

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Vliv typu ředidla na kvalitu inseminační dávky

Diplomová práce

**Bc. Kateřina Šperlová
Reprodukční biotechnologie**

Ing. Martina Janošíková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv typu ředidla na kvalitu inseminační dávky" 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 21.04.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martině Janošíkové Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a Ing. Kristýně Petričákové za trpělivost a cenné rady, které mi poskytovala. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Vliv typu ředidla na kvalitu inseminační dávky

Souhrn

Využití reprodukčních biotechnologií, jako je umělá inseminace a kryokonzervace inseminačních dávek, hraje důležitou roli v uchování genových zdrojů a zachování diverzity. Umožňují dlouhodobé uchování genetického materiálu, což předchází ztrátě cenných zdrojů. Mezi tyto zdroje v České republice patří Česká zlatá kropenatá slepice.

Pro uchování inseminačních dávek tohoto plemene byla porovnávána tři komerční ředidla, která jsou běžně používána pro krátkodobou konzervaci drůbežního spermatu - Poultry Media[®], NeXcell[®] a Raptac[®]. Ty byly následně doplněny o penetrující kryoprotektivum N - methylacetamid o koncentraci 9 %. Inseminační dávky byly získány ze směsného vzorku ejakulátů odebraných kohoutům (n=4) stejného věku chovaných ve stejných podmínkách v Demonstrační a pokusné stáji České zemědělské univerzity v Praze.

Před mrazením a po rozmrazení byly pomocí CASA iSperm (Aidmics Biotechnology Co., Ltd, Taipei, Taiwan) hodnoceny parametry celkové motility spermií v doporučeném poměru ředění. Životachopnost (PMI), poškození plazmatické membrány (PMD) a poškození akrozomu (ACRD) po rozmrazení bylo hodnoceno pomocí průtokového cytometru (Novocyte 3000[®], Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA).

Nejlepších výsledků celkové motility po rozmrazení bylo dosaženo na hladině významnosti $p < 0,0001$ při použití ředidla PoultryMedia[®] a naopak nejhorších při použití ředidla NeXcell[®] ($p < 0,05$).

PMI po rozmrazení byla na hladině významnosti $p < 0,0001$ nejvyšší u ředidla PoultryMedia[®] a Raptac[®], nejnižší životaschopnost byla zjištěna při použití ředidla NeXcell[®]. Nejnižší procentuální zastoupení buněk s PMD bylo sledováno na hladině významnosti $p < 0,0001$ u ředidla Raptac[®], nejvyšší bylo pozorováno u ředidla NeXcell[®]. Nejvíce buněk s ACRD bylo zjištěno na hladině významnosti $p < 0,0001$ u ředidla PoultryMedia[®] a nejméně při použití ředidla NeXcell[®].

Jako optimální ředidlo pro kryokonzervaci kohoutího spermatu plemene Česká zlatá kropenatá bylo vyhodnoceno PoultryMedia[®] a Raptac[®]. Je třeba brát v úvahu i další faktory jako je individualita jedince, odběrový den a rychlost mrazení a rozmrazení. Využití komerčních ředidel doplněných o kryoprotektivum lze doporučit a je vhodné pokračovat v dalších studiích.

Klíčová slova: kryokonzervace, ředidla, ejakulát, genové zdroje, glycerol

Effect of diluent type on the quality of the insemination dose

Summary

The use of reproductive biotechnologies, such as artificial insemination and cryopreservation of insemination doses, plays an important role in conserving genetic resources and maintaining diversity. They enable the long-term preservation of genetic material, which prevents the loss of valuable resources. Among these sources in the Czech Republic is the Czech golden speckled hen.

Three commercial diluents that are commonly used for short-term preservation of poultry sperm - Poultry Media[®], NeXcell[®] and Raptac[®] - were compared to preserve the insemination doses of this breed. These were subsequently supplemented with the penetrating cryoprotectant N-methylacetamide at a concentration of 9 %. Insemination doses were obtained from a mixed sample of ejaculates taken from roosters (n=4) of the same age kept under the same conditions in the Demonstration and Experimental Stable of the Czech University of Life Sciences in Prague.

Before freezing and after thawing, total sperm motility parameters were evaluated using CASA iSperm (Aidmics Biotechnology Co., Ltd, Taipei, Thailand) at the recommended dilution ratio. Viability (PMI), plasmatic membrane damage (PMD) and acrosome damage (ACRD) after thawing were assessed using a flow cytometer (Novocyte 3000[®], Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA).

The best results of total motility after thawing were achieved at the significance level of $p < 0.0001$ when using PoultryMedia[®] diluent and the worst when using NeXcell[®] diluent ($p < 0.05$).

PMI after thawing was highest at the $p < 0.0001$ level of significance with PoultryMedia[®] and Raptac[®] diluent, the lowest viability was found using NeXcell[®] diluent. The lowest percentage of cells with PMD was observed at the significance level of $p < 0.0001$ with Raptac[®] diluent, the highest was observed with NeXcell[®] diluent. The most cells with ACRD were found at the $p < 0.0001$ significance level with PoultryMedia[®] diluent and the least with NeXcell[®] diluent.

PoultryMedia[®] and Raptac[®] were evaluated as optimal diluents for cryopreservation of Czech golden speckled rooster semen. Other factors such as the individuality of the individual, the day of collection and the speed of freezing and thawing must also be taken into account. The use

of commercial diluents supplemented with a cryoprotectant can be recommended and further studies should be continued.

Keywords: cryopreservation, diluents, ejaculate, gene reserve, glycerol

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Charakteristika a význam umělé inseminace	11
3.2 Ejakulát	12
3.2.1 Složení.....	12
3.2.2 Ejakulát ptáků	13
3.2.3 Morfologické změny, poškození spermií, ROS	14
3.2.4 Hodnocení ejakulátu	15
3.2.4.1 CASA	16
3.2.4.2 Průtoková cytometrie.....	16
3.3 Konzervace ejakulátu	17
3.3.1 Krátkodobá konzervace.....	17
3.3.1.1 Ředidla spermatu	17
3.3.2 Dlouhodobá konzervace.....	24
3.3.2.1 Penetrující kryoprotektiva	26
3.3.2.2 Nepenetrující kryoprotektiva.....	27
4 Metodika	29
4.1 Zvířata zařazená do experimentu	29
4.2 Odběr ejakulátu	29
4.3 Zpracování ejakulátu a výroba inseminační dávky	29
4.4 Hodnocení ejakulátu pro výrobu inseminačních dávek	30
5 Statistická analýza dat	33
6 Výsledky	34
6.1 Základní statistické parametry – mCASA	34
6.2 Základní statistické parametry- průtokový cytometr	34
6.2.1 Procento životaschopných spermií	34
6.2.1.1 Popis modelu	34
6.2.2 Zastoupení spermií s poškozenou plazmatickou membránou	36
6.2.2.1 Popis modelu	36
6.2.3 Zastoupení spermií s poškozeným akrozomem	37
6.2.3.1 Popis modelu	37
7 Diskuze	39

8 Závěr	42
9 Literatura	43
10 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	52
11 Seznam obrázků	I
12 Seznam grafů	I
13 Seznam tabulek.....	I

1 Úvod

Genové zdroje představují důležitý nástroj pro udržení genetické rozmanitosti a odolnosti chovných populací. Jejich využívání je klíčové pro zachování vitality biologických druhů a adaptaci na změněné podmínky prostředí. Do genových zdrojů je v České republice zařazeno i plemeno slepic Česká zlatá kropenatá, které se na našem území chová již po staletí (Anderle et al. 2014; Kraus et al. 2022).

Reprodukční biotechnologie, mezi něž je řazena umělá inseminace, představují klíčový a efektivní nástroj v moderních chovech zvířat. Tato technika překonává biologické bariéry spojené s přirozeným pářením. Pro dosažení kvalitních inseminačních dávek je zásadní použití vhodného ředidla, které optimalizuje životaschopnost spermatu během skladování. U ptáků je však zásadním problémem skutečnost, že na rozdíl od savců, nemají schopnost kryokonzervace oocytů. Toto biologické omezení zdůrazňuje význam uchovávání kvalitního spermatu u ptáků jako klíčového zdroje genetické informace pro budoucí generace (Zong 2023).

U mnoha druhů zvířat jsou na trhu k dispozici standardizovaná ředidla určená k mrazení inseminačních dávek. V případě spermií kohoutů, kteří mají jedinečné biologické vlastnosti a požadavky na kryokonzervaci, v současné době neexistuje standardizované ředidlo, které by plně vyhovovalo těmto potřebám. Tato skutečnost zdůrazňuje důležitost výzkumu a vývoje nových ředidel specificky určených pro kryokonzervaci kohoutího spermatu tak, aby bylo zajištěno optimální zachování a účinnost spermatu pro inseminaci (Roiter & Konopleva 2019).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bude porovnat vliv různých typů ředidel na kvalitu inseminační dávky. Hypotéza: Lze předpokládat, že přídavek různých modifikovaných ředidel pro kryokonzervaci pohlavních buněk pozitivně ovlivní motilitu a viabilitu spermií v inseminačních dávkách po rozmrazení.

3 Literární rešerše

3.1 Charakteristika a význam umělé inseminace

Stále rostoucí světová populace klade vysoké požadavky na zlepšení úrovně živočišné výroby. Reprodukce je jedním z hlavních faktorů, který ovlivňuje celkovou efektivnost a ziskovost chovů. Dobrá úroveň reprodukční schopnosti a plodnosti je klíčová z hlediska ekonomiky chovu. Snahou každého chovatele je získat stále lepší a výkonnější jedince pro další chov. Pozornost je věnována nejen užitkovým vlastnostem, ale také nízkou dědičným znakům jako je zdraví a plodnost (Rakova 2020). Zejména mlékárenský průmysl má dlouhou historii testovacích systémů pro potomstvo k identifikaci elitních býků a k následnému šíření těchto genů v komerčních mléčných stádech (Vishawanath 2003).

Tyto snahy mohou být značně usnadněny díky reprodukčním biotechnologiím. Nejstarší biotechnologickou metodou je inseminace. Její počátky sahají do 18. století. Využití umělého oplodnění začalo v polovině 20. století zpočátku při reprodukci skotu a ovcí a v zemích, kde byl nutný rychlý nárůst živočišných produktů pro zajištění potravinové zásoby obyvatelstva. Již od svých počátků je inseminace základní technologií a nepostradatelným pomocníkem pro všechny moderní metody v oblasti chovu zvířat (Wiebke et al. 2021). U hospodářských zvířat je praktikována po celém světě a stále více se používá u domácích zvířat a u volně žijících živočichů. Dále je základem pro další biotechnologie od přenosu embryí po klonování (Aurich 2012).

Umělá inseminace může zlepšit plodnost a zároveň snížit počet samců na farmách, zajistit oplodnění většího počtu samic od menšího počtu samců s kvalitním spermatem (Muvhali et al. 2022). Je to nástroj, který při správném použití umožní maximální reprodukční účinnost a zvýší genetický zisk.

Limitujícími faktory inseminace jsou:

- denní produkce spermií, jejich počet a kvalita,
- procento progresivně pohyblivých a morfologicky normálních spermií,
- manipulace se semenem,
- plodnost samic,
- kompetence inseminačního technika,
- místo ukládání spermatu,
- načasování inseminace,
- celkový management farmy.

Bez ohledu na to, kolik faktorů ovlivňuje plodnost, mezi těmito faktory existují interakce (Pickett & Shiner 1994; Diskins 2019).

Při páření zvířat je uvolňováno do pohlavních orgánů samice velké (nadbytečné) množství spermií (skot 4–14 miliard), k realizaci procesu oplození vajíčka stačí daleko menší počet (u krávy je potřebné množství 10 milionů aktivních spermií), vlastní oplození vajíčka provede, jediná spermie. Je tedy možno zvýšit využití ejakulátu ředěním. Vysoké využití plemenika pomocí inseminace dokládá případ býka z Dánska, od kterého bylo získáno pomocí inseminace více jak 100 000 telat. Tento způsob řízení reprodukce v chovu zvyšuje plodnost

stád, zlepšuje populace po genetické stránce a podporuje rozvoj plemenářských programů. Umožňuje uchovávání semene i desítky roků a přepravu na libovolné vzdálenosti. Při této metodě jsou spermie samce uměle přenašeny do pohlavního ústrojí samic, kde mají oplodnit přirozeně uvolněné vajíčko během přirozené říje nebo během říje uměle indukované pomocí hormonálních preparátů (Rakova 2020).

Cílem inseminace je zajistit, aby v době ovulace existoval dostatečný rezervoár motilních a kapacitovaných spermií v kaudální oblasti vejcovodu, aby byla zajištěna nejvyšší možná pravděpodobnost oplodnění (Diskins 2019).

3.2 Ejakulát

Ejakulát je zásadní pro úspěšnou reprodukci u pohlavně se rozmnožujících zvířat: samci získávají veškerou svou fitness prostřednictvím ejakulátu a samice potřebují ejakulát k rozmnožování. Spermie i nespermiové složky ejakulátu hrají zásadní roli v postkopulačním sexuálním výběru a v procesech, které mohou potencionálně způsobit rychlé evoluční změny (Perry et al. 2013).

3.2.1 Složení

Samčí ejakulát obsahuje mnohem více než jen spermie. Složky spermatu mohou zahrnovat proteiny nebo peptidy semenné plazmy, soli a cukry, obranné sloučeniny, lipidy a vodu. Nespermatické složky ejakulátu plní mnoho funkcí. Často jsou nezbytné pro plodnost a regulují dobu skladování a využití spermií (Perry et al. 2013).

Ejakulát se skládá ze spermií suspendovaných ve fluidním médiu zvaném semenná plazma. Semenná plazma je komplexní tekutá část a zprostředkovává chemickou funkci ejakulátu. Její pH se liší podle druhu. Biochemické složky seminální plazmy jsou vylučovány z retetestes, epididymis a přídatných pohlavních žláz samčího reprodukčního traktu. Přídatné pohlavní žlázy přispívají k objemu ejakulátu a sekrece semenných váčků tvoří hlavní část semenné plazmy při ejakulaci. Konvenční role semenné plazmy je jako médium pro přežití, které usnadňuje transport spermií. Tento názor byl v rozporu s nástupem reprodukčních technologií, pomocí kterých je možné oplodnit vajíčka vymytými spermii a produkovat životaschopná embrya, což má za následek živé potomstvo bez vystavení samčího reprodukčního traktu semenné plazmě (Juyena & Stelletta 2012).

Bylo popsáno, že semenná plazma obsahuje faktory, které podporují aktivitu spermií, jako je pohyblivost a životaschopnost, a které usnadňují kapacitaci. Je však také známo, že semenná plazma obsahuje faktory, které jsou škodlivé pro oplozeníschopnost, například dekapacitační faktor a faktor inhibující motilitu. Semenná plazma je navíc škodlivá pro skladování spermií, protože obsahuje faktory, které negativně ovlivňují životaschopnost spermií. Faktory odpovědné za tyto činnosti však nebyly přesně charakterizovány (Manjunath 2012).

Na druhé straně bylo také pozorováno, že použití konzervovaného spermatu pro umělou inseminaci u druhů hospodářských zvířat, které často zahrnuje rozsáhlé ředění nebo odstraňování semenné plazmy, má za následek nižší míru plodnosti než při přirozeném páření.

Tyto důkazy naznačují, že složky semenné plazmy se účastní klíčových událostí souvisejících s oplodněním a vývojem embrya v ženském reprodukčním traktu (Juyena & Stelletta 2012).

Spermie jsou tedy produkovány ve varlatech a v případě ptačích druhů je ve varlatech produkována i semenná plazma. Všechny tyto sekrece jsou řízeny endokrinními hormony – FSH (folikulo-stimulační hormon) a LH (luteinizační hormon) z hypofýzy, které regulují varlata, které následně produkují testosteron, který řídí vývoj varlat a jejich sekreci (Getachew 2016). Počet produkováných spermií závisí na počtu přítomných Sertoliho buněk a Leydigových buněk (Getachew 2016). U býka se průměrný objem ejakulátu pohybuje od 5 do 8 ml, u drůbeže je to v rozsahu od 0,1 do 1,5 ml (Janošíková et al. 2023).

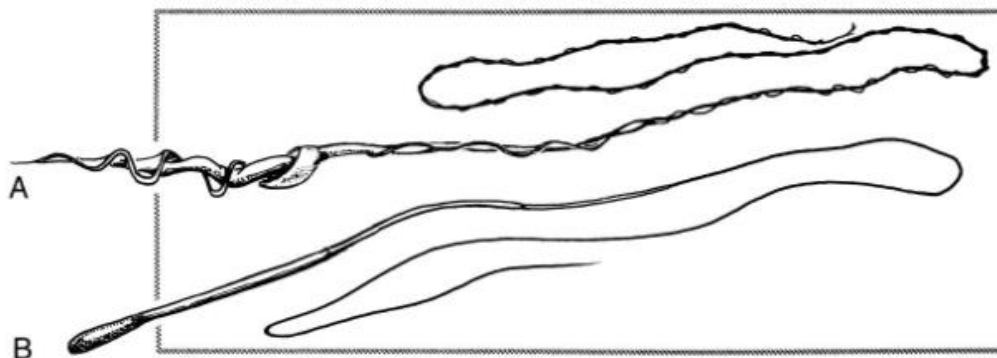
3.2.2 Ejakulát ptáků

Spermie jsou buňky nesoucí haploidní jaderný genom a jejich primární úlohou je dostat se k oocytu a zapojit se do oplodnění, poskytnout svou DNA a aktivovat oocyt. U druhů s vnějším oplozením prodělávají spermie několik procesů jejichž cílem je překonat bariéry v samičím reprodukčním traktu a dosáhnout oocytu (Roldan & Taves 2020). Leeuwenhoek byl první, kdo v roce 1679 komentoval rozdíly ve vzhledu spermií z různých taxonů. Později v 19. století německý zoolog Rudolf Wagner poznamenal, že spermie se mezi taxony výrazně liší, včetně rozdílů mezi spermiemi pěvců a nepěvců a mezi ptáky, savci, žábami, rybami, ještěrkami, hmyzem a měkkýši (Birkhead & Montgomerie 2009). V živočišné říši tedy existuje velká rozmanitost, pokud jde o způsob, jakým se spermie chovají a procházejí těmito procesy (Roldan & Taves 2020).

Mezi ejakuláty savců a ptáků existují podstatné rozdíly ve složení i ve tvaru samotných spermií. Na rozdíl od spermií savců mají ptačí spermie málo cytoplazmatických antioxidantů a jejich membrány jsou bohaté na polynenasycené mastné kyseliny. Díky těmto vlastnostem jsou spermie ptáků více náchylné k oxidačnímu stresu, což vede ke ztrátě pohyblivosti, poškození DNA spermií a následně ke snížené plodnosti (Leão et al. 2021).

Ptačí spermie jsou tenké a dlouhé buňky složené z hlavičky (akrozomu a jádra), střední části a bičíku. Jak je patrné z obrázku 1, ptáci mají dva druhy spermií. Jednoduchý typ se vyskytuje u domácí drůbeže a většiny druhů ptáků a je podobný anatomickému uspořádání spermií savců. Komplexní typ se nachází u pěvců. Všechny spermie ptáků vykazují akrozom, hlavu a ocas. Akrozom je malý a obsahuje akrozomový vezikul, který tvoří rezervoár vápníku a obsahuje hydrolytické enzymy. Jádro je vysoce kondenzované pro optimální ochranu genů během pohybu spermií. Střední část se skládá z proximálního a distálního centriolu pro potřebu motility a z mitochondriálního pouzdra, které přispívá k energetickému metabolismu. Pro klíčové procesy, jako je dosažení kapacitace a zahájení oplodnění, je nutná pohyblivost spermií. Mitochondrie jsou také přítomny v části bičíku některých druhů, jako jsou křepelky. Počet mitochondrií spermií se velmi liší podle druhu: průměrně 30 μm u slepice a krůty, 1000 μm u křepelky. Bičík je nejdelší částí spermatu (70–90 μm u slepice, 140 μm u některých křepelky). Spermie ptáků jsou štíhlejší vzhledem i objemem, čímž se snižuje objem ejakulátu ve srovnání s objemem savců. Jednoduchý typ spermií je velmi štíhlý a dlouhý, přibližně o jednu třetinu delší než lidský. Akrozom u jednoduchého typu se připojuje pouze na kraniální část hlavičky, na rozdíl od savců, u kterých pokrývá většinu hlavičky. Komplexní typ má

akrozom, hlavu i ocas uspořádaný do spirály. Tyto spermie rychle rotují podél podélné osy spirály jako vývrtka, na rozdíl od zvlněné formy jednoduchého typu (Pollock & Orosz 2002; Blesbois 2018).



Obrázek 1 - Typy spermií u ptáků (A - komplexní spermie pěvců, B - jednoduchý typ spermie nacházející se u většiny ptáků) (Pollock & Orosz 2002).

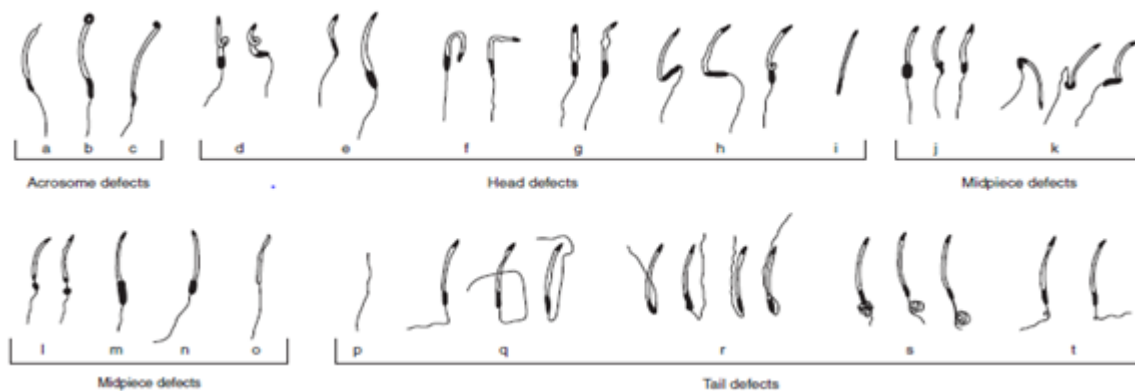
Koncentrace spermií v ejakulátech ptáků je typicky druhově specifická. U domácích druhů jsou průměrné hodnoty v milionech na mikrolitr: 2,5-5,5 u kura domácího, pekingských kačerů a perliček; 6-10 u krocanů, zatímco u nedomácích druhů je sperma mnohem méně koncentrované. Pro dosažení vysoké plodnosti je koncentrace spermií důležitým parametrem pro domácí i divoké druhy ptáků (Barna et al. 2020).

U většiny druhů savců spermie dozrávají ve varlatech a nadvarlatech. U ptáků však dochází ke konečnému dozrání až ve vas deferens (Janošíková et al. 2023).

3.2.3 Morfologické změny, poškození spermií, ROS

Aby bylo dosaženo úspěšného oplodnění, musí být spermie progresivně pohyblivé, schopné produkovat energii ve formě ATP pro buněčné procesy, udržovat plazmatickou membránu a akrozomální integritu a zachování enzymů nezbytných pro penetraci oocytů (Layek et al. 2016).

V ejakulátu není neobvyklý výskyt fyziologicky nebo anatomicky abnormálních spermií. Některé spermie se mohou pohybovat v nepravidelných vzorcích pohybu, být jen slabě pohyblivé nebo se nemusí pohybovat vůbec. Běžné jsou i akrozomální či ocasní vady, stejně jako malé nebo příliš velké hlavičky. Dokonce se vyskytují i spermie, které postrádají hlavu nebo ocas. Některé z těchto variací jsou jednoduše důsledkem nezralých nebo stárnoucích spermií objevujících se v ejakulátu (Pitnick et al. 2009; Chenoweth & Lorton 2014) viz obr. 2. Morfologické abnormality tvaru spermií mohou mít přímý vliv na oplodnění s rizikem nízkého březosti (Ilhan & Serbes 2022). Normální morfologie je jistě v pozitivní korelaci s úspěšnou fertilitou. Vyšší úroveň abnormálních a nezralých spermií lze obvykle nalézt v ejakulátech v raných fázích období rozmnožování jedince (Barna et al. 2020). *In vitro* hodnocení morfologických defektů spermií spermatu kohouta zahrnuje; ohnutí krku (ohnutí střední části), poškození střední části, poškození akrozomu (ohnutí, otok, zauzlování nebo zaoblení), celkové otoky hlavy a defekty ocasu (Gatachew 2016).



Obrázek 2 Morfologické poškození spermií spojené s akrozomem (a-c), hlavou (d-i), střední částí (j-o) a ocasem (p-t) krutích spermií (Animal Andrology, Chenoweth & Lorton 2014).

Citlivost spermií na oxidační stres během kryokonzervace je způsobena tvorbou velkého množství reaktivních forem kyslíku (ROS) během zpracování. ROS jsou normální vedlejší produkty buněčného metabolismu a v relativně malém množství hrají klíčovou roli ve funkcích spermií, jako je kapacitace, akrozómová reakce a vazba na zona pellucida (Kameni et al. 2021). Nízké teploty během konzervace podporují změny v konfiguraci fosfolipidové vrstvy membrán, čímž se stávají tuhými a křehkými (Leão et al. 2021). Membrány spermií jsou složeny z heterogenní směsi fosfolipidů, glykolipidů a sterolů. Předpokládá se, že lipidy spermií jsou důležité pro životaschopnost, zralost, motilitu a fertilizační schopnost spermií. Obvykle se předpokládá, že lipidy v plazmatické membráně spolu s lipidy asociovanými v akrozomálních membránách jsou hlavními cíli útoku reaktivního kyslíku. Rozsah poškození membrány může zahrnovat změny v organizaci lipidů, fluiditě, permeabilitě, lipidovém složení membránové dvojvrstvy a celkové narušení membrány (Tavilani 2008). Nejbezprostřednějšími důsledky jsou zvýšená propustnost membrán následovaná ztrátou motility a oplozeníschopnosti. Peroxidační poškození plazmatické membrány a DNA spermií je považováno za důležitý patologický mechanismus samčí neplodnosti (Abavisani et al. 2013).

Tyto strukturální změny v membráně podporují působení ROS v methylenové skupině fosfolipidů, což způsobuje oxidaci lipidů. Kromě toho vysoké hladiny ROS také ohrožují funkci mitochondrií, což následně snižuje produkci ATP. Proto je prevence peroxidace lipidů v membráně spermií zásadní, aby se minimalizovaly škodlivé účinky během chlazení nebo zmrazování nebo se jim úplně zabránilo (Leão et al. 2021).

3.2.4 Hodnocení ejakulátu

Hodnocení spermatu je rutinní postup v reprodukčním managementu domácích zvířat. Je součástí hodnocení zdravého chovu, které zahrnuje systematické fyzické vyšetření samce se zaměřením na identifikaci jedinců s potenciálními problémy s plodností. Analýza spermatu má za cíl předpovědět fertilizační potenciál čerstvého ejakulátu nebo dávky spermatu a má klíčový význam pro úspěch jakéhokoli šlechtitelského programu (Bustamante-Filho et al. 2022; Wysokińska et al. 2023).

Hodnocení spermií se provádí za účelem odhadu koncentrace a hodnocení procenta pohyblivých buněk, morfologie, integrity organel a integrity DNA. Cílem je laboratorně vyhodnotit schopnost spermií podstoupit řadu změn nutných pro oplodnění (Roldan & Gomendio 2009).

3.2.4.1 CASA

Po ejakulaci je důležité vizuální vyšetření čerstvě odebraného spermatu. Odebrané sperma by mělo být čisté, perleťově bílé a ve většině případů viskózní. Vodnaté sperma a sperma kontaminované krví, výkaly či jinými nečistotami by se nemělo používat k následnému zpracování a inseminaci (Barna et al. 2020).

Systém CASA (Computer Assisted Sperm Analysis – analýza spermií podporovaná počítačem) promítá postupné obrazy suspenze spermií na pole detektorů, detekuje objekty na základě intenzity pixelů v rámečku nebo rozptylu světla, používá speciální software k extrakci požadovaných informací a vytvoření požadovaného výstupu (Amann & Waberski 2014).

CASA poskytuje parametry motility-progresivní motilita (%), celková motilita (%), a kinematické charakteristiky pro hodnocení spermií, jako je rychlost či linearita (Ugur et al. 2019).

Nárůst používání CASA pro hodnocení kinetiky a morfologie spermií přinesl mnoho výhod a významně snížil provozní chyby. CASA má však stále omezení, pokud jde o přesnou předpověď „potenciálu plodnosti“ daného vzorku spermatu nebo subjektu. Po pečlivé validaci poskytují systémy CASA cenné informace pro zajištění kvality komercializovaného spermatu a pro pochopení rozmanitosti reakcí spermií na změny v mikroprostředí. Jiné metody, jako je průtoková cytometrie, jsou slibnými přístupy pro analýzu spermatu, ale aplikace v terénu a v komerčních stádech jsou omezené (Bustamante-Filho et al. 2022).

3.2.4.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je výkonný nástroj pro analýzu buněk, který umožňuje morfologické charakterizace, jako je mimo jiné velikost buněk, granulace, obsah DNA nebo RNA, počítání buněk a stanovení životaschopnosti. Některé přístroje jsou také schopny oddělit buněčné populace v procesu zvaném buněčné třídění (Bajgelman 2019). Průtokový cytometr třídí živé a mrtvé buňky po barvení fluorescenčními barvivy SYBR-14 a propidium jodidem. SYBR-14 označuje živé spermie zelenou fluorescencí a propidium jodid označuje mrtvé spermie červenou fluorescencí (Barna 2020).

Princip fungování cytometru spočívá v tom, že buňky procházejí soustředěným světelným zdrojem v kapiláře. Fotodetektory zachycují signály, které umožňují vyhodnotit velikost buněk, granularitu a expresi molekulárních cílů. Tyto signály z jednotlivých buněk jsou zpracovávány a analyzovány graficky, například jako histogramy nebo bodové grafy, k identifikaci a kvantifikaci buněčných populací nebo dokonce k posouzení exprese cílového genu (Bajgelman 2019).

K dispozici jsou dva typy systémů průtokové cytometrie. Jeden z nich má třídící schopnost (fluorescenčně aktivovaná průtoková cytometrie – FACS) umožňuje fyzickou

separaci a purifikaci buněk. Druhý je netřídění, který měří fluorescenční emisi vysoce opakovatelným, přesným a citlivým způsobem a generuje vysoce přesná data o subpopulacích spermií (Ugur et al. 2019).

3.3 Konzervace ejakulátu

Konzervace spermatu je problémem, kterému čelí chovatelé hospodářských zvířat od doby, kdy se začalo poprvé uvažovat o umělé inseminaci. S rozvojem rozsáhlých programů chovu hospodářských zvířat ve 20. století, potřeba transportu spermatu z místa odběru na místo inseminace a nutnost připouštět velké množství samic po delší dobu nebo v různých obdobích roku, bylo vyžadováno konzervovat sperma v umělých podmínkách. Toho lze dosáhnout metodami, které snižují nebo zastavují metabolismus spermií a tím prodloužit jejich plodný život (Maxwell & Salamon 1993).

Spermie jsou morfologicky a fyziologicky jedinečné, diferencované a polarizované buňky, které mají integrální funkci přenosu otcovské DNA a aktivaci oocyty po oplodnění. Ve spermiích však existuje mnoho druhově specifických rozdílů, zejména pokud jde o morfologii hlavičky spermií, specifické kinematické parametry, složení plazmatické membrány nebo mrazicí kapacitu. Hlavní vysvětlení těchto rozdílů spočívá v přítomnosti specifických, vysoce diferencovaných, reprodukčních funkcí mezi druhy. Tyto jedinečné druhové funkce, jako je například zachování životaschopnosti spermií uvnitř samičího genitálního traktu, se mohou lišit, od několika hodin (u skotu) do několika dnů (u drůbeže) (Partyka & Nizański 2022).

3.3.1 Krátkodobá konzervace

V první polovině dvacátého století bylo publikováno mnoho zpráv o ředění spermatu hospodářských zvířat a velká část těchto prací pocházela z bývalého Sovětského svazu. Přijatým principem technologie krátkodobé konzervace spermatu bylo udržet spermie životaschopné po dlouhou dobu. Aby bylo sperma použitelné pro inseminaci, musela být jeho minimální doba skladování 2 až 4 dny, aby bylo možné zajistit jeho přepravu a použití na vzdálených farmách. To si vynutilo vývoj techniky skladování spermatu sestávající ze snížení teploty spermatu na 5 °C, což vedlo ke snížení rychlosti metabolismu spermií a přispělo k jejich lepší životaschopnosti (Kowalczyk et al. 2020).

3.3.1.1 Ředidla spermatu

Ejakulát většiny domácích zvířat obsahuje více spermií, než je potřeba pro dosažení březosti. Naředěním ejakulátu je možno získat mnohem více inseminačních dávek a potenciálně oplodnit více samic. U druhů, jako je pes a kůň, je celá frakce ejakulátu bohatá na spermie zředěna a zchlazena, poté použita buď k postupným inseminacím téže samice během jejího prodlouženého období říje nebo po různých stanoveních plodného období. U hospodářských druhů zvířat se ejakulát obecně ředí, takže může být použit k inseminaci mnoha samic. V každém případě je maximální stupeň ředění určen z minimálního počtu spermií

a objemu ejakulátu, který je nutný k dosažení přijatelné míry březosti. Tyto faktory samy o sobě jsou určeny místem inseminace, přežitím spermií v ředidle a specifitou jednotlivých druhů a samců. Obecně platí, že tam, kde lze dosáhnout intrauterinní inseminace, jsou minimální počty spermií o jeden nebo dva řády nižší než u intracervikální inseminace, která je sama o sobě o jeden nebo dva řády nižší než u intravaginální inseminace (Noakes et al. 2001).

Chladicí a mrazicí postupy mají za následek řadu fyzikálních změn ve vnějším prostředí buněčné suspenze (jako například pohyb vody a rozpuštěných látek). U zmrazených a rozmrazených ejakulátů dochází k významnému poklesu motility, životaschopnosti a progresivního pohybu v samičím reprodukčním traktu, což způsobuje snížení plodnosti. Takto snížená plodnost pravděpodobně souvisí s narušením membrány spermií. Funkční parametry spermií jsou tedy značně ovlivněny lipidovým složením membrány spermií (Abavisani et al. 2013). Z těchto důvodů ředidla spermatu obsahují ochranné složky, které umožňují přežití spermií mimo reprodukční trakt samce (Brinsko et al. 2011).

Volba vhodného ředidla spermatu je důležité při použití čerstvého spermatu, pro krátkodobé skladování, ale také pro kryokonzervaci. Základní médium pro zmrazení spermatu by mělo poskytovat vhodné chemické a fyzikálně-chemické podmínky, které minimalizují buněčný stres, aby poskytly buňkám nejlepší možný výchozí od pro vypořádání se se stresem při zmrazování a rozmrazování. Kromě základního média má pro úspěšnou kryokonzervaci velmi důležitou úlohu typ a koncentrace použitého kryoprotektivního prostředku, rychlost chlazení a další charakteristiky mrazicího protokolu (Rehman et al. 2013; Woelders et al. 2022).

3.3.1.1.1 Složení ředidel

Destilovaná voda

V ředidle plní funkci nosiče ostatních látek v něm obsažených (Beran et al. 2014).

Pufry

Kyselina mléčná je konečným produktem metabolismu spermií. Může způsobit snížení hladiny pH. Pufry, přidané do ředidla mají za cíl a zabránit aglutinaci spermií a udržovat hladinu pH u většiny druhů hospodářských zvířat v rozmezí 6,4 – 6,8 (Beran et al. 2014).

Pufry používané pro uchovávání gamet:

- TRIS - (hydroxymethyl)methylarnin,
- TES - 2-{[tris(hydroxymethyl)methyl]amino}ethansulfonová kyselina,
- HEPES - 4-2-hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonová kyselina,
- MES - 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina,
- PIPES - Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina),
- MOPS - 3-(N-norfolino)propansulfonová kyselina,
- BES - NN-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonová kyselina (Will et al. 2011).

Nejběžněji se pro skladování chlazeného i mrazeného spermatu využívají ředidla s pufry na bázi TRIS (Raheja et al. 2018). Will et al. (2011) však uvádí, že pufry (HEPES a MOPS)

zdají být mnohem lepšími pufrů než TRIS, a také že pufrů kombinované se prokázaly jako mnohem lepší pro kryokonzervaci spermií.

Cukry

Každý živý organismus potřebuje energii pro metabolismus na buněčné úrovni. Mitochondrie generují ATP ve spermiích procesem oxidativní fosforylace a k tomu potřebují dostatek energie. Spermie přirozeně obsahují fruktózu. Ředidla obvykle obsahují různé druhy cukrů: glukózu, trehalózu, ribózu, rafinózu, sacharózu či galaktózu (Rahman et al. 2013).

Bylo prokázáno, že přídavek trehalózy do ředidla spermatu výrazně zlepšilo životaschopnost spermií pro rozmrazení u kanců (Malo et al. 2010), beranů (Rostami et al. 2020), hřebců (Pérez-Marín et al. 2018) a kohoutů (Mosca et al. 2016; Thananurak et al. 2020; Stanishevskaya et al. 2021).

Aminokyseliny

Aminokyseliny hrají při kryokonzervaci důležitou roli díky svým antioxidačním vlastnostem (Beran et al. 2014). Jsou hlavními jednotkami proteinů a hrají významnou roli v různých biologických a fyziologických procesech. Bylo popsáno, že aminokyseliny, např. glutamin, glycin, prolin, se podílejí na inhibici všech typů poškození způsobených během procesu zmrazování a rozmrazování u beranů, koz, hřebců a lidských spermií. Aminokyselina prolin chrání spermie proti chladovému šoku a mrazovému stresu u spermií hřebců (Ahmed et al. 2020).

Ahmed et al. (2020) použil L-tryptofan jako přídavek do ředidla spermatu býků. L – tryptofan je esenciální aromatická aminokyselina, která se účastní metabolických funkcí a je nepostradatelná pro biosyntézu proteinů. Přídavek L-tryptofanu zajistil výrazné zlepšení kvality spermatu během procesu zmrazování a rozmrazování. Bernal et al. (2020) použil valin jako doplněk ředidla spermatu kohoutů. Byla zjištěna výrazně vyšší motilita spermií po rozmrazení oproti kontrolním vzorkům bez přidaného valinu.

Mastné kyseliny

Vzhledem k tomu, že peroxidace lipidů během kryokonzervace vlivem reaktivních forem kyslíku má za následek ztrátu polynenasycených mastných kyselin z plazmatické membrány a snížení přežití spermií a fertility, lze předpokládat, že přídavek mastných kyselin může zlepšit kvalitu ejakulátu po rozmrazení (Abavisani et al. 2013; Beran et al. 2014).

Jakop et al. (2019) přidali do ředidla spermatu kanců přirozeně se vyskytující mastné kyseliny – kyselinu linolovou, linoleovou, olejovou, palmitoolejovou. S výjimkou kyseliny linolenové všechny přirozeně se vyskytující mastné kyseliny zvýšily počet spermií s aktivními mitochondriemi po 3 dnech skladování. Kyselina palmitoolejná se jeví jako nejúčinnější přídavek. Zvýšila podíl pohyblivých a progresivně pohyblivých spermií ještě výrazně více než ostatní použité mastné kyseliny.

Eslami et al. (2018) využili kyselinu linolovou jako přídavek do ředidla spermatu kohoutů. Kyselina linolová prokazatelně snížila peroxidaci lipidů v membránách spermií a zlepšila motilitu u chlazeného spermatu kohoutů.

Antibiotika

Antibiotika jsou důležitými složkami ředidel spermatu pro kontrolu bakteriální kontaminace. Obecně je tendence využívat širokospektrální antibiotika, což znamená vysoce účinné látky v různých kombinacích za účelem snížení toxicity spermií. S tím se dostávají do popředí problémy reziduí a rezistence (Schulze et al. 2020).

Téměř všechny vzorky spermatu obsahují bakterie. Sliznice reprodukčního traktu je kolonizovaná mikroby z vnějšího prostředí i ze samotného zvířete. Tyto bakterie jsou přenášeny do spermatu během ejakulace. V rozsahu kontaminace hraje tedy klíčovou roli čistota prostředí, ve kterém je zvíře chováno. Během zpracování ejakulátu může dojít k následné kontaminaci spermatu bakteriemi z prostředí nebo od personálu, proto je klíčové během celého procesu věnovat velkou pozornost hygieně (Morrel et al. 2022).

Předpisy stanovují, že antibiotika by měla být přidávána do dávek spermatu, což je ve značném rozporu se současnými doporučeními o obezřetném používání antimikrobiálních látek. V nich je uvedeno, že antibiotika by měla být používána pouze pro terapeutické účely, a to až po stanovení citlivosti původce na příslušné antibiotikum. Proto je překvapivé, že tématu rozšířeného používání antibiotik v ředidlech spermatu u všech živočišných druhů věnovaná tak malá pozornost (Morrel et al. 2022). Z tohoto důvodu je důležité najít dostatečnou a účinnou alternativu k antibiotikům přidávaných do ředidel spermatu hospodářských zvířat.

Konvenčně využívanými antibiotiky přidávanými do ředidel spermatu jsou:

- penicilin,
- streptomycin,
- ceftiofur,
- apramycin,
- aminoglykosidy,
- linco-sespetin + tylosin + gentamycin (Bustani & Baiee 2021).

Jedním z nejčastěji používaných antibiotik v komerčně dostupných ředidlech spermatu drůbeže je gentamicin. V současné době se v drůbežářském průmyslu úměrně k vyššímu využití umělé inseminace zvýšilo používání antibiotických látek v ředidlech, což může způsobit výraznou antibiotickou rezistenci u ptáků (Mohan et al. 2023).

U umělé inseminace skotu jsou nejrozšířenějšími antibiotiky benzylpenicilin a streptomycin, protože jsou účinné proti *Campylobacter fetus*. Většina ostatních antibiotik buď nedokáže tento organismus kontrolovat, nebo jsou pro spermie přímo škodlivé. V poslední době vedly obavy z potenciálního přenosu druhů *Mycoplasma* a *Ureaplasma* ve spermatu skotu k začlenění linkomycinu a spektinomycinu do ředidel spermatu ve snaze kontrolovat tyto organismy. Existují důkazy, že účinnost antibiotik může být snížena v přítomnosti některých složek ředidel, zejména vaječného žloutku, a proto je v některých centrech pro umělé oplodnění skotu využívána předinkubace spermatu s antibiotickými koktejly, než dojde k hlavnímu ředění (Nakes et al. 2001).

Vhodnou alternativou k přidávání antibiotik může být dle Morell & Wallgren (2014) fyzické odstranění bakterií z ejakulátu. To je prováděno použitím koloidní centrifugace, zejména jednovrstvé. Jedná se o poměrně jednoduchý postup, který je možné provést v podstatě v jakékoliv laboratoři na zpracování spermatu. Schulze et al. (2016) navrhuje používání

antimikrobiálních peptidů jako účinnou náhradu za antibiotika. Antimikrobiální peptidy jsou složeny z krátkých sekvencí aminokyselin (10-50 pb). Jsou součástí vrozeného imunitního systému vyšších organismů. Vykazují silnou aktivitu proti široké škále mikroorganismů, hub, virů a parazitů, mají imunomodulační účinky a působí jako chemokiny (podporují hojení ran). Vzhledem k tomu, že tyto peptidy způsobují nescifickou lýzu membrán bakteriálních buněk, je při jejich použití podstatně menší pravděpodobnost vzniku rezistence (Mohan et al. 2023). To naznačuje, že by antimikrobiální peptidy mohly být dobrou alternativou ke konvenčním antibiotikům u drůbeže (Mohan et al. 2023), hřebců (Malaluang et al. 2021) a kanců (Hensel et al. 2020).

Další z možností může být použití nanočástic oxidu železitého (Fe_3O_4) (Hensel et al. 2020). U kančího spermatu byl prokázán mírný antibiotický účinek bez nepříznivých účinků na vlastnosti spermií. Naproti tomu u berana sice částice nebyly toxické pro spermie, ale nevykazovaly požadovaný antibiotický účinek. Kombinace nanočástic stříbra a oxidu železa vyvolala větší antibakteriální účinek než oxid železa, ale vykazovala vyšší spermatotoxicitu (Morrell et al. 2022).

Antioxidanty

Antioxidanty jsou molekuly, které inhibují tvorbu ROS a peroxidaci lipidů (Ugur et al. 2019). Specifická buněčná struktura spermií a jejich plazmatická membrána, velký počet mitochondrií, malý objem cytoplazmy a nízký obsah antioxidantů v cytoplazmě, činí spermie náchylnými k poškození volnými radikály. Proto se využívá přídavek vhodných antioxidantů k ředidlům spermatu, aby se snížilo oxidační poškození během zmrazování a rozmrazování spermií (Büyüklebici et al. 2014).

Existují 2 typy antioxidantů: enzymatické antioxidanty a neenzymatické antioxidanty. Mezi enzymatické antioxidanty patří glutathionperoxidáza, glutathionreduktáza, superoxidodismutáza a kataláza. Všechny jsou účastníci přirozeného antioxidačního obranného systému spermií (Amidi et al. 2016). Superoxidodismutáza, glutathionperoxidáza a kataláza jsou dobře známé antioxidanty, které jsou významné pro funkci spermií. Glutathion (GSH) je silný antioxidant, který chrání býčí spermie před volnými kyslíkovými radikály a doplňuje buvolí semeno o zvýšenou pohyblivost GSH, integritu plazmatické membrány a životaschopnost buněk (Ugur et al. 2019).

Neenzymatické antioxidanty, nebo také syntetické antioxidanty, zahrnují například kyselinu askorbovou, vitamin E, karotenoidy, ubichinony, taurin, selen a zinek (Amidi et al. 2016).

3.3.1.1.2 Typy ředidel

V průběhu posledních 60 let se kryoprotektivní média používaná ke zředění spermatu pro skladování spermatu průběžně upravovala, ale základní složky médií zůstaly nezměněny. Vaječný žloutek nebo mléko a glycerol představují nepostradatelné složky prakticky všech médií používaných pro uchování spermií v tekutém nebo zmrazeném stavu. Vaječný žloutek a mléko, jakožto produkty živočišného původu, představují potenciální riziko kontaminace spermatu a jejich složení není v souladu s právními předpisy jednotné. V důsledku toho roste zájem o vývoj nových rozšiřujících přípravků, které neobsahují produkty živočišného původu

ke skladování spermatu. Je však obtížné najít náhradní složky za vaječný žloutek nebo mléko, protože mechanismy, které se podílejí na ochraně spermií pomocí vaječného žloutku a mléka proti poškození při skladování, chlazení a zmrazení zůstávají nejasné (Bergeron & Manjunath 2006).

Ředidla na bázi vaječného žloutku

Vaječný žloutek je nejběžnější volbou v ředidlech používaných pro kryokonzervaci. Složení žloutku je však variabilní, což ztěžuje výrobu standardizovaných kryokonzervačních ředidel. Kromě toho se při používání vaječného žloutku zvyšuje riziko mikrobiální kontaminace a zvyšuje se pravděpodobnost přítomnosti škodlivých metabolitů nebo endotoxinů, které mohou mít negativní vliv na životaschopnost spermií a motility (Miquel-Jimenez et al. 2020).

Nejvýznamnější roli vaječného žloutku v ředidle hrají proteiny s nízkou hustotou (LDL proteiny). Vykazují nejvyšší ochrannou schopnost a je pravděpodobné, že LDL proteiny jsou lepší v porovnání s celým vaječným žloutkem pro zachování pohyblivosti spermií po rozmrazení (Manjunath 2012). Býčí semenné vajíčky vylučují proteiny BSP, které tvoří přibližně 60 % celkových hovězích semenných plazmatických proteinů. Při ejakulaci se tyto proteiny přidávají ke spermiím, vážou se na cholinfosfolipidy membrány spermií a způsobují nepřetržitý úbytek cholesterolu a fosfolipidů z membrány spermií. Je známo, že spermie od druhů s nízkou hladinou cholesterolu v membránách spermií mají sníženou toleranci vůči chladovému šoku v porovnání se spermiemi od druhů s vysokou hladinou cholesterolu. Po nařazení spermatu ředidlem na bázi vaječného žloutku, LDL přítomné ve vaječném žloutku oddělují proteiny BSP a zabraňují jejich vazbě na membránu, čímž zabraňují stimulaci ztráty cholesterolu a fosfolipidů (Bergeron 2007). Toto bylo prokázáno i u krůt (Alkali et al. 2022).

Lipoproteiny, obvykle živočišného původu, jsou složkami ředidel. Nevýhody použití živočišných produktů v ředidlech, jsou však nedefinované složení těchto produktů a potenciál jako zdroj mikrobiální kontaminace. Je proto potřeba najít alternativu k vaječnému žloutku s definovatelnými složkami, která účinně zabraňuje chladovému šoku a minimalizují potenciál mikrobiální kontaminace (Yang et al. 2021). Pro zlepšení kvality zmrazeného byl v poslední době intenzivně zkoumán vztah mezi buněčnou membránou, semennou plazmou, ředidlem a teplotní křivkou. Přání nahradit vaječný žloutek ve ředidlech má různé důvody. Vaječný žloutek je jedním z nejlepších přírodních kryoprotektiv a je známo, že zabraňuje kapacitaci a předčasné akrozomové reakci u chlazených a zmrazených spermií. Složení vaječného žloutku se však liší. Kromě toho vaječný žloutek může obsahovat bakterie, mykoplasmy a viry, takže může být pro oplodnění nebezpečný (Schäfer-Somi et al. 2021).

Existuje hypotéza, že přidání vaječného žloutku různých ptačích druhů má vliv na zmrazitelnost spermií stabilizací jejich plazmatických membrán v kritických teplotních zónách kryokonzervace. Ve studii Su et al. (2008) byl do býčího spermatu přidán vaječný žloutek od pěti různých druhů ptáků ve 20% koncentraci. Nejlepších výsledků bylo dosaženo přidáním holubiho vaječného žloutku ve srovnání s vaječnými žloutky slepice, křepelky, husy a kachny. Tyto výsledky byly potvrzeny i u beraního spermatu ve studii Gholami et al. (2012), kde měl holubí žloutek nejlepší výsledky v porovnání se slepičím, kachním a krůtím. Santiago-Moreno et al. (2012) zkoumal vliv vaječného žloutku slepice a křepelky na kohoutí spermie. Mezi nimi nebyl prokázán žádný významný rozdíl, u obou bylo dosaženo lepší kvality spermatu po rozmrazení. Zároveň však v porovnání se spermatem bez vaječného žloutku byla pozorována

výrazně snížená plodnost. To naznačuje, že vaječný žloutek může mít v reprodukčním traktu slepice antikoncepční účinek.

Ředidla na bázi mléka

Pro uchování spermií je možné použít ředidlo na bázi odstředěného či plnotučného mléka. Sperma v něm může být skladováno při 48 °C nebo v případě přídavku glycerolu zamrazeno. Vzhledem k tomu, že odstředěné mléko (které neobsahuje lipidy) je stejně účinné jako plnotučné mléko při ochraně spermií během skladování spermatu při 48 °C nebo během kryokonzervace, nezdá se, že by lipidy byly složkou odpovědnou za ochranu poskytovanou mlékem (Bergeron & Manjunath 2006).

Nejvíce chránící složkou mléka jsou pravděpodobně kaseiny. Jedná se o hlavní bílkoviny mléka. Ty jsou uspořádány ve velkých shlucích nazývaných micely. V zásadě jsou kaseinové micely tvořeny hydrofobním jádrem alfa a beta obklopenými kaseiny (Bergeron et al. 2007; Manjunath 2012).

Bylo prokázáno, že kaseinové micely izolované z mléka mohou chránit hřebčí, kozlí, beraní a býčí spermie během skladování při teplotě 4-58 °C. Kromě toho mohou kaseinové micely chránit býčí spermie během zmrazování, pokud je přidán glycerol. Mechanismus, kterým kaseinové micely chrání spermie během skladování, však nebyl vysvětlen. Navíc přídavek laktózy do ředidla obsahující kasein zlepšil účinnost ředidla během zmrazování býčích spermií. Zdá se tedy, že laktóza se také podílí na ochraně spermií. Mléčný filtrát, který obsahuje pouze laktózu a minerální látky, však k ochraně spermií hřebců během skladování nestačí. Stejně tak dialyzát odstředěného mléka nestačil k ochraně býčích spermií během kryokonzervace a k ochraně spermií byla nutná přítomnost nedialyzovatelné frakce odstředěného mléka. Laktóza je také běžnou součástí ředidel na bázi vaječného žloutku používaných ke zmrazování kančích a hřebců. Zdá se tedy, že laktóza zlepšuje účinnost ředidla, ale nestačí k ochraně spermiím sama o sobě (Bergeron & Manjunath 2006).

Ředidla na bázi sójového lecitinu

Sója obsahuje, stejně jako vaječný žloutek, velký podíl LDL. U sóji jsou tyto proteiny nazývány sójový lecitin. Sójový lecitin se ukázal jako účinná náhražka vaječného žloutku pro jeho neživočišný původ. Jedná se o přírodní směs fosfatidylcholinu a několika mastných kyselin, jako je stearová, olejová a palmitová, která propůjčuje buněčným membránám strukturální stabilitu (Miquel-Jimenez et al. 2020; Alkali et al. 2022).

Sójový lecitin je náhradou za vysokomolekulární proteiny a fosfolipidy, který může snížit hygienická rizika v ředidlech a může zabránit poškození plazmatické membrány spermií během ředění, chlazení a kryokonzervace (Sun et al. 2020).

El-Sisy et al. (2016) zkoumali vliv koncentrací sójového lecitinu v ředidlech býčího spermatu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s 1% a 1,5% koncentrací sójového lecitinu bez jakýchkoliv škodlivých účinků na kvalitu spermatu po zchlazení a po rozmrazení. Vyšší koncentrace jsou pro býčí spermie škodlivé a mají toxický účinek na spermie během kryokonzervace a způsobují snížení pohyblivosti a životaschopnosti spermií. Studie Alkali et al. (2022) porovnávala vliv ředidla na bázi sójového lecitinu a na bázi vaječného žloutku na parametry krocaních spermií. Výsledky ukázaly, že mezi těmito variantami nebyl prokázán významný rozdíl. Je prokázáno, že sójový lecitin může být dostatečnou alternativou

vaječného žloutku u kozlů (Salmani et al. 2013), beranů (Forouzanfar et al. 2010), hřebců (Papa et al. 2010).

Další alternativy k vaječnému žloutku

V současné době se použití lipozomů v mrazících médiích jeví jako účinná alternativa ředidel spermatu na živočišné bázi. Lipozomy obsahují optimální složení a koncentraci fosfolipidů, které zajišťují ochranu buněk během kryokonzervace a nejsou přenašečem infekčních agens (Miquel-Jimenez et al. 2020).

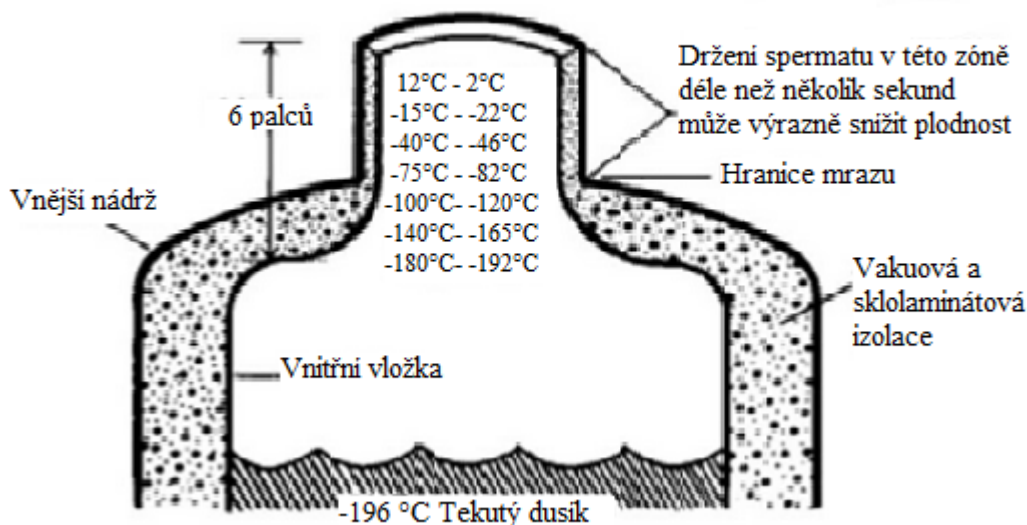
Byly vyvinuty postupy extrakce lipoproteinů s nízkou hustotou z vaječného žloutku, které mají prokazatelně ochranný účinek na spermie (Anand et al. 2015). Výhodou LDL ředidla oproti standartnímu ředidlu na bázi vaječného žloutku je, že má přesně definované složení (Vera-Munoz et al. 2009).

3.3.2 Dlouhodobá konzervace

Postup, který umožňuje stabilizovat buňky při kryogenních teplotách, se nazývá kryokonzervace. Mnoho pokroků v technologii kryokonzervace vedlo k vývoji metod, které umožňují nízkoteplotní udržování různých typů buněk, včetně samčích i samičích gamet (Di Santo et al. 2012). Kryokonzervace spermií představuje mocný nástroj pro konzervaci genetických zdrojů a pro adekvátní genetický management populací v zajetí i volně žijících populací. Spermie byly poprvé úspěšně kryokonzervovány před více než 50 lety a brzy poté byly použity při umělé inseminaci skotu. Výhody použití konzervace se týkají možnosti uchování gamet z geneticky cenných zvířat, zabránění možnému přenosu infekčních chorob a usnadňují výměnu genetického materiálu mezi subpopulacemi zvířat (Roldan & Gomendio 2009).

Současná práce v mnoha laboratořích se snaží porozumět mnoha faktorům, které ovlivňují úspěšnou kryokonzervaci u různých druhů. Mezi oblasti, kterým je věnována pozornost patří složení pufru, chladicí křivky, typ a expozice kryoprotektivním činidlům a rychlost zmrazování a rozmrazování (Roldan & Gomendio 2009).

V současné době je ejakulát zmrazován buď v 0,25 ml nebo v 0,5 ml pejetách a skladován v kapalném dusíku při -196°C . Kromě toho, že pejety usnadňují výrobu inseminační dávky, její označování, skladování a přepravu, zajišťují také jednotnější postupy při zmrazování a rozmrazování, což v konečném důsledku vede ke zlepšení regenerace spermií po rozmrazení. Velkou nevýhodou pejet je však jejich náchylnost k nesprávnému zacházení, 0,25 ml pejety mají ve srovnání s pejetami 0,5 ml velký poměr povrchu a objemu, což je činí náchylnější k rychlým teplotním výkyvům. Proto pro je doporučeno, aby přesun 0,25 ml pejet z jedné nádrže s tekutým dusíkem do druhé nebo do rozmrazovací nádrže trval maximálně 3 sekundy. Rozmrazování zmrazeného spermatu by mělo probíhat maximální rychlostí. Rychlé rozmrazování snižuje škodlivé účinky rekrystalizace a rehydratace vody, a tím zabraňuje poškození membrány a cytoplazmy spermií. Kritická teplotní zóna pro tvorbu ledových krystalů je mezi -50°C a 0°C , viz obr. 3. Rychlá progresse touto teplotní zónou znamená, že sperma přechází ze skelného do tekutého stavu a ledové krystaly nemají dostatek času na vytvoření (Diskins 2019).



Obrázek 3 Průměrná teplota v různých hloubkách v nádrži se spermatem (převzato z South Dakota State, 2023).

Konzervace hlubokým chladem se u kance využívá zřídka, neboť kvůli nízkému obsahu fosfolipidů v membráně spermií bývá její výsledek neuspokojivý. Poškození spermií hlubokým chladem navíc následně vyžaduje intrauterinní depozici inseminační dávky, pro kterou je nutno používat speciální inseminační pipety, které celý proces prodrazují (Kos et al. 2019).

Zmrazitelnost spermatu se u jednotlivých hřebců liší a spermie jednotlivých hřebců nesnášejí zmrazování a rozmrazování do takové míry, která umožňuje jejich použití v komerčních programech umělé inseminace. Krátká životaschopnost kryokonzervovaného koňského spermatu a dlouhé trvání říje u klisny dále brání širokému použití zmrazeného spermatu. Na rozdíl od situace u skotu tedy zmrazené sperma nenahradilo chlazené sperma u koní (Aurich 2012).

Kryokonzervace semene ptáků nebyla tak úspěšná jako kryokonzervace spermatu savců. Jedinečné fyziologické vlastnosti kohoutího spermatu ho činí náchylným k poškození během kryokonzervace, což vede k menšímu potenciálu plodnosti rozmrazeného spermatu. Během kryokonzervace má poškození, ke kterému dochází ve strukturálních, ultrastukturálních a biochemických vlastnostech spermií, za následek sníženou pohyblivost spermií a jejich životaschopnost. Poškození je většinou připisováno tvorbě ledových krystalů v kryokonzervačním médiu, což způsobuje ztrátu životaschopnosti spermií. Mezi různými strukturami ledu, které se vytvářejí v ředidle, je hexagonální struktura nejškodlivější a způsobuje většinu poškození spermií (Askarianzadeh et al. 2018). Proces je doprovázen teplotním šokem vedoucím k narušení plazmatické membrány spermií a snížení pohyblivosti a životaschopnosti spermií, což může potenciálně snížit potenciál plodnosti (Zong et al. 2022)

Kryoprotektiva

Proces kryokonzervace zahrnuje několik kroků: odběr spermatu, přidání kryoprotektiva, buněčnou dehydrataci, zmrazení, skladování v tekutém dusíku a rozmrazení před použitím spermatu (Lin et al. 2023).

Dlouhodobějšího skladování spermatu je dosaženo kryokonzervací. Kryokonzervace zachovává plodný život spermatu prakticky neomezeně, ačkoli velká část jednotlivých spermií nepřežije značný stres zmrazování a rozmrazování. Aby spermie zmrazení přežily, potřebují být rozšířeny v ředidle, které obsahuje nejen látky, které je chrání před chladovým šokem, ale také kryoprotektanty, jako je glycerol, které je chrání před zhoubnými následky zmrazení (Nakes et al. 2001). Kryoprotektanty jsou chemické sloučeniny, které chrání buňky před poškozením při kryokonzervaci (Lin et al. 2023).

Zpočátku, když teplota vnějšího média klesne pod bod mrazu, začnou se tvořit krystaly čisté vody. Koncentrace rozpuštěných látek v nezmrazené části média, proto stoupá a v důsledku toho se zvyšuje i jeho osmotický tlak. Krystalky ledu v této fázi nepronikají do buňky, protože jsou vyloučeny buněčnou membránou. Intracelulární obsah tak prochází obdobím ochlazování, během něhož buňka ztrácí vodu do nezmražené části extracelulárního prostředí osmózou. Následují různé stupně dehydratace buňky, která je ukončena tvorbou intracelulárních ledových krystalků. K poškození buněk tak může dojít jedním ze dvou způsobů. Pokud dojde ke značnému stupni dehydratace buněk, může dojít k poškození vlivem vysokých koncentrací rozpuštěných látek ve zbytkové intracelulární vodě, zatímco pokud dojde pouze k mírné dehydrataci, mohou se uvnitř buňky vytvořit velké krystalky ledu, které způsobí fyzické poškození jejich intracelulárních i extracelulárních membrán. Stupeň, v jakém každý z těchto faktorů ovlivňuje buňku, je určen rychlostí ochlazování – čím pomalejší je, tím větší je dehydratace, čím rychlejší je, tím větší je poškození tvorbou ledu, - a velikostí buňky, takže čím větší je buňka, tím pomalejší je její vlastní rychlost dehydratace. Kryoprotektivní látky mohou buď pronikat do buňky, nebo zůstat mimo ni, ale obě působí vazbou vody, a proto mění dostupnost vody buď pro dehydratační ztráty, nebo pro tvorbu ledových krystalů (Nakes et al. 2001).

3.3.2.1 Penetrující kryoprotektiva

Penetrující kryoprotektiva (glycerol, dimethylsulfoxid, ethylenglykol propylenglykol) způsobují přeuspořádání membránových lipidů a proteinů, což má za následek zvýšenou fluiditu membrány, větší dehydrataci při nižších teplotách, snížení tvorby intracelulárního ledu a zvýšení přežití kryokonzervace. Navíc penetrační kryoprotektiva jsou rozpouštědla, která rozpouštějí cukry a soli v kryokonzervačním médiu (Barbas & Mascarenhas 2009).

Glycerol, intracelulární kryoprotektant, je nejčastěji používaný v ředidlech spermatu u většiny druhů zvířat. Tento konvenční kryoprotektant zabraňuje intracelulární krystalizaci. Náhlý pokles teploty z + 5 °C na - 196 °C snižuje integritu membrány a zvyšuje permeabilitu. Tento šok je chráněn glycerolem (Rehman et al. 2013). Je však spojen s nežádoucími cytotoxickými účinky na spermie, které mohou ovlivnit biologické vlastnosti spermií a jejich plodnost u různých druhů, včetně lidí, myší, oslů, koní, prasat, ovcí a vačnatců. Aby se zabránilo cytotoxickým účinkům, několik studií navrhlo alternativy ke glycerolu během procesu

kryokonzervace. Tyto alternativy však stále postrádají slibné výsledky, pokud jde o úspěšnost oplodnění nebo nesplňují bezpečnostní požadavky a jasnou identifikaci potřebnou pro kryobankování (Lin et al. 2023). Další strategie souvisí s odstraněním glycerolu před inseminací. Přidání a odstranění permeabilního kryoprotektiva však vede ke zvýšení osmotického tlaku na plazmatickou membránu, což vyvolává potencionální poškození buňky (Gloria et al. 2019). Dle Lin et al. (2023) je málo známo o mechanismech, které se podílejí na toxicitě glycerolu, a to buď přímo na biologii spermií, nebo prostřednictvím modifikací samičího genitálního traktu.

Dle Barbas & Mascarenhas (2009) je využívána řada jiných kryoprotektorů, jmenovitě dimethylsulfoxid, ethylenoglykol, albumin, vysoké koncentrace cukrů různých typů, kompatibilní soluty (prolin, glycin, betain, taurin) a nemrznoucí proteiny z polárních ryb, ale nejlepší výsledky bylo vždy dosaženo s glycerolem.

U drůbeže může přítomnost glycerolu významně snížit plodnost, a to i při poloviční koncentraci, než je koncentrace používaná pro kryokonzervaci. Během výroby a použití kryokonzervovaného drůbeží inseminační dávky je sperma vystavené různým teplotám: 4 °C během přidávání glycerolu a ekvibrace, na -196 °C během zmrazování a zchlazování, návrat na 4 °C během rozmrazování a nakonec až 41 °C při inseminaci do samičího reprodukčního traktu. I když je tato metoda poměrně účinná, přítomnost glycerolu při 4 °C i při 41 °C může mít přímý vliv na biologii spermií. Kromě jejich cesty do vejcovodu, může glycerol zhoršit migraci a ukládání spermií do tubulů pro ukládání spermií (SST). SST jsou struktury nalezené v distální polovině vejcovodu všech dosud studovaných ptačích druhů, který hraje roli při výběru spermií, přežití a udržování oplození schopnosti. Je podobný rezervoáru spermií ve vejcovodech savců. Nedostatek ukládání spermatu v SST a jeho uvolňování do oocytu ve vejcovodu může narušit celkovou plodnost. Kromě toho toxické účinky mohou také zhoršit schopnost spermií pronikat vnitřní perivitellinní membránou u ptáků, což je analogie savčí zona pellucida. To může mít za následek selhání oplodnění (Donoghue & Wishart 2000; Lin et al. 2023).

Mezi nejvíce využívané penetrující kryoprotektiva používané u drůbeže patří DMA (Mehaisen et al. 2022) a NMA (Petričáková et al. 2022).

Další skupinou propustných kryoprotektantů jsou amidy, zejména methylformamid a dimethylformamid. Hlavní výhodou amidů ve srovnání s glycerolem je menší osmotické poškození díky nižší molekulové hmotnosti amidů. Přesto se účinky zahrnutí amidů do zmrazovacího média mezi druhy liší kvůli různé odolnosti spermií vůči kryokonzervaci (Yanez-Ortiz 2022).

3.3.2.2 Nepenetrující kryoprotektiva

Zájem o nepenetrující kryoprotektanty pro uchovávání spermatu výrazně stoupá. Nepenetrující kryoprotektiva jsou vysokomolekulární sloučeniny, jako jsou polymery, cukry, proteiny a aminokyseliny, které modulují intracelulární tvorbu ledových krystalů a stabilizují intracelulární koncentrace rozpuštěných látek během podmínek, při kterých je koncentrace rozpuštěných látek v prostředí nižší než uvnitř buňky (Gloria et al. 2019). Díky neschopnosti difundovat přes plazmatickou membránu vytvářejí tyto látky osmotický tlak, který snižuje teplotu tuhnutí média a snižuje tvorbu extracelulárního ledu. Působí tedy především jako

osmoprotektanty. Mezi často využívané disacharidy patří sacharóza a trehalóza (Mosca et al. 2016).

Nepenetrující kryoprotektivum (vaječný žloutek, odtučněné odstředěné mléko, trehalóza, aminokyseliny, dextransy, sacharóza) neprochází plazmatickou membránou a působí pouze extracelulárně. Proto může nepenetrující kryoprotektant změnit plazmatickou membránu nebo působit jako rozpuštěná látka, snižovat teplotu tuhnutí média a snižovat tvorbu extracelulárního ledu (Barbas & Mascarenhas 2009).

4 Metodika

4.1 Zvířata zařazená do experimentu

Ejakulát použitý v experimentu byl odebírán od čtyř kohoutů plemene Česká zlatá kropenatá slepice. Kohouti byli chováni v Demonstrační a pokusné stáji České zemědělské univerzity v Praze v kontrolovaných podmínkách individuálních klecí. Teplota vzduchu byla udržována na 20 °C a vlhkost vzduchu se udržovala na 50-60 %. Kohouti byli po celou dobu trvání experimentu krmeni komplexní krmnou směsí vyrobenou na míru pro Českou zemědělskou univerzitu firmou Sehnoutek a synové s.r.o. *ad libitum*. Přístup k čerstvé vodě měli též *ad libitum*.

Česká zlatá kropenatá slepice je jediným původním českým plemenem slepic zařazeným do genových zdrojů, jehož cílem je zachování genetických zdrojů původních plemen v České republice pomocí reprodukčních biotechnologií. Z toho důvodu byli zařazeni do experimentu.

4.2 Odběr ejakulátu

Ejakulát byl odebírán během ledna 2022 vždy v 8 hodin ráno stejným pracovníkem pomocí dorzo-abdominální masáže (Burrows a Quinn 1935). Vzorky byly odebírány po dobu 5 dní a mezi odběry byl interval 2-3 dní. Po odběru byl ejakulát skladován při 5 °C až do zpracování.

4.3 Zpracování ejakulátu a výroba inseminační dávky

Po odběru byl ejakulát přepraven do reprodukční laboratoře Katedry chovu hospodářských zvířat FAPPZ k dalšímu zpracování. Použity byly vzorky pouze bez výrazného znečištění, jako je například příměs krve či trusu. Jednotlivé vzorky byly po stanovení koncentrace smíchány do směsného vzorku, u kterého byl stanoven objem. Na základě stanoveného objemu byl vzorek naředěn v poměru 1:1 komerčními ředidly NeXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, Francie), Poultry Media® (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) a Raptac® (AMP-Lab, GmbH, Německo). V dalším kroku byly vzniklé vzorky zředěny výše uvedenými ředidly na finální koncentraci plus minus 100 x 10⁶ spermií na 1 ml a ekvilibrovány při teplotě 5 °C po dobu 30 minut a obohaceny o kryoprotektivní látku. Na základě předběžných měření byl pro tyto účely zvolen N-methylacetamid v koncentraci 9 %.

Po ekvilibraci byly naředěné vzorky naplněny do plastových pejet o objemu 0,25 ml (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) a utěsněny těsnícím práškem (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Mrazení bylo prováděno v polystyrenovém mobilním mrazícím boxu (komerční mrazící box Minitube, GmbH). Nejprve byly pejety přesunuty na plovoucí rack a umístěny do par tekutého dusíku 5 cm nad hladinou po dobu 10 min. Poté byly ponořeny do tekutého dusíku (-196 °C) po dobu 10 min. Zmrazené inseminační dávky byly přemístěny do kryotanku (CD cryo diffusion, Francie). Potřeby nezbytné pro výrobu inseminačních dávek

jsou zobrazeny na obrázku č. 4. Rozmrazení inseminační dávky probíhalo ve vodě o teplotě 5 °C po dobu 1 minuty a 40 vteřin (Sasaki et al. 2010).

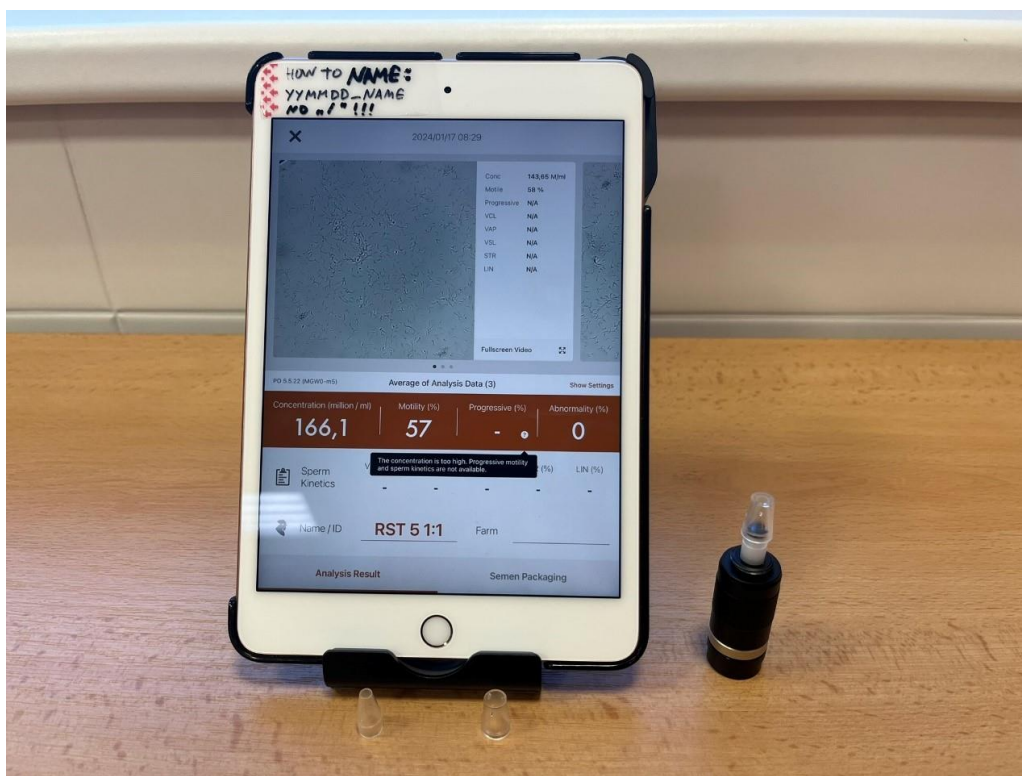


Obrázek 4 - Příslušenství k mrazení inseminačních dávek (a - polystyrenový mrazicí box, b - plnička pejet, c - těsnící prášek, d - pejety, e - nůž na pejety) (archiv autora).

4.4 Hodnocení ejakulátu pro výrobu inseminačních dávek

Ihned po odběru byl makroskopicky hodnocen objem, barva, zápach a obsah cizích příměsí. Znečištěný ejakulát byl automaticky vyřazen.

Po přesunu vzorků do laboratoře byly hodnoceny nejdříve pomocí zařízení CASA před ředěním pro stanovení koncentrace spermií v ejakulátu jednotlivých kohoutů a poté se vytvořil směsný vzorek. Po vytvoření vzorků naředěných jednotlivými ředidly, bylo použito 10 µl od každého vzorku pro hodnocení koncentrace a klíčového parametru spermií-celkové motility. Pro hodnocení těchto parametrů byla použita mCASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan) viz obrázek č. 5. Pomocí tohoto zařízení lze hodnotit ejakulát i v polních podmínkách.



Obrázek 5 - mCASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan) (archiv autora).

Použitá mCASA je vybavena následujícími parametry:

- optické rozlišení: 1-1 μm ,
- ohřívač: 37 ± 5 °C,
- optické rozlišení: 200 x.

Je vhodná k následujícím analýzám:

- celková motilita: 0 % - 100 % pro jakoukoliv koncentraci – optimální 30–60 mil/ml,
- progresivní motilita: 0 % - 100 % při koncentraci 10–75 mil/ml – optimální 30 - 60 mil/ml,
- koncentrace: 10-75 mil/ml – optimální 30–60 mil/ml.

Po rozmrazení bylo opět odebráno 10 μl pro hodnocení v mCASA. Poté byly vzorky vyhodnocené jako vhodné k inseminaci podrobeny další analýze pomocí průtokového cytometru (Novocyte 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, Californie, USA) viz obr. 6. Cytometr byl vybaven lasery emitující modré (488 nm), červené (640 nm) a fialové (405 nm) záření. Vzorky byly za tlumeného světla obarveny následujícími fluorescenčními barvivy:

- Hoechst-33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA),
- PNA-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA),
- PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA),
- MitoTracker Deep Red (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).



Obrázek 6 - Průtokový cytometr (Novocyte 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, Californie, USA) (archiv autora).

Po obarvení probíhala inkubace po dobu 10 minut ve tmě při teplotě 38 °C.

Pro hodnocení byl využit plate, ve kterém byly hodnoceny 3 jamky pro každou z variant vzorků (typ ředidla). V každé z jamek bylo použito:

- 100 μ l PBS (fosfátový pufr),
- 10 μ l master mixu složeným z výše uvedených barviv,
- 10 μ l rozmrazené inseminační dávky.

Takto připravený plate byl umístěn do průtokového cytometru pro následnou analýzu. Pro analýzu a sběr dat byl využit software NovoExpress, v 1.3.3 0 (Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA).

5 Statistická analýza dat

Statistická vyhodnocení byla provedena ve statistickém programu SAS (SAS/STAT, 2013). Analýza variance byla provedena za použití generalizované lineární model procedury. Jako závislé proměnné byly analyzovány parametry průtokové cytometrie a mCASA.

Statistické modely pro vyhodnocení parametrů průtokové cytometrie po ekvilibraci hodnocené v definovaném časovém intervalu jsou uvedeny níže:

$$1) \text{MOT}_{ijk} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + e_{ijk},$$

$$1) \text{PMI}_{ijk} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + e_{ijk},$$

$$2) \text{PMD}_{ijk} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + e_{ijk},$$

$$3) \text{ACR}_{ijk} = \mu + \text{DEN}_i + \text{EX}_j + e_{ijk},$$

kde MOT_{ijk} = celková motilita buněk po ekvilibraci, PMI_{ijk} = celková životaschopnost spermií, PMD_{ijk} = podíl spermií s poškozenou plazmatickou membránou po ekvilibraci, ACR_{ijk} = podíl spermií s poškozeným akrozomem po ekvilibraci; DEN_i = fixní efekt i -tého odběrového dne ($i = 1$. odběrový den, $n=5$; $i = 2$. odběrový den, $n= 17$; $i = 3$. odběrový den, $n = 12$; $i = 4$. odběrový den, $n = 18$; $i = 5$. odběrový den, $n = 18$); EX_j = fixní efekt přídatku j -tého ředidla ($j =$ přídatek ředidla Poultry media[®] + 9% NMA, $n = 15$; $j =$ přídatek ředidla Raptac[®] + 9% NMA, $n = 15$; $j =$ přídatek ředidla NeXcell[®] + 9% NMA, $n = 15$); e_{ijk} = residuální chyba.

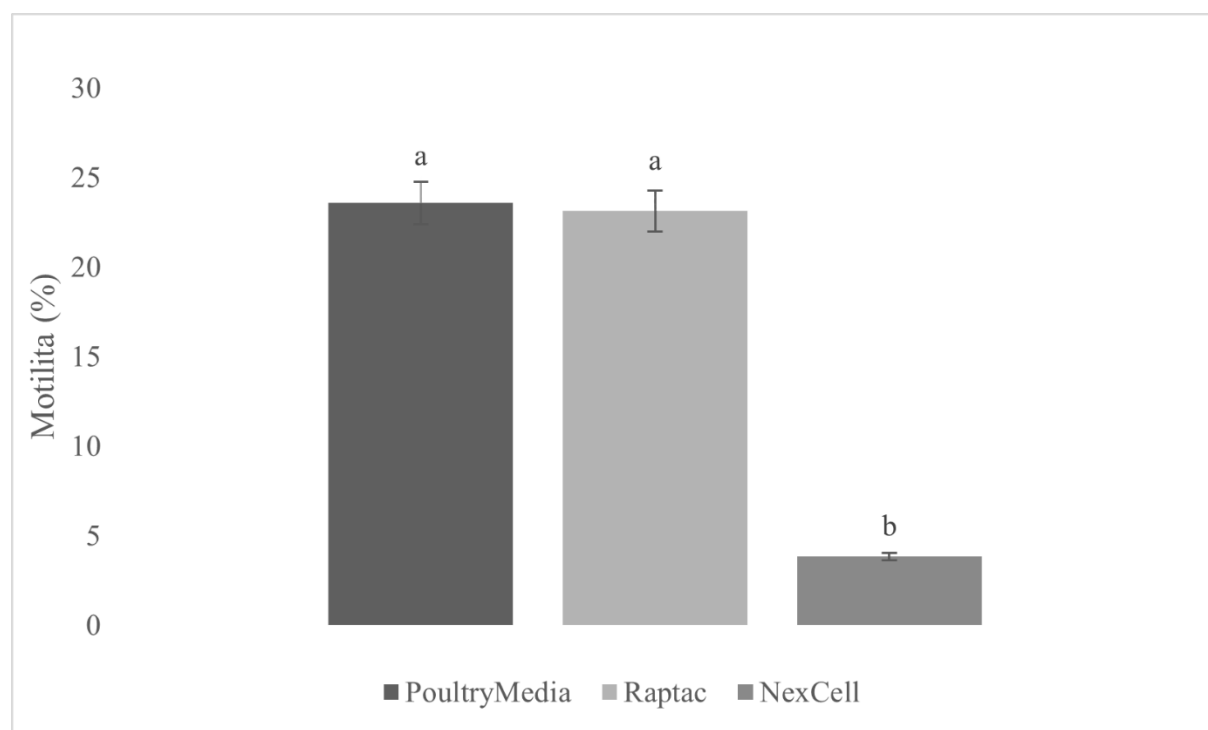
Statistické rozdíly mezi odhadnutými průměry byly detekovány na hladině významnosti $P < 0,05$.

6 Výsledky

6.1 Základní statistické parametry – mCASA

Před mrazením a půl hodiny po rozmrazení byly měřeny základní parametry pro celkovou motilitu pomocí mCASA. Celková motilita se měřila na 81 vzorcích. Celková motilita před zamrazením dosahovala průměrně 52,27 %. Po rozmrazení dosahovala u ředidla NeXcell[®] 3,84 % ± 2,41. Tento výsledek se statisticky výrazně lišil od zbylých dvou ředidel, viz graf č. 1. S přidavkem ředidla PoultryMedia[®] bylo dosaženo 23,58 % ± 2,41, což se statisticky výrazně nelišilo od ředidla Raptac[®] s 23,13 ± 2,41.

Graf 1 Celková motilita po rozmrazení.



6.2 Základní statistické parametry- průtokový cytometr

6.2.1 Procento životaschopných spermíí

6.2.1.1 Popis modelu

Proměnlivost ukazatele byla prokázána z 97,45 % ($P < 0,0001$). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv sledovaných faktorů: vliv odběrového dne ($P < 0,0001$) a vliv přidavku zvoleného ředidla ($P < 0,0001$).

6.2.1.1.1 Vliv odběrového dne

Během pokusu byl pozorován statisticky významný rozdíl v životaschopnosti po rozmrazení mezi jednotlivými odběrovými dny, viz. tabulka 1. První den byla naměřena nejvyšší životaschopnost, kdy byla po rozmrazení $42,79 \pm 1,29$. Statisticky nejhorší byl prokazatelně čtvrtý den, ve který životaschopnost dosahovala pouze $28,98 \pm 0,86$.

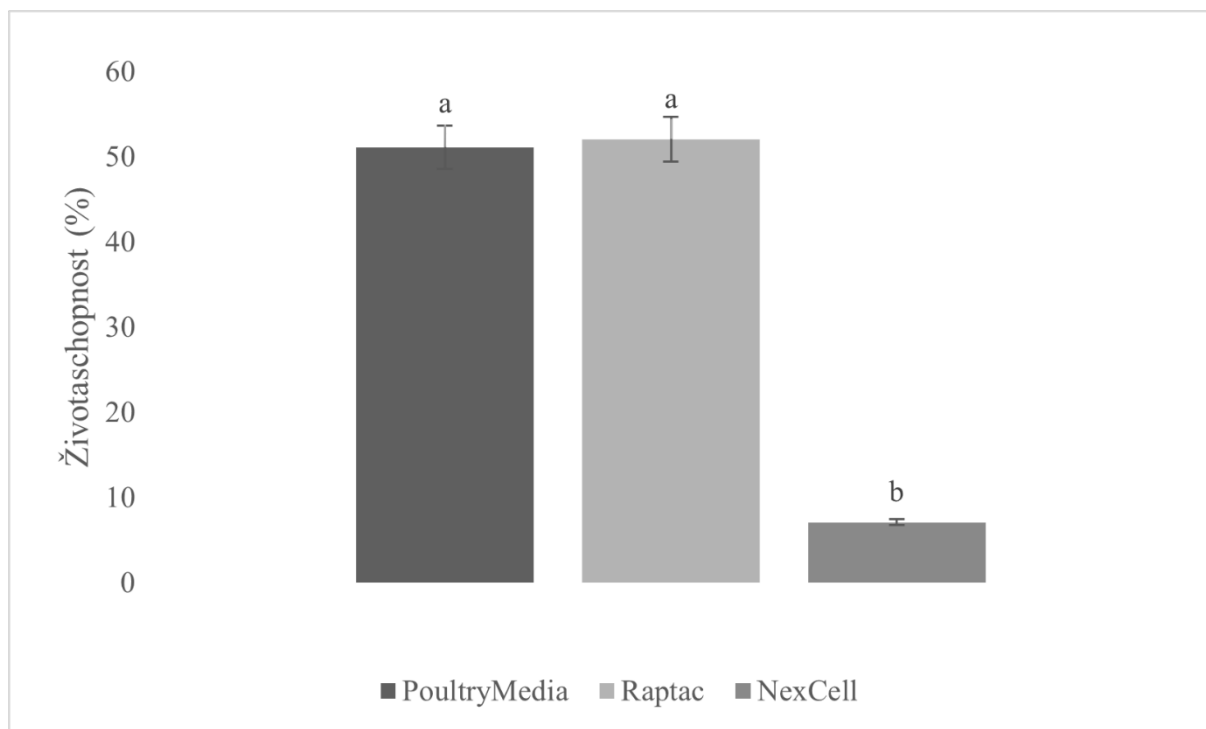
Tabulka 1 Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií po rozmrazení (PMI), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).

Odběrový den	PMI LSM [%] $\pm \sigma$	P < 0,05
1	42,9 \pm 1,29	1: 3, 4, 5
2	38,85 \pm 0,86	2: 4
3	35,80 \pm 0,86	3: 1, 4
4	28,99 \pm 0,86	4: 1, 2, 3, 5
5	37,30 \pm 0,86	5: 1, 4

6.2.1.1.2 Vliv ředidla

Na životaschopnost spermií po rozmrazení měla výrazný vliv volba ředidla. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi ředidly Raptac[®] a PoultryMedia[®]. U ředidla Raptac[®] bylo dosaženo $52,04 \% \pm 0,72$ a u ředidla PoultryMedia[®] $51,11 \% \pm 0,72$. Naproti tomu u přídatku ředidla NeXcell[®] byl prokázán statisticky významný vliv oproti prvním dvěma ředidlům. S tímto ředidlem bylo dosaženo pouze $7,07 \% \pm 0,72$, viz graf č. 2.

Graf 2 Vliv použitého ředidla na životaschopnost spermií po rozmrazení.



6.2.2 Zastoupení spermií s poškozenou plazmatickou membránou

6.2.2.1 Popis modelu

Proměnlivost ukazatele poškození plazmatické membrány byl průkazný z 96,75 % ($P < 0,001$) V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv sledovaných faktorů: vliv odběrového dne ($P < 0,001$) a vliv zvoleného ředidla ($P < 0,001$).

6.2.2.1.1 Vliv odběrového dne na poškození plazmatické membrány

Odběrový den měl vliv na poškození plazmatické membrány, viz tabulka 2. Nejmenšího poškození bylo dosaženo první odběrový den, který se statisticky významně lišil od zbylých dnů. V tento den bylo naměřeno poškození plazmatické membrány pouze $44,98 \% \pm 1,47$. Nejvyšší poškození bylo zaznamenáno třetí den, kdy bylo naměřeno $63,33 \% \pm 0,98$.

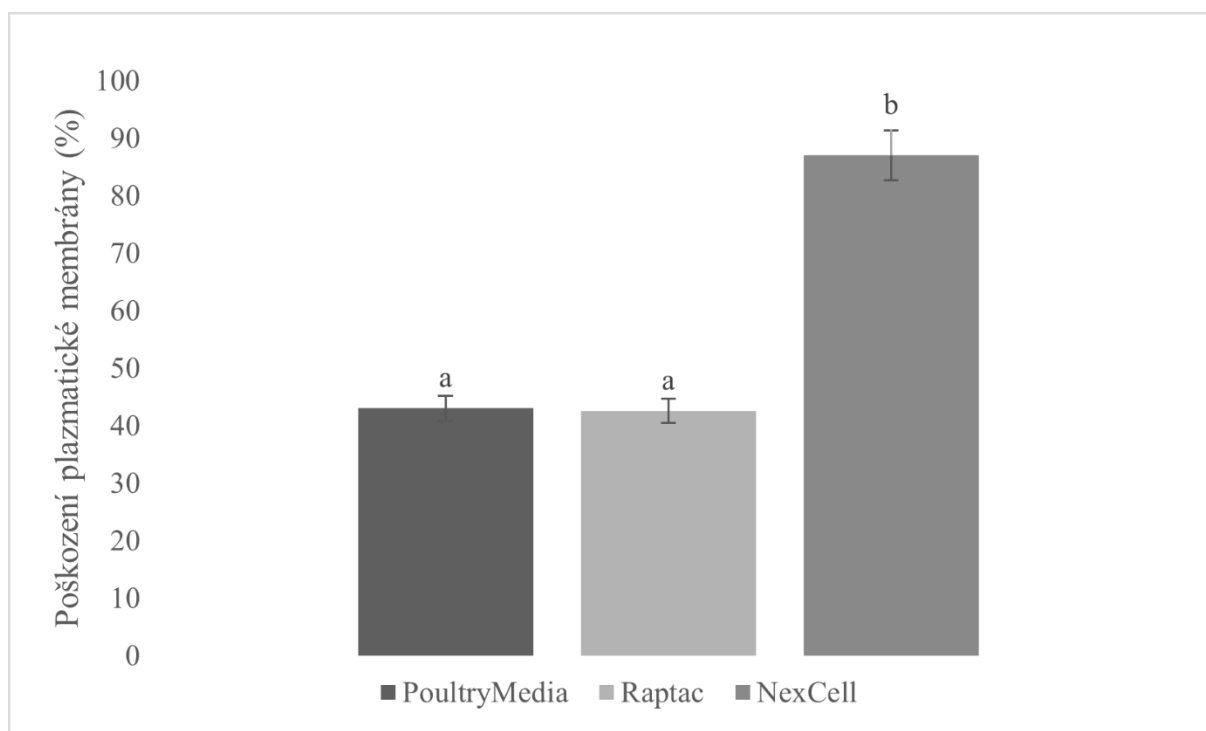
Tabulka 2 Vliv odběrového dne na poškození plazmatické membrány po rozmrazení (PMD), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).

Odběrový den	PMD LSM [%] $\pm \sigma$	P < 0,05
1 (n = 9)	44,98 \pm 1,47	1: 2-5
2 (n = 17)	58,80 \pm 0,98	2: 1, 2, 5
3 (n = 12)	63,33 \pm 0,98	3: 1, 2, 4
4 (n = 18)	59,23 \pm 0,98	4: 1, 3
5 (n = 18)	61,42 \pm 0,98	5: 1

6.2.2.1.2 Vliv ředidla na poškození plazmatické membrány

Použitím ředidla NeXcell[®] bylo zaznamenáno nejvyšší poškození plazmatické membrány a to $87,03 \% \pm 0,82$. Tím byl prokázán statisticky významný rozdíl oproti zbylým ředidlům. Nejmenší poškozením bylo naměřeno při použití ředidla Raptac[®], $42,57 \% \pm 0,82$, které se statisticky významně nelišilo od ředidla PoultryMedia[®] s $43,06 \pm 0,82$, viz graf č. 3.

Graf 3 Vliv použitého ředidla na poškození plazmatické membrány po rozmrazení.



6.2.3 Zastoupení spermií s poškozeným akrozomem

6.2.3.1 Popis modelu

Proměnlivost ukazatele poškození akrozomu byl průkazný z 95,4 % ($P < 0,001$). V modelové rovnici byl statisticky významný vliv odběrového dne ($P < 0,001$).

6.2.3.1.1 Vliv odběrového dne na poškození akrozomu

Největší procentuální zastoupení buněk s poškozeným akrozomem po rozmrazení bylo zaznamenáno čtvrtý odběrový den s $10,19 \% \pm 0,22$. Naopak nejmenšího poškození bylo dosaženo třetí odběrový den a to $0,25 \% \pm 0,22$. Tento den nebyl statisticky významně lepší než druhý a pátý den, viz tab. 3.

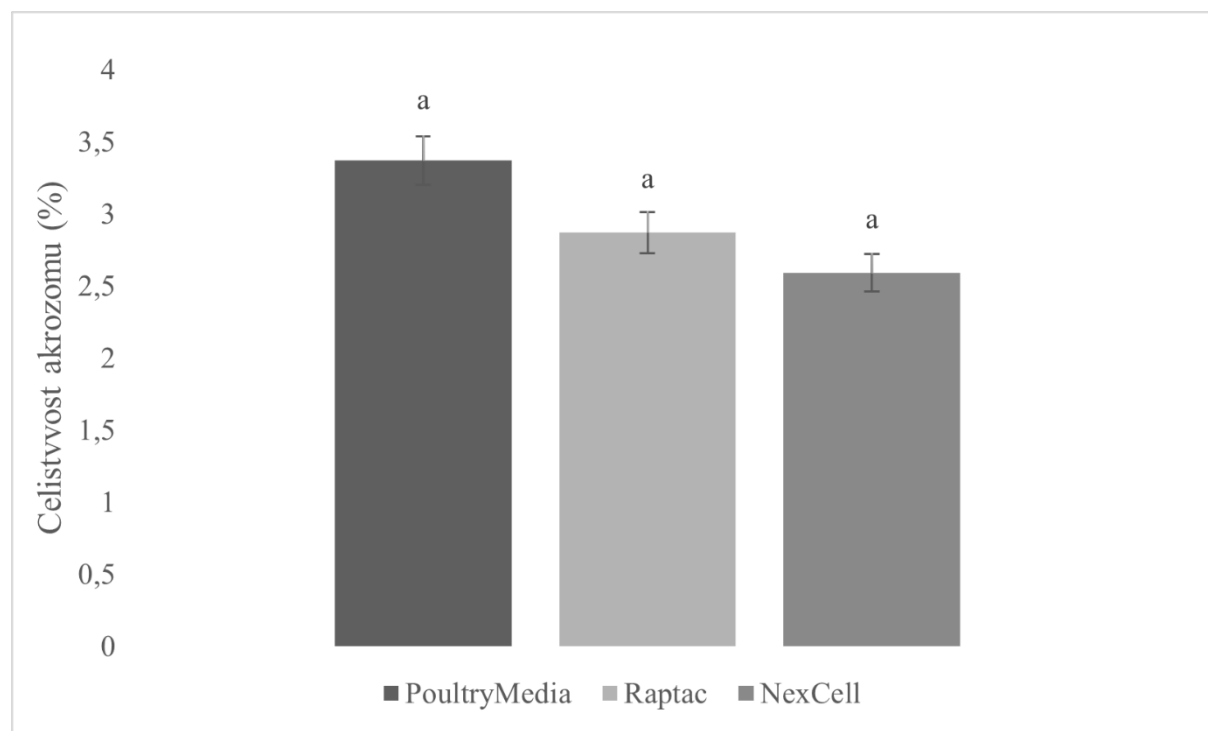
Tabulka 3 Vliv odběrového dne na poškození akrozomu po rozmrazení (ACRD), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).

Odběrový den	ACRD LSM [%] $\pm \sigma$	P < 0,05
1 (n = 9)	2,73 \pm 0,32	1: 2-5
2 (n = 17)	0,99 \pm 0,22	2: 1, 4
3 (n = 12)	0,25 \pm 0,22	3: 1, 4
4 (n = 18)	10,19 \pm 0,22	4: 1-3, 5
5 (n = 18)	0,56 \pm 0,22	5: 1, 4

6.2.3.1.2 Vliv ředidla na poškození akrozomu

Poškození akrozomu spermií po rozmrazení bylo nejvyšší u ředidla PoultryMedia[®] s $3,37\% \pm 0,18$. Naopak nejmenší poškození akrozomu bylo naměřeno u ředidla NeXcell[®] $2,59\% \pm 0,18$. Oba výsledky se statisticky významně nelišily od hodnot naměřených u ředidla Raptac[®] s $2,87\% \pm 0,18$, viz graf č. 4.

Graf 4 Vliv použitého ředidla na poškození akrozomu po rozmrazení.



7 Diskuze

Česká zlatá kropenatá slepice je tradičním českým plemenem kura, chovaným po staletí na našem území. V minulosti bylo toto plemeno velmi rozšířeným, avšak vlivem importu nových plemen v 19. století došlo k jeho ústupu. Díky úsilí nadšených chovatelů byla na přelomu 19. a 20. století obnovena jeho populace, včetně zlatého kropenatého rázu. Česká zlatá kropenatá je dnes zařazena do programu genových zdrojů, který chrání a udržuje genetickou rozmanitost ohrožených plemen. V rámci tohoto programu byl vypracován postup pro případnou regeneraci plemene, což zajišťuje jeho ochranu pro budoucí generace (dle zásad formulovaných v metodice schválené MZe). Současná produkce vajec i masa ve velkochovech spoléhá především na speciálně vyšlechtěné hybridy, a proto je dnes chov České zlaté kropenaté záležitostí především zájmových chovů.

Kryokonzervace je u některých druhů hospodářských zvířat běžnou technikou používanou rutinně a jsou již sestaveny funkční protokoly pro uchovávání spermií. U kohoutů tomu však tak není, a to především kvůli jedinečným vlastnostem drůbežího spermatu. Na rozdíl od savčích mají kohoutí spermie mnohem méně cytoplazmy a jsou tedy mnohem náchylnější na poškození, ať už vlivem oxidačního stresu, nebo při manipulaci s ejakulátem (Svoradová et al. 2021).

Úspěšnost kryokonzervace úzce souvisí s volbou ředidla spermatu. Výběr správného ředidla je tedy důležitým faktorem při optimalizaci procesu kryokonzervace (Thananurak et al. 2020). Mezi nejčastěji používaná ředidla u drůbeže patří Lake (Masoudi et al. 2019), BHSV (Blumberger Hahnen Sperma Verdünner; Thananurak et al. 2019) a Beltsville (Siari et al. 2021). Existují také komerčně dostupná ředidla pro krátkodobou konzervaci ejakulátu. Jejich velkou výhodou je dostupnost, nízká pořizovací cena, přesně definované složení a snadná manipulace, která výrazně snižuje chybovost lidského faktoru. Zároveň jsou jednoduše aplikovatelná v praxi (Petričáková et al. 2022).

Práce se zabývala porovnáním vlivu různých ředidel na kvalitu inseminační dávky. Pro potřeby experimentu byla zvolena komerční ředidla NeXcell[®], PoultryMedia[®] a Raptac[®]. Tato ředidla jsou určena pro krátkodobé uchovávání ejakulátu. Předpokladem bylo, že s ředidlem NeXcell[®] bude dosaženo nejlepších výsledků, neboť je obohaceno o antioxidanty, což by mělo zajistit lepší výsledky po rozmrazení. Tento předpoklad nebyl potvrzen. Po rozmrazení vzorky s přídatkem tohoto ředidla dosahovaly životaschopnosti pouze 7,07 % ± 0,72. Zároveň bylo u tohoto ředidla zaznamenáno nejvyšší procento poškození plazmatické membrány. Oproti Raptac[®] a PoultryMedia[®] byla hodnota poškození plazmatické membrány u NeXcell[®] téměř dvojnásobná, a bylo tedy naměřeno 87,03 % ± 0,82. Poškození akrozomu se u NeXcell[®] s hodnotou 2,59 % ± 0,18 statisticky významně nelišilo od ostatních hodnocených ředidel (P < 0,05).

Mezi ředidly PoultryMedia[®] a Raptac[®] nebyl v žádném pozorovaném parametru po rozmrazení prokázán statisticky významný rozdíl. Při použití ředidla PoultryMedia[®] bylo dosaženo 51,11 % ± 0,72 životaschopnosti spermií po rozmrazení a u Raptac[®] tomu bylo 52,04 % ± 0,72. Nejnižší hodnoty poškození plazmatické membrány bylo dosaženo s ředidlem Raptac[®], u kterého byla naměřena hodnota 42,57 % ± 0,82. Tato hodnota se statisticky nelišila od 43,06 % ± 0,82 s ředidlem PoultryMedia[®]. Poškození akrozomu bylo s ředidlem PoultryMedia[®] 3,37 % ± 0,18 a s ředidlem Raptac[®] 2,87 % ± 0,18.

V práci byl také porovnáván vliv odběrového dne na celkovou životaschopnost spermií a na poškození membrány a akrozomu. Nejlepších výsledků životaschopnosti spermií bylo dosaženo první odběrový den, kdy bylo naměřeno 42,79 % ± 1,29. Naopak nejhorší výsledky životaschopnosti byly získány čtvrtý odběrový den (28,98 % ± 0,86). Nejvíce buněk s poškozenou plazmatickou membránou bylo naměřeno třetí odběrový den (63,33 ± 0,98). Naopak v prvním odběrovém dni bylo získáno 44,98 % ± 1,47 spermií s PMD. Největší procentuální zastoupení buněk s poškozeným akrozomem bylo zjištěno čtvrtý odběrový den (10,19 % ± 0,22). Nejnižších hodnot poškození bylo dosaženo třetí odběrový den (0,25 % ± 0,22). Tyto výsledky naznačují, že odběrový den má vliv na kvalitu inseminační dávky.

Pro kryokonzervaci ejakulátu drůbeže dosud nebyla vyvinuta žádná standardizovaná ředidla, proto jsou využívána ředidla pro krátkodobé skladování obohacena o různá kryoprotektiva a antioxidační látky. Obecně nejlepších výsledků funkčních parametrů spermií po rozmrazení bylo dosaženo s přidavkem glycerolu (Abouelezz et al. 2015; Zong et al. 2022). Glycerol má paradoxně silný antikoncepční účinek v reprodukčním traktu slepice a značně snižuje pravděpodobnost oplodnění (Donoghue & Wishart 2000). Řešením může být mechanické odstranění glycerolu před inseminací, což může být ekonomicky náročné, těžko aplikované v běžné chovatelské praxi a způsobovat poškození buněk. Proto je snaha najít účinnou kryoprotektivní alternativu. U drůbeže jsou nejčastěji využívanými prostupujícími kryoprotektivy dimethylsulfidoxid (Rakha et al. 2018), dimethylacetamid (Madeddu et al. 2016), N-methylacetamid (Sasaki et al. 2010) a ethylenglykol (Svoradová et al. 2021). Z neprostupných kryoprotektiv lze zmínit např. trehalosu (Thananurak et al. 2020).

Zaniboni et al. (2022) porovnávali vliv přidavku DMA a NMA na kvalitu a plodnost kohoutích spermií. NMA i DMA vykazovaly podobný pozitivní účinek na kvalitu spermatu, plodnost však byla lepší s použitím NMA o koncentraci 2 %. Mosca et al. (2019) porovnával NMA a DMA v koncentracích 6 % a 9 %. Lepších výsledků *in vitro* hodnocených parametrů spermií dosáhl s DMA v koncentraci 6 %. Navzdory tomu lepší fertilizační schopnosti dosáhl s NMA v obou variantách koncentrace. Abouelezz (2015) dodává, že DMA má velmi škodlivý účinek na integritu akrozomu. Všechny tři studie (Abouelezz 2015; Mosca et al. 2019; Zaniboni et al. 2022) zároveň naléhají na snížení koncentrací vzhledem k specifickým toxickým účinkům kryoprotektiv na integritu a plodnost spermatu a vývoj embrya. V našem experimentu byla zvolena jako kryoprotektivní látka NMA o 9 % koncentraci na základě předběžných výsledků a na základě Sasaki et al. (2010).

Dalším faktorem, který má vliv na kvalitu inseminační dávky je poměr ředění spermatu. Správně zvolený poměr ředění může optimalizovat koncentraci a minimalizovat negativní účinky kryokonzervace. Pro kryokonzervaci drůbežního spermatu se obvykle doporučuje poměr ředění 1:1 až 1:4 (Zong et al. 2023). Ředění v poměru 1:1 bylo doporučeno ve studiích Blesbois et al. (2008), Sasaki et al. (2010) a Blanch et al. (2014). Ředění 1:1 bylo v našem experimentu využito jako předředění. Následné druhé ředění bylo na požadovanou koncentraci.

Rychlost mrazení představuje další faktor, kterým lze ovlivnit kvalitu ID. U kohoutů se obvykle jedná o pomalé mrazení. Pejety s ejakulátem doplněným o vybrané ředidlo a kryoprotektivum jsou položeny vodorovně v parách tekutého dusíku (5 cm nad hladinou) po dobu 15 minut (-125 až -130 °C) a následně ponořeny do tekutého dusíku (Svoradová et al. 2021). Madeddu et al. (2016), který porovnával výšku mrazení v parách

tekutého dusíku od 1 do 10 cm, doporučuje pro zachování optimální životaschopnosti volit výšku od 1 do 5 cm. V kombinaci s přídatkem 11 % glycerolu doporučuje studie Wu et al. (2020) mrazení ve výšce 6 cm nad hladinou tekutého dusíku.

Diskutovaným tématem je i způsob rozmrazení inseminačních dávek. Miranda et al. (2017) doporučují rozmrazování inseminačních dávek při teplotě 5 °C. Ve studii Murugesan & Mahapatra (2020) byly pozorovány výrazně lepší parametry spermií po rozmrazení při teplotě 37 °C než při 5 °C. Rozdílný výsledek těchto dvou studií může být vysvětlen použitím jiných kryoprotektivních látek.

Hlavní hypotézou práce byl předpoklad, že přídatkem modifikovaných ředidel pro kryokonzervaci pohlavních buněk pozitivně ovlivní motilitu a životaschopnost spermií v inseminačních dávkách po rozmrazení. Tato hypotéza nemohla být jednoznačně potvrzena ani vyvrácena, protože na kvalitu inseminační dávky působí mnoho faktorů včetně individualita jedince, odběrový den, poměr ředění, použité kryoprotektivum a způsob mrazení a rozmrazení. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s ředidly Raptac[®] a Poultry Media[®] s přídatkem 9 % NMA.

8 Závěr

Česká zlatá kropená slepice je jediným původním českým plemenem drůbeže zařazeným do genových zdrojů. Tento druh je zároveň součástí záchranného programu. Z tohoto důvodu je zásadní zajistit dostatečnou genetickou diverzitu. K tomuto účelu se nabízí využití reprodukčních technologií, zejména umělá inseminace a kryokonzervace inseminačních dávek. V současné době bohužel neexistuje standardizovaný postup pro kryokonzervaci spermatu kohoutů.

Cílem diplomové práce bylo porovnat vliv různých typů ředidel na kvalitu inseminační dávky. V experimentu byl zkoumán vliv tří různých komerčních ředidel (PoultryMedia[®], Raptac[®] a NeXcell[®]). U vzorků byla hodnocena celková motilita, životaschopnost spermií, poškození plazmatické membrány a poškození akrozomu buněk po rozmrazení. Tyto parametry poskytují komplexní pohled na vlastnosti spermií a umožňují objektivní hodnocení účinnosti vybraných ředidel. Jsou klíčové pro posouzení celkové kvality inseminační dávky. Pro vyhodnocení vybraných parametrů byla použita mCASA a průtokový cytometr.

Inseminační dávky doplněné o ředidla Poultry Media[®] a Raptac[®] dosahovaly nejlepších výsledků celkové motility a životaschopnosti, přičemž mezi těmito ředidly nebyl pozorován statisticky průkazný rozdíl. Naopak, u ředidla NeXcell[®] byly zaznamenány nejvyšší hodnoty poškození plazmatické membrány.

Pro dosažení úspěšné kryokonzervace spermatu kohoutů je nezbytné zaměřit se na optimalizaci kryokonzervačních protokolů a vyvinutí efektivního ředidla. Budoucí výzkum by měl směřovat k nalezení ideálního kryoprotektiva a stanovení jeho optimální koncentrace. Zároveň je důležité nadále testovat další aditiva do ředidel, například antioxidanty, pro snížení oxidačního stresu a zlepšení kvality spermií po rozmrazení. Sestavení funkčního protokolu včetně vytvoření efektivních ředidel by mohlo vést k výraznému zlepšení úspěšnosti umělé inseminace a přispělo by k udržení genetické rozmanitosti v rámci genových zdrojů.

9 Literatura

Abavisani A, Arshami J, Naserian AA, Kandelousi MAS, Azizzadeh M. 2013. Quality of bovine chilled or frozen-thawed semen after addition of omega-3 fatty acids supplementation to extender. *International Journal of Fertility and Sterility* **7**(3):161-168.

Abouelezz FMK, Castaño C, Toledano-Díaz A, Estes MC, López-Sebastián A, Campo JL, Santiago-Moreno J. 2015. Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals* **50**:135-141.

Ahmed H, Jahan S, Khan A, Khan L, Ullah H, Riaz M, Ullah K, Ullah F. 2020. Supplementation of L-tryptophan (an aromatic amino acid) in tris citric acid extender enhances post-thaw progressive motility, plasmalemma, mitochondrial membrane potential, acrosome, and DNA integrities, and *in vivo* fertility rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Cryobiology* **92**:117-123.

Alkali IM, Asuku SO, Colombo M, Bukar MM, Waziri MA, Luvoni GC. 2022. Spermatozoa in Egg Yolk-Based and Soybean-Based Extenders at Ambient and Chilling Temperature in Domestic Turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Animals* **12**:648.

Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**:5-17.

Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank* **17**:745-756.

Amundson O. 2023. Proper Semen Handling Techniques. South Dakota State University Extension. Available from <https://extension.sdstate.edu/proper-semen-handling-techniques> (accessed January 2024)

Anand M, Yadav S, Vaswani S, Shukla PK. 2015. Low density lipoprotein (LDL) as cryoprotectant in semen extender: A new approach. *The Asian Journal of Animal Science* **10**(2):206-214.

Anderle V, Lichovníková M, Przywarová A, Dračková E. 2014. Egg quality of gene reserve the Czech Golden Spotted Hens. *Acta Fytotechnica et Zootechnica* **17**(3)84-86.

Askarianzadeh Z, Sharafi M, Torshizi MAK. 2018. Sperm quality Characteristics and fertilization capacity after cryopreservation of rooster semen in extender exposed to magnetic field. *Animal Reproduction Science* **198**: 37-46.

Aurich JE. 2012. Artificial Insemination in Horses-More Than a Century of Practice and Research. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**:458-463.

Bajgelman MC. 2019. Principles and applications of flow cytometry. Pages 119-124 in Misra G, editor. *Data processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Academic Press, Cambridge. ISBN 978-0-12-816548-5.

Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* **10**:49-62.

Barna J, Végi B, Liptói K, Várkonyi EP. 2020. Reproductive technologies in avian species. Pages 193-228 in Presicce GA, editor. *Reproductive Technologies in Animals*. Academic Press, Cambridge. ISBN 978-0-12-817107-3.

Beran J, Stádník L, Doležalová M, Toušová R. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. Česká zemědělská univerzita, Praha. ISBN 978-80-213-2537-1

Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. 2007. Milk Caseins Decrease the Binding of the Major Bovine Seminal Plasma Proteins to Sperm and Prevent Lipid Loss from the Sperm Membrane During Sperm Storage. *Biology of Reproduction* **77**:120-126.

Bergeron A, Manjunath P. 2006. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Molecular Reproduction and Development* **73**:1338–1344.

Bernal B, Iqlesias-Cabeza N, Sánchez-Rivera U, Toledano-Díaz A, Castaño C, Pérez-Cerezales S, Gutiérrez-Adán A, López-Sebastián A, García-Casado P, Gil MG, Blesbois E, Santiago-Moreno J. 2020. Effect of supplementation of valine to chicken extenders on sperm cryoresistance and post-thaw fertilization capacity. *Poultry Science* **99**(12):7133-7141.

Birkhead TR, Montgomerie R. 2009. Three centuries of sperm research. Pages 1-42 in Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S, editors. *Sperm Biology*. Academic Press, Cambridge. ISBN 978-0-12-372568-4

Blanch E, Tomás C, Casares L, Gómez EA, Sansano S, Giménez I, Mocé E. 2014. Development of methods for cryopreservation of rooster sperm from the endangered breed „Gallina Valenciana de Chulilla“ using low glycerol concentrations. *Theriogenology* **81**:1174-1180.

Blesbios E. 2018. Bird Reproduction Overview. *Encyclopedia of Reproduction* **6**:579-585.

Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F, Mignon-Grasteau S, Saint Jalme M, Mialon-Richard MM. 2008. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* **69**(2):252-261.

Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CHC, Hinrichs K. 2010. *Manual of Equine Reproduction*. Elsevier, Amsterdam. ISBN 978-0-32-306513-9

- Bustamante-Filho IC, Pasini M, Moura AA. 2022. Spermatozoa and seminal plasma proteomics: To many molecules, too few markers. The case of bovine and porcine semen. *Animal Reproduction Science* **247**:107075.
- Bustani GH, Baiee FH. 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World* **14**:1220-1233.
- Büyükblebici S, Tuncer PB, Bucak MN, Eken A, Sariözkan S, Sasdemir U, Endirlik BÜ. 2014. Cryopreservation of bull semen: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science* **150**:77-83.
- Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. 2012. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology* 2012:854837.
- Diskin MG, 2018. Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal* **12**:75-84.
- Donoghue AM, Wishart GJ. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* **62**:213-232.
- El-Sisy GA, El-Nattat WS, El-Sheshtawy RI, El-Maaty AMA. 2016. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. *Asia Pacific Journal of Reproduction* **5**:514-518.
- Eslami M, Hashem EZ, Ghaniei A, Sayyah-Atashbeig H. 2018. Evaluation of lonileic acid on lipid peroxidative/antioxidative parameters, motility and viability of rooster spermatozoa during cold storage. *Cell and Tissue Banking* **19**:799-807.
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* **73**:480-487.
- Getachew T. 2016. A Review Article of Artificial Insemination in Poultry. *World's Veterinary Journal* **6**:26-35.
- Gholami M, Faraji Z, Zamiri MJ. 2012. Effect of the egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research* **13**:23-27.
- Gloria A, Toscani T, Rabbe D, Parrillo S, De Amicis I, Contri A. 2019. Cryopreservation of turkey spermatozoa without permeant cryoprotectants. *Animal Reproduction Science* **211**:106218.
- Hensel B, Jakop U, Scheinpflug K, Mühldorfer K, Schröter F, Schäfer J, Greber K, Jung M, Schulze M. 2020. Low temperature preservation of porcine semen influence of short antimicrobial lipopeptides on sperm quality and bacterial load. *Scientific Reports* **10**:13225.

Ilhan HO, Serbes G. 2022. Sperm morphology analysis by using the fusion of two-stage fine-tuned deep networks. *Biomedical Signal Processing and Control* **71**:103246.

Jakop U, Svetlichnyy V, Schiller J, Schulze M, Schroeter F, Mueller K. 2019. *In vitro* supplementation with unsaturated fatty acids improves boar sperm viability after storage at 6 °C. *Animal Reproduction Science* **206**:60-68.

Janošíková M, Petričáková K, Ptáček M, Savvulidi FG, Rychtarová J, Fulka J. 2023. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa. *Poultry Science* **102**:102386.

Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**(4):536-551.

Kameni SL, Meutchieye F, Ngoula F. 2021. Liquid Storage of Ram Semen: Associated Damages and Improvement. *Open Journal of Animal Sciences* **11**(3):473-500.

Kowalczyk A, Kuczaj M, Czerniawska-Piatkowska E. 2020. The role of environmental optimization for storing bulls' sperm cells. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **66**:300-310.

Kraus A, Krunt O, Zita L, Vejvodová K, Drábek O. 2022. Laying hens under smallholder conditions: laying performance, growth and bone quality of tibia and femur including essential elements. *Poultry Science* **101**(7):101927.

Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science* **172**:1-9.

Leão APA, de Souza AV, Mesquita NF, Pereira LJ, Zangeronimo MG. 2021. Antioxidant enrichment of rooster semen extenders-A systematic review. *Research in Veterinary Science* **136**:111-118.

Lin HLH, Mermillod P, Grasseau I, Brillard JP, Gérard N, Reynaud K, Chen LR, Blesbois E, Carvalho A. V. 2023. Is glycerol a good cryoprotectant for sperm cells? New exploration of its toxicity using avian model. *Animal Reproduction Science* **258**:107330.

Madeddu M, Mosca F, Sayed AA, Zaniboni L, Mangiagalli MG, Colombo E, Carolini S. 2016. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science* **171**:58-64.

Malaluang P, Wilén E, Lindahl J, Hansson I, Morrell JM. 2021. Antimicrobial Resistance in Equine Reproduction. *Animals* **11**:3035.

Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, de Blas I, Espinosa. 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* **61**:17-21.

- Manjunath P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction* **9**:809-815.
- Masoudi R, Sharafi M, Pourazadi L. 2019. Improvement of rooster semen quality using coenzyme Q10 during cooling storage in the Lake extender. *Cryobiology* **88**:87-91.
- Maxwell WM, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development* **5**(6):613-638.
- Mehaisen GMK, Elomda AM, Hamad SK, Ghaly MM, Sun Y, Li Y, Zong Y, Chen J, Partyka A, Nazmi A, Abbas AO, Stino FKR. 2022. Effect of Dimethylacetamide Concentration on Motility, Quality, Antioxidant Biomarkers, Anti-Freeze Gene Expression, and Fertilizing Ability of Frozen/Thawed Rooster Sperm. *Animals* **12**(20):2739.
- Miquel-Jimenez S, del Alamo MMR, Álvarez-Rodríguez M, Hidalgo CO, Peña AI, Muiño R, Rodríguez-Gil JE, Mogas T. 2020. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science* **215**:106315.
- Miranda M, Kulíková B, Vašíček J, Olexiková L, Iaffaldano N, Chrenek P. 2017. Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals* **53**:93-100.
- Mohan J, Kolluri G, Srivastava V, Tyagi JS, Tiwari AK. 2023. Bacterial contamination of poultry semen, its dilution and storage. *World's Poultry Science Journal* **79**:593-617.
- Morrel JM, Malaluang P, Cojkic A, Hansson I. 2022. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders Used in Artificial Insemination. Pages 181-253 in Tellez-Isaias G, editor. *The Global Antimicrobial Resistance Epidemic – Innovative Approaches and Cutting-Edge Solutions*. BoD – Books on Demand, Norderstedt.
- Morrel JM, Wallgren M. 2014. Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review. *Pathogens* **3**:934-946.
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* **73**(3):343-347.
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* **73**(3):343-347.
- Mosca F, Zaniboni L, Sayed AA, Madeddu M, Iaffaldano N, Cerolini S. 2019. Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *Poultry Science* **98**(11):6071-6077.

- Murugesan S, Mahapatra R. 2020. Cryopresevation of Ghagus chicken semen: Effect of cryoprotectants, diluents and thawing temperature. *Reproduction in Domestic Animals* **55**(8):951-957.
- Muvhali PF, Bonato M, Malecki IA, Cloete SWP. Minimum sperm dose for optimal fertility after artificial insemination in ostriches. *Theriogenology* **187**:34-41.
- Noakes DE, Parkinson TJ, England CW. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, eight edition. Elsevier, London. Pp 767-768. ISBN 978-0-7020-2556-3.
- Papa FO, Felício GB, Melo CM, Alvarenga MA, De Vita B, Avanzi BR, Dell'Aqua JA. 2010. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science* **121**:171-172.
- Partyka A, Nizański W. 2022. Advances in storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* **246**:10692
- Pavel I. Metodika uchování genetického zdroje zvířat. Available from: <http://cschdz.eu/odbornosti/drubez/geneticke-zdroje.aspx> (accessed January 2024).
- Pérez-Marín CC, Requena FD, Arando A, Ortiz-Villalón S, Requena F, Agüra EI. 2018. Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology* **80**:62-69.
- Perry JC, Sirot L, Wigby S. 2013. The seminal symphony: how to compose an ejaculate. *Trends in Ecology & Evolution* **28**:7.
- Petřičáková K, Janošíková M, Ptáček M, Zita L, Savvulidi FG, Partyka A. 2022. Comparison of Commercial Poultry Semen Extenders Modified for Cryopreservation Procedure in the Genetic Resource Program of Czech Golden Spotted Hen. *Animals* **12**(20):2886.
- Pickett BW, Shiner KA. 1994. Recent developments in artificial insemination in horses. *Livestock Production Science* **40**:31-36.
- Pitnick S, Hosken DJ, Birkhead TR. 2009. Sperm morphological diversity. Pages 69-149 in Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S, editors. *Sperm Biology*. Academic Press, Cambridge. ISBN 978-0-12-372568-4
- Pollock CG, Orosz SE. 2002. Avian reproductive anatomy, physiology and endokrinology. *Veterinary Clinisc of North America: Exotic Animal Practice* **5**(3): 441-474.
- Raheja N, Choudhary S, Grewal S, Sharma N, Kumar N. 2018. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**:239-245.

- Rakha BA, Ansari MS, Akhter S, Zafar Z, Naseer A, Hussain I, Blesbois E, Santiago-Moreno J. 2018. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). *Theriogenology* **122**:61-67.
- Rehman FU, Zhao C, Shah MA, Qureshi MS, Wang X. 2013. Semen Extenders and Artificial Insemination in Ruminants. *Veterinaria* **1**:1-8.
- Roiter YS, Konopleva AP. 2019. Universal biotechnological medium for sperm dilution during poultry artificial insemination. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **315**:042020
- Roldan ERS, Gomendio M. 2009. Sperm and conservation. Pages 539-564 in Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S, editors. *Sperm Biology*. Academic Press, Cambridge. ISBN 978-0-12-372568-4
- Roldan ERS, Taves ME. 2020. Understanding sperm physiology: Proximate and evolutionary explanations of sperm diversity. *Molecular and Cellular Endocrinology* **518**:110980.
- Rosa CO, Bonato DV, Souza AK, Morotti F, Francisco RC, Basso AC, Martins MIM, Seneda MM. 2019. Improvement on the efficiency of doses per conception by using a semen extender in timed artificial insemination. *Livestock Science* **221**:77-81.
- Rostami B, Ebrahimi DM, Sadeghipanah H, Masoumi R, Shakir MH. 2020. Effects of supplementation of tris-egg yolk extender with different sugars and antioxidants on freezability of ram semen. *Cryobiology* **92**:62-66.
- Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh AZ, Zhandi M. 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Research* **112**:123-127.
- Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, Campo JL. 2012. Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Cryobiology* **65**:230-234.
- SAS Institute Inc. *Base SAS 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures*, 2nd ed.; Statistical Analysis System Institute Inc.: Cary, NC, USA, 2013.
- Sasaki K, Tatsumi T, Tsutsui M, Niinomi T, Imai T, Naito M, Tajima A, Nishi Y. 2010. A Method for Cryopreserving Semen from Yakido Roosters Using N-Methylacetamide as a Cryoprotective Agent. *Japan Poultry Science* **47**:297-301.
- Schäfer-Somi S, Binder C, Burak J, Papadopoulos N, Ilas J, Boersma A, Aurich C. 2021. Using egg yolk in a TRIS-Equex STM paste extender for freezing of dog semen is superior to egg yolk plasma, also after addition of lecithin and catalase. *Cryobiology* **100**:67-71.

- Schulze M, Dathe M, Waberski D, Müller K. 2016. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology* **85**:39-46.
- 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.
- Siari S, Mohri M, Sharafi M. 2021. Supplementation of Beltsville extender with quecetin improves the quality of frozen-thawed rooster semen. *British Poultry Science* **63**(2):252-260.
- Stanishevskaya O, Silyukova Y, Pleshanov N, Kurochkin A, Fedorova E, Fedorova Z, Perinek O, Pituzhalova A, Meftakh I. 2021. Effects of Saccharides Supplementation in the Extender of Cryopreserved Rooster (*Gallus domesticus*) Semen on the Fertility of Frozen/Thawed Spermatozoa. *Animals* **11**(1):189.
- Su L, Li X, Quan J, Yang S, Li Y, He X, Tang X. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science* **104**:212-219.
- Sun L, Fan W, Wu C, Zhang S, Dai J, Zhang D. 2020. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology* **92**:146-150.
- Svoradová A, Kuželová L, Vašíček J, Baláži A, Olexiková L, Makarevich A, Chrenek P. 2021. Rooster Spermatozoa Cryopreservation and Quality Assessment. *Cryoletters* **42**(2):59-66.
- Tavilani H. 2008. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online* **16**(5):649-656.
- Thananurak P, Chuaychu-noo N, Phasuk Y, Vongpralub T. 2020. Comparison of TNC and standard extender on post-thaw quality and *in vivo* fertility of Thai native chicken sperm. *Cryobiology* **92**:197-202.
- Thananurak P, Chyaychu-noo N, Thélie A, Phasuk Y, Vongpralub T, Blesbois E. 2019. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms inn contrast to raffinose. *Poultry Science* **98**(9):4161-4171.
- Ugur MR, Abdelrahman AS, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini R, Purwantara B, Kaya A, Memili E. 2019. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science* **6**:268.
- Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Diaz T, Vásquez L, Schmidt E, Desherces S, Anton M, Bencharif D, Tainturier D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparsion to Triladyl and Bioxcell. *Theriogenology* **71**:895-900.

- Wiebke M, Hensel B, Nitsche-Melkus E, Jung M, Schulze M. 2022. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science* **246**:106822.
- Will MA, Clark NA, Swain JE. 2011. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **28**:711-724.
- Woelders H, Wit AAC, Engel B, Hulsege B, Grasseau I, Blesbois E, Santiago-Moreno J. Freezing chicken semen. Influence of base medium osmolality, cryoprotectants, cryoprotectant concentration, and cooling rate on post-thaw sperm survival. *Cryobiology* **108**:67-77.
- Wu MX, Yang XH, Yan HF. 2020. Improving the quality of rooster semen frozen in straws by screening the glycerol concentration and freezing rate. *British Poultry Science* 61(2):173-179.
- Wysokińska A, Szablicka D, Dziekońska A, Wójcik E. 2023. Analysis of changes in the morphological structures of sperm during preservation of liquid boar semen in two different seasons of the year. *Animal Reproduction Science* **256**:107297.
- Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil J, Miró J, Yeste M. 2022. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science* **246**:106904.
- Yang SX, Adams GP, Zwiefelhofer EM, Rajapaksha K, Anzar M. 2021. Cholesterol-cyclodextrin complex as a replacement for egg yolk in bull semen extender: sperm characteristics post-thawing and *in vivo* fertility. *Animal Reproduction Science* **225**:106691.
- Zaniboni L, Madeddu M, Mosca F, Sayed AA, Marelli SP, Di Iorio M, Iaffaldano N, Cerolini S. 2022. Concentration dependent effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of cryopreserved chicken semen. *Cryobiology* **106**:66-72.
- Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GMK, Ma T, Chen J. 2023. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanism. *Agriculture* **13**:445.
- Zong Y, Sun Y, Li Y, Mehaisen GMK, Yuan J, Ma H, Ni A, Wang Y, Hamad SK, Elomda A. M, Abbas AO, Chem J. 2022. Effect of glycerol concentration, glycerol removal method, and straw type on the quality and fertility of frozen chicken semen. *Poultry Science* **101**:102840.

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACRD Poškození akrozomu

ATP Adenosintrifosfát

DMA Dimethylacetamid

DNA Deoxyribonukleová kyselina

FACS Fluorescenčně aktivovaná průtoková cytometrie

FSH Folikulo-stimulační hormon

GSH Glutathion

LDL Proteiny s nízkou hustotou

LH Luteinizační hormon

LPO Peroxidace lipidů

LSM Metoda nejmenších čtverců

MZe Ministerstvo zemědělství

NMA N-methylacetamid

OS Oxidativní stres

PMD Poškození plazmatické membrány

PMI Životaschopnost spermií

RNA Ribonukleová kyselina

ROS Reaktivní formy kyslíku

SST Tubuly pro ukládání spermií

11 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Typy spermií u ptáků (A - komplexní spermie pěvců, B - jednoduchý typ spermie nacházející se u většiny ptáků) (Pollock& Orosz 2002).	14
Obrázek 2 Morfologické poškození spermií spojené s akrozomem (a-c), hlavou (d-i), střední částí (j-o) a ocasem (p-t) krutích spermií (Animal Andrology, Chenoweth & Lorton 2014). ..15	
Obrázek 3 Průměrná teplota v různých hloubkách v nádrži se spermatem (převzato z South Dakota State, 2023).	25
Obrázek 4 - Příslušenství k mrazení inseminačních dávek (a - polystyrenový mrazicí box, b - plnička pejet, c - těsnicí prášek, d - pejety, e - nůž na pejety) (archiv autora).	30
Obrázek 5 - mCASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan) (archiv autora).	31
Obrázek 6 - Průtokový cytometr (Novocyte 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, Californie, USA) (archiv autora).	32

12 Seznam grafů

Graf 1 Celková motilita po rozmrazení.	34
Graf 2 Vliv použitého ředidla na životaschopnost spermií po rozmrazení.	35
Graf 3 Vliv použitého ředidla na poškození plazmatické membrány po rozmrazení.	37
Graf 4 Vliv použitého ředidla na poškození akrozomu po rozmrazení.	38

13 Seznam tabulek

Tabulka 1 Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií po rozmrazení (PMI), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).	35
Tabulka 2 Vliv odběrového dne na poškození plazmatické membrány po rozmrazení (PMD), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).	36
Tabulka 3 Vliv odběrového dne na poškození akrozomu po rozmrazení (ACRD), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).	37