Vishwanath & Shannon, 2000; Muiño et al. 2007). Avšak nejvhodnější kombinace použitého ředidla a délky ekvibrace stále není dostatečně určena (Shahverdi et al. 2013). Dhami et al. (1992) stanovili dobu ekvibrace od 30 minut do 24 hodin, avšak jako nejvhodnější dobu z tohoto rozmezí posléze stanovili délku ekvibrace 2 hodiny při 5 °C. Zatímco Muiño et al. (2007) určili tuto optimální dobu od 4 hodin do 18 hodin, přičemž studie ukázaly, že kvalita vyrobených inseminačních dávek se zvýšila při použití délky ekvibrace 18 hodin. Z hlediska produkce dávek je však snaha o zkrácení doby ekvibrace nebo její úplné odstranění a tím urychlení zpracování spermií a kryokonzervace (Doležalová et al. 2016).

Proces mrazení způsobuje uvolnění latentního tepla z ejakulátu, čímž se mění celková teplota okolí vedoucí ke tvorbě ledových krystalů (Doležalová et al. 2015). Značný význam v procesu mrazení má teplota -5 °C až -50 °C, která určuje, zda spermie zůstane v rovnováze s extracelulárním prostředím nebo se postupně prochladí a zvýší se možnost tvorby krystalů (Kumar et al. 2003). Inseminační dávky jsou uloženy ve speciálně upravených izolovaných kontejnerech v tekutém dusíku (Ball & Peters 2004). Pod hladinou dusíku je teplota -196 °C, v jeho parách se teplota pohybuje od -160 °C do -140 °C, ve vlastním hrdle kontejneru je teplota již kritická, pohybuje se mezi -25 °C a +10 °C. Za kritickou teplotu par dusíku se považuje teplota -130 °C, nazývaná chladová zóna bezpečné teploty. Při této teplotě dochází k orosení inseminační dávky, což může při přechodném zvýšení teploty pejetý vést k procesu rekrystalizace, při kterém mohutnější krystaly při následném opětovném snížení teploty rostou na úkor drobnějších krystalů a tím porušují vnitřní strukturu spermií a snižují jejich oplozovací schopnost (Louda et al. 2008).

Interakce teplot a použitého ředidla má vliv na odolnost spermií vůči chladovému šoku (Stádník et al. 2015b), rozsah poškození způsobený tímto šokem závisí na teplotě i na rychlosti jejího poklesu, přičemž obecně platí, že čím vyšší je míra chlazení, tím závažnější je poškození spermií určující jejich následnou motilitu po rozmrazení (Andrabi 2007). Souhrnně lze říct, že výsledek kryokonzervace je ovlivněn i typem a průběhem mrazicí křivky (Doležalová et al. 2015).

3.8 Mrazicí křivky

Je všeobecně známo, že proces kryokonzervace snižuje životaschopnost spermií o více než 50 % (Kumar et al. 2003; Stádník et al. 2015a). Spermie nejsou přizpůsobeny k přežití kryokonzervace, a proto různě reagují na chlazení a zahřívání v závislosti na jednotlivci i druhu (Kumar et al. 2003). Nízká oplozovací schopnost je dána poškozeními, ke kterým došlo v průběhu mrazení (Saragusty et al. 2007). V procesu kryokonzervace je velmi důležitá rychlost chlazení/mrazení během kritické teploty ($-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$). V této době totiž nejčastěji dochází ke tvorbě ledových krystalů a následné dehydrataci buňky (Kumar et al. 2003). Je dokázáno, že při využití kontrolovaného systému chlazení je dosaženo lepší kvality zmrazeného ejakulátu, a i výsledky životaschopnosti spermií po rozmrazení jsou lepší (Stádník et al. 2015a). Proto byly vyrobeny stroje s regulovatelnou rychlostí chlazení/mrazení (Kumar et al. 2003).

Podle rychlosti mrazení lze techniky kryokonzervace rozdělit do dvou hlavních kategorií – pomalé mrazení (konvenční) a ultrarychlé mrazení (vitřifikace). Postupné mrazení zahrnuje postupné snižování teploty, ale intracelulární ledové krystaly, tvořící se během tohoto procesu, mají extrémně škodlivé účinky, proto je potřeba přidat správné množství ředidla s penetrujícími kryoprotektanty tak, aby na spermie mělo pozitivní a zároveň netoxické účinky. Technika ultrarychlého mrazení se využívá ke konzervaci embryí a tkání. Při tomto procesu se vzorek dostává do vitřifikačního stavu (stav připomínajícího sklo), čímž se zabráňuje tvorbě intracelulárních i extracelulárních ledových krystalů (Rosato & Iaffaldano 2013).

Ejakulát býků se dle Muiña et al. (2007) standardně mrazí v parách kapalného dusíku dle 3-fázové mrazicí křivky. Při použití této křivky se v první fázi využívá teplotní gradient z $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, v druhé fázi z $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a v poslední fázi z $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Januskauskas et al. (1999) ve své studii využili k mrazení býčího ejakulátu 2-fázovou mrazicí křivku, při které se v první fázi využívá teplotní gradient z $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ve druhé fázi z $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Stradioli et al. (2007) se ve své studii věnovali pomalé 3-fázové mrazicí křivce, přičemž pejetý s býčím ejakulátem nejdříve zchladili na $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, poté využili teplotního gradientu z $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a v poslední fázi z $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Naopak Saragusty et al. (2007) využili rychlejší 3-fázové mrazicí křivky, v jejíž první fázi klesala teplota z $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, poté z $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a v poslední fázi z $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $-60\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Ve studii od Doležalové et al. (2015) byl potvrzen významný vliv použité mrazicí křivky a individuality plemenů na kvalitu a oplozovací schopnost inseminačních dávek. Výsledky popisující interakci obou faktorů poukazují na nutnost individuální optimalizace

kryokonzervace, respektive individuální použití mrazící křivky, u jednotlivých plemenů s potenciálem zvýšit oplozovací schopnost jejich inseminačních dávek po rozmrazení.

4 Metodika

Na vybrané spolupracující inseminační stanici byl vypracován pokus zaměřený na výrobu inseminačních dávek, respektive na jejich ředění a efekty na jejich následnou oplozovací schopnost. Pokus probíhal ve 3 pokusných dnech (pokus XXIV., XXV. a XXXIII.), kdy se opakovaně odebíral ejakulát od předem vybrané skupiny plemenných býků ($n = 5$), ve které jsou býci stejného věku, plemene, kondice, přičemž všichni tito býci měli stejné podmínky ustájení, výživy a ošetřování. Ejakulát byl poté naředěn ředidlem Andromed[®], které však bylo rozděleno na 4 části, přičemž do každé části byla přidána frakce vaječného žloutku LDL cholesterol (low density lipoprotein) v různých koncentracích (0 %, 4 %, 6 %, 8 %). Takto naředěný ejakulát byl naplněn do pejet, které byly dle inseminační stanice standardním způsobem zchlazeny na 4 °C, následně prošly ekvilibrací a pomocí naprogramovaného automatického mrazicího boxu byly zmrazeny. Poté byly vloženy do kontejneru s tekutým dusíkem (-196 °C). Pejety nebyly hodnocené neprodleně po vložení do kontejnerů, zůstaly zde uloženy až do zahájení analýz zpracovávaných pomocí průtokového cytometru, které probíhaly ke konci roku 2019, začátkem roku 2020. Při zahájení analýz byly inseminační dávky rozmrazeny standardním způsobem – ve vodní lázni (± 38 °C) po dobu 30 sekund, a následně byla do vzorků přidána speciální barviva sloužící k hodnocení parametrů životaschopnosti spermií pomocí průtokové cytometrie. Takto připravené vzorky byly pomocí průtokového cytometru zanalyzovány z pohledu integrity buněčných membrán, funkčnosti akrozomu a aktivity mitochondrií. Bylo realizováno statistické hodnocení vlivu použitého ředidla, v doplnění s ostatními vlivy jako například délka ekvibrace a typ mrazicí křivky, na výsledky přežitelnosti spermií po kryokonzervaci.

4.1 Inseminační stanice býků

Inseminační dávky pro potřeby výzkumu byly získávány na inseminační stanici firmy Natural, spol. s r. o., která byla registrována v roce 1991 v obchodním rejstříku. Firma se nachází v Hradištku pod Medníkem. Získala certifikát EU CZ21790087, který ji opravňuje k prodeji inseminačních dávek jak v České republice, tak i ve všech zemích Evropské unie a dalších států s unií asociovaných. Firma Natural obdržela od National Association of Animal Breeders kód NAAB, jenž jí opravňuje k volnému vývozu inseminačních dávek do USA.

Na této inseminační stanici se vyrábí inseminační dávky od většiny v ČR chovaných plemen skotu – dojných, masných i kombinovaných. Za dobu fungování firmy stanici prošlo přes 340 plemenných býků dojených plemen. Vyrábí se a prodávají se zde dávky plemene Holštýn, Red holštýn, Jersey, Brown swiss i Ayrshire. Dále také dávky od Českého strakatého, Fleckvieh a Montbeliard. Dlouholetou tradicí stanice jsou masná plemena, od roku 1998 prošlo stanici přes 200 plemenných býků masných plemen skotu. Z vlastní produkce nabízí stanice dávky 18 masných plemen.

Vybavení laboratoře je v současné době na vysoké technické úrovni, výroba je pod přísným veterinárním dohledem, díky čemuž jsou výsledkem inseminační dávky vynikající kvality z hlediska plodnosti u zdravotních parametrů. Jejich bezpečnou identifikaci zaručuje kontrolovaný systém práce laboratoře i odběrových techniků. Jsou zde splněny všechny přísné české i evropské hygienické a veterinární podmínky.

Centrum celé výrobní linky je manažerský laboratorní program IDA (Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo). Ten umožňuje tvorbu odběrových plánů, individuálně vypočítává množství přidávaného ředidla, čímž určuje i předpokládaný počet vyrobených inseminačních dávek. Základem tohoto programu je systém počítačově asistované analýzy ejakulátu (CASA – Computer-assisted sperm analysis), IDENT (elektronická identifikace býků; Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo), Smart Dispenser (ředění ejakulátu na požadované množství spermií; Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo), MPP Quatro (plnění pejet; Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo) a Domino (zajišťující potisk pejet; Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo). Systém sleduje celý proces výroby, odesílá a přijímá informace z napojených zařízení a následně umožňuje hodnocení výroby (Biniová 2016).

4.2 Krmení býků

Býkům, od kterých byl využit ejakulát, resp. inseminační dávky, byla podávána stejná krmná dávka. Tato krmná dávka obsahovala:

- 10 kg sena
- 5 kg slámy
- 0,5 kg sójového šrotu
- 3 kg směsi obilných šrotů (tato směs obsahovala $\frac{1}{3}$ ovesného šrotu, $\frac{1}{3}$ pšeničného a $\frac{1}{3}$ ječného)

Do této krmné dávky je navíc přidávána směs minerálií Premin 22 Natural od firmy VVS Verměřovice s. r. o. Tento minerální doplněk obsahuje:

- 25 % žitných otrub
- 25 % KH_2PO_4
- 19 % CaCO_3
- 13 % NaCl
- 9 % MgO
- 4 % řepné melasy
- ostatní minerály

V 1 kg krmné směsi je tedy celkem:

- | | |
|------------------------------|---|
| - 11,4 % vápníků | - 600 mg $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ |
| - 6 % fosforu | - 3 000 mg MnO |
| - 5,2 % hořčíku | - 5 500 mg ZnO |
| - 1 250 000 i. u. Vitamínu A | - 45 mg $\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$ |
| - 250 000 i. u. Vitamínu D3 | - 45 mg $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ |
| - 5 000 mg Vitamínu E | - 36,5 mg Na_2SeO_3 |
| - 61 mg Vitamínu B1 | - 835 mg Niacinu |
| - 8 200 mg FeCO_3 | - 800 mg beta karotenu |

4.3 Odběr ejakulátu býků a jejich vstupní parametry

Na této inseminační stanici jsou býci standardně odebíráni 4 dny v týdnu vždy v ranních hodinách. Před každým odběrem jsou očištěni, aby se zamezilo jakékoliv kontaminaci odebíraného ejakulátu. K odběru se využívá buď fantoma nebo býka – atrapy, který je vždy

velmi klidného charakteru. Ejakulát je odebírán standardním způsobem do sterilní, předem vyhráté a vymazané vagíny, na kterou je připojen jednorázový sběrač.

Díky systému IDENT, který zahrnuje označení býků elektronickými čipy s jedinečným kódem, dnes technik pouze vytiskne čárový kód obsahující nezbytné informace a nalepí ho na daný sběrač.

4.3.1 Vstupní parametry ejakulátu býků

Po odebrání ejakulátu do jednorázového sběrače, kvalita se hodnotí makroskopické, pak v labortoři hodnotí pomocí systému CASA vstupní parametry ejakulátu, podle nichž se rozhodne, zda je daný ejakulát vhodný k dalšímu zpracování. Tyto minimální vstupní podmínky ve většině případech zahrnují koncentraci spermií v ejakulátu minimálně $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ a progresivní motilu spermií minimálně 70 % (Tabulka č. 4).

Ejakulát využitý při tomto výzkumu byl po dobu 3 dní odebírán od 5 býků, kteří jsou umístěni přímo v inseminační stanici v Hradištku pod Medníkem.

Tabulka č. 4 Vstupní parametry vybraných býků

Býk	1. odběrový den (XXIV.)			2. odběrový den (XXV.)			3. odběrový den (XXXIII.)		
	konc.	celk.mot.	prog.mot.	konc.	celk.mot.	prog.mot.	konc.	celk.mot.	prog.mot.
I.	0,78	78,8	72,8	0,83	82,9	78,6	0,86	77,1	71,5
II.	0,89	89,1	85,8	1,11	79,3	71,3	0,78	88,5	72,2
III.	0,75	88,8	87,4	0,75	76,7	73,8	0,81	74,5	70,6
IV.	1,55	92,3	90,5	0,80	83,7	80,6	0,73	81,2	73,9
V.	0,94	76,5	75,5	1,30	74,3	72,0	0,77	82,6	78,8

konc. – koncentrace spermií ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$), celk. mot. – celková motilita (%), prog. mot. – progresivní motilita (%)

4.4 Technologie výroby inseminačních dávek

Standardně proces výroby inseminačních dávek zahrnuje ředění ejakulátu, plnění naředěného ejakulátu do pejet, ekvilibraci a mrazení. Dříve byla výroba inseminačních dávek časově náročnější, vše se dělalo ručně. Nyní, díky důmyslnému propojení všech dostupných softwarů, je většina výroby již plně automatizována. Avšak přítomnost lidského faktoru je zde i tak důležitá.

Na této inseminační stanici jsou standardně inseminační dávky po ukončení procesu výroby uskladněny v bance ejakulátu v kontejnerech pod hladinou tekutého dusíku ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) a před opuštěním stanice je u vybraných inseminačních dávek opakovaně přezkušována motilita spermií. Přičemž při prodeji se musí dodržovat 30denní karanténa stanovená Evropskou unií.

Avšak pro účely tohoto experimentu byly po zmrazení inseminační dávky převezeny ve transportních kontejnerech na půdu České zemědělské univerzity v Praze, kde byly následně uloženy taktéž v tekutém dusíku.

4.4.1 Ředění a zpracování ejakulátu

Hodnoty, jako je objem ejakulátu, koncentrace spermií a jejich motilita, získané pomocí CASA, se odesílají do systému IDA, který vypočte množství ředidla potřebného pro daný ejakulát tak, aby výsledná koncentrace aktivních spermií po rozmrazení byla 10 mil./ID.

V tomto pokusu bylo využito běžně používané komerční ředidlo na bázi rostlinných fosfolipidů AndroMed® (Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo). Toto ředidlo obsahuje bidestilovanou vodu, fosfolipidy, glycerol, kyselinu citrónovou, fruktózu, pufrý a antibiotika. Pro potřeby tohoto výzkumu bylo ředidlo rozděleno na 4 části, přičemž do každé z nich byl přidán příravek LDL v různých koncentracích. Ejakulát je naředěn pomocí zařízení SmartDispenser, a to daným ředidlem, které je předem přehřáté na požadovanou teplotu (nejčastěji 38 °C) a je čerpáno přímo do sběrače, čímž se zamezuje kontaminaci nežádoucími elementy.

Takto naředěný ejakulát se v zatavených sběračích nechal promísit, aby došlo k rovnoměrné distribuci spermií, která je potřebná k vytvoření kvalitních inseminačních dávek. Následovalo plnění pejet o objemu 0,25 ml (IMV, L'Aigle, Francie), které zařizuje systém MPP Quatro, který je v těsném spojení jak s IDA systémem, tak i se systémem Domino, který zajišťuje potisk pejet. Plnička, jenž je v laboratoři v Hradištku, registruje vzduchové bubliny a pokud je třeba, plnění pejet automaticky ukončí (Biniová 2016).

4.4.2 Ekvilibrace a mrazení

Vyrobené pejety byly standardním způsobem inseminační stanice postupně zchlazeny na teplotu 4 °C a ekvilibrovány po dobu 120 nebo 240 minut.

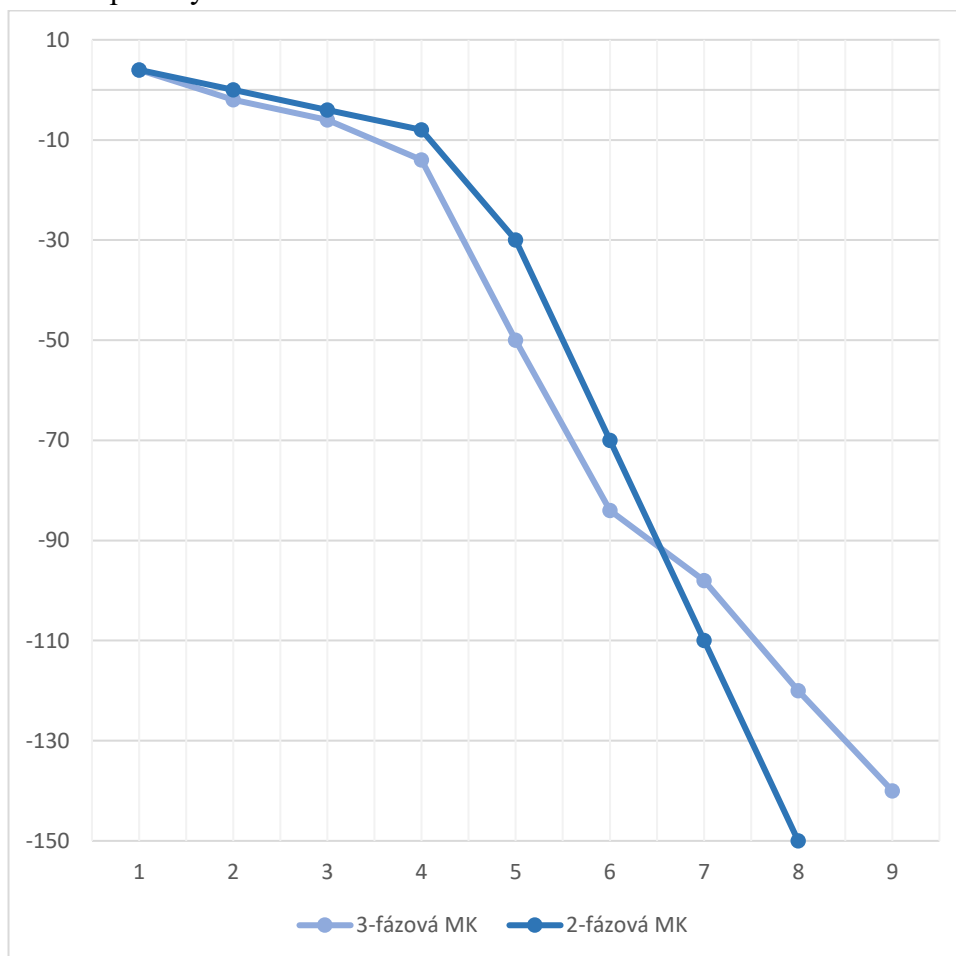
Při mrazení byla využita 3-fázová mrazicí křivka klasicky využívaná k mrazení býčího ejakulátu dle Muiña et al. (2007). Při použití této křivky se v první fázi využívá teplotní gradient z +4 °C na -10 °C rychlostí -5 °C/min, v druhé fázi z -10 °C na -100 °C rychlostí -40 °C/min a v poslední fázi z -100 °C na -140 °C rychlostí -20 °C/min. Na porovnání vlivu použité mrazicí křivky byla na druhou půlku dávek zvolena standardní 2-fázová křivka dle Januskauskase et al. (1999). V první fázi tato mrazicí křivka využívá teplotní gradient z +4 °C na -10 °C rychlostí -4 °C/min, ve druhé fázi z -10 °C na -150 °C rychlostí -40 °C/min. Postupné klesání teplot v čase u obou křivek je vysvětleno v Tabulce č. 5 a dále graficky znázorněno v Grafu č. 1.

Toto řízené postupné mrazení bylo zajištěno díky automatickému mrazicímu boxu DigitCool (Digitcool®; IMV CryoBio-Systém, L'Aigle, Francie). Inseminační dávky byly po ukončení řízeného mrazení přesunuty a uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem a uchovávány při teplotě -196 °C.

Tabulka č. 5 Pokles teploty v čase

Bod v grafu (vodorovná osa)	Čas (min)	Teplota (svislá osa; °C)	
		2-fázová mrazicí křivka	3-fázová mrazicí křivka
1	0,5	4	4
2	2	0	-2
3	3	-4	-6
4	4	-8	-14
5	5	-30	-50
6	6	-70	-84
7	7	-110	-98
8	8	-150	-120
9	9	-	-140

Graf č. 1 Průběh použitých mrazících křivek



4.5 Metoda hodnocení

V jednom pokusném dnu bylo od jednoho býka vyrobeno celkem 16 inseminačních dávek, a to tak, aby vznikly různé koncentrace přídavku LDL (0 %, 4 %, 6 % a 8 %), různé délky ekvilibrace (120 minut a 240 minut) a použité mrazící křivky (MK-2f, MK-3f). Schéma výroby inseminačních dávek během všech odběrových dnů je znázorněno v Tabulce č.6. Celkem bylo za všechny odběrové dny vyrobeno od jednoho býka 48 ID, celkem tedy od všech býků 240 ID. Každá ID se hodnotila ve 2 opakováních pro detailnější výsledky. Celkově tedy bylo vyhodnoceno 480 případů. Každý případ obsahoval 7 parametrů, které byly logicky vybrány tak, aby bylo možné následně zhodnotit životaschopnost spermií. Mezi tyto parametry patří:

1. obsah LDL,
2. vliv individuality býka,
3. doba ekvilibrace,
4. typ mrazící křivky,
5. procento spermií s neporušenou plazmatickou membránou i neporušeným akrozomem,
6. procento spermií s funkčními mitochondriemi (tzn. s vysokým obsahem barviva MitoTracker™ Deep Red v mitochondriích) a

7. procento spermií s nefunkčními mitochondriemi (tzn. s nízkým obsahem barviva v mitochondriích).

Tabulka č. 6 Schéma výroby ID během všech odběrových dnů

V.	Býk I.			Býk II.			Býk III.			Býk IV.			Býk V.		
	LDL	E	MK	LDL	E	MK	LDL	E	MK	LDL	E	MK	LDL	E	MK
1	0	120	3	0	120	3	0	120	3	0	120	3	0	120	3
2	4	120	3	4	120	3	4	120	3	4	120	3	4	120	3
3	6	120	3	6	120	3	6	120	3	6	120	3	6	120	3
4	8	120	3	8	120	3	8	120	3	8	120	3	8	120	3
5	0	240	3	0	240	3	0	240	3	0	240	3	0	240	3
6	4	240	3	4	240	3	4	240	3	4	240	3	4	240	3
7	6	240	3	6	240	3	6	240	3	6	240	3	6	240	3
8	8	240	3	8	240	3	8	240	3	8	240	3	8	240	3
9	0	120	2	0	120	2	0	120	2	0	120	2	0	120	2
10	4	120	2	4	120	2	4	120	2	4	120	2	4	120	2
11	6	120	2	6	120	2	6	120	2	6	120	2	6	120	2
12	8	120	2	8	120	2	8	120	2	8	120	2	8	120	2
13	0	240	2	0	240	2	0	240	2	0	240	2	0	240	2
14	4	240	2	4	240	2	4	240	2	4	240	2	4	240	2
15	6	240	2	6	240	2	6	240	2	6	240	2	6	240	2
16	8	240	2	8	240	2	8	240	2	8	240	2	8	240	2

V – číslo varianty, LDL – přídavek LDL (v %), E – ekvibrace (v min), MK – mrazící křivky (typ 2 nebo 3)

4.5.1 Rozmrazování ID a jejich příprava pro cytometrickou analýzu

Inseminační dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 30 sekund. Ihned po rozmrazení bylo nutné přidat ke spermatu potřebná fluorescenční barviva, díky kterým je posléze pomocí průtokového cytometru možno zhodnotit, dle sledovaných vlastností, životaschopnost spermií.

Aktivitu mitochondrií lze posoudit na základě obsahu barviva MitoTracker™ Deep Red (MTR), které je transportováno do mitochondrií. Spermie, které mají vysoký obsah tohoto barviva, mají tedy funkční mitochondrie. Spermie, které mají nízký obsah tohoto barviva mají naopak nefunkční mitochondrie.

Barvivo Hoechst 33342 je dobře rozeznatelná fluorescenční sloučenina emitující modré záření, která se hojně využívá k barvení jádra. Jako sloučenina vázající se na malé zářezy DNA („DNA minor groove“) může pronikat buněčnými membránami, a tudíž přednostně obarví hlavně jádro buňky. Díky tomuto barvivu jsme tedy schopni rozeznat buněčné a nebuněčné částice.

Barvivo PNA-FITC je fluorescenční barvivo na bázi rostlinného lektinu odvozeného z plodů rostliny *Arachis hypogaea* (PNA) a konjugovaného s fluoresceinem isothiokyanátu (FITC). Slouží k vyhodnocení akrozomální integrity spermií. PNA se váže na manózoové a galaktózoové skupiny matrixu akrozomu, nemůže proniknout neporušenou membránou

akrozomu, což znamená, že se obarví pouze spermie s aktivovaným nebo poškozeným akrozomem. Nízký obsah PNA-FITC tedy znamená, že akrozom buňky je neporušený.

Barvivo PI (propidium iodid) slouží k posouzení integrity plazmatické membrány. Rychle proniká hlavně do neživých spermií, a to kvůli jejich narušené plazmatické membráně. Pokud má tedy buňka vysoký obsah propidium iodidu, má poškozenou plazmatickou membránu.

Při hodnocení průtokovým cytometrem se využilo speciální jamkové destičky s 96 jamkami. Do jedné jamky se přidává:

- 225 µl PBS (phosphate buffered saline – fosfátem pufovaný fyziologický roztok)
- 25 µl vzorku rozmrazeného spermatu,
- 2,5 µl barviva Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 10,0 µg/ml,
- 2,5 µl barviva PNA-FITC (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA) o koncentraci 0,5 µg/ml,
- 2,5 µl barviva PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o koncentraci 8,0 µg/ml
- a 5 µl (finální koncentrace = 80 nM) barviva MitoTracker Deep Red (MTR) (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA).

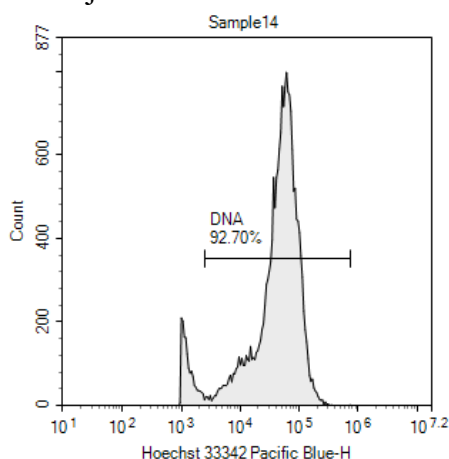
Po přidání barviv se destička vloží na 10 minut do tmy inkubovat (při 38 °C), aby se barviva dostatečně spojila se všemi spermii ve vzorku.

4.5.2 Hodnocení průtokovým cytometrem

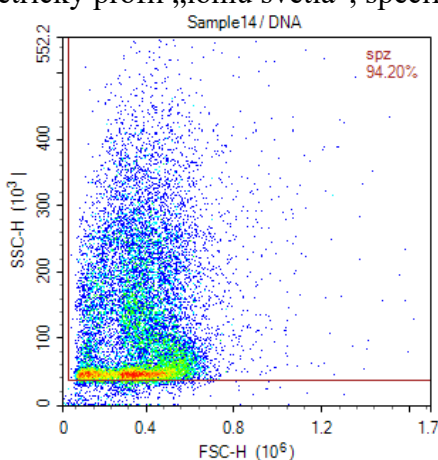
K hodnocení životaschopnosti spermií byl použit digitální průtokový cytometr NovoCyte, model 3000, od společnosti ACEA Biosciences (součást Agilent, Santa Clara, California, USA). Tento cytometr je vybaven fialovým (o vlnové délce 405 nm), modrým (o vlnové délce 488 nm) a červeným (o vlnové délce 640 nm) laserem a dále také vhodnými optickými filtry pro detekci vyzařovaných fluorescenčních signálů. Vzorky byly hodnoceny nízkou rychlostí a pro každý vzorek bylo zaznamenáno minimálně 10 000 událostí, maximálně však 20 000.

Pro automatizované nastavení cytometru, sledování jeho výkonu a pro získávání dat z cytometru byl použit NovoExpress software verze 1.3.0 (ACEA Biosciences, součást Agilent, Santa Clara, California, USA). V tomto softwaru byly vytvořeny schémata pro bodové grafy, které bylo pro všechny případy stejné. Tato schémata jsou vzájemně provázána a zaměřila se na vybrané 3 nejdůležitější parametry životaschopnosti spermií, a to na neporušenost akrozomu, neporušenost plazmatické membrány a aktivitu mitochondrií.

Obrázek č. 1 Schéma buněk obsahující DNA



Obrázek č. 2 Typický cytometrický profil „lomu světla“, specifický pro spermie

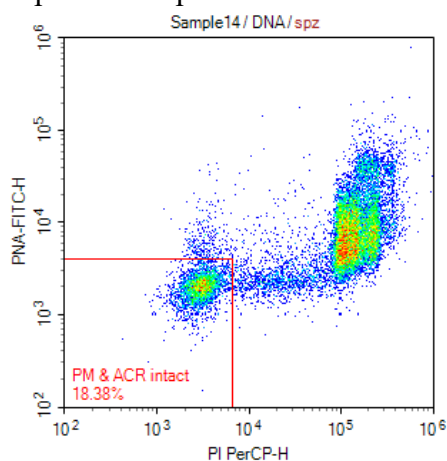


Pro znázornění, na schématu na Obrázku č. 1 jsou zaznamenány částice, které obsahovaly DNA. Tyto částice (buňky) byly rozlišeny na základě obsahu barviva Hoechst-33342. Z těchto buněk byly vybrány pouze spermatické buňky (dle jejich typického cytometrického profilu) rozlišené na základě lomu světla (Obrázek č. 2).

Ze spermatických buněk se následně vybralo procento buněk s jak neporušeným akrozomem, tak i neporušenou membránou (znázorněno na bodovém grafu na Obrázku č. 3), které byly analyzovány na základě barviva PNA-FITC a barviva PI.

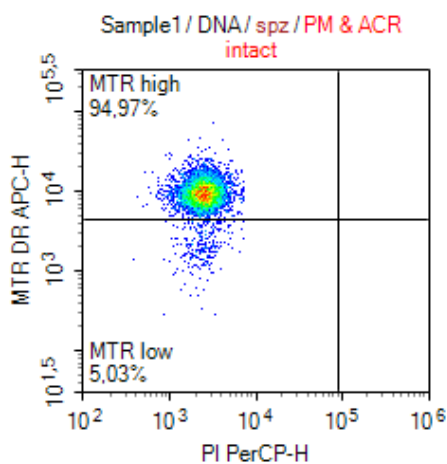
Dále, z buněk s jak neporušeným akrozomem, tak i neporušenou membránou byly analyzovány buňky s vysokým nebo nízkým obsahem barviva MitoTracker™ Deep Red (MTR), tzn. tedy byly analyzovány buňky s aktivními nebo neaktivními mitochondriemi (bodový graf na Obrázku č. 4).

Obrázek č. 3 Reprezentativní schéma strategie identifikace spermatických buněk s neporušeným akrozomem a neporušenou plazmatickou membránou



PM & ACR intact ... Neporušená plazmatická membrána a neporušený akrozom

Obrázek č. 4 Reprezentativní schéma strategie identifikace spermatických buněk s aktivními nebo neaktivními mitochondriemi



MTR high ... buňky s vysokým obsahem barviva MTR (= aktivní mitochondrie); MTR low ... buňky s nízkým obsahem barviva MTR (= neaktivní mitochondrie)

Ze schémat ze softwaru NovoExpress byla poté vygenerována data (procenta spermií k jednotlivým parametrům životschopnosti spermií), se kterými se dále pracovalo ve statistickém programu.

4.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro statistické vyhodnocení byl využit program SAS 9.3 (SAS/STAT® 9.3, 2011). Základní parametry souboru byly vypočteny za pomoci procedury UNIVARIATE. Pro stavení vzájemných vztahů (korelací) byla využita procedura CORR. Vhodný model hodnocení ukazatelů kvality inseminačních dávek byl vybrán za použití procedury REG, metody STEPWISE. Hlavní vyhodnocení významnosti efektů bylo provedeno v proceduře GLM (ANOVA), s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey-Kramerova testu.

Modelová rovnice (ANOVA)

$$y_{ijklm} = \mu + SP_i + LDL_j + EQUI_k + CUR_l + e_{ijklm}$$

kde:

y_{ijklm} – hodnoty závisle proměnné (intaktní membrána a akrozóm, funkční mitochondrie, nefunkční mitochondrie),

μ – obecná hodnota závislé proměnné,

SP_i – fixní efekt býka ($i = I, n=96; i = II, n=96; i = III, n=96; i = IV, n=96; i = V, n=96$),

LDL_j – fixní efekt přídatku LDL ($j = 0, n=120; j = 4, n=120; j = 6, n=1120; j = 8, n=120$),

$EQUI_k$ – fixní efekt délky ekvibrace ($k = 120, n=240; k = 240, n=240$),

CUR_l – fixní efekt mrazicí křivky ($l = 2, n=241; l = 3, n=239$),

e_{ijklm} – náhodná reziduální chyba.

V rámci statistického vyhodnocení byly využity následující statistické průkaznosti $P < 0,01$, $P < 0,05$ a $P < 0,001$.

5 Výsledky

Tabulka č. 7 Základní statistiky hodnoceného souboru dat

proměnná	n	\bar{x}	s	min.	max.	s.e.	V (%)
intaktní membrána a akrozom	480	33,38	12,51	2,11	63,16	0,57	37,47
funkční mitochondrie	480	66,34	30,77	2,54	99,8	1,40	46,38
nefunkční mitochondrie	480	33,53	30,73	0,2	97,46	1,40	91,65

n..... počet měření; \bar{x} aritmetický průměr; s..... směrodatná odchylka; min. minimální hodnota; max. maximální hodnota; s.e. střední chyba aritmetického průměru; V (%) koeficient variance

V Tabulce č. 7 jsou uvedeny základní statistiky hodnoceného souboru dat – průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota, střední chyba aritmetického průměru a variační koeficient. Průměrně mělo neporušenou membránu a akrozom 33,38 % spermií ze všech napočítaných spermií v každém vzorku, funkční mitochondrie (= vysoký obsah barviva MTR) pak mělo v průměru 66,34 % spermií v každém vzorku. Nefunkční mitochondrie (= nízký obsah barviva MTR) mělo v průměru 33,53 % spermií. Koeficient variability pro intaktní akrozom a intaktní membránu je 37,47 %, koeficient variability pro funkční mitochondrie je 46,38 % a koeficient pro nefunkční mitochondrie je oproti ostatním parametrům životaschopnosti razantně vyšší (91,65 %), je tedy nejvíce variabilní. Detailněji jsou tyto základní statistiky znázorněny v Tabulkách 8 – 11, kde jsou tyto statistiky vyhodnoceny dle zvolených efektů (přídavek LDL, individualita býka, délka ekvilibrace, typ mrazicí křivky).

Tabulka č. 8 Základní statistiky hodnoceného souboru dat dle přídavku LDL

LDL	proměnná	N	\bar{x}	s	min.	max.	s.e.	V (%)
0	intaktní membrána a akrozom	120	32,20	12,58	2,11	63,16	1,15	39,07
	funkční mitochondrie		48,38	31,62	2,54	99,68	2,89	65,36
	nefunkční mitochondrie		51,62	31,62	0,32	97,46	2,89	61,27
4	intaktní membrána a akrozom	120	33,07	12,80	7,45	55,65	1,17	38,69
	funkční mitochondrie		64,44	30,65	2,89	99,7	2,80	47,55
	nefunkční mitochondrie		35,56	30,65	0,3	97,11	2,80	86,19
6	intaktní membrána a akrozom	120	34,17	12,84	2,85	57,83	1,17	37,58
	funkční mitochondrie		73,86	27,24	11,34	99,8	2,49	36,88
	nefunkční mitochondrie		25,62	26,91	0,2	88,66	2,46	105,06
8	intaktní membrána a akrozom	120	34,06	11,84	2,27	58,07	1,08	34,76
	funkční mitochondrie		78,67	24,31	18,83	99,74	2,22	30,90
	nefunkční mitochondrie		21,33	24,31	0,26	81,17	2,22	113,96

n..... počet měření; \bar{x} aritmetický průměr; s..... směrodatná odchylka; min. minimální hodnota; max. maximální hodnota; s.e. střední chyba aritmetického průměru; V (%) koeficient variance

Tabulka č. 9 Základní statistiky hodnoceného souboru dle přídatku LDL

Býk	proměnná	n	\bar{x}	s	min.	max.	s.e.	V (%)
I.	intaktní membrána a akrozom	96	21,78	5,76	3,2	33,19	0,59	26,45
	funkční mitochondrie		64,04	27,45	9,73	98,42	2,80	42,87
	nefunkční mitochondrie		35,96	27,45	1,58	90,27	2,80	76,35
II.	intaktní membrána a akrozom	96	32,44	13,51	2,52	58,07	1,38	41,63
	funkční mitochondrie		43,61	31,61	2,54	97,13	3,23	72,49
	nefunkční mitochondrie		56,39	31,61	2,87	97,46	3,23	56,06
III.	intaktní membrána a akrozom	96	38,50	11,03	2,11	53,17	1,13	28,64
	funkční mitochondrie		79,02	26,91	7,38	99,7	2,75	34,05
	nefunkční mitochondrie		20,98	26,91	0,3	92,62	2,75	128,24
IV.	intaktní membrána a akrozom	96	45,05	8,55	2,27	63,16	0,87	18,98
	funkční mitochondrie		75,67	26,87	8,33	99,8	2,74	35,51
	nefunkční mitochondrie		24,33	26,87	0,2	91,67	2,74	110,46
V.	intaktní membrána a akrozom	96	29,11	7,68	14,87	48,16	0,78	26,37
	funkční mitochondrie		69,35	28,06	4,09	98,86	2,86	40,46
	nefunkční mitochondrie		29,99	27,78	1,14	95,91	2,83	92,61

n..... počet měření; \bar{x} aritmetický průměr; s..... směrodatná odchylka; min. minimální hodnota; max. maximální hodnota; s.e. střední chyba aritmetického průměru; V (%) koeficient variance

Tabulka č. 10 Základní statistiky hodnoceného souboru dle délky ekvibrace

ekvibrace	proměnná	n	\bar{x}	s	min.	max.	s.e.	V (%)
120	intaktní membrána a akrozom	240	32,32	13,73	2,11	63,16	0,89	42,48
	funkční mitochondrie		70,13	29,28	3,43	99,8	1,89	41,76
	nefunkční mitochondrie		29,61	29,17	0,2	96,57	1,88	98,50
240	intaktní membrána a akrozom	240	34,43	11,08	13,84	55,65	0,72	32,18
	funkční mitochondrie		62,55	31,80	2,54	99,17	2,05	50,84
	nefunkční mitochondrie		37,45	31,80	0,83	97,46	2,05	84,91

n..... počet měření; \bar{x} aritmetický průměr; s..... směrodatná odchylka; min. minimální hodnota; max. maximální hodnota; s.e. střední chyba aritmetického průměru; V (%) koeficient variance

Tabulka č. 11 Základní statistiky hodnoceného souboru dle typu mrazící křivky

mrazící křivka	proměnná	n	\bar{x}	s	min.	max.	s.e.	V (%)
2	intaktní membrána a akrozom	240	33,13	13,80	2,11	58,07	0,89	41,64
	funkční mitochondrie		68,54	28,62	2,54	99,59	1,84	41,76
	nefunkční mitochondrie		31,46	28,62	0,41	97,46	1,84	91,00
3	intaktní membrána a akrozom	240	33,63	11,08	13,84	63,16	0,72	32,95
	funkční mitochondrie		64,12	32,70	2,89	99,8	2,12	51,00
	nefunkční mitochondrie		35,62	32,65	0,2	97,11	2,11	91,65

n..... počet měření; \bar{x} aritmetický průměr; s..... směrodatná odchylka; min. minimální hodnota; max. maximální hodnota; s.e. střední chyba aritmetického průměru; V (%) koeficient variance

Tabulka č. 12 Korelace

		intaktní membrána a akrozom	funkční mitochondrie	nefunkční mitochondrie
přídavek LDL	r	0,061	0,374	-0,377
	P	0,183	<0,001	<0,001
délka ekvibrace	r	0,084	-0,123	0,128
	P	0,065	0,007	0,005
typ mrazící křivky	r	0,020	-0,072	0,068
	P	0,665	0,115	0,138
intaktní membrána a akrozom	r		0,333	-0,329
	P		<0,001	<0,001
funkční mitochondrie	r			-0,996
	P			<0,001

r... korelační koeficient; P... statistická průkaznost; n... počet případů

Tabulka č. 12 obsahuje vyjádření vztahů a jejich síly mezi sledovanými parametry, popisuje tedy vliv změny úrovně jednoho znaku na změnu úrovně jiných znaků. Z tabulky vyplývá, že mezi obsahem LDL v ředidle a intaktní membránou a akrozomem spermií nebyla prokázána žádná korelace ($P > 0,05$). Z této tabulky je patrná středně silná korelace mezi přídavkem LDL a funkčními mitochondriemi ($r = 0,374$; $P < 0,001$) a středně silná korelace mezi intaktní membránou a akrozomem a funkčními mitochondriemi ($r = 0,333$; $P < 0,001$). Všechny tyto zmíněné korelace jsou kladné, což znamená, že se zvyšováním hodnot jednoho znaku se zvyšují i hodnoty znaku druhého. Mezi přídavkem LDL a nefunkčními mitochondriemi byla logicky popsána záporná korelace ($r = -0,377$; $P < 0,001$). Stejný trend byl zaznamenán i u vztahu mezi intaktní membránou a akrozomem a nefunkčními mitochondriemi ($r = -0,329$; $P < 0,001$) a také mezi funkčními a nefunkčními mitochondriemi ($r = -0,996$; $P < 0,001$). Ostatní vztahy mezi hodnocenými proměnnými nebyly statisticky průkazné ($P > 0,05$).

Tabulka č. 13 Základní statistiky vyhodnocení v ANOVA

	MODEL		býk		přídavek LDL		délka ekvibrace		typ mrazící křivky	
	r^2	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
intaktní membrána a akrozom	0,417	< 0,001	81,54	< 0,001	1,1	0,349	5,73	0,017	0,27	0,602
funkční mitochondrie	0,327	< 0,001	28,78	< 0,001	33,01	< 0,001	10,66	0,001	3,88	0,049
nefunkční mitochondrie	0,331	< 0,001	29,19	< 0,001	33,8	< 0,001	11,5	< 0,001	3,48	0,063

r^2 ... koeficient variability, P ... koeficient průkaznosti

V Tabulce č. 13 jsou uvedeny základní statistiky použité modelové rovnice pro hodnocení ukazatelů (neporušenost akrozomu, neporušenost membrány a aktivita mitochondrií, založená na obsahu barviva MitoTracker (MTR)). Při vyhodnocení byly využity efekty: býk, přídavek

LDL, délka ekvibrace, typ mrazící křivky. Model byl statisticky významný pro všechny hodnocené proměnné ($P < 0,001$), což je znázorněno v příslušném sloupci označeném „P“.

Použitá modelová rovnice pro intaktní membránu a akrozom vysvětlovala zvolenými efekty 41,7 % z proměnlivosti ($P < 0,001$). Pro tento ukazatel byl v modelové rovnici průkazný pouze efekt býka ($P < 0,001$) a efekt délky ekvibrace ($P < 0,05$). Ostatní efekty pro intaktní membránu a akrozom (přídavek LDL a typ mrazící křivky) byly bohužel neprůkazné.

Modelová rovnice pro funkční mitochondrie vysvětlovala zvolenými efekty 32,7 % z proměnlivosti ($P < 0,001$). Pro tento ukazatel byl průkazný efekt býka a efekt přídavku LDL ($P < 0,001$). Efekt ekvibrace a použité mrazící křivky ($P = 0,049$) neměly na tuto závisle proměnnou statisticky průkazný vliv, protože hodnota P v tomto případě nebyla menší než 0,05.

Modelová rovnice pro nefunkční mitochondrie vysvětlovala zvolenými efekty 33,1 % z proměnlivosti ($P < 0,001$). Pro tento ukazatel byl průkazný efekt býka, efekt přídavku LDL i délka ekvibrace ($P < 0,001$). Efekt použité mrazící křivky neměl na tuto závisle proměnnou statisticky průkazný vliv.

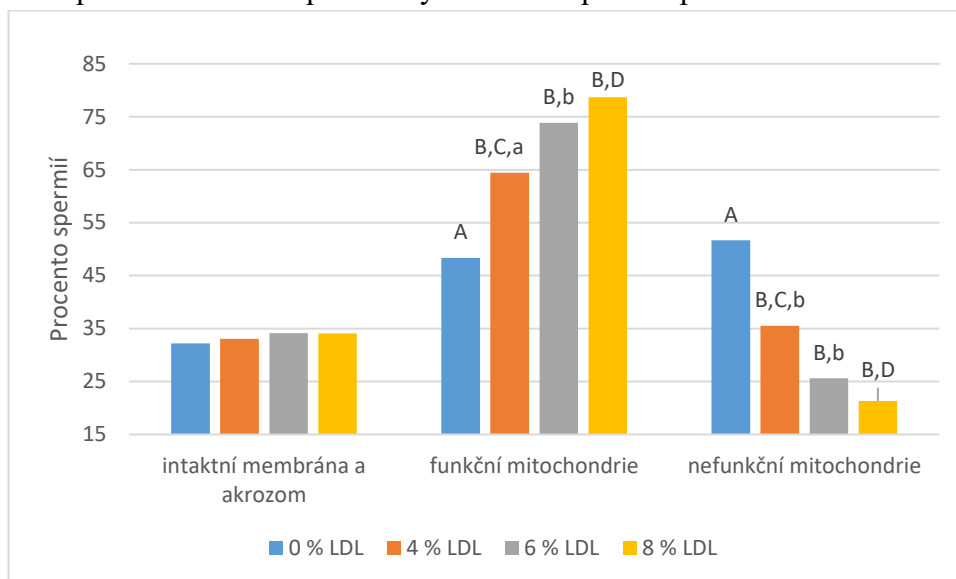
Tabulka č. 14 Vliv přídavku LDL na parametry životaschopnosti spermií

LDL (%)	intaktní membrána a akrozom	funkční mitochondrie	nefunkční mitochondrie
	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM
0	32,21 \pm 0,880	48,35 \pm 2,326 ^A	51,65 \pm 2,316 ^A
4	33,07 \pm 0,880	64,44 \pm 2,326 ^{B,C,a}	35,56 \pm 2,316 ^{B,C,b}
6	34,17 \pm 0,880	73,86 \pm 2,326 ^{B,b}	25,62 \pm 2,316 ^{B,b}
8	34,06 \pm 0,880	78,67 \pm 2,326 ^{B,D}	21,33 \pm 2,316 ^{B,D}

Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost A-B, C-D, E-F, G-H, I-J, K-L, M-N, O-P, Q-R... $P < 0,01$; a-b, c-d, e-f ... $P < 0,05$

Vliv přídavku LDL do ředidla na parametry životaschopnosti spermií je znázorněn v Tabulce č. 14. Nejvyšší průměrné procento spermií s intaktní membránou a akrozomem bylo nalezeno při použití ředidla s 6 % přídavkem LDL (34,17 %), poté u ředidla s 8 % přídavkem LDL (34,06 %), které následovalo ředidlo s 4 % přídavkem LDL (33,07 %). Nejnižší průměrné procento spermií bylo zaznamenáno u ředidla bez přídavku LDL (32,21 %). Rozdíly však nebyly nijak statisticky významné. U funkčních mitochondrií bylo nejvyššího průměrného procenta spermií dosaženo při použití ředidla s 8 % přídavkem LDL (78,67 %), poté u 6 % přídavku (73,86 %), dále u 4 % přídavku (64,44 %) a nakonec u ředidla bez přídavku LDL (48,35 %). U nefunkčních mitochondrií tomu bylo logicky naopak. Všechny tyto výsledky týkající se funkčních/nefunkčních mitochondrií byly statisticky průkazné ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Všechny tyto skutečnosti jsou znázorněny v Grafu č. 2.

Graf č. 2 Vliv přidavku LDL na parametry životaschopnosti spermií



Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost A-B, C-D, E-F, G-H, I-J, K-L, M-N, O-P, Q-R... $P < 0,01$; a-b, c-d, e-f... $P < 0,05$

Hlavním záměrem této diplomové práce bylo vyhodnotit vliv přidavku ředidla s různým obsahem LDL na hlavní parametry životaschopnosti spermií. Byly však zpracovány i vlivy jiného charakteru (délka ekvibrace, typ použité mrazicí křivky a vliv individuality býka), které také ovlivňují kvalitu výsledné inseminační dávky, a proto jsou do této práce zahrnuty také jako doplňkové výsledky, které by mohly být předmětem dalšího studia.

Tabulka č. 15 Vliv individuality býka na parametry životaschopnosti spermií

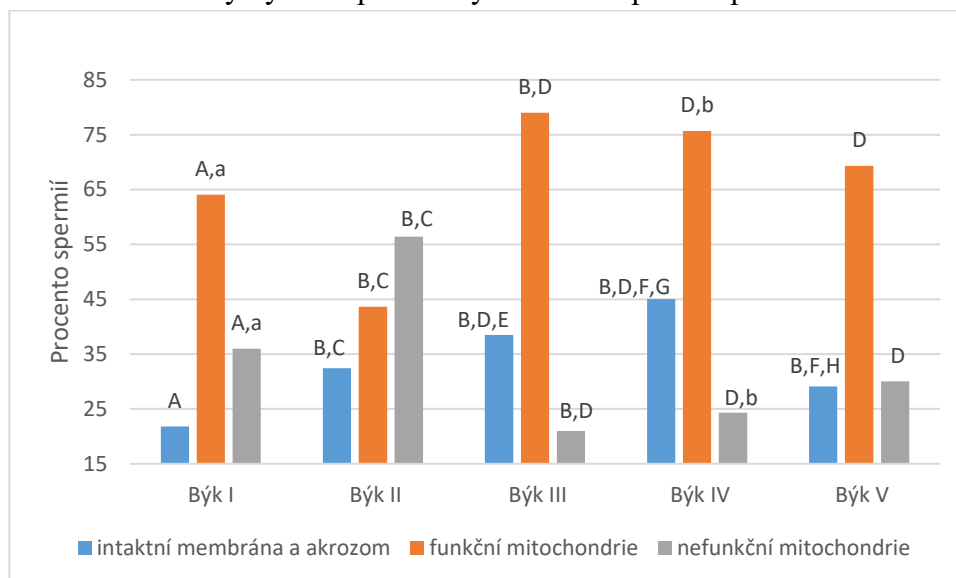
Býk	intaktní membrána a akrozom	funkční mitochondrie	nefunkční mitochondrie
	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM
I	21,78 \pm 0,984 ^A	64,04 \pm 2,601 ^{A,a}	35,96 \pm 2,589 ^{A,a}
II	32,44 \pm 0,984 ^{B,C}	43,61 \pm 2,601 ^{B,C}	56,39 \pm 2,589 ^{B,C}
III	38,50 \pm 0,984 ^{B,D,E}	79,02 \pm 2,602 ^{B,D}	20,98 \pm 2,589 ^{B,D}
IV	45,05 \pm 0,984 ^{B,D,F,G}	75,67 \pm 2,602 ^{D,b}	24,33 \pm 2,589 ^{D,b}
V	29,11 \pm 0,984 ^{B,F,H}	69,31 \pm 2,602 ^D	30,04 \pm 2,589 ^D

Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost A-B, C-D, E-F, G-H, I-J, K-L, M-N, O-P, Q-R... $P < 0,01$; a-b, c-d, e-f... $P < 0,05$

V Tabulce č. 15 byl hodnocen vliv individuality býka na parametry životaschopnosti spermií. Nejnižší průměrné procento spermií s intaktní membránou a akrozomem bylo zaznamenáno u býka I (21,78 %). Naopak nejvyšší průměrné procento spermií s intaktní membránou a akrozomem (45,05 %) měl býk IV. Statisticky významné rozdíly v intaktnosti membrány a akrozomu byly nalezeny mezi býky I, II, III, IV a V, dále mezi býky III a IV a mezi býky IV a V ($P < 0,01$). Nejnižší průměrné procento spermií s funkčními mitochondriemi bylo zaznamenáno u býka II (43,61 %). Naopak nejvyšší průměrné procento spermií s funkčními mitochondriemi (79,02 %) měl býk III. Statisticky významné rozdíly ve funkčnosti

mitochondrií byly zaznamenány mezi býky I, II a III, a dále mezi býky III, IV a V ($P < 0,01$). U nefunkčních mitochondrií to bylo logicky naopak – nejnižší procento spermií s nefunkčními mitochondriemi měl býk III (20,98 %), nejvyšší procento těchto spermií měl býk II (56,39 %). Výskyt statisticky významných rozdílů v nefunkčnosti mitochondrií byl stejný jako v případě funkčních spermií ($P < 0,01$). Vývoje těchto trendů jsou znázorněny v Grafu č. 3.

Graf č. 3 Vliv individuality býka na parametry životaschopnosti spermií



Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost A-B, C-D, E-F, G-H, I-J, K-L, M-N, O-P, Q-R... $P < 0,01$; a-b, c-d, e-f... $P < 0,05$

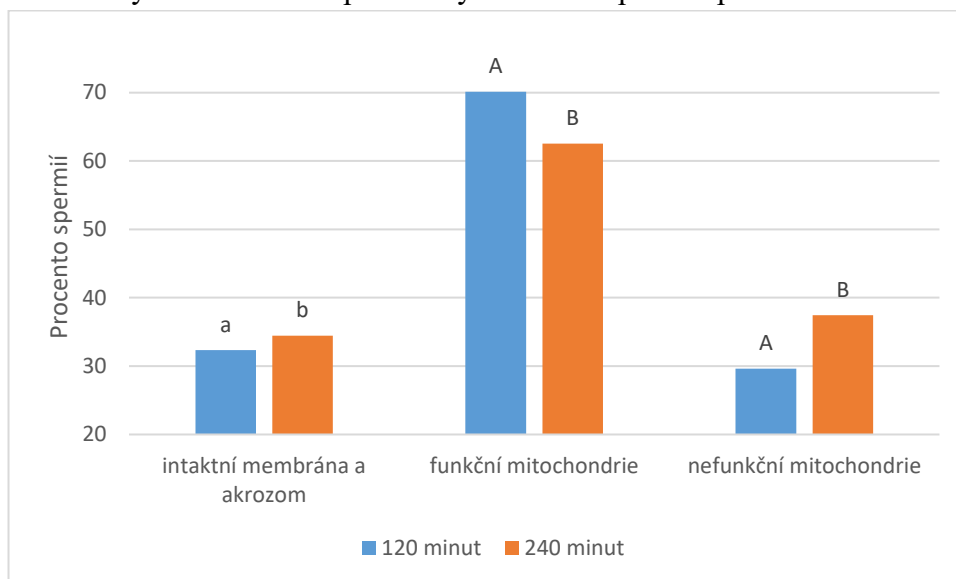
Tabulka č. 16 Vliv délky ekvilibrace na parametry životaschopnosti spermií

délka ekvilibrace	intaktní membrána a akrozom	funkční mitochondrie	nefunkční mitochondrie
	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM
120 min	32,32 \pm 0,623 ^a	70,13 \pm 1,645 ^A	29,61 \pm 1,638 ^A
240 min	34,43 \pm 0,623 ^b	62,53 \pm 1,645 ^B	37,47 \pm 1,638 ^B

Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost A-B... $P < 0,01$; a-b... $P < 0,05$

V Tabulce č. 16 je znázorněn vliv délky ekvilibrace na parametry životaschopnosti spermií. Při ekvilibraci trvající 120 minut bylo průměrné procento spermií s intaktní membránou a akrozomem 32,32 %, u délky ekvilibrace 240 minut je průměrné procento spermií vyšší (+2,11 %), v tomto případě byl nalezen statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$). Průměrné procento spermií s funkčními mitochondriemi při ekvilibraci trvající 120 minut bylo 70,13 %, u ekvilibrace trvající 240 minut bylo procento spermií nižší (- 7,6 %), přičemž tyto výsledky byly statisticky významné ($P < 0,01$). Opačný trend byl zaznamenán ve spojení s nefunkčními mitochondriemi, kdy u ekvilibrace trvající 120 minut bylo průměrné procento spermií 29,61 %, u ekvilibrace trvající 240 minut bylo toto procento o 7,86 % vyšší. Tyto rozdíly byly opět statisticky významné ($P < 0,01$). Vývoj těchto trendů je znázorněn v Grafu č. 4.

Graf č. 4 Vliv délky ekvilibrace na parametry životaschopnosti spermií



Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost A-B... $P < 0,01$; a-b ... $P < 0,05$

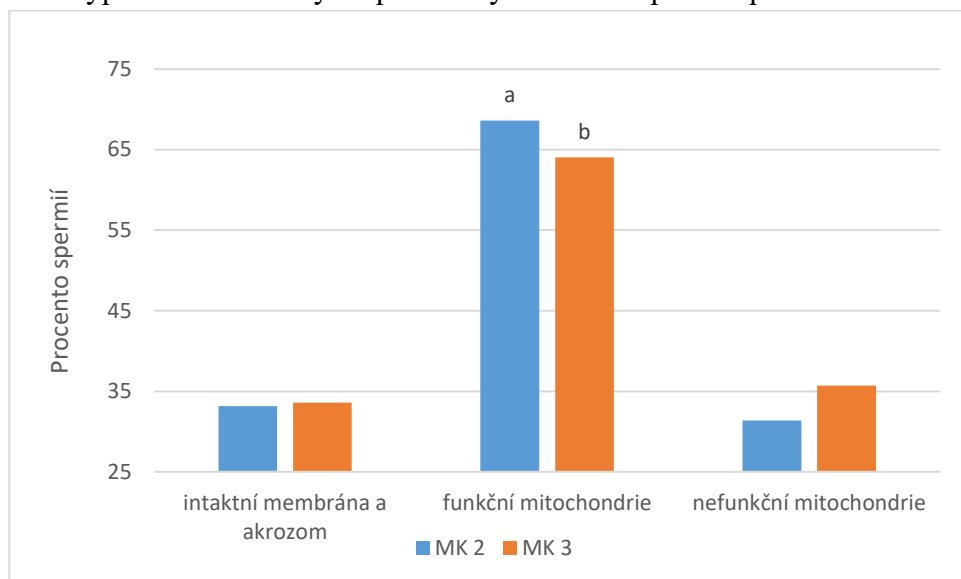
Tabulka č. 17 Vliv typu mrazicí křivky na parametry životaschopnosti spermií

mrazicí křivka	intaktní membrána a akrozom	funkční mitochondrie	nefunkční mitochondrie
	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM	LSM \pm SELSM
2	33,15 \pm 0,621	68,62 \pm 1,642 ^a	31,38 \pm 1,634
3	33,61 \pm 0,624	64,04 \pm 1,648 ^b	35,70 \pm 1,641

Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost a-b ... $P < 0,05$

V Tabulce č. 17 je znázorněn vliv typu použité mrazicí křivky na parametry životaschopnosti spermií. Při použití 2-fázové mrazicí křivky bylo průměrné procento spermií s intaktní membránou a akrozomem 33,15 %, u 3-fázové mrazicí křivky bylo toto průměrné procento nepatrně vyšší (+ 0,46 %). Tento rozdíl však nebyl statisticky průkazný. Opačný trend byl zaznamenán u funkčnosti mitochondrií. Při použití 2-fázové mrazicí křivky bylo průměrné procento spermií s funkčními mitochondriemi 68,62 %, u 3-fázové mrazicí křivky bylo toto průměrné procento nižší (- 4,58 %). Zde však byly nalazeny statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$). Nefunkční mitochondrie mělo při použití 2-fázové mrazicí křivky průměrně 31,38 % spermií, u 3-fázové mrazicí křivky to průměrně bylo o 4,32 % spermií více. Tyto výsledky však nebyly statisticky významné.

Graf č. 5 Vliv typu mrazící křivky na parametry životaschopnosti spermií



Stejná písmena znamenají statistickou průkaznost a-b, c-d, e-f ... $P < 0,05$

6 Diskuze

Ejakulát od býků byl před zpracováním zhodnocen, a to standardním způsobem dle inseminační stanice, který může vycházet i z výzkumu Rodriguez-Martineza (1998), ve kterém byla při hodnocení zaměřena pozornost na objem, koncentraci, aktivitu a morfologii spermií. Vstupní čerstvý ejakulát od všech býků z inseminační stanice splňoval všechny podmínky, které byly i v souladu se studií od Loudy et al. (2007) – koncentrace dosahovala minimálně $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ a progresivní motilita (pohyb spermie vpřed za hlavičkou) byla minimálně 70 %.

Hypotézou této diplomové práce je předpoklad, že lze detekovat a kvantifikovat průkazné rozdíly v životaschopnosti spermií v inseminačních dávkách býků po rozmrazení ve vztahu k typu aplikovaného ředidla (rozdíl mezi typy ředidla spočíval v různých koncentracích LDL, ve všech případech bylo využíváno ředidlo na bázi sójového lecitinu Andromed®).

Můžeme vycházet z první studie z roku 1974 od Pace et al. a novější studie od Moussa et al. (2002), kde bylo potvrzeno, že LDL je funkční kryoprotektivní sloučenina vaječného žloutku, která pozitivně ovlivňuje různé parametry býčích spermií po rozmrazení (Amirat et al. 2004; Hu et al. 2010; Hu et al. 2011). Během kryokonervace je LDL považováno za jednu z klíčových látek hrajících roli při gelovatění vaječného žloutku (Wakamatu et al. 1982), při níž je narušena struktura LDL a fosfolipidy, cholesterol a další jeho složky (kromě apoproteinů) mohou být uvolněny do médií, v nichž jsou spermie rozptýleny. Fosfolipidy a cholesterol tudíž mohou interagovat s plazmatickou membránou a vytvořit tak její ochrannou vrstvu (Martinet et al. 2003; Amirat et al. 2005). Kromě toho cholesterol přítomný ve struktuře LDL může interagovat hlouběji ve struktuře plazmatické membrány, kde se může začlenit do fosfolipidů, čímž vlastně zvyšuje odolnost této struktury během drsných teplotních podmínek během kryokonzervace (Bergeron et al. 2004).

Ve studii od Šimoníka et al. (2019) byly zkoumány účinky přídatku LDL do ředidel na bázi sójového lecitinu (Andromed® a Bioxcell®) na životaschopnost spermií a na jejich akrozomální a mitochondriální membránový potenciál. Účinek přídatku LDL k obou těmto ředidlům na výskyt spermií s intaktní plazmatickou membránou nebyl prokázán ($P > 0,05$). Naopak procento spermií s intaktním akrozomem bylo vyšší, když bylo LDL přidáno k ředidlu Bioxcell® ($P < 0,05$), zatímco v případě ředidla Andromed® s 6 % přídatkem LDL byly rozdíly nevýznamné. Co se týká mitochondriálního potenciálu, při 6 % přídatku LDL do ředidla Andromed® došlo k zlepšení mitochondriálního membránového potenciálu po rozmrazení ($P < 0,05$), což u ředidla Bioxcell® nebylo potvrzeno. Tento fakt týkající se 6 % přídatku LDL do ředidel potvrdili i Bencharif et al. (2008), kteří tvrdí, že právě tento přídatek LDL dokáže zajistit nejlepší potenciál zachování životaschopnosti spermií. I přes to, že v této jejich studii byl zkoumán vliv pouze 6 % přídatku LDL do dvou různých ředidel, byly její výsledky z části v souladu s výsledky této předkládané práce – i zde bylo statisticky prokázáno, že 6 % přídatek LDL zajistil 2. nejvyšší (hned po 8 % přídatku LDL) průměrné procento spermií s funkčními mitochondriemi (tzn. vysoký mitochondriální membránový potenciál). Další, kdo zkoumali vliv přídatku LDL do ředidla byli Hu et al. (2010), kteří přidávali do ředidel, určených ke kryokonzervaci, LDL o koncentracích od 7 do 10 % s předpokladem, že tyto přídatky budou různým způsobem ovlivňovat motilitu, mitochondriální aktivitu, integritu plazmatické membrány a integritu aktozomu. Při 8 % koncentraci LDL bylo dosaženo nejlepšího výsledku

z pohledu mitochondriální aktivity a intaktního akrozomu ($P < 0,05$), což potvrdila i tato diplomová práce, avšak pouze z pohledu mitochondriální aktivity, výsledky týkající se intaktního akrozomu zde nebyly statisticky průkazné. Výrazně lepšího výsledku bylo v práci od Šimoníka et al. (2019) dosaženo u integrity membrány, a to při 8 % a 9 % koncentraci LDL (v porovnání s 7 % a 10 % koncentrací LDL a také v porovnání s kontrolní skupinou ředěnou ředidlem obsahujícím 20 % vaječného žloutku). Ve své studii Hu et al. (2011) také zkoumali vliv přídavku LDL, a to v koncentracích 7 %, 8 % a 9 % (opět v porovnání s ředidlem obsahujícím 20 % vaječného žloutku). Došli k závěru, že nejlepších výsledků bylo dosaženo opět při 8 % koncentraci LDL, avšak nyní pouze v případě akrozomální integrity (lepší o 28,9 % oproti kontrolní skupině) a integritě plazmatické membrány (lepší o 10,2 % oproti kontrolní skupině). Mitochondriální aktivita v jejich studii nebyla zkoumána. Všechny výsledky, ke kterým Hu et al. (2011) došli, byly v rozporu s touto předkládanou prací, poněvadž při hodnocení daných dvou parametrů životaschopnosti (intaktní membrána a akrozom) zde nebyly nalezeny statisticky významné výsledky.

Ve studii od Leite et al. (2010) byly zkoumány důsledky použití různých ředidel (ředidlo Bioxcell[®] na bázi sójového lecitinu a TRIS ředidlo na bázi vaječného žloutku a glycerolu) a různých délek ekvibrace (0, 2 a 4 hodiny) na parametry životaschopnosti spermií. Nejnižší průměrné procento spermií s neporušenou plazmatickou membránou a akrozomem bylo zaznamenáno při nulové ekvibraci při použití obou ředidel ($P < 0,05$). Nicméně při použití ředidla na bázi sójového lecitinu nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly mezi ekvibrací trvající 2 hodiny a 4 hodiny, což je v rozporu s výsledky této předkládané práce. Naopak u ředidla na bázi vaječného žloutku byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi všemi délkami ekvibrace ($P < 0,05$), přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při 4-hodinové ekvibraci. Toto tvrzení je v rozporu s výsledky předkládané diplomové práce, kdy nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi různými délkami ekvibrace při hodnocení intaktnosti plazmatické membrány a akrozomu, ale pouze při hodnocení funkčnosti mitochondrií ($P < 0,01$). Všechny tyto skutečnosti otevírají prostor pro zkoumání možného faktu, že použití delší ekvibrace způsobuje vyčerpání zásob ATP v buňkách, čímž dochází k nižšímu podílu spermií s funkčními mitochondriemi. Během nízkých teplot je totiž postupně pozastavována glykolýza, jakožto hlavní zdroj ATP, a i přesto, že je v ředidlech obsažena glukóza, je při delší ekvibraci ATP (díky absenci glykolýzy) postupně vyčerpáváno. Ve studii od Vahedi et al. (2019) byl zkoumán vliv hodinové a dvouhodinové ekvibrace na motilitu spermií velbloudů (motilitu, linearitu pohybu, „beat cross-frequency“, a integritu membrány), přičemž bylo lepších výsledků dosaženo s kratší, tj. hodinovou, ekvibrací. S jejich studií se shodují i výsledky studie od Abd El-Salaama (2013), kteří došli k závěru, že lepších výsledků motility spermií a integrity akrozomu je dosaženo s nulovou ekvibrací (oproti 2 h a 4 h ekvibraci), s čímž se ztotožňuje i výše zmíněná studie od Leite et al. (2010). Toto pozorování může být výsledkem dlouhé expozice glycerolu, protože byla prokázána toxicita kryoprotektantů na životně důležité reakce spermií, jako je právě glykolýza (Fahy et al. 1990).

V práci byly nalezeny statisticky významné rozdíly v kvalitě parametrů životaschopnosti po rozmrazení a zhodnocení mezi jednotlivými býky. Louda et al. (2001) ve své práci zmiňuje, že životaschopnost spermií je ovlivněna řadou faktorů, jako například teplota, pH, osmotický tlak nebo individualita býka. Tento poznatek byl potvrzen i studiemi od Berana et al. (2011) a Stádníka et al. (2015b), ve kterých bylo mimo jiné stanoveno, že kvalita spermií je ovlivňována

mnoha vnitřními faktory, jako například plemeno býka, jeho věk nebo individualita. S těmito tvrzeními jsou v souladu i výsledky této práce, kdy u 5 býků byla zaznamenána individuální odpověď na typ použitého ředidla (resp. na rozdílný přírůstek LDL), která se projevila různou kvalitou všech parametrů životaschopnosti u všech inseminačních dávek, což opět potvrdilo studii Stádníka et al. (2015b), kteří se domnívají, že samotný odběr ejakulátu a jeho následné zpracování představují faktory ovlivňující výslednou fertilizační schopnost inseminační dávky. S tím je v souladu i práce od Chaveira et al. (2005), ve které bylo také zjištěno, že existuje individualita mezi býky v jejich citlivosti na různé faktory ovlivňující následnou životaschopnost spermií po rozmrazení. Toto tvrzení o vlivu individuality býka potvrdila i studie Doležalové et al. (2015), kde spermie od jednotlivých býků rozdílně reagovali na stejné podmínky, jako například na typ mrazicí křivky.

Kryokonzervace ejakulátu se při reprodukci používá velmi rozsáhle a nejčastěji (Amirat et al. 2005). Bylo zjištěno, že proces mrazení má nepříznivý vliv na důležité funkční parametry spermií, jako například nevratné poškození plazmatické membrány nebo akrozomu, kdy dochází ke změně aktivity jeho enzymů, což ve výsledku ovlivňuje přežitelnost a životaschopnost spermií (Aires et al. 2003). Z toho vyplývá, že je důležité vybrat i správný typ použité mrazicí křivky s vhodnou rychlostí a poklesy teplot, aby se co nejvíce předešlo chladovému šoku (Leite et al. 2010). Výsledky této práce ukázaly, že při mrazení dle 2-fázové a 3-fázové mrazicí křivky nebyly v případě intaktní membrány a akrozomu a nefunkčních mitochondrií nalezeny žádné statisticky významné výsledky. V případě funkčních mitochondrií však byly nalezeny statisticky průkazné výsledky ($P < 0,05$). Ve studii Forero-Gonzaleza et al. (2012) byl ejakulát mrazen dvěma technikami – konvenční (horizontální) a automatizovanou (vertikální) v kombinaci s různými kryoprotektanty (glycerol, etylenglykol a dimethylformamid). Při horizontální metodě byly inseminační dávky po dobu 90 minut vloženy do tepelného boxu s rychlostí chlazení $-0,55\text{ °C/min}$, a to z teploty 37 °C na 5 °C , poté byly vloženy do jiného boxu do par dusíku, kde byly mrazeny rychlostí $-19,1\text{ °C/min}$. Při vertikální metodě byly dávky prvně chlazeny z 37 °C na 5 °C rychlostí $-0,23\text{ °C/min}$ a následně mrazeny rychlostí $-15,5\text{ °C}$ na teplotu -120 °C . Bylo zjištěno, že procentuální podíl pohyblivých spermií, spermií s neporušenou membránou, neporušeným akrozomem a funkčními mitochondriemi byl vyšší při obou těchto technikách mrazení, avšak pouze při použití glycerolu jako kryoprotektantu. Jinak mezi konvenční a automatickou metodou mrazení bez použití kryoprotektantů nebyl žádný významný rozdíl. Na tento výzkum navazuje studie od Martorana et al. (2014), kteří zde zkoumali tvrzení o tom, že se spermie stávají nejcitlivější při chladovém šoku, když jsou z 37 °C ochlazeny na 5 °C , a to buď příliš pomalou rychlostí, nebo naopak příliš rychle – chladový šok totiž zvyšuje náchylnost k oxidačnímu poškození v důsledku tvorby reaktivních kyslíkových látek (ROS), které jsou výrazným stresovým faktorem generovaným během chlazení a skladování při nízké teplotě. Kromě toho mohou být tyto látky hlavní příčinou snížené pohyblivosti a schopnosti oplození, jelikož mění buněčnou funkci narušením plazmatické membrány a následně tak ničí bílkoviny a DNA. Inseminační dávky byly nejdříve chlazeny (z 22 °C na 0 °C) třemi různými způsoby – $0,5\text{ °C/min}$, 45 °C/min a 93 °C/min . Následně byly mrazeny z 0 °C na -110 °C dvěma různými způsoby – rychlým (87 °C/min) a pomalým (45 °C/min). Pomalé chlazení z pokojové teploty, v porovnání se středně rychlým nebo rychlým mrazením, zajistilo vyšší integritu membrány a vyšší motilitu spermií po rozmrazení. Pokud k rychlostem chlazení byly použity stejné (resp. velmi podobné)

rychlosti mrazení, byly zaznamenány významné statistické rozdíly v integritě membrány, pokud byly použity rozdílné rychlosti výsledky se nijak nelišily. S tím souhlasí i Watson (2000), který tvrdí, že při rychlejším poklesu teplot mrazení dochází k vyšší tvorbě ledových krystalů, které ovlivňují následnou životaschopnost spermií po rozmrazení. To se ovšem neshoduje s výsledky předložené práce, kdy hodnoty týkající se intaktnosti plazmatické membrány nebyly statisticky průkazné.

Doležalová et al. (2015) se ve své studii věnovali vlivu odlišných typů mrazících křivek na přežitelnost spermií z hlediska jejich motility po rozmrazení. Srovnávali stejné křivky, jaké byly použity v této práci – standardně používanou 3-fázovou mrazící křivku (pro mrazení spermií býků) ve dvou rychlostech (s rychlejším a pomalejším poklesem teplot) s 2-fázovou mrazící křivkou, která využívá nižší teplotní gradient mrazení. Jejich výsledky ukázaly, že při použití 2-fázové křivky bylo dosaženo podstatně vyšších hodnot motility spermií. Nejde však naznačit, zda se tato studie ztotožňovala s výsledky diplomové práce či ne, protože stále není plně objasněn vztah mezi motilitou a sledovanými parametry životaschopnosti.

7 Závěr

Hlavním cílem práce bylo vyhodnotit s využitím průtokové cytometrie vliv ředidla s vybranými přísadami LDL, na životaschopnost spermií po rozmrazení kryokonzervovaných inseminačních dávek.

Výsledky práce ukázaly, že LDL může mít pozitivní vliv na parametry životaschopnosti spermií. Do ředidla Andromed[®] byly přidávány různé koncentrace LDL (0 %, 4 %, 6 % a 8 %), přičemž nejlepšími výsledky, respektive nejvyššího procenta spermií s funkčními mitochondriemi (a zároveň nejnižšího procenta spermií s nefunkčními mitochondriemi), dosáhlo ředidlo s 8 % přísadou LDL. Výsledky týkající se intaktní membrány a akrozomu byly statisticky neprůkazné. Tato skutečnost by mohla mít přínos pro praxi při výrobě kryokonzervovaných ID, kdy zřejmě vyšší přísada LDL zajišťuje ochranu spermií při mrazení, resp. zajistí jejich delší životnost po rozmrazení, a následně při rozmrazování, díky čemuž by se mohla zvýšit jejich fertilizační schopnost a tím by došlo ke snížení likvidace inseminačních dávek, ke které dochází právě hlavně v důsledku zhoršené oplozovací schopnosti spermií při výrobě/skladování.

Lze tedy shrnout, že stanovená hypotéza nebyla úplně potvrzena, a to hlavně proto, že byly detekovány a kvantifikovány určité rozdíly v životaschopnosti spermií v inseminačních dávkách býků po rozmrazení ve vztahu k typu aplikovaného ředidla, avšak pouze z hlediska jednoho parametru (funkčnosti mitochondrie). Výsledky kvality ostatních parametrů (intaktní membrána a akrozom) nebyly statisticky průkazné.

Jako doplněk této diplomové práce byly součástí výzkumu zkoumány i různé vlivy při zpracování inseminačních dávek. Dávky byly ekvilibrovány po různě dlouhou dobu (120 minut a 240 minut) a následně byly mrazeny dle různých mrazících křivek (2-fázová mrazící křivka a 3-fázová mrazící křivka). Výsledky práce ukázaly, že konečné hodnoty týkající se délky ekvibrace byly statisticky průkazné, avšak kratší ekvibrace (120 minut) zajistila nižší procento spermií s intaktní membránou a akrozomem, a naopak vyšší procento funkčních mitochondrií (a tím pádem logicky menší procento spermií s nefunkčními mitochondriemi). U delší ekvibrace (240 minut) byl trend výsledků opačný – zajistila vyšší procento spermií s intaktní membránou a akrozomem a menší procento spermií s funkčními mitochondriemi (tzn. vyšší procento spermií s nefunkčními mitochondriemi). Z těchto výsledků není jasné průkazné, který typ ekvibrace je vhodnější na zpracování býčího ejakulátu, jelikož ani jeden typ neovlivnil všechny 3 parametry životaschopnosti najednou v pozitivním slova smyslu. Mrazící křivky měla statisticky průkazný vliv pouze na parametr funkčních mitochondrií, na všechny ostatní parametry nebyl popsán žádný statisticky významný vliv. Výše popsaná zjištění doplňuje také vliv individuality býka na sledované parametry spermií po rozmrazení, který se ve výzkumu také projevil jako statisticky významný.

Závěrem lze říct, že všechna tato zjištění otevírají prostor pro nové výzkumy týkající se optimalizace procesu výroby inseminačních dávek. Tato optimalizace by se měla týkat hlavně vhodného přísady LDL, délky ekvibrace a typu mrazící křivky, a to vše ve vztahu k individualitě býka, která hraje ve fertilizační schopnosti inseminačních dávek velkou roli.

8 Literatura

- Abd El-Salaam A. 2013. Freezability of camel spermatozoa as affected by cryoprotective agents and equilibration periods added with pentoxifylline. *Egypt Journal of Basic and Applied Physiology* **12**: 17 – 48.
- Ahman E, Naseer Z, Aksoy M, Küçük N, Uçan U, Serin I, Ceylan A. 2015. Trehalose enhances osmotic tolerance and suppresses lysophosphatidylcholine-induced acrosome reaction in ram spermatozoon. *Andrologie* **47**: 786 – 792.
- Ahmed KU, Islam MR, Talukder MKU, Rahman Z, Hossain MM, Bhuiyan MMU. 2014. Influence of breed, age and collection interval on semen quality of AI dairy bulls in Bangladesh. *Bangladesh Research Publications Journal* **10**: 275 – 282.
- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* **60**: 269 – 279.
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* **57**: 1801 – 1808.
- Al Naib A, Ward F, Kelly AK, Wade M, Marti JI, Lonergan P. 2011. Effect of duration of storage at ambient temperature on fertilization ability and mucus penetration ability of fresh bovine semen. *Theriogenology* **76**: 1070 – 1075.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. 2005. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* **61**: 895 – 907.
- Amirat T, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. 2005. Modifications of bull spermatozoa included by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* **129**: 535 – 543.
- Andrabi SMH. 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture and Biology* **9**: 367 – 369.
- Andrabi SMH. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* **44**: 552 – 569.
- Anton M. 2007a. Composition and structure of hen egg yolk. Pages 1 – 6 in Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Anton M. 2007b. Low-density lipoproteins (LDL) of lipovitellenin fraction. Pages 7 – 12 in Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Anton M. 2007c. High-density lipoproteins (HDL) of lipovitellin fraction. Pages 13 – 16 in Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ball PJH, Peters AR. 2004. *Reproduction in cattle*. Blackwell Publishing, London.
- Beran J, Stádník L, Doležalová M, Toušová R. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Toušová R, Louda F, Štolc L. 2011. Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **59**: 37 – 44.

- Bergeron A, Crête MH, 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.
- Bergron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development* **73**: 1338 – 1344.
- Bezdiček J, Louda F. 2016. Výzkum v chovu skotu: Reprodukční fyziologie skotu. Agrovýzkum Rapotín s. r. o., Rapotín.
- Biniová Z. 2016. Nová technologie na výrobu inseminačních dávek na ISB Hradištko. Pages 10 – 11 in Štráfelda J, editor. Genotyp. Natural spol. s. r. o. Hradištko pod Medníkem.
- Boztepe S, Aytakin I. 2017. The key to successful dairy cattle: Days in milk (DIM). *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences* **31**: 184 – 188.
- Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. 2012. Effect of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality of *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brasil. *Theriogenology* **70**: 181 – 190.
- Byvaltsev VA, Bardonova LA, Onaka NR, Polkin RA, Ochkal SV, Shepelev VV, Aliyev MA, Potapov AA. 2019. Acridine Orange: A Review of Novel Application for Surgical Cancer Imaging and Therapy. *Frontiers in Oncology* **9**: 925.
- Cenariu M, Pall E, Borzan M, Bogdan L, Groza I. 2018. Advanced Techniques of Bovine Semen Analysis. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* **75**: 58 – 65.
- de Oliveira RV, Dogan S, Belser LE, Kaya A, Topper E, Moura A, Thibaudeau G, Memili E. 2013. Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction* **146**: 263 – 272.
- Dhami AJ, Sahni KL, Mohan G. 1992. Effect of various cooling rates (from 30 degrees to 5 degrees C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos Bubalis* semen. *Theriogenology* **38**: 565 – 574.
- Doležalová M, Stádník L, Biniová Z, Ducháček J, Beran J. 2015. The effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno* **84**: 383 – 391.
- Doležalová M, Stádník L, Biniová Z, Ducháček J, Stupka R. 2016. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science* **61**: 515 – 525.
- Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. 1990. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* **27**: 247 – 268.
- Farstad W. 2009. Cryopreservation of canine semen – new challenges. *Reproduction in Domestic Animals* **44**: 336 – 341.
- Forero-Gonzalez RA, Celeghini ECC, Raphael CF, Andrade AFC, Bressan FF, Arruda RP. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* **44**: 154 – 159.
- Gamčík P, Kozuplík J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava.

- Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction* **53**: 276 – 284.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* **63**: 445 – 457.
- Gloria A, Contri A, Wegher L, Vignola G, Dellamaria D, Carluccio A. 2014. The effect of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science* **150**: 15 – 23.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* **67**: 1811 – 1816.
- Holt, WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **62**: 3 – 22.
- Hossain S, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* **13**: 406 – 419.
- Hu JH, Jiang ZL, Lv RK, Li QW, Zhang SS, Zan LS, Li YK, Li X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* **62**: 83 – 87.
- Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science* **1 – 2**: 11 – 1.
- Hung P, Miller MG, Meyers SA, VandeVoort CA. 2008. Sperm mitochondrial integrity is not required for hyperactivated motility, zona binding or acrosome reaction in the rhesus rhesus macaque. *Biology of reproduction* **79**: 367 – 375.
- Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. 2005. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology* **65**: 1875 – 1890.
- James PS, Hennessy C, Berge T, Jones R. 2004. Compartmentalisation of the sperm plasma membrane: a FRAP, FLIP and SPFI analysis of the diffusion barriers on the sperm head. *Journal of Cell Science* **117**: 6485 – 6495.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Haard MGM, Haard MC, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* **52**: 641 – 658.
- Jyuena NS, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: An Essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**: 537 – 551.
- Karoui S, Díaz C, Serran M, Cue R, Celorrio I, Carabaño MJ. 2011. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Animal Reproduction Science* **124**: 28 – 38.
- Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE, Mohey-Elsaeed O. 2018. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* **6**: 549 – 556.
- Kubovičová E, Makarevič AV, Špaleková E, Chrenek P. 2015. Intenzifikační faktory plodnosti skotu: sborník přednášek. Agrovýzkum Rapotín, Rapotín.

- Kumar A, Saxena A, Anand M. 2019. Evaluation of Acrosomal Integrity and Viability in Bull Spermatozoa: Comparison of Cytochemical and Fluorescent Techniques. *International Journal of Livestock Research* **9**: 69 – 77.
- Kumar P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, Yadav PS. 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* **159**: 38 – 45.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* **46**: 246 – 253.
- Kvapilík J, Bucek P, Kučera J. 2006. Ročenka – Chov skotu v České republice: Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2005. Českomoravská společnost chovatelů, a. s., Výzkumný ústav živočišné výroby v. v. i., Svaz chovatelů českého strakatého skoru, z. s., Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z. s., Český svaz chovatelů masného skotu, z. s., Praha.
- Kvapilík J, Bucek P, Kučera J. 2019. Ročenka – Chov skotu v České republice: Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2018. Českomoravská společnost chovatelů, a. s., Výzkumný ústav živočišné výroby v. v. i., Svaz chovatelů českého strakatého skoru, z. s., Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, z. s., Český svaz chovatelů masného skotu, z. s., Praha.
- Leite TG, Vale Filho VR, Arruda RP, de Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JAM, Andrade VJ. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* **120**: 31 – 37.
- Lemma A, Shemsu T. 2015. Effect of age and breed on semen quality and breeding soundness evaluation of pre-service young bulls. *Journal of Reproduction and Infertility* **6**: 35 – 40.
- Louda F, Bjelka M, Ježková A, Pozdíšek J, Stádník L, Bezdíček J. 2007. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
- Louda F, Čerovský J, Ježková A, Stádník L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnologických metod. Česká zemědělská univerzita v Praze – AF.
- Louda F, Vaněk D, Ježková A, Stádník L, Bjelka M, Bezdíček J, Pozdíšek J. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic: metodika. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín.
- Lu JC, Huang YF, Lü NQ. 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* **46**: 329 – 338.
- Martinet V, Saulnier P, Beaumal V, Courthaudon JL, Anton M. 2003. Surface properties of hen egg yolk low-density lipoproteins spread at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **31**: 185 – 194.
- Martorana K, Klooster K, Meyers S. 2014. Suprazero cooling rate, rather than freezing rate, determines post thaw quality of rhesus macaque sperm. *Theriogenology* **81**: 381 – 388.
- McKinnon KM. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* **120**: 5.1.1. – 5.1.11.
- Meena GS, Bhakat M, Raina VS, Gupta AK, Mohanty TK, Bishist R. 2017. Effect of different antibiotic combinations in extender on bacterial load and seminal characteristics of Murrah bulls. *Buffalo Bulletin* **36**: 251 – 257.

- Mocé E, Graham JK. 2008. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* **105**: 104 – 118.
- Moussa M, Martinert 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.
- Muiño R, Fernández M, Peña AI. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals* **42**: 305 – 311.
- Murphy EM, Eivers B, O'Meara CM, Lonergan P, Fair S. 2018. Effect of storage temperature, nitrogen gassing and sperm concentration on the *in vitro* semen quality and *in vivo* fertility of liquid bull semen stored in INRA96. *Theriogenology* **108**: 223 – 228.
- Mutalík S, Salian SR, Avadhani K, Mennon J, Joshi H, Hegde AR, Kumar P, Kalthur G, Adiga SK. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **60**: 183 – 188.
- Nehring H, Rothe L, Reguszynski K, Schuman-Zuhlke D. 2005. Developments in quality estimation and cryopreservation of bull semen. *Zuchtunskunde* **77**: 93 – 109.
- Niles D, Eicker S, Stewart S. 2001. Using pregnancy rate to monitor reproductive management conference, April 4 – 6, Las Vegas, Nevada, 117 – 121. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Kansas.
- Pace MM, Graham EF. 1974. Components in egg-yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science* **39**: 1144 – 1149.
- Parisi AM, Thompson SK, Kaya A, Memili E. 2014. Molecular, cellular, and physiological determinants of bull fertility. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **38**: 637 – 642.
- Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF. 2006. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology* **66**: 1894 – 1900.
- Přinosilová P, Kopecká V, Hlavicová J, Kunetková M. 2014. Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Veterinaria Brno* **83**: 313 – 319.
- Qadeer S, Khan MA, Ansari MS, Rakha BA, Ejaz R, Iqbal R, Younis M, Ullah N, DeVries AL, Akhter S. 2015. Efficiency of antifreeze glycoproteins for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm. *Animal Reproduction Science* **157**: 56 – 62.
- Rehman FU, Zhao C, Shah MA, Qureshi MS, Wang X. 2013. Semen extenders and artificial insemination in ruminants. *Veterinaria* **1**: 1 – 8.
- Rodriguez-Martinez H. 2006. Can we increase the estimate value of semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals* **41**: 2 – 10.
- Rodriguez-Martinez M, Larsson B, Zhang BR, Söderquist L. 1997. *In vitro* assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development* **43**: 1 – 11.
- Rosato MP, Iaffaldano N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus

- osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* **79**: 508 – 516.
- Říha J, Jakubec V, Jílek F, Illek J, Kvapilík J, Hanuš O, Čermák V. 2000. Reprodukce v procesu šlechtění skotu. Asociace chovatelů masných plemen, Rapotín.
- Říha J, Petelíková J, Čerovský J, Bažant J, Bochenek M, Pytloun J. 2003. Plemenitba hospodářských zvířat. Asociace chovatelů masných plemen, Rapotín.
- Sabés-Alsina M, Lundeheim N, Johannisson A, López-Béjar M, Morrell JM. 2019. Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen: A retrospective analysis. *Journal of Dairy Science* **102**: 11652 – 11669.
- Saragusty J, Gacituna H, Pettit MT, Arav A. 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals* **42**: 610 – 615.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Savvulidi F, Ptáček M, Stádník L. 2018. Pathogens in processed ram semen and approaches for their elimination. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **66**: 1065 – 1072.
- Siddique M, Ali R, Raza A. 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of agriculture & social sciences* **2**: 117 – 119.
- Stádník L, Doležalová M, Ducháček J. 2015a. Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Stádník L, Rajmon R, Beran J, Šimoník O, Doležalová M, Šichtař J, Stupka R, Folková P. 2015b. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno* **84**: 125 – 131.
- Stradioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* **67**: 1249 – 1255.
- Swain J, Smith G. 2010. Cryoprotectants. Pages 24 – 38 in Chian R, Quinn P, editors. *Fertility Cryopreservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Syrůček J, Burdych J. 2015. Vybrané ukazatele ovlivňující efektivitu chovu dojníc. *Náš chov* **75**: 34 – 38.
- Šimoník O, Šichtař J, Beran J, Maňásková-Postlerová P, Tůmová L, Doležalová M, Folková P, Stádník L, Rajmon R. 2019. Low density lipoprotein – important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Animal Reproduction* **16**: 267 – 276.
- Taylor JF, Schnabel RD, Sutovsky P. 2018. Review: Genomics of bull fertility. *Animal* **12**: 172 – 183.
- Uçan U, Küçük N, Ahmad E, Naseer Z, Aksoy M, Serin I, Ceylan A. 2016. Effect of different sugars supplemented to the extender in combination with cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) on post-thaw quality of ram spermatozoa. *Small Ruminant Research* **136**: 243 – 246.
- Vahedi V, Mostafaei M, Dodaran HV, Evrigh NH. 2019. Optimization of sperm freezability in Bactrian camel using various dilution rates and equilibration times. *Zygote*: 1 – 5.
- Vasan SS. 2011. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian Journal of Urology* **27**: 41 – 48.

- Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Bencharif D, Anton M, Desherces S, Shmitt E, Thorin C, Tainturier D. 2010. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 °C. *Asian Journal of Andrology* **13**: 281 – 286.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Pauw I, De Kruif A. 2004. Storage of fresh bovine semen in diluent based on the ionic composition of cauda epididymal plasma. *Reproduction in Domestic Animals* **39**: 410 – 416.
- Věžník, Z, Švecová D, Zajícová A, Přinosilová P. 2004. Repetitorium dermatologie a andrologie metodiky spermatoanalýzy. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno.
- Vishwanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* **62**: 23 – 53.
- Wakamatu T, Sato T, Salto Y. 1982. Identification of the components responsible for the gelation of egg-yolk during freezing. *Agricultural and Biological Chemistry* **46**: 1495 – 1503.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* **60 – 61**: 481 – 492.
- Wojcik C, Sawicki W, Marianowski P, Benchaib M, Czyba JC, Guerin JF. 2000. Cyclodextrin enhances spermicidal effects of magainin-2-amide. *Contraception* **61**: 99 – 103.
- Wronski R, Golob N, Grygar E, Windisch M. 2002. Two-color, fluorescence-based microplate assay for apoptosis detection. *Biotechniques* **32**: 666 – 668.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AMP	antimicrobial peptides (anitimikrobiální peptidy)
ATP	kyselina adenosintrifosforečná
BSP	phospholipid-binding proteins (bílkoviny vázající fosfolipidy)
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis (počítačem řízená analýza ejakulátu)
FITC	fluorescein isothiokyanát
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung (společnost s ručeným omezením)
HDL	high density lipoproteins (lipoproteiny s vysokou hustotou)
ID	inseminační dávka
LDL	low density lipoproteins (nízkomolekulové lipoproteiny)
MTR	barvivo MitoTracker™ Deep Red
PNA	lektin z plodů rostliny <i>Arachis hypogaea</i>
PSA	lektin z rostliny <i>Pisum sativum</i>
TRIS	ředidlo s obsahem organické látky tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZP	zona pellucida

