

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Hodnocení vybraných reprodukčních ukazatelů dojných  
koz v závislosti na inseminaci chlazenými či zmrazenými  
inseminačními dávkami**

**Diplomová práce**

**Bc. Tereza Ranná**

**Biotechnologie – Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Martin Ptáček, Ph.D.**

**© 2023 ČZU v Praze**



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Hodnocení vybraných reprodukčních ukazatelů dojných koz v závislosti na inseminaci chlazenými či zmrazenými inseminačními dávkami" 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 14.04.2023

---

## **Poděkování**

Mé největší poděkování patří mému vedoucímu diplomové práce Ing. Filippu Georgijevičovi Savvulidimu, Ph.D., za jeho vedení, motivaci i cenné rady a zkušenosti, které mi po dobu studia předával. Také děkuji mému konzultantovi Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D., za jeho čas, který mi věnoval, a pomoc při tvorbě diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině, přítelovi a přátelům, za roky podpory a pomoci při mém studiu.

# Hodnocení vybraných reprodukčních ukazatelů dojných koz v závislosti na inseminaci chlazenými či zmrazenými inseminačními dávkami

## Souhrn

Získání nových informací o asistované reprodukci koz by bylo přínosné, jelikož by pomohly usnadnit reprodukci malých přežvýkavců, zejména v komerčních chovech i při záchranném programu genetických zdrojů zvířat.

Cílem práce bylo ověřit, zda způsob uchování inseminačních dávek kozlů (chlazené (5 °C) nebo krykonzervované) ovlivní poškození spermatických buněk, což se projeví na vybraných reprodukčních parametrech koz při testování dané inseminační metody. Dalším cílem bylo ověřit výsledky kvalitativních testů spermií *in vitro*, které byly zjištěny pomocí průtokové cytometrie a počítačově asistované analýzy spermií na vybraných reprodukčních ukazatelích. Pro účel této diplomové práce byla ve vybraném chovu dojných koz provedena jednoduchá intracervikální inseminace (chlazenými a krykonzervovanými inseminačními dávkami) u vzorku 20 koz. Z reprodukčních ukazatelů bylo sledováno procento okozlených koz (počet okozlených koz/počet inseminovaných koz) a procento plodnosti (počet narozených kůzlat/počet okozlených koz).

Bylo zjištěno, že použitá umělá inseminace je relevantní a snadnou metodou v asistované reprodukci koz. Při využití chlazených inseminačních dávek bylo možné dosáhnout  $71,4 \pm 15,7$  % okozlených koz. Inseminací krykonzervovaných inseminačních dávek signifikantně kleslo okozlení na  $15,4 \pm 11,5$  %. Způsob uchování inseminačních dávek neměl vliv na plodnost samic. Zpětně po okozlení koz bylo hodnoceno, zda kvalitativní parametry spermií mají vliv na okozlení a plodnost koz. Nebyl prokázán signifikantní vliv spermií a jejich parametrů na plodnost koz. Kdežto kvalitativní parametry spermií prokazatelně ovlivňovaly procento okozlení. Korelační koeficient mezi okozlením a parametry spermií byl  $r = 0,56$ . Součástí práce bylo i navržnutí statistických modelů pro odhad reprodukčních ukazatelů.

Zjištěná data měla charakter prvotních výsledků. Navrhují pokračovat ve studiích, které se budou zabývat sběrem dat týkajících se použité metody umělé inseminace koz i kvalitativních testů spermií *in vitro* ke zpřesnění prediktivních modelů. Zjištěné informace mohou pomoci k dalšímu zdokonalování metod asistované reprodukce v chovech koz.

**Klíčová slova:** okozlení, CASA, průtoková cytometrie, asistovaná reprodukce koz, kvalitativní parametry spermií

# Evaluation of selected reproductive indicators of dairy goats depending on insemination with chilled or frozen insemination doses

## Summary

Obtaining new information on assisted reproduction of goats would be beneficial as it would help to facilitate the reproduction of small ruminants, especially in commercial farms as well as in the rescue programme of animal genetic resources.

The aim of this study was to investigate whether the method of preservation of insemination doses of bucks (chilled (5 °C) or cryopreserved) affects sperm cell damage, which will be reflected in selected reproductive parameters of goats when testing a specified insemination method. Another objective was to verify the results of qualitative tests of sperm *in vitro*, which were determined by flow cytometry and computer-assisted semen analysis on selected reproductive parameters. For the purpose of this thesis, simple intracervical insemination (with chilled and cryopreserved insemination doses) was performed in a sample of 20 does in a selected dairy goat farm. Among the reproductive parameters, kidding rate (number of does kidding/number of does inseminated) and the percentage of fertility (number of kids born/number of does kidding) were monitored.

The artificial insemination used was found to be a relevant and easy method in assisted reproduction of goats. Using chilled insemination doses, it was possible to achieve  $71.4 \pm 15.7 \%$  of kidding rate. The insemination of cryopreserved insemination doses significantly reduced the kidding rate to  $15.4 \pm 11.5 \%$ . The method of storage of the insemination doses did not affect the fertility rate of the does. The effect of sperm quality parameters on kidding rate and fertility rate of goats was evaluated retrospectively after the does kidded. There was no significant effect of semen and its parameters on goat fertility rate. Whereas sperm quality parameters were shown to influence the kidding rate. The correlation coefficient between kidding rate and sperm parameters was  $r = 0.56$ . The work included the design of statistical models for estimation of reproductive parameters.

The data found were preliminary results. I propose to continue studies, that will collect data on the used method artificial insemination of goats as well as on *in vitro* qualitative sperm tests to develop more precisely predictive models. The information found may help to further improve assisted reproduction methods in goat breeding.

**Keywords:** kidding rate, CASA, flow cytometry, assisted reproduction of goats, sperm quality parameters

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Literární řešerše.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Umělá inseminace koz .....</b>	<b>11</b>
3.1.1 Vybavení pro umělou inseminaci .....	11
3.1.2 Vaginální metoda inseminace.....	12
3.1.3 Cervikální metoda inseminace.....	12
3.1.3.1 Intracervikální inseminace .....	12
3.1.3.2 Transcervikální inseminace .....	13
3.1.4 Laparoskopická metoda inseminace .....	13
<b>3.2 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu kozlů .....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Sezónnost.....	15
3.2.2 Teplota.....	16
3.2.3 Výživa .....	16
3.2.4 Stres.....	16
3.2.5 Pořadí a četnost odebraných ejakulátů .....	17
<b>3.3 Faktory ovlivňující reprodukci koz .....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Motilita spermií.....	18
3.3.2 Životaschopnost spermií.....	18
3.3.3 Sezónnost.....	19
3.3.4 Čas inseminace.....	19
<b>3.4 Laboratorní vyšetření ejakulátu.....</b>	<b>20</b>
3.4.1 CASA – počítačově asistovaná analýza spermií.....	20
3.4.2 Průtoková cytometrie .....	22
3.4.2.1 Životaschopnost .....	23
3.4.2.2 Celistvost akrozomu.....	23
3.4.2.3 Nespermatické buňky .....	23
3.4.2.4 Mitochondriální aktivita .....	24
3.4.2.5 Nespermatické buňky .....	24
3.4.3 Mass motility .....	25
<b>3.5 Uchovávání spermatu.....</b>	<b>25</b>
3.5.1 Ředidla ejakulátu.....	26
3.5.2 Kryoprotektanty .....	26
3.5.3 Krátkodobé uchovávání spermatu.....	27
3.5.4 Dlouhodobé uchovávání spermatu.....	27
3.5.4.1 Chlazení a ekvilibrace .....	28

3.5.4.2	Mrazení spermatu.....	29
3.5.4.3	Rozmrazení spermatu.....	29
<b>3.6</b>	<b>Synchronizace říje .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Popis zvířat .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Odběr ejakulátu.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Příprava inseminačních dávek.....</b>	<b>31</b>
4.3.1	Příprava chlazených inseminačních dávek .....	32
4.3.2	Příprava kryokonzervovaných inseminačních dávek .....	32
4.3.2.1	Rozmrazení kryokonzervovaných inseminačních dávek .....	32
<b>4.4</b>	<b>Zhodnocení kvality inseminačních dávek.....</b>	<b>32</b>
4.4.1	mCASA.....	32
4.4.2	Průtoková cytometrie.....	33
<b>4.5</b>	<b>Synchronizační program samic.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6</b>	<b>Cervikální inseminace a hodnocené reprodukční ukazatele koz .....</b>	<b>34</b>
4.6.1	Hodnocení reprodukčních ukazatelů .....	35
<b>4.7</b>	<b>Statistická analýza dat.....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Základní statistika .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Vliv kvalitativních parametrů spermií na okozlení koz .....</b>	<b>39</b>
5.2.1	Hodnocení kvality spermií průtokovou cytometrií .....	40
5.2.2	Hodnocení z počítačově asistované analýzy spermií .....	42
<b>5.3</b>	<b>Vliv kvalitativních parametrů spermií na plodnost koz.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>61</b>



# 1 Úvod

Dojná plemena koz bílá krátkosrstá koza patří mezi genetické zdroje ČR. Dle Svazu chovatelů ovcí a koz se v roce 2022 v České republice nacházelo 1633 zvířat tohoto plemene. K udržení žádaných parametrů pro toto plemeno, jako je zejména množství mléka a jeho složení, napomáhá asistovaná reprodukce.

Umělá inseminace koz je důležitá biotechnologická metoda, která umožňuje lépe využívat genetický materiál zvířat, zlepšovat reprodukční parametry i zdraví zvířat, ale stále naráží na mnoho metodických problémů. Jednou překážkou je samotné provedení umělé inseminace a zavedení inseminační pipety do reprodukčního traktu samice. Děložní krček koz tvořen několika pevnými chrupavčitými prstenci společně s cervikálním hlenem tvoří ochrannou vrstvu před proniknutím cizích částic do dělohy. Tato ochrana také zabraňuje snadnému proniknutí inseminační pipety skrz děložní krček. Dalším problémem jsou nedostatečné informace o způsobu uchování spermatu kozlů a parametrech spermií v kontextu jejich vlivu na reprodukční ukazatele u koz. Získávání těchto informací je důležité pro sběr dostatečného množství dat na vytvoření prediktivních modelů pro odhad reprodukčních ukazatelů koz.

Z důvodu výše uvedené problematiky se má diplomová práce bude zabývat využitím jednoduché intracervikální inseminační metody u koz společně s použitím rozdílných inseminačních dávek dle jejich konzervace. Bude hodnocena úspěšnost inseminační metody dle využití inseminační dávky, také bude zjišťován vliv kvalitativních parametrů spermií a jejich vztah na vybrané reprodukční ukazatele.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

**Hypotéza:** Předpokládáme, že způsob konzervace inseminační dávky (chlazené nebo zmrazené) ovlivní poškození spermatických buněk v průběhu konzervace, což se projeví na reprodukčních ukazatelích po následné inseminaci. Dále předpokládáme, že samotnou inseminaci s použitím dvou různých typů inseminačních dávek (chlazené nebo zmrazené) lze použít pro ověření výsledků kvalitativních testů spermií *in vitro* (jako je počítačově asistovaná analýza spermií a průtoková cytometrie).

**Cíle práce:** Využití biotechnologických metod (především umělá inseminace) u malých přežvýkavců a zejména u koz je velmi omezené. Jakékoli informace vedoucí ke zlepšení dílčích postupů jsou proto důležité s ohledem na potenciální rozvoj tohoto odvětví nejen na místní, ale i na celosvětové úrovni. Předmětem diplomové práce bude ověření vyslovených hypotéz, navržení a ověření zvoleného způsobu inseminace u dojných koz a optimalizace metodiky *in vitro* kvalitativního stanovení spermií.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Umělá inseminace koz

Umělá inseminace (UI) je metoda využívaná v chovu hospodářských zvířat, při níž je získáno semeno samce, které je následně vpraveno pomocí speciálních nástrojů do reprodukčního traktu samice. Při umělé inseminaci tedy nedochází k přímému kontaktu samce a samice (Evans & Maxwell 1987).

Umělá inseminace má mnoho výhod v chovu zvířat. Využitím UI dochází ke genetickému zlepšování, jelikož díky UI je možné selektovat a využívat pouze kvalitní plemeníky. Z důvodu ředění a přípravy inseminačních dávek (ID) je následně možné získat mnohonásobně vyšší množství mláďat po vybraném kvalitním plemeníkovi, než by bylo možné běžným pářením. Dalším z důležitých benefitů UI je možnost transportu inseminačních dávek po celém světě, který je mnohem méně složitý a nákladný než transport jednotlivých plemeníků. Tímto způsobem je možné zvyšovat genetický zisk i na jiných místech planety, než se samotný plemeník nachází. Inseminační dávky je možné díky kryokonzervaci uchovávat na neomezeně dlouhou dobu a využít sperma daného plemeníka i po jeho smrti. UI také přináší prevenci nemocí, které si mohou samec se samicí v přímém kontaktu předat, ale i jiné nemoci, jelikož dochází ke kontrole zdravotního stavu plemeníků (Parkinson & Morrell 2019). Jsou zde i rizika, které UI přináší. Jedním z nich je, že při dlouhodobém využívání UI může docházet ke snižování plodnosti v populaci. Pomocí umělé inseminace je možné využívat i méně kvalitní ejakuláty a tato genetická informace je s těmito ejakuláty přenášena na potomky (Evans & Maxwell 1987). Nejproblematictější částí UI je detekce vhodné doby k inseminaci. U malých přežvýkavců je detekce říje velmi složitá, protože nevykazují žádné známky říje a je potřeba využití vasektomovaných samců nebo říje musí být vyvolána farmakologicky hormony pro synchronizaci či indukci říje (Parkinson & Morrell 2019).

Umělá inseminace u koz může být směřována do vagíny, do děložního krčku nebo přímo do dělohy samice. Každá metoda má své výhody a nevýhody, které se s použitou metodou liší, jako je náročnost a složitost metody, či procento okozlení (počet koz, kterým se narodilo mláďe/počet inseminovaných koz) (Evans & Maxwell 1987).

#### 3.1.1 Vybavení pro umělou inseminaci

Vybavení pro vaginální i cervikální inseminaci koz zahrnuje plastovou inseminační pipetu připojenou k injekční stříkačce, která slouží jako aplikátor inseminační dávky. Pro cervikální metodu UI je dále potřeba spekulum pro lepší viditelnost děložního hrdla. Některá spekula jsou opatřena zabudovaným světelným zdrojem, pokud tomu tak není, je možné využít klasickou čelovku. Plastové pipety jsou asi 30 cm dlouhé, mají vnitřní průměr cca 2,5 mm, vnější 4,5 mm a na konci se zužují pro lepší zavedení do děložního krčku. Pro vaginální metodu je inseminační pipeta opatřena pouze zaoblenou špičkou, která chrání proti poranění při inseminaci „naslepo“. Také je možné použít tzv. inseminační pistoli, která aplikuje sperma přímo z brčka inseminační dávky (Evans & Maxwell 1987).

### 3.1.2 Vaginální metoda inseminace

Inseminace vaginální metodou spočívá v uložení dávky spermatu hluboko do pochvy. U této metody se nehledá děložní čípek samice, sperma je pouze deponováno hluboko do pochvy, proto se někdy nazývá také SID metoda („shot in the dark“). Jedná se o nejjednodušší a nejrychlejší metodou UI, která ale vyžaduje vyšší dávku spermatu (Evans & Maxwell 1987).

Vaginální umělá inseminace (VUI) je sice levná a nenáročná, ale pouze s čerstvými ID dosahuje dobrých výsledků oplození. Při použití rozmrazeného spermatu při vaginální inseminaci dochází k poklesu procenta oplození, tím pádem tato metoda není vhodná pro kryokonzervované ID (Leethongdee & Ponglowhapan 2014). Při využití čerstvého spermatu pro vaginální metodu UI je možné u Norské dojně kozy dosáhnout okozlení až 74 % (Paulenz et al., 2005), kdežto při využití mrazených ID klesá procento okolozených koz a pohybuje se okolo 58 % (Nordstoga et al., 2010). Procento okozlení je obdobné při inseminaci koz chlazenými ID (50 %) (Bello et al., 2022). Ideální dobou pro vaginální inseminaci je před ovulací, tedy 12-18 h od začátku říje (Evans & Maxwell 1987) s doporučenou koncentrací spermií  $200 \times 10^6$  u čerstvých ID (Paulenz et al., 2005) a koncentrací  $400 \times 10^6$  spermií u rozmrazených ID (Nordstoga et al., 2010). Momentálně se vaginální UI dostává do popředí, jelikož cílem je rozšířit techniku inseminace koz, která je dostatečně jednoduchá, méně nákladná, časově nenáročná, chovatelé jsou schopni ji sami používat a také je šetrnější k welfare zvířat (Paulenz et al., 2005).

### 3.1.3 Cervikální metoda inseminace

Metoda, kdy je semeno deponováno přímo do či za děložní krček, je náročnější než vaginální inseminace. Je to z důvodu anatomie děložního krčku koz. Nachází se zde 4 pevné chrupavčité prstence (Dayan et al., 2010), které spolu s cervikálním hlenem tvoří ochrannou vrstvu před proniknutím cizích částic do dělohy (Farin, 2015). Cervikální inseminaci lze rozdělit na dvě metody podle hloubky zavedení inseminační pipety. Méně náročnější z těchto dvou metod je intracervikální metoda inseminace, při které se pipeta zavádí do hloubky 1–3 cm děložního hrdla samice. Jelikož až u 50 % koz je možné se dostat inseminační pipetou až skrz děložní krček, lze provádět tzv. transcervikální inseminační metodu, při které je ID deponována přímo do dělohy samice bez potřeby chirurgického zákroku (Evans & Maxwell 1987).

#### 3.1.3.1 Intracervikální inseminace

Jak již bylo zmíněno, intracervikální umělá inseminace (IUI) je metoda, při které se inseminační pipeta zavádí do děložního krčku samice a zde je i deponována inseminační dávka (Evans & Maxwell 1987). Při IUI je procento okozlení přímo závislé na hloubce zavedení inseminační pipety a deponování semene do děložního hrdla. Je značný rozdíl oplozenosti při zavedení pipety pouze 1 cm do děložního krčku a při hluboké intracervikální inseminaci (3 cm), kdy s hlubší deponací se zvyšuje procento oplozených koz (Salvador et al., 2005). Paulenz et al. (2005) při zavedení inseminační pipety 0,5-1 cm hluboko do děložního krčku s použitím čerstvého spermatu dosáhli výsledku 78 % okozlených samic. Intracervikální inseminace je úspěšná i při využití chlazených ID, kdy je možné získat až 73,1 % okozlení (Roca et al., 1997). Při inseminaci rozmrazeným spermatem lze také dosahovat vysokého procenta okozlení, pokud

se inseminace provede hluboko do děložního krčku samice (3 cm). Takto je možné zajistit až okolo 65 % koz, které porodí (Salvador et al., 2005). Ideálním časem pro UIU je 55 hodin po vyndání intravaginálním progesteronových tamponů nebo 15-17 hodin po začátku říje (Faigl et al., 2012). Hloubka zavedení inseminační pipety je závislá i na stáří samice. Nuliparní (které ještě nerodily) nebo primiparní (které jednou porodily) kozy mají úzký děložní krček s těsnými a nesouměrnými cervikálními prstenci, které komplikují průchod inseminační pipety. Z těchto důvodů je u mladých samic vhodné přistoupit k intracervikální inseminaci, jelikož pro tyto samice není transcervikální inseminace vhodnou metodou (Farin, 2015).

### 3.1.3.2 Transcervikální inseminace

Transcervikální umělá inseminace (TUI) je jakási náhrada za laparoskopii (viz kapitola 3.1.4), jelikož v obou případech se semeno deponuje do dělohy samice, ale TUI je neinvazivní metoda. Je vhodná pro mrazené inseminační dávky či méně kvalitní semeno, které mají horší motilitu či oplozovací schopnost. Samostatná metoda totiž překonává přirozenou bariéru děložního krčku, která méně kvalitním spermii zabraňuje oplození vajíčka. Díky bližšímu uložení semene k místu oplození vajíčka se navyšuje procento oplození oproti vaginální a intracervikální metodě (Evans & Maxwell 1987). Ritar a Salamon (1983) ve své studii dosahovali výsledků procenta okozlení 67,3 % při využití čerstvých ID. Těchto výsledků dosahovali i při stejné metodě inseminace, ale s využitím mrazeného spermatu. Foxworth et al. (2019) pozorovali snížení procenta okozlení, pokud využili chlazené inseminační dávky (45,7 %).

Při TUI by se inseminační pipeta ale neměla zavádět hlouběji než 3,8 cm z důvodu možného poranění děložní stěny špičkou pipety (Faigl et al., 2012). Pipetu je možné zavádět hlouběji, pouze pokud se pipeta zavede přes děložní krček až do děložního rohu. Takto je možné dosahovat 71 % okozlení při použití rozmrazené ID. Zajímavostí je, že při kontrolním experimentu, kdy samice koz byly oploďňovány laparoskopicky, procento okozlení dosahovalo pouze 53 %. Předpokládá se, že nižší počet březostí po laparoskopické inseminaci (LUI) by mohl souviset s dočasným odebráním krmiva a vody před LUI a také se stresem, který je spojený s typickou polohou hlavou dolů při provádění LUI (Sohnrey & Holtz 2005).

### 3.1.4 Laparoskopická metoda inseminace

Při laparoskopické metodě inseminace dochází k chirurgickému zákroku, při kterém se inseminační dávka deponuje do dělohy samice přes dutinu břišní. Před samotným zákrokem je samice znehybněna a sedována. Jakmile je potvrzena dostatečná sedace, je zvíře zvednuto a připevněno za přední i zadní končetiny ke speciální fixační kolébce pro laparoskopickou inseminaci. Břicho je oholeno, očištěno a samice je přenesena do Trendelenburgovy polohy, kdy zadní končetiny jsou zvednuty, aby se břicho dostalo až do úhlu 45° a směřovalo nahoru. Následně je do míst, kde budou zaváděny laparoskopické nástroje, injekčně podáno lokální anestetikum. Do těchto míst jsou zavedeny trokar a kanyla, které jsou o průměru 5-7 mm. Laparoskop se protáhne kanylou a slouží jako zdroj světla v dutině břišní a také funguje jako kamera (Sathe, 2018). Kanyla je připojena k plynové lahvi s CO<sub>2</sub> a slouží k nafouknutí pobřišnicové dutiny plynem z důvodu zviditelnění břišního obsahu. Zde je potřeba postupovat opatrně, jelikož nadměrné nafouknutí způsobuje zvířeti nepříjemné pocity (Evans & Maxwell

1987). Laparoskopickou inseminační pistolí se protáhne kanylou a rychlým vpichem jehly se deponuje semeno do jednoho nebo obou děložních rohů. Následně jsou všechny nástroje vytaženy a řezy jsou zašity (Sathe, 2018). Samičím je nejméně 12 hodin před chirurgickým zákrokem odepřena voda a potrava. Tím se zmenší obsah močového měchýře a bachoru, který může bránit lokalizaci dělohy, a zabrání se návratu nestrávené potravy bachoru během laparoskopie (Evans & Maxwell 1987).

U laparoskopické inseminace je výhodou vysoké procento zabřezávání koz i při použití kryokonzervovaných inseminačních dávek. Pomocí LUI je tedy možné dosáhnout vyšší míry březosti i s nekvalitním a zmrazeným spermatem na rozdíl od většiny ostatních metod inseminace, kde procento zabřeznutí při použití takového spermatu je zpravidla nižší (Sathe, 2018). Při použití čerstvého zředěného spermatu dochází průměrně k 80% okozlení (Bhoi et al. 2020). Leil a El-Shamy (2020) ve své studii zjistili, že při použití kryokonzervovaných ID o koncentraci  $20 \times 10^6$  spermií mohou dosáhnout procenta okozlení až 71 %. Kdežto Sohnrey a Holtz (2005) pozorovali pouze 53 % inseminovaných koz, kterým se po laparoskopické inseminaci zmrazeným spermatem narodilo kůzle. Průměrně tedy laparoskopická inseminace rozmrazenými kryokonzervovanými ID vykazuje okozlení 60 % (Kulaksiz & Daşkin 2012) a rozdíly mohou být způsobené např. různou koncentrací ID či plemenem. Při laparoskopické inseminaci chlazenými ID u dojných ovcí je možné dosáhnout 40 % obahnění (Gimenez-Diaz & Aslan 2011).

Čím dál častěji se ale přistupuje k jiným technikám umělé inseminace z důvodu některých nevýhod, které tato metoda přináší. Jednou z nevýhod jsou vysoké náklady, a to jak na nástroje a vybavení potřebné k laparoskopické inseminaci, tak i náklady spojené s tím, že pouze kvalifikovaní veterinární lékaři mohou tuto metodu provádět. Dalším problémem u LUI nastává s ohledem na dobré životní podmínky zvířat a legislativu (Anel et al., 2006). To i vzhledem k tomu, že v některých evropských zemích, jako je např. Norsko a Švédsko, je laparoskopická intrauterinní inseminace zakázána z důvodu welfare zvířat (Faigl et al., 2012). Laparoskopie je pro malé přežvýkavce náročným a stresujícím zákrokem. Laparoskopický zákrok způsobuje zvýšení hladiny kortizolu v plazmě, a to i pokud dojde k sedaci samic (Stafford et al., 2006). Samotná následná laparoskopická inseminace není pro samice natolik stresující jako celková příprava na laparoskopický zákrok. Důkazem tomu jsou samice, které před pokusem nedostaly žádné sedativum a byly pouze připoutány do fixační kolébky, tak vykazovaly podobnou hladinu kortizolu jako samice při laparoskopické inseminaci bez sedativ. Reakce kortizolu byla na Trendelenburgovu polohu a to naznačuje, že tato převrácená pozice ve fixační kolébce je pro samice malých přežvýkavců natolik nepříjemná, že následná inseminace už další negativní zážitek nepřidává (Khalid et al. 1998). Studie Sohnreyho a Holtze (2005) poukazuje na negativní vliv LUI na plodnost koz (počet narozených kůzlat/počet okozlených koz). Stres vyvolaný odebráním krmiva a vody před LUI a také typickou polohou hlavou dolu při provádění LUI snižují plodnost koz v porovnání se samicemi, kterým se provedla TUI.

**Tab. č. 1:** Průměrné hodnoty procenta okozlení dle zvolené metody UI a uchovávání ID

Metoda UI	Chlazené ID	Rozmrazené ID
VUI	50 % (Bello et al., 2022)	58 % (Nordstoga et al., 2010)
IUI	56 % (Mocé et al., 2022)	65 % (Salvador et al., 2005)
TUI	46 % (Foxworth et al. 2019)	71 % (Sohnrey & Holtz 2005)
LUI	40 % (Gimenez-Diaz & Aslan 2011) (ovce)	60 % (Kulaksiz & Daşkin 2012)

### 3.2 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu kozlů

Hodnoty a vlastnosti ejakulátu kozlů se liší jedinec od jedince a ani u stejného kozla nepozorujeme konstantní hodnoty v průběhu celého roku. Lze ale říci, že běžně se objem ejakulátu kozlů se pohybuje v rozmezí 0,5 – 1,5 ml o průměrné koncentraci 4000 milionů/ml. Průměrně mají spermie kozlů motilitu 80 % a normální morfologii spermií také 80 % (Goyal & Memon 2007).

Na změny ve kvalitě ejakulátu má vliv mnoho faktorů, které vzájemně mezi sebou souvisí. Ejakuláty nejsou v průběhu roku jednotné, a to co se týče objemu i kvality a motility spermií. Kvalitu ejakulátu mohou dlouhodobě ovlivňovat různé vnější vlivy, jako jsou například výživa (Martin & Walkden-Brown 1995), délka dne (Williams & Helliwell 1993), stres (Garrido-Fariña et al., 2016), teplotní stres (Ranjan et al., 2020), hormony (Martínez-Madrid et al., 2021) či pořadí a četnost odběrů (Dhaher & Aziz 2021).

#### 3.2.1 Sezónnost

Sezónnost je hlavním faktorem rozhodujícím o reprodukčních vlastnostech většiny plemen koz. Plemena středních a vysokých zeměpisných šířek (vyšších než 35°), tedy v kozy v oblasti České republiky, vykazují výraznou sezónnost. Oproti tomu kozy z tropických a subtropických oblastí nevykazují téměř žádnou reprodukční sezónnost a lze u nich pozorovat rozmnožování po dobu celého roku. V našich podmínkách sezónní plemena koz vstupují do reprodukčního období ke konci léta až přes podzim do začátku zimy. Tím pádem se první kůzlata rodí v období konce zimy až do začátku jara (Chemineau & Xande 1982). Corsteel et al. (1988) definovali období rozmnožování pro kozy ze severní polokoule jako období od poloviny září do poloviny března. Sezónnost reprodukčního cyklu koz je způsobena fotoperiodou, tedy s měnicími se délkami denního světla v průběhu roku. Tyto projevy jsou ovlivněny melatoninem, jelikož se zkracováním denního světla se malým přežvýkavcům zvyšuje tvorba tohoto hormonu a vstupují do reprodukčního období (Williams & Helliwell 1993).

S měnicí délkou denního světla v průběhu roku souvisí i tvorba testosteronu u kozlů. V průběhu roku se mění koncentrace testosteronu obsaženého v krevní plazmě kozlů. Vyšší hladiny hormonu lze pozorovat v měsících letních a podzimních měsících, kdy v září je hladina testosteronu nejvyšší. Následně začne hladina testosteronu postupně klesat a v zimních a jarních měsících jsou hladiny testosteronu velmi nízké, kdy v dubnu je hladina hormonu nejnižší a poté dochází k opětovnému vzrůstu (Todini et al. 2007; Martínez-Madrid et al. 2021). Injekční podávání testosteronu je jednou z možností, jak udržet vyšší hladinu testosteronu v krvi kozlů

v končícím období páření a tím toto období prodloužit. Injekční podávání testosteronu nezvyšuje pouze hladinu hormonu v krvi, ale i zvyšuje kvalitu spermií, a to zejména spermie, které jsou rozmrazené po kryokonzervaci (Flores-Gil et al., 2020).

### 3.2.2 Teplota

S měnícím se ročním obdobím souvisí i změna okolní teploty. Varlata savců mají teplotu přibližně o 2–7 °C nižší, než je tělesná teplota (Wislocki, 1933), a díky tomu může docházet ke správné spermatogenezi. Pokud okolní prostředí dosahuje vysokých okolních teplot, varlata jsou vystavována vyšším teplotám a neprobíhá správná spermatogeneze, což negativně ovlivňuje kvalitu spermatu. Dochází ke snižování pohyblivosti, tak i k zhoršení morfologie spermií či k poškození jejich DNA (Abdollahi et al. 2021; Shahat et al. 2021). Vliv okolní teploty se hodnotí společně s vlhkostí vzduchu tzv. teplotně vlhkostním indexem (THI – Temperature Humidity Index), tímto způsobem je možné sledovat vliv teplotního stresu na organismus (Ranjan et al., 2020). Zvýšení tepelného stresu v letních měsících vede k vyšším sexuálním projevům (čichání k vulvě, močení, flámování) a sexuální aktivitě kozlů. Vede i k zhoršení kvality ejakulátů. Dochází ke snížení objemu ejakulátu, koncentrace, pohyblivosti, procenta živých spermií, neporušených akrozomů. Dále lze pozorovat vyšší množství abnormálních spermií v ejakulátu i zhoršení mrazitelnosti spermatu oproti zimním měsícům. Naopak v zimních měsících nedochází k tepelnému stresu zvířat a i přes snížené libido samců lze pozorovat lepší hodnoty a kvalitu ejakulátu i mrazitelnost spermií (Mohamed et al., 2023; Ranjan et al., 2020).

Změny teplot ovlivňují kvalitu spermatu podle počtu dnů, kdy před ejakulací k tepelnému stresu došlo. Tepelný stres 12 dní před ejakulací pravděpodobně ovlivňuje fázi dozrávání spermií v nadvarletí. Kdežto pokud dojde k tepelnému výkyvu 50 dní před ejakulací, dá se předpokládat, že dochází ke změnám ve fázi spermiogeneze ve varlatech (Malama et al., 2013). Při vystavení zvířat tepelnému stresu po dobu 4 dnů lze pozorovat snížení motility spermií a k nejvýraznějšímu snížení dochází čtyři týdny po tepelném stresu (Shahat et al. 2021).

### 3.2.3 Výživa

Správná výživa má zásadní vliv na kvalitní reprodukci zvířat. Změny ve výživě kozlů ovlivňují velikost varlat a s tím spojenou spermatogenezi. Nevhodné složení krmné dávky, kdy kozlí nemají dostatek krmiva, způsobuje zmenšování jejich varlat a dochází ke snižování produkce spermií (Martin & Walkden-Brown 1995). Důležitým prvkem ve výživě hospodářských zvířat, který má významný vliv na samčí plodnost, je selen. Je důležité udržet optimální hladinu selenu ve stravě, jelikož nízké, ale i vysoké dávky selenu mají negativní vliv na zdraví a reprodukci samců. Důsledkem nevyvážené suplementace selenu mohou být abnormality spermií, zhoršení motility spermií a snížení plodnosti (Ahsan et al. 2014). Vyvážená suplementace selenu u kozlů vede ke zvýšení objemu a koncentraci ejakulátu, motilitě spermií i životaschopnosti spermií (Mojapelo et al. 2021).

### 3.2.4 Stres

Stres má za následek zvýšení hladiny kortizolu v krvi zvířat a také zvyšuje přítomnost nespermatických buněk (neutrofilů, exfoliované epitelové buňky) v ejakulátu. To naznačuje, že



přítomnost neutrofilů v ejakulátu malých přežvýkavců nemusí být indikátorem pouze zánětlivých nebo infekčních procesů reprodukčním traktu, ale může také naznačovat stresové podmínky pro tato zvířata (Garrido-Fariña et al., 2016). Stres a bolest tedy vede ke zhoršení kvality spermatu. Jedním z vyvolávačů může být použití elektroejakulátoru (EE). Při používání elektroejakulátu dochází ke stresu kozlů a vyplavování kortizolu do krve (Ungerfeld et al. 2021). Sperma odebrané pomocí EE má nižší koncentraci než sperma odebrané do umělé vagíny (Memon et al. 1986; Jiménez-Rabadán et al. 2016). EE také ovlivňuje kvalitu spermií po rozmrazení, kdy spermie odebrané pomocí EE mají horší motilitu i horší výsledky z průtokového cytometru než spermie odebrané do umělé vagíny (Jiménez-Rabadán et al., 2016).

### **3.2.5 Pořadí a četnost odebraných ejakulátů**

I pořadí odebraného ejakulátu a četnost odběrových dní má vliv na kvalitu spermatu. S častějšími a početnějšími odběry se snižuje koncentrace spermií a objem ejakulátu, ale zvyšuje se kvalita spermií. Prvně odebrané ejakuláty vykazují horší kvalitu spermií než druhé ejakuláty, a to zejména co se týče motility spermií. Naopak třetí odebrané ejakuláty v jednom týdnu vykazují nižší parametry pohyblivosti spermií než z prvního a druhého ejakulátu (Dhaher & Aziz 2021). Yotov et al. (2011) vysvětluje zlepšení kvality druhých ejakulátů tím, že první ejakuláty obsahují vyšší procento „starých“ spermií. Jedná se o spermie, které už jsou delší dobu zralé, nebo spermie, které brzy odumřou. U druhého ejakulátu se předpokládá, že dojde k jakémusi proplachu starých spermií v průběhu první ejakulace a tím se zvýší procentuální obsazení kvalitnějších spermií v druhém ejakulátu. Snížení motility u třetích odebraných ejakulátu by mělo být způsobeno získáním ještě nezralých spermií, což zapříčiňuje procentuálně nižší motilitu ejakulátu (Oyeyemi & Akusu 1998). Pro výrobu inseminačních dávek je tedy nejvhodnější používat dva po sobě jdoucí ejakuláty odebrané v intervalu jedné hodiny v jednom dni (Dhaher & Aziz 2021).

### **3.3 Faktory ovlivňující reprodukci koz**

Je velmi obtížné najít vztah mezi okozlením či plodností a jednotlivými laboratorními parametry spermií, jelikož procento okozlených koz je multifaktoriální záležitost (Mocé et al., 2022). Počet mláďat ve vrhu závisí na počtu ovulovaných vajíček, počtu oplozených vajíček a jejich schopnost přežít. Počet ovulovaných vajíček je ovlivněn genetickými, ale i negenetickými faktory samice jako je výživa samic (Nalbandov 1990).

Laboratorní testy pro analýzu a vlastnosti spermií nejsou stoprocentním nástrojem k určení výslednému počtu mláďat v chovu. I přes to jsou laboratorní testy spermií velmi důležité, jelikož mohou například pomoci k vyřazení zcela nevyhovujících vzorků spermií a nevyužit je k umělé inseminaci (Mocé et al., 2022). Spermie musí splňovat několik vlastností, aby byla schopna oplodnit oocyt. Spermie je schopná oplození pouze pokud je motilní; má aktivní mitochondrie, které jsou zdrojem energie pro pohyb spermie; nemá porušenou akrozomální membránu, je tedy schopna procházet kapacitačními změnami a tím projít akrozomální reakcí pouze ve správný okamžik; má na sobě receptory vázající se na zonu pellucidu a oolemu; její plazmatická membrána je schopná splýnout s oolemou; jádro spermie

je schopné správné dekondenzace, jaderné reorganizace a dokáže udržet zygotický a embryonální vývoj (Graham & Mocé 2005).

Výsledky inseminace jsou ovlivněny nekontrolovatelnými vnějšími faktory i ovlivnitelnými faktory jako jsou hodnoty spermatu či vlastnosti samic (Mocé et al., 2022). Z tohoto důvodu je třeba provádět laboratorní vyšetření spermií, která jsou důležitá k tomu, aby vůbec mohlo dojít k interakci na různých úrovních samičího pohlavního ústrojí, na obalu oocyty i na oocyty samotném. Zcela spolehlivě lze úroveň plodnosti spermií určit po provedení umělé inseminace a následném vyhodnocení. Tento postup je sice spolehlivý k určení kvality spermatu v závislosti na plodnost, ale jde o nákladný proces, který neumožňuje predikovat fertilizační potenciál spermií, dokud k samostatné inseminaci nedojde. Může tedy nastat situace, kdy fertilizační schopnost je určena až po narození ani jednoho mláděte. Z tohoto důvodu je důležité provádět a rozvíjet laboratorní analýzy spermatu, které mohou předem určit oplozovací schopnost spermií (Rodríguez-Martínez, 2003).

### 3.3.1 Motilita spermií

Hlavním předpokladem oplozovací schopnosti spermií je, že jsou motilní. Spermie musí vykazovat pohyb ve směru hlavičky, aby mohly projít pohlavním ústrojím samice a proniknout do vajíčka. Proto je mikroskopické zhodnocení pohyblivosti jedním z prvních kroků pro zhodnocení kvality spermatu i z důvodu, že patří mezi nenáročné laboratorní testy. Díky tomuto jednoduchému testu lze okamžitě vyloučit ejakuláty s nízkou či žádnou motilitou, které jsou zcela nevhodné k umělé inseminaci (Graham & Mocé 2005). Pro umělou inseminaci jsou vhodné pouze vzorky vykazující velké množství progresivně motilních spermií, kdy rychlost pohybu spermií je okolo 7 mm/min. Změny rychlosti spermií, např. způsobené sezónností, odpovídají změnám v okozlení (Evans & Maxwell 1987).

Zabřeznutí inseminovaných koz přímo úměrně souvisí s procentem pohyblivých spermií a s VAP hodnotou (upravená křivka, nepřímě sleduje pohyb spermie; viz kapitola 3.4.1) ve vzorku spermatu. Pro nejvyšší procento okozlení je doporučeno vybírat mladé samice druhorodičky a inseminační dávky, které obsahují vysoké procento pohyblivých spermií a vyššími hodnotami přímočarého pohybu spermií (Mocé et al., 2022). Další parametr VCL přímo ovlivňuje zabřezávání samic. Se zvyšující VCL se zvyšuje procento samic, které po inseminaci porodily, a tento parametr je možné využít k predikci oplození malých přežvýkavců (Santolaria et al., 2015). Furstoss et al. (2010) tvrdí, že významnou část variability oplození schopnosti kryokonzervovaných ejakulátů kozlů lze předpovědět pouze z jednoho laboratorního testu. Tímto testem je subjektivní mikroskopické hodnocení procenta pohyblivých spermií 120 minut po rozmrazení a inkubaci při 37 °C. Takto je možné ze 70% úspěšností predikovat fertilizační schopnost spermií.

### 3.3.2 Životaschopnost spermií

Životaschopné spermie jsou takové, u kterých byla zjištěna celistvá plazmatická membrána. Hodnocení neporušenosti plazmatické membrány spermie je možné mnoha testy. Starší metodou je barvení eosinem, při kterém barva eosin prochází do spermie přes poškozenou plazmatickou membránu a tím jsou mrtvé spermie barevně označeny (Jeyendran et al., 1984). Novější metoda využívá barvení fluorescenčními barvami

a vyhodnocením na průtokovém cytometru. Zde se nejčastěji používají barvy propidium jodid a ethidium homodimer a fungují na stejném principu prostupuji do spermie skrz poškozenou membránu (Martínez-Pastor et al., 2010).

Integrita a funkčnost membrány spermií není důležitá pouze pro jejich metabolismus, má zásadní roli v průběhu oplodnění vajíčka, ať už při kapacitaci spermií, akrozomové reakci, ale i při mezibuněčných interakcích, jako je vazba spermie na epitel oviduktu či vazba spermie na vajíčko a jeho obaly. Hodnocení celistvosti membrány může být tedy užitečným indikátorem oplození schopnosti spermií (Jeyendran et al., 1984; Rodríguez-Martínez, 2003). Celistvost plazmatické membrány a motilita spolu úzce souvisí, jelikož někteří autoři uvádějí životaschopné spermie ty, které se progresivně pohybují vpřed a mají celistvou plazmatickou membránu i akrozom (Roca et al., 1997).

Celistvost plazmatické membrány spermií je právě jedním z parametrů, který přímo ovlivňuje reprodukci samic. Vyšší procento životaschopných spermií v inseminační dávce zvyšuje šanci narození mláďete (Santolaria et al., 2015).

### **3.3.3 Sezónnost**

Sezónnost je jedním z významných faktorů ovlivňující fertilitu malých přežvýkavců. Je možné pozorovat značné rozdíly ve fertilitě samic v reprodukčním období a mimo reprodukční období. Při inseminaci v rozmnožovacím období zabřezávají kozy častěji, než je tomu mimo reprodukční sezónu (Anel et al., 2005).

Pokles zabřeznutí mezi jednotlivými obdobími může být až poloviční (Arrebola et al., 2014). Sezónnost neovlivňuje pouze samice, má značný vliv i na reprodukci samců. Sezónnost totiž ovlivňuje rychlost spermií, která, jak již bylo zmíněno, přímo souvisí s jejich oplozovací schopností. Nevhodná doba inseminace může negativně ovlivnit výsledný počet narozených mláďat ve stádě (Evans & Maxwell 1987).

### **3.3.4 Čas inseminace**

Pro dobrou využitelnost inseminačních dávek je důležité inseminovat ve správný čas, aby vůbec mohlo dojít ke splynutí spermie s vajíčkem. Délka říje koz bývá zpravidla 20–40 hodin a k ovulaci dochází po 30–36 hodinách od nástupu říje (Evans & Maxwell 1987). Inseminaci koz je možné provádět v intervalu 12–36 h od začátku říje, ale pro vysokou šanci zabřeznutí je ideálním časem 12–24 hodin od nástupu říje. Až 5x se snižuje šance na zabřeznutí, pokud je inseminace provedena ihned po nástupu říje (Murtaza et al., 2020). Přesný čas inseminace ovlivňuje i zvolená inseminační metoda. Při inseminaci, kdy je semeno deponováno do vagíny, je nejvhodnější doba 12–18 hodin od začátku říje (Evans & Maxwell 1987), ale při uložení spermatu do děložního krčku se interval posouvá o pár hodin, kdy nejideálnějším časem je 15–17 hodin od nástupu říje (Faigl et al., 2012). U laparoskopické umělé inseminace je nejvyšší míry zabřezávání dosahováno při inseminaci 18,5 hodiny po nástupu říje (Malmakov et al., 2022).

### 3.4 Laboratorní vyšetření ejakulátu

Laboratorní vyšetření ejakulátu jsou klíčové pro zhodnocení kvality plemeníků i jejich jednotlivých ejakulátů. Výsledky jsou důležité pro uchovnění plemeníků, diagnostiku různých reprodukčních poruch a nemocí, charakteristiku spermatu na výrobu inseminačních dávek, a i pro jejich prodej. Díky jednotlivým metodám je možné zjistit kvalitativní i kvantitativní vlastnosti ejakulátů. Běžná analýza kvality spermatu zahrnuje koncentraci a pohyblivost spermií, což jsou parametry, na jejichž základě se vypočítá počet inseminačních dávek produkovatelných z jednoho ejakulátu (Brito et al. 2016; Valverde et al. 2020).

Mezi další z hlavních metod analýzy spermatu patří CASA, která umožňuje sledovat kinetiku spermií, morfologii jejich hlavičky a koncentraci (Valverde et al. 2020). Dalším přístrojem je průtokový cytometr, který je schopen učit koncentraci buněk ve vzorku, ale zejména poskytuje kvalitativní informace o jednotlivých spermiích ve vloženém vzorku. Jedná se například životaschopnost, akrozomální stav, mitochondriální stav, poškození DNA, velikost spermií, detekci různých proteinů a mnoho dalších faktorů (Martínez-Pastor et al., 2010).

#### 3.4.1 CASA – počítačově asistovaná analýza spermií

Tradičně se analýza kvality spermatu, která zahrnuje hodnocení koncentrace a pohyblivosti, provádí subjektivně pod mikroskopem. Zavedení automatizovaných systémů hodnocení spermatu založených na počítačové analýze spermatu (CASA – computer-assisted semen analysis) představuje značné zjednodušení analýzy a objektivnost výsledků. Systémy CASA umožňují analýzu velkého počtu spermií v krátkém čase a poskytují informace o motilitě, koncentraci, kinematice spermií i o morfometrii hlavičky spermie. Motilita je hodnocena jako procentuální zastoupení pohyblivých spermií ve vzorku. Progresivní motilita je procentuální zastoupení spermií, které vykazují přímý pohyb vpřed za hlavičkou v přímých čarách nebo velkých kruzích (Valverde et al. 2020). Za dobře motilní je považováno sperma, které má okolo 80 % pohyblivých spermií (Evans & Maxwell 1987). Kinematika spermií je měřena pomocí vzdáleností mezi jednotlivými body na hlavičce spermie v průběhu doby snímání. Tímto způsobem je možné vykreslit trajektorii spermie (Gallagher et al., 2019).

CASA vyhodnocuje kinematické parametry:

Křivočará rychlost (VCL – curvilinear velocity) je vypočtená rychlost z délky skutečné dráhy, po které se hlavička spermie pohybuje v daném časovém úseku. Rychlost se udává v  $\mu\text{m/s}$  a u kozlů je tato hodnota přibližně okolo 140  $\mu\text{m/s}$ .

Rychlost průměrné dráhy (VAP – average-path velocity) je rychlost odvozená od VCL. Jedná se o křivku, která vyhlazuje odchylky nepřímého pohybu spermie dopředu. Kozlí spermie vykazují hodnot přibližně 105  $\mu\text{m/s}$ .

Přímočará rychlost (VSL – straight-line velocity) je takzvaný "čistý prostorový zisk" neboli jedná se o vzdálenost mezi výchozím a konečným bodem dráhy za daný časový úsek, která se může pohybovat okolo 90  $\mu\text{m/s}$ .

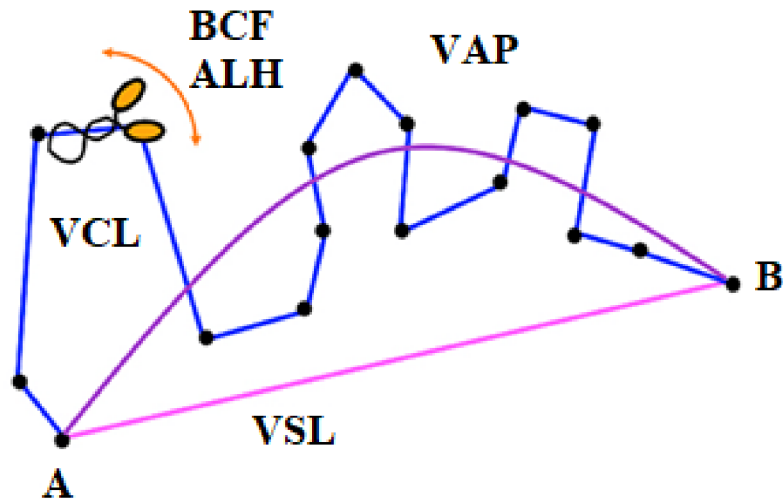
Linearita (LIN – linearity =  $VSL/VCL \times 100$ ) se udává v procentech, vypočítá se porovnáním přímočaré rychlosti ku křivočaré rychlosti a vyjadřuje linearitu skutečné dráhy. Kozlí spermie se pohybují s linearitou cca 60 %.

Přímochařost (STR – straightness =  $VSL/VAP \times 100$ ) porovnává mezi sebou přímochařou rychlost a rychlost průměrné dráhy. Určuje, jak moc přímochaře se spermie pohybovala, a hodnota bývá 85 %.

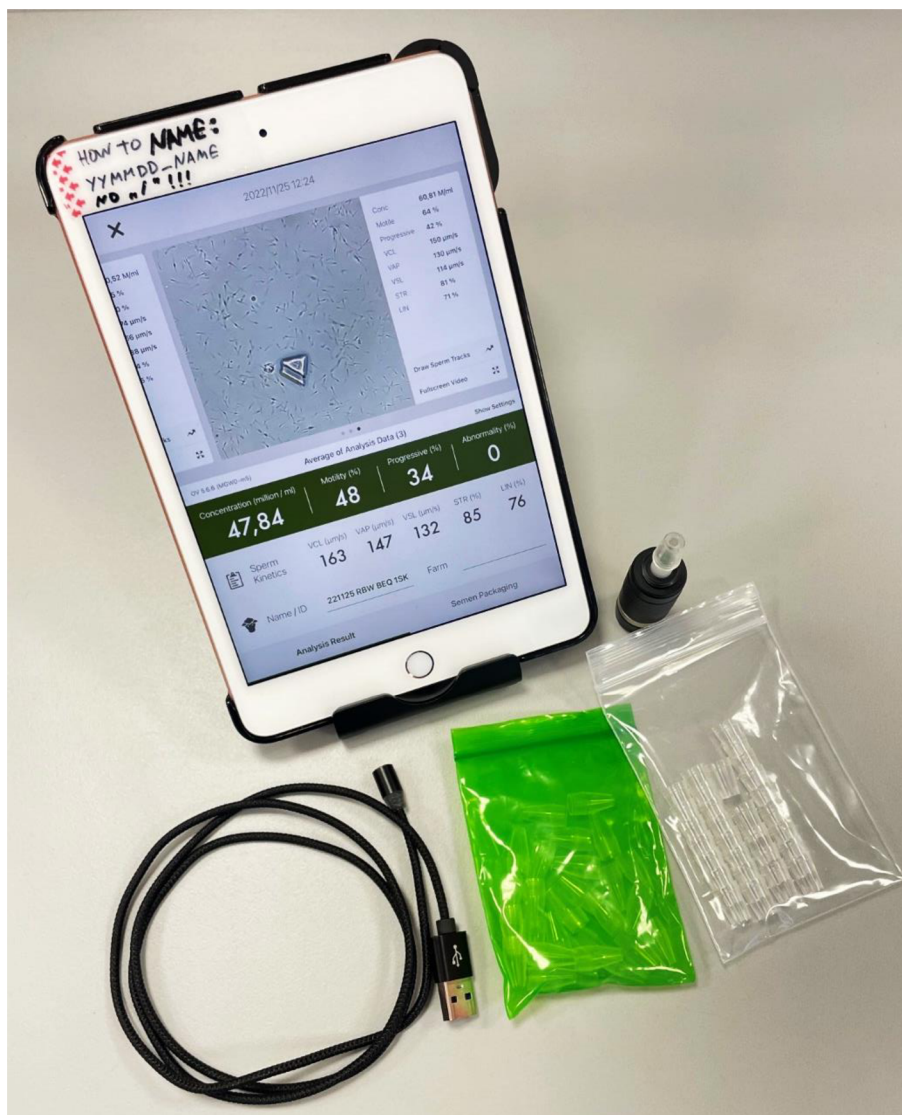
Kmitání (WOB – wobble =  $VAP/VCL \times 100$ ) uvádí z kolika procent se spermie nepohybovala rovně po zaoblené křivce, ale vychylovala se při svém kmitavém pohybu. Kolísavost je okolo 75 %.

Amplituda bočního pohybu hlavičky (ALH – amplitude of lateral head displacement) je maximální pohyb hlavičky do stran při kmitání spermie. Uvádí se v  $\mu\text{m}$  a tento pohyb je průměrně 4,8  $\mu\text{m}$ .

Frekvence bičíku (BCF – beat cross frequency) vyjadřuje frekvenci bičíku neboli kolik kmitajících pohybů bičíků udělá. Frekvence bičíku se udává v hertzích a kozlí spermie mají pohyb bičíku cca 43 Hz (Cox et al. 2006; Sundararam & Edwin 2007; Mortimer & De Jonge 2018).



**Obr. č. 1:** Graf zobrazující kinetické parametry spermii dle CASA (Mortimer & De Jonge 2018)



**Obr. č. 2:** mCASA (archiv autora)

### 3.4.2 Průtoková cytometrie

Průtokový cytometr je laboratorní přístroj umožňující hodnotit jednotlivé buňky ve vzorku. Je schopen určit jak koncentraci buněk, tak poskytuje zejména kvalitativní informace o jednotlivých spermii ve vzorku. Jedná se například o životaschopnost, akrozomální stav, mitochondriální stav, poškození DNA, detekci různých proteinů a mnoho dalších faktorů (Martínez-Pastor et al., 2010). Výhodou oproti ostatním laboratorním vyšetřením je, že průtokový cytometr umožňuje hodnocení velkého počtu spermii (Gillan et al. 2005).

Při analýze průtokovou cytometrií jsou spermie označeny fluorescenčními barvami, následně se pohybují v laminárním proudu skrz lasery a u každé buňky se analyzuje rozptyl viditelného světla a emitované světlo pro jeden nebo více parametrů fluorescence. Rozptyl viditelného světla je nezávislý na fluorescenci a měří se ve dvou různých směrech. Směr dopředu (FSC – Forward Scatter) dodává informaci o relativní velikosti buňky, kdežto rozptyl v úhlu 90° (SSC – Side Scatter) ukazuje vnitřní složitost nebo zrnitost buňky. Výběr fluorescenčních barviv, které jsou ve vzorku použity, závisí na zjišťovaném parametru spermie (McKinnon, 2018).

### 3.4.2.1 Životoschopnost

Životoschopnost spermií se zjišťuje pomocí membránově nepropustných sond, které se vážou na nukleové kyseliny. Jedná se o fluorescenční barvy, které nejsou schopné projít skrz neporušenou plazmatickou membránu. Pokud je plazmatická membrána spermie porušena, nezabrání těmto sondám proniknout do spermie, sondy jsou schopné obarvit jádro a tím je spermie označena jako neživotoschopná. Životoschopná spermie může být pouze taková, která nemá poškozenou svou plazmatickou membránu. Takovéto spermie nemohou být touto fluorescenční barvou označeny, jelikož barva nemohla projít skrz plazmalemu. Pro vyhodnocení životoschopnosti spermií se nejčastěji využívají fluorescenční barvy propidium jodid (PI) a ethidium homodimer (EH). Tato barviva lze excitovat laserem o vlnové délce 488 nm, kterou využívá většina cytometrů. Po průniku porušenou plazmatickou membránou a navázání se na nukleové kyseliny spermií vyzařují červenou fluorescenci (PI - 636 nm; EH - 617 nm) (Gillan et al. 2005). Pro rozlišení životoschopných a neživotoschopných spermií se často využívá kombinace fluorescenčních barev PI a SYBR-14. SYBR-14 barví živé spermie, zatímco PI barví pouze neživotoschopné spermie s poškozenou plazmatickou membránou. Sonda SYBR-14 funguje na podobném principu jako PI. Váže se na nukleové kyseliny, ale na rozdíl od PI či EH je schopná procházet neporušenou plazmatickou membránou. Pokud SYBR-14 projde skrz plazmatickou membránu, naváže se na nukleovou kyselinu a označená hlavička spermie začne vyzařovat zelenou fluorescenci (525 nm). PI ruší signál SYBR-14. Pokud PI pronikne do spermií s poškozenou membránou, vytěsňuje a zhasne fluorescenci SYBR-14 a opět vyzařuje červenou fluorescenci (Garner et al., 1994).

### 3.4.2.2 Celistvost akrozomu

Neporušený akrozom spermií je důležitý aspekt pro fertilizační schopnost spermie, jelikož bez celistvého akrozomu nemůže dojít k průchodu spermie skrz zonu pellucidu. Fluorescenční sondy na zjištění stavu akrozomu fungují na principu navázání se na vnější akrozomální membránu. Neoznačeny jsou tedy pouze spermie s nepoškozeným či nezreagovaným akrozomem. Při průtokové cytometrii se jako sondy využívají lektiny. Nejčastěji se využívá lektin PNA (peanut agglutinin) z *Arachis hypogaea* (podzemnice olejná), který se specificky váže na cukr galaktosyl  $\beta$ -1,3 N-acetylgalaktosamin v akrozomální membráně (Mortimer et al. 1987). Tyto sondy pro zjištění akrozomálního stavu jsou obvykle spřaženy se zeleným fluorescenčním barvivem fluorescein isothiokyanát (FITC – 518 nm) a vzniká komplex FITC-PNA (Martínez-Pastor et al., 2010). Jelikož FITC a SYBR-14 emitují záření o podobné vlnové délce, je možné místo FITC-PNA využít kombinaci PE-PNA. PNA lektin je navázán s fluorescenční barvou fykoerythrin (PE), který emituje oranžové záření (561–583 nm) a nedochází k překryvu při použití barev pro životoschopnost spermií (Nagy et al., 2003).

### 3.4.2.3 Nespermatické buňky

Při průtokové cytometrii je problém odlišení spermií od jiných buněk a nečistot, které se v ejakulátu mohou nacházet. Jedná se zejména o bakterie, krevní buňky, buňky epitelu či částice z ředidel, hlavně se jedná o žlutkové ředidlo. Nespermatické buňky a nečistoty mohou být

z analýzy vyřazeny díky FSC a SSC parametrům (podle jiné velikosti a složitosti buněk), ale toto rozlišení nečistot není stoprocentní. Z tohoto důvodu se využívá fluorescenční barvivo Hoechst 3334, které barví jádra buněk. Emituje modré fluorescenční záření (461 nm) a tím se nepřekrývá se zelenými a červenými zářeními, které využívají SYBR-14 a PI. Kombinace barviva Hoechst 33342 a FSC / SSC lasery dokáže optimálně rozlišit spermie od jiných buněk a nečistot ve vzorku (Martínez-Pastor et al., 2010).

#### 3.4.2.4 Mitochondriální aktivita

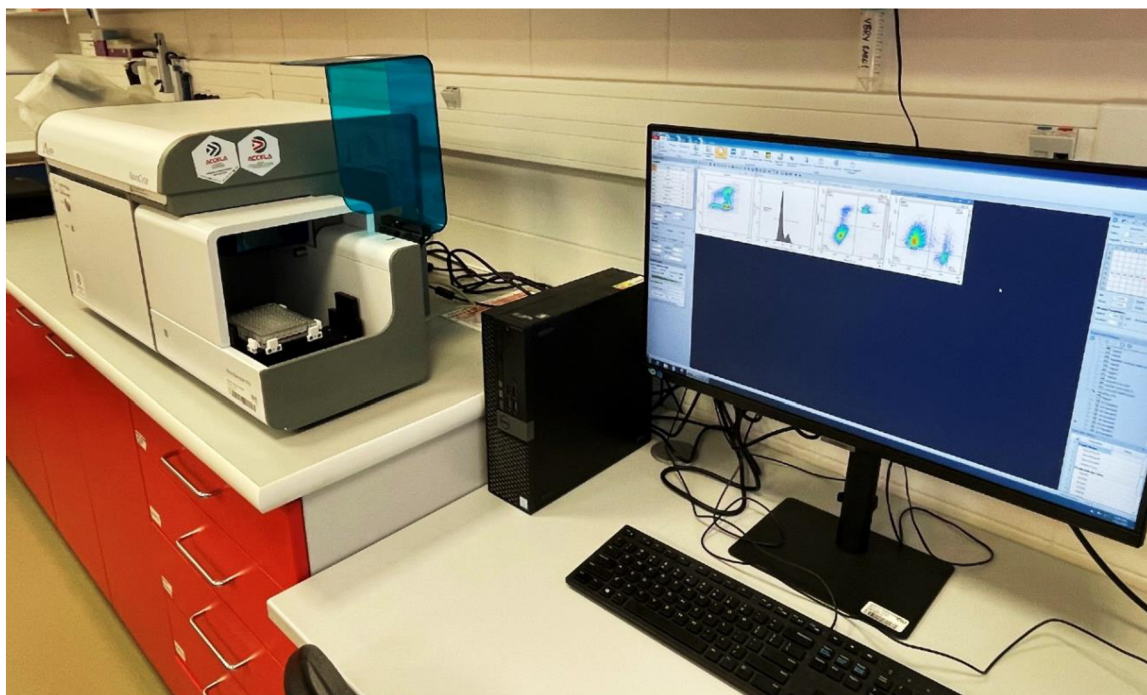
Mitochondrie se nacházejí ve střední části spermie v mitochondriální pochvě a jejich hlavní funkcí je dodání energie spermii. Energií dodává ve formě ATP, které je důležité pro metabolismus spermie, membránovou funkci a zejména samotnou motilitu spermii (Peña et al., 2009).

Fluorescenční barviva k označování mitochondrií pro průtokovou cytometrii fungují tak, že vstupují do živých buněk a hromadí se v mitochondriích (Hossain et al., 2011). Často jsou barviva závislá na membránovém potenciálu spermii. Jedná se o barviva, jako jsou rhodamin 123, tetramethylrhodamin methyl ester (TMRM) a tetramethylrhodamin ethyl ester (TMRE), která je možné použít do té doby, dokud si mitochondrie udržuje záporný membránový potenciál (Chazotte, 2011). Momentálně nepoužívanější komerční sondy pro barvení mitochondrií MitoTracker® pasivně pronikají plazmatickou membránou buněk a hromadí se v aktivních mitochondriích tím, že jsou chemicky reaktivní a vážou se na thiolové skupiny v mitochondriích (Johnson & Spence 2010). Výhodou MitoTracker® sond je velký barevný výběr. V nabídce jsou barvy MitoTracker® Green FM, MitoTracker® Red FM, MitoTracker® Red CM-H2TMRos a MitoTracker® Deep Red FM, což dává možnost vybrat excitovanou barvu, která se nebude překrývat s jinými již použitými barvami ve vzorku (Johnson & Spence 2010; Hossain et al. 2011).

#### 3.4.2.5 Nespermatické buňky

Při průtokové cytometrii je problém odlišení spermii od jiných buněk a nečistot, které se v ejakulátu mohou nacházet. Jedná se zejména o bakterie, krevní buňky, buňky epitelu či částice z ředidel, hlavně se jedná o žlutkové ředidlo. Nespermatické buňky a nečistoty mohou být z analýzy vyřazeny díky FSC a SSC parametrům, které tyto částice rozezná podle jiné velikosti a složitosti buněk, ale toto rozlišení nečistot není stoprocentní. Z tohoto důvodu se využívá fluorescenční barvivo Hoechst 3334, které barví jádra buněk. Emituje modré fluorescenční záření (461 nm) a tím se nepřekrývá se zelenými a červenými zářeními, které využívají SYBR-14 a PI. Kombinace barviva Hoechst 33342 a FSC / SSC lasery dokáže optimálně rozlišit spermie od jiných buněk a nečistot ve vzorku (Martínez-Pastor et al., 2010).





**Obr. č. 3:** Průtokový cytometr (archiv autora)

### 3.4.3 Mass motility

Mass motility, neboli vířivý pohyb, je metoda hodnotící motilitu spermií. Jedná se o subjektivní posuzování pohyblivosti spermií v nativním ejakulátu, zejména vhodné jako prvotní hodnocení kvality ejakulátu v místě odběru. Pozorování se provádí pod mikroskopem na okraji kapky ejakulátu, která je nanesená na vyhřívané podložní sklíčko. Vířivý pohyb je způsoben tím, že spermie plavou různými směry. Vířivost lze pozorovat pouze u druhů s vysokou koncentrací spermií v ejakulátu, jako jsou ovce a kozy. Pohyb je hodnocen od 0 do 5 (viz. tabulka) (Evans & Maxwell 1987).

Kapka nativního ejakulátu je nanesena na předehřáté podložní sklíčko o teplotě 37 °C. Okraj kapky je pozorován mikroskopem při malém zvětšení (40× nebo 100×) na tepelně řízeném stolku. Vhodné s inseminací se považují spermie, které jsou hodnoceny 4 – dobré nebo 5 – velmi dobré (Evans & Maxwell 1987).

### 3.5 Uchovávání spermatu

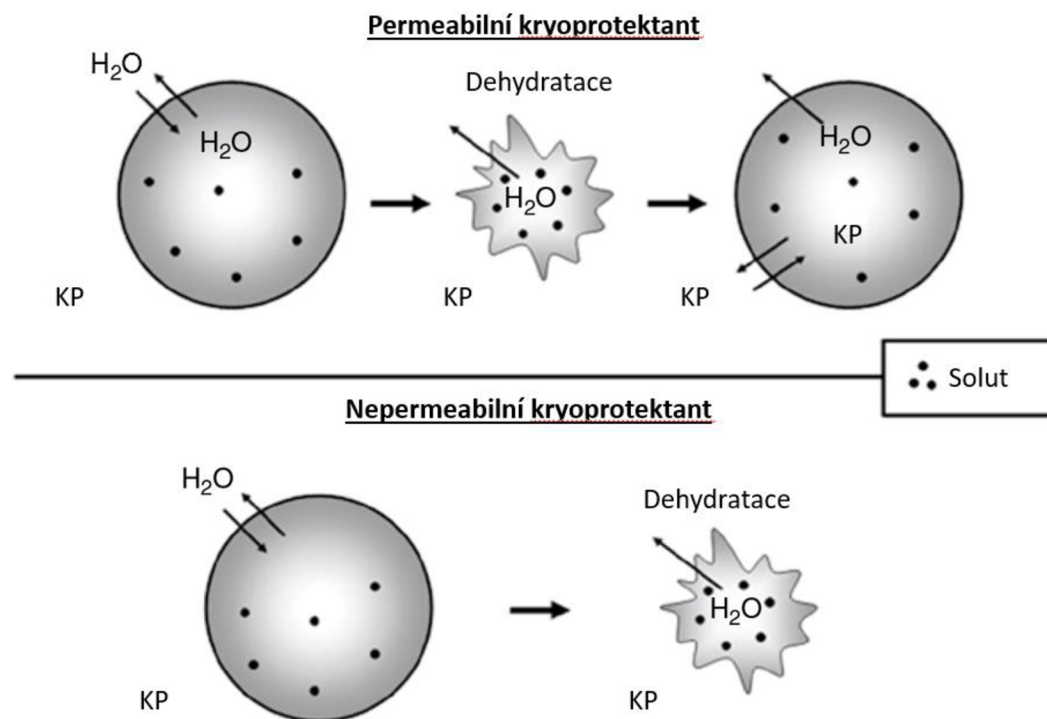
Nástup umělé inseminace vedl k potřebě ejakulát nějak uchovávat, což má svá pozitiva. Po naředění je možné ejakulát krátkodobě či dlouhodobě uskladnit a díky těmto technikám je možné uchovávat ejakulát geneticky kvalitních samců a sperma přepravovat po celém světě, tím pádem je možné oplodňovat velký počet koz malým počtem kvalitních kozlů. Sperma lze v tekutém dusíku uchovávat neomezeně dlouhou dobu a prodlužuje reprodukční období samce i po jeho smrti. Umělá inseminace a uchovávání spermatu tedy dává možnost ke genetickým pokrokům v chovech hospodářských zvířat (Parkinson & Morrell 2019).

### 3.5.1 Ředidla ejakulátu

Ředění ejakulátu je důležité pro získání požadované koncentrace spermií v inseminační dávce, ale zejména pro poskytnutí vhodného prostředí pro spermie. Ředidla dodávají spermiím živiny, udržují vhodné pH a zajišťují izotonické prostředí. Obecně platí, že ředidlo pro kozi sperma obsahuje pufr, jeden nebo více cukrů, soli a antibiotika (Evans & Maxwell 1987). Ředidla musí obsahovat antibiotika (např. penicilin), aby se zamezilo bakteriální kontaminaci a jejich růstu (Schulze et al., 2020). Zdrojem energie v ředidlech je přidaný sacharid (fruktóza, glukóza, manóza). Funkci pufru má v ředidle Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) a navozuje správné pH (6,5-7,5) a soli, např. ve formě citrátu sodného či kyseliny citrónové pomáhá ke správnému pH a zejména správné osmolalitě ředidla. Pokud se jedná o ředidla na bázi žloutku, tak jeho lipoproteiny kromě ochrany před chladovým šokem zabraňují poškození akrozomu během krátkodobého skladování spermatu (Salamon & Maxwell 2000).

### 3.5.2 Kryoprotektanty

Hlavním úkolem kryoprotektantů v ředidlech spermatu je chránit spermie před chladovým šokem a poškozením způsobeným nejen během zmrazování spermií, ale i jejich rozmrazování. Kryoprotektanty (KP) se rozdělují na dvě skupiny dle jejich penetrace skrz membránu spermie. Permeabilní kryoprotektant je schopný projít skrz plazmatickou membránu spermie a nahrazovat většinu intracelulární vody ve spermií. Prostupující kryoprotektanty tuhnou při nižších teplotách než voda, tím zamezují tvorbě vnitrobuněčných ledových krystalů, které mohou spermií poškodit. Nepermeabilní kryoprotektiva jsou obvykle polymery s dlouhým řetězcem a kvůli své velikosti nejsou schopna projít skrz plazmatickou membránu spermie. Tyto kryoprotektanty působí tak, že zvyšují osmolaritu extracelulárního prostoru, což vede k dehydrataci buněk, a tím snižují množství vody v buňce a možnost tvorby intracelulárních ledových krystalů. Také jsou schopné se držet na povrchu membrány a tím zabránit tvorbě ledových krystalů v těsné blízkosti spermií (Swain & Smith 2010).



**Obr. č. 4:** Funkce kryoprotektantů. Upraveno dle (Swain & Smith 2010)

Mezi permeabilní kryoprotektanty patří glycerol, ethylenglykol nebo dimethylsulfoxid, a mezi nepermeabilní se řadí mléko nebo vaječný žloutek. Ke spermatu kozlů se nejčastěji jako kryoprotektant přidává glycerol v 6% koncentraci (Evans & Maxwell 1987).

### 3.5.3 Krátkodobé uchování spermatu

Krátkodobé skladování umožňuje uchovat sperma při snížené teplotě. Při teplotě 0-5 °C nebo 10-15 °C se sperma uchovává v rádech dnů. Cílem krátkodobého uchování spermatu je prodloužit jeho oplozovací schopnost tím, že se chladem vratně sníží nebo zastaví pohyblivost a metabolismus spermií (Maxwell & Salamon 1993). Takto je možné sperma uchovat 72 h, ale oplozovací schopnost spermií se výrazně snižuje po 24 hodinách uchování a po této době inseminační dávky již nejsou zcela vhodné k využití pro intracervikální inseminaci (O'Hara et al., 2010).

### 3.5.4 Dlouhodobé uchování spermatu

Pro dlouhodobé uskladnění se dnes naředěné sperma plní výhradně do speciálních PVC slávek (pejet) o velikosti 0,25 nebo 0,5 ml. Takto připravené inseminační dávky je možné uchovávat v tekutém dusíku při teplotě -195,8 °C a teoreticky na neomezeně dlouhou dobu (Salamon & Maxwell 1995). Salamon et al. (1996) provedli testy plodnosti, kdy k intracervikální inseminaci použili rozmrazené sperma skladované 3, 5, 7, 11, 16 a 27 let v tekutém dusíku. Ve všech letech se výsledky narozených mláďat pohybovaly mezi 52-62 % (narozená mláďata/nainseminované samice). Lze tedy říci, že doba skladování inseminačních

dávek v tekutém dusíku nezhoršuje kvalitu spermatu ani jeho oplodňovací schopnost, ale snižuje jeho kvalitu oproti jiným metodám uchovávání spermatu.



**Obr. č. 5:** Kontejner s tekutým dusíkem a uloženými inseminačními pejetami rozdělené v gobletách (archiv autora)

#### 3.5.4.1 Chlazení a ekvilibrace

Důležitým faktorem při uchovávání spermatu v tekutém dusíku je proces, kterým se sperma postupně ochlazuje a zmrazuje. Postupné chlazení je důležité pro adaptaci spermií na snížený metabolismus. Ekvilibrace je čas, při kterém jsou spermie v kontaktu s kryoprotektivním ředidlem, dokud nedojde k jejich zamrazení. Tyto dva kroky je možné spojit, dochází k ekvilibraci v čase ochlazování a jedná se o tzv. jednostupňovou techniku přípravy inseminačních dávek. Při tomto procesu se dávky postupně ochlazují na teplotu 5 °C po dobu 1,5 – 2 hodiny (Evans & Maxwell 1987). Ke spermiím se dostávají komponenty kryoprotektivního ředidla, které chrání spermie před kryogenním poškozením. V průběhu ekvilibrace glycerol osmoticky proniká do spermatických buněk, odstraňuje vnitrobuněčnou vodu a vytváří ochranu před mrazem (Salamon & Maxwell 2000).

#### 3.5.4.2 Mrazení spermatu

Po ochlazení a ekvilibraci přichází na řadu samotné hluboké zmrazení spermatu. Spermie nejlépe snáší postupné zmrazování podle křivky namísto lineárního poklesu teploty. Této paraboly je možné dosáhnout, pokud se sperma umístí 4-6 cm nad hladinu tekutého dusíku po dobu 5 minut, poté je možné pejety vložit přímo do tekutého dusíku. Pro pejety o velikosti 0,25 ml je optimální výška 4 cm nad hladinou tekutého dusíku (Maxwell et al. 1995).

#### 3.5.4.3 Rozmrazení spermatu

Stejně jako při zamrazování, tak i při rozmrazování prochází spermie kritickou teplotní zónou -15 °C až -60 °C. Při průchodu touto teplotou je důležitý čas, který v něm spermie stráví. Je potřeba dát buňkám dostatečný čas na jejich dehydrataci či opětovnou hydrataci, ale pokud doba v kritických teplotách bude příliš dlouhá, dochází k tvorbě zmiňovaných ledových krystalků (Mazur, 1984). Semeno uchovávané v pejetách se zpravidla rozmazuje vložením do vodní lázně přehřáté na teplotu 38-42 °C po dobu ~ 30 sekund (Salamon & Maxwell 1995).

### 3.6 Synchronizace říje

Pro synchronizaci či vyvolání říje se samicím koz do pochvy zavádí intravaginální synchronizační tampóny, které jsou napuštěné syntetickým hormonem podobným progesteronu – kronolónem (flugeston acetát). Tampóny jsou zavedeny po dobu 14 dnů, kde se hormon přes stěnu pochvy uvolňuje do krevního oběhu. V reprodukčním období hormon dočasně zabraňuje příchodu samice do říje tím, že kronolón prodlouží luteální fázi a po vyjmutí dochází k ovulaci v další folikulární vlně. Naopak mimo reprodukční období kronolón vyvolá říji u ještě necyklující samice. Běžně je progesteron produkovan žlutým tělískem po prasknutí folikulu a udržuje březost tím, že k další ovulaci nedochází. Vyjmutí synchronizačního tampónu způsobí snížení hladiny progesteronu v krvi a samice vstupuje do říje. Vyndávání tampónů se obvykle pojí společně s intramuskulárním injekčním podáním hormonu PMSG a následně přibližně za 48 hodin dochází k nástupu říje (Intervet International B.V, 2009; Schoenian, 2019). Sérový gonadotropin březích klisen (PMSG – Pregnant Mare Serum Gonadotrophyn) je nehypofyzární gonadotropní hormon, který má stejnou funkci jako folikuly stimulující hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH), které stimulují růst ovariálních folikulů a následnou ovulaci. Ve vyšších dávkách se PMSG používá jako superovulační přípravek (Somanjaya et al., 2021).

## 4 Metodika

### 4.1 Popis zvířat

Pro účely diplomové práce byly vzorky ejakulátu odebrány od 2letého kozla plemene bílé krátkosrsté kozy. Kozel byl ustájen na pozemcích Pokusné a demonstrační stáje České zemědělské univerzity v Praze (50°07'47.6"N 14°22'07.0"E). Jednalo se o ustájení se dvěma dalšími berany a jedním kozlem ve skupinovém kotci se stálým přístupem k pastevnímu výběhu. Ustájovací prostory, venkovní plochy a technologické vybavení splňovaly platnou legislativu dle zákona č. 208/2004 Sb. Krmnou dávku v průběhu celého roku tvořil z hlavní části pastevní porost s lučním senem vlastní výroby, které bylo zkrmováno ad libitum. Příkrm byl tvořen granulami (1580 OVCE UNI, De Heus a.s., Bučovice, ČR) v množství 300–500 g/ks/den dle kondičního stavu zvířete. K dispozici byla i pitná voda a minerální lizy ad libitum. Průběžně byl monitorován výživný stav zvířete a tělesná kondice se pohybovala v rozmezí 3–4 body. Kozel byl po celou dobu pod veterinárním dohledem a v čase experimentu nevykazoval příznaky žádných onemocnění.

Kozy, které byly využity pro experiment k diplomové práci, se nacházely ve vybraném komerčním chovu v Libereckém kraji. Jednalo se o intenzivní dojný chov koz se všemi aspekty charakteru těchto farem. Průměrná užitkovost dojnic v daných podmínkách byla 652 kg (3,4 % tuku, 3,27 % bílkovin, 4,5 % laktózy) za normovanou laktační periodu. Zapouštění koz probíhalo přirozenou plemenitbou během srpna a září s tím, že kůzlata se rodila od začátku února. Mláďata byla po narození uměle odstavována a napájena mléčnými krmnými směsmi. Od 2. týdne byla dále příkrmována startery. Odstav probíhal po dosažení 16 kg živé hmotnosti. Kozy byly od 5. dne věku dojeny 2 × denně a mléko zpracovávalo faremně ve formě sýrů. Ze základního stáda koz byla vybrána skupina 24 koz. Krmná dávka byla v průběhu celého roku z hlavní části tvořena travním porostem s přidavkem lučního sena a senáže vlastní výroby. Jadrný příkrm byl použit pro motivaci koz ke vstupu do dojíren a kozy byly v průběhu dojení příkrmovány.

### 4.2 Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu kozla bylo proveden přirozenou cestou za využití umělé vagíny pro malé přežvýkavce (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo). Odběry probíhaly v připouštěcí sezóně v měsíci září. K výrobě inseminačních dávek byl využit pouze 1. odebraný ejakulát. Do umělé vagíny byl navlečen latexový prezervativ, který sloužil jako sběrač ejakulátu. Před odběrem byla umělá vagina natemperována teplou vodou na teplotu pohybující se okolo 38–39 °C, nafouknuta na požadovaný tlak a vnitřní horní strana sběrače byla nalubrikována nespermicidní vazelinou. Okamžitě po odběru byl ejakulát z sběrače přenesen automatickou pipetou do 10 ml uzavíratelné zkumavky a zde byl ejakulát naředěn v poměru 1:4 (ejakulát:ředidlo) komerčním ředidlem OptiXcell o teplotě 38 °C, připraveným dle instrukcí výrobce IMV Technologies, (L'Aigle, France). Takto připravené vzorky byly v polystyrenovém termoboxu o vnitřní teplotě 38 °C přeneseny do laboratoře.



**Obr. č. 6:** Příprava na odběr ejakulátu pomocí umělé vagíny (archiv autora)

### 4.3 Příprava inseminačních dávek

V laboratoři probíhala práce a hodnocení spermatu při pokojové teplotě (25 °C). Prvním krokem bylo stanovení objemu a koncentrace ejakulátu pro další možné zpracování spermatu. Zjištění koncentrace bylo provedeno pomocí předkalibrovaného spektrofotometru (Genesys 10S Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Následně byly vzorky doředěny na finální koncentraci  $200 \times 10^6/\text{ml}$  spermatozoí (Alvarez et al., 2012) pomocí stejného ředidla OptiXcell.



**Obr. č. 7:** Spektrofotometr (archiv autora)

### **4.3.1 Příprava chlazených inseminačních dávek**

Naředěné semeno bylo plněno do pejet francouzského typu o objemu 0,25 ml (IMV Technologies, L'Aigle, France) při pokojové teplotě (cca 25 °C). Pejety s inseminační dávkou byly uzavřeny pomocí zatavacího prášku (IMV Technologies, L'Aigle, France). Takto připravené pejety byly vloženy do laboratorní ledničky, kde byly při teplotě 5 °C (průměrná rychlost chlazení 1 °C za minutu) ekvilibrovány a následně po dobu 24 hodin uchovávány, než byly použity k inseminaci.

### **4.3.2 Příprava kryokonzervovaných inseminačních dávek**

Inseminační dávky byly plněny stejným postupem jako chlazené inseminační dávky. Připravené vzorky spermatu v 0,25 ml pejetách byly nejprve schlazeny v laboratorní lednici (z 25 °C na 5 °C; při průměrné rychlosti chlazení 1 °C za minutu). Současně byly ve stejné teplotě 5 °C ekvilibrovány po dobu 2–4 hodin (Lv et al., 2019). Mrazení inseminačních dávek probíhalo v polystyrenovém mobilním mrazícím boxu (modifikace komerčního mrazícího boxu Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA, USA), kde bylo možné kontrolovat výšku vzorků nad hladinou tekutého dusíku a tím regulovat mrazicí křivku (Ptáček et al., 2019). Pejety byly udržovány v parách tekutého dusíku, první 3 minuty byly 15 cm nad hladinou tekutého dusíku. Následně se výška nad tekutým dusíkem snížila na 9,5 cm po dobu 2 minut. Poté se pejety přiblížily 5 cm nad hladinu tekutého dusíku na 1 minutu, na závěr byly pejety pouze 1,5 cm nad hladinou tekutého dusíku 2 minuty a následně byly pejety vloženy přímo do tekutého dusíku (Savvulidi et al., 2021).

#### **4.3.2.1 Rozmrazení kryokonzervovaných inseminačních dávek**

Rozmrazení kryokonzervovaných inseminačních dávek proběhlo těsně přes samotnou umělou inseminaci či laboratorní analýzou. Pejety byly rozmrazovány ve vodní lázni temperované na 39 °C po dobu 30 sekund.

## **4.4 Zhodnocení kvality inseminačních dávek**

Analýzy vzorků byly provedeny po vyjmutí z lednice a ohřátí na 39 °C u chlazených inseminačních dávek a po rozmrazení u kryokonzervovaných inseminačních dávek. Analýzy obou vzorku se prováděly ráno stejného dne, kdy dávky byly využity k inseminaci.

### **4.4.1 mCASA**

Mobilní počítačově asistovaná analýza spermií – mCASA (model iSperm, Aidmics Biotechnology Co., LTD, Taipei City, Taiwan) vyhodnocovala parametry týkající se motility spermií. Optická čočka zabudovaná v přístroji byla zahřata pomocí speciálního USB ohřívače na teplotu 38 °C. Semeno bylo naředěno ředidlem OptiXcell na koncentraci  $20 \times 10^6$ /ml spermatozoí. Takto naředěné semeno bylo v objemu 7  $\mu$ l kápnuto na speciální analyzační jednorázovou komůrku. Komůrka následně byla vložena do předehřáté čočky a CASA software vyhodnotil motilitu spermií ve vzorku.



#### 4.4.2 Průtoková cytometrie

Vzorky spermatu byly naředěny PBS na koncentraci  $20 \times 10^6$ /ml spermatozoí (25  $\mu$ l spermatu + 225  $\mu$ l PBS). Vzorky byly barveny ve tmě po dobu 10 min při 38 °C s přidavkem fluorescenčních barviv:

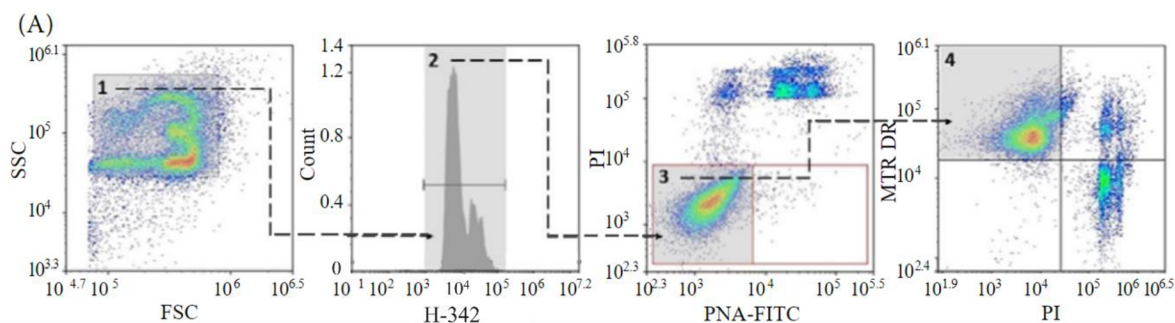
- 2,5  $\mu$ l fluorescenčního barviva Hoechst-33342 (H-342) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 10  $\mu$ g/ml pro identifikaci obsahu DNA;
- 2,5  $\mu$ l propidium jodidu (PI) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 8  $\mu$ g/ml pro posouzení poškození plazmatické membrány;
- 2,5  $\mu$ l PNA lektinu z *Arachis hypogaea* (PNA-FITC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) o finální koncentraci 0.5  $\mu$ g/ml pro posouzení poškození akrozomu;
- 5  $\mu$ l Mito Tracker Deep Red (MTR DR) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) o finální koncentraci 80 nM pro posouzení mitochondriální aktivity.

Po uplynutí doby barvení spermii byly vzorky analyzovány pomocí průtokového cytometru NovoCyte, číslo modelu 3000 (Acea Biosciences, součást společnosti Agilent, Santa Clara, CA, USA). Průtokový cytometr byl vybaven fialovým (405 nm), modrým (488 nm) a červeným (640 nm) laserem a příslušnými optickými filtry pro detekci emitovaných fluorescenčních signálů. Pro automatické nastavení cytometru, sledování výkonu, sběr dat a analýzu získaných dat z průtokové cytometrie byl použit software NovoExpress, v1.3.0 (Acea Biosciences, součást Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Životaschopnost spermii (VIA) byla hodnocena na základě tří parametrů z průtokového cytometru. Životaschopná spermie byla definována jako buňka s neporušenou plazmatickou membránou, neporušeným akrozomem a vysokou mitochondriální aktivitou viz Tab.č.2 a Graf č. 1.

**Tab. č. 2:** Hodnocení životaschopné spermie

Barvivo	Značení
Hoechst-33342	+
PI	-
PNA-FITC	-
MitoTracker Deep Red	+



**Graf č. 1:** Gatovací strategie průtokové cytometrie pro určení životaschopných spermií. 1) Částice obsažené ve vzorku byly nejprve identifikovány pomocí bočního rozptylu SSC a předního rozptylu FSC. 2) Buňky byly identifikovány barvením Hoechst-33342 (H-342) určující obsah DNA. 3) Spermie byly hodnoceny na základě intenzity signálu propidium jodidu (PI) pro neporušenost plazmatické membrány a PNA lektinu (PNA-FITC) pro celistvost akrozomu. 4) Spermie pozitivní i na Mito Tracker Deep Red (MTR DR) byly považovány za životaschopné (Savvulidi et al., 2021)

#### 4.5 Synchronizační program samic

Před umělou inseminací byla samicím veterinárním lékařem provedena synchronizace a stimulace říjového cyklu pomocí poševních tamponů (Chronogest, Intervet International B.V.) s následnou superovulací pomocí intramuskulárního injekčního hormonálního preparátu (Sergon, Bioveta a.s.) podle schématu doporučeného výrobcem:

- den 0 = aplikace poševních tamponů;
- den 14 = vyjmutí poševních tamponů a aplikace stimulačního media v množství 500 m.j. na samici;
- 56 hod. po vyjmutí poševních tamponů a po aplikaci superovulačního přípravku byly kozy 1× inseminovány intracervikální metodou.

#### 4.6 Cervikální inseminace a hodnocené reprodukční ukazatele koz

Kozy byly fixovány v připouštědle s krční zábranou a se zvednutou zádi v úhlu cca 40°. Po dezinfekci zevních pohlavních orgánů bylo jemně zavedeno spekulum, které sloužilo jednak k vizuálnímu zhodnocení optimální fáze říjového cyklu zvířete, a jednak k detekci vstupu do děložního krčku kozy. Následně byla jemně zavedena inseminační pipeta (MiniTube GmbH) do ústí děložního krčku a lehce manipulována tak, aby inseminační dávka byla deponována na okraj 1. až 2. řasy děložního krčku. Nástroje použité pro cervikální inseminaci jsou detailněji vizualizovány na obr. č. 8. Všechny kozy byly inseminovány dvěma pejetami s výslednou koncentrací  $100 \times 10^6$  spermií na inseminaci.

Z celkového počtu připravených koz bylo inseminováno 20 koz, které byly vizuálně posouzeny jako vhodné k inseminaci. Sedm zvířat bylo inseminováno chlazeným semenem a 13 koz bylo inseminováno kryokonzervovaným semenem.

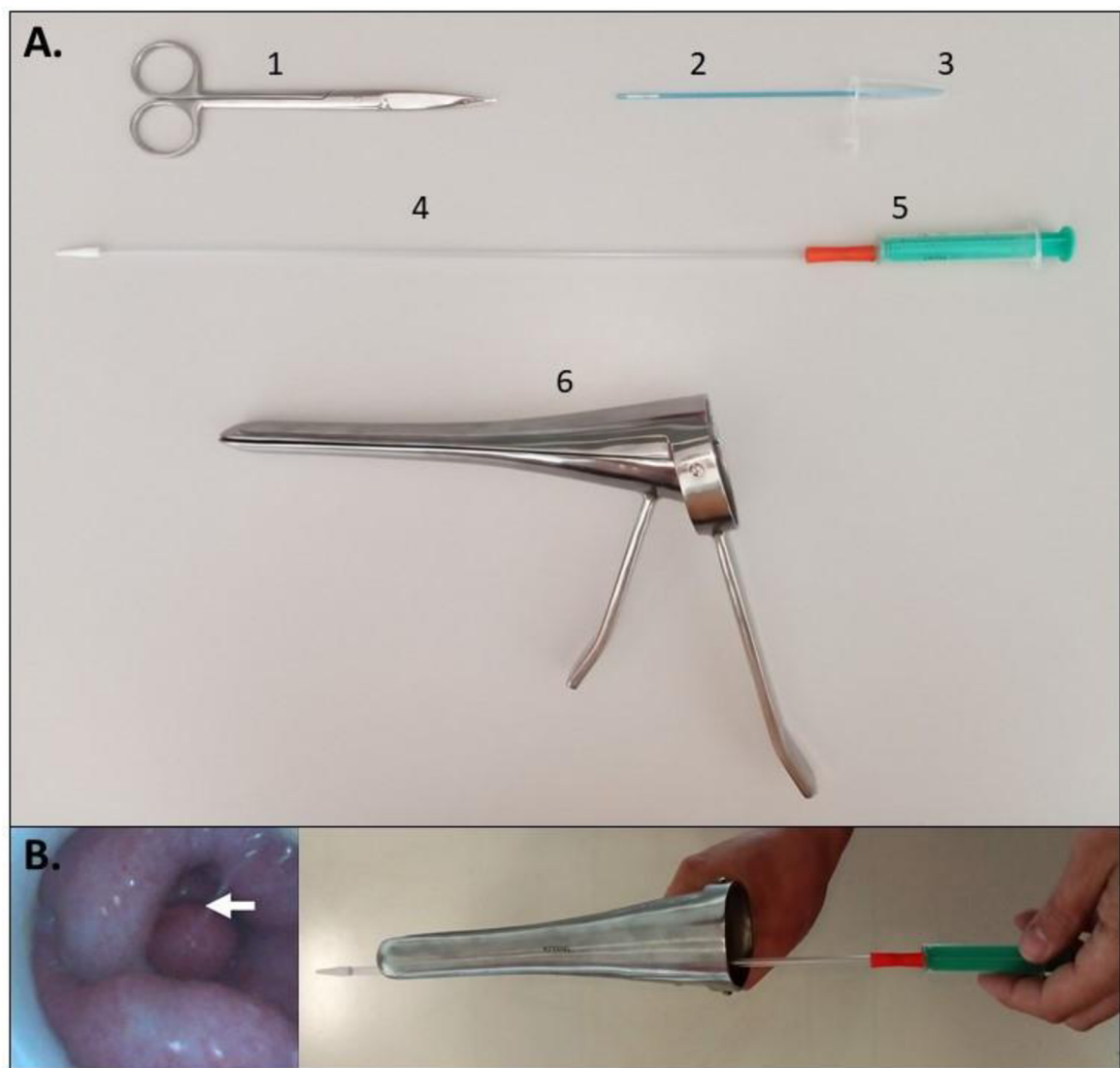
#### 4.6.1 Hodnocení reprodukčních ukazatelů

Po inseminaci byly kozy jeden pohlavní cyklus izolovány a následně zařazeny do přirozené plemenitby. Na základě termínu porodu byla definována úspěšnost inseminace. Sledována byla také četnost vrhu. V návazném statistickém vyhodnocení a při prezentaci výsledků byly tyto ukazatele vyjádřeny jako procento okozlení a plodnosti.

Pro účel této práce byly hodnoceny následné reprodukční ukazatele:

- procento okozlených zvířat (počet okozlených koz/počet inseminovaných koz $\times$ 100);
- procento plodnosti (počet všech narozených kůzlat/počet okozlených koz $\times$ 100).

Úspěšnost okozlení byla hodnocena 1 – narození mláděte/mláďat, 0 – nenarození žádného mláděte. U 7 koz byla následně hodnocena plodnost v rozmezí 1 – jedno narozené mládě, 2 – dvě narozená mláďata.



**Obr. č. 8:** A. Instrumentária používaná pri cervikálnej inseminácii koz; B. Sestavená sada pripravená k cervikálnej inseminácii včetně naznačení miesta deponovania inseminačnej dávky (archív autora)

1. laboratorní nůžky na otevírání pejet; inseminační pejeta o objemu 0,25 ml; 3. zkumavka Eppendorf, do které se zachytí objem pejety a odkud se následně natahuje do inseminační pipety; 4. inseminační pipeta Minitübe se zúženou koncovkou pro zavedení do ústí děložního krčku; 5. injekční aplikátor pro aplikaci inseminační dávky do děložního krčku; 6. spekulum se světelným zdrojem

#### 4.7 Statistická analýza dat

Statistické analýzy byly provedeny pomocí statistického programu SAS 9.4. (SAS/STAT, 2011).

Procedura GLM (zobecněný lineární model) byla použita pro vyhodnocení procenta okozlení a plodnosti v závislosti na použitých inseminačních dávkách (chlazených vs. mrazených). Statisticky průkazné rozdíly byly definovány podle Tukey – Kramerova testu na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Níže je uvedena modelová rovnice pro vyhodnocení závisle proměnných:

$$Y_{ij} = \mu + VAR_i + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  = hodnota závisle proměnné (okozlení a plodnost);  $\mu$  = průměrná hodnota závisle proměnné; VAR = i-tá varianta metody konzervace ID ( $i$  = chlazené ID,  $n = 7$ ;  $i$  = mrazené ID,  $n = 13$ );  $e_{ij}$  = reziduální chyba.

Následná regresně-korelační analýza byla provedena procedurami REG a CORR, kdy na jedné straně byly analyzovány reprodukční ukazatele koz (okozlení a plodnost) ve vztahu k cytometrickým parametrům spermíí a mCASA parametrům spermíí na straně druhé.

## 5 Výsledky

### 5.1 Základní statistika

V tabulce Tab. č. 3 jsou uvedeny údaje, které jsou prezentovány jako základní statistiky bez ohledu na způsob inseminace koz či způsobu uchování inseminačních dávek. U 20 vzorků inseminačních dávek byly hodnoceny kvalitativní parametry spermií.

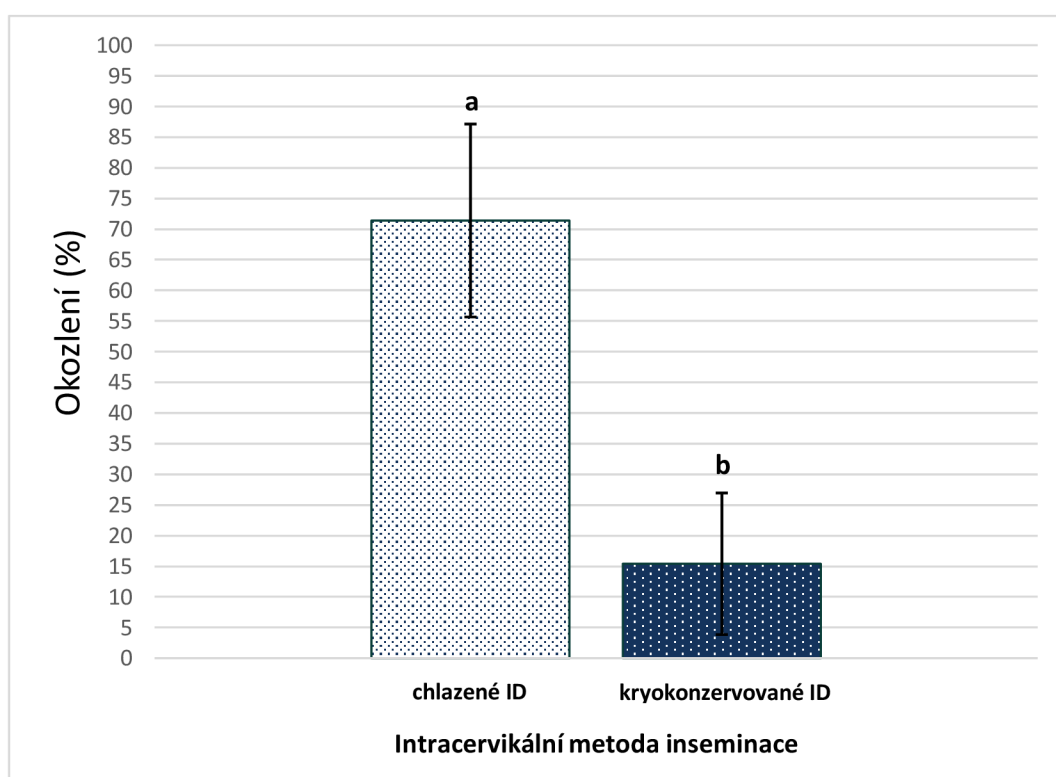
Tab. č. 3: Základní statistické údaje

Proměnná	Četnost	Průměr	$\sigma$	Minimum	Maximum
OKOZ. [ks]	20	0.35	0.49	0	1
PLOD. [ks]	7	1.43	0.53	1	2
VIA [%]	20	49.96	20.47	35.32	77.16
MITCH [%]	20	61.52	20.75	33.95	76.36
MOT [%]	20	43.60	27.40	24.00	80.00
PROG [%]	20	32.99	20.03	18.66	59.60
VCL [ $\mu\text{m/s}$ ]	20	96.93	1.30	96.00	98.66
VAP [ $\mu\text{m/s}$ ]	20	80.03	0.98	79.33	81.33
VSL [ $\mu\text{m/s}$ ]	20	69.68	0.49	69.33	70.33
STR [%]	20	85.96	0.98	84.66	86.66
LIN [%]	20	70.77	0.33	70.33	71.00

Zkratky:  $\sigma$  = směrodatná odchylka; OKOZ. – okozlení; PLOD. – plodnost; VIA – životaschopnost spermií; MITCH – mitochondriální aktivita spermií; MOT – motilita spermií; PROG – progresivní motilita spermií; VCL – křivočará rychlost spermií; VAP – rychlost průměrné dráhy spermií; VSL – přímočará rychlost spermií; STR – přímočarost spermií; LIN – linearita spermií

## 5.2 Vliv kvalitativních parametrů spermií na okozlení koz

V grafu č. 2 je možné pozorovat procento okozlených koz po využití chlazené či kryokonzervované inseminační dávky k jednoduché intracervikální inseminaci. Při použití chlazeného semene došlo k narození kůzlat u  $71,4 \pm 15,7$  % koz, kterým byla provedena jedna inseminace (bez reinseminace). Při použití kryokonzervovaného semene se stejnou metodou inseminace narodilo alespoň jedno kůzle  $15,4 \pm 11,5$  % inseminovaných koz. Z grafu je patrné, že způsob uchovávání inseminačních dávek má značný vliv na jejich fertilizační schopnosti a s tím spojené procento okozlení. Dle očekávání vlivem kryokonzervace se statisticky průkazně ( $p = 0,0102$ ) snižovala oplozovací schopnost spermií, a to přibližně čtyřapůlnásobně oproti chlazenému spermatu.

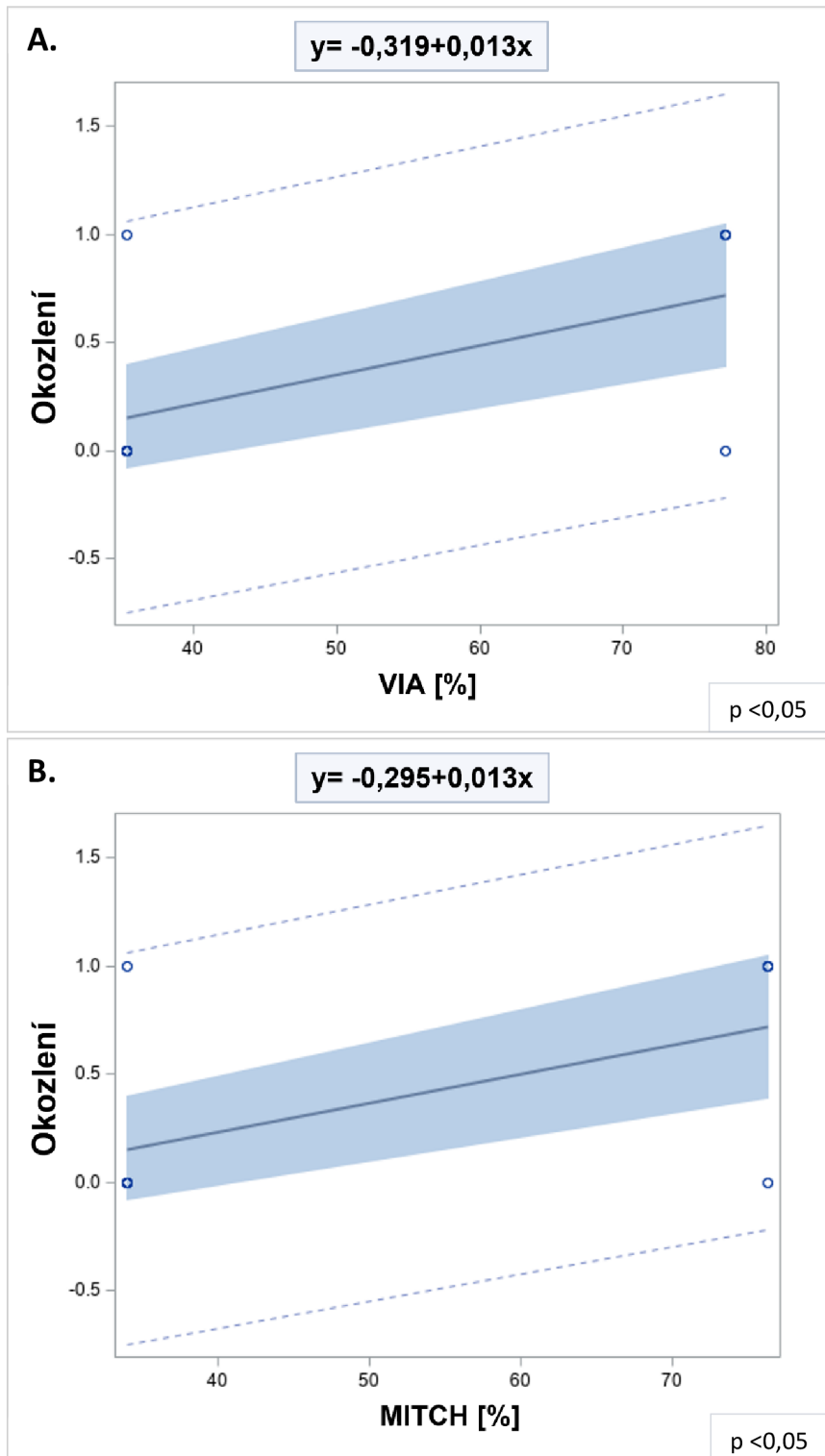


**Graf č. 2:** Procento okozlených koz intracervikální inseminaci chlazenými a kryokonzervovanými inseminačními dávkami (ID). Rozdílná písmena a, b značí statisticky průkazné rozdíly na hladině významnosti  $p < 0,05$

### 5.2.1 Hodnocení kvality spermií průtokovou cytometrií

Graf č. 3 zobrazuje vliv kvalitativních hodnot spermií z průtokového cytometru na okozlení koz. Regresní rovnice grafu č. 3–A. byla vypočtena z dat průtokového cytometru o životaschopnosti spermií. Z těchto dat, která měla minimální a maximální hodnoty v rozmezí 35,3 – 77,2 %, je možné se statistickou průkazností  $p < 0,05$  konstatovat, že se zvyšující se koncentrací životaschopných spermií ve spermatu o 1 % došlo ke zvýšení procenta okozlených koz po inseminaci o 1,3 %. Graf č. 3-B. znázorňuje vliv koncentrace spermií s mitochondriální aktivitou obsažený v inseminačních dávkách na okozlení. Se zvyšující se koncentrací mitochondriálně aktivních spermií ve vzorku o 1 % narostlo procento okozlených koz o 1,3 %. Také tento vztah byl dokumentován statistickou průkazností  $p < 0,05$ . Regresní rovnice grafu č. 3–B. byla odhadnuta z dat průtokové cytometrie o koncentraci spermií s mitochondriální aktivitou. Rozmezí této rovnice byly minimální a maximální hodnoty 33,9 – 76,4 % mitochondriálně aktivních spermií ve vzorcích. Středně silná korelace ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,05$ ) byla detekována mezi cytometrickými parametry a procentem okozlení.





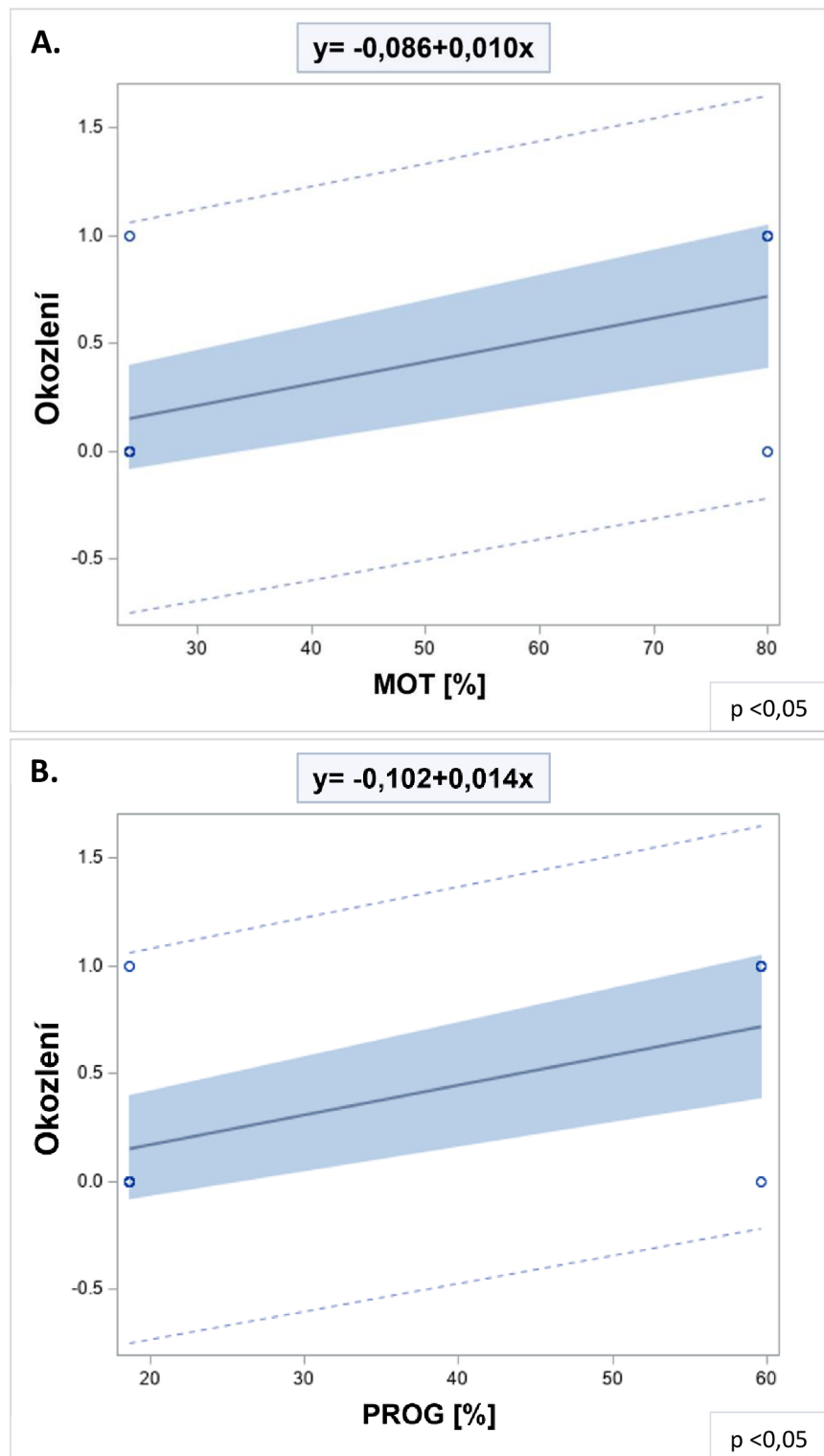
**Graf č. 3:** Lineárně-regresní vztah hodnoty okozlení v závislosti na vybraných cytometrických parametrech

A. Vliv životaschopnosti (VIA) spermií na okozlení

B. Vliv mitochondriální aktivity (MITCH) spermií na okozlení

### 5.2.2 Hodnocení z počítačově asistované analýzy spermií

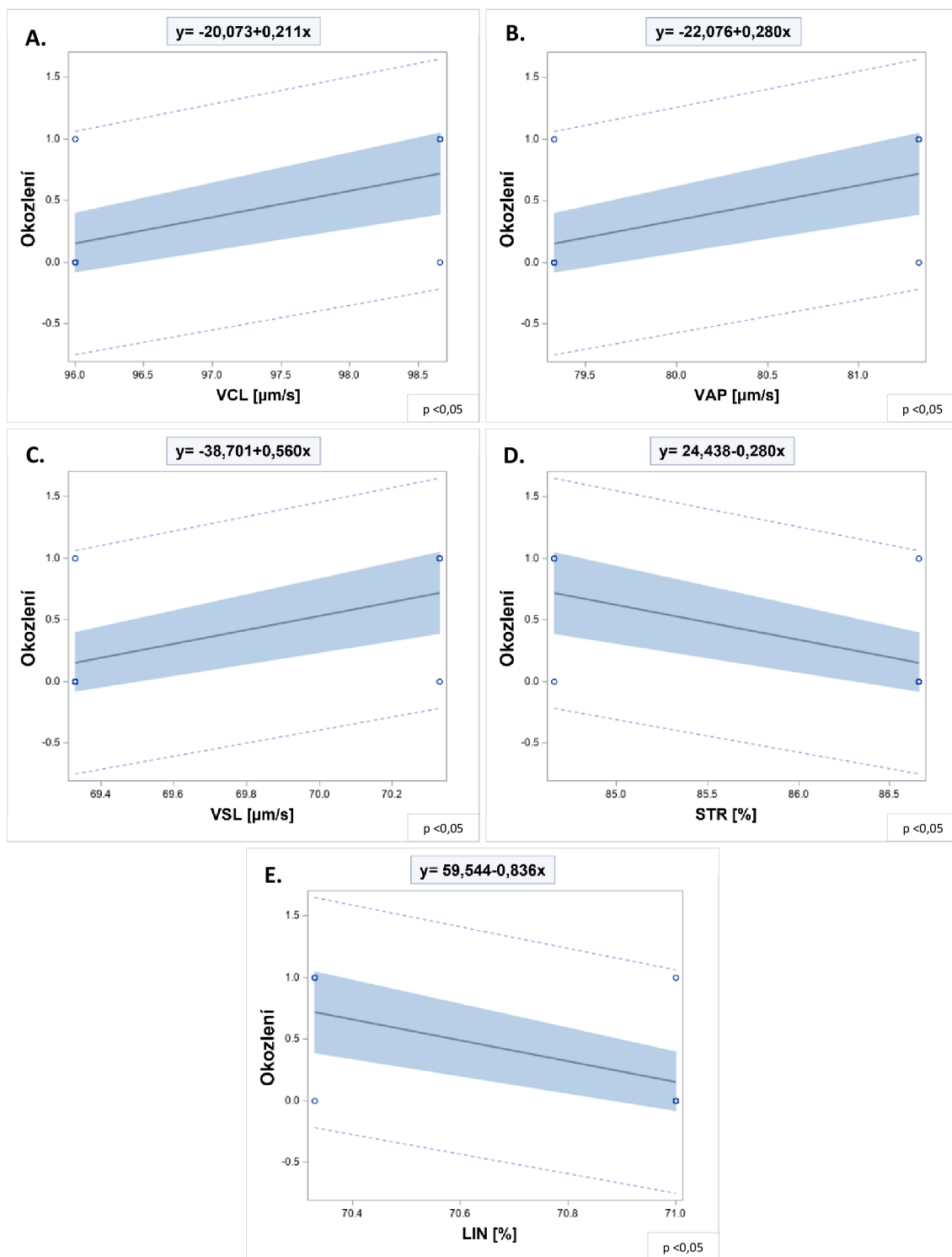
V grafu č. 4 je možné pozorovat vliv motility spermií zjištěnou počítačově asistovanou analýzou spermií (CASA) na okozlení koz se statistickou průkazností  $p < 0,05$ . V grafu č. 4-A. byla na základě získaných hodnot odhadnuta rovnice, která v daném rozmezí minimální – 24 % a maximální – 80 % hodnot motility spermií dokumentovala, že se zvyšující se motilitou spermií o 1 % narostl počet okozlených koz také o 1 %. V grafu č. 4-B. můžeme identifikovat, že s nárůstem progresivní motility spermií o jedno procento se přímo úměrně navýšilo okozlení o 1,4 %. Tato lineárně-regresní rovnice byla odhadnuta na základě údajů progresivní motility ve spermatu pohybujícími se v rozmezí 18,7 – 59,6 %. Mezi pohybovými parametry z počítačově asistované analýzy spermií byla zjištěna pozitivní a středně silná korelace ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,05$ ).



**Graf č. 4:** Lineárně-regresní vztah hodnoty okozlení v závislosti na parametrech pohyblivosti zhodnocené pomocí CASA

- A. Vliv motility spermií (MOT) na okozlení
- B. Vliv progresivní motility kvality spermií (PROG) na okozlení

Graf č. 5 zobrazuje vliv kinematických parametrů spermií na okozlení koz se statistickou průkazností  $p < 0,05$ . Jednotlivé kinematické parametry spermií byly hodnoceny pomocí počítačově asistované analýzy spermií. V grafu č. 5–A. je rovnice pro vliv křivočaré rychlosti spermií (VCL). Rovnice značí, že se zvyšující se křivočarou rychlostí spermií o  $1 \mu\text{m/s}$  se zvýšilo okozlení o 21,1 %. Nicméně rovnice byla odhadnuta z dat, která měla minimální a maximální hodnoty  $96 - 98,7 \mu\text{m/s}$ . Další graf č. 5–B. vliv rychlosti průměrné dráhy spermií (VAP) na okozlení byl vytvořen vstupními daty v rozmezí  $79,3 - 81,3 \mu\text{m/s}$ . Z těchto dat byla odhadnuta rovnice, která zaznamenává, že se vzrůstající rychlostí průměrné dráhy spermií v inseminační dávce o  $1 \mu\text{m/s}$  bylo pozorováno vzrůstající procento okozlení o 28 %. Rovnice grafu č. 5–C. znázorňuje, že při nárůstu přímočaré rychlosti spermií (VSL) o  $1 \mu\text{m/s}$  došlo k 56% vyšší míře okozlení z minimálních a maximálních hodnot  $69,3 - 70,3 \%$ . Pro graf č. 5–D. byly naměřeny minimální a maximální hodnoty v rozmezí  $84,7 - 86,7 \%$  přímočarosti spermií (STR). Pro výše uvedené rozmezí bylo zjištěno, že se zvyšující se přímočarostí spermií o 1 % se zvyšovala pravděpodobnost okozlení o 28 %. Na základě odhadnuté rovnice pro graf č. 5–E. souvisel nárůst linearity spermií (LIN) o 1 % s nárůstem okozlení koz o 83,6 %. Jedná se o rovnici, která je ohraničená minimálními a maximálními hodnotami v rozmezí  $70,3 - 71 \%$ . I mezi parametry z počítačově asistované analýzy spermií (VCL, VAP, VSL, STR, LIN) byla zjištěna středně silná korelace ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,05$ ).

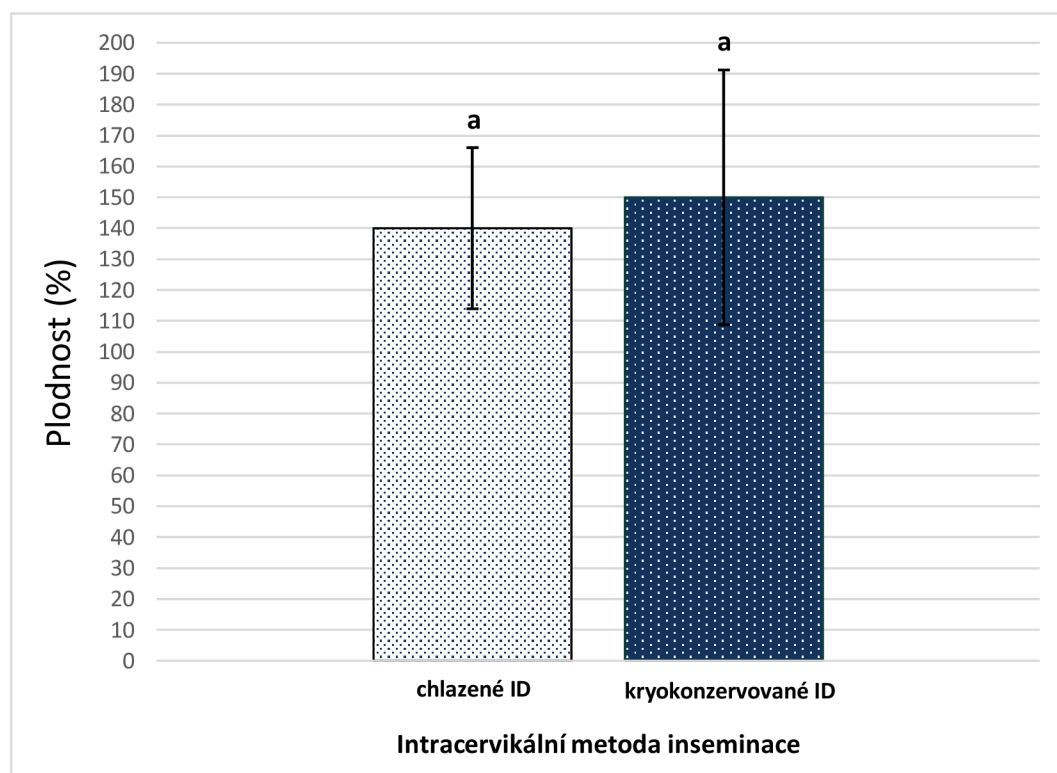


**Graf č. 5:** Lineárně-regresní vztah hodnoty okozlení v závislosti na vybraných CASA parametrech

- A. Vliv křivočaré rychlosti spermíí (VCL) na okozlení
- B. Vliv rychlosti průměrné dráhy spermíí (VAP) na okozlení
- C. Vliv přímočaré rychlosti spermíí (VSL) na okozlení
- D. Vliv přímočarosti spermíí (STR) na okozlení
- E. Vliv linearity spermíí (LIN) na okozlení

### 5.3 Vliv kvalitativních parametrů spermií na plodnost koz

Graf č. 6 je možné pozorovat průměrnou plodnost koz v procentech dle použitého způsobu uchovávání inseminačních dávek, kdy 100 % znázorňuje jedno narozené mládě po okozlení a 200 % jsou dvě narozená mláďata ve vrhu. Při inseminaci koz chlazenými inseminačními dávkami byla plodnost v průměru  $140 \pm 26$  %. Při inseminaci kryokonzervovanými inseminačními dávkami činilo procento plodnosti  $150 \pm 41,2$  %. Nicméně z hlediska statisticky významných rozdílů byly difference mezi průměrnými hodnotami neprůkazné ( $p = 0,8457$ ). Způsob uchovávání inseminačních dávek nemá vliv na počet mláďat ve vrhu koz.



**Graf č. 6:** Procento okozlených koz intracervikální inseminací chlazenými a kryokonzervovanými inseminačními dávkami (ID). Písmena a značí statisticky neprůkazné rozdíly na hladině významnosti  $p < 0,05$

Dle tabulky č. 4 nebyl žádný statistický model pro odhad plodnosti na základě kvalitativních parametrů spermií na hladině významnosti  $p < 0,05$  statisticky průkazný ( $p = 0,8457$ ). Mezi kvalitativními parametry spermií byla vypočtena nízká korelace, která nebyla statisticky průkazná na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Hodnoty kvality spermatu v inseminačních dávkách nešlo dávat do souvislosti s tímto reprodukčním ukazatelem a ani je využít k predikci plodnosti u sledovaného souboru koz.

**Tab. č. 4:** Statistické modely pro odhad plodnosti. n.s. = nesignifikantní, statisticky neprůkazné na hladině významnosti  $p < 0,05$

Statistické modely pro odhad plodnosti (PLOD.) na základě kvalitativních parametrů spermií		
	p-hodnota	korelace
$PLOD. = 1,584^{n.s.} - VIA \times 0,002^{n.s.}$	n.s.	-0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = 1,320^{n.s.} + MITCH \times 0,002^{n.s.}$	n.s.	0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = 1,543^* - MOT \times 0,002^{n.s.}$	n.s.	-0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = 1,546^{n.s.} - PROG \times 0,002^{n.s.}$	n.s.	-0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = 5,109^{n.s.} - VCL \times 0,038^{n.s.}$	n.s.	-0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = 5,467^{n.s.} - VAP \times 0,050^{n.s.}$	n.s.	-0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = 8,433^{n.s.} - VSL \times 0,100^{n.s.}$	n.s.	-0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = -2,833^{n.s.} + STR \times 0,050^{n.s.}$	n.s.	0,091 <sup>n.s.</sup>
$PLOD. = -9,097^{n.s.} + LIN \times 0,149^{n.s.}$	n.s.	0,091 <sup>n.s.</sup>
n.s. – $p > 0,05$ ; * - $p < 0,05$ ; ** - $p < 0,01$ ; *** - $p < 0,001$		

Zkratky: PLOD. – plodnost; VIA – životaschopnost spermií; MITCH – mitochondriální aktivita spermií; MOT – motilita spermií; PROG – progresivní motilita spermií; VCL – křivočará rychlost spermií; VAP – rychlost průměrné dráhy spermií; VSL – přímočará rychlost spermií; STR – přímočarost spermií; LIN – linearita spermií

## 6 Diskuze

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda způsob konzervace inseminačních dávek ovlivní poškození spermatických buněk v průběhu konzervace, což se projeví na reprodukčních ukazatelích po následné inseminaci. Výsledky mé práce tuto hypotézu potvrzují u parametru procenta okozlených koz. Mrazené inseminační dávky vykazovaly nižší míru okozlení než chlazené inseminační dávky.

Při využití jednoduché intracervikální inseminace bez reinseminace bylo kryokonzervovaným spermatem dosaženo 15,4 % okozlení. Tyto výsledky korespondují s Ritarem a Salamonem (1983), kteří stejnou inseminační metodou dosáhli 14,3 % okozlení po použití mrazených inseminačních dávek. Naproti tomu Salvador et al. (2005) při shodné hloubce inseminace do děložního krčku koz mrazenými spermatem byli schopni docílit procenta okozlení kolem 52 %. Významný rozdíl ve fertilizační schopnosti spermií po rozmrazení mohl být způsoben jiným postupem mrazení inseminačních dávek, který mohl být ke spermiím šetrnější. Rozdíl mohl být také způsoben odlišnou dobou inseminace či rozdílným plemenem koz Murciano Granadina.

Při využití chlazených inseminačních dávek bylo dosaženo 71,4 % okozlení. Roca et al. (1997) hodnotili úspěšnost zabřeznutí koz po intracervikální inseminaci chlazeným spermatem. Jejich výsledky se shodují s našimi, míra zabřeznutí byla 73,1 %. Nižší procento okozlení s použitím chlazeného semene pozorovali další autoři (Pamungkas 2009; Mohammed et al. 2012; Ade Salim et al. 2020; Alvarado-Espino et al. 2022; Mocé et al. 2022), jejichž procento okozlení dosahovalo hodnoty v rozmezí 41,1–66,7 %. Rozdíly mohou být způsobené různou délkou uchování spermatu (Pamungkas, 2009) nebo použitím jiného ředidla (ředidla – Tris, mléko) (Mohammed et al. 2012). Tyto změny mohou značně ovlivnit výsledné procento okozlených samic. Je zřejmé, že v našem pozorování chlazené inseminační dávky dosahovaly vyššího procenta okozlení než kryokonzervované inseminační dávky z důvodu poškození spermií procesem kryokonzervace (Kogan et al., 2018) a bylo vyšší, než pozorovaly ostatní studie.

Způsob konzervace inseminačních dávek naopak neměl signifikantní vliv na procento plodnosti koz (počet narozených kůzlat/počet okozlených koz). Spermie nemají značný vliv na počet narozených mláďat ve vrhu. Tento reprodukční ukazatel je ovlivněn převážně samicí, jelikož plodnost je ovlivněna počtem ovulovaných vajíček (Nalbandov 1990). Spermie tedy nemohou zvýšit počet mláďat, mohou pouze mít vliv na oplodnění již ovulovaných vajíček. Dalo by se pouze předpokládat, že kryokonzervace sníží kvalitu spermií a s tím spojenou jejich fertilizační schopnost. Tímto způsobem by kryokonzervované inseminační dávky mohly vykazovat nižšího procenta plodnosti než chlazené inseminační dávky. V případě našich výsledků tomu tak nebylo, a naopak kryokonzervované ID dosahovaly o 10 % vyšší plodnost (150 %) než chlazené ID (140 %). Předpokládám, že tyto výsledky mohou být ovlivněny především nízkým počtem pozorování ( $n = 7$ ).

Součástí práce bylo i navržení a ověření zvoleného způsobu inseminace u dojných koz. Cílem bylo navrhnout způsob inseminace, který by byl snadno proveditelný za předpokladu vysokého procenta zabřeznutých koz. Jednalo se o jednoduchou intracervikální metodu inseminace koz bez reinseminace, při které se inseminační pipeta jemně zavedla do ústí děložního krčku, aby sperma bylo deponováno na okraj 1. až 2. řasy děložního krčku. Tato



metoda inseminace koz byla spolehlivá. Jak již bylo zmíněno výše, dosahovala 71,4 % okozlení při použití chlazených inseminačních dávek a tento výsledek je vyšší než výsledky většiny dalších autorů, kteří použili obdobnou metodiku. Další autoři Paulenz et al. (2005) nebo Ritar a Salamon (1983) se nezabývali intracervikální inseminací koz chlazeným spermatem, ale zejména čerstvými inseminačními dávkami. V tomto případě se procenta okozlení pohybovala v rozmezí 42–78 %. Ve studiích zabývajících se jinými metodami inseminace koz (s použitím čerstvých či chlazených inseminačních dávek) se procenta okozlení pohybovala v hodnotách 50–74 % při vaginální inseminaci (Paulenz et al. 2005; Bello et al. 2022), 46–67 % u transcervikální inseminace (Ritar & Salamon 1983; Foxworth et al. 2019) a <80 %, pokud byla použita laparoskopická inseminace (Bhoi et al. 2020). Naše procento okozlení dosahovalo horní hranice výsledků těchto studií, z čehož vyplývá, že námi použitá intracervikální inseminace s chlazenými inseminačními dávkami je relevantní metodou v reprodukčních biotechnologiích malých přežvýkavců. Námi provedená metoda by mohla nahradit složitější i pro samice náročnější metody inseminace, jako je například laparoskopická inseminace (Sohnrey & Holtz 2005).

Dalším cílem práce bylo ověřit, zda samotnou inseminaci s použitím dvou různých typů konzervace inseminačních dávek (chlazené nebo zmrazené) lze použít pro ověření výsledků kvalitativních testů spermií *in vitro* (jako je počítačově asistovaná analýza spermií a průtoková cytometrie). I tato hypotéza byla potvrzena ( $p = 0,0102$ ) u reprodukčního ukazatele okozlení, po inseminaci bylo možné vyhodnotit, že kvalitativní parametry spermií ovlivňují procento okozlených koz na hladině významnosti  $p < 0,05$ . U druhého reprodukčního ukazatele nebyl prokázán statisticky významný vliv parametru spermií na plodnost koz ( $p = 0,8457$ ).

Korelace mezi jednotlivými kvalitativními parametry spermií a procentem koz, které porodí mládě, je zpravidla nízká, jelikož se jedná o multifaktoriální záležitost (Mocé et al., 2022). Námi zjištěné Pearsonovy korelační koeficienty mezi kvalitativními parametry spermií a procentem okozlení dosahovaly hodnot  $r = 0,56$  ( $p < 0,05$ ), což znamená, že mezi kvalitou spermií a okozlením je středně silná korelace. Tyto výsledky ukazují na vyšší lineární závislost mezi těmito dvěma hodnotami, než tomu bylo u Mocého et al. (2022), kteří pozorovali velmi nízké hodnoty korelačního koeficientu parametrů spermií v chlazeném spermatu na okozlení koz plemene Murciano Granadina, jejich výsledky v absolutní hodnotě dosahovaly maximálních hodnot 0,34. V jejich studii linearita spermií (LIN) korelovala s okozlením slabě ( $r = 0,29$ ) a stejně na tom byla progresivní motilita spermií (PROG) ( $r = 0,28$ ), ostatní parametry spermií vykazovaly ještě nižší hodnoty korelačního koeficientu. Korelace obou zmiňovaných parametrů byla statisticky významná ( $p = 0,02$ ). Jejich výsledky korespondují i s dalšími studiemi u jiných druhů. U králíků byla nízká korelace pozorována mezi počtem samic, které po inseminaci porodily a celkovou motilitou ( $r = 0,31$ ) či linearitou spermií ( $r = -0,32$ ) (Lavara et al. 2005). U skotu byla obdobná korelace mezi linearitou spermií a zabřeznutím krav ( $r = 0,31$ ), avšak oproti ostatním studiím tato korelace nebyla statisticky významná. Naopak signifikantní vliv kvality spermatu se spíše shodoval s našimi hodnotami. Statisticky významná korelace byla pozorována mezi zabřeznutím krav po inseminaci a procentem životaschopných spermií ( $r = 0,68$ ;  $p < 0,01$ ) nebo motilitou spermií ( $r = 0,43$ ;  $p < 0,05$ ) (Januskauskas et al. 2003). Z těchto dat je patrné, že nejvýznamnější vliv mezi oplozovací schopností a kvalitativními hodnotami spermií mají zejména parametry, jako jsou motilita (MOT), progresivní motilita (PROG), linearita (LIN) či životaschopnost spermií

(VIA). I přesto korelace ani u jednoho parametru nebyla silná a jednalo se pouze o nízké korelace z již zmiňovaného důvodu, že procento okozlení je ovlivněno mnoha vnitřními faktory samice (věk, pořadí porodu) a i vnějšími, z něhož nejvýznamnějším je sezónnost (Mocé et al. 2022). Sezónnost bude pravděpodobně hlavním důvodem našich vyšších výsledků korelace mezi okozlením a parametry spermií oproti Mocé et al. (2022). Námi provedené inseminace byly ve stejném reprodukčním období (září) a nemohl se tedy na výsledky projevit vliv sezónnosti, který by vliv hodnot spermií na okozlení snižoval. Rozdílné korelace mohou být také způsobeny jinými hodnotami vstupních dat a počtem pozorování.

Pro optimalizaci metodiky *in vitro* kvalitativního stanovení spermií byla snaha získat model, který by pomohl predikovat vybrané reprodukční ukazatele na základě kvalitativních parametrů spermií. Statistické modely pro odhad plodnosti nebyly statisticky průkazné ( $p = 0,8457$ ). Statistické modely pro odhad procenta okozlení byly statisticky průkazné na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Na základě statistických modelů pro okozlení lze predikovat úspěšnost inseminace pomocí zjištěných kvalitativních parametrů spermií v použité inseminační dávce. Statistické modely mohou také například pomoc určit spodní hranici pro výrobu inseminačních dávek kozlů na základě kvalitativních parametrů spermií pro dosažení požadovaného procenta okozlení samic. Avšak vzhledem ke koeficientu determinace ( $r^2 = 0,3141$ ) budou tyto modely pouze orientační, jelikož okozlení bude z 68,6 % ovlivněno dalšími faktory (vliv samice aj.), jak již bylo zmíněno výše. Vzhledem ke zmíněným důvodům je tento model určen zejména pro vědecké studie, v praxi je třeba dbát na ovlivnitelné vnější faktory (např. zdravotní stav a kondice samice, vhodná doba inseminace) a pro zvýšení procenta okozlení brát zřetel především na tyto vlivy za předpokladu, že byly použity kvalitní inseminační dávky s vysokými hodnotami kvalitativních parametrů spermií. Mocé et al. (2022) tvrdí, že statistické modely pro odhad okozlení nejsou natolik přesné, aby bylo možné spolehlivě předpovídat procento okozlení. I přesto navrhli jeden model, který dle jejich dat vysvětloval predikci procenta okozlení nejlépe. Model zahrnoval celkovou motilitu spermií (MOT) nebo rychlost průměrné dráhy spermií (VAP), věk koz a efekt sezónnosti. Santolaria et al. (2015) provedli obdobnou studii u ovcí. Signifikantní výsledky ( $p < 0,05$ ) této studie ukázaly, že obahnění se zvyšovalo s rostoucí křivočarou rychlostí spermií (VCL) nebo se zvyšujícím se procentem spermií s neporušenou plazmatickou membránou. Tyto modely mohou částečně predikovat procento obahnění ovcí na základě těchto dvou parametrů spermií.

Závěrem je podstatné zmínit, že námi zjištěná data mají charakter prvotních výsledků o vlivu způsobu uchovávání inseminačních dávek kozlů na reprodukční ukazatele u koz a jednoduché intracervikální inseminaci. Je důležité pokračovat ve výzkumu umělé inseminace malých přežvýkavců, jelikož cílem je rozšířit techniku inseminace, která bude dostatečně jednoduchá, finančně nenákladná, časově nenáročná, bude šetrnější ke zvířatům a chovatelé ji budou schopni sami vykonávat. Je třeba usilovat i o získávání dalších dat, které by napomohly k tvorbě přenějších prediktivních modelů pro reprodukční ukazatele koz, aby se usnadňovala asistovaná reprodukce malých přežvýkavců.

## 7 Závěr

- Byla potvrzena hypotéza, že způsob konzervace inseminační dávky (chlazené nebo mrazené) ovlivnil poškození spermatických buněk v průběhu konzervace, což se projevilo na reprodukčních ukazatelích po následné inseminaci.
- Mrazené inseminační dávky vykazovaly více než 4,5násobně nižší míru okozlení než chlazené inseminační dávky.
- Způsob konzervace inseminačních dávek neměl vliv na následnou plodnost inseminovaných koz.
- Jednoduchým způsobem intracervikální inseminace s využitím chlazených inseminačních dávek bylo možné dosahovat vyhovujících výsledků okozlení samic 71,4 % i bez následné reinseminace.
- Byla zpracována data o vlivu kvalitativních parametrů spermií zjištěná počítačově asistovanou analýzou spermií a průtokovou cytometrií na vybrané reprodukční ukazatele.
- Z dat o kvalitativních parametrech spermií byly vytvořeny predikční rovnice pro odhad procenta okozlení a plodnosti koz po inseminaci.
- Kvalitativní parametry spermií měly vliv na změny v okozlení. Naproti tomu kvalitativní parametry spermií neměly vliv na změny v plodnosti koz.
- Zjištěná data měla charakter prvotních výsledků, která jsou návrhem pro další studie. V budoucnu by bylo vhodné rozšířit počet zvířat inseminovaných dávkami různé kvality ke zpřesnění prediktivních modelů okozlení a plodnosti malých přežvýkavců.

## 8 Literatura

- Abdollahi, F., Farhang Dehghan, S., Amanpour, S., Haghparast, A., Sabour, S., Zendehtdel, R. 2021. Effect of Co-exposure to Heat and Psychological Stressors on Sperm DNA and Semen Parameters. *Toxicology Reports*. 8 . 1948–1954. doi: 10.1016/j.toxrep.2021.11.015.
- Ade Salim, M., Nur Ihsan, M., Isnaini, N., Susilawati, T. 2020. Kidding rate of artificial insemination with Boer goat liquid semen during chilled preservation using coconut water-based diluent. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 30 (3). 184–189. doi: 10.21776/ub.jiip.2020.030.03.02.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H., Iqbal, Z. 2014. Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal Reproduction Science*. 146 (1–2). 55–62. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.01.009.
- Alvarado-Espino, A. S., Alvarado-Espino, A. V., Arellano-Rodríguez, F., Flores-Salas, J., Moreno-Avalos, S., Delgado-González, R., Véliz-Deras, F. G. 2022. The Time of Artificial Insemination with Cooled Semen does not Affect the Pregnancy Rate in Anestrous Goats. *Indian Journal of Animal Research*. (Of). doi: 10.18805/IJAR.BF-1534.
- Alvarez, M., Tamayo-Canul, J., Anel, E., Boixo, J. C., Mata-Campuzano, M., Martinez-Pastor, F., Anel, L., de Paz, P. 2012. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*. 77 (6). 1111–1118. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.10.013.
- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E., de Paz, P. 2006. Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals*. 41 (s2). 30–42. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00767.x.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Fuente, L. F. de la, Paz, P. de 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*. 63 (4). 1235–1247. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.07.001.
- Arrebola, F., González, O., Torres, R., Abecia, J.-A. 2014. Artificial insemination in Payoya goats: factors affecting fertility. *Animal Production Science*. 54 (3). 356. doi: 10.1071/AN13138.
- Bello, A. A., Voh, A. A., Ogwu, D., Ayo, J. O. 2022. Recto-vaginal artificial insemination using digital rectal palpation technique in Red Sokoto goat. *Small Ruminant Research*. 215 . 106780. doi: 10.1016/j.smallrumres.2022.106780.

- Bhoi, D. B., Raval, J. K., Dangar, N. S. 2020. Technological Advances in Goat Reproduction. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.* 9 . 189–194.
- Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., Waberski, D. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*. 85 (9). 1507–1527. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.002.
- Corteel, J. M., Leboeuf, B., Baril, G. 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Ruminant Research*. 1 (1). 19–35. doi: 10.1016/0921-4488(88)90041-7.
- Cox, J. F., Alfaro, V., Montenegro, V., Rodriguez-Martinez, H. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*. 66 (4). 860–867. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.062.
- Dayan, M., Besoluk, K., Eken, E., Özkadif, S. 2010. Anatomy of the Cervical Canal in the Angora Goat (*Capra hircus*). *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 16 . 847–850.
- Dhafer, N., Aziz, D. 2021. The influence of semen collection frequency on deleterious the interaction between the enzymes of the bulbourethral gland and egg yolk during the dilution of buck semen. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*. 4 (1). 10–18. doi: 10.21608/svu.2021.40564.1078.
- Evans, G., Maxwell, W. M. C. 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. ISBN: 0409491772.
- Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., Cseh, S. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica*. 60 (1). 115–129. doi: 10.1556/avet.2012.010.
- Farin, C. E. 2015. Artificial Insemination and Embryo Transfer in Goats. .
- Flores-Gil, V. N., Millan de la Blanca, M. G., Velázquez, R., Toledano-Díaz, A., Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A. 2020. Influence of testosterone administration at the end of the breeding season on sperm cryoresistance in rams (*Ovis aries*) and bucks (*Capra hircus*). *Domestic Animal Endocrinology*. 72 . 106425. doi: 10.1016/j.domaniend.2019.106425.
- Foxworth, W. B., Horner, S., Ho-Watson, A., Gilmore, I., Gutierrez, K., Lewis, S., Newton, G. 2019. PSX-12 Comparison of transcervical and intracervical artificial insemination techniques for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the goat. *Journal of Animal Science*. 97 (Supplement\_3). 464–464. doi: 10.1093/jas/skz258.914.

- Furstoss, V., Borderes, F., Forgerit, Y., Guillouet, P., Leboeuf, B. 2010. The value of the percentage of motile sperm in predicting a significant portion of the fertility variation of frozen-thawed buck semen. *Theriogenology*. 74 (7). 1197–1206. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.022.
- Gallagher, M. T., Cupples, G., Ooi, E. H., Kirkman-Brown, J. C., Smith, D. J. 2019. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Human Reproduction*. doi: 10.1093/humrep/dez056.
- Garner, D. L., Johnson, L. A., Yue, S. T., Roth, B. L., Haugland, R. P. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of andrology*. 15 (6). 620–9.
- Garrido-Fariña, G. I., Castillo-Hernández, G., Gutiérrez-Hernández, J. L., Pérez, D. I. M., Ramírez, C. M. R., García, A. T., Pérez, J. L. T. 2016. Stress-induced leukocytospermia in rams with healthy reproductive tract. *Small Ruminant Research*. 137 . 34–39. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.02.024.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 63 (2). 445–457. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.024.
- Gimenez-Diaz, C., Aslan, F. 2011. Laparoscopic artificial insemination in dairy sheep with hilled semen stored for up to 26 h. *African Journal of Biotechnology*. 10 . 5812–5814.
- Goyal, H. O., Memon, M. A. 2007. Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the Buck. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. s. 511–514. Elsevier.
- Graham, J. K., Mocé, E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64 (3). 492–504. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.006.
- Hossain, Md. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., Rodriguez-Martinez, H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology*. 13 (3). 406–419. doi: 10.1038/aja.2011.15.
- Chazotte, B. 2011. Labeling Mitochondria with MitoTracker Dyes. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2011 (8). pdb.prot5648. doi: 10.1101/pdb.prot5648.
- Chemineau, P., Xande, A. 1982. Reproductive efficiency of Creole meat goats permanently kept with males. Relationship to a tropical environment. *Tropical animal production*.
- Intervet International B.V 2009. PMSG ® Chronogest ® CR Synchronised oestrus and Early Lambing. .

- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*. 60 (4). 743–758. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00050-5.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*. 70 (1). 219–228. doi: 10.1530/jrf.0.0700219.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., Garde, J. J. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 167 . 103–108. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.013.
- Johnson, I. D., Spence, M. T. Z. 2010. *The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 11. vyd. ISBN: 9780982927915.
- Khalid, M., Haresign, W., Bradley, D. G. 1998. Heart rate responses and plasma cortisol concentrations in ewes: comparison between cervical and laparoscopic intrauterine insemination and their associated handling procedures. *Animal Science*. 66 (2). 383–387. doi: 10.1017/S1357729800009516.
- Kogan, T., Zeron, Y., Laor, R., Mesilati-Stahy, R., Argov-Argaman, N., Roth, Z. 2018. Effect of cryopreservation on semen progressive motility. *Animal Reproduction Science*. 194 . e18. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.041.
- Kulaksiz, R., Daşkin, A. 2012. Reproductive performance of primiparous and multiparous Saanen goats after laparoscopic intrauterine insemination: a field study. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. doi: 10.3906/vet-1010-525.
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., Viudes de Castro, M. P., Vicente, J. S. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*. 64 (5). 1130–1141. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.01.009.
- Leethongdee, S., Ponglowhapan, S. 2014. Artificial insemination in goats: An update. *Thai Journal of Veterinary Medicine*. 44 (1). 73–77.
- Leil, A., A. El-Shamy, A., D.A., E.-B. 2020. Clinical Application Of Intrauterine Laparoscopic Insemination In Zaraiby Goats Using Different Concentrations Of Zaraiby And Boer Bucks' Frozen Semen. *Journal of Applied Veterinary Sciences*. 5 (4). 61–67. doi: 10.21608/javs.2020.118167.
- Lv, C., Wu, G., Hong, Q., Quan, G. 2019. Spermatozoa Cryopreservation: State of Art and Future in Small Ruminants. *Biopreservation and biobanking*. 17 (2). 171–182. doi: 10.1089/BIO.2018.0113.

- Malama, E., Bollwein, H., Taitzoglou, I. A., Theodosiou, T., Boscós, C. M., Kiossis, E. 2013. Chromatin integrity of ram spermatozoa. Relationships to annual fluctuations of scrotal surface temperature and temperature-humidity index. *Theriogenology*. 80 (5). 533–541. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.05.019.
- Malmakov, N., Ptacek, M., Savvulidi, F. G., Stadnik, L. 2022. Optimal time for laparoscopic intrauterine insemination performed on ewes detected in natural heat. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 29 (10). 103416. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103416.
- Martin, G. B., Walkden-Brown, S. W. 1995. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 49 . 437–49.
- Martínez-Madrid, B., Castaño, C., Ureña, L. P., Flix, E., Velázquez, R., López-Sebastián, A., Ungerfeld, R., Arrebola, F. A., Santiago-Moreno, J. 2021. Seasonal changes in testosterone and thyroxine concentrations in Mediterranean rams and bucks and their relationship with sperm cryoresistance. *Livestock Science*. 249 . 104513. doi: 10.1016/j.livsci.2021.104513.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., De Paz, P. 2010. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 . 67–78. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x.
- Maxwell, W. M. C., Landers, A. J., Evans, G. 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*. 43 (7). 1201–1210. doi: 10.1016/0093-691X(95)00092-M.
- Maxwell, W. M. C., Salamon, S. 1993. Liquid Storage of Ram Semen: a Review *Reprod. Fertil. Dev.* Roč. 5.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 247 (3). C125–C142. doi: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
- McKinnon, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*. 120 (1). doi: 10.1002/cpim.40.
- Memon, M. A., Bretzlaff, K. N., Ott, R. S. 1986. Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*. 26 (6). 823–827. doi: 10.1016/0093-691X(86)90011-7.
- Mocé, E., Mocé, M. L., Lozano-Palazón, S. A., Bernácer, J., Martínez-Granell, M. M., Esteve, I. C., Bernat, F., Contreras, S. J., Villalba, I., Gómez, E. A. 2022. Fertility prediction in dairy goats from Murciano-Granadina breed: The role of sperm evaluation and female traits. *animal*. 16 (5). 100525. doi: 10.1016/j.animal.2022.100525.
- Mohamed, R. H., Mohamed, R. S., Abd El-Hamid, I. S., Madkour, F. A., Sallam, A. M., Ali, F., Hussein, H. A. 2023. Semen quality, testicular characteristic, biochemical profile and



- histopathology of testes of goats under heat stress conditions. *Assiut Veterinary Medical Journal*. 69 (176). 76–87. doi: 10.21608/avmj.2022.173957.1100.
- Mohammed, KM., Khalil, M. H., Al-saeef, A. M. 2012. EFFECT OF GOAT BREEDS, SEMEN DILUENTS AND FREEZING METHODS ON SPERM FREEZABILITY AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE. *Assiut Veterinary Medical Journal*. 58 (133). 1–12. doi: 10.21608/avmj.2012.173745.
- Mojapelo, M. M., van Ryssen, J. B. J., Lehloenya, K. C. 2021. Selenium supplementation reduces induced stress, enhances semen quality and reproductive hormones in Saanen bucks. *Small Ruminant Research*. 201 . 106443. doi: 10.1016/j.smallrumres.2021.106443.
- Mortimer, D., Curtis, E. F., Miller, R. G. 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *Reproduction*. 81 (1). 127–135. doi: 10.1530/jrf.0.0810127.
- Mortimer, S. T., De Jonge, C. J. 2018. CASA—Computer-Aided Sperm Analysis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. s. 59–63. Elsevier.
- Murtaza, A., Khan, M. I.-R., Abbas, M., Hameed, N., Ahmad, W., Mohsin, I., Tahir, M. Z. 2020. Optimal timing of artificial insemination and changes in vaginal mucous characteristics relative to the onset of standing estrus in Beetal goats. *Animal Reproduction Science*. 213 . 106249. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106249.
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., Gadella, B. M. 2003. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles1. *Biology of Reproduction*. 68 (5). 1828–1835. doi: 10.1095/biolreprod.102.011445.
- Nalbandov, A. V., Keman, Sunaryo. 1990. *Fisiologi reproduksi pada mamalia dan unggas*. UI-Press 1990. p. 378. ISBN: 9794560677.
- Nordstoga, A. B., Söderquist, L., Ådnøy, T., Farstad, W., Paulenz, H. 2010. Vaginal deposition of frozen-thawed semen in Norwegian Dairy goats: Comparison of single and double insemination with equal total number of spermatozoa. *Theriogenology*. 74 (5). 895–900. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.04.014.
- O’Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., Lonergan, P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*. 73 (4). 541–549. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.009.
- Oyeyemi, M. O., Akusu, M. O. 1998. Short-term effect of hemi-orchidectomy on testicular and ejaculate characteristics of West African Dwarf bucks. *Small Ruminant Research*. 31 (1). 75–78. doi: 10.1016/S0921-4488(98)00082-0.

- Pamungkas, F. A. 2009. The Potency and Quality of Goat's Semen for Technological Application of Artificial Insemination. . Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan.
- Parkinson, T. J., Morrell, J. M. 2019. Artificial Insemination. In: Veterinary Reproduction and Obstetrics. s. 746–777. Elsevier.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Soltun, K., Sæther, P. A., Fjellsøy, K. R., Berg, K. A. 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Animal Reproduction Science*. 86 (1–2). 109–117. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.06.007.
- Peña, F., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Macías García, B. 2009. Mitochondria in Mammalian Sperm Physiology and Pathology: A Review. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (2). 345–349. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01211.x.
- Ptáček, M., Stádníková, M., Savvulidi, F., Stádník, L. 2019. Ram Semen Cryopreservation Using Egg Yolk or Egg Yolk-free Extenders: Preliminary Results. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 50 (2). 96–103. doi: 10.2478/SAB-2019-0014.
- Ranjan, R., Singh, P., Kharche, S. D., Gangwar, C., Ramachandran, N., Singh, S. P., Singh, M. K. 2020. Effect of temperature humidity index on sexual behavior and semen quality in Barbari buck under Indian climatic condition. *Small Ruminant Research*. 193 . 106263. doi: 10.1016/j.smallrumres.2020.106263.
- Restall, B. J. 1991. Goat production in the Asian humid tropics. In: *Goat Production in the Asian Humid-tropics. Proceedings of an International Seminar held in Hat-Yai, Thailand*. s. 74–84.
- Ritar, A. J., Salamon, Sz. 1983. Fertility of Fresh and Frozen -Thawed Semen of the Angora Goat. *Australian Journal of Biological Sciences*. 36 . 49–60.
- Roca, J., Carrizosa, J. A., Campos, I., Lafuente, A., Vazquez, J. M., Martinez, E. 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5 °C. *Small Ruminant Research*. 25 (2). 147–153. doi: 10.1016/S0921-4488(96)00978-9.
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia?\*. *Reproduction in Domestic Animals*. 38 (4). 312–318. doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x.
- Salamon, S., Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 1996. Fertility of ram semen after long-term frozen storage. *Proc. 13th Int. Congr. Anim. Reprod., Sydney*. 3 (24). P25.

- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37 (3–4). 185–249. doi: 10.1016/0378-4320(94)01327-I.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1–3). 77–111. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X.
- Salvador, I., Viudes-de-Castro, M., Bernacer, J., Gomez, E., Silvestre, M. 2005. Factors Affecting Pregnancy Rate in Artificial Insemination with Frozen Semen During Non-Breeding Season in Murciano-Granadina Goats: a Field Assay. *Reproduction in Domestic Animals*. 40 (6). 526–529. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00624.x.
- Santolaria, P., Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Fantova, E., Blasco, M. E., Silvestre, M. A., Yániz, J. L. 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science*. 163 . 82–88. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.10.001.
- Sathe, S. R. 2018. Laparoscopic Artificial Insemination Technique in Small Ruminants—A Procedure Review. *Frontiers in Veterinary Science*. 5 . doi: 10.3389/fvets.2018.00266.
- Savvulidi, F. G., Ptacek, M., Malkova, A., Beranek, J., Stadnik, L. 2021. Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science*. 66 (2). 55–64. doi: 10.17221/226/2020-CJAS.
- Shahat, A. M., Thundathil, J. C., Kastelic, J. P. 2021. Scrotal subcutaneous temperature is increased by scrotal insulation or whole-body heating, but not by scrotal neck insulation; however, all three heat-stress models decrease sperm quality in bulls and rams. *Journal of Thermal Biology*. 100 . 103064. doi: 10.1016/j.jtherbio.2021.103064.
- Schoenian, S. 2019. Sheep 201: A Beginner’s Guide to raising Sheep – Reproduction in the ewe. . Získáno 16. března 2023, z <http://www.sheep101.info/201/ewerepro.html>
- Schulze, M., Nitsche-Melkus, E., Hensel, B., Jung, M., Jakob, U. 2020. Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock. *Animal Reproduction Science*. 220 . 106284. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106284.
- Sohnrey, B., Holtz, W. 2005. Technical Note: Transcervical deep cornual insemination of goats. *Journal of Animal Science*. 83 (7). 1543–1548. doi: 10.2527/2005.8371543x.
- Somanjaya, R., Fuah, A. M., Rahayu, S., Setiadi, M. A., Abdullah, L. 2021. PMSG in ewes: A Practical and Efficient Step for Superovulation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 748 (1). 012010. doi: 10.1088/1755-1315/748/1/012010.

- Stafford, K., Chambers, J., Sylvester, S., Kenyon, P., Morris, S., Lizarraga, I., de Nicolo, G. 2006. Stress caused by laparoscopy in sheep and its alleviation. *New Zealand Veterinary Journal*. 54 (3). 109–113. doi: 10.1080/00480169.2006.36621.
- Sundararam, M. N., Edwin, M. J. 2007. Changes in Motility Characteristics of Goat Spermatozoa During Glycerol-Equilibration and the Relevance to Cryopreservation. *Asian Journal of Cell Biology*. 3 (1). 22–33. doi: 10.3923/ajcb.2008.22.33.
- Swain, J. E., Smith, G. D. 2010. Cryoprotectants. In: *Fertility Cryopreservation*. s. 24–38. Cambridge University Press.
- Thwaites, C. J. 1995. Effect of undernutrition on the size and tone of the ram's testes. *Small Ruminant Research*. 16 (3). 283–286. doi: 10.1016/0921-4488(95)00633-V.
- Todini, L., Malfatti, A., Terzano, G. M., Borghese, A., Pizzillo, M., Debenedetti, A. 2007. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. *Theriogenology*. 67 (3). 627–631. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.023.
- Ungerfeld, R., Viera, M. N., Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Casuriaga, D., Silveira, P. 2021. Seasonality of the stress response in goat bucks when there is use of electroejaculation for semen collection. *Animal Reproduction Science*. 226 . 106719. doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106719.
- Valverde, A., Barquero, V., Soler, C. 2020. The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 29 (3). 189–198. doi: 10.22358/jafs/127691/2020.
- Williams, L. M., Helliwell, R. J. A. 1993. Melatonin and seasonality in the sheep. *Animal Reproduction Science*. 33 (1–4). 159–182. doi: 10.1016/0378-4320(93)90113-6.
- Wislocki, G. B. 1933. Location of the Testes and Body Temperature in Mammals. *The Quarterly Review of Biology*. 8 (4). 385–396. Získáno z <http://www.jstor.org/stable/2808447>
- Yotov, S., Fasulkov, I., Vassilev, N. 2011. Effect of ejaculation frequency on spermatozoa survival in diluted semen from Pleven Blackhead rams. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. doi: 10.3906/vet-0911-229.

## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

CASA – počítačově asistovaná analýza spermií  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
EH – ethidium homodimer  
FITC – fluorescein isothiokyanát  
FSC – přední rozptyl  
FSH – folikuly stimulující hormon  
H-342 – Hoechst-33342  
ID – inseminační dávka  
IUI – intracervikální umělá inseminace  
KP – kryoprotektanty  
LH – luteinizační hormon  
LIN – linearita spermií  
LUI – laparoskopická umělá inseminace  
mCASA – mobilní počítačově asistovaná analýza spermií  
MITCH – mitochondriální aktivita spermií  
MOT – motilita spermií  
MTR DR – Mito Tracker Deep Red  
OKOZ. – okozlení  
PI – propidium jodid  
PLOD. – plodnost  
PMSG – koňský sérový gonadotropin  
PNA – arašídový aglutinin  
PROG – progresivní motilita spermií  
SSC – boční rozptyl  
STR – přímočarost spermií  
TMRE – tetrametylrhodamin ethyl ester  
TMRM – tetrametylrhodamin methyl ester  
TUI – transcervikální umělá inseminace  
UI – umělá inseminace  
VAP – rychlost průměrné dráhy spermií  
VCL – křivočará rychlost spermií  
VIA – životaschopnost spermií  
VSL – přímočará rychlost spermií  
VUI – vaginální umělá inseminace  
 $\sigma$  – směrodatná odchylka



