

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci  
spermatu u malých přežvýkavců**

**Bakalářská práce**

**Kateřina Hamed Dis.**

**Chovateství**

**Ing. Martin Ptáček, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u malých přežvýkavců" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2022

---

## **Poděkování**

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) vedoucímu mé bakalářské práce panu Ing. Martinu Ptáčkovi, PhD., zato že mi poskytoval potřebné konzulce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině především manželovi a rodičům, zato že mě při studiu podporovali a pomáhali, i když to bylo se mnou těžké.

# Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u malých přežvýkavců

## Souhrn

Cílem této práce je literární shrnutí poznatků o moderních kryoprotektorech, které jsou využívané při konzervaci spermatu u malých přežvýkavců – ovcí a koz. Bakalářská práce je napsána formou literární rešerše.

V bakalářské práci jsem se věnovala nejprve metodám konzervace spermatu a hodnocení kvality spermatu, což je velmi důležité pro výrobu inseminačních dávek. V této souvislosti jsem se zmínila o průtokové cytometrii a fluorescenční mikroskopii. Tyto dvě metody nám pomáhají zjišťovat kvalitu inseminační dávky.

Nejvýznamnější část této práce tvoří kryoprotektory a kryokonzervace. Kryoprotektory jsou látky, které se přidávají do ředidel, aby nám zlepšily životaschopnost, integritu a motilitu spermií po zmrazení a následném rozmrazení. Mezi takovéto látky patří např. glycerol, vaječný žloutek, mateří kašička, antioxidanty nebo antifreeze proteiny. Použití každé z těchto látek přináší své výhody a nevýhody, které jsou v této práci popsány. Při používání ředidel hraje velmi důležitou roli i poměr v jakém je dané ředidlo použito. Z kryoprotektorů jsem velkou pozornost věnovala vaječnému žloutku, mateří kašičce, antioxidantům a antifreeze proteinům.

Kryokonzervace hraje velmi důležitou roli v rozmnožování a šlechtění hospodářských zvířat, proto je nesmírně důležité, aby byla kryokonzervace provedena co nejlépe. V této práci je proces kryokonzervace popsán velmi důkladně i s možnými problémy, které mohou při kryokonzervaci nastat. V této práci je dále i zmíněno, jak je možné těmto problémům předcházet.

Více jsem našla studie, které pojednávají o problému beraního spermatu než kozlího spermatu.

V závěru práce jsem se věnovala procesu ultra rychlého mrazení a lyofilizace.

**Klíčová slova:** vaječný žloutek, mateří kašička, antioxidanty, antifreeze proteiny

# **Modern cryoprotectants using by preservation of spermatozoa in small ruminants**

## **Summary**

The aim of this study is collecting knowledge about modern cryoprotectants using by preservation of spermatozoa in small ruminants – sheep and goats. The bachelor thesis is written in the form of a literary research.

In my bachelor thesis, I first focused on methods of sperm preservation and evaluation of semen quality, which is very important for the production of insemination doses. In this context, I mentioned flow cytometry and fluorescence microscopy. These two methods help us determine the quality of the insemination dose.

The most important part of this work consists of cryoprotectors and cryopreservation. Cryoprotectors are substances that are added to extenders to improve the viability, integrity and motility of sperm after freezing and subsequent thawing. Such substances include, for example, glycerol, egg yolk, royal jelly, antioxidants or antifreeze proteins. The use of each of these substances brings its advantages and disadvantages, which are described in this work. When using extenders, the ratio in which the diluent is used also plays a very important role. Of the cryoprotectors, I paid a lot of attention to egg yolk, royal jelly, antioxidants and antifreeze proteins.

Cryoconservation plays a very important role in the reproduction and breeding of livestock, so it is extremely important that cryopreservation is carried out in the best possible way. In this work, the process of cryopreservation is described very thoroughly with possible problems that may occur during cryopreservation. In this work, it is also mentioned how these problems can be prevented.

I have found more studies that deal with the problem of ram semen than goat semen.

At the end of the thesis, I focused on the process of ultra-fast freezing and freeze-drying.

**Keywords:** egg yolk, royal jelly, antioxidants, antifreeze proteins

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Metody konzervace spermatu .....</b>	<b>10</b>
3.1.1	Krátkodobá konzervace spermatu.....	10
3.1.2	Dlouhodobá konzervace spermatu.....	11
<b>3.2</b>	<b>Hodnocení kvality spermatu u berana a kozla .....</b>	<b>12</b>
3.2.1	Makroskopické posouzení kvality spermatu .....	14
3.2.2	Mikroskopické posouzení kvality spermatu .....	14
<b>3.3</b>	<b>Analyzační metody zjišťování kvality ID.....</b>	<b>15</b>
3.3.1	Průtoková cytometrie .....	15
3.3.2	Fluorescenční mikroskopie .....	16
<b>3.4</b>	<b>Kryokonzervace .....</b>	<b>17</b>
<b>3.5</b>	<b>Kryoprotektory.....</b>	<b>20</b>
3.5.1	Vaječný žloutek .....	24
3.5.2	Mateří kašička .....	27
3.5.3	Antioxidanty.....	29
3.5.4	Antifreeze proteiny .....	33
<b>3.6</b>	<b>Ultra rychlé mrazení .....</b>	<b>35</b>
<b>3.7</b>	<b>Lyofilizace .....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>45</b>

# 1 Úvod

Kryobiologie a kryokonzervace hraje velmi důležitou roli při výrobě inseminačních dávek. Kryokonzervace spermatu je jedním z nejdůležitějších nástrojů, jak zlepšit reprodukční technologie v oblasti zootechniky. Zlepšení reprodukce lze dosáhnout několika způsoby. Jedním ze způsobů, jak zlepšit reprodukci je zlepšení kvality spermatu po rozmrazení, toho můžeme dosáhnout výběrem vhodného kryoprotektoru a ředidla. Úsilí o zlepšení ochrany spermatu malých přežvýkavců jsou zaměřeny na úpravu ředidla a na přidání různých složek pro udržení motility a integrity spermií. To je předmětem této bakalářské práce.



## **2 Cíl práce**

Cílem bakalářské práce je soupis aktuálních poznatků tématicky zaměřených na využití moderních kryoprotektorů při konzervaci semene malých přežvýkavců. Jako důsledek bakalářské práce bude navržen možných postupů pro optimalizaci výroby inseminačních dávek, popřípadě zlepšení úspěšnosti při následné inseminaci.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Metody konzervace spermatu

Konzervace spermatu vyžaduje depresi nebo přerušeni metabolismu spermií, který se provádí kryokonzervací (Alcay et al., 2017). Alternativně dlouhodobé (zmrazení) a krátkodobé (kapalné) skladování spermií může vést ke zhoršení membrány – v důsledku přechodů membránových fází, které se vyskytují v oblastech vysoce specializované regionalizované plazmatické membrány spermií (Bucak et al., 2009).

Úsilí o zlepšení ochrany koziho spermatu je zaměřeno na úpravu ředidla (Alcay et al., 2017).

S odebraným spermatem se musí zacházet opatrně, aby nedošlo k teplotním šokům, kontaminaci vodoudezinfekčními prostředky, světelním zářením a vzduchem, jakož i jinými procesy nebo faktory, které mohou snížit životaschopnost spermií (Faigl a kol. et al., 2012)

#### 3.1.1 Krátkodobá konzervace spermatu

Beranní sperma je podstatně citlivější na chladový šok vzhledem k jejich nižší molární koncentraci cholesterolu/fosfolipidů ve srovnání s jinými druhy. Z tohoto důvodu je důležité snížit účinek chladového šoku, například zvýšením obsahu cholesterolu na buněčné membrány. Obsah cholesterolu v membráně spermií a poměr cholesterolu k lipidům je druhově specifický. To může být důvodem rozdílů v toleranci spermií na chladový šok. Cyklodextriny, cyklické oligosacharidy, lze použít ke změně obsahu cholesterolu v buněčných membránách (Motamedi-Mojdehi et al., 2013).

Moce' a kol. (2010) navrhli, že zachování vyšší koncentrace cholesterolu ve spermiích zvyšuje jejich životaschopnost po rozmrazení případně snížení kapacity jako změny v důsledku zamrznutí. Již bylo prokázáno, že vysoká hladina cholesterolu zvyšuje membránovou propustnost kryoprotektorů jako je glycerol (Motamedi-Mojdehi et al., 2013). Na počátku 60. let byl obecně uznávaným ředidlem pro beranní sperma glukozo-citrátový žlutek. Optimální koncentrace glycerolu je v rozmezí 4–6 % (Salamon et Maxwell, 2000). Glycerol lze přidat do spermatu v samostatné ředící frakci nebo jediným přídatkem ředidla obsahujícího glycerol (Faigl et al., 2012).

Již bylo prokázáno, že kvalita beraního spermatu se extrémně snižuje po 3–5 dnech (Amini et al., 2019). Hlavními metodami skladování zředěného spermatu v kapalném stavu je skladování při snížené teplotě +5 °C. Většina umělé inseminace u bahniček se provádí pomocí čerstvého spermatu, do kterého bylo přidáno jednoduché ředidlo, protože malý objem ejakulátu znamená, že je obtížné kontrolovat počet spermií, pokud se používá k přímé inseminaci. Konečná koncentrace spermatu u inseminační dávky závisí na způsobu inseminace, zde se inseminace provádí během rozmnožovacího období v přirozeném/synchronizovaném cyklu nebo po indukčním estru během období, kdy není rozmnožovací období, a také o tom, jak je sperma skladováno během odběru a inseminací (Faigl et al., 2012).

Nejčastěji se beranní sperma ke krátkodobé konzervaci ředí v poměru 1:3 až 4. Mohou se však použít i poměry nižší a to 1:1 až 2 (Kukovics et al., 2011). Poměr ředění je většinou poměrně malý z důvodu minimalizace nadměrného zředění semenné plazmy, která obsahuje

prospěšné proteiny a antioxidanty. Tzv. „ředící efekt“ je totiž často označován jako důvod pro sníženou motilitu a fertilizační schopnost beraního spermatu (Mata-Campuzano et al., 2015). Po zředění musí být beraní sperma pomalu ochlazováno na 5°C. Toto pomalé chlazení by mělo probíhat po dobu 1,5 až 2 hodiny (Faigl et al. 2012).

Je tedy nutné při chlazení postupovat opatrně. Vlastnosti spermií, a tedy i oplozovací schopnost se s prodlužujícím časem konzervace zhoršují, a to zhoruba o 10–35 % na každý den konzervace v tekutém stavu (Maxwell et Watson, 1996; Salamon et Maxwell, 2000). Je třeba se vyhnout rychlému kolísání teplot chladicí směsi a zředěného spermatu. Zjevnou nevýhodou tekutě skladovaných spermií je jejich omezená životnost, omezení přepravy na velké vzdálenosti a zabránění dlouhodobému skladování. Snížená plodnost je způsobena snížením pohyblivosti a morfologické integrity spermií, to je ještě doprovázeno poklesem transportu a přežití spermií v reprodukčním traktu samic. Skladování v tekutém stavu může vést ke zranění spermií, a tím ke zvýšení podílu kapacitovaných a na akrozomech reagujících buněk. Plodnost a dobu skladování tekutě uloženého spermatu lze zlepšit pečlivě načasovanou intrauterinní inseminací pomocí laparoskopie se spermatem, které obsahuje antioxidant (Faigl et al., 2012). O'Hara a kol. (2010) ve své studii došli k závěru, že beraní sperma chlazené a skladované při 15 °C má kratší životnost, než je rozpětí chlazené na 5°C. Skladování při teplotě 5 °C udržovalo přijatelnou motilitu a životaschopnost až 72 hodin ve srovnání a skladování při 15°C.

Hlavním problémem při konzervaci kozlího spermatu je, že v semenné plazmě jsou složky, které narušují životaschopnost spermií uložených v médiích, která obsahují vaječný žloutek a mléko (Faigl et al., 2012). Toxická interakce s vaječným žloutkem je způsobena enzymem koagulujícím vaječný žloutek, který je vylučován bulbouretrální žlázou a koaguluje vaječný žloutek a hydrolyzuje lecitinna mastné kyseliny a spermicidní lyzocitiny (Chemineau et al., 1991; Nuti et al., 2007). Sekrece bulbouretrální žlázy má také toxickou interakci s mlékem. Tento efekt byl připisován glykoproteinu lipáze. Tento enzym hydrolyzuje triolein i mléčné triacylglyceridy na volné mastné kyseliny, které silně inhibují pohyblivost a mohou poškodit membránu spermií (Faigl et al., 2012). Ředidla pro kozí sperma používaná při kapalném skladování nebo zmrazení byly založeny buď na bázi odstředěného mléka nebo byla odstraněna semenná plazma před použitím ředidla na bázi vaječného žloutku (Leboeuf et al., 2004). Nedávná pozorování naznačují, že nízké úrovně inkluze vaječného žloutku nevedly k toxickým účinkům typických pro vysokou míru inkluze, proto glukóza-citrát a tris-fruktoza spolu v kombinaci s nízkou koncentrací vaječného žloutku mohou být úspěšně použity (Shamsuddin et al., 2000).

### **3.1.2 Dlouhodobá konzervace spermatu**

Pomalé a rychlé zmrazení jsou běžné metody pro dlouhodobé uchování syvčích gamet. Při pomalém zmrazení jsou vzorky spermatu pomalu zmrazené v kapalném dusíku (Igbokwe et al., 2019).

V současné době jsou dvě trisová ředidla, která se doporučují pro běžné použití beraního spermatu a těmi ředidly jsou tris – glukóza vaječný žloutek a tris-citrát-glukóza – vaječný žloutek (Salamon et Maxwell, 2000). Mléko může být také použito jako základní složka ředidla, ale musí být tepelně ošetřeno, aby se zničil spermicidní laktenin protein v mléce. Pro použití se

upřednostňuje odstředěné nebo UHT ošetřené mléko (Faigl et al., 2012). Rodríguez-Irazaqui a kol. (2004) zjistili, že Bioxcell se jeví jako konvenční alternativa ředidla mléčného žloutku po zmrazení beraního spermatu. Bioxcell poskytuje podobné výsledky plodnosti po cervikální inseminaci za rozsáhlých podmínek řízení. Bioexcell je ředidlo, které je na bázi soyového lecitinu. Sojový lecitin byl nedávno devinován jako chemická alternativa vaječného žloutku a mléka pro skladování beraního spermatu při nízkých teplotách v tekutém a pevném stavu. Bioexcell je ředidlo, které bylo vyrobeno ve Francii pro komerční účely firmou IMV Technologies. Bioxcell byl shledán vhodným pro kryokonzervaci beraního spermatu nejen na základě strukturální a funkční integrity spermií, ale také díky míře zabřeznutí bahnic po intracervikální a intrauterinní inseminaci (Khalifa et al., 2013).

Molinia et al. (1994) použil ředící roztoky obsahující oboustranně působící pufrы TES, HEPES, PIPES, upravené na 7 pH s NaOH, dále tris rozředěný citrátem sodným, zahrnující 13,5 % žloutku, který zvýšil % neporušených akrozomů u spermií po rozmrazení.

Aby se zachovala oplozovací schopnost spermatu po dlouhou dobu byly testovány různá ředidla s různými přísadami. Ředidla spermatu obecně obsahují jednoduché sacharidy především glukozu, které slouží jako zdroj energie, dále obsahují vaječný žloutek, mléko nebo sojový lecitin, aby zabránily chladovému šoku, další složkou jsou iontové nebo neiontové látky pro udržení pro udržení vhodného osmotického tlaku a pH, nakonec obsahují antibiotika k prevenci bakteriální kontaminace. Úsilí o zlepšení ochrany beraního spermatu je zaměřeno na úpravu ředidla, jakož i na přidání různých složek pro udržení motility, oplozovací schopnosti a zachování integrity spermií (Alcay et al., 2015). Například použití ředidel s nízkou hustotou lipoproteinů můžou nahradit použití vaječného žloutku jako ředidla při mrazení beraních spermií (Moustacas et al., 2011).

Dlouhodobá konzervace spermatu vede k biologickým a funkčním změnám ve spermií, což zhoršuje jejich oplozovací schopnost. Kromě toho náhlé změny teploty jako je chladový šok a tvorba a rozpouštění ledu během procesu mrazení a tání ovlivňují integritu a funkci akrosomu, jádra, mitochondrií, axonému a plazmatické membrány (Alcay et al., 2015). Je pozorována velká variabilita ve schopnosti spermií jednotlivých beranů k přežití kryokonzervace, část spermií beranů zmrazení nepřežije (Faigl et al., 2012).

V současné době je nejpoužívanějším kryokonzervačním komponentem ředidla vaječný žloutek, který působí jako zásobárna fosfolipidů a cholesterolu a pomáhá chránit plazmatické membrány a akrosomy před poškozením vlivem změn teploty (Sun et al., 2019). Při kryokonzervaci beraního spermatu byla raná ředidla založena na citrátu, vaječném žloutku, monosacharidu jako je glukóza nebo fruktóza anebo mléka. Nově vyvinutá mrazící ředidla byla založena na disacharidech (např. Laktoza), trisacharidech (např. rafinoza), komplexních polysacharidech (arabská guma) nebo jiných složitých molekul např. polyvinylpyrrolidon (Faigl et al., 2012).

### **3.2 Hodnocení kvality spermatu u berana a kozla**

Kvantitativní a kvalitativní parametry ejakulátu by se měly přezkoumat brzy po odebrání ejakulátu (Faigl et al., 2012).

Kvalita i životaschopnost beraních spermií se zhoršuje v důsledku zmrazení a rozmrazení. Beraní spermie jsou citlivé na extrémní teplotní změny. Bylo prokázáno, že

postupy a procesy používané při kryokonzervaci způsobují poškození plazmatické membrány spermií (Marco-Jimenez et al., 2005).

V současné době jsou některé z hlavních nástrojů pro stanovení kvality spermií počítačově asistovaný systém analýzy spermií a specifická mořidla (mořidla a fluorochromy), které jsou analyzovány optickými nebo fluorescenčními mikroskopy nebo průtokovým citometrem. Nicméně vyčerpávající hodnocení morfologie spermií a jejich organel vyžaduje použití zobrazovacích technik s vysokým rozlišením, které nabízejí větší jasnost, jak je tomu v případě skenování a přenosové elektronové mikroskopie. Tyto techniky umožňují detekce změn v membránách, akrozomech, jádrech, mitochondriích nebo flagellu, které by poskytly informace o tom proč je snížena kvalita spermií během různých kryokonzervačních procesů. Různé metodiky morfologického hodnocení spermií vyvolávají různé variace velikosti spermií (Arando et al., 2019). Jak ve své studii popsal De Paz a kol. (2011) šířka spermie je nejvíce měnitelný parametr spojený s jeho architekturou, přičemž se má za to, že hlavní osa (délka) ukazuje nižší odchylku. K podobnému zjištění došel ve své studii u beranních spermií pod různými kryokonzervačními postupy i Arando a kol. (2019). Rozměry hlavičky spermií (plocha, délka, šířka) se lišily podle skladovací teploty a ředidly používaných při kryokonzervaci, s tím, že velikost spermií byla ve vzorcích skladovaných při teplotě 5 °C a zředěných sacharózou. Uvedené vzorky ukázaly krátkou velikost spermií, což je odvozeno od toho, že se dosáhlo většího intracelulárního výstupu tekutiny a tím nedochází k poškození spermií, které vyplývá z tvorby ledových krystalů, které vznikají během ultra – rychlého mrazení (Arando et al., 2019).

Spermie jsou citlivější na hypertonické než hypotonické stavy a navrhuje se, aby k buněčnému poškození došlo, když sevrklé buňky nebo vrásčité buňky se vrátí do izotonických stavů, tj. během rozmrazování nebo oteplování v případě kryokonzervovaných spermií. Poté je buněčná plazmatická membrána nevratně poškozená a vyvolá lýzu u spermií (Arando et al., 2019). Různé reakce na teplotní napětí vznikají hlavně v důsledku rozdílů v kompozici lipidové membrány. To má za následek, že beranní spermie mají vyšší poměr polynasyčených a nasyčených mastných kyselin a nižší poměr hladiny cholesterolu a fosfolipidů než jiné druhy (Bucak et al., 2009).

Chladový šok může poškodit spermie na různých úrovních, jako jsou mitochondrie, plazmatické nebo akrosomové membrány a může změnit funkční integritu spermií tím, že snižuje jejich schopnost při hojení. Kromě toho významné snížení hladiny antioxidantů spermií bylo uvedeno jako jedna z příčin zvýšené náchylnosti těchto buněk k preoxidačnímu poškození po kryokonzervaci (Succu et al., 2011). Succu a kol. (2011) ve své studii zjistili, že přidání melatoninu do ředidla beraního spermatu pozitivně ovlivňuje životaschopnost spermií po rozmrazení, parametry pohyblivosti, intracelulární koncentraci ATP, DNA integritu a schopnost hojení. Podávání melatoninu zlepšilo kvalitu beranních spermií mimo hlavní připouštěcí období. Melatonin může mít mimo hlavní připouštěcí sezonu účinek na hypothalamus-hypofýzatestikulární osu, která moduluje GnRH a gonadotropin a produkuje testosteron (Succu et al., 2011).

### 3.2.1 Makroskopické posouzení kvality spermatu

Kvalita spermatu je ovlivněna sezonou u různých druhů zvířat jako je koza, beran, býk, kanec, hřebec a bůvol. Sezonní změny reprodukčního traktu jsou modulovány endokrinními variacemi, které by tak mohli přímo ovlivnit kryoresistenci spermií (Martinez-Fresneda et al., 2020).

Makroskopické vyšetření ejakulátu spočívá ve vizuálním posouzení jeho objemu, barvy a konzistence. Dále se v rámci tohoto vyšetření hodnotí pH, hustota a pach. Toto posouzení má do určité míry diagnostickou hodnotu při posouzení funkčnosti přídatných pohlavních žláz, k odhadu koncentrace spermatu či možném počtu inseminačních dávek vyrobených z ejakulátu (Dhurvey et al. 2012). Makroskopické vyšetření ejakulátu se provádí u čerstvého spermatu ihned po odběru (Gamčík & Kozumplík 1984).

Ejakulát berana by měl mít barvu mléčně bílou nebo jemně krémovou. Růžová barva svědčí o přítomnosti krve. Infekce v reprodukčním traktu berana se projevuje šedým nebo hnědým zbarvením berana. Objem ejakulátu je ovlivněn věkem a kondicí berana, sezonou a frekvencí odběru ejakulátu. Objem u dospělého berana by měl kolísat mezi 0,5 až 2 ml, u mladých zvířat potom v rozmezí od 0,5 – 0,7 ml. Objem ejakulátu u kozla by měl kolísat mezi 0,4 – 3 ml (Gamčík & Kozumplík 1984).

### 3.2.2 Mikroskopické posouzení kvality spermatu

V současné době se pro stanovení kvality spermií používá počítačově asistovaný systém analýzy spermií (CASA) anebo se používá optická nebo fluorescenční mikroskopie a průtoková citometrie. Nicméně vyčerpávající hodnocení morfologie spermií a jejich organel vyžaduje použití zobrazovacích technik s vysokým rozlišením, které nabízejí větší přesnost jako v případě skenování (SEM) nebo přenosové elektronové mikroskopie (TEM). Tyto techniky umožňují dektece změn v membránách, akrozomech nebo mitochondriích, které by poskytly informace o tom, proč se snižuje kvalita spermií během různých kryokonzervačních postupů (Arando et al., 2019).

Pomocí CASA lze zkoumat koncentraci, motilitu a morfologii spermií. Výhodou je, že rozbor je více objektivní a přesný než při hodnocením člověkem. Tato metoda dokáže během krátkého časového intervalu analyzovat velké množství spermií. Nevýhodou této metody je vysoká pořizovací cena a nutnost standardizace parametrů přístroje pro daný druh před použitím. Na přístroji je možné nastavit frekvenci pořizování snímků, zvětšení mikroskopu, velikost sledovaných objektů, velikost a počet sledovaných polí (Verstegen et al., 2002).

Do mikroskopického vyšetření spermatu patří veškeré metody, které hodnotí koncentraci spermií, aktivitu spermií, cizí příměsi, morfologii spermií, přežitelnost a rezistenci spermií (Gamčík & Kozumplík 1984). Tradičně je koncentrace spermií u malých přežvýkavců (normální 3,5 až 6 miliard v ml), pohyblivost (pohyb vln, individuální progresivní pohyb vpřed, pohyb spermií ředěných ředidlem; normální 80-90 %), morfologie spermií (normální 70-80 %), to jsou vlastnosti kvantitativní a kvalitativní, které jsou hodnoceny u malých přežvýkavců. Mezi další propracovanější tety patří testy tepelné odolnosti, akrosomální integrity, schopnost spermií cestovat v různých médiích (např. cervikální hlen, plavání v médiích atd.), test hyposobotického otoku, oplodnění in vitro, počítačové posouzení motility (Faigl et al., 2012). Životaschopnost beraních spermií po rozmrazení je nižší v části roku, kdy jsou hladiny

testosteronu a prolaktinu nejvyšší. Předpokládá se, že sezonní endokrinní změny, jako je testosteron a prolactin cirkanaální fluktace, může přímo ovlivnit přežitelnost spermií při mrazení (Martinez-Fresneda et al., 2020).

Melatonin působí na hypofýzu, aby zprostředkoval sekreci prolaktinu u beranů během změn délky dne. Funkční role prolaktinu při kontrole gonadální aktivity a sexuálního chování byla zobrazena. Místa nebo receptory vázané prolaktinem jsou široce distribuovány v řadě buněk a tkání jako jsou varlata a spermie a tím podporují steroidogenezi a spermatogenezi ve varletech. Testosteron je navíc nezbytný pro udržení spermatogeneze vazbou na androgení receptor, který je vyjádřen v různých typech buněk jako jsou Sertolliho buňky a spermie. Bylo navrženo, že testosteron ovlivňuje tekutost membrány spermií, a proto by mohl ovlivnit odolnost spermií vůči chladovému šoku (Martinez-Fresneda et al., 2020).

### 3.3 Analyzační metody zjišťování kvality ID

Mnoho metod, které se v současné době používají na posouzení stavu plazmatu, jsou založené na zvýšené propustnosti různých látek poškozených membrán spermií. Tyto metody zahrnují měření propustnosti membrány vodou v hypoosmotickém roztoku (Yániz et al., 2008).

Průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie slouží k posouzení integrity membrány velkého počtu buněk spermií barvených fluorochromem v relativně krátkém časovém období. Tyto metody jsou považovány za důležitý pokrok v hodnocení kvality spermií (Yaniz et al., 2008).

Během posledního desetiletí byla objevena řada fluorochromů a konjugovaných sloučenin, které s fluorescenčními sondami umožnily rozsáhlejší analýzu atributů spermií ve spojení s průtokovou cytometrií (Marco-Jimenez et al., 2005).

#### 3.3.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda jejíž pomocí lze hodnotit různé vlastnosti buněk včetně spermií, jako je například jejich počet, koncentrace, velikost, integrita membrán, akrozómu nebo kvalita DNA (Ormerod et al., 2000). Tyto parametry jsou detekovány pomocí optického systému, který zaznamenává, jak se jednotlivé částice rozptylují a vyzařují záření (Fernando et al., 2016). V průtokové cytometrii jsou označené spermie řízeny v laminárním proudění, kde prochází jedna po druhé buňkou, pokud jsou osvětleny jedním nebo více lasery. Rozptýlené nebo vyzařované světlo je filtrováno zrcadly a filtry, dosahujícími několika fotodetektorů, kde jsou signály zesíleny. Nakonec jsou informace digitalizovány a prezentovány v jednotkách různé fluorescenční intenzity pro výzkumné pracovníky (Martinez-Pastor et al., 2010).

Analyzované buňky se označí vhodným barvivem a následně rozptýlené procházejí v tekutém mediu průtokovým cytometrem, kde jsou označeny laserem. Nejčastěji je používán argonový laser o exsitační vlnové délce 488 nm. Barviva, jež jsou navázána v analyzované buňce, absorbují světlo o určité vlnové délce a následně vyzařují světlo s odlišnou vlnovou délkou. Buňky s rozdílnou vlastností pak vykazují odlišnou fluorescenci (Ormerod et al., 2000).

Jednou z metod, kterou průtoková cytometrie používá je cell sorting neboli třídění buněk. Vychází se z toho, že samčí spermie, které obsahují chromozom Y obsahují méně

DNA než samičí spermie s chromozomem X (Ormerod et al., 2000). DNA se obarví pomocí barviva, které se na ni naváže. Chromozom X na sebe tím pádem naváže více barviva než chromozom Y (Seidel et al., 2007).

Průtoková cytometrie je používána pro hodnocení spermií z hlediska posouzení více parametrů současně, proto poskytuje spolehlivější výsledky, které umožňují spolehlivější odhad oplodňovací schopnosti spermií (Pena, 2015). Po provedení této analýzy jsou spermie obarveny a množství barviva absorbovaného každou spermií je měřeno průtokovým cytometrem. Informace o jednotlivých spermiích lze získat díky tomu, že ze vzorku vstříkované do uzavřeného kanálku, kterým proudí tekutina (Graham, 2001).

Průtoková cytometrie se stala široce používanou analýzou spermií, která pomalu nahrazuje jiné techniky, které jsou časově náročné a náchylné k chybám (Martinez-Pastor et al., 2010).

Průtoková cytometrie byla velmi užitečná při hodnocení kvality spermií tím, že poskytla specifické, objektivní, přesné informace ve srovnání s tradičními metodami, které jsou založené na mikroskopii (Marco-Jimenez et al., 2005). Průtoková cytometrie má schopnost analyzovat více vlastností spermie najednou, což je slibné pro nové přístupy v analýze kvality spermií, které usilují o integraci různých testů s cílem dosáhnout lepšího pochopení funkčnosti spermií (Martinez-Pastor et al., 2010).

Membránově nepropustné sondy propidium jodid a homodimer ethidium jsou nejpoužívanější mořidla k udržení životaschopnosti. Jiné sondy životaschopnosti emitují zelenou fluoroscenci při vstupu do metabolicky aktivních buněk (Martinez-Pastor et al., 2010).

Fixovatelná barviva jsou zachována po fixaci, což nám umožňuje zpoždění analýzy. Další výhodou je společné použití analýzy životaschopnosti s technikami, které vyžadují permeabilizaci, která může způsobit ztrátu jiných barviv životaschopnosti (Martinez-Pastor et al., 2010).

### 3.3.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je metoda, kterou lze sledovat fyziologii buněk. Jedná se o základní metodu používanou v oblasti buněčné biologie a biotechnologie, umožňující sledovat molekuly v živých či fixních buňkách (Shahshavi a Youseffi, 2018).

Pomocí fluorescenční mikroskopie lze například hodnotit integritu plazmatické membrány spermií, mitochondriální aktivitu, kapacitaci spermií a stav akrozomu. Jedná se o metodu, která představuje alternativu pro průtokovou cytometrii (Magistrinia et al., 1997). Fluorescenční mikroskopie využívá toho, že buňky, které jsou předmětem zájmu fluoreskují, to znamená, že musí být schopné absorbovat energetické kvantum fotonů a uvolňovat energii emisí světla, respektive fluorescence. Fluorescence je emise světla, ke které dochází v nanosekundách. Dochází k filtraci světla s krátkou vlnovou délkou za účelem vizualizace světla s dlouhou vlnovou délkou. Důležitý faktor ovlivňující fluorescenční mikroskopii je tzv. Stokesův posun, což je rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního minima. Stokesův posun určuje sílu fluorescence pro tzv. fluorofory, dobu fluorescence a intenzitu fluorescenčního signálu, který lze z fluoroforu získat. Na základě toho volíme vhodná fluorescenční barviva (Sanderson et al., 2014).



### 3.4 Kryokonzervace

Kryokonzervace je definována jako nefyziologický proces, při kterém se spermie přizpůsobují osmotickým a teplotním změnám, které chrání před poškozením buněčné membrány a DNA (Saberivand et al., 2021). Kryokonzervace spermií (hlavně pomalé a rychlé zmrazení) zajišťuje zachování strukturální a funkční integrity spermií po delší dobu. Vhodná technika vyžaduje, aby buněčné membrány spermií byly schopny odolat mrazivému a rozmrazovacímu namáhání při kryokonzervaci (Igbokwe et al., 2019).

Kryokonzervace spermií je jednou z nejdůležitějších a nejpoužívanějších metod, které se využívají při konzervaci živočišných genetických zdrojů tak i v chově a šlechtění hospodářských zvířat. Zmražení biologického materiálu nám umožňuje prakticky časově neomezené uchování genofondu vysoce hodnotných plemenných jedinců, kteří přispívají k udržení specifické genetické diverzity druhů a plemen hospodářských zvířat (Špaleková, Chrenek, 2015).

Kryokonzervace spermatu je jednou z nejdůležitějších technik pro zlepšení reprodukce zvířat. Nicméně pokročilá reprodukční účinnost chovu s použitím kryokonzervovaného spermatu je možná díky zvýšení kvality spermií po rozmražení prostřednictvím vylepšení ředidla (Alcay et al., 2017). Na úspěšnosti kryokonzervace se podílejí různé parametry jako je například složení ředidla, použitý kryoprotektor a rychlost chlazení a rozmrazování (Saberivand et al., 2021). Již je prokázáno, že kvalita beraního spermatu je ovlivněna použitím ředidel při kryokonzervaci a během jejich skladování (Saberivand et al., 2021). Různé faktory včetně osmotického tlaku, fyziologického namáhání a kolísání teploty mrazem a rozmrazováním ovlivňují parametry kvality spermatu jako je životaschopnost, motilita a integrita membrány během kryokonzervace (Igbokwe et al., 2019).

Kryokonzervace způsobuje spermím řadu fyzikálních a chemických poškození, jako je útok volných radikálů, což snižuje životaschopnost a plodnost spermií. Spermatozoon je chráněn antioxidantním systémem v semenné plazmě, v membránách a v cytoplazmě, ale tento systém je částečně porušen a změněn během procesu kryokonzervace (Mata-Campuzano et al., 2014). Kryokonzervační postupy spermií indukují ultrastrukturální, biochemické a funkční změny, což snižuje životně důležité parametry, jako jsou pohyblivost nebo životaschopnost spermií (Arando et al., 2019). Kryokonzervační proces spermatu, který zahrnuje snížení teploty způsobuje oxidační stres na membránu spermií. To zase vede k nevratným poškozením organel spermií a změnám enzymatických aktivit, které jsou spojené se sníženou pohyblivostí spermií, funkční integritou membrány a oplozovací schopností (Bucak et al., 2009). Hlavními strukturami postiženými chladovým šokem jsou plazmatická membrána a akrosom spermatozoonu (Ozturk et al., 2020).

Přežití a pohyblivost spermií nejsou jediné parametry, které vedou ke zlepšení po kryokonzervaci (Robles et al., 2019).

Kryokonzervace způsobuje významné letální a subletální poškození spermií (Pini et al., 2018). Bylo prokázáno, že proces kryokonzervace způsobuje značné poškození spermií buněčnou dehydratací, osmotickým stresem a intracelulární tvorbou ledu (Pini et al., 2018). V důsledku toho mají zmrazené a rozmrazené spermie sníženou membránovou a akrosomovou

integritu, a kromě toho dochází k reorganizaci a porušení v důležitých lipidoproteinových asociacích v plazmatické membráně (Pini et al., 2018). Buněčná membrána má strukturu fluidní mozaiky, která je převážně složená z periferních a integrálních bílkovin, cholesterolu a lipidů (Ozturk et al., 2020). Kryokonzervace také významně snižuje toleranci vůči stresorům jako jsou reaktivní druhy kyslíku a osmotický šok (Pini et al., 2018). Tvorba ledových krystalů, oxidační poškození, poškození plazmatické membrány, fragmentace DNA, toxicita kryoprotektorů nebo osmotický stres jsou některé z faktorů, které ovlivňují subcelulární strukturu spermií (Arando et al., 2019).

Během kryokonzervace se obvykle životnost spermií sníží o více než 50 %. Poškození spermií je způsobeno tepelným šokem, tvorbou ledových krystalů, dehydratací změnou koncentrace solí a osmolality (Galarza et al., 2019). Je známo, že živé organismy hromadí aminokyseliny, které odolávají chladovému šoku. Aminokyseliny např. glutamin hrají důležitou roli při prevenci denaturace svalové hmoty bílkovin u ryb a mají také kryoprotektivní potenciál během fáze zmrazení kozích spermií (Bucak et al., 2009).

Kryokonzervace spermií zahrnuje mnoho samostatných procesů, a každý z nich může přispět ke změně proteomu spermií (Pini et al., 2018). Kryokonzervace vyvolává oxidační stres na spermiích, která způsobuje nevratné poškození struktury spermií a změny v membránové tekutosti a enzymatické aktivitě. Všechny tyto změny zhoršují motilitu, životaschopnost, integritu DNA a oplozovací schopnost spermií (Alcay et al., 2017). Kromě toho zmrazení intracelulární a extracelulární vody vytváří ledové krystaly. Extracelulární ledové krystaly poškozují buněčnou membránu osmotickým tlakem. Intracelulární ledové krystaly poškozují různé intracelulární orgány a struktury (Ozturk et al., 2020).

Kryokonzervace spermií beranů není účinná při umělé inseminaci bahnic ve stádech, která jsou chována pro komerční účely (Masoudi, 2016), ale naproti tomu je kryokonzervace spermatu účinnou technikou pro zlepšení programů chovu koz (Alcay S. et al., 2016). Kryokonzervace narušuje fosfolipidovou asymetrii v plazmatických membránách beraních spermií. Ultrastrukturální poškození plazmatických membrán dále pak zvyšuje náchylnost k peroxidaci lipidů při vysoké produkci reaktivních druhů kyslíku během procesu zmrazení a rozmrazení predisponují beraní spermie sníženou motilitou a oplozovací schopností. Poškození způsobené oxidačním namáháním může být obcházeno tím, že do ředidla beraního spermatu před procesem zmrazení přidáme antioxidanty (Bucak et al., 2009).

Beraní spermie jsou nejvíce náchylné k poškození při teplotě od -10 do -25 °C (Byrne et al., 2000). Kryokonzervace beraního spermatu není jednoduchý proces. Tento proces způsobuje významnou míru poškození beraního spermatu (Faigl et al., 2012). Data naznačují, že rozmrazení beraního spermatu vyvolává předčasnou kapacitaci spermatu a zkracuje životnost buněk (Salamon et Maxwell, 2000). Došlo také k významnému snížení motility v důsledku doby strávené skladováním v kapalném stavu a při rozmrazování a zmrazení (Faigl et al., 2012). Pomocí analýzy CASA Moses a kol. (1995) zjistili, že všechny kinetické parametry beraního spermatu byly změněny kryokonzervací. Spermie přežvýkavců jsou charakterizovány vysokou schopností oxidačního dýchání a nerušeného mitochondriálního dýchání, což je důležité proto, aby sperma berana mohlo úspěšně proniknout do děložního čípku (Faigl et al., 2012).

Navzdory úspěchu, který byl dosažen při kryokonzervaci spermií, tak postupy, které se běžně používají, způsobují závažné změny ve funkčnosti spermií. Někteří vědci se domnívají, že kryokonzervace spermií je způsobena fragmentací DNA, která způsobuje, že se

jednovláknová DNA ve spermiích láme (Amidi et al., 2016). Oxidační stres nejen narušuje buněčné membrány, ale také způsobuje lámání a poškození DNA (Ozturk et al., 2020).

Ředidla spermatu (hlavně vaječný žloutek a mléko), která se používají při kryokonzervaci, chrání spermie před tepelným šokem, podporují stabilizaci plazmatické membrány a slouží jako energetické substráty pro buňky, čímž se zachovává jejich životaschopnost (Igbokwe et al., 2019).

Nejčastěji používané ředidlo pro kryokonzervaci kozlího ejakulátu je vaječný žloutek či odstředěné mléko. U obou však bylo prokázáno, že mohou poškozovat spermie. Kozlí spermie jsou náchylné k biochemickým a fyziologickým procesům, ke kterým dochází během mražení a rozmražení ejakulátu. V semenné plazmě jsou přesto přítomny specifické faktory zabraňující poškození způsobenému kryogenními postupy (Gangewar et al., 2016). Škodlivé účinky, které souvisejí se semennými plazmatickými enzymy, koalugační enzym vaječného žloutku a bulbouretrální sekrece glykoproteinu-60 u kozího spermatu mají nepříznivý účinek na kozí spermie při interakci s ředidlem spermatu živočišného původu jako je vaječný žloutek nebo mléko. Omezení, proto vyžadují částečnou nebo úplnou výměnu živočišných ředidel rostlinnými ředidly jako je například mléko z tygřích ořechů, které poskytují velké množství výživného mléka při extrakci (Igbokwe et al., 2019). U kryokonzervace kozlího spermatu jsou nepoužívanější ředidlo glukóza na bázi odstředěného mléka a tris-glukóza-kyselina citronová-vaječný žloutek (Faigl et al., 2012). Hlavní faktor, který omezuje široké používání zmrazeného spermatu u reprodukce koz, je snížení životaschopnosti spermií během procesu zmrazení a rozmrazení, který vede k biologickým a funkčním změnám spermií (Igbokwe et al., 2019).

Studie ukázaly, že tygří ořechy obsahují glukózu, fosfolipidy, aminokyseliny, draslík, vitamín C a E, které jsou důležitými složkami ředidel spermatu. Relativně vyšší motilita pozorovaná u spermií zředěných mlékem z tygřích ořechů je připisována značné hladině glukózy v tygřích ořechích. Energie je potřebná k tomu, aby se udržoval metabolismus spermií. Primárním zdrojem energie v ředidle spermtu je glukóza. Tygří ořechy mají vysokou hladinu fosfolipidů a nízkou viskozitu, a proto je vhodné je používat v ředidlech spermatu (Igbokwe et al., 2019).

Jimenez-Rabadan a kol. (2015) ve své studii tvrdí, že kryokonzervace spermií u malých přežvýkavců byla doposud konvenční technikou, která zahrnuje tři fáze: chlazení na 5 °C, ekvilibrace při této teplotě po proměnlivou dobu a zmrazení v párách tekutého dusíku. Membránové fosfolipidy procházejí fázovým přechodem při ochlazení z 36 °C na 5°C. Tyto fázové změny jsou specifické pro jednotlivé druhy a vedou k různým reakcím, které se liší v závislosti na změny teploty spermií. Během fázového přechodu ztrácí plazmatická membrána spermatozonu svoji strukturu tekuté mozaiky a mění se na gel. Tento přechod mění kinetiku enzymů a snižuje životaschopnost buněk po rozmrazení. Negativní změny následované fázovým přechodem mají za následek poškození buněk způsobené oxidačním stresem a chladovým šokem (Ozturk et al., 2020). Fosfolipidy redukují tvorbu ledových krystalů, pomáhá stabilizovat buněčnou membránu a chrání spermie před chladovým šokem (Igbokwe et al., 2019).

Kryokonzervace spermatu je praktická metoda ukládání spermie buněk a poté zlepšit genové přednosti a posílit reprodukční a produkční vlastnosti. Umělé oplodnění zmrazeným a rozmrazeným beraním spermatem však u ovcí poskytuje nízkou plodnost, což má za následek, že kryokonzervace beraního spermatu musí být zlepšena (Amini et al., 2019).

Během kryokonzervace různé stresory jako je osmotický tlak, fyzikálně-chemické napětí a teplotní výkyvy mražení a tání, vytvářejí ROS (redukce oxidačního stresu) a také LOP (peroxidace lipidů) buněčné membrány, se snižují kvalitativní vlastnosti spermatu jako je životaschopnost, motilita a integrita plazmatické membrány (Amini et al., 2019). Jeden z důležitých a účinných faktorů při zlepšení kvality spermií během kryokonzervace může být použití ředidla a jeho přísad (Saberivand et al., 2021). Reaktivní oxidační látky vznikají během kryokonzervace spermií a způsobují některé fyzikální a chemické změny v membráně spermií, proto početné výzkumy zkoumaly účinek různých syntetických a přírodních antioxidantů na spermiích (Baghshahi et al., 2014).

Během procesu zmrazení a rozmrazení dochází k různým biochemickým a funkčním změnám spermatu. Krystalizace ledu a peroxidace lipidů vyvolávají oxidační stres, který vede k tvorbě reaktivních druhů kyslíku (ROS) během kryokonzervace. Rovnováha úrovně ROS je zjevně zásadní, protože nadprodukce vede ke snížení pohyblivosti, životaschopnosti a oplozovací schopnosti. Spermie jsou chráněné antioxidantními systémy v semenné plazmě, v membránách a v cytoplazmě, ale tento systém je částečně odstraněn a změněn během kryokonzervace. Proto může mít přidání antioxidantů do prodlužovače pozitivní účinky při kryokonzervaci spermatu různých druhů (Alcay et al., 2016).

Kromě toho narušení integrity plazmatické membrány způsobené odzbrojením lipidů membráně během kryokonzervace může vyvolat další buněčné poškození a následně vést ke smrti spermií. HOST (hypoosmotický test) se nedávno ukázal jako užitečný při detekci jemných změn ve funkční integritě na membráně beraních spermií. Bylo oznámeno, že existuje přímá souvislost mezi funkční membránovou integritou spermií a pohyblivostí spermií. Pak se dá předpokládat, že motilita může souviset s integritou plazmatické membrány (Alcay et al., 2015). HOST je test, kterým se hodnotí funkčnost plazmatické membrány bičíku spermie. Vzorek ejakulátu se smísí s hypoosmotickým roztokem. Pokud je buněčná stěna v pořádku, bičík spermie se začne kroutit, zvětšovat svůj objem a následně bobtnat (Gadea et al., 2005). Narušení plazmatické membrány během kryokonzervace spermatu může mít za následek únik intracelulárních složek jako jsou metabolické a akrosomální enzymy a ATP což vede k poklesu pohyblivosti a kvality spermií po rozmražení spermatu (Saberivand et al., 2021).

Akrosomy beraních spermií jsou citlivější než u jiných hospodářských zvířat, pokud se jedná o přežití při kryokonzervaci. Bylo prokázáno, že provést kryokonzervaci beraního spermatu je náročnější než u jiných hospodářských zvířat. Pro kryokonzervaci beraního spermatu byly vyvinuty různá ředidla jako například lyofilizovaný vaječný žloutek (Alcay et al., 2015).

### **3.5 Kryoprotektory**

Existují nepropustné neboli vnější kryoprotektory a propustné neboli vnitřní kryoprotektory, v závislosti na jejich schopnosti proniknout biologickými membránami. Mezi nepropustné kryoprotektory patří například glukóza, sacharóza nebo polyvinylpyrrolidon (PVP). Mezi propustné kryoprotektory patří dimethylsulfoxid, 1,2-propandiol, glycerol, ethylenglykol a metanol (Robles et al., 2019).

Kryoprotektory se přidávají do ředidel před zmrazením, aby se snížily účinky chladového šoku a oxidační stresové faktory (Ozturk et al., 2020). Kryoprotektivní mechanismus lipoproteinů s nízkou hustotou nebyl zcela objasněn, ale není pochyb o tom, že fosfolipidy a proteinové faktory jsou, zato zodpovědné (Aboagla & Terada, 2004). Výběr kryoprotektoru je rozhodující pro úspěšnou kryokonzervaci spermií (Mata-Campuzano et al., 2015). V oblasti kryobiologie bylo úspěšně testováno mnoho kryoprotektivních látek při kryokonzervaci gamet různých druhů (Ozturk et al., 2020).

Je také zajímavé zmínit, že některé běžně používané kryoprotektory mají vysokou toxicitu (Robles et al., 2019).

Kryoprotektory (Glycerol, ethylen glykol, sacharidy), které se vážou na intracelulární molekuly vody a zabraňují tvorbě ledových krystalů nemohou vyjít z buňky, pokud jsou rozmrazeny. Proto je intracelulární osmotická rovnováha porušena. Když se extracelulární ledové krystaly rozpustí během tání tak je extracelulární osmotický tlak vyšší než intracelulární osmotický tlak. Buňka má tedy tendenci přijímat vodu zvenčí. Vzhledem k tomu, že intracelulární kryoprotektant nemůže odejít z buňky, se buňka zvětšuje, což nakonec poškozuje buněčnou membránu (Ozturk et al., 2020).

Glycerol je nejčastěji používaný propustný kryoprotektor ředidla zmrazeného spermatu, ale může být cytotoxický (Tonieto et al., 2010). Bylo prokázáno, že vysoké koncentrace glycerolu vykazují toxický účinek během kryokonzervace. Pokud je koncentrace glycerolu vyšší než 8 %, tak má glycerol toxický účinek na beranní sperma (Ozturk et al., 2020). Glycerol je neúčinnější kryoprotektant, který lze přidat v jednom nebo dvou krocích (Faigl wet al., 2012). Svůj sekundární účinek glycerol vykazuje v intracelulárním prostředí (Ozturk et al., 2020). Ředidla s různými kryoprotektory jako je glycerol mají být použity k ochraně různých buněčných částí (Alcay et al., 2015). Glycerol jako kryoprotektor zabraňuje molekulám vody, aby se z nich staly velkoobjemové ledové krystaly během procesu mrazení. Kromě toho, že má glycerol osmotický účinek na buňky, tak má také schopnost se vázat na buněčnou membránu (Ozturk et al., 2020). Konečná doporučená koncentrace glycerolu je 6-7 %. Mrazičí protokoly, které byly používané pro zmrazení spermatu jelena jsou velmi podobné těm, které se používají při kryokonzervaci beraního spermatu (Faigl et al., 2012).

Velké množství kryoprotektiv včetně glycerolu a dimethylsulfidoxidu (DMSO) byly použity při kryokonzervaci gamet různých druhů s různými výsledky. Glycerol a DMSO se obvykle používají při koncentraci 6–7 % v ředidle na bázi kyseliny tris-citronové při 37 °C při použití spermií malých přežvýkavců. Glycerol působí snížením bodu tuhnutí vody, chelatací kovových iontů, nahrazením intracelulární vody profílu elektrolytu v nezmrzlé části. Několik studií ukázalo synergetický účinek při kombinaci DMSO a glycerolu v ředidle při kryoprotekci spermií u některých druhů. DMSO jako rychle propustný kryoprotektor má nižší molekulovou hmotnost než glycerol (Saberivand et al., 2021).

Zatímco kryoprotektory, jako je vaječný žloutek, obecně pomáhají minimalizovat poškození, tak rozsah jejich účinků na spermie nejsou dobře charakterizovány. Kromě toho modifikace spermií proteomu kryoprotektivními činidly, zvláště všudy přítomně používaným vaječným žloutkem požaduje další šetření (Pini et al., 2018). Různá ředidla na bázi vaječného žloutku, sojového lecitinu a mléka se používají k ochraně spermií před poškozením během zpracování nebo zmrazení (Moradi et al., 2013).

Ethylenglykol je další kryoprotektor, který má stejný účinek jako glycerol během procesu zmrazení a rozmrazení (Ozturk et al., 2020). Ethylenglykol, známý také jako ethan-1,2diol, je

kryoprotektant, který je schopný proniknout do buňky. Vzhledem k tomu, že molekulová hmotnost ethylenglykolu je nižší než u glycerolu, tak může ethylenglykol snadno procházet buněčnou membránou a je méně toxický než glycerol. Pokud však snížíme koncentraci glycerolu a ethylenglykolu sníží se nám motilita spermií (Ozturk et al., 2020).

Jimenez-Rabadan a kol. (2015) ve své tvrdí, že v posledních letech bylo provedeno několik studií, aby se zabránilo používání kryoprotektorů živočišného původu. Tak prodlužovače založené na soji nebo ředidlo obsahující cukry s vysokou molekulovou hmotností v kombinaci s propustnými kryoprotektanty jako je glycerol, byla studována u zmrazení spermií u mnoha druhů. Kromě toho byly některé výzkumy zaměřeny na vyhodnocení účinku při použití propustných kryoprotektorů, sacharózy nebo dokonce na techniky bez použití kryoprotektorů, které jsou spojeny s jinými metodami konzervace jako je ultra-rychlé mrazení. U ovcí se konvenční postup zmrazení používá pro kryokonzervaci spermií, i když vzhledem k jeho omezenému úspěchu s cílem zabránit tvorbě ledových krystalů jsou nové postupy vyvíjeny při ultra rychlém mrazení (Arando et al., 2019). Někteří vědci naznačují, že kryoprotektory s nízkou molekulovou hmotností mohou způsobit menší poškození spermií ve srovnání s glycerolem (Ozturk et al., 2020).

Pozorování spermatu pomocí TEM umožňuje identifikovat podrobné vady při kryokonzervačním postupu, který nelze pozorovat světelnou mikroskopií. V současné studii vykazuje střední část celkem 66–73 otáček mitochondrií v beranním spermatu a jejich vady, které souvisejí s konfigurací byly dříve spojené s pohyblivostí spermií. TEM ukazuje destrukci a narušení mitochondriálních cristae se světlejší mitochondriální maticí ve vitrifikovaných vzorcích. Zjištěné mitochondriální vady v těchto skupinách mohou být přičítány buněčné smrti, která je spojená s poklesem pohyblivosti spermií. Vady mitochondrií zjištěných TEM ve vitrifikovaných vzorcích spermií mohou vysvětlit sníženou pohyblivost spermií. Také integrita akrosomu byla významně snížena po vitrifikaci, toto bylo patrné po celou dobu pozorování nepřítomnosti obsahu akrozomů a poškození akrosomální membrány (Arando et al., 2019). Arando a kol. (2019) dospěli ve své studii, že vitrifikace má vysoce negativní dopad na spermie, a že je potřeba dalších studií na zavedení nových ochranných prostředků pro membrány akrosom a mitochondrie během vitrifikace.

Cukry se také podílejí na kryokonzervaci spermií a slouží jako regulátor osmotického tlaku a zdroj energie, k redukci tvorby buněčného ledu a kryoprotektor. Trehaloza je disacharid, který váže dvě molekuly D-glukózy a stabilizuje membránové fosfolipidy (Ozturk et al., 2020). Trehaloza může být použita jako kryoprotektor, protože podporuje buňky dehydratace, která snižuje negativní účinky vody protékající spermiemi během zmrazení a tvorbu ledových krystalů. Trehaloza také interaguje s membránou fosfolipidů a bílkovin, což membráně poskytuje více flexibility proti poškození během procesu kryokonzervace (Tonieto et al., 2010). Trehaloza vykazuje svůj ochranný účinek v extracelulárním prostředí, tím že snižuje velikost molekul vody tím, že váže atomy vodíku (Ozturk et al., 2020). Ultramikroskopické poškození plazmatické membrány bylo spojeno přidavkem EDTA (kyselina ethyldiamintetraoctová) nebo trehalozy do mrazicího média (Arando et al., 2019). Tonieto a kol. (2010) ve své studii zjistili, že použití ředidla obsahujícího 100 mM trehalozy a 8 % LDL (lipoproteiny s nízkou hustotou) může zachovat pohyblivost spermií po rozmrazení a integritu membrány zmrazených beraních spermií stejně efektivně jako ředidla tradičních kryoprotektantů jako je vaječný žloutek a glycerol.

Zatímco vaječný žloutek byl široce používán jako kryoprotektant, mnoho studií se zaměřilo na jiné možnosti zejména sojový lecitin. Sojový lecitin se vyhýbá použití produktů živočišného původu, což pomáhá předcházet mikrobiální kontaminaci a pomáhá dosáhnout standartizace, protože složení vaječného žloutku se může mezi dávkami značně lišit (Mata-Campuzano et al., 2015).

Sojový lecitin je přírodní směs fosfatidylcholinu a několika mastných kyselin (Sun et al., 2019). Obecně sojový lecitin fosfatidylcholin obsahuje větší množství arachidonických kyselin, dokosahexaenové kyseliny a nenasycených mastných kyselin s uhlíkatým řetězcem C18 (Sharafi et al., 2014). Sojový lecitin by mohl nahradit lipoprotein s vysokou molekulovou hmotností a fosfolipidy z vaječného žloutku. Může také zabránit nebo zlepšit poškození plazmatické membrány spermií, ke kterému dochází během prodloužení, chlazení a kryokonzervaci. Jiné studie rovněž potvrdili, že sojový lecitin by mohl být vhodnou alternativou vaječného žloutku při kryokonzervaci kozlího spermatu kvůli lepší ochraně membrány před poškozením chladovým šokem. Pro úspěšné oplodnění musí spermie udržovat plazmatickou membránu a akrosomální integritu. Fosfolipidy a cholesterol ze sojového lecitinu můžou chránit plazmatickou membránu a akrosom k udržení pohyblivosti při nízké teplotě (Sun et al., 2019).

Sojový lecitin chrání chromatin spermií efektivněji než vaječný žloutek. Předchozí studie zjistila, že tento kryoprotektor má relativně vysokou antioxidační kapacitu. Proto nižší stupeň poškození chromatinu a další příznivé účinky jako je nižší podíl poškozených akrosomů, může být způsoben tímto větším antioxidačním účinkem (Mata-Campuzano et al., 2015). Spermie navíc obsahují větší poměr polynenasycených tuků a nízký poměr cholesterolu k poměru fosfolipidů, které způsobují, že je nadměrně citlivý na nadměrnou produkci reaktivního kyslíku s následnou peroxidací lipidů (Sharafi et al., 2014).

Sojový lecitin snižuje problémy vaječného žloutku v ředidle jako je kontaminace, standartizace a aglutinace. Dále sojový lecitin poskytuje prostředí pro peroxidaci lipidů okolo spermií (Sharafi et al., 2014).

Sojový lecitin nahrazuje lipoprotein s vysokou molekulovou hmotností a fosfolipidy, které mohou snížit hygienická rizika u prodlužovačů a můžou zabránit poškození plazmatické membrány spermií během prodloužení, chlazení a kryokonzervace. Několik studií hodnotilo účinky sojového lecitinu jako primárního zdroje lipoproteinů v ředidle spermatu používaného pro kryokonzervaci kozlího spermatu, některé výsledky byly slibné pro kvalitu spermatu po rozmrazení. Kromě toho sojový lecitin má fyziologický účinek snížení chladičho bodu a snížení výměny plazmogenů, čímž se omezí možné mechanické poškození spermií během zpracování spermatu a kryokonzervace (Sun et al., 2019).

Různé přírodní přísady, jako je extrakt ze zeleného čaje, extrakt z rozmarýnu, rybí olej, byly zkoumány, aby se snížilo poškození beraního spermatu při kryokonzervaci (Amini et al., 2019). Pozorování axenomu po zmrazení beraních spermií neodhalily vady, ale zjistili, že při vitifikaci došlo k některým změnám na středním úseku (absence axenomu a mitochondrií) nebo na úrovni hlavního úseku jako je absence vnějších mikrotubulů (Arando et al., 2019). Pokus o zavedení prodlužovače rostlinného původu pro beraní sperma v posledních letech odhalil, že exogenní fosfatidylcholin ze sojových lecitinů by byl dokonalým kryoprotektantem na ochranu spermie proti poškození mrazem a rozmrazením (Motlangh et al., 2014).

Strategie pro zlepšení kvality spermií během skladování, zmražení a rozmražení může být ve vylepšení ředidla spermatu. Mnoho studií zkoumalo za tímto účelem použití různých doplňkových látek, aby se snížilo poškození spermií během skladování (Amini et al., 2019). Amini a kol. (2019) ve své studii prokázali, že ochranná kapacita lyofilizované mateří kašičky při přidání do základního prodlužovače na berenní spermie proti poškození způsobené chlazením nebo mražením. Dále Amini a kol. (2019) ve své studii tvrdí, že stanovení některých funkčních vlastností spermií jako je pohyblivost, životaschopnost a integrita membrány, by mohlo odrážet úspěšnost skladování a může být považováno za přijatelné ukazatele použitelnosti spermií. Během procesu rozmrazování krystalizace ledu a peroxidace lipidů způsobují funkční a biochemické změny ve spermatozomu, které vyvolávají oxidační stres, což vede k tvorbě ROS (Alcay et al., 2017).

### 3.5.1 Vaječný žloutek

Vaječný žloutek je běžnou součástí ředidla spermatu, který chrání sperma před chladovým šokem. Předpokládá se, že vaječný žloutek působí na úroveň buněčných membrán (Aboagla & Terada, 2004). Vaječný žloutek je v současné době nejčastěji používaným nepronikavějším kryoprotektorem (Tonieto et al., 2010). Vaječný žloutek je nejčastější složkou, která se používá v ředidlech spermatu savců při ochraně spermatu před poškozením mrazem. Účinnou složkou vaječného žloutku je protein s nízkou hustotou, který zabraňuje chladovému šoku během kryokonzervace. Kromě toho jsou fosfolipidy vaječného žloutku jako je fosfatidycholin, velmi důležité pro udržení integrity spermií během procesu zmrazení a rozmrazování (Alcay et al., 2016). Kampsemidt a kol. tvrdí, že vaječný žloutek chrání sperma před a během procesu zmrazení tím, že vyvolává rezistenci proti chladovému šoku a chrání před poškozením mrazem. Mechanismus účinku, kterým vaječný žloutek poskytuje ochranu je připisována přítomnosti lipoproteinů, které přilnou k membráně spermií během kryokonzervace, čímž se spermií zachovají (Yimer et al., 2014)

Graham a Foote (1987) tvrdí, že fosfolipidy z vaječného žloutku by se mohly spojit s membránou spermií a tím snížit teplotu fázového přechodu. To by mohlo pomoci předcházet chladovému šoku. Kromě toho má vaječný žloutek další vlastnosti při ochraně před toxickými reakcemi složek semenné plazmy, včetně antibakteriální kationtové peptidy, které se uvolňují z bílkovin s dlouhým řetězcem a mohou způsobit vážné poškození membrány (Yimer et al., 2014).

Aboagla a kol. (2004) zjistili, že vaječný žloutek hlavní ochranný prostředek proti chladovému šoku, není snadno rozpustný v roztoku, který obsahuje velké množství trehalozy. Na druhou stranu by vaječný žloutek mohl být rozpustný, pokud se přidá dodecyl sulfát sodný (SDS). V tomto ohledu byl SDS zahrnut do mrazicích ředidel spermatu mnoha druhů.

Mnoho vědců tvrdí, že při oplození in vitro, pokud je použit vaječný žloutek, se výrazně zvyšuje procento proniklých spermií do oocytů (Aboagla & Terada, 2004). Naproti tomu Bielfield a kol. (1990) prokázali, že mytí spermií po inkubaci ve vaječném žloutku výrazně zvýšilo výskyt reakce na akrosomu, stejně tak procenta spermií proniknutých do oocytů ve srovnání s použitím bazálního činidla. Aboagla a kol. (2004) se domnívají, že vaječný žloutek může vyvolat reakci na akrosomu spermií před zmražením, což vede k vyšším procentuálním



ztrátám spermií po zmrazení. Při použití vaječného žloutku jako kryokonzervačního ředidla spermatu je pozorována vysoká oplozovací schopnost spermií, ale zároveň přidání takové složky, která je živočišného původu, představuje potenciální mikrobiologická rizika (Sun et al., 2019).

Bylo zjištěno, že inkubace ve vaječném žloutku může snížit poměr cholesterolu a fosfolipidu spermií. (Moubasher et al., 1985)

Aboagla a kol. (2004) ve své práci zmiňují, že mechanismus ochrany spermií cukrem trehalózou během kryokonzervace byla navržena několika vědci. Aboagla a kol. (2004) tvrdí, že použití trehalozy, pokud je přidána do ředidla během zmrazení kozích spermií spolu s vaječným žloutkem může mít velký význam. Dále podle Aboagla a kol. (2004) hraje přidání vaječného žloutku významnou roli během kryokonzervace kozích spermií a že přidání trehalozy významně zlepšilo její kryoprotektivní účinky. Kromě toho ani glycerol ani vaječný žloutek by sami o sobě nemohli snížit procento neporušených akrosomů spermií, nicméně kombinace těchto dvou hlavních kryoprotektivních látek významně snižuje procento neporušeného akrosomu spermií. Pini a kol. (2018) ve své studii předpokládají, že proteom spermií bude významně změněn, jak vystavením vaječnému žloutku, tak i kryokonzervací, a že proteiny, které jsou získány nebo ztraceny, mohou mít důležité funkční role, včetně změny zmrazeného i rozmrazeného beraního spermatu k úspěšnému dosažení děložního čípku ovce. Dále Pini a kol. (2018) zjistili, že celkem 15 proteinů dříve rozpoznávaných v proteomech vaječného žloutku byly ve spermií po přidání vaječného žloutku ve výrazně vyšších hladinách.

Kryoprotektivní povaha vaječného žloutku je do značné míry připisována proteinu s nízkou hustotou, je však možné, že i jiné proteiny, které jsme v této studii rozpoznaly mohou hrát určitou roli v kryokonzervaci, například antioxidační kapacity kovových chelatorů hemopexinu a transferinu. Některé bílkoviny obsažené ve vaječném žloutku mohou mít nepříznivé účinky na spermie po rozmrazení. ApoA1, hlavní proteinová složka lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL), je ústředním bodem cholesterolu efflux, který může mít negativní účinky na funkci spermií (Pini et al., 2018).

Důkazy naznačují, že lipoproteiny s nízkou hustotou jako je lecitin jsou frakce vaječného žloutku vykazující nejvyšší ochranou schopnost a udržovat integritu fosfolipidové membrány spermií během kryokonzervace. Kromě toho některé studie uvádějí, že pohyblivost spermií po zmrazení je lepší při použití čistých lipoproteinů s nízkou hustotou než při použití celého vaječného žloutku. Na druhou stranu by mohl být vaječný žloutek rozpuštěn přidáním dodecylu síranu sodného do ředidla spermatu, aby došlo ke snížení nežádoucích účinků. Přidání dodecylu síranu sodného do ředidla vaječného žloutku napodobuje hydrofobní prostředí existující v biologických membránách bez změny konformace proteinů (Baghshahi et al., 2014). El Kon a kol. (2010) ve své studii uvedli, že ředidlo tris-glycerol vaječný žloutek obsahující 0,05 % dodecyl síran sodný zlepšil životaschopnost, integritu akrosomu a plodnost spermií u koz.

Navíc vaječný žloutek je obvykle zahrnut jako neprostupný kryoprotektor do ředidel zmrazených spermií. Hlavní nevýhodou vaječného žloutku je, že je to nedefinovaná substance, což vede k variabilitě mezi dávkami. Kromě toho je živočišného původu, což by mohlo způsobit přenos chorob (Jimenez – Rabadan et al., 2015). Navzdory příznivé efektivitě ředidla vaječného žloutku, je použití vaječného žloutku spojeno s rizikem přenosu onemocnění a kontaminace (Sun et al., 2019).

Ředidla také vykazovala různé účinky na mnoho veličin, přičemž vaječný žloutek a lecitin významně ovlivňují výsledek kryokonzervace (Mata-Campuzano et al., 2015).

Nicméně vaječný žloutek by mohl prezentovat kontaminaci, některé složky by mohly negativně ovlivnit kryokonzervaci spermií a standartizace je zpochybněna variabilitou mezi dávkami. Použití sojového lecitinu by mohlo zabránit některým problémům a mohlo by to přinést výsledky srovnatelné s vaječným žloutkem (Mata-Campuzano, 2015).

Nedávná studie rovněž uvedla, že kozí semenná plazma obsahuje speciální enzymkoalugující vaječný žloutek, který může ovlivnit životaschopnost spermií prostřednictvím interakce s vaječným žloutkem. Je tedy obtížné udržovat kontrolu jakosti na výsledek kryokonzervace spermatu při použití mrazicích medií na bázi vaječného žloutku (Sun et al., 2019). Alcaay a kol. (2015) ve své studii úspěšně kryokonzervoval kozí spermie různými antioxidačními doplňky lyofilizovaných ředidel na bázi vaječného žloutku, které chránily motilitu, plazmatickou membránu, akrosom a integritu DNA. El-Kon a kol. (2010) ve své studii uvedli, že ředidlo Tris žloutkový glycerol, který obsahoval 0,05 % SDS zlepšil životaschopnost, integritu akrosomů a oplozovací schopnost spermií u koz.

Vaječný žloutek a ředidla odstředěného mléka jsou nejčastější přísady živočišného původu, které se používají při kryokonzervaci spermatu. Vaječný žloutek je obecně považován za účinnou složku prodlužovače spermatu pro ochranu spermií před chladovým šokem a přechodovým efektem lipidové fáze (Alcaay et al., 2015).

Lyofilizované ředidlo vaječný žloutek může být skladován déle a použit později v kryokonzervaci spermatu (Alcaay et al., 2015). Dlouhodobě skladovaná lyofilizovaná ředidla na bázi vaječného žloutku byla použita pro kryokonzervaci beraního spermatu (Alcaay et al., 2016).

Alcaay a kol. (2015) se domnívají, že lyofilizované ředidlo vaječného žloutku může být úspěšně použito při maražení spermatu. Proto může lyofilizované ředidlo vaječného žloutku usnadnit kryokonzervační procesy spermatu v chovném průmyslu ovcí.

Ředidla na bázi vaječného žloutku patřily mezi první látky, které zajistily přiměřenou motilitu a plodnost po rozmrazení pro komerční využití. Vaječný žloutek se později vyvinul v univerzální ředidlo, které našelo uplatnění při kryokonzervaci u lidí a zvířat (Sun et al., 2019).

Typ použitého vaječného žloutku a koncentrace hrají důležitou roli při kryokonzervaci kozlího spermatu (Yimer et al., 2014). Yimer a kol. (2014) ve své studii zjistili, že při použití 10 % vaječného žloutku v citrátu bylo nejvhodnější pro vyšší míru výtěžnosti živých spermií po rozmrazení a motilitu. V mnoha studiích se pohybuje motilita po rozmrazení zmrazeného kozlího spermatu vaječným žloutkem mezi 35,4 – 63,2 %. Alcaay a kol. (2016) ve své studii zjistili, že se motilita po rozmrazení ve lyofilizovaných antioxidačních skupinách schoduje se zjištěním dřívějších studií. Hladina vaječného žloutku je u koz proměnlivá. Například použití 20 % vaječného žloutku v ředidle na bázi Tris spolu s praním spermatu mělo za následek dobrou kvalitu kozlího spermatu po rozmrazení (Yimer et al., 2014).

Omega-3 vaječný žloutek v ředidle citrátu se zdá být účinný při zachování morfologie spermií během kryokonzervace (Yimer et al., 2014). Yimer a kol. (2014) ve své studii zjistili, že použití Omega-3 mastných kyselin obohacených vaječným žloutkem pravděpodobně pomohly kompromitovat možný účinek očekávané škodlivé interakce mezi EYCE a vaječným žloutkem. Omega-3 mastné kyseliny jsou esenciální polynenasycené mastné kyseliny potřebné pro fyziologické procesy včetně reprodukce (Yimer et al., 2014).

Bylo zjištěno, že ředidla obsahující vaječný žloutek mohou mít škodlivé účinky na životaschopnost a integritu akrosomu spermií u některých druhů (Baghshahi et al., 2014). Výsledky studie Baghshahi a kol. ukázaly, že náhrada 15 % kompletního vaječného žloutku s 8 % lyofylizovaným LDL v ředidle měly nepříznivý vliv na motilitu, parametry pohybu, životaschopnost a integritu plazmatické membrány kryokonzervovaných spermií. Na druhou stranu kombinace vaječného žloutku s SDS zvýšila kvalitu spermií po kryokonzervaci.

### 3.5.2 Mateří kašička

Mateří kašička je hustá smetanově žlutá látka typické vůně a kyselé chutě. Kyselost má od pH 2,5 do 4,8. není zcela rozpustná ani ve vodě, ani v etylalkoholu, chloroformu, acetonu a fyziologickém roztoku. Během stárnutí se výrazně mění její elektrická vodivost, která může být ukazatelem její kvality (Veselý, 2003).

Mateří kašička je produkována v hypo-falantu a v mandibulárních žlázách dělnic včely medonosné a slouží jako primární potrava královny včely medonosné a larv včely medonosné během prvních tří dnů (Moradi et al., 2013).

Objem vody v kašičce dosahuje hodnot 65–70 %, a proto musí být uchovávána v chladu, aby se zabránilo poškození a aby byla zachována její nutriční hodnota. Kromě toho je mateří kašička bohatá na ionty vápníku, což může zvýšit pohyblivost spermií omezenou kapacitou buňky spermií. Cukry tvoří do 40 % sušiny, bílkoviny asi 30 %, tuky 12-20 % a minerální látky až do 4 % sušiny (Veselý, 2003; Amini et al., 2019). Nukleové kyseliny se vyskytují v množství okolo 0,35 %. V mateří kašičce byly prokázány ve značném množství aminokyseliny, celkem asi 25 různých druhů. Většina bílkovin mateří kašičky jsou různé enzymy. Byl v ní prokázán i peptid, který má podobné hormonální účinky jako inzulin. Ve významném množství jsou v mateří kašičce obsaženy prakticky všechny známé vitamíny. (Veselý, 2003). Mateří kašička také obsahuje 10 – hydroxy – 2 – defeonovou kyselinu jako bioaktivní složku a několik esenciálních aminokyselin s antioxidační aktivitou zejména cystein, lysin a arginin (Amini et al., 2019; Alcay et al., 2017). Kromě toho úspěšný účinek suplementace mateří kašičky na schopnost oplodnění spermií byla zjištěna na modelových laboratorních zvířatech (Alcay et al., 2017).

Mateří kašička je velmi citlivá na teplo, světlo, kyslík a styk s kovy. Skladujeme ji nejlépe v nádobách z tmavého skla v temnu a při teplotě do 0 °C. Při zmrazení kašičky na -15 až 18 °C dbáme jen na to, aby se až do okamžiku konzumu uchovávala jen při této teplotě. Opakované rozmrazání škodí mateří kašičce stejně jako skladování při teplotách nad +5 °C. Nádoby s kašičkou plníme tak, aby v nich bylo co nejméně vzduchu, a hermeticky je uzavíráme. (Veselý, 2003).

Bylo prokázáno, že mateří kašička může chránit teskulární tkáň před apoptózou vyvolanou 6 – merkaptopurinem pomocí regulace dráhy PI3K/AKT (Saberivand et al., 2021).

Moradi a kol. (2013) ve své studii zjistili hluboký dopad oxidačního/nitrosativního stresu na kvalitu spermií během skladování v tekutém stavu. Dále ve své studii zjistili, že existují významné rozdíly mezi opakováním experimentů při analýze čistých dat. Pokud však byly údaje převedeny do procentuálního formátu, žádné významné rozdíly nebyly.

Lyofilizace mateří kašičky je konzervační proces, který v sobě zahrnuje zmrazení a dehydrataci, která odstraňuje vodu z mateří kašičky, a v důsledku toho jí lze skladovat po

dlouhou dobu při pokojové teplotě. Kromě toho zachovává chemické a biologické vlastnosti mateří kašičky. Průměr bílkovin, sacharidů, tuků, popela a vody po lyofilizaci mateří kašičky je 34 %, 26,5 %, 22,5 %, 2,5 % a méně než 5 %. (Amini et al., 2019).

Několik analytických a farmakologických studií prokázalo širokou škálu biologických aktivit v mateří kašičce, které mají různé vlastnosti, jako jsou antioxidační a buněčné ochranné účinky (Amini et al., 2019). Přidání mateří kašičky mělo za následek významný ochranný účinek na integritu membrány. Ochranný účinek mateří kašičky můžeme připisovat jejímu chemickému složení a zejména jejím hlavním bílkovinám, včetně esenciálních aminokyselin a kyseliny 10-hydroxy-2-deceanové, která hraje důležitou roli v integritě buněčné membrány (Moradi et al., 2013).

Amini a kol. (2019) ve své studii tvrdí, že nedávno bylo navrženo, aby přidání nižší koncentrace čersvé mateří kašičky do ředidla spermatu zlepšilo pohyblivost spermií a integrity plazmatické membrány během skladování beranních spermií při chladných teplotách. Rovněž, bylo hlášeno, že suplementace zmrazeného prodlužovače pomocí mateří kašičky zlepšila parametry spermií při době inkubace 6 hodin. Dále Amini a kol. (2019) ve své studii dospěli k závěru, že suplementace lyofizované mateří kašičky do Tris žloutkového ředidla měla ochranný účinek na chlazené a zmrazené beraní spermie. Zajímavým zjištěním je, že pro delší dobu skladování beranních spermií mohou být k ochraně spermií před negativními vlivy použité nižší koncentrace mateří kašičky (Moradi et al., 2013). Saberivand a kol. (2021) ve své studii zjistili, že přidání 2% mateří kašičky v kombinaci s DMSO a glycerolu při zmrazení spermií beranů má za následek snížení jejich abnormalit, vyšší byla také integrita membrány spermií.

Alcay a kol. (2015) také ukázali, že suplementace spermatu ředěného s 0,5 a 0,75 % mateří kašičky mělo blahodárné účinky na inkubované zmrazené a rozmrazené spermie kozlů.

Významný ochranný účinek mateří kašičky na spermie během procesu zmrazení a rozmrazení může pocházet z jejího chemického složení jako jsou aminokyseliny (kyselina aspargová, cynein, lysin, valin), vitamíny (C a E) a minerální soli (Na, C, K, Mg), které jsou zásadní pro kryokonzervaci spermií (Alcay et al., 2017). Ochranné účinky mateří kašičky pravděpodobně souvisejí s jejími antioxidačními vlastnostmi, které by měli být poskytovány ve správných koncentracích. A co je důležitější mělo by se vzít v úvahu, že koncentrace mateří kašičky musí být určena na základě doby skladování (Moradi et al., 2013).

Předpokládá se, že obsah prolinu v mateří kašičce modifikuje membránovou strukturu proti stresovým situacím. Kromě toho cystein a prolin působí jako robustní antioxidant, který eliminuje ROS a vytváří glutation během procesu chlazení a zmrazení. Navíc vitamín C a E a 10-hydroxy-2-deceanová kyselina v mateří kašičce chrání buněčnou membránu (Saberivand et al., 2021).

Saberivand a kol. (2021) ve své studii tvrdí, že integrita spermií se zvýšila, když byla do beranních spermií přidána 2% mateří kašičky s 6 % DMSO. Normální kondenzace chromatinu a DNA integrita spermií je potřebná pro úspěšné oplodnění in vitro. Velký počet zbytků histonu ve spermiích mají za následek nižší míru oplodnění a následnou vadnou produkci embryí před implantací a sníženou míru blastulace (Saberivand et al., 2021). Dále ve své studii Saberivand a kol. zjistili, že hladiny MDA byly nižší u spermií, které byly doplněny 2 % mateří kašičky v kombinaci s DMSO nebo glycerolem anebo s oběma kryoprotektivy. Přidání 2 % mateří kašičky + 3 % DMSO a 3 % glycerolu do ředidla zlepšily mikroskopičnost a biochemické parametry beraních spermií po zmrazení a rozmrazení.

### 3.5.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou redukční látky lehce reagující s oxidačními substancemi, čímž chrání důležité molekuly před oxidací. K biologickým antioxidantům řadíme vitamíny C a E, ubichinol a některé karotenoidy. Také bilirubin a kyselina močová chrání před oxidací. Zvláště důležitý je tripeptid glutathion (Koolman et al., 2012). Antioxidanty jsou hlavní obranné faktory proti oxidačnímu namáhání vyvolané volnými radikály (Silva et al., 2011). Několik výzkumníků uvedlo, že přidání antioxidantů do kryokonzervačního média zlepšilo kvalitu spermatu proti poškození peroxidací (Memon et al., 2012). Řada studií implikovala peroxidaci lipidové membrány jako příčinu defektu funkce spermií, zejména u beranních spermií, které obsahují větší množství polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Baghshahi et al., 2014).

Spermie a semenná plazma mají k dispozici primární antioxidační systém jako je superoxid dismutaza, glutathionperoxidaza a kataláza, která vylučuje lipidové peroxylové radikály, dále působí jako obranný systém proti peroxidaci lipidů. Tento antioxidační systém je však omezený a nedostatečný (Sharafi et al., 2014). Předpokládá se, že antioxidanty neutralizují volné radikály v lipidových řetězcích tím, že přispívají atom uhlíku obvykle z fenolické hydroxylové skupiny, která zase přeměňuje fenolické skupiny na stabilní volné radikály, které neiniciují ani nešíří další oxidaci lipidů (Baghshahi et al., 2014).

Existují studie, které naznačují, že suplementace ředidla antioxidanty, jako jsou taurin, kataláza a redukované glutathionové a membránové látky včetně theralozy úspěšně snižují dopad různých oxidantů, které vznikají při skladování spermií (Moradi et al., 2013). Suplementace mrazicích medií antioxidanty může snížit negativní dopad ROS a poté zachovat kvalitu spermií po rozmražení (Sharafi et al., 2014).

Různé kryoprotektory většinou doplněné o antioxidanty byly použity ve snaze překonat buněčné poškození způsobené kryokonzervací. Mnoho studií prokázalo, že ředidla doplněné o antioxidanty jsou užitečné pro inhibice tvorby ROS u mnoha druhů hospodářských zvířat doposud však existují omezené informace pro ochranné účinky antioxidantů na kryokonzervaci kozích spermií (Memon et al., 2012). Nadměrná produkce ROS může mít vážné důsledky na strukturu a funkčnost spermií, protože spermie jsou obzvláště náchylné k poškození způsobené ROS (Succu et al., 2011).

Rozlišujeme dva druhy antioxidantů, a to oxidanty enzymatické a neenzymatické (Kefer et al., 2009). Mezi enzymatické antioxidanty neboli také přírodní antioxidanty patří peroxidáza glutathionu, glutathionová reductáza, superoxid dismutáza a kataláza. (Alvarez et al., 1987) Tyto všechny přírodní antioxidanty se podílejí na obranném systému spermií (Silva et al., 2011). Mezi neenzymatické antioxidanty neboli syntetické antioxidanty nebo také doplňky stravy patří glutathion, urát, kyselina askorbová, vitamín E, karotenoidy, ubichinony, taurin, hypotaurin, selen a zinek (Alvarez a Podlost, 1989; Therond et al., 1996).

Cystein a glutathion jsou nejdůležitější neenzymatické látky, které hrají klíčovou roli při eliminaci ROS během aerobního stavu v různých fázích procesu zmrazení a rozmrazení (Sharafi et al., 2014).

Memon a kol. (2012) ve své studii zjistili, že při použití kyseliny askorbové došlo k výraznému zlepšení progresivní motility. Další suplementace antioxidantů v jejich studii

ukázala nevykonné zlepšení ve srovnání s kontrolou. Fosfolipidy jsou hlavní složkou sojového lecitinu a mají antioxidační vlastnosti (Sun et al., 2019).

Vitamín E je přítomen zejména v lipidové složce biologických membrán a jako antioxidant zde chrání nenasycené lipidy před ROS a dalšími radikály (Koolman, 2012). Přidání vitamínu E spolu s vitamínem C k berannímu spermatu zlepšují jejich přežití a kvalitu, pokud jsou chlazené (Azawi a Hussein, 2013).

Alfa-tokoferol je nejúčinnější antioxidační sloučenina vitamínu E rozpustná v lipidech, která neutralizuje lipidové radikály. Takže je to jedna z hlavních látek, které chrání membránu proti ROS a preoxidaci lipidů bez ovlivnění generace ROS (Jeong et al., 2009, Sharma a Agarwal, 1996). Účinek alfa-tokoferolu se může měnit v závislosti na jeho koncentraci, při vysokých koncentracích může spíše působit jako oxidační stimulátor než antioxidant (Minaei et al., 2012).

Mata-Campuzano a kol. (2015) nicméně získali některé pozitivní účinky při skladování beraního spermatu, a to v případě, že bylo ředidlo doplněno o GSH. Nakonec se zaměřili na testování interakce antioxidantů s ředidly, která se liší v lipidovém zdroji: vaječný žloutek a sojový lecitin. Je známo, že glutamin hraje regulační roli v několika procesech specifických pro buňky, včetně metabolismu, integrity buněk (apoptóza, buněčná proliferace), syntézy bílkovin a degradaci, genové exprese a syntézy extracelulární matrice (Bucak et al., 2009).

Ředidla by také mohla ovlivnit účinnost přísad, následkem interakce různých složek a skutečnosti, že vaječný žloutek a lecitin mohou přispět k celkové antioxidační aktivitě (Mata-Campuzano et al., 2015).

Mata-Campuzano a kol. (2015) ve své studii vyzkoušeli antioxidanty GSH, Trolox, merkaptamin a krucin jako doplňky beraního spermatu, aby určili jejich vliv na kvalitu po rozmrazení a na odolnost rozmraženého spermatu, testovaného po inkubaci. Zkombinovali je se dvěma různými kryoprotektory, vaječný žloutek a sojový lecitin, za účelem studia interakcí antioxidantů s každým kryoprotektorem. Některé antioxidanty, jako je krucin a Trolox, mírně zvýšily určitou kvalitu veličin, zatímco merkaptamin měl většinou negativní účinky (Mata-Campuzano et al., 2015).

Ve své studii Mata-Campuzano a kol. (2015) zjistili, že antioxidanty měly velmi odlišné účinky. Dokonce i merkaptamin a GSH, které na základě aktivity thiolové skupiny, vykazovaly několik rozdílů. Účinek merkptaminu byl neočekávaný, protože bylo zjištěno, že je dostatečný pro zmrazení beraního a kozlího spermatu. Mata-Campuzano a kol. (2015) ve své studii dále zjistili, že Trolox byl jediný antioxidant, který snížil hladinu lipoperoxidace, dále snížil hladinu malondialdehydu 1,5 promile. Ve skutečnosti Trolox napravuje zvýšenou produkci malondialdehydu ve vzorcích zmražených lecitinem. Mata-Campuzano a kol. (2015) si myslí, že schopnost Troloxu zrušit lipoperoxidaci by z něj mohla učinit součást optimalizovaných prodlužovačů, možná při nižších teplotách a dále zjistili, že crocin nezlepšil pohyblivost spermií, ale chránil DNA spermií.

Účinky doplňků jako jsou antioxidanty, jsou modulovány jinými ředidly a případně dalšími parametry jako je rychlost chlazení, doba rovnováhy nebo zdroj vzorků (Mata-campuzano et al., 2015). Lze se domnívat, že antioxidanty ovlivňují integritu axosomu a mitochondrie, dále že po rozmrazení spermatu dochází ke zlepšení motility a morfologické integrity nad hlavou, ve střední a ocasní části (Menom et al., 2012).

Nevhodná produkce ROS vede ke snížení pohyblivosti spermií, životaschopnosti spermií. Úroveň ROS je velmi důležitá. Ve spermatu je přírodní antioxidační systém, ale ten je částečně

odstraněn a vážně změněn během procesu kryokonzervace. Proto může mít přidání antioxidantů do ředidla pozitivní účinky při kryokonzervaci spermatu u různých druhů (Alcay et al., 2017). Nadměrná produkce ROS může mít vážné důsledky na strukturu a funkčnost spermií, protože spermie jsou obzvláště náchylné k poškození způsobenému ROS. Z tohoto důvodu byly různé exogenní antioxidanty součástí marazického ředidla a jejich schopnost účinně zlepšila funkci a kvalitu spermií po rozmrazení (Succu et al., 2011).

Reaktivní látky kyseliny thiobarbiturové (TBARS) mají být použity k detekci peroxidace lipidů v mnoha tělesných tekutinách a jsou dobře zavedeným nepřímým měřítkem celkového oxidačního stresu. Výsledky ukázaly, že přidání suplementovaných antioxidačních skupin, které významně snižují ROS ve zmraženém a rozmraženém spermatu byly pozorovány MDA (malondialdehyd). Tyto suplementace v ředidlech snižují produkci ROS během mražení a tání, čímž chrání spermie před poškozením při kryokonzervaci (Menom et al., 2012).

Je pozoruhodné, že nižší potenciál antioxidační aktivity byl pozorován v kozlím spermatu ve srovnání s jinými druhy. Proto ředidla doplněná o antioxidanty by mohly vylepšit poškození spermií po rozmrazení způsobené oxidačním stresem (Sun et al., 2019).

Účinek antioxidantů na kvalitu ejakulovaného spermatu berana během krátkodobé konzervace nebyl podrobně studován (Rather et al., 2016). Beraní sperma má dostatečné množství superoxid dismutázy a mnohem nižší koncentrace peroxidázy glutathionu a katalázy, aby se zabránilo oxidačnímu poškození. Tato antioxidační kapacita v buňkách spermií je omezená vzhledem k malé cytoplazmatické složce, která obsahuje antioxidanty pro úklid oxidantů. Proto se koncentrace antioxidantů může značně snížit, pokud se sperma zředí (Bucak et al., 2009). Kromě toho bylo zjištěno, že semenná plazma beraního spermatu má nižší potenciál antioxidačních aktivit ve srovnání s jinými druhy (Motlagh et al., 2014).

Navzdory slibným výsledkům se suplementací kryokonzervačních medií antioxidanty není samozřejmostí použití antioxidantů při ředění medií a chybí údaje o jeho využití v kryokonzervaci kozlího spermatu (Memon et al., 2012).

Ačkoliv mnoho studií zkoumalo účinky různých antioxidantů na výsledky rutinních spermatologických hodnocení, žádná předchozí studie se nezabývala účinky antioxidantů doplněných o lyofilizovaný vaječný žloutek při kryokonzervaci kozlího spermatu (Alcay et al., 2016). Alcay a kol. (2015) ve své studii navrhl porovnávání různých antioxidantů (methionin, cytyamin, BHT) doplněných o lyofilizované ředidla na bázi vaječného žloutku pro kvalitu po rozmrazení a inkubační odolnost kozlího spermatu pomocí testu kvality jako je motilita a plazmatická membrána, akrozom a integrita DNA v rozmnožovací sezoně.

Alcay a kol. (2016) ve své studii zjistili, že motilita spermatu po rozmrazování ve skupinách obsahujících methionin, merkaptamin a BHT měla lepší hodnoty než kontrolní skupina při 0 h ( $P < 0,05$ ). Skupiny merkaptaminu a BHT měly po rozmrazování lepší hodnoty motility než skupina methioninu. Dále ve své studii zjistili, že antioxidační skupiny úspěšně chránily akrosomální integritu ve srovnání s kontrolní skupinou po rozmrazení a inkubační době ( $P < 0,05$ ). Integrita akrosomu kozlího spermatu po rozmrazení se v mnoha studiích pohybuje v rozmezí 57,90 – 78,0 % k podobnému výsledku ve své studii dospěl i Alcay a kol. (2016).

Malondialdehyd se často používá jako indikátor oxidačního poškození. Proto je klíčovým produktem peroxidace polynenasycených mastných kyselin v buňkách. V současné studii byly hladiny malondialdehydu v antioxidační skupině nižší než v kontrolní studii (Alcay et al., 2016).

Přibývá důkazů, které naznačují, že přírodní látky s antioxidačními účinky působí jako dvousečné meče, což znamená, že vysoká koncentrace exogenních antioxidantů může narušit redoxní rovnováhu. Předpokládá se, že vyšší koncentrace exogenního antioxidantu působí jako prooxidační a aktivací cest, jako je zvýšená produkce protizánětlivých mediátorů, nitrosylace bílkovin, proglykační účinek a činnosti narušující činnost žláz s vnitřní sekrecí (Moradi et al., 2013). V posledních letech si užívání přírodních antioxidantů získalo pozornost několika výzkumných pracovníků. V tomto ohledu je velmi zajímavé poznamenat, že dvě třetiny druhů rostlin mají léčivou hodnotu. Mnoho těchto léčivých rostlin mají velký antioxidační potenciál (Motlangh et al., 2014).

Hřebíček je známý jako účinný bylinný antioxidant, který obsahuje fenolické sloučeniny hlavně eugenol. Baghshahi a kol. (2014) ve své studii prokázali, že při ošetření extraktem hřebíčku během procesu chlazení, zmrazení a rozmrazení jsou spermie berana nejlépe chráněny, pokud použijeme koncentraci 75 µg/ml. Dále Baghshahi a kol. (2014) ve své studii zjistili, že při použití vyšších koncentrací extraktu hřebíčku, bylo zpozorováno, že mají nepříznivý účinek na všechny parametry spermií berana. Tento výsledek může být připsán spermicidnímu účinku vysokých dávek eugenolu. Použití extraktu hřebíčku o koncentraci 35 a 75 µg/ml měly příznivý vliv na motilitu beraních spermií po ochlazení a po procesu zmrazení a rozmrazení (Baghshahi et al., 2014).

Vodný extrakt z rozmarýnu byl použit jako konzervační a ošetřující činidlo proti oxidačnímu stresu v několika studiích. Použití rozmarýnu při zpracování spermií a kryokonzervaci spermatu byl zkoumán pouze v několika studiích. S ohledem na výše uvedené informace se lze domnívat, že vodný extrakt z rozmarýnu může být vhodným antioxidantem proti kryokonzervačnímu poklesu životaschopnosti spermií a motility spermií po rozmrazení. Ačkoliv příznivý účinek vodného extraktu z rozmarýnu jako bylinného antioxidantu byl dobře zaveden v literatuře, existuje jen několik málo studií, které zkoumaly účinek vodného extraktu z rozmarýnu na savčí spermie (Motlangh et al., 2014).

Melatonin přímo neutralizuje účinek vysokého počtu toxických volných radikálů a vlivů exprese antioxidačního enzymu, který zvyšuje hladinu RNA a bílkovin těchto enzymů. Melatonin byl také schopen chránit spermie před rtutí, oxidem dusnatým a oxidačním poškozením H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bylo prokázáno, že melatonin je schopný chránit mitochondrii před oxidačním poškozením pomocí snížené spotřeby kyslíku, membránový potenciál a produkci aniontu superoxidu, aby se udržela výroba ATP (Succu et al., 2011).

Casao a kol. (2010) demonstrovali přítomnost melatoninu v beraním plazmě. Jeho koncentrace silně korelovala s aktivitou tří antioxidačních enzymů (glutathionová reduktáza, superoxid dismutáza a kataláza), což nasvědčuje tomu, že melatonin může hrát roli v regulaci antioxidačního enzymu obranných systémů ve spermiích jako u jiných typů buněk. Přítomnost enzymu CAT byla prokázána v beraním spermatu. Jeho potenciální role je ve stárnoucích procesech a kontrole oxidačního stresu v buňkách, zejména odstraněním superoxidového aniontu radikální produkce, která je generovaná NADPH oxidázou v živých buňkách (Bucak et al., 2009). Bucak a kol. (2009) ve své studii zjistili, že aktivita enzymu CAT byla ve skupině rozmrazeného spermatu s prodlužovačem 5mM glutaminu vyšší než v jiných skupinách. Toto zjištění podpořil svou dřívější studií, kterou uskutečnil na ovcích, kde byla aktivita enzymu CAT zvýšena v přítomnosti různých antioxidantů po procesu zmrazení a rozmrazení. Předpokládá se, že glutamin vykazoval antioxidační zvýšení aktivity enzymu CAT



při použití antioxidačních činidel. Takže například glutamin může mít kryoprotektivní účinek na funkční integritu akrozomu spermií a mitochondrií, zlepšení pohyblivosti spermií po rozmrazení, což mělo za následek snížení poškození spermií (Bucak et al., 2009).

### 3.5.4 Antifreeze proteiny

Antifreeze proteiny se přirozeně vyskytují u několika organismů, které jsou vystavovány teplotám pod bodem mrazu. Schopnost těchto proteinů inhibovat rekrytalizaci ledu spolu s jejich schopností integrovat se s biologickými membránami z nich dělá zajímavé molekuly pro použití při kryokonzervaci (Robles et al., 2019).

Existuje několik druhů, které přirozeně vykazují zvláštní ochranu proti nízkým teplotám a díky své schopnosti produkovat zajímavou skupinu proteinů, které se vážou na led a zabraňují růstu tvorbě ledových krystalů (Robles et al., 2019).

Antifreeze proteiny mohou být přítomny v bakteriích, houbách, korýších, mikrořasách, hmyzu a rybách (Robles et al., 2019). Antifreeze proteiny jsou skupiny polypeptidů, které se vyvinuly u bezobratlých, obratlovců, hmyzu a rostlin. Antifreeze proteiny hrají základní roli pro jejich přežití při teplotách pod nulou, u těchto druhů působí jako přirozené kryoprotektory. Tyto proteiny vyvolávají termální hystereze a inhibují rekrytalizaci ledu, snižují kinetiku tvorby ledu a ovlivňují morfologii ledových krystalů (Correia et al., 2020). V přírodě jsou tyto proteiny rozhodující pro přežití zvířat v mrazivých podmínkách (Robles et al., 2019).

Tyto proteiny mohou být použity pro buněčnou kryokonzervaci včetně spermií, protože jejich zařazení do vzorku spermatu snižuje ztrátu pohyblivosti, zachovává životaschopnost, funkčnost membrány a integritu akrosomu v zmraženém i rozmraženém spermatu u několika druhů hospodářských zvířat jako je beran, bůvol, a králík (Correia et al., 2020).

Tepelná hystereze a inhibice rekrytalizace ledu spolu s jejich schopností integrovat se s biologickými membránami jsou důležité vlastnosti antifreeze proteinů. Je zajímavé si všimnout, že různé antifreeze proteiny mohou mít různou aktivitu a mohou se vázat na různou plochu ledových krystalů. Jejich schopnost inhibovat rekrytalizaci ledu je zásadní při ochraně membrán proti poškození mrazem. Pokles přežití může souviset s fyzickým nebo mechanickým poškozením, které může nastat po procesu zmrazení a rozmrazení (Robles et al., 2019).

Existují však čtyři hlavní typy antifreeze proteinů (typ I, typ II, typ III a typ AFP – lipoprotein) s různými způsoby působení a rozdíly mimo jiné ve vázání na ledové křišťálové plochy (Correia et al., 2020).

Vlastnosti antifreezy proteinů pravděpodobně stabilizují membránové fosfolipidy a nenasycené mastné kyseliny (Correia et al., 2020). Koncentrace AFP musí být pečlivě optimalizovány, aby se zabránilo negativním účinkům na přežití buněk (Robles et al., 2019). Robles a kol. ve své studii popsali změnu tvaru ledového krystalu vyvolanou suplementací AFP ve vysokých koncentracích a jejich škodlivý účinek na přežití buněk.

Antifreeze proteiny jsou obsaženy v krvi polárních ryb. Tyto proteiny snižují bod mrznutí vody nekologativním mechanismem, který se nazývá adsorpce – inhibice, čímž umožňují těmto rybám přežít v islandských mořských vodách (-1,9 °C), tím že zabraňují tvorbě ledu v krevním oběhu. Kromě toho antifreeze proteiny zabraňují rekrytalizaci ledu, tím že se vážou přímo na tvář ledového krystalu tak, aby se vytvořily malé špičáky ledu (De Vries, 1988).

V současné době se zmražené beranní sperma používá v umělé chovu pouze pro intrauterinní inseminaci s početím 60–75 %. Zmražené sperma není možné použít pro cerviální inseminaci, protože pohyblivost spermií je velmi malá (25–45 %) (Evans et al., 1987). Toto omezení lze překonat zlepšením postupů mražení. Payne a kol. (1994) vyhodnotili v rámci celkové studie vliv AFP a AFGP na pohyblivost beranních spermií.

Payne a kol. (1994) ve své studii tvrdí, že skóre pohyblivosti spermií, které jsou měřítkem kvality spermatu, nebylo ovlivněno přidáním antifreeze proteinů do ředidla. Všechna ošetření dosáhla 4 bodů na stupnici motility, a to jak před rozmražením, tak i po něm. Pilotní experimenty s koncentracemi AFP a AFGP ukázaly, že použití vyšších koncentrací mělo malý nebo žádný příznivý účinek na beranní sperma po zmražení a rozmražení. Pokud se použili nižší koncentrace antifreeze proteinů pohyblivost spermií byla o 10 % větší. AFP a AFGP chrání sperma před poškozením během mražení a po rozmražení. (Payne et al., 1994)

Correia a kol. (2020) ve své studii tvrdí, že zejména bylo prokázáno, že procento pohyblivých spermií po rozmražení je větší po přidání AFP I a AFGP. Robles a kol. ve své studii přišli na to, že pokud se u beranních spermií použijí AFP typu I a AFGP typu I v koncentraci 10 µg/ml tak se po rozmražení zlepšila jejich motilita. Různé AFP, včetně rekombinantního antifreeze proteinu *Dendroides canadensis*, byly testovány v různých podmínkách a byly zjištěny různé příznivé účinky během skladování při 4 °C a během zmražení. Po rozmražení bylo zjištěno zvýšení progresivní motility a integrity plazmatické membrány při použití 0,1 µg/ml AFP typu III, dále zjistili, že vyšší koncentrace byly neúčinné (Robles et al., 2019).

Je dobře známo, že ledové krystaly rekrystalizují v blízkosti bodu tání (Knight et al., 1986). Tento proces může být inhibován antifreeze proteiny (Carpenter et al., 1992). Antifreeze proteiny chrání sperma před poškozením během mražení a rozmražení při velmi nízkých koncentracích (Payne et al., 1994).

Reaktivní oxidační látky se vytvářejí během kryokonzervace spermií, které způsobují některé fyzikální a chemické změny v membráně spermií. Proto mnohé vědecké studie hodnotily účinek různých syntetických a přírodních antioxidantů na spermie. Předpokládá se, že antioxidanty neutralizují volné radikály v lipidových řetězcích přenecháním atomu vodíku obvykle z fenolické hydroxylové skupiny, které na oplátku převádí fenolické skupiny na stabilní volné radikály, které nezačínají další oxidaci lipidů (Baghshagi et al., 2014).

Correia a kol. (2020) ve své studii přišli nato, že použití AFP I a AFP III pro ředění otevírají zajímavé perspektivy pro rozvoj účinnější techniky konzervace spermií v chovu ovcí. Koncentrace byly definovány podle literárního screeningu, vzhledem k tomu, že nižší koncentrace AFP zlepšují výsledky kryokonzervace, zatímco vyšší koncentrace by mohly mít cytologické účinky při přidání do prodlužovače (Correia et al., 2020).

Přidání AFP do beranního spermatu mělo blahodárné účinky, které zvyšovaly jejich kryoistiku, zejména u kinetiky spermií, integrity plazmatické membrány a morfologie, které udržovaly energii metabolismu bez zvýšení ROS. Použití AFP jako kryoprotektantu spermatu se prokázalo jako nástroj ke snížení ztráty pohyblivosti, zachování energie metabolismu a osmotické rezistence. Během kryokonzervace spermií by tvorba ledových krystalů mohla nevratně poškodit buňky ovlivňující plazmatickou membránu a morfologii buněk. Postup mrznutí může změnit lipidové membrány, nenávratně seskupit proteiny, aby byly membrány tužší a křehčí (Correia et al., 2020).

Ačkoliv AFP III nepředstavovaly žádnou výhodu proti AFP I je třeba vzít v úvahu, že se jedná o první studii, která používá tento typ antifreezy proteinů u beraního spermatu (Correia et al., 2020).

Zdá se, že přidání antifreezy proteinů při kryokonzervaci beraních spermií se jeví jako příznivé. Použití antifreezy proteinů převážně typu I zvyšuje ochranu spermií během kryokonzervace, což má za následek větší kinetiku spermií, lepší integritu plazmatu a větší procento normálních spermií. Tyto výsledky otevírají zajímavé možnosti využití antifreezy proteinů jako kryoprotektoru spermatu beranů (Correia et al., 2020).

### 3.6 Ultra rychlé mrazení

Ultra rychlé mrazení lze provádět pomocí ředidla bez vaječného žloutku nebo propustných kryoprotektantů, které zamezují negativní účinky těchto látek a používají proteiny a cukry jako nepropustné extracelulární kryoprotektory (Jimenez – Rabadan et al., 2015). V současné době výsledky získané při ultra rychlém mrazení beraních spermií nezlepšují konvenční zmrazení, vykazují vysoké procento poškození spermií a zdůrazňují vliv předchozí skladovací teploty. Během ultra rychlého mrazení jsou buňky vystaveny hyper osmotickým ředidlům na bázi nepropustných látek jako jsou sacharóza a trehalóza, aby se zabránilo extracelulárním krystalům zvýšit viskozitu ředidla, navození intracelulárního odtoku vody a podporu sklivcového stavu do a kolem spermií, což snižuje buněčné poškození spojené s krystalizací během procesu kryokonzervace. Protože jsou spermie vystaveny mediím s proměnlivou molaritou během vitrifikace a zmrazení, má se zato, že osmotické změny mohou podpořit výskyt morfologických změn těchto buněk (Arando et al., 2019). Ultra rychlé mrazení indukuje poškození buněk jako je snížená životaschopnost, apoptóza, ztráta integrity DNA a rozpad buněčné membrány (Igbowke et al., 2019).

Proces vitrifikace byl navržen jako nová technika, která se používá pro skladování spermií, ale nebyl použit při rutinní kryokonzervaci spermií z důvodu zhoršujícího se osmotického účinku vysokých koncentrací prstoúhlých kryoprotektorů. Tato technika je založena na ultra rychlém zmrazení buňky přímým ponořením do tekutého dusíku. Hlavní výhodou této metody je zabránění tvorby ledových krystalů a možnosti použít ředidlo vaječného žloutku. Postup je také rychlejší, jednodušší v aplikaci a nákladově efektivnější než konvenční kryokonzervace. Nevýhodou ultra rychlého mrazení je, že vyžaduje vysokou koncentraci kryoprotektivních látek, a to že spermie jsou na tyto látky citlivé. Dalším omezením této metody je, že dosud byla prováděna pomocí malých objemů a otevřených systémů, které nebrání přímému kontaktu s kapalným dusíkem (Jimenez – Rabadan et al., 2015).

Některé studie, které jsou zaměřeny na ultra rychlé mrazení spermií v poslední době ukazují, že parametry jako motilita nebo akrosom jsou při ultra rychlém mrazení spermií ovlivněny negativně. Implementace technik pro hodnocení subcelulárních morfologických aspektů ve spermatu by mohly pomoc určit, proč tento proces nepodporují, a které buněčné struktury jsou problémovější, aby se tyto postupy zlepšily. Pokud jde o ultra rychlé mrazení, tak studie provedené na beraních spermiích, se shodují na tom, že sacharóza nabízí mírný ochranný účinek pro motilitu, životaschopnost a membránové funkce, i když jsou výsledky získané po rozmrazení (Arando et al., 2019). Arando a kol. (2019) ve své studii prokázali, že

beranní sperma trpí vysokým akrosomálním poškozením po ultra rychlé mrazení, pokud byly vzorky uchovávány při teplotě 22 °C na rozdíl od 5°C. Jimenez – Rabadan a kol. (2015) na základě výsledků provedených experimentů ve své studii došli k závěru, že ředidla založená na kombinaci sacharóza a glycerol nejsou užitečné pro ultra rychlé mrazení beraního spermatu. Avšak ultra rychlé mrazení pomocí ředidla vaječného žloutku díky jeho nízké koncentraci spermií nabízí možnost použít tuto metodu v budoucnu.

### 3.7 Lyofilizace

Lyofilizace je konzervační proces biologických produktů zahrnujících jak zmrazení, tak dehydrataci. Tento proces je zvláště vhodný pro vysoce hodnotné biomolekuly jako jsou proteiny. Při zmrazení a sušení při teplotách nižších než 30 °C si proteiny zachovaly celou nebo větší část své počáteční biologické aktivity v suchém stavu. Tento suchý stav nabízí mnoho výhod při dlouhodobém skladování (Alcay et al., 2016). Tato technika je běžná pro konzervaci krevní plazmy, lidských tkání pro transplantaci, bakteriálních a virových kultur, jakož i pro potraviny a léky, aby byla zachována stabilita a životaschopnost po dlouhou dobu (Moustacas et al., 2011).

Lyofilizace spermatu je slibná technika, která může být levnou alternativou pro dlouhodobé skladování spermatu v tekutém dusíku. Hlavním problémem lyofilizace je poškození jednovláknové a dvouvláknové DNA v důsledku procesu sušením mrazem. Je třeba uznat, že současné lyofilizační postupy sledují metody používané k sušení potravin nebo farmaceutických výrobků. Standardním přístupem přizpůsobeným spermiím je zejména jejich přímé ponoření do tekutého dusíku předchozí vakuové sublimace vodní frakce (Palazzese et al., 2020).

Lyofilizace ohrožuje stabilitu DNA fyzickým poškozením rychlým chlazením na -196 °C, které je následováno vakuovou extrakcí vody (Palazzese et al., 2020).

Lyofilizované spermie se rehydratují přidáním čisté vody, jejíž objem by měl být stejný jako objem suspenze před lyofilizací. Kředění rehydratovaných vzorků lze použít jakýkoliv fyziologický roztok. Koncentrace ve finálním rehydratačním mediu by měla být taková, aby bylo snadné vyhledávání jednotlivých spermií pro účely ICSI (intracytoplazmatická injekcí injektáž spermie) (Gil et al., 2014).

## 4 Závěr

Cílem bakalářské práce je soupis aktuálních poznatků tématicky zaměřených na využití moderních kryoprotektorů při konzervaci semene.

Ze souhrnu literární rešerše vyplývá, že je velmi důležité, jak bude kryokonzervace provedena, jaký kryoprotektor bude použit, jaký druh ředidla při kryokonzervaci použijeme. Při kryokonzervaci spermatu, je pro nás důležitá přežitelnost spermií pro rozmrazení, také chceme, aby spermie po rozmrazení vykazovaly, co nejmenší známky poškození a měly dobrou oplozovací schopnost, proto se při kryokonzervaci snažíme vybrat co nejvhodnější kryoprotektor.

Podle dostupných studií vidím velkou perspektivu při kryokonzervaci spermatu u malých přežvýkavců v lyofilizaci.

Na základě dostupných informací z odborných studií je znát, že lyofilizace vaječného žloutku, mateří kašičky a dalších má kladné účinky při použití při kryokonzervaci spermií u beranů. Určitě by stálo, zato se v tomto směru dále zdokonalovat a provádět více pokusů na odborné úrovni, zejména u beranů.

Další oblast, která má potenciál a mohla by přinést dobré výsledky je ultra rychlé mrazení. Určitě by stálo zato, věnovat se také více problematice u kozlů. Nenašla jsem moc studií, které by se zabývaly problematikou kryokonzervace kozlího spermatu. Nějaké studie byly provedeny s vaječným žloutkem u kozlího spermatu, a tam byly výsledky pozitivní, spermie měly po rozmrazení dobrou motilitu a větší výtěžnost. Také lyofilizace vaječného žloutku přinesla u kozlího spermatu dobré výsledky.

Dále bychom mohli věnovat pozornost přírodním antioxidantům. Byla provedena studie, že se jako přírodní antioxidant u beraních spermií použil hřebíček nebo rozmarýn.

## 5 Literatura

Aboagla, E. M.-E., & Terada, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1160–1172.

S. Alcay, et al. (2017). Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa, *Cryobiology*

Alcay, S., Berk Toker, M., Gokce, E., Ustuner, B., Tekin Onder, N., Sagirkaya, H., ... Kemal Soyulu, M. (2015). Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*, 71(2), 329–333.

Alcay, S., Gokce, E., Toker, M. B., Onder, N. T., Ustuner, B., Uzabacı, E., ... Cavus, S. (2016). Freeze-dried egg yolk-based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 72(3), 269–273.

Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide Dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8:338–348

Alvarez JG, Storey BT (1989) Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 23:77–90

Amidi, F., a kol., 2016: The role of antioxidants in sperm freezing.

Azawi OI, Hussein EK (2013) Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 C. In: *Veterinary Research Forum*, vol 3. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, p 157

Sara Amini, Reza Masoumia, Behnam Rostamia, Mohammad Hossein Shahira, Parisa Taghiloua, Halil Ozancan Arslanb (2019). Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics.

Arando, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., León, J. M., Alcalá, C. J., & Pérez-Marín, C. C. (2019). Vitrification induces critical subcellular damages in ram spermatozoa. *Cryobiology*.

Baghshahi, H., Riasi, A., Mahdavi, A. H., & Shirazi, A. (2014). Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, 69(3), 482–487.

Bielfeld P, Jeyendran RS, Holmgren WJ, Zaneveld LJ. Effect of egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa. *J Androl* 1990; 11:260–9.

Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science* 62:265–275.

Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., & Ulutaş, P. A. (2009). Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81(1), 13–17.

Casao A, Cebria'n I, Asumpc,a~o ME et al. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:59.

Correia, L. F. L., Espírito-Santo, C. G., Braga, R. F., Carvalho-de-Paula, C. J., da Silva, A. A., Brandão, F. Z., ... Souza-Fabjan, J. M. G. (2020). Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. *Cryobiology*.

De Paz, P., Mata-Campuzano, M., Tizado, E. J., Álvarez, M., Álvarez-Rodríguez, M., Herraez, P., & Anel, L. (2011). The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology*, 76(7), 1313–1325.

De Vries, A.L. (1988) The role of antifreeze glycoproteins and peptides in the freeze of antartic fishes *Comp. Biochem. Physiol.* 90, 611-621

Dhurvey M, Gupta VK, Nema SP, Patidar A, Shivhare M, Singh N, Shakya V. 2012. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *Dhr-ljbls* 3:62–83.

Igbokwe, A. A., Iyasere, O. S., Sobayo, R. A., Iyasere, S., Animashaun, R. I., Balogun, F. A., ... Daramola, J. O. (2019). Comparative effect of slow and rapid freezing on sperm functional attributes and oxidative stress parameters of goat spermatozoa cryopreserved with tiger nut milk extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 551–559.

I.I. El-Kon, A.A. Sallam, T.M. Ashmawy, B. Heleil, Effect of sodium dodecyl sulphate (SDS) on the viability and fertility of Damascous goat spermatozoa, *Global Veterinaria* 4 (2010) 576–581.

Faigl, V., Vass, N., Jávora, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., & Cseh, S. (2012). Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1),

Galarza DA, López-Sebastián A, Woelders H, Blesbois E, Santiago-Moreno J. 2019. Twostep accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*.

Gangawar C, Kharche S, Kumar S, Jindal S. 2016. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. *Indian Journal of Small Ruminants* 22:1–10.

Gamčík P, Kozumplík J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Priroda, Bratislava.

Gil L, Olaciregui M, Luño V, Malo C, González N, Martínez F. 2014. Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 49:72–81.

Graham JK, Foote RH. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*; 24:42–52.

Graham J. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68:239–247.

Chemineau, P., Cagine, Y. and Guerin, Y. (1991): *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. FAO Animal Production and Health Paper 83. Food and Agriculture Organization of the United Nations, R

Jeong Y-J et al (2009) Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58:181–189

Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., ... Soler, A. J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71(1), 85–90

Kampschmidt RF, Mayer DT, Herman HA. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* 1953; 36:733–42.

Leboeuf, B., Guillouet, P., Bonne, J. L., Forgerit, Y. and Magistrini, M. (2004): Goat semen preserved at 4 °C until 76 hours before artificial insemination: different attempts to maintain the fertility. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34, 233–235.

Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E (2009) Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol* 16:449–457

Khalifa, T., Lymberopoulos, A., & Theodosiadou, E. (2013). Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-blind parallel group design. *Theriogenology*, 79(3), 517–527.

Koolman, J., Rohm, K. 2012. *Barevný atlas biochemie*. 4. vyd. Praha: Grada. 52 s. ISBN 978-80-247-2977-0.

Kukovics, S., Gyoker, E., Nemeth, T., Gergatz, E. 2011. *Artificial Insemination of Sheep- Possibilities, Realities and Techniques at the Farm Level*. Manafi, Milad (ed.), Milad Manafi. *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech. ISBN: 978-953-307-312-5.

Magistrini M, Guitton E, Levern Y, Nicolle JC, Vidament M, Kerboeut D, Palmer E. 1997. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* 48:1229–1235.



- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J. S., & Viudes-de-Castro, M. P. (2005). *Effect of semen collection method on pre – and post-thaw Guirra ram spermatozoa*. *Theriogenology*, 64(8), 1756–1765
- L. Martínez-Fresneda, E. O’Brien, A. López Sebastián, R. Velázquez, A. Toledano-Díaz, D. Tesfayeb, K. Schellander, F.A. García-Vázquez, J. Santiago-Moreno, 2020: In vitro supplementation of testosterone or prolactin affects spermatozoa freezability in small ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & De Paz, P. (2010). Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 67–78.
- Masoudi, R., a kol., 2016: Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin – and egg yolk – based extenders. *Theriogenology* 86, 1583-1588
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M. 2014. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*. 151 (3-4). 137-147
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Tamayo-Canul, J., Anel, L., de Paz, P., & Martínez-Pastor, F. (2015). Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*, 83(4), 520–528.
- Maxwell, W., Watson, P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 42 (1-4). 55-65.
- Memon, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y. M., Ebrahimi, M., & Nadia, F. M. (2012). Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Animal Reproduction Science*, 136(1-2), 55–60
- Minaei MB et al (2012) Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. *Iran J Reprod Med* 10:99.
- Moce E, Purdy PH, Graham JK, 2010: Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 118, 236–247.
- Moses, D. F., de las Heras, M. A., Valcárcel, A., Pérez, L. and Baldassere, H. (1995): Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia* 27, 25–29.
- Moubasher AED, Prentice DA, Wolf DP. Membrane lipid changes in human sperm during capacitation. *J Androl* 1985; 6:135.

Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Loaiza-Eccheverri, A. M., Varago, F. C., Neves, M. M., ... Henry, M. (2011). Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 75(2), 300–307.

Moradi, A. R., Malekinejad, H., Farrokhi-Ardabili, F., & Bernousi, I. (2013). Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small Ruminant Research*, 113(2-3), 346–352.

Motamedi-Mojdehi, R., Roostaei-Ali Mehr, M., & Rajabi-Toustani, R. (2013). Effect of Different Levels of Glycerol and Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on Cryosurvival of Ram Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 65–70

Motlagh, M. K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani, M., & Zeinoaldini, S. (2014). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, 69(2), 217–222.

Nuti, I. (2007): Techniques for artificial insemination of goats. In: Youngquist, R. S. and Threlfall, W. R. (eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd edition. SaundersElsevier, St. Louis, MO. pp. 529–534.

O’Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O. and Lonergan, P. (2010): Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram semen. *Theriogenology* 73, 541–549.

Ormerod, M. G. 2000. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. 3rd ed. Oxford University Press, New York. 276 s. ISBN:0-19-963824.

Öztürk, A. E., Bodu, M., Bucak, M. N., Ağır, V., Özcan, A., Keskin, N., ... Dursun, Ş. (2020). The synergistic effect of trehalose and low concentrations of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. *Cryobiology*.

Palazzese, L., Anzalone, D., A., Turri, F., Faieta, M., Donnadio, A., Pizzi, F., Pittia, P., Matsukawa, K. & Loi, P. (2020): Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature. *Scientific Reports*.

Peña F. 2015. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. *Animal Reproduction* 12:351–355.

Pini, T., Rickard, J. P., Leahy, T., Crossett, B., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2018). Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *Journal of Proteomics*, 181, 73–82.

- Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P (1996) a-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol Hum Reprod* 2:739–744
- Rather, H. A., Islam, R., Malik, A. A., & Lone, F. A. (2016). Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4°C. *Small Ruminant Research*, 141, 24–28.
- Robles, Valcarce, & Riesco. (2019). The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos. *Biomolecules*, 9(5), 181.
- Rodriguez-Irazogui, M., Lundeheim, N., Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. (2003): Fertility of ram semen frozen in Bioxell. *Theriogenology* 59, 1157–11
- Saberivand, A., Pashapour, S., Noghani, A. E., & Namvar, Z. (2021). Synergistic effect of Royal jelly in combination with glycerol and dimethyl sulfoxide on cryoprotection of Romanov ram sperm. *Cryobiology*.
- Salamon, S., Maxwell, W. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1–3). 77-111
- Sanderson J, Smith I, Parker I, Bootman D. 2014. Fluorescence Microscopy. *Fluorescence Microscopy*:85–132
- Seidel, G. E. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*. 68. (3). 443-446
- Shamsuddin, M., Amiri, Y. and Bhuivan, M. M. U. (2000): Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reprod. Dom. Anim.* 35, 53–57
- Shahsavani MB, Yousefi R. 2018. *Fluorescence Microscopy*:2–3.
- Sharma RK, Agarwal A (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48:835–850
- Sharafi, M., Zhandi, M., & Akbari Sharif, A. (2014). Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and Tissue Banking*, 16(2), 261–269
- Silva S, Soares A, Batista A, Almeida F, Nunes J, Peixoto C, Guerra M (2011) In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reprod Domest Anim* 46:874–881
- Succu, S., Berlinguer, F., Pasciu, V., Satta, V., Leoni, G. G., & Naitana, S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 50(3), 310–318.

Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D. (2019). Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*.

Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C., & Lucia, T. (2010). Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, 93(2-3), 206–209.

Veselý, V., a kol., 2003: Včelařství. 2. vyd. Praha: Brázda. 272 s. ISBN 80-209-0320-8.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57(1), 149-179.

Yániz, J. L., Santolaria, P., Marco-Aguado, M. A., & López-Gatius, F. (2008). Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology*, 70(2), 192–198.

Yimer N, AH Noraisyah, Y Rosnina, H Wahid, K Sarsaifi and AM Hafizal, 2014. Comparison of cryopreservative effect of different levels of omega-3 egg-yolk in citrate extender on the quality of goat spermatozoa. *Pak Vet J*, 34(3): 347-350.

## 6 Seznam použitých zkratek a symbolů

LOP peroxidace lipidů  
ROS redukční oxidační stres  
MDA malondialdehyd  
ID inseminační dávka  
TRABS kyselina thiobarbitulová  
SDS dodecyl sulfát sodný  
HOST hypoosmotický test  
EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová  
LDL lipoproteiny s nízkou hustotou  
EYCE vaječný žloutek v citrátovém ředidle  
DMSO dimethylsulfidoxid  
CASA počítačová analýza spermatu  
AFP antifreeze proteiny  
AFPG antifreeze glykoproteiny  
ICSI intracytoplazmatická injekcí injektáž spermie