

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Metody ředění a konzervace inseminačních dávek u prasat

Bakalářská práce

**Karolína Kapounová
Chov hospodářských zvířat**

Ing. Kateřina Zadinová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Metody ředění a konzervace inseminačních dávek u prasat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

20.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí bakalářské práce Ing. Kateřině Zadinové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, ochotu a trpělivost při zpracování této práce.

Rovněž patří mé velké díky doc. Mgr. Danielovi Nývltovi, Ph.D. za čas strávený při korektuře této práce.

Metody ředění a konzervace inseminačních dávek u prasat

Souhrn

Bakalářská práce byla zaměřena na zhodnocení metod ředění a konzervace inseminačních dávek u prasat. Cílem této práce bylo zpravovat literární přehled o metodách ředění spermatu a konzervaci inseminačních dávek u prasat, se kterými se můžeme nejčastěji setkat na inseminačních stanicích. Dále byly představeny základní informace o odběru spermatu od kance, vyšetření spermatu, jeho ředění a o konzervaci spermatu.

Umělá inseminace se využívá po celém světě a je nejpoužívanější a nejúčinnější biotechnologií v reprodukci prasat. Více než 90 % všech prasniček a prasnic po celém světě je inseminovaných touto technikou a méně než 10 % prasnic je využito pro přirozenou plemenitbu, jež je stále preferovaná v ekologických chovech prasat. Při reprodukci působí mnoho faktorů, které mohou ovlivnit kvalitu inseminačních dávek. Obecně lze tyto vlivy rozdělit na vnitřní faktory, jež ovlivňuje samotný kanec a na vnější faktory, které působí na odebrané sperma jako jsou podmínky vnějšího prostředí. Tyto faktory jsou podrobně okomentovány v této práci.

Dále byly v této práci diskutovány jednotlivé možnosti a postupy při ředění spermatu, přičemž byly komentovány i negativní vlivy na kvalitu spermatu, když ředění není prováděno správně. V práci je také komentováno, jaká je úloha ředidel spermatu a jejich nezanedbatelná důležitost. Také zde byly zmíněny látky jako například extrakt z kořene *Isatis*, bovinní sérový albumin, glutathion, cystein, vitamín E, hydroxytyrosol a chlorid zinečnatý, jež zlepšují kvalitu kančího spermatu během ředění a které by mohly být v budoucnu vhodnou součástí ředidel pro kančí sperma.

V práci byly popsány také možnosti konzervace inseminačních dávek prasat. Navzdory pokroku v metodách kryokonzervace kančího spermatu není zmrazené sperma v chovech běžně používáno kvůli velkému poškození spermií po kryokonzervaci a jejich snížené schopnosti oplodnění. Velká citlivost kančích spermií na nízké teploty prostředí je do jisté míry nevyhnutelná kvůli jejich fyziologické stavbě. Na druhé straně se běžně používá chlazené sperma v tekutém stavu s koncentrací 1,5–3 miliard spermií na dávku uchovávané až sedm dní v dlouhodobých ředidlech, které je z velké části zodpovědné za rozšířené používání umělé inseminace u prasat.

Tato práce přináší nové poznatky pro výrobu inseminačních dávek kanců a také může posloužit jako příručka hlavních postupů na inseminačních stanicích prasat. Nové poznatky zjištěné v této práci lze shrnout takto. Metoda ředění neovlivňuje kvalitu spermií. Přidání spermatu do ředidla umožňuje účinnou a bezpečnou produkci dávek spermatu, které lze použít pro konvenční umělou inseminaci. Extrakt z kořene *Isatis*, bovinní sérový albumin a hydroxytyrosol se ukázaly jako látky s výbornými antioxidačními vlastnostmi použitelné na ochranu kančích spermií. Zinečnaté ionty velmi příznivě působí na vlastnosti spermií. Pokud jsou předředené vzorky spermatu udržovány nad 15 °C po několik hodin, spermie získávají postupnou odolnost vůči chladovému šoku a následně lépe přežívají proces kryokonzervace.

Klíčová slova: kanec, umělá inseminace, plodnost, inseminační dávka

Methods of dilution and conservation of insemination doses in pigs

Summary

The bachelor thesis was focused on the assessment of the methods of dilution and preservation of insemination doses in pigs. The aim of this study was to provide a literature review on methods of sperm dilution and conservation of insemination doses in pigs, which we can most often encounter at insemination stations. Furthermore, basic information about the collection of sperm from a boar, the examination of sperm, its dilution and the preservation of sperm were described.

Artificial insemination is used worldwide and is the most widely applied and effective biotechnology in pig reproduction. More than 90 % of all gilts and sows worldwide are inseminated with this technique and less than 10 % of sows are used for natural mating, which is still preferred in organic pig farms. In reproduction, there are many factors that can affect the quality of insemination doses. In general, these influences can be divided into internal factors, which affect the boar itself, and external factors, which affect the collected sperm, such as the conditions of the external environment. These factors are commented in detail in this thesis.

Furthermore, individual options and procedures for diluting sperm were discussed in this study, while the negative effects on sperm quality when the dilution is not performed correctly were also commented on. The study also comments on the role of sperm thinners and their considerable importance. Substances such as Isatis root extract, bovine serum albumin, glutathione, cysteine, vitamin E, hydroxytyrosol and zinc chloride have also been mentioned. They improve the quality of boar sperm during dilution and could be used as an appropriate part of boar sperm diluents in the future.

The possibilities of preserving pig insemination doses were also described in this study. Despite advances in methods of cryopreservation of boar sperm, frozen sperm is not commonly used in breeding because of the great damage to sperm after cryopreservation and their reduced ability to fertilise. The high sensitivity of boar sperm to low environmental temperatures is to some extent unavoidable due to their physiological structure. On the other hand, refrigerated liquid semen with a concentration of 1.5–3 billion sperm per dose stored for up to seven days in long-term diluents is commonly used and is largely responsible for the widespread use of artificial insemination in pigs.

This study brings new knowledge for the production of boar insemination doses and can serve as a guide at pig insemination stations. The new findings presented in this study can be summarised as follows. The dilution method does not affect sperm quality. The addition of sperm to the diluent allows efficient and safe production of sperm doses that can be used for conventional artificial insemination. Isatis root extract, bovine serum albumin and hydroxytyrosol have been shown to be the substances with excellent antioxidant properties to protect boar sperm. Zinc ions have a very favorable effect on the properties of sperm. If pre-diluted sperm samples are kept above 15 °C for several hours, the sperm acquire a gradual resistance to cold shock and subsequently survive better the cryopreservation process.

Keywords: boar, artificial insemination, fertility, insemination dose

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	10
3 Literární přehled.....	11
3.1 Ejakulát.....	11
3.1.1 Spermie	11
3.1.2 Semenná plazma	13
3.1.3 Hodnocené ukazatele kančího semene	14
3.1.3.1 Makroskopické hodnocení spermatu.....	14
3.1.3.2 Mikroskopické hodnocení spermatu	14
3.1.4 Požadavky na kančí ejakulát pro výrobu inseminačních dávek	16
3.2 Faktory ovlivňující kvalitu kančího ejakulátu	17
3.2.1 Vnitřní faktory	17
3.2.1.1 Plemeno	17
3.2.1.2 Věk	17
3.2.1.3 Zdravotní stav	18
3.2.1.4 Velikost varlat	19
3.2.1.5 Frakce ejakulátu	20
3.2.2 Vnější faktory	20
3.2.2.1 Technologie ustájení.....	20
3.2.2.2 Roční období, klimatické podmínky	21
3.2.2.3 Výživa	22
3.2.2.4 Frekvence odběru	23
3.2.2.5 Odběr spermatu	23
3.3 Ředění spermatu	25
3.3.1 Postup ředění a teplota ředění.....	25
3.3.1.1 Rychlost ředění.....	26
3.3.1.2 Metody ředění.....	26
3.3.2 Látky zlepšující kvalitu kančího spermatu během ředění.....	27
3.3.3 Ředidla	29
3.3.4 Balení inseminačních dávek	31
3.4 Konzervace inseminačních dávek.....	32
3.4.1 Možnosti skladování	32
3.4.2 Kryokonzervace	33

3.4.2.1	Variabilita ve zmrazování spermatu kanců	34
3.4.2.2	Kryoprotektiva.....	35
3.4.2.3	Antioxidanty	37
3.4.2.4	Příprava inseminačních dávek pro kryokonzervaci.....	37
3.4.2.5	Skladování před kryokonzervací	38
3.4.2.6	Zmrazování a rozmrazování kančích spermií.....	38
3.4.2.7	Umělá inseminace zmrazeným a rozmrazeným spermatem	39
3.4.2.8	Alternativní metody kryokonzervace	40
4	Závěr	43
5	Seznam literatury	44
6	Seznam použitých zkratk a symbolů	54
7	Seznam obrázků	I
8	Seznam tabulek	II

1 Úvod

Prasata jsou důležitá zvířata z hlediska produkce vepřového masa, kterého se spotřebuje ve většině zemí nejvíce. Proto existuje velká snaha o zlepšení technologií asistované reprodukce u prasat, přičemž umělá inseminace (AI–artificial insemination) je nejčastěji používanou technikou (Ren et al. 2019; Martín-Hidalgo et al. 2020). V komerčních chovech, jež slouží k produkci vepřového masa je více než 90 % všech prasniček a prasnic inseminovaných touto technikou (Schulze et al. 2014a; Yeste et al. 2017; Martín-Hidalgo et al. 2020; Schulze et al. 2020). Zbýlá procenta zahrnují přirozenou plemenitbu, která se využívá hlavně v ekologických chovech prasat (Hodel et al. 2021).

Existuje několik faktorů, které mohou vysvětlit široké uplatnění umělé inseminace. Oproti přirozené plemenitbě dochází ke zrychlenému rozmnožování a zesílení genetické hodnoty, k ekonomickým úsporám a snadnějšímu řízení reprodukce. Kromě toho, protože nedochází ke kopulaci a žádnému přímému fyzickému kontaktu mezi kancem a prasnicí, je nižší riziko zavlečení nebo přenosu kančích patogenů do stáda prasnic (Knox 2016; Maes et al. 2016; Waberski et al. 2019). Jelikož se ve většině zemí v chovech prasat ve velké míře využívá umělá inseminace, hlavním důvodem pro zpracování této práce bylo zhodnotit vlivy, které mohou zhoršit kvalitu inseminačních dávek kanců a také sepsat možnosti, jak kvalitu spermatu zlepšit během ředění a konzervace.

Schopnost kance produkovat vysoce kvalitní sperma v dostatečném množství je pro tento typ zemědělské výroby rozhodující. Výběr mladých kanců pro produkci spermatu na inseminačních stanicích je dán především jejich vynikající genetickou hodnotou. Spolu s tím je kvalita spermatu základním výběrovým kritériem pro zajištění produkce vysokého počtu potomků (Smital 2009; Schulze et al. 2014a; Pinho et al. 2018).

Příprava inseminačních dávek ze spermatu vybraných kanců zahrnuje jednotlivé kroky, kterými jsou odběr spermatu, kontrola kvality spermatu, ředění spermatu, balení, distribuce a skladování. Moderní chov dnes vyžaduje produkci spermatu ve specializovaných inseminačních stanicích, což zlepšuje efektivitu reprodukce prasat (Luongo et al. 2022).

Nejčastěji se používá chlazené sperma v tekutém stavu, které vyžaduje ředění ejakulátu ve vodném roztoku, aby se zvětšil objem a zachovala se funkční životnost spermií po dobu 3–7 dnů (Fu et al. 2017; Fair & Romero-Aguirregomez-corta 2019). Rozsáhlá aplikace umělé inseminace v 80. letech 20. století podpořila vývoj krátkodobých a dlouhodobých ředidel pro skladování kapalin při 15–17 °C, stejně jako standardizaci a komercializaci konvenčních inseminačních katétrů a postupů (Yeste et al. 2017). Skladování spermatu v tekutém stavu při 17 °C je účinný způsob uchování kančího spermatu a vede k podobné míře březosti a velikosti vrhu jako u přirozeného páření (Fu et al. 2017).

Umělou inseminaci lze také provést pomocí kryokonzervovaného kančího spermatu (Yeste et al. 2017). První úspěšný porod selat po umělé inseminaci zmrazeným a rozmrazeným semenem proběhl v Anglii v roce 1970. Téměř 50 let po zavedení této technologie se zmrazené a rozmrazené sperma pro chov prasat využívá minimálně (Recuero et al. 2019). Kryokonzervace gamet představuje důležitý prvek v reprodukční biotechnologii. Umožňuje nekonečně dlouhou dobu skladování cenného genetického materiálu pro další použití v chovu nebo národních programech genetické ochrany zvířat (Fair & Romero-Aguirregomez-corta 2019; Simonik et al. 2022). Kryokonzervace kančího spermatu se však v praxi běžně nepoužívá.

Poškození kančích spermií kryokonzervací vede k významně nižší míře jejich přežití. Tento jev je významnější u kanců než u jiných druhů hospodářských zvířat, kde je kryokonzervace běžně používanou metodou uchovávání spermatu (Simonik et al. 2022).

Součástí práce jsou podrobně popsány různé faktory, které mohou ohrozit kvalitu produkovaných inseminačních dávek a je tedy důležité tyto vlivy co nejvíce omezit (Smital 2009; Lopez-Rodriguez et al. 2017; Martín-Hidalgo et al. 2020). Dále jsou zde diskutovány látky, které by mohly zlepšit kvalitu kančích spermií během ředění. Toto je důležité téma, protože stále u některých spermií během skladování dochází k poškození a následně ke smrti buněk. V neposlední řadě jsou v této práci komentovány možnosti, jak zlepšit kvalitu kančích spermií po kryokonzervaci, jelikož i přes velké pokroky v této oblasti stále dochází po kryoprezervaci u mnoha kančích spermií k velkému poškození a smrti (Baishya et al. 2014).

2 Cíl práce

Cílem práce je zpracovat ucelený literární přehled o metodách ředění spermatu a konzervaci inseminačních dávek u prasat. Dále pak shrnout poznatky o vnějších a vnitřních vlivech, které na ně působí.

3 Literární přehled

3.1 Ejakulát

Ejakulát je tekutina, která je složena ze spermií a semenné plazmy (Marvan et al. 1992). Kančí ejakulát je charakteristický velkým objemem, může mít až 500 ml s relativně nízkou koncentrací spermií přibližně 500 milionů na ml. U kanců je délka ejakulace velice specifická, jelikož může trvat 5–10 minut (Rodríguez-Martínez et al. 2009). Ejakulát kance se rozděluje na tři sekvenční frakce, přičemž složení každé frakce je jiné (Druart et al. 2019; Recuero et al. 2019).

První frakce kančího ejakulátu je frakce prespermiová, obsahuje sekret z uretrálních žláz, který má za úkol vyplavení moči a bakterií z močové trubice. Tekutina je nažloutlá, slizovitá a lepkavá. Tato frakce představuje 5–20 % z celkového objemu ejakulátu (Louda et al. 2001). Při přípravě inseminační dávky se tato frakce neodebírá, protože vykazuje značné mikrobiální znečištění (Luongo et al. 2022).

Následující frakce je velmi bohatá na spermie a označujeme ji jako frakci spermiovou. Tato frakce má smetanovou konzistenci a její ejakulace probíhá 1–3 minuty. Z celkového objemu ejakulátu představuje 30–50 %. Je tvořena sekretem z nadvarlat spolu s malým množstvím sekretu ze semenných váčků, prostaty a ojedinělým výskytem zrněk sekretu z bulbouretrálních žláz (Louda et al. 2001). Frakce bohatá na spermie neboli spermiová frakce obsahuje 80–90 % všech spermií z ejakulátu (Louda et al. 2001; Recuero et al. 2019). Tato frakce ejakulátu je základem pro přípravu inseminační dávky (Luongo et al. 2022). Počátečních 10 ml frakce bohaté na spermie obsahuje málo semenné plazmy, vyšší koncentraci spermií a považuje se za frakci ejakulátu s maximem spermií (Druart et al. 2019).

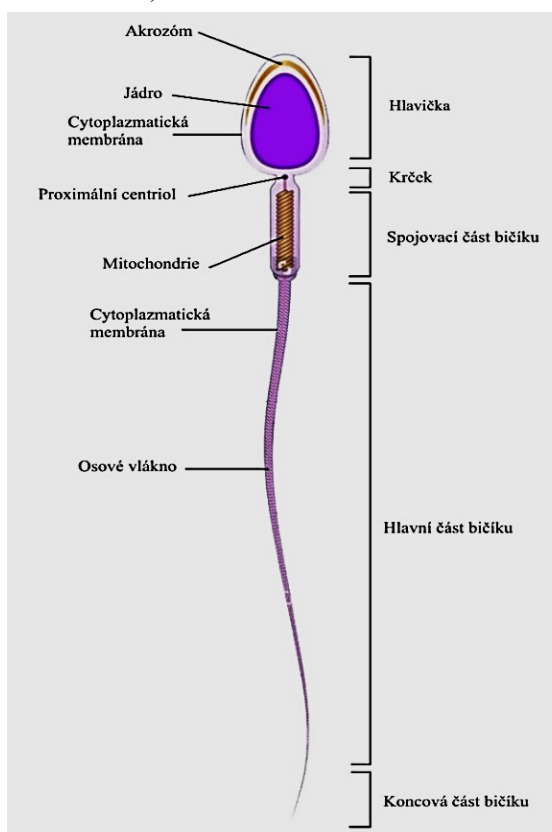
Ke konci ejakulace vzniká frakce postspermiová, jež je označovaná jako frakce chudá na spermie. Tato frakce je charakteristická velkým objemem semenné plazmy a nízkým počtem spermií (Louda et al. 2001; Luongo et al. 2022). Tekutina je mléčně vodnatá a obsahuje 40–60 % podílu z objemu ejakulátu. Nejvíce je zde zastoupen sekret ze semenných váčků a rosolovitá mazlavá část ejakulátu, tvořena bulbouretrálními žlázami, která je vylučována v největším množství na konci ejakulace. Tento rosolovitý sekret zabírá 10–20 % z objemu ejakulátu. Jeho úděl spočívá v utěsnění přední části vagíny a vchodu do děložního krčku, jako opatření proti výtoku spermatu z pohlavních orgánů prasnice po kopulaci (Louda et al. 2001). Pokud bude ejakulát použit pro výrobu inseminačních dávek, rosolovitý sekret se odstraní filtrací přes sterilní gázu při odběru semene nebo bezprostředně po něm v laboratoři (Louda et al. 2001; Druart et al. 2019).

3.1.1 Spermie

Spermie je samčí pohlavní buňka schopná samostatného pohybu a její cíl zahrnuje aktivní vyhledávání a oplození vajíčka. Velikost a tvar je druhově odlišen. Kančí spermie má délku 50–60 μm (Marvan et al. 1992). Spermie u kance mají své specifické vlastnosti, kam patří nízký obsah enzymu hyaluronidázy, zvýšená vnímavost vůči rychlejším změnám teploty, labilita povrchového membránového krytu a citlivost akrozómu vůči vnějšímu prostředí (Louda et al. 2001). Kančí spermie mají nižší obsah cholesterolu v membráně, taktéž mají zvýšenou tendenci

k oxidativnímu poškození kvůli relativně vysoké koncentraci nenasycených mastných kyselin mezi membránovými lipidy (Bathgate 2011; Guimarães et al. 2017; Tong et al. 2022). V neposlední řadě mají kančí spermie poměrně nízkou vrozenou antioxidační ochranu seminální plazmou (Bathgate 2011). Všechny tyto uvedené vlastnosti kančích spermií vedou k tomu, že jsou spermie kanců náchylné k poškození nízkými teplotami (Bathgate 2011; Baishya et al. 2014; Guimarães et al. 2017). Dále charakteristickými vlastnostmi kančích spermií jsou efektivní způsob získávání energie prostřednictvím oxidace pro zajištění pohybu mimo organismus kance a reakce na otřesy zvýšeným metabolismem následované poměrně rychlou sedimentací spermií (Louda et al. 2001).

Spermie je složena ze dvou základních částí – hlavičky a bičíku (Obr. 1) (Cibulka et al. 2004). U všech domácích hospodářských zvířat (savců) má hlavička spermie oválný a zploštělý tvar. Uvnitř hlavičky je uložena genetická informace. Na předním pólu hlavičky je akrozóm, který pokrývá u kance dvě pětiny jádra (Marvan et al. 1992). Uvnitř akrozómu se nachází řada enzymů jako hyaluronidáza, proakrozín, akrozín a další, které se podílejí na pronikání spermie do vajíčka při oplození (Hafez & Hafez 2000). Hlavička je na bazální části zakončena implantační jamkou, do níž se vkládá hlavice bičíku, pomocí toho dochází ke spojení těchto dvou částí (Marvan et al. 1992).



Obrázek 1 Popis spermie (vlastní ilustrace autorky)

Bičík se rozděluje na několik částí. Krček je krátký obsahuje proximální a distální centriol, který spojuje hlavičku s bičíkem. Na krček navazuje spojovací část bičíku, v níž je uložený velký počet mitochondrií. Následuje hlavní část bičíku, jež je nejdelší. Jejím základem je osové vlákno, kryté fibrózní vrstvou. Cílem fibrózní pochvy je zajistit pevnost a pružnost osových vláken při pohybu spermie. Poslední částí je koncová část bičíku, která obsahuje jen

osové vlákno. Celý povrch hlavičky a bičiku pokrývá cytoplazmatická membrána (Marvan et al. 1992; Hafez & Hafez 2000).

3.1.2 Semenná plazma

Semenná plazma představuje 93–97 % z celého objemu ejakulátu (Louda et al. 2001). Jak je dobře známo, kančí semenná plazma je komplexní směs tekutin varlat, nadvarlat a přídatných pohlavních žláz (González-Cadavid et al. 2014). Samčí přídatné pohlavní žlázy zahrnují semenné váčky, prostatu a bulbouretrální žlázy. Všechny jsou to exokrinní žlázy, které uvolňují svůj sekret do lumenu močové trubice (Bonet et al. 2013). Sekrety z těchto žláz tvoří přirozené ředidlo spermií, dále spermiím poskytují výživu a v neposlední řadě upravují spermiím prostředí během jejich pasáže močovou trubicí a v samičím reprodukčním traktu (Marvan et al. 1992). U kance pochází 55–75 % objemu ejakulátu ze sekretů prostaty a uretrálních žláz, 10–25 % ze sekretů Cowperových žláz a 15–20 % ze semenných váček. Pouze 2–5 % objemu ejakulátu je složeno ze sekretu varlat a nadvarlat (Bonet et al. 2013).

Semenné váčky, také známé jako měchýřkovité nebo vezikulární žlázy, jsou párové žlázy narůžovělé barvy a houbovitého vzhledu (Bonet et al. 2013). Zajímavé je, že u kance vylučovací kanálky semenných váček vyúsťují do močové trubice samostatně, zatímco u ostatních samců hospodářských zvířat vyúsťují společně s chámovodem (Marvan et al. 1992). Energetické substráty vylučované semennými váčky jsou sorbitol, glycerofosfocholin a fruktóza. Tyto látky dodávají spermiím energii pro jejich pohyb (Bonet et al. 2013). Dále tyto žlázy vyměšují do semenné plazmy ergothionein, glutathion a kyselinu askorbovou (Jelezarsky et al. 2008; Bonet et al. 2013). V neposlední řadě tyto žlázy produkují do semenné plazmy inositol a kyselinu citrónovou (Mann 1974). Bylo zjištěno, že proteiny vylučované semennými váčky představují 80–90 % celkového obsahu bílkovin v semenné plazmě, zbytek pochází ze sekretu nadvarlat a prostaty (Jelezarsky et al. 2008; Bonet et al. 2013).

Prostata je nepárová žláza, která je u kance (a býka) rozdělena na dvě části. První část se nazývá tělo prostaty a druhý úsek je označován jako roztroušená část. Vylučovací kanálky prostaty ústí v blízkosti kanálků vezikulárních žláz. Prostata produkuje do semenné plazmy proteiny, jejichž účinky jsou popsány níže (Bonet et al. 2013).

Cowperovy žlázy, nazývané také jako bulbouretrální žlázy, jsou párové žlázy narůžovělé barvy (Bonet et al. 2013). Tato žláza je v porovnání s jinými živočišnými druhy nejvíce vyvinuta u kance (Marvan et al. 1992). Sekret této žlázy obsahuje sialoproteiny (obsah kyseliny sialové nad 25 %), které se uvolňují hlavně na konci ejakulace a vytváří gelovou zátku, která zabraňuje zpětnému toku semene (Mann 1974; Bonet et al. 2013). Dále tento sekret obsahuje glykoproteiny, které chrání a lubrikují povrch pohlavních cest kance při ejakulaci (Bonet et al. 2013).

Semenná plazma je tvořena převážně bílkovinami, obsahuje také řadu anorganických iontů, solí, cukrů, kyseliny citrónové, prostaglandinů a elektrolytů (Druart et al. 2019).

Proteiny semenné plazmy jsou molekuly s vysokou molekulovou hmotností, které vykonávají mnoho funkcí. Souvisí s vývojem, zráním, transportem a přežitím spermií v samičím reprodukčním traktu, stejně jako s kapacitací a akrozomovou reakcí. V neposlední řadě souvisí s rozpoznáváním spermií, vajíček a také mají ochrannou funkci proti mikrobiálnímu a oxidačnímu poškození (González-Cadavid et al. 2014). Nicméně existují i proteiny

poškozující spermie, které mají negativní vliv na motilitu spermií (De Lazari et al. 2019). Přibývající důkazy naznačují, že společné působení pozitivních a negativních regulačních faktorů semenné plazmy regulují stav kapacity savčích spermií. Biologické účinky těchto faktorů na funkci spermií jsou složité a nejsou stále dobře pochopeny. Částečně kvůli vysoké variabilitě složení semenné plazmy mezi druhy, mezi samci v rámci stejného druhu a mezi ejakuláty homologických samců (Centurion et al. 2003).

3.1.3 Hodnocené ukazatele kančího semene

Průměrný objem ejakulátu u dospělého kance se pohybuje obvykle mezi 200–300 cm³, koncentrace spermií pak 250–400 tisíc na 1 mm³. Motilita se pohybuje od 60 do 90 % a celkový počet spermií se pohybuje v rozmezí 50 až 90 miliard. Maximální přípustný výskyt morfologicky změněných spermií ve spermatu musí být do 25 % (Louda et al. 2001; Lipenský et al. 2014).

Pomocí makroskopických a mikroskopických vyšetřovacích metod se provádí základní posouzení ejakulátu. Bezprostředně po odběru ejakulátu se provede makroskopické posouzení spermatu. Tímto vyšetřením se hodnotí následující parametry: objem, konzistence, barva, pach, obsah cizích příměsí a pH. Posouzení motility, koncentrace spermií, morfologie a životnost spermií se hodnotí pomocí mikroskopického vyšetření (Kos et al. 2019). Při mikroskopickém vyšetření je nutné mít všechny pomůcky, které jsou v kontaktu se spermii zahřáté na 30–35 °C (Louda et al. 2001).

3.1.3.1 Makroskopické hodnocení spermatu

Objem spermatu – určujeme pomocí kalibrované nádoby a vyjadřuje se v cm³ nebo ml. Taktéž se může sperma zvážit a poté se uvede v gramech (Louda et al. 2001; Kos et al. 2019).

Konzistenci – posuzujeme subjektivně, nakloněním odběrové nádoby a zhodnocením ulpívání tekutiny na stěně. Pokud je viskozita vodnatá s bílou barvou znamená to, že sperma má nízkou koncentraci spermií (Louda et al. 2001; Kos et al. 2019).

Barva – by měla být světle sivá, bílá nebo mírně nažloutlá. Pokud se vyskytuje jiná barva svědčí to o přítomnosti moči, hnisu, krve a podobně (Louda et al. 2001).

Pach – má neutrální vůni, často přirovnávanou k vaječnému bílku. Specificky kančí nebo ostrý pach vypovídá o znečištění spermatu močí, prepuciálním sekretem, případně obsahem předkožkového divertikula (Louda et al. 2001; Kos et al. 2019).

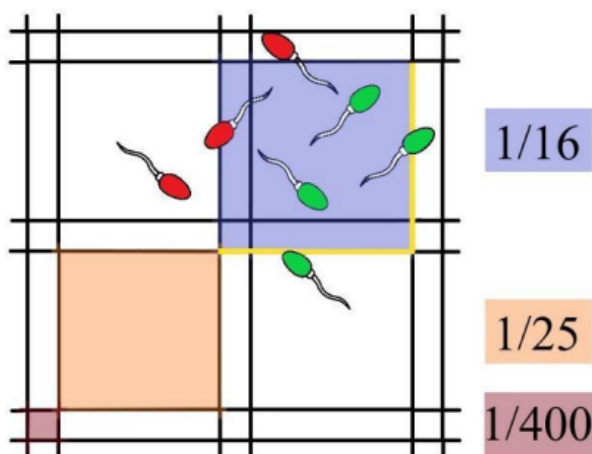
Hodnota pH – se nehodnotí jako závažný ukazatel (Louda et al. 2001). V čerstvě ejakulovaném spermatu kance se pH pohybuje mezi 7,2 a 7,5 a pod touto hodnotou se pohyblivost i metabolismus spermií postupně snižuje (Johnson et al. 2000).

3.1.3.2 Mikroskopické hodnocení spermatu

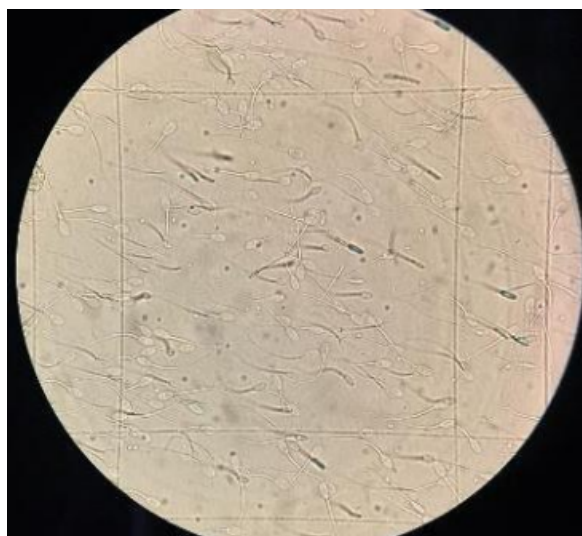
Aktivita (motilita) – obecně označuje jakoukoli schopnost spermií se pohybovat. V užším slova smyslu motilitou rozumíme pouze tzv. progresivní motilitu, to znamená, že se spermie pohybuje přímočaře dopředu za hlavičkou. Progresivní motilitu vyjadřujeme v procentech. Také rozlišujeme patologické formy pohybu například pohyb trhavý, kruhový, přerušovaný, oscilační a retrogradní (Kos et al. 2019).

Aktivitu určujeme vizuálně při 200x–300x zvětšení, na podložním sklíčku zahřátém na 38 až 40 °C (Louda et al. 2001). Pokud bychom chtěli detailnější analýzu pohybu je možné využít speciální analyzátor CASA (analýza spermií pomocí počítače), který je schopen rozlišovat různé formy pohybu a rychlost na základě předem vymezených parametrů (Kos et al. 2019). Motilita spermií se běžně používá k hodnocení kvality spermatu na stanicích umělé inseminace, protože je to jeden z parametrů, který je nejvíce ovlivněn během skladování (Dziekońska et al. 2009).

Koncentrace spermií – se určuje pomocí různých technik, lze ji stanovit fotometricky, hemocytometricky, nebo počítačově. Při hodnocení ejakulátu a jeho následném zpracování pro přípravu inseminačních dávek je měření koncentrace spermií velmi důležitým krokem. Vyjadřuje se počtem spermií v 1 mm³. Fotometrickou metodou hodnotíme stupeň zákalu, který vznikne po standardním naředění nativního semene. Tato technika se běžně používá v inseminačních stanicích. Mezi základní vyšetřovací metodu přísluší hemocytometrické stanovení v počítačích komůrkách (Obr. 3). Při použití této techniky jsou zjištěné hodnoty poměrně přesné, nicméně provedení je dosti pracné. V této metodě se nejvíce používá Bürkerova počítací komůrka, avšak používají se i další typy komůrek například Thomova a Neubauerova. V komůrce počítáme všechny spermie, jejichž hlavičky se vyskytují vně stanoveného čtverce, případně se dotýkají z vnějšku dvou sousedních stran příslušného čtverce (Obr. 2; Kos et al. 2019). U kanců povětšinou počítáme spermie v 10 čtvercích komůrky o ploše 1/25 mm² a napočítaný počet spermií vynásobíme 5000 (Louda et al. 2001).



Obrázek 2 Schéma Bürkerovy komůrky (Kos et al. 2019)



Obrázek 3 Spermie v Bürkerovy komůrce pod mikroskopem (Kos et al. 2019)

Životnost spermií – se zjišťuje při vyšetření integrity povrchových membrán spermií. Vzorek spermií obarvíme pomocí kombinace barviv eosinu a nigrosinu. Barvivo nigrosin má za úkol obarvit pozadí preparátu, zatímco barvivo eosin proniká zkrz membránu do mrtvých spermií a obarví je do červena. Bílé, neobarvené spermie jsou vyhodnoceny jako živé s neporušenou membránou (Kos et al. 2019).

Morfologické vyšetření spermií – se provádí v pravidelných intervalech, zpravidla 1x za měsíc. U kanců s vyšším výskytem morfologicky abnormálních spermií se vyšetření provádí častěji (Louda et al. 2001). Toto vyšetření se řadí mezi nejobektivnější metody mikroskopického posuzování spermatu. Kvalitní nátěr spermatu na sklíčku se musí obarvit.

K obarvení je možné použít barvení dle Brandon-Fareillyho, dle Karrase, nebo Hemacolor (Kos et al. 2019).

Během spermatogeneze vznikají změny primární, kam řadíme změny na hlavičce, středním mitochondriálním oddílu, proximální kapku a stočený ocásek. Sekundární změny jsou většinou spojovány s defekty ocásku, které vznikají důsledkem nedokončeného zrání, nebo při odběru a zpracování semene. Změny sekundární zahrnují distální kapku, jednoduše zahnutý ocásek či chybějící ocásek (Lipenský et al. 2014; Kos et al. 2019).

3.1.4 Požadavky na kančí ejakulát pro výrobu inseminačních dávek

Sperma kance musí mít mléčně bílou až šedobílou barvu a další charakteristické vlastnosti kančího spermatu jako například konzistenci a jiné. Sperma musí být bez zápachu a nesmí obsahovat cizí přímíseniny jako je krev, moč, hnis a tak dále. Objem filtrovaného spermatu, který je bez hlenové zátky musí mít nejméně 100 cm³, u mladých kanců do 12 měsíců věku musí mít minimálně 80 cm³. Hustota spermatu nesmí být menší než 150 000 v mm³, motilita spermií musí být minimálně 70 % a morfologicky normálních spermií musí být alespoň 75 %. V neposlední řadě sperma nesmí obsahovat patogenní zárodky, ani velký nález nepatogenních zárodků (Louda et al. 2001; Schulze et al. 2013a; Fair & Romero-Aguirregomezcorta 2019; Waberski et al. 2019).

3.2 Faktory ovlivňující kvalitu kančího ejakulátu

Četné studie ukazují, že výsledky kvantitativních a kvalitativních parametrů ejakulátů jsou ovlivněny faktory závislými i nezávislými na kanci (Knecht et al. 2017). Mezi tyto faktory řadíme plemeno, věk, zdravotní stav, velikost varlat, frakce ejakulátu, technologii ustájení, roční období, výživu a také frekvenci odběru (Smital 2009; Knecht et al. 2017; Kuhlitz et al. 2019).

3.2.1 Vnitřní faktory

3.2.1.1 Plemeno

Kvalita plemenného kance se neodráží pouze v jeho plemenné hodnotě, ale také v kvalitě jeho reprodukčních funkcí, které vymezují využití i vynikajících plemenných kanců. O genofond špičkových plemenných kanců je velký zájem, a proto je snaha o jejich maximální využití. Na druhou stranu je kvalita spermatu u kanců značně proměnlivá, což ztěžuje produkci inseminačních dávek (Kamanová et al. 2018).

Dle Schulze et al. (2014a) plemeno kance má významný vliv na všechny kvantitativní a kvalitativní parametry spermií. Významně nejvyšší objemy poskytují kanci plemene yorkshire a landrace (ať jde o Českou nebo Německou), zatímco nejnižší objem ejakulátu je odebírán od kanců plemene duroc (Schulze et al. 2014a; Kamanová et al. 2018). Nejvyšší koncentrace spermií se vyskytují u kanců plemene duroc a large white. Celkový počet spermií v ejakulátu je ve srovnání s ostatními plemeny nejvyšší u plemen pietrain a duroc (Schulze et al. 2014a).

Plemeno kance významně ovlivňuje i motilitu spermií. Rozdíly mezi jednotlivými plemeny jsou však malé, pohybují se mezi 71 a 74 % pohyblivých spermií (Schulze et al. 2014a). Morfologie spermií je také významně ovlivněna plemenem kance. Nejnižší výskyt abnormalit spermií byl zjištěn u kanců plemene yorkshire a landrace (ať jde o Českou nebo Německou), zatímco kanci plemene duroc vykazují nejvyšší procento morfologicky abnormálních spermií (Schulze et al. 2014a; Kamanová et al. 2018). Většina autorů se shoduje, že žádné plemeno ne vyniká ve všech charakteristikách spermatu (Smital 2009).

3.2.1.2 Věk

Věk kance je důležitým fyziologickým faktorem přispívajícím k úspěchu umělé inseminace prasat (Tsakmakidis et al. 2012). Většina kanců používaných v inseminačních stanicích začíná svou reprodukční výkonnost ve věku 7–8 měsíců, avšak plného vývoje a produkčních schopností dosáhnou později. Kanci dospívají v různých časech, obvykle v 9–10 měsících, přičemž variabilita vyplývá z genotypu a podmínek odchovu (Knecht et al. 2017). Stárnutí samců je doprovázeno hormonálními a buněčnými změnami ovlivňujícími kvalitu spermií a také jejich oplodňovací schopnost (Tsakmakidis et al. 2012). Knecht et al. (2017) zjistili, že nejlepší užitkovost mají kanci ve věku 24–30 měsíců, zatímco podle Smitala (2009) se produkce spermií zvyšuje až do 3,5 roku kance.

Věk kance má významný vliv na objem ejakulátu a celkový počet spermií. Tyto parametry spermatu se zvyšují s rostoucím věkem. Dále má významný vliv na přítomnost

morfologicky abnormálních spermií v semenu. Kanci mladší 8 měsíců mají více abnormálních spermií než starší kanci ve věku 9–14 měsíců (Schulze et al. 2014a).

U základních charakteristik spermatu byl hlášen pokles testosteronu související s věkem. Snížení testosteronu související s věkem je komplexní a zahrnuje vnitřní a vnější faktory Leydigových buněk. Je známo, že věk kance a kvalita spermatu jsou brány v úvahu jako faktory pro vyřazení kance. Míra výměny je odlišná, ale obecně jsou kanci nahrazeni kolem tří let, pokud nejsou skutečně výjimeční, v takovém případě jsou chováni až do věku 5 let (Tsakmakidis et al. 2012).

3.2.1.3 Zdravotní stav

Vyšetření na jatkách u kanců utracených kvůli problémům s plodností odhalují různé patologické stavy varlat, jako je varikokéla, fibróza, zánět nebo krvácení. Z těchto jmenovaných se vyskytuje nejčastěji varikokéla. U kanců byly také popsány některé nádory zejména hemangiom nebo tumor ze Sertoliho buněk, které mohou vést ke špatné kvalitě spermatu. Inseminacním stanicím pro kance by prospěla metoda časného zachytu těchto stavů, např. ultrazvukovým vyšetřením šourku a varlat (Lopez-Rodriguez et al. 2017).

Existuje jen málo infekčních bakterií, které jsou předmětem zájmu ve vztahu k umělé inseminaci prasat (Althouse & Rossow 2011). Kančí ejakuláty obvykle obsahují 10^4 až 10^5 bakterií/ml. Většina z nich je pro zvíře nepatogenní, mohou však zhoršit kvalitu spermií. Mezi specifické bakteriální patogeny ve spermatu prasat se řadí *Brucella suis*, *Leptospira* spp., *Mycobacterium* spp., *Chlamydia* spp. a *Mycoplasma* spp. (Maes et al. 2016). I tak je důležité si uvědomit, že některé bakteriální druhy jsou normální součástí kančího ejakulátu.

Chlamydifilóza u kanců může způsobit poruchy urogenitálního systému, i když preferuje kolonizaci střevního traktu, přičemž mnoho prasat je asymptomatických (Althouse & Rossow 2011).

Leptospiroza je běžné bakteriální onemocnění prasat, které může přispívat k reprodukční neefektivitě. Je široce rozšířena po celém světě, má více sérotypů, z nichž některé mají zoonotický význam. Leptospiry se mohou lokalizovat v urogenitálním traktu vnímavého kance, což vede k chronickému přenašečství (Althouse & Rossow 2011). Obecně bakterie mají na spermie spermicidní účinky, které způsobují významný pokles motility, poškození plazmatické membrány a také byla pozorována zjevná aglutinace spermií (Althouse & Lu 2005).

Nedávno bylo zjištěno, že několik virových agens může také ovlivnit kvalitu a produkci spermatu (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Mezi viry, které mají vliv na kvalitu spermatu náleží: virus Aujeszkyho choroby, virus japonské encefalitidy, virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat, prasečí rubulavirus a prasečí enterovirus (Maes et al. 2016; Lopez-Rodriguez et al. 2017).

Virus Aujeszkyho choroby způsobuje přechodné zvýšení abnormálních spermií ve spermatu infikovaných kanců. Vylučování viru však není striktně spojeno s klinickým příznaky nebo se snížením kvality spermatu a rekultivace kanců latentně infikovaných představuje trvalé riziko. Klinicky infikovaní kanci často nejsou schopni naskočit na fantom (Maes et al. 2016). Za viremických podmínek se mohou infikované bílé krvinky vylučovat do spermatu a způsobit infekční leukospermii (Althouse & Rossow 2011).

Virus japonské encefalitidy je patogen přenášený komáry (Althouse & Rossow 2011; Maes et al. 2016). Virus představuje ekonomicky důležitý reprodukční patogen chovných prasat. Infekce vnímavých kanců vede k edematózním, překrveným varlatům a spermatu s četnými abnormálními spermii a významně snižuje celkový počet a počet pohyblivých spermii. Tyto změny jsou obvykle dočasné a většina kanců se zcela zotaví (Maes et al. 2016).

Virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRS) způsobuje poškození membrán a akrozómů spermii. Většina spermii takto poškozených byla později detekována jako mrtvá (Schulze et al. 2013b). Dle Schulze et al. (2013b) k poškození spermii dochází v důsledku přímého vlivu virové replikace v samčím reprodukčním traktu, zejména u spermatogonií, spermatid a spermatocytů. Infekce spermatogenního epitelu má přímý vliv na spermatogenezi a také způsobuje buněčnou depopulaci a deskvamaci. Během akutního onemocnění může kanci kromě anorexie, letargie a respiračních klinických příznaků chybět i libido (Schulze et al. 2013b; Maes et al. 2016).

Prasečí rubulavirus je spojen s onemocněním modrých očí u prasat, avšak způsobuje i reprodukční problémy. Kanci obecně nevykazují klinické příznaky, s výjimkou epididymitidy a orchitidy (Althouse & Rossow 2011; Maes et al. 2016; Lopez-Rodriguez et al. 2017). V závažných případech virus způsobuje ztrátu libida. Sperma od infikovaných kanců vykazuje dočasnou nebo trvalou neplodnost se snížením koncentrace spermii. Dále sperma obsahuje zvýšený výskyt morfologických abnormalit, snížení motility a životaschopnosti spermii. Navíc u některých kanců se vyskytuje azoospermie neboli absence spermii v ejakulátu (Maes et al. 2016).

Prasečí enterovirus u kanců může vést k semenné vesikulitidě, abnormalitám spermii a sníženému libidu (Maes et al. 2016; Lopez-Rodriguez et al. 2017).

3.2.1.4 Velikost varlat

Ve varlatech kanců se denně vytvoří 15 miliard spermii (Kamanová et al. 2018). U dospělého kance se vyprodukuje denně 20 až 30 milionů spermii z 1 g varletního parenchymu (Říha et al. 2001). Pinho et al. (2018) ve své studii zjistili, že rozdíly v objemu a celkové koncentraci spermii jsou způsobeny velikostí varlat, kde zvířata s největší šířkou šourku ejakulovala větší objem spermatu. Biometrie (délka a šířka) a objem varlat pomáhají při charakterizaci puberty a pohlavní dospělosti u kanců, protože vysoce korelují s vývojem varlat, schopností produkovat sperma, objemem spermatu a charakteristikami spermatu. Dále se používají jako klíčové parametry v šlechtitelských programech.

Normální kanci by měli vykazovat rozdíl v průměru mezi varlaty menší než půl centimetru (Clark et al. 2003). Několik studií uvádí, že levé varle bývá obvykle větší než pravé varle (Clark et al. 2003; Jacyno et al. 2015). Podle Jacyno et al. (2015) kanci s většími varlaty produkují ejakuláty s vyšším počtem spermii ve srovnání s kanci s menšími varlaty. Dle Schulze et al. (2020) selekce kanců s velkými varlaty v pubertě povede ke zvýšené koncentraci spermii v ejakulátu.

Flowers (2022) ve své studii zjistil, že kanci s malou porodní hmotností mají menší varlata, relativně menší počet Sertoliho buněk a produkují méně normálních spermii ve srovnání se selaty kanců s vyšší porodní hmotností. Podle Flowerse (2022) kanci, kteří při narození vážili 2 kg, trvale produkovali více spermii ve srovnání se sourozenci o hmotnosti 1

kg. Dohromady kanci s vyšší porodní hmotností vyprodukovali během svého života o 1,2 bilionu spermií více než kančí selata s nižší porodní hmotností. To odpovídá zvýšení produkce spermií o 35 % na 1 kg porodní hmotnosti. Snížení porodní hmotnosti o 1 kg proto typicky vede k poklesu produkce spermií, bez ohledu na to, zda to bylo způsobeno špatnou výživou matky či tepelným stresem (Flowers 2022). Vzhledem k tomu, že několik studií ukázalo pozitivní korelaci mezi velikostí varlat a znakem spermatu, Hodel et al. (2021) došli k závěru, že výběr kanců podle velikosti varlat může být snadno použitelným způsobem k výběru plodnějších kanců s vyšším reprodukčním výkonem.

3.2.1.5 Frakce ejakulátu

Vliv dané frakce ejakulátu na kvalitu semene je připisován především změnám v kvalitě semenné plazmy. Semenná plazma obsahuje různé organické a anorganické látky včetně proteinů, které ovlivňují funkce a schopnost oplodnění spermií (Dziekońska et al. 2017).

Hlavní složkou prespermiové frakce je sekret z uretrálních žláz s ojedinělým obsahem zrněk sekretu bulbouretrálních žláz a minimální přítomností spermií. Jak bylo popsáno výše tato frakce vykazuje vysoké mikrobiální znečištění a její posláním spočívá ve výplachu močové trubice kance (Louda et al. 2001). Jelikož je výskyt spermií v této frakci sporadický, lze tuto frakci označit jako nekvalitní. Při odběru spermatu se tato frakce nikdy neodebírá (Sebastián-Abad et al. 2021; Luongo et al. 2022).

Za nejkvalitnější frakci se považuje frakce spermiová, neboť obsahuje většinu spermií z celého objemu ejakulátu. Dziekońska et al. (2017) ve své studii zjistili, že spermie z frakce bohaté na spermie mají lepší kvalitu než spermie z chudé frakce. Toto tvrzení je v souladu s předchozími studiemi (García et al. 2009). V současné době neexistuje shoda názorů o zahrnutí na spermie chudé frakce pro přípravu inseminačních dávek, protože je třeba zdůraznit, že různá množství semenné plazmy z různých frakcí ejakulátu mohou ovlivnit kvalitu spermií a konzervaci spermatu (Sebastián-Abad et al. 2021).

3.2.2 Vnější faktory

3.2.2.1 Technologie ustájení

Podmínky ustájení a postupy řízení jsou hlavními faktory, které ovlivňují sexuální chování kance. Nešťastné nebo nepříjemné zážitky při odběru semene, jako je kluzká podlaha nebo zranění, mají u samců plemenných zvířat za následek snížení libida (Hodel et al. 2021).

Sociální prostředí má významný vliv na pohlavní schopnost kance. Kanci chovaní bez kontaktu s jinými prasaty, pohlavně dospívají později, vykazují slabší sexuální touhu a menší objem ejakulátu. Taková zvířata mohou být dokonce asociální a projevovat agresivitu vůči jedincům stejného plemene (Savić et al. 2017). Typ ustájení dospělých kanců může nepřímo ovlivnit kvalitu spermatu bakteriální kontaminací. Pokud je dodávána podestýlka, měly by být před odběrem spermatu odstraněny zbytky podestýlky na ventrální straně břicha, aby se zabránilo bakteriální kontaminaci spermatu (Lopez-Rodriguez et al. 2017).

Produkcí spermatu ovlivňuje i ustájení mladých kanců. Ukázalo se, že skupinové ustájení rostoucích kanců je prospěšné pro následnou reprodukční výkonnost. Kanci, kteří byli ustájeni ve skupině měli v průměru silněji vyvinuté nohy, vyšší libido, dřívější uskutečnění prvního

odběru a vyšší počet spermií v ejakulátu ve srovnání s kancí chovanými samostatně (Lopez-Rodriguez et al. 2017).

3.2.2.2 Roční období, klimatické podmínky

Kvalitu ejakulátů, a tím i kvalitu produkovaných inseminačních dávek, mohou zhoršit různé faktory, přičemž jedním z těchto faktorů je roční období, ve kterém se ejakulát odebírá (Martín-Hidalgo et al. 2020). Produkční výsledky kanců z hlediska množství a kvality ejakulátu získaného během kalendářního roku se mohou lišit až o 30 % (Knecht et al. 2017). Konkrétně během léta dochází k nižší kvalitě spermií v ejakulátu. Toto snížení kvality spermií je spojeno s efektem zvýšené fotoperiody během letních měsíců a tepelným stresem, ke kterému dochází během ročních období, kdy jsou okolní teploty vysoké (Martín-Hidalgo et al. 2020).

Okolní teploty, vyšší než teploty v termoneutralní zóně, mají akutní i chronické účinky, které ohrožují všechny aspekty samčí reprodukční soustavy (Flowers 2022). Teplo může nepříznivě ovlivnit spermatogenezi a způsobit mírnou až střední degeneraci varlat (Suriyasomboon et al. 2004; Lipenský et al. 2010). Suriyasomboon et al. (2004) ve své studii zjistili, že zvýšená teplota, ale i zvýšená vlhkost má negativní dopad na objem a celkovou produkci spermií v ejakulátu.

Tepelný stres anebo horké počasí má negativní vliv na produkci spermií a ovlivňují motilitu spermií, integritu akrozomů nebo morfologii spermií. Motilita a morfologie spermií je nejcitlivějším indikátorem tepelného stresu u kanců (Lipenský et al. 2010). Normální produkce spermií typicky klesá během 2 týdnů po akutním tepelném stresu a trvá dalších 5–6 týdnů, než se vrátí k původnímu množství před stresem. V důsledku toho jsou spermie v každé fázi spermatogeneze náchylné k negativním účinkům okolních teplot, které přesahují teploty termoneutralní zóny (Flowers 2022).

Nicméně pravděpodobně důležitější v komerčních systémech živočišné výroby, jsou chronická období tepelného stresu, která se zdají být převládající i v situacích, kdy jsou samci umístěni v mechanicky větraných budovách, kde se používají doplňková chladicí zařízení. Chronický tepelný stres je typicky definován jako situace, kdy jsou samci vystaveni okolním teplotám, které jsou po delší dobu v horním rozmezí jejich termoneutralní zóny ve spojení s vysokou úrovní relativní vlhkosti. Nejnižší kvalita spermatu se často vyskytuje několik měsíců po nástupu tohoto tepelného stresu. Také se zdá, že u prasat existuje podskupina kanců, u nichž se produkce spermií po chronickém tepelném stresu nikdy nevrátí k normálu, což naznačuje, že spermatogeneze může být trvale ovlivněna (Flowers 2022).

Fotoperioda je další složkou, o které se předpokládá, že se podílí na sezónních změnách v produkci spermií (Flowers 2022). Méně denního světla na podzim zvyšuje objem a koncentraci ejakulátu u kanců, zatímco na jaře dochází ke snížení kvality a produkce spermií (Yeste et al. 2010).

Dle Smitala (2009) je nejnižší kvalita spermatu pozorována v létě, zatímco nejvyšší kvalita je dosahována na podzim a v zimě. Výše uvedená klimaticky nepříznivá období mají za následek významný pokles počtu dávek spermatu získaných z ejakulátu a také snížení schopnosti oplodnění samice (Singh et al. 2022).

3.2.2.3 Výživa

Flowers (2022) uvedl, že u dospělých kanců, kteří váží nad 200 kg je 37 MJ metabolizovatelné energie a 230 g hrubých bílkovin denně adekvátních k udržení normálního libida a produkce spermií. Požadavky na udržení těchto vlastností jsou však ovlivněny řadou faktorů, včetně genetiky, zdravotního stavu, okolní teploty a frekvence odběrů, takže tato doporučení lze nejlépe považovat za odhady.

Dle Flowerse (2022) je snížení a omezení proteinu v krmné dávce (KD) škodlivější než nedostatečný energetický příjem. Avšak libido klesá dříve, než dojde k poklesu množství a kvality spermií v obdobích, kdy dochází k chronickému nedostatku těchto živin. To je výhodné z pohledu managementu, protože to umožňuje včasnou identifikaci a intervenci.

V praxi jsou kanci typicky krmeni stravou s vysokým obsahem hrubých bílkovin, protože jsou pro kance významné. Nadměrný protein ve stravě však může způsobit nadváhu kanců, zvýšení koncentrace močoviny v krvi, skatolů v séru a abnormálních spermií. Několik studií uvádí (Luce et al. 1976; O'Shea et al. 2010), že kanci krmení dietou s nižším obsahem bílkovin mají podobnou kvalitu spermatu jako kanci krmení dietou s vysokým obsahem bílkovin (Ren et al. 2015).

Účinky mikroživin na množství i kvalitu produkovaných spermií byly a nadále jsou důležitou oblastí výzkumu. To zahrnuje přidavek mastných kyselin, aminokyselin, anorganických forem minerálů a vitamínů. Tyto mikroživiny jsou typicky buď složkami spermií samotných, nebo nezbytnými faktory pro produkci, ochranu a funkci spermií. Zdá se tedy rozumné, že použití mikroživin jako doplňků vyvážené stravy může zlepšit spermatogenezi. Zahrnutí mikroživin do stravy je důležitou strategií managementu, zejména v situacích, kdy je náročné udržet optimální podmínky pro produkci spermií (Flowers 2022).

Ren et al. (2015) ve své studii zjistili, že není žádný významný rozdíl v kvalitě spermatu, když jsou kanci krmeni stravou s 15 % nebo 21 % hrubého proteinu doplněného stejnou hladinou esenciální aminokyseliny lysinu. Mezitím zvýšení příjmu aminokyselin v nízkoproteinové dietě u dospělých kanců zvyšuje produkci spermií. Bylo zjištěno, že diety doplněné threoninem zlepšují kvalitu spermatu kanců. Různé množství aminokyselin tedy může ovlivnit kvalitu spermatu, zejména pohyblivost spermií a celkové množství spermií, jak uvedli ve své studii Ren et al. (2015).

Selen získal velkou pozornost pro své antioxidační vlastnosti, jelikož pomáhá chránit lipidy membrán spermií proti peroxidaci. Vitamin E spolupracuje se selenem na ochraně spermií proti peroxidaci lipidů a nedostatek tohoto vitamínu v krmivu může mít za následek sníženou pohyblivost a více abnormálních spermií v ejakulátu (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Podle studie Martinse et al. (2014) kanci, kteří mají do KD přidáný organický selen vykazují vyšší procento normálních buněk, snížené procento proximálních cytoplazmatických kapek, změn hlavy a střední části spermií, nicméně selen nemá vliv na morfologii spermií.

Studie ze starších let uvádějí, že podávání L-karnitinu v KD kanců zvyšuje jak objem spermatu, tak koncentraci spermií (Yeste et al. 2010). Yeste et al. (2010) ve své studii uvedli, že tento účinek na objem ejakulátu a koncentraci spermií nebyl pozorován, i když použili množství L-karnitinu podobné tomu, které bylo použito v předchozích experimentech. Lze tedy shrnout, že vědci by se měli více zaměřit na experimenty v této oblasti, jelikož mechanismy působení L-karnitinu na spermie zůstávají neznámé.

Jak bylo popsáno výše, tepelný stres negativně ovlivňuje kvalitu spermií u kanců. Singh et al. (2022) ve své studii zjistili, že podávání lněného oleje v KD kanců zmírnilo tepelný stres během zvýšené teploty v letních měsících. Přidání lněného oleje vede k významnému zlepšení množství a kvality kančího semene a antioxidačnímu profilu.

3.2.2.4 Frekvence odběru

Podle zpráv řady výzkumníků je optimální pauza mezi dvěma skoky pro kance v intervalu 3–5 dní, avšak pro mladé kance by pauza mezi dvěma skoky měla být minimálně 7 dní. Interval delší než 12 dnů mají za následek snížení procenta pohyblivých spermií a zvýšení procenta abnormálních spermií v ejakulátu. Interval menší než 7 dní mezi dvěma odběry vykazuje lepší účinek na produkci spermií, z čehož vyplývá, že odběr kančího spermatu by měl být prováděn alespoň jednou týdně (Savić et al. 2017). Sperma odebrané od kanců v intervalech nižších jak 7 dní mezi dvěma odběry mají ve výsledku vyšší objem ejakulátu, vyšší počet spermií v ejakulátu a vyšší počet dávek na odběr oproti intervalům trvajícím déle než 7 dní (Savić et al. 2017; Knecht et al. 2017).

Je známo, že vysoká frekvence odběrů má negativní vliv na morfologii a motilitu spermií, protože spermie jsou nuceny rychle přecházet z hlavy nadvarlete do ocasu nadvarlete a nemají tak dostatek času na dozrávání (Lopez-Rodriguez et al. 2017).

V praxi jsou někteří kanci častěji využíváni k odběru ejakulátu pro snadnou manipulaci nebo kratší dobu přípravy na skok. Zároveň ignorujeme intenzitu odběrů a děláme kratší pauzy mezi skoky. Tímto způsobem jsou zvířata nejen extrémně vyčerpaná, ale také poskytují ejakulát s nižší schopností oplození. Z tohoto důvodu je nutné dbát na četnost odběrů kančího semene, aby se získalo sperma s optimální fertilizační schopností (Savić et al. 2017).

3.2.2.5 Odběr spermatu

Odběr spermatu u kance se uskutečňuje manuální metodou „do ruky“ s pomocí fantomu. Poté co je kanec naučen na odběr a při náležitém temperamentu, není potřeba žádná jiná stimulace. Po dostavení pohlavních reflexů kanec vyskočí na fantom a zafixuje se hrudními končetinami (Obr. 4). Při této etapě je vhodné odstranit obsah předkožkové výdutě krátkou masáží. Kanec opakovaně vysouvá a zasouvá penis ve snaze dosáhnout pohlavního ústrojí prasnice. Technik odběru penis jemně uchopí rukou v rukavici a nechá kance uskutečnit několik frikčních pohybů přes své sevřené prsty, které napodobují pochvu a děložní krček. Ve správnou chvíli sevře penis do dlaně a vytáhne ho z předkožkového vaku tak, že dojde k natažení esovitého ohbí. V tento moment dochází k ejakulaci, která může trvat až 30 minut (Kos et al. 2019). Spermatická frakce se odebírá do temperované, sterilní nádoby (Louda et al. 2001). Rychlé ochlazení by mohlo způsobit poškození spermií, a proto se používá předeřtá (38 °C) odběrová nádoba (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Semeno se do nádoby odebírá přes dvojitou sterilní gázu, aby se odstranil želatínový sekret z bulbouretrálních žláz (Kos et al. 2019). K odběru lze použít polyvinylové rukavice, přičemž je třeba se vyhnout latexovým rukavicím, jelikož jsou pro spermie toxické (Lopez-Rodriguez et al. 2017).

Odběr spermatu je označován jako nejkritičtější bod pro bakteriální kontaminaci (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Vysoké úrovně bakteriální kontaminace jsou spojeny s vysokým výskytem aglutinace spermií, poškozenými akrozomy, špatnou pohyblivostí spermií a sníženou

životností spermií (Goldberg et al. 2013). Pokud je bakteriální kontaminace ponechána nekontrolovaná, konečným výsledkem je snížená reprodukční výkonnost stáda (Althouse & Rossow 2011; Goldberg et al. 2013). Z tohoto důvodu je třeba dodržovat standardní protokol minimální kontaminace, aby se snížila bakteriální kontaminace během odběru kančího spermatu (Goldberg et al. 2013).

Podmínkou k získání kvalitního spermatu při odběru je především vysoká úroveň hygieny před a při odběru. Mezi faktory, které se považují za důležité pro správný odběr spermatu, řadíme permanentní čistotu kanců, umývání nebo čištění břišní krajiny před odběrem, používání jednorázových rukavic, správnou fixaci penisu během odběru, zamezení vzniku prespermiové frakce a tekutiny z předkožkové výdutě do sběrače spermatu (Louda et al. 2001; Goldberg et al. 2013).



Obrázek 4 Fixace kance na fantomu (Kos et al. 2019)

3.3 Ředění spermatu

Po ejakulaci zůstane pohyblivost a vitalita spermií zachována pouze několik hodin (Centurion et al. 2003; Lopez-Rodriguez et al. 2017). Aby se předešlo předčasnému vyčerpání a prodloužilo přežívání spermií, musí být jejich metabolická aktivita snížena chemickými inhibitory anebo snížením teploty. Proto je nutné ejakulát naředit ve vhodném ředidle krátce po odběru (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Dále se kančí sperma ředí z důvodu zvětšení objemu pro rozdělení spermií do více inseminačních dávek (Louda et al. 2001). Krok ředění je však kritickým bodem, protože spermie mohou podléhat ztrátě motility a integrity membrány v důsledku takzvaného „efektu ředění“. Tento účinek závisí na některých faktorech, jako je teplota, technika ředění nebo semenná plazma (Sebastián-Abad et al. 2021). Sperma se ředí nejméně v poměru 1:1, přičemž normálně ředění nepřesahuje poměr 1:10 (Johnson et al. 2000).

3.3.1 Postup ředění a teplota ředění

Vzhledem k tomu, že kančí spermie jsou velmi citlivé na šok z chladu, změny teploty během zpracování spermatu mohou mít hluboký dopad na kvalitu spermatu. Důvody, proč jsou spermie kanců náchylné na nízké teploty prostředí, již byly vysvětleny výše v této práci. Při ředění kančího spermatu se teplota spermatu postupně snižuje, aby se zabránilo šoku z chladu. Na inseminačních stanicích se běžně používají dva různé postupy ředění (López-Rodríguez et al. 2012).

Jednokrokové ředění spočívá v promíchání spermatu a ředidla izotermicky během prvních 30 minut po odběru. U dvoukrokového ředění se nejprve provádí první ředění nazývané jako předředění 1:1 s předehřátým ředidlem (přibližně 33 °C), po kterém následuje druhé ředění buď v předehřátém ředidle čili dvoukrokové izotermické ředění nebo ředidlem udržovaném při pokojové teplotě označované jako dvoukrokové hypotermické ředění (López-Rodríguez et al. 2012; Schulze et al. 2013a; Soler-Llorens et al. 2020; Sebastián-Abad et al. 2021).

Předběžné ředění bylo klasifikováno jako kritický krok během zpracování spermatu a pokud není provedeno správně, může způsobit, že spermie budou citlivější na jakékoli poškození během konečného ředění. Toto předběžné ředění se neprovádí pravidelně v poměru 1:1, ale může být aplikován vyšší nebo nižší poměr ředění v závislosti na objemu ejakulátu. Je pravděpodobné, že nižší poměr ředění je aplikován na ejakuláty s vyšším objemem. U kančích spermií se chladový šok objevuje ihned po ejakulaci, a proto je ředění 1:1 velmi důležité pro aklimatizaci na následné konečné ředění. Mechanismy této aklimatizace nejsou zcela známy, ale zdá se, že souvisí s reorganizací membránových lipidů a proteinů (López-Rodríguez et al. 2012; Wiebke et al. 2022).

Většina inseminačních stanic používá dvoukrokové ředění, přičemž druhý krok tohoto postupu ředění závisí na dané inseminační stanici (López-Rodríguez et al. 2012). Nejnověji zavedeným postupem pro ředění kančího spermatu je dvoustupňový hypotermický postup s cílem usnadnit zpracování spermatu tím, že se dávky spermatu přivedou rychleji na požadovanou skladovací teplotu (Schulze et al. 2013a). Tento postup by mohl snížit čas a náklady, ale dostupná literatura porovnávající jednotlivé techniky obsahuje nesrovnalosti (Soler-Llorens et al. 2020).

3.3.1.1 Rychlost ředění

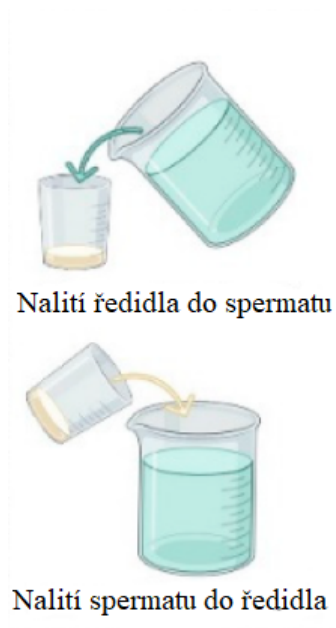
Stejně tak jako teplota při ředění spermatu tak i rychlost ředění ovlivňuje kvalitu inseminačních dávek (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Vysoké míry ředění jsou pro kančí spermie škodlivé, jelikož zkracují jejich životnost (Centurión et al. 2006). Dle Lopez-Rodriguez et al. (2017) vysoké ředění ($0,5 \times 10^9$ spermií/80 ml nebo 1×10^9 spermií/80 ml) vede k nižší pohyblivosti spermií během skladování ve srovnání s nižším ředěním ($2,5 \times 10^9$ spermií/80 ml), přičemž přidání semenné plazmy by mohlo zmírnit tento negativní efekt. Avšak Luther & Waberski (2019) ve své studii vyloučili hypotézu, že přidání semenné plazmy do zředěného kančího spermatu by mohlo působit proti účinku vyšší rychlosti ředění. Pokud je ředění nadměrné, vede to k trvalé ztrátě motility, metabolické aktivity a schopnosti oplodnění (Centurion et al. 2003).

3.3.1.2 Metody ředění

Ředění spermatu je základním krokem pro produkci kančího spermatu konzervovaného v tekutém stavu. Je všeobecně známo, že přidání ředidla do spermatu způsobuje méně náhlou změnu spermií, a proto je méně škodlivé ve srovnání s přidáním spermatu do ředidla (Obr. 5). Na inseminačních stanicích se však k surovému spermatu přidávají velké objemy ředidel, což způsobí tvorbu pěny a hygienická rizika, pokud se plnicí tryska dostane do kontaktu s pěnou. Tvorba pěny je zvláště výrazná u ředidel obsahujících bovinní sérový albumin (BSA), ale vyskytuje se také u jiných ředidel a je třeba se jí vyhnout (Schulze et al. 2017).

Z praktického a hygienického hlediska má přidání spermatu do ředidla několik výhod. Například snížení tvorby pěny, které usnadňuje utěsnění spermatu během balení a zabraňuje kontaktu mezi plnicí tryskou a spermatem (Sebastián-Abad et al. 2021). Další výhodou je větší homogenita ředěného spermatu. Sedimentace surového spermatu může nastat rychle v závislosti na časovém intervalu od odběru spermatu po zředění, což vede k nerovnoměrnému rozdělení spermatu. Následkem toho může být nestejný počet spermií v dávkách spermatu (Schulze et al. 2017).

Podle studií Schulze et al. (2017) a Sebastián-Abad et al. (2021) metoda ředění neovlivňuje kvalitu spermií, což je v rozporu s dlouho zavedeným doporučením, že ředidlo by mělo být vždy přidáváno do spermatu. Tyto nesrovnalosti mohou být způsobeny konečným poměrem ředění. V obou těchto studiích nebyly rychlosti ředění vysoké, což může snížit dopad na spermie ve srovnání s vyššími rychlostmi ředění (Sebastián-Abad et al. 2021). Podle Schulze et al. (2017) přidání spermatu do ředidla umožňuje účinnou a bezpečnou produkci dávek spermatu, které lze použít pro konvenční AI.



Obrázek 5 Metody ředění spermatu, převzato a upraveno z (Sebastián-Abad et al. 2021)

3.3.2 Látky zlepšující kvalitu kančího spermatu během ředění

Jak bylo popsáno výše, ředění savčího semene vede ke snížení motility spermií a ke zvýšení procenta mrtvých spermií (Zhang et al. 2015). Oxidační stres je kritickým faktorem, který poškozuje spermie v důsledku nerovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a antioxidační obranou, zejména u kančích spermií. Hojně polynenasycené mastné kyseliny v plazmatické membráně kančích spermií slouží jako potenciální substrát pro tvorbu ROS a vzhledem k omezenému cytoplazmatickému prostoru mají spermie pouze omezenou enzymatickou ochranu. Vznik ROS je odpovědný za zhoršenou pohyblivost spermií v důsledku vyčerpání intracelulárních hladin ATP (adenosintrifosfát) (Tamanini et al. 2022). Z tohoto důvodu je důležité nalezení optimálního antioxidantu pro udržení kvality spermií (Ren et al. 2019).

Kořen Isatis (*Radix Isatidis*), ve kterém jsou polysacharidy primárními aktivními složkami, je používán ve tradiční čínské medicíně. Extrakt z tohoto kořene má různé biologické aktivity, zejména antioxidační, bakteriostatické a antivirové. Sloučenina extrahovaná z kořene Isatis (IRPS), je přírodní makromolekulární látka složená z různých poměrů xylózy, arabinózy, glukózy, rhamnózy, manózy a galaktózy. Polysacharidy mají antioxidační aktivitu proto, že tyto sloučeniny vychytávají volné radikály ROS (Ren et al. 2019). Podle Ren et al. (2019) by přidání IRPS mohlo potlačit pokles celkové motility spermií během skladování, přičemž ve své studii zjistili, že IRPS má ochranné účinky na plazmatickou membránu spermií a na integritu akrozómu. Jiné rostlinné extrakty, jako je rooibos a rozmarýn, se ukázaly být užitečné jako přírodní zdroje antioxidantů pro konzervaci kančího spermatu, ale tyto sloučeniny nechrání plazmatickou membránu spermií ani akrozóm. S ohledem na snadnou dostupnost a ekonomickou cenu IRPS může být sloučenina vhodně použitelnou antioxidační přísadou do ředidel kančího spermatu.

Plazmatická membrána je důležitá pro udržení metabolismu spermií, vysoce koreluje s pohyblivostí spermií a indexem přežití. Bovinní sérový albumin má ochranné účinky související se specifickou interakcí s fosfolipidy plazmatické membrány, které snižují stupeň poškození spermií během skladování spermatu. Ukázalo se, že integrita plazmatické membrány je důležitá pro motilitu spermií (Zhang et al. 2015). Zhang et al. (2015) ve své studii zjistili, že integrita membrány spermií byla významně zvýšena a důvodem může být to, že BSA vyrovnává osmotický tlak na obou stranách membrány spermií vychytáváním iontů a malých molekul. Dále ve své studii uvedli, že motilita spermií byla zvýšena po přidavku BSA do ředidla. To lze vysvětlit tím, že došlo ke zvýšení integrity plazmatické membrány. Ukázalo se, že BSA může snížit peroxidaci lipidů v plazmatické membráně způsobenou ROS a účinně chránit plazmatickou membránu. BSA rychle přilne k membráně spermií v procesu skladování, následně pokryje povrch spermií a brání tak plazmatické membráně v kontaktu s ROS. Avšak zvýšení dávek BSA snižuje motilitu spermií, efektivní dobu přežití, integritu plazmatické membrány a integritu akrozomu (Zhang et al. 2015). Bylo prokázáno, že BSA může účinně udržovat pohyblivost kančích spermií během skladování v tekutém stavu při 17 °C a doporučená optimální koncentrace BSA je 4 g/l (Fu et al. 2017).

Antioxidanty a další lapače ROS potenciálně vhodné jako doplňky do zředěného spermatu dále zahrnují glutathion, resveratrol a příbuzné hroznové flavonoidy, extrakty z rostlin a bobulí, vitamíny a sloučeniny produkované včelami, např. propolis. U kanců suplementace glutathionem a cysteinem zlepšuje životaschopnost spermií, integritu akrozomů a *in vitro* fertilizační schopnost naředěného, chlazeného semene (Sutovsky 2015). Sutovsky (2015) ve své studii uvedl, že vitamín E a jeho analog Trolox zlepšují motilitu a mitochondriální potenciál spermií a snižují peroxidaci membránových lipidů během prodlouženého skladování spermatu.

Dalším adekvátním antioxidantem by mohl být hydroxytyrosol (HT). Li et al. (2022) ve své studii prokázali, že kvalitu kančího spermatu lze účinně zlepšit přidáním vhodné koncentrace hydroxytyrosolu do ředidla BTS (Beltsville – ředidlo pro krátkodobou konzervaci). Navíc přidání HT do ředidla BTS může účinně snížit poškození spermií volnými oxidativními radikály, což hraje důležitou roli při udržování normální fyziologické funkce kančích spermií (Li et al. 2022). Podle Ngula et al. (2019) přidání kofeinu do kančího spermatu vede ke zvýšení motility buněk. To je pro spermie výhodné, jelikož adekvátní progresivní motilita je nezbytná pro vytvoření optimálního rezervoáru spermií ve vejcovodu. Kofein funguje jako imunomodulátor, protože snižuje funkci některých imunitních buněk a produkci některých cytokinů a receptorů. Doplnění ředidel spermatu kofeinem zjevně snižuje fagocytózu spermií děložními neutrofily a zánětlivou reakci dělohy po AI, čímž se zlepšuje plodnost kančích spermií.

Sutovsky et al. (2019) ve své studii uvedli, že doplnění zředěného kančího spermatu chloridem zinečnatým by mohlo zlepšit životaschopnost a schopnost oplodnění *in vitro* u spermatu skladovaného v průmyslových podmínkách. Zinečnaté ionty mají příznivé vlastnosti na konzervaci spermií, tudíž by mohly zvýšit procento spermií schopných oplodnění v inseminační dávce, a nakonec zvýšit míru březosti a velikost vrhu po AI. Doplnování spermatu zinečnatými ionty by také mohlo umožnit snížení počtu spermií na inseminační dávku, čímž by se zvýšila ziskovost chovných kanců a snížil se jejich dopad na životní prostředí, snížením počtu kanců chovaných pro odběr spermatu. Optimální koncentrace

zinečnatých iontů v ředidlech, které jsou šetrné k zinku by zachovaly žádoucí akrozomální stav, životaschopnost, potenciál mitochondriální membrány a pohyblivost spermií.

Ředidla kančího spermatu s optimálním množstvím zinečnatých iontů, napodobující molekulární složení neředěné semenné plazmy, by mohla být navržena pro distribuci čerstvého kančího spermatu, ale také pro média pro zpracování spermatu a pro kryokonzervaci kančích spermií. Chlorid zinečnatý se ukázal jako adekvátní přísada do kančího spermatu, ale je třeba dalších studií pro zajištění optimální kvality spermií (Sutovsky et al. 2019).

3.3.3 Ředidla

Pokud nejsou spermie naředěny ztrácejí postupně elektrický náboj kvůli vysoké koncentraci elektrolytů a volným iontům jako je například vápník, železo, hořčík a jiné. Dále kvůli zvýšenému obsahu protilátek, důsledkem čehož vzniká aglutinace spermií (Louda et al. 2001). Aby se tomu předešlo, přidávají se do ředidel různé přísady, mezi které řadíme cukry, proteiny, soli a lipidy (Louda et al. 2001; Jovičič et al. 2020; Oldenhof et al. 2021). Současné tyto látky působí i jako zdroj energie (Louda et al. 2001).

Vysoký obsah glukózy ve většině ředidel pro kančí sperma způsobuje značné snížení intracelulárního pH pod 6,0. Tato intracelulární acidóza zjevně umožňuje buňkám přežít skladování několik dní při teplotě okolí (Johnson et al. 2000). K získání optimálních poměrů mezi ionty se používají bivalentní a trivalentní anionty. Ukázalo se, že tyto anionty chrání spermie před bobtnáním membrán. Dále se zjistilo, že polyvalentní anionty usměrňují koncentraci polyvalentních kationtů jako je vápník, hořčík a železo, které se při převaze podílejí na aglutinaci spermií. Pro udržení správného osmotického tlaku jsou důležité ionty sodíku a draslíku. Pufrovací úlohu mají fosfátové ionty, které se dále podílejí i na energetických reakcích. Ionty bikarbonátu se podílejí na biochemických procesech dýchání buněk a jsou důležité k udržení správné hodnoty pH. Mezi prvky, které se uplatňují při enzymatických procesech se řadí vápník a hořčík, zatímco síra se účastní syntézy bílkovin (Louda et al. 2001).

Koncentrace vodíkových iontů má vliv na pohyb, přežitelnost a látkovou přeměnu spermií (Louda et al. 2001). Pro spermie kance je optimální hodnota pH 7,0–7,5. Látkový metabolismus a pohyblivost spermií se snižuje, pokud pH spermatu klesne pod 7. Zatímco při alkalických hodnotách blízkých hodnotě pH = 8 se pohyb spermií povzbudí, ale přežití spermií se snižuje (Johnson et al. 2000; Louda et al. 2001).

Vzhledem k tomu, že ve zředěném spermatu kance je přítomna bakteriální kontaminace, běžně se přidávají antibiotika, aby se zabránilo přemnožení bakterií a snížil se účinek bakteriálních toxinů na spermie. V kontextu obezřetného používání antimikrobiálních látek může nižší používání antibiotik ve zředěném spermatu pomoci snížit antibiotickou rezistenci. V tomto ohledu může jednovrstvá centrifugace kančích ejakulátů snížit koncentraci bakterií a následně snížit potřebu antibiotik v ředidlech spermatu. Ačkoli se nezdá, že by tento proces měl vliv na celkovou pohyblivost, zdá se, že zvyšuje linearitu pohybu spermií. Jeho vliv na kvalitu a plodnost spermatu si zaslouží další výzkum (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Mnoho antibiotik a antimikrobiálních látek má škodlivý účinek na spermie, tudíž výběr látek pro použití v ředidlech spermatu je omezený. Alternativa k zahrnutí antibiotik do ředidel spermatu by tak značně snížila spotřebu antibiotik (Morrell & Wallgren 2011). Přidání cyklického hexapeptidu

bylo navrženo jako náhrada antibiotik v ředidlech, ale potenciál těchto peptidů je stále předmětem zkoumání (Schulze et al. 2014b).

Ředidla pro konzervaci kančího spermatu v tekutém stavu musí splňovat určité požadavky. V ředidlech musí být příslušné látky pro metabolismus spermií, látky ochraňující spermie před chladovým šokem, a hlavně ředidla musí mít patřičnou osmolaritu. Dále musí ředidla obsahovat přiměřený poměr v zastoupení elektrolytů a neelektrolytů, látky potlačující vývoj patogenní mikroflóry a adekvátní pufrů. V neposlední řadě musí ředidla zahrnovat i látky, které snižují peroxidaci lipidů cytoplazmatické membrány spermií (Louda et al. 2001).

Aktuálně jsou ředidla složena z glukózy, citronanu sodného a EDTA (dvojsodná sůl kyseliny etyléndiamintetraoctové). Tuto látku můžeme najít pod několika názvy například chelaplex III, chelaton, komplexon III a trilon B. Látka EDTA chrání akrozóm, membránu spermií a zvyšuje přežitelnost spermií (Louda et al. 2001). Jak bylo popsáno výše, běžně se do zředěného spermatu přidávají antibiotika. Existuje mnoho populárních antimikrobiálních látek používaných v ředidlech spermatu, mezi které náleží aminocyklitoly, aminoglykosidy, beta-laktamová antibiotika, linkosamidy a makrolidy (Althouse & Rossow 2011).

K ředění se používají komerčně dostupná ředidla (Tab. 1). Pro krátkodobou konzervaci se nejčastěji používá ředidlo EDTA nebo BTS (Louda et al. 2001; Kos et al. 2019). Ředidlo EDTA má více obchodních názvů například Kiev, Merck III, Kare I (Louda et al. 2001). Pro střednědobou konzervaci se využívá ředidlo Androhep a Modena I (Louda et al. 2001; Kos et al. 2019).

Charakteristickými látkami střednědobého ředidla Androhep jsou BSA a HEPES. Jak bylo uvedeno výše, BSA ochraňuje membránu spermií a snižuje pokles motility spermií během uchování ředěného spermatu. HEPES je látka, která se řadí do skupiny biologických pufrů a její úlohou je udržování optimálního pH (Louda et al. 2001; Lopez-Rodriguez et al. 2017).

Tabulka 1 Složení ředidel používaných pro kančí sperma (Louda et al. 2001)

Složení	Merck	BTS	Androhep
Glukóza	53,68 g	37,0 g	26,0 g
Citronan sodný neutr. x 2H ₂ O	3,30 g	6,0 g	8,0 g
NaHCO ₃	1,20 g	1,3 g	1,20 g
EDTA	1,80 g	1,3 g	2,40 g
KCl	-	0,8 g	-
HEPES	-	-	9,0 g
BSA	-	-	2,5 g

3.3.4 Balení inseminačních dávek

Po dokončení ředění se zředěné sperma zabalí do dávek po 80–100 ml, aby se skladovaly a distribuovaly. Dávky běžně obsahují 2–3 miliardy spermií. V posledních letech však byly vyvinuty nové techniky (např. intrauterinní inseminace), které umožňují inseminaci nižšího počtu spermií v menším objemu (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Při použití této techniky je objem inseminační dávky 0,5 až 10 ml a počet spermií se pohybuje kolem 0,5–1 miliardy spermií (Roca et al. 2006). Proces balení provádějí automatizované systémy ve většině inseminačních stanicích. Tyto systémy jsou rychlé a přesné, přičemž nesmí poškodit spermie. Pro skladování, dodávání a inseminaci naředěných dávek spermatu lze použít různé nádoby (Obr. 6), jako jsou plastové lahvičky, blistry, trubičky, sáčky nebo skládací membránu s integrovaným katétrem (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Je třeba vybírat vhodný materiál, protože plastové sloučeniny v různých baleních mohou být pro spermie toxické. Přítomnost cyklického laktonu a bisfenolu A diglycidyléteru (BADGE) ve spermatu způsobuje snížení kvality spermií a následně dochází k poklesu plodnosti prasnic (Nerin et al. 2014).



Obrázek 6 Nádoby na uskladnění kančího spermatu (Singleton 1997)

3.4 Konzervace inseminačních dávek

Účelem konzervace je navodit ve spermích reverzibilní stav neboli anabiózu spermií. Během tohoto stavu se metabolické procesy ve spermích sníží nebo přeruší. Pokud dojde k vytvoření adekvátních podmínek prostředí, metabolismus spermií se opět obnoví (Louda et al. 2001). Existují dvě primární strategie skladování kančího spermatu, kryokonzervace a konzervace v tekutém stavu (Ren et al. 2019).

3.4.1 Možnosti skladování

Navzdory velkému pokroku v technologii zmrazeného spermatu je konzervace v tekutém stavu i nadále hlavní metodou stabilizace kančího spermatu až do inseminace. Navíc tekuté sperma poskytuje téměř dvakrát více inseminačních dávek z odebraného spermatu (přibližně 40–50 pro tradiční, 60–80 dávek pro intrauterinní AI) než zmrazené sperma, s nižšími výrobními náklady a nižší uhlíkovou stopou (Waberski et al. 2019). Pokud je kančí sperma zředěno v ředidle pro krátkodobou konzervaci, doba jeho použitelnosti je do 3 dnů (Louda et al. 2001; Grossfeld et al. 2008; Waberski et al. 2019; Li et al. 2022). Podle studie Li et al. (2022) kvalita spermií po 3 dnech skladování rychle klesá (motilita spermií je menší než 60 %). Proto důrazně doporučují, aby krátkodobé uchování spermií netrvalo déle než 3 dny (Li et al. 2022). Při použití střednědobých ředidel (některé studie uvádějí jako dlouhodobá ředidla) je doba použitelnosti spermatu 5–7 dní (Louda et al. 2001; Grossfeld et al. 2008; Luther & Waberski 2019; Waberski et al. 2019). Ve většině zemí zvyšují střednědobá ředidla flexibilitu použití spermatu a jeho ochranu během přepravy na dlouhé vzdálenosti (Waberski et al. 2019).

V komerčním prostředí je doporučená skladovací teplota pro tekuté konzervované sperma stále 17 °C (15–20 °C). Tento teplotní rozsah je považován za kompromis mezi zachováním dlouhověkosti spermií snížením metabolické aktivity spermií, aniž by došlo k nevratné ztrátě selektivní permeability a integrity plazmatické membrány (Henning et al. 2022). Kritická nižší teplota pro přežití spermií u prasat byla stanovena na 12 °C (Lopez-Rodriguez et al. 2017). Nižší teploty poskytují výhodu v inhibici růstu bakterií, nicméně způsobují chladový šok spermií, jenž zapříčiní ztrátu životaschopnosti a motility. Nejde jen o to, že chlazení může narušit buněčnou integritu, ale také o obnovení metabolické aktivity v životaschopných spermích během zahřívání na tělesnou teplotu po inseminaci. Takové subletální poranění související s ochlazením je zvláště zřejmé během zahřívání v teplotním rozsahu mezi 20 a 38 °C. Dopad rychlého nárůstu teploty se někdy označuje jako tepelný šok a zahrnuje například vzestup koncentrací volných intracelulárních iontů vápníku a kapacitační změny v životaschopných buňkách (Henning et al. 2022).

Na rozdíl od teplotního rozsahu pod 15 °C jsou skladovací teploty nad 20 °C vnímány jako plně neinhibující metabolismus spermií, což vede k vyčerpání energetických rezerv spermií a hromadění metabolických (vedlejších) produktů. Skladování spermatu při teplotě nad 20 °C není proto žádoucí, ale může k němu dojít během hromadné přepravy čerstvě naplněných inseminačních dávek v izolovaných boxech nebo během horkého období. Dále může dojít ke zvýšení teploty prostředí kvůli tomu, že chladicí boxy pro skladování spermatu nefungují na farmě správně (Henning et al. 2022).

Obvykle se tedy zředěné kančí sperma skladuje po dobu 3–5 dnů při teplotě 15 až 17 °C a poskytuje porodnost 80–90 % s celkovým počtem 13–14 narozených selat (Fair & Romero-Aguirregomezcorta 2019).

Během skladování je třeba se vyhnout kontaktu se vzduchem, protože zvyšuje pH, což negativně ovlivňuje pohyblivost spermií. Ke stabilizaci pH se proto používá mnoho různých pufovacích systémů, které byly zmíněny výše (Lopez-Rodriguez et al. 2017).

3.4.2 Kryokonzervace

V moderním chovu hospodářských zvířat se kryokonzervované sperma běžně používá k umělé inseminaci (Oldenhof et al. 2021). Kryoprezervace spermatu je nejúčinnější metodou pro dlouhodobé uchování samčích gamet, ale použití kryokonzervovaného spermatu kance představuje celosvětově méně než 1 % (Guimarães et al. 2017). Umělá inseminace zmrazeným a rozmrazeným spermatem u prasat je omezena na specifické případy, jako je uchování cenného genetického materiálu, transport spermií na dlouhé vzdálenosti a bezpečnostní strategie v případech přírodních katastrof. Kryokonzervované sperma také slouží, jako rezervní zásoba, která může být využita v reakci na náhlé propuknutí nemoci (Baishya et al. 2014; Athurupana et al. 2015; Yeste et al. 2017; Fair & Romero-Aguirregomezcorta 2019; Recuero et al. 2019). Kromě toho se kryokonzervace kančích spermií také provádí pro výzkumné účely (Wongtawan et al. 2006).

Podstatný rozdíl mezi tekutým a kryokonzervovaným semenem je rozdíl reakce ejakulovaných spermií na ochlazení. Zatímco spermie od různých kanců reagují podobně dobře na skladování v tekutém stavu, kde je zde chlazení okrajové, odezva se značně liší při použití intenzivnějšího chlazení (Roca et al. 2006).

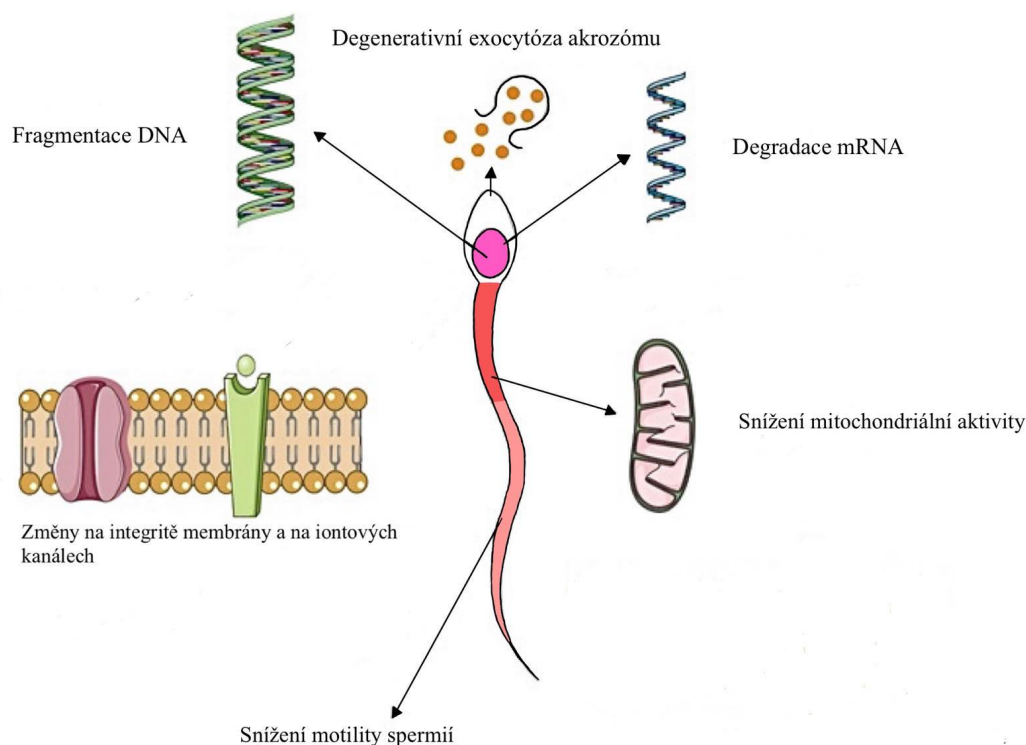
Ačkoli je zmrazené kančí sperma k dispozici již dlouho, velmi malý podíl komerčních umělých inseminací se provádí u prasat pomocí zmrazeného spermatu kvůli nižšímu přežití po rozmrazení, což má za následek nízkou porodnost a velikost vrhu (Baishya et al. 2014). Ve srovnání s inseminací čerstvým spermatem způsobuje inseminace zmrazeným a rozmrazeným spermatem pokles porodnosti o 20 až 30 %, přičemž přibližně 40 až 50 % kančích spermií kryokonzervaci nepřežije (Jovičić et al. 2020).

Jak bylo zmíněno výše, poškození kančích spermií během zmrazování souvisí s lipidovým složením plazmatické membrány spermií, oxidačním stresem a tvorbou ROS (Baishya et al. 2014). Kryokonzervace spermií vede k řadě škodlivých změn spermatu (Obr. 7). Patří mezi ně poškození DNA, u kterého bylo prokázáno, že snižuje fertilizační potenciál. Dále změny ve spojovací části bičíku, které způsobují ztrátu motility spermií. Poté akrozomální restrukturalizace, jež brání fúzi spermie-oocyt (Bathgate 2011; Yeste et al. 2017). V neposlední řadě dochází k poškození struktury cytoplazmatické membrány spermií (Bathgate 2011; Athurupana et al. 2015; Yeste et al. 2017; Guimarães et al. 2017). Zdá se, že tato poškození souvisí se zvýšenou produkcí ROS, ke které dochází během zmrazování a rozmrazování. Dokonce i během skladování zmrazených spermií v kapalném dusíku jsou spermie vystavené možnému oxidativnímu poškození (Bathgate 2011).

Kryoprezervace spermatu může tedy způsobit biochemické a funkční poškození spermií, což vede ke snížení motility, životaschopnosti a transportu spermií v genitálním traktu prasnice (Silva et al. 2015). Lepší pochopení kryopoškození spermií je nanejvýš důležité, mohlo by vést

ke zlepšení metod kryokonzervace poskytující špičkovou kvalitu zmrazeného spermatu a následnou vyšší plodnost (Baishya et al. 2014).

Pro kančí sperma se komerčně používají dvě metody zmrazování vyvinuté v polovině 70. let. Konkrétně se jedná o Beltsvillskou a Westendorfovou metodu. V první metodě se sperma zmrazuje v peletách (kuličkách) o objemu 0,15–0,20 cm³ (Johnson et al. 2000). Ve Westendorfově metodě se sperma zmrazuje v pejetách (maxi-brčkách) o objemu 5–10 cm³ (Johnson et al. 2000; Louda et al. 2001).



Obrázek 7 Poškození kančích spermii během zmrazování, převzato a upraveno z Yeste et al. (2017)

3.4.2.1 Variabilita ve zmrazování spermatu kanců

Optimální kryopřežití spermii závisí nejen na metodice kryokonzervace, ale také na individualitě každého kance (Roca et al. 2006). Důležité jsou geneticky podmíněné vlastnosti membránové struktury spermii pro predispozici přežít pod kryokonzervačním stresem (Roca et al. 2006; Jovičić et al. 2020). Variabilita ve zmrazování spermatu kanců existuje mezi jednotlivci v rámci stejného plemene a mezi ejakuláty od stejného kance (Yeste et al. 2017; Jovičić et al. 2020). V neposledí řadě i plemeno kance ovlivňuje kryopřežití spermii. Bylo zjištěno, že ejakuláty kanců plemene duroc vykazují lepší mrazuvzdornost než ejakuláty kanců plemene landrace. Dále bylo prokázáno, že sperma kanců plemene landrace a pietrain má po rozmrazení vyšší pohyblivost spermii, integritu membrány, mitochondriální membránový potenciál a integritu akrozómů než sperma od kanců plemene large white, duroc a yorkshire (Jovičić et al. 2020).

Velká variabilita ve zmrazení spermii mezi kančími ejakuláty a mezi frakcemi ejakulátu je připisována především interakcím mezi spermii a semennou plazmou z různých částí

ejakulátu (Parrilla et al. 2019; Recuero et al. 2019; Jovičić et al. 2020). Na začátku této práce bylo zmíněno, že proteiny semenné plazmy působí na různé vlastnosti spermií (González-Cadavid et al. 2014; Parrilla et al. 2019). Parrilla et al. (2019) ve své studii prokázali, že tyto proteiny jsou potenciálně klíčovými faktory ovlivňujícími kryopřežití spermií. Četné studie prokázaly, že spermie získané ze spermiové frakce odolávají kryokonzervaci lépe než ty, které byly vystaveny semenné plazmě z celého ejakulátu (Alkmin et al. 2014; Druart et al. 2019; Parrilla et al. 2019; Recuero et al. 2019; Höfner et al. 2020). Toto zjištění Höfner et al. (2020) vysvětlují tím, že spermie této frakce jsou vystaveny hlavně tekutinám z nadvarlete a prostaty. Dále je hlavním důvodem to, že spermie z této frakce nejsou vystaveny škodlivým proteinům, které jsou bohatě zastoupené při sekreci vezikulárních a bulbouretrálních žláz (Höfner et al. 2020).

Vzhledem k tomu, že ne všechny kančí ejakuláty mají stejnou schopnost odolat zmrazování a rozmrazování, jsou kanci klasifikováni jako „dobře mrazitelní“ nebo „špatně mrazitelní“. Následně jsou ejakuláty těchto kanců označovány jako „ejakuláty s dobrou zmrazitelností“ nebo „špatnou zmrazitelností“ (Roca et al. 2006; Grossfeld et al. 2008; Guimarães et al. 2017; Jovičić et al. 2020).

Bylo zjištěno, že přidavek 50 % semenné plazmy z ejakulátu kanců s dobrou mrazuvzdorností, po rozmrazení chrání spermie před poškozením chromatinu a udržuje pohyblivost spermií po rozmrazení (Recuero et al. 2019). Doplnění zmrazovacích ředidel semennou plazmou z kanců s dobrou zmrazitelností spermií by mohla případně zlepšit schopnost kančích spermií udržet proces zmrazení a rozmrazení, zlepšit pohyblivost spermií, zachovat integritu akrozómu, oddálit změny podobné kapacitaci a zvýšit odolnost vůči chladovému šoku nebo oxidativnímu stresu. Pomocí toho by mohly být využity ke kryokonzervaci i ejakuláty kanců se špatnou zmrazitelností spermatu (Yeste et al. 2017; Jovičić et al. 2020).

3.4.2.2 Kryoprotektiva

Všechna ředidla pro zmrazení spermií obsahují propustná a nepropustná kryoprotektiva, které minimalizují tvorbu ledu a pomáhají stabilizovat buněčné membrány a proteiny (Silva et al. 2015; Yeste et al. 2017). V nepřítomnosti kryoprotektivních látek může chladový šok a tvorba ledových krystalů vést k destrukci organel ve spermiích. Tento jev se může negativně projevit oxidací membrán spermií, narušením a poškozením buněčných struktur spermií (Hezavehei et al. 2018).

Propustná kryoprotektiva vstupují do buňky, snižují koncentraci elektrolytů a snižují rozsah osmotického smrštění při nízkých teplotách. Hlavním problémem prostupujících činidel je to, že mohou ohrozit přežití buněk při teplotách nad 5 °C (Yeste et al. 2017). Nejběžnější prostupující kryoprotektant pro kančí sperma je glycerol v koncentracích 2 až 4 % (Athurupana et al. 2015; Yeste et al. 2017; Jovičić et al. 2020; Oldenhof et al. 2021). Kančí spermie vykazují větší citlivost na hladiny glycerolu než spermie jiných domácích zvířat (Johnson et al. 2000). Z tohoto důvodu vyšší koncentrace glycerolu snižují schopnost přežití spermií po rozmrazení. Dále vysoké koncentrace glycerolu poškozují akrozómy spermií. Následkem toho mají kančí spermie sníženou plodnost. Amidy, zejména DMA (dimethylacetamid) a DMF

(dimethylformamid), mohou úspěšně nahradit glycerol jako penetrační kryoprotektiva používaná při zmrazování kančího semene (Jovičić et al. 2020).

Nepropustná kryoprotektiva působí extracelulárně a zlepšují účinky propustných kryoprotektiv. Nejběžnějšími nepropustnými kryoprotektivy jsou proteiny mléka a vaječného žloutku, cukry a sloučeniny s vysokou molekulární hmotností (např. polyvinylpyrrolidon, polyethylenglykoly a dextransy) (Yeste et al. 2017). Fosfolipidy, které se nacházejí ve vaječném žloutku chrání spermie před chladovým šokem, zatímco nízkohustotní lipoprotein (LDL) ve vaječných žloutcích vykazuje nejlepší kryoprotektivní funkci. Při použití žloutku se vždy přidává pasta Orvus ES (Equex), která usnadňuje interakci proteinů vaječného žloutku s plazmatickou membránou spermií (Johnson et al. 2000; Yeste et al. 2017; Oldenhof et al. 2021). Z kategorie sacharidů se používá sacharóza, laktóza, glukóza, fruktóza, popřípadě trehalóza. Cukry v ředidlech zvyšují životaschopnost spermií a schopnost oplodnění po rozmrazení kančích spermií (Jovičić et al. 2020; Oldenhof et al. 2021). Vaječný žloutek a laktóza jsou nejběžnějšími nepropustnými kryoprotektivy používanými ve zmrazovacích ředidlech pro kančí sperma (Yeste et al. 2017; Oldenhof et al. 2021).

Bylo zjištěno, že kombinace cukru a glycerolu je nepostradatelná při poskytování ochrany během zmrazování. Je tomu tak proto, že osmotické vlastnosti cukru poskytují extracelulární ochranu spermií (Jovičić et al. 2020).

Vzhledem k tomu, že kančí spermie vykazují větší citlivost na vyšší dávky glycerolu, bylo provedeno více studií (Molinia et al. 1994; Sztein et al. 2001; Malo et al. 2010) používajících neprostupující kryoprotektanty, jako jsou sacharidy včetně monosacharidů, disacharidů a polysacharidů, což vedlo ke zlepšení míry přežití spermií po zmrazení a rozmrazení. Nepropustné disacharidy, včetně trehalózy, mají vysokou kryoprotektivní schopnost a kineticky inhibují růst ledových krystalů díky vysoké viskozitě (Athurupana et al. 2015). V současné době bylo prokázáno, že disacharid trehalóza je schopna odolat dehydrataci nebo zmrazení u řady rostlin a zvířat. Bylo zjištěno, že trehalóza může tvořit vodíkové vazby s polárními hlavními skupinami fosfolipidů, aby se zabránilo fúzím membrán spermií umístěných vedle sebe. Pomocí interakce trehalózy s membránovými fosfolipidy dochází ke stabilizaci membrány spermií během procesu zmrazování a rozmrazování (Hu et al. 2009; Athurupana et al. 2015). Z tohoto důvodu bylo zjištěno, že trehalóza je v tomto ohledu účinnější než jiné cukry (Hu et al. 2009). Bylo prokázáno, že trehalóza může zlepšit kvalitu kančích spermií v kombinaci s glycerolem během procesu zmrazování a rozmrazování (Hu et al. 2009; Athurupana et al. 2015).

Podle studie Athurupana et al. (2015) se viskozita ředidla zvyšuje v přítomnosti vyšší koncentrace trehalózy, následkem toho mají spermie ztížený pohyb. Alternativně se tření v ocasu spermií zvyšuje v důsledku ztráty intracelulární volné vody. Tyto dvě uvedené příčiny následně způsobují sníženou motilitu spermií. Bylo také popsáno, že vyšší koncentrace trehalózy v přítomnosti glycerolu mají škodlivý účinek na integritu akrozomu zmrazených a rozmrazených spermií (Athurupana et al. 2015). Z tohoto důvodu, byla stanovena optimální koncentrace trehalózy na 100 mmol/l pro kančího sperma, jelikož při této koncentraci je dosahováno nejlepší kvality spermií po rozmrazení. Bylo prokázáno, že trehalóza propůjčuje zmrazovacímu ředidlu větší kryoprotektivní ochranu. Následně bylo uvedeno, že motilita spermií, mitochondriální aktivita, integrita membrány a integrita akrozomu se významně

zlepšily během procesu zmrazení a rozmrazení, když byla do zmrazovacího ředidla přidána trehalóza (Hu et al. 2009; Athurupana et al. 2015).

3.4.2.3 Antioxidanty

Jak bylo uvedeno výše, tvorba ROS a oxidační stres během procesu zmrazování mohou vést k vážnému poškození spermií (Hezavehei et al. 2018). Bylo zjištěno, že přidání antioxidantů do zmrazovacích ředidel může neutralizovat ROS a zlepšit funkci spermií po rozmrazení. Avšak ne všechny antioxidanty se ukázaly jako prospěšné (Yeste et al. 2017; Hezavehei et al. 2018).

Zvýšená produkce ROS kančími spermiemi vyvolaná zpracováním pro kryokonzervaci může být poněkud zmírněna použitím redukováného glutathionu, L-cysteinu, α -tokoferolu (vitamin E), butylovaného hydroxytoluenu, Troloxu (analog vitamínu E) a kyseliny askorbové (vitamin C) (Grossfeld et al. 2008; Bathgate 2011; Yeste et al. 2017; Hezavehei et al. 2018). Bathgate (2011) ve své studii zjistila, že začleněním těchto antioxidantů do ředidel pro zmrazení, dochází ke zlepšení kvality zmrazených a rozmrazených spermií po kryokonzervaci. Zvláště zajímavý výsledek přinesl redukováný glutathion, protože jeho přidání do ředidla pro zmrazování a rozmrazování, následně zachovává pohyblivost spermií, integritu membrán i jádra a kompenzuje sníženou schopnost oplodnění po kryokonzervaci (Yeste et al. 2017).

Pokud se jedná o přírodní alternativu, Sutovsky (2015) ve své studii uvedl, že doplnění kančího spermatu extraktem ze zeleného čaje, rozmarýnu nebo alginátu (extrakt z hnědé řasy) také snížila peroxidaci lipidů ve spermatu po kryokonzervaci.

3.4.2.4 Příprava inseminačních dávek pro kryokonzervaci

Pro využití kryokonzervace je třeba sperma pečlivě zpracovat, aby se po rozmrazení zachovaly jeho životní funkce (Oldenhof et al. 2021). Kryoprezervace spermií a příprava inseminačních dávek pro AI zahrnuje odstranění semenné plazmy v odstředivce (Yeste et al. 2017; Recuero et al. 2019; Jovičić et al. 2020; Oldenhof et al. 2021). Semenná plazma poskytuje příznivé prostředí pro funkci spermií *in vivo* (Recuero et al. 2019). Nicméně, bylo zjištěno, že před kryokonzervací má semenná plazma škodlivé účinky na spermie. Následkem toho mají kančí spermie sníženou kvalitu a plodnost (Yeste et al. 2017; Druart et al. 2019; Recuero et al. 2019). Pomocí centrifugace také dochází ke koncentraci spermií a poté následuje ředění spermatu ve zmrazovacím ředidle (Recuero et al. 2019; Jovičić et al. 2020; Oldenhof et al. 2021). Konečné koncentrace pro kryokonzervaci kančích spermií jsou typicky 20 % vaječného žloutku, 0,5 % pasty Equex, 2 % glycerolu a koncentrace spermií je 1000–500 × 10⁶ spermií na 1 ml (Oldenhof et al. 2021).

Vzorky spermií je třeba pomalu ochladit (~0,1 °C/min) z pokojové teploty na 5 °C, poté je lze zabalit (Oldenhof et al. 2021). Kančí sperma lze zabalit do různých balení, mezi které patří mini-brčka (0,25 ml), střední brčka (0,5 ml), maxi-brčka (5 ml) nebo plastové sáčky (5 ml) (Yeste et al. 2017). V současnosti většina zmrazovacích protokolů uváděných v literatuře používá střední brčka (0,5 ml) s koncentrací 0,5 × 10⁹ spermií na brčko (Baishya et al. 2014; Yeste et al. 2017; Oldenhof et al. 2021). Po naplnění brček se musí inseminační dávky utěsnit (Oldenhof et al. 2021).

3.4.2.5 Skladování před kryokonzervací

Procesy zmrazování a rozmrazování kančího spermatu mají bezpochyby vliv na kvalitu spermií. Avšak bylo zjištěno, že délka doby uchování (celková doba skladování při teplotě 15–17 °C od odběru spermatu do začátku kryokonzervace) také ovlivňuje schopnost spermií vydržet postupy zmrazení a rozmrazení. Bylo uvedeno, že ideální doba zdržení spermií před kryokonzervací je 24 hodin při 17 °C. Zdržení spermií lze charakterizovat tak, že se naředěné sperma uchovává po určitou dobu ve chlazeném stavu a nezamrazuje se tedy ihned (Alkmin et al. 2014; Yeste et al. 2017; Recuero et al. 2019; Jovičić et al. 2020). Při těchto podmínkách bylo pozorováno zvýšení celkové a progresivní motility spolu se stabilitou plazmatické membrány a akrozómu spermií (Recuero et al. 2019).

Toto tvrzení souhlasí se starší studií, ve které Johnson et al. (2000) uvedli, že pokud jsou předředěné vzorky spermatu udržovány nad 15 °C po několik hodin, spermie získávají postupnou odolnost vůči chladovému šoku. Tato dlouhá doba držení kančích spermií před kryokonzervací se ukázala jako účinná, protože umožňuje dosáhnout vyšší míry přežití spermií po rozmrazení a následně vede k vyšší plodnosti (Alkmin et al. 2014). Alkmin et al. (2014) ve své studii zmínili, že v některých protokolech kryokonzervace se toto zdržení před zmrazováním již používá.

3.4.2.6 Zmrazování a rozmrazování kančích spermií

Postupy zmrazování a rozmrazování zahrnují řadu fyzikálních a chemických změn, které mohou poškodit spermie (Yeste et al. 2017). Nejkritičtějšími proměnnými, které ovlivňují kryopřežití spermií jsou rychlosti chlazení a rozmrazování (Jovičić et al. 2020). Vysoké rychlosti zmrazování vedou k tvorbě intracelulárního ledu, zatímco nižší rychlosti vedou k dehydrataci a snižují podíl nezmrzlé vody v extracelulárním prostředí. Z toho můžeme usoudit, že identifikace správné rovnováhy mezi nízkou a vysokou rychlostí zmrazování je zásadní pro minimalizaci dopadu kryokonzervace na spermie (Yeste et al. 2017). Bylo zjištěno, že optimální rychlost chlazení pro zmrazování kančích spermií je -30 °C/min (Johnson et al. 2000; Baishya et al. 2014; Jovičić et al. 2020). Při této rychlosti zmrazování by měly být spermie zmrazeny během 6 minut (Yeste et al. 2017). Zmrazování se provádí umístěním brček na kovové stojany, zde jsou brčka uložena ve vodorovné poloze. Stojany mohou být umístěny buď v mrazicím boxu s řízenou rychlostí nebo v definované vzdálenosti v páře nad kapalným dusíkem v uzavřeném polystyrenovém boxu, poté se zmrzlá brčka uloží do kapalného dusíku (Oldenhof et al. 2021).

Hladina kapalného dusíku musí být pravidelně kontrolována a udržována, aby se zajistilo, že zmrazené vzorky zůstanou po dobu skladování při teplotě -196 °C. Stejná přísnost musí být uplatňována i při přepravě zmrazeného spermatu. Přeprava spermatu by měla být prováděna s dusíkovými nádržemi (Obr. 8), které mají kapacitu uchovávat vzorky déle, než je doba přepravy (Yeste et al. 2017).



Obrázek 8 Nádrž s tekutým dusíkem (Yimer et al. 2016)

Rychlosti rozmrazování mohou ovlivnit funkci a integritu spermií, tudíž je důležité najít správnou rovnováhu mezi vysokou a nízkou rychlostí rozmrazování. Zatímco pomalé rozmrazování vede k rekrystalizaci, příliš rychlé rozmrazování narušuje plazmatickou membránu spermií. Takové poškození souvisí s neschopností propustných kryoprotektantů opustit buňku, což umožňuje vodě vstoupit do buňky v reakci na zvýšenou osmolalitu (Yeste et al. 2017). Ačkoli se rozmrazování v 0,5ml brčkách obvykle provádí při 37 °C po dobu 20 s ve vodní lázni, byly hlášeny variace kombinující různé teploty (od 37 do 70 °C) a doby rozmrazování (5 až 50 s) (Yeste et al. 2017; Jovičić et al. 2020).

Bylo uvedeno, že zmrazování optimální rychlostí a nejrychlejšími rychlostmi rozmrazování je výhodné pro všechny parametry kvality spermatu, včetně motility spermií a integrity akrozómů spermií (Jovičić et al. 2020).

Přestože je kančí sperma citlivé na nízké teploty a pouze kvalitní sperma je vhodné pro kryokonzervaci, je důležité vyvinout nové protokoly kryokonzervace. Jelikož sperma v tekuté formě lze skladovat pouze 7 dní, ale kryokonzervované sperma lze skladovat po mnohem delší dobu a v případě potřeby ho použít (Jovičić et al. 2020).

3.4.2.7 Umělá inseminace zmrazeným a rozmrazeným spermatem

Na rozdíl od zmrazených spermií z jiných druhů (např. skot), kančí sperma musí být po rozmrazení zředěno. Nejčastěji se používá ředidlo pro krátkodobou konzervaci BTS, které je zároveň i nejrozšířenějším ředidlem kančích spermií. Umělá inseminace se zmrazenými a rozmrazenými spermiemi musí proběhnout do 10–30 minut po rozmrazení spermatu a po indukované ovulaci se doporučuje vícenásobná inseminace (Yeste et al. 2017). Opakovaná umělá inseminace během říje může pomoci zmírnit nižší fertilizační kapacitu zmrazených a rozmrazených spermií (Knox 2015; Yeste et al. 2017). Maximální doba mezi inseminacemi je osm hodin (Yeste et al. 2017).

Důležitým bodem, který je třeba vzít v úvahu při provádění umělé inseminace zmrazeným a rozmrazeným spermatem, je počet dostupných (životaschopných) spermií, jež by měla

inseminační dávka pro AI obsahovat (Yeste et al. 2017). Z tohoto pohledu není tradiční metoda umělé inseminace (zavedení spermií do děložního čípku) praktická při použití zmrazených a rozmrazených spermií, kvůli většímu počtu použitých spermií a snížené životnosti spermií. Místo toho jsou vhodnější metody intrauterinní inseminace (Wongtawan et al. 2006; Grossfeld et al. 2008; Knox 2015; Yeste et al. 2017). Yeste et al. (2017) ve své studii uvedli, že minimální počet životaschopných spermií v inseminační dávce by se měl pohybovat mezi 1×10^9 a 2×10^9 při použití zmrazeného a rozmrazeného spermatu, aby byly dosaženy uspokojivé reprodukční výsledky.

3.4.2.8 Alternativní metody kryokonzervace

Vzhledem k tomu, že kančí spermie jsou citlivé na kryokonzervaci, stále se hledají různé alternativy, jak zlepšit kvalitu spermií po rozmrazení (Alkmin et al. 2014; Torres et al. 2016). Silva et al. (2015) ve své studii zkoumali vzorky laktózy, trehalózy a práškové kokosové vody spojené s glycerolem, stejně jako roztok kokosové vody obsahující DMF. Při spojení DMF s práškovou kokosovou vodou bylo možné pozorovat příznivý účinek na kvalitu spermií. Ochranný účinek tohoto amidu lze přičíst jeho molekulární struktuře a schopnosti pronikat buněčnou membránou. Protože jeho funkční skupiny se vážou na vodík molekul vody a vysoce hydrofilní povaha molekuly amidu umožňuje silnou interakci s vodou, tato vzájemná vazba následně snižuje tvorbu intracelulárních ledových krystalů. Příznivý účinek kokosové vody na spermie je pravděpodobně způsoben neutrální frakcí, která obsahuje různé anionty a kationty, volný cukr, sorbitol a inositol, to potvrzuje, že neobsahuje žádnou neznámou látku se speciálními vlastnostmi.

Silva et al. (2015) ve své práci prokázali, že roztoky laktózy, trehalózy a práškové kokosové vody spojené s glycerolem, stejně jako vzorek kokosové vody obsahující DMF, představovaly vyšší kvalitu spermií než ostatní roztoky. Prášková kokosová voda spojená s glycerolem nebo DMF se objevuje jako nová možnost kryokonzervace kančích spermií. Navzdory povzbudivým výsledkům zjištěným v této studii, je stále nezbytné prokázat účinnost těchto kryoprotektivních látek.

Výhodou je, že prášek lze snadno skladovat a jednoduše poslat do oblastí, kde čerstvé kokosy nejsou dostupné. Navíc se jedná o standardizovanou alternativu snadné přípravy a nízké ceny, typicky pocházející z tropického ovoce (Silva et al. 2015).

Simonik et al. (2022) jako první ve své publikaci uvedli, že je možné ředidla pro zmrazení kančího spermatu doplnit polysacharidem pentaisomaltózou, který se již klinicky používá při kryokonzervaci jiných typů buněk. Bylo zjištěno, že tento polysacharid interaguje s proteiny, které jsou uloženy na povrchu membrány spermií. Pomocí této interakce pentaisomaltóza vytváří ochrannou vrstvu na povrchu kančích spermií. Dále toto vzájemné působení vede k lepší obnově mitochondrií po rozmrazení. Příznivý účinek pentaisomaltózy lze také pozorovat v určité úrovni zlepšení integrity DNA. Je zajímavé, že tento účinek byl nejrozšířenější, když byla pentaisomaltóza použita jako úplná náhrada glycerolu. Experimenty ve studii Simonik et al. (2022) prokázaly slibný účinek pentaisomaltózy jako úplné náhrady glycerolu ve zmrazovacím ředidle kančího semene.

Ratchamak et al. (2020) ve své studii zkoumali množství sericinu z bource morušového (*Bombyx mori*), které by zlepšilo kvalitu kančích spermií po rozmrazení. Sericin je protein,

který obsahuje vysoké hladiny aminokyselin obsahujících hydroxyl (serin a threonin). Následkem toho má sericin antioxidační vlastnosti a může tedy snížit peroxidaci lipidů způsobenou přítomností volných radikálů. Bylo zjištěno, že doplnění množstvím 0,75 % sericinu v mrazicím ředidle bylo nejúčinnější pro zlepšení kvality kančího spermatu a vedlo ke snížení peroxidace lipidů po kryokonzervaci. Avšak vyšší doplnění sericinu na 1 % negativně ovlivnilo kvalitu spermií, protože docházelo k vyšší peroxidaci lipidů plazmatické membrány spermií. Ratchamak et al. (2020) ve své studii uvedli, že množství 0,75 % sericinu se doporučuje jako alternativní složka zmrazovacího ředidla pro zlepšení kryokonzervovaného kančího spermatu. Bude však nutný další výzkum využívající AI, aby se prokázalo, že tato indikace může být aplikována na produkci potomstva na farmách.

Studie de Mercado et al. (2020) se zaměřila na úpravu pH ředidla během rozmrazování spermií po kryokonzervaci. Bylo uvedeno, že pokud je v ředidle pro zmrazování a rozmrazování zásadité pH, dochází ke zlepšení kvality spermií po rozmrazení. Dále bylo hlášeno, že když je v ředidle při rozmrazování zásadité pH, dochází ke zlepšení motility spermií po rozmrazení. Dle de Mercado et al. (2020) je možné zlepšit pohyblivost spermií u kryokonzervovaných kančích spermií pomocí alkalického pH. Zejména pH 8 je nejúčinnější pro udržení pohyblivosti spermií během skladování. Tyto modifikace pH by mohly být použity jako postup k určení, zda došlo ke ztrátě motility či nikoli, aniž by to ovlivnilo proměnné, jako je integrita membrány nebo stav akrozómu. Výsledky studie de Mercado et al. (2020) poskytují nový pohled na motilitu spermií úpravou pH rozmrazovacího ředidla. Nicméně je zapotřebí více studií, abychom lépe pochopili vliv pH na rozmrazené spermie kanců a následné účinky na plodnost.

Vzhledem k současným problémům při kryokonzervaci kančích spermií studie Arraztoa et al. (2017) navrhuje zhodnotit vitrifikaci v koulích jako alternativní postup kryokonzervace. Jak bylo popsáno výše, samotné kryoprotektanty mohou mít toxický účinek na spermie v souvislosti s jejich koncentrací a délkou expozice buněk. K vyřešení této situace byl v některých výzkumech hodnocen účinek kryokonzervace spermií v nepřítomnosti kryoprotektiva ve spojení s dalšími metodami konzervace, jako je vitrifikace. Vitrifikace je proces, při kterém kapaliny získávají sklovitý stav bez tvorby ledových krystalů. Je to jednoduchá, časově méně náročná a méně nákladná alternativa ke konvenční kryokonzervaci.

Kvůli škodlivému osmotickému účinku, který mají vysoké koncentrace kryoprotektantů na spermie, nelze vitrifikaci použít přímo na samčí gametu, pokud jsou tato kryoprotektiva přítomna. Pro lidské, psí, lososí a králičí sperma byla tedy vyvinuta nová technika vitrifikace pomocí velmi malých vzorků (kuliček), aby bylo možné obejít se bez přidání toxických kryoprotektiv. Tímto se inspirovali Arraztoa et al. (2017) a následně zkusili tuto techniku použít na kančí spermie.

Arraztoa et al. (2017) postupovali následovně. Malé množství 20–30 μ l naředěných vzorků spermatu byly nakapány přímo do kapalného dusíku, přičemž byla dodržena minimální vzdálenost 10 cm mezi pipetou a povrchem kapaliny. Mikrokapky vytvořily při kontaktu s kapalným dusíkem koule a po 4 s spontánně klesly. Pevné kuličky zůstaly ponořeny v kapalném dusíku během individuálního přenosu do kryozkumavek pomocí pitevních kleští. Všechny kryozkumavky a pitevní kleště používané k manipulaci s kuličkami byly předem ochlazeny kapalným dusíkem a udržovány ponořené po celou dobu procesu (takže se zabránilo vystavení

kuliček vzduchu). Pevné kuličky byly udržovány v kryozkumavkách při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu minimálně 24 hodin.

Následně byly vzorky hodnoceny. Pokud jde o životaschopnost spermií, bylo pozorováno jen malé procento živých spermií (rozmezí 0–2 %) jak v syrových, tak ve zředěných vzorcích vitrifikovaných v nepřítomnosti kryoprotektiva nebo v přítomnosti DMF. Výsledky této studie byly založené na kvalitě DNA a naznačují, že by bylo vhodnější vitrifikovat vzorky surového semene kanců metodou kuliček v nepřítomnosti kryoprotektantů, protože je zachována kondenzace a integrita chromatinu spermatu, navíc jsou získány i některé živé spermie. Ačkoli použití glycerolu jako kryoprotektiva neovlivnilo kondenzaci nebo integritu DNA, nebyly získány žádné živé buňky, když byl tento kryoprotektant přítomen. Tato metoda, prováděná bez kryoprotektivních látek, se tedy vyhýbá negativním účinkům těchto látek (Arraztoa et al. 2017).

Jelikož si rozmrazené spermie po vitrifikaci zachovaly pouze svou chromatinovou kondenzaci a integritu, tyto buňky by byly výhradně vhodné pro použití v reprodukčních biotechnologiích, jako je intracytoplazmatická injekce spermií (zavedení spermie do cytoplazmy zralého vajíčka). Vzhledem k velkému poškození spermií při použití této techniky je tato alternativní metoda kryokonzervace pouze předmětem zkoumání (Arraztoa et al. 2017).

4 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zpravovat literární přehled o metodách ředění spermatu a konzervaci inseminačních dávek u prasat, se kterými se můžeme nejčastěji setkat na inseminačních stanicích.

Byly zde diskutovány vnější a vnitřní faktory, jež mohou ovlivnit kvalitu kančího spermatu z nichž nejzajímavější informace lze shrnout následovně. Nejlepší užitkovost mají kanci ve věku 2–3 let. Ze zmíněných prací vyplývá, že kanci s většími varlaty produkují ejakuláty s vyšším počtem spermií ve srovnání s kanci s menšími varlaty. Selekcí kanců s velkými varlaty v pubertě, povede ke zvýšené koncentraci spermií v ejakulátu. Lze tedy shrnout, že výběr kanců podle velikosti varlat může být snadno použitelný způsob k výběru plodnějších kanců s vyšším reprodukčním výkonem. Ukázalo se, že skupinové ustájení rostoucích kanců je prospěšné pro následnou reprodukční výkonnost. Během léta dochází k nižší kvalitě spermií v ejakulátu a toto snížení kvality spermií je spojeno s efektem zvýšené fotoperiody a tepelným stresem. Optimální pauza mezi dvěma skoky je pro kance v intervalu 3–5 dní.

Bylo by dobré se do budoucna zaměřit na postup ředění kančího spermatu, konkrétně na dvoustupňový hypotermický postup, protože tento postup by mohl snížit čas a náklady při výrobě inseminačních dávek. Také by bylo dobré se do budoucna zaměřit na metody ředění spermatu, protože z praktického a hygienického hlediska má přidání spermatu do ředidla několik výhod. Například snížení tvorby pěny, které usnadňuje utěsnění spermatu během balení a zabraňuje kontaktu mezi plnicí tryskou a spermatem. Další výhodou je větší homogenita ředěného spermatu. Extrakt z kořene *Isatis*, bovinní sérový albumin a hydroxytyrosol mají dobré antioxidační vlastnosti a tím ochraňují spermie během konzervace. Bylo by dobré se více zaměřit na tyto látky, protože zlepšují kvalitu spermií během skladování a bylo by tedy vhodné, aby byly v budoucnu součástí ředidel spermatu. Dále by bylo dobré zvážit přídavek chloridu zinečnatého do ředidel, protože zinečnaté ionty mají příznivé vlastnosti na konzervaci spermií, tudíž by mohly zvýšit procento spermií schopných oplodnění v inseminační dávce, a nakonec zvýšit míru březosti a velikost vrhu po AI. Doplnění spermatu zinečnatými ionty by také mohlo umožnit snížení počtu spermií na inseminační dávku, čímž by se zvýšila ziskovost chovných kanců.

Kryoprezervace kančího spermatu má stále velkou pozornost vědců, protože po zmrazení a rozmrazení spermií dochází stále k velkému poškození takto uchovávaných spermií. Z uvedených prací vyplývá, že kvalita kančího spermatu po kryokonzervaci může být zlepšena výběrem spermatu s dobrou zmrazitelností, přidáním antioxidantů do zředěného spermatu a použitím vhodné techniky pro umělou inseminaci prasnic. Do budoucna by bylo vhodné zařadit do protokolu kryokonzervace krok zdržení spermií před zmrazováním, protože je po rozmrazení dosahováno lepší kvality spermií, vyšší míry jejich přežití a následně to vede k vyšší plodnosti.

Tato práce přináší nové poznatky pro výrobu inseminačních dávek kanců a může též posloužit jako příručka na inseminačních stanicích prasat.

5 Seznam literatury

Alkmin DV, Perez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Roca J. 2014. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology* **69**(2):203-210. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.004.

Althouse GC, Lu KG. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* **63**(2):573-584. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.031.

Althouse GC, Rossow K. 2011. The Potential Risk of Infectious Disease Dissemination Via Artificial Insemination in Swine. *Reproduction in Domestic Animals* **46**(2):64-67. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01863.x.

Arraztoa CC, Miragaya MH, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta MC, Neild DM. 2017. Porcine sperm vitrification II: Spheres method. *Andrologia* **49**(8):e12738. DOI: 10.1111/and.12738.

Athurupana R, Takahashi D, Ioki S, Funahashi H. 2015. Trehalose in glycerol-free freezing extender enhances post-thaw survival of boar spermatozoa. *The Journal of reproduction and development* **61**(3):205-210. DOI: 10.1262/jrd.2014-152.

Baishya SK, Biswas RK, Kadirvel G, Deka BC, Kumar S, Sinha S, Dutta DJ, Saikia GK. 2014. Effect of conventional and controlled freezing method on the post thaw characteristics of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **149**(3-4):231-237. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.06.020.

Bathgate R. 2011. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals* **46**:23-25. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01826.x.

Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. 2013. *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin. ISBN 978-3-642-35049-8

Centurión F, Echeverría S, Canul N, Ake R, Alfaro M, Santos R, Sarmiento L. 2006. Influence of Seminal Plasma Added to Highly Diluted Semen on Sperm Motility of Young Boar Feed with Selenium and Vitamin E. *Reproduction in Domestic Animals* **41**(2):103-104. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00774_1_4.x.

Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Martinez EA. 2003. Influence of Porcine Spermadhesins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High Dilution. *Biology of reproduction* **69**(2):640-646. DOI: 10.1095/biolreprod.103.016527.

- Cibulka J, Fučíková A, Härtlová H, Jílek F, Lánská V, Sedmíková M. 2004. *Základy fyziologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha. ISBN 80-213-1247-5
- Clark SG, Schaeffer DJ, Althouse GC. 2003. B-Mode ultrasonographic evaluation of paired testicular diameter of mature boars in relation to average total sperm numbers. *Theriogenology* **60**(6):1011-1023. DOI: 10.1016/s0093-691x(03)00127-4.
- De Lazari FL, Sontag ER, Schneider A, Moura AAA, Vasconcelos FR, Nagano CS, Mattos RC, Jobim MIM, Bustamante-Filho IC. 2019. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility and morphology in boars. *Andrologia* **51**(4):e13222. DOI: 10.1111/and.13222.
- De Mercado E, Tomás-Almenar C, Gómez-Izquierdo E. 2020. Improvement of the motility of boar sperm after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* **222**:106610. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106610.
- Druart X, Rickard JP, Tsikis G, de Graaf SP. 2019. Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology* **137**:30-35. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.034.
- Dziekońska A, Fraser L, Strzeżek J. 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *Journal of Animal and Feed Sciences* **18**(4):638-649. DOI: 10.22358/jafs/66438/2009.
- Dziekońska A, Świąder K, Kozirowska-Gilun M, Mietelska K, Zasiadczyk Ł, Kordan W. 2017. Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **20**:77-84. DOI: 10.1515/pjvs-2017-0011.
- Fair S, Romero-Aguirregomezcorta J. 2019. Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation. *Theriogenology* **137**:15-22. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.032.
- Flowers WL. 2022. Factors affecting the production of quality ejaculates from boars. *Animal Reproduction Science* **246**:106840. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106840.
- García EM, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM. 2009. Distinct Effects of Boar Seminal Plasma Fractions Exhibiting Different Protein Profiles on the Functionality of Highly Diluted Boar Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* **44**(2):200-205. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2007.01028.x.
- Fu J, Li Y, Wang L, Zhen L, Yang Q, Li P, Li X. 2017. Bovine serum albumin and skim-milk improve boar sperm motility by enhancing energy metabolism and protein modifications during liquid storage at 17 °C. *Theriogenology* **102**:87-97. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.020.

Goldberg AM, Argenti LE, Faccin JE, Linck L, Santi M, Bernardi ML, Cardoso MR, Wentz I, Bortolozzo FP. 2013. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Research in Veterinary Science* **95**(2):362-367. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.06.022.

González-Cadavid V, Martins JA, Moreno FB, Andrade TS, Santos AC, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Moura AA. 2014. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology* **82**(5):697-707. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.05.024.

Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM, Rath D. 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* **70**:1225-1233. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.017.

Guimarães DB, Barros TB, van Tilburg MF, Martins JAM, Moura AA, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Toniolli R. 2017. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science* **183**:27-38. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.06.005.

Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*, 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA. ISBN 0-683-30577-8

Henning H, Nguyen QT, Wallner U, Waberski D. 2022. Temperature limits for storage of extended boar semen from the perspective of the sperm's energy status. *Frontiers in veterinary science* **9**:953021. DOI: 10.3389/fvets.2022.953021.

Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online* **37**(3):327-339. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.05.012.

Hodel C, Nathues H, Grahofer A. 2021. Effect of housing conditions, management procedures and traits of the external male reproductive tract on the sexual behaviour of natural mating boars. *Theriogenology* **167**:44-50. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.03.003.

Höfner L, Luther AM, Waberski D. 2020. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **220**:106290. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106290.

Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS, Zhao HW. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reproduction in Domestic Animals* **44**(4):571–575. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2007.00975.x.

Jacyno E, Kawęcka M, Pietruszka A, Sosnowska A. 2015. Phenotypic Correlations of Testes Size with Semen Traits and the Productive Traits of Young Boars. *Reproduction in Domestic Animals* **50**(6):926-930. DOI: 10.1111/rda.12610.

Jelezarsky L, Vaisberg Ch, Chaushev T, Sapundjiev E. 2008. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology* **69**(2):139-145. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.016.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* **62**(1-3):143-172. DOI: 10.1016/s0378-4320(00)00157-3.

Jovičić M, Chmelíková E, Sedmíková M. 2020. Cryopreservation of boar semen. *Czech Journal of Animal Science* **65**(4):115-123. DOI: 10.17221/47/2020-CJAS.

Kamanová V, Nevrkla P, Hadaš Z. 2018. Effect of Breed on Frequency of Morphological Defects in Boar Spermatozoa. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelinae Brunensis* **66**(3):665-668. DOI: 10.11118/actaun201866030665.

Knecht D, Jankowska-Mąkosa A, Duziński K. 2017. The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of AI boars productivity. *Livestock Science* **201**:13-21. DOI: 10.1016/j.livsci.2017.04.013.

Knox RV. 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* **85**(1):83-93. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.009.

Knox RV. 2015. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals* **50**(2):90-97. DOI: 10.1111/rda.12552.

Kos V, Andrlíková M, Ledabylová A, Marková B, Koudelová A, Novotný R, Vránová L, Čech S. 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.

Kuhlgatz DA, Kuhlgatz C, Aepli M, Schumann B, Grossfeld R, Bortfeldt R, Jakop U, Jung M, Schulze M. 2019. Development of predictive models for boar semen quality. *Theriogenology* **134**:129-140. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.024.

Li D, Zhang W, Tian X, He Y, Xiao Z, Zhao X, Fan L, Du R, Yang G, Yu T. 2022. Hydroxytyrosol effectively improves the quality of pig sperm at 17 °C. *Theriogenology* **177**:172-182. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.10.018.

Lipenský J, Lustyková A, Čerovský J. 2010. Effect of season on boar sperm morphology. *Journal of Central European* **11**(4):465-468. DOI: 10.5513/JCEA01/11.4.866.

Lipenský J, Lustyková A, Rozkot M, Václavková E, Přinosilová P, Šípek J, Kunetková M, Kopecká V. 2014. Základy hodnocení morfologického obrazu spermií kance. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves. ISBN 978-80-7403-122-9

López-Rodríguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soom A, Maes D. 2012. Effect of Dilution Temperature on Boar Semen Quality. *Reproduction in Domestic Animals* **47**(5):e63-e66. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01938.x.

Lopez-Rodriguez A, Soom AV, Arsenakis I, Maes D. 2017. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management* **3**:15. DOI: 10.1186/s40813-017-0062-5.

Louda F, Čerovský J, Ježková A, Stádník L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnologických metod. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha. ISBN 80-213-0702-1

Luce WG, Johnson RK, Walters LE. 1976. Effects of Levels of Crude Protein on Performance of Growing Boars. *Journal of Animal Science* **42**(5):1207-1210. DOI: 10.2527/jas1976.4251207x.

Luongo C, Llamas-López PJ, Hernández-Caravaca I, Matás C, García-Vázquez FA. 2022. Should All Fractions of the Boar Ejaculate Be Prepared for Insemination Rather Than Using the Sperm Rich Only? *Biology* **11**(2):210. DOI: 10.3390/biology11020210.

Luther AM, Waberski D. 2019. In vitro aging of boar spermatozoa: role of sperm proximity and seminal plasma. *Andrology* **7**(3):382-390. DOI: 10.1111/andr.12600.

Maes D, Van Soom A, Appeltant R, Arsenakis I, Nauwynck H. 2016. Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology* **85**(1):27-38. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.046.

Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, de Blas I, Espinosa E. 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* **61**(1):17-21. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2010.03.008.

Mann T. 1974. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *Journal of reproduction and fertility* **37**(1):179-188. DOI: 10.1530/jrf.0.0370179.

Martín-Hidalgo D, Macías-García B, García-Marín LJ, Bragado MJ, González-Fernández L. 2020. Boar spermatozoa proteomic profile varies in sperm collected during the summer and winter. *Animal Reproduction Science* **219**:106513. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106513.

Martins SMMK, et al. 2014. Organic selenium increases PHGPx, but does not affect quality sperm in raw boar semen. *Livestock Science* **164**:175-178. DOI: 10.1016/j.livsci.2014.02.018.

Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha. ISBN 978-80-213-1658-4

Molinia FC, Evans G, Quintana Casares PI, Maxwell W. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **36**(1-2):113-122. DOI: 10.1016/0378-4320(94)90058-2.

Morrell JM, Wallgren M. 2011. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science* **123**(1-2):64-69. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.11.005.

Nerin C, Ubeda JL, Alfaro P, Dahmani Y, Aznar M, Canellas E, Ausejo R. 2014. Compounds from multilayer plastic bags cause reproductive failures in artificial insemination. *Scientific reports* **4**:4913. DOI: 10.1038/srep04913.

Ngula J, Manjarín R, Martínez-Pastor F, Alegre B, Tejedor I, Brown T, Piñán J, Kirkwood RN, Domínguez JC. 2019. A novel semen supplement (SuinFort) improves sow fertility after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* **210**:106193. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.106193.

Oldenhof H, Wolkers WF, Sieme H. 2021. Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock: Bovine, Equine, and Porcine Sperm. *Methods in Molecular Biology* **2180**:365-377. DOI: 10.1007/978-1-0716-0783-1_15.

O'Shea CJ, Lynch MB, Callan JJ, O'Doherty JV. 2010. Dietary supplementation with chitosan at high and low crude protein concentrations promotes Enterobacteriaceae in the caecum and colon and increases manure odour emissions from finisher boars. *Livestock Science* **134**(1-3):198-201. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.06.140.

Parrilla I, Perez-Patiño C, Li J, Barranco I, Ladilla L, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Roca J. 2019. Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology* **137**:23-29. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.033.

Pinho RO, Camilo BS, Lima D, Villadiego F, Vergara J, Shiomi HH, Cardoso RE, Lopes PS, Guimarães S, Guimarães JD. 2018. The use of ultrasonography in the reproductive evaluation of boars. *Reproduction in Domestic Animals* **53**(2):393-400. DOI: 10.1111/rda.13119.

Ratchamak R, Ratsiri T, Kheawkanha T, Vongpralub T, Boonkum W, Chankitisakul V. 2020. Evaluation of cryopreserved boar semen after supplementation sericin form silkworm (*Bombyx mori*) in semen extender. *Animal Science Journal* **91**(1):e13428. DOI: 10.1111/asj.13428.

- Recuero S, Fernandez-Fuertes B, Bonet S, Barranco I, Yeste M. 2019. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* **137**:36-42. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.035.
- Ren B, Cheng X, Wu D, Xu SY, Che LQ, Fang ZF, Lv G, Dong HJ, Lin Y. 2015. Effect of different amino acid patterns on semen quality of boars fed with low-protein diets. *Animal Reproduction Science* **161**:96-103. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.08.010.
- Ren Z, Shaoyong W, Li Q, Ma L, Xiao J, Jiao J, Yang G, Pang W. 2019. Effects of Isatis root polysaccharide on boar sperm quality during liquid storage and in vitro fertilization. *Animal Reproduction Science* **210**:106178. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.106178.
- Roca J, Rodríguez-Martínez H, Vázquez JM, Bolarín A, Hernández M, Saravia F, Wallgren M, Martínez EA. 2006. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **62**:261-275.
- Rodríguez-Martínez H, et al. 2009. The physiological roles of the boar ejaculate. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **66**:1-21.
- Říha J, Čerovský J, Matoušek V, Jakubec V, Kvapilík J, Pražák Č. 2001. Reprodukce v procesu šlechtění prasat. *Asociace chovatelů masných plemen v Rapotíně, Rapotín*.
- Savić R, Marcos RA, Petrović M, Radojković D, Radović Č, Gogić M. 2017. Fertility of boars – What is important to know. *Biotechnology in Animal Husbandry* **33**(2):135-149. DOI: 10.2298/BAH1702135S
- Sebastián-Abad B, Llamas-López PJ, García-Vázquez FA. 2021. Relevance of the Ejaculate Fraction and Dilution Method on Boar Sperm Quality during Processing and Conservation of Seminal Doses. *Veterinary Science* **8**(12):292. DOI: 10.3390/vetsci8120292.
- Schulze M, Ammon C, Schaefer J, Luther AM, Jung M, Waberski D. 2017. Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. *Animal Reproduction Science* **182**:138-145. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.05.013.
- Schulze M, Beyer S, Beyer F, Bortfeldt R, Riesenbeck A, Leiding C, Jung M, Kleve-Feld M. 2020. Relationship between pubertal testicular ultrasonographic evaluation and future reproductive performance potential in Piétrain boars. *Theriogenology* **158**:58-65. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.09.003.
- Schulze M, Buder S, Rüdiger K, Beyerbach M, Waberski D. 2014a. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. *Animal Reproduction Science* **148**(3-4):164-170. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.06.008.

- Schulze M, Henning H, Rüdiger K, Wallner U, Waberski D. 2013a. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology* **80**(9):990-998. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.026.
- Schulze M, Junkes Ch, Mueller P, Speck S, Ruediger K, Dathe M, Mueller K. 2014b. Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa. *Public Library of Science one* **9**(6):e100490. DOI: 10.1371/journal.pone.0100490.
- Schulze M, Revilla-Fernández S, Schmoll F, Grossfeld R, Griessler A. 2013b. Effects on boar semen quality after infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica* **55**(1):16. DOI: 10.1186/1751-0147-55-16.
- Silva CG, Cunha ER, Blume GR, Malaquias JV, Bão SN, Martins CF. 2015. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology* **70**(2):90-94. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.01.001.
- Simonik O, et al. 2022. Boar Sperm Cryopreservation Improvement Using Semen Extender Modification by Dextran and Pentaisomaltose. *Animals* **12**(7):868. DOI: 10.3390/ani12070868.
- Singh M, Mollier RT, Pongener N, Bordoloi LJ, Kumar R, Chaudhary JK, Katiyar R, Khan MH, Rajkhowa DJ, Mishra VK. 2022. Linseed oil in boar's diet during high temperature humidity index (THI) period improves sperm quality characteristics, antioxidant status and fatty acid composition of sperm under hot humid sub-tropical climate. *Theriogenology* **189**:127-136. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.012.
- Singleton WL. 1997. *A Guide to Basic Boar Semen Collection, Evaluation and Processing Procedures*. Purdue University, West Lafayette.
- Smital J. 2009. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science* **110**:335-346. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.01.024.
- Soler-Llorens P, Mendoza N, Miguel J, Falceto MV, Mitjana O, Ausejo R. 2020. Insemination of sows with seminal doses prepared by a two-step hypothermic dilution does not impair the reproductive performance at farm. *Reproduction in Domestic Animals* **55**(9):1202–1209. DOI: 10.1111/rda.13763.
- Suriyasomboon A, Lundeheim N, Kunavongkrit A, Einarsson S. 2004. Effect of temperature and humidity on sperm production in Duroc boars under different housing systems in Thailand. *Livestock Production Science* **89**(1):19-31. DOI: 10.1016/j.livprodsci.2003.12.008.
- Sutovsky P. 2015. New Approaches to Boar Semen Evaluation, Processing and Improvement. *Reproduction in Domestic Animals* **50**:11-19. DOI: 10.1111/rda.12554.

- Sutovsky P, Kerns K, Zigo M, Kerns K. 2019. Boar semen improvement through sperm capacitation management, with emphasis on zinc ion homeostasis. *Theriogenology* **137**:50-55. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.037.
- Sztejn JM, Noble K, Noble K, Mobraaten LE. 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* **42**(1):28-39. DOI: 10.1006/cryo.2001.2300.
- Tamanini MSC, Dos Santos G, Leal LA, Wolf LM, Schulze M, Christ TS, Bortolozzo FP, Ulguim RR, Wentz I, Mellagi APG. 2022. Impact of agitation time of boar semen doses on sperm traits in short- and long-term extenders. *Animal Reproduction Science* **247**:107159. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.107159.
- Tong S, Yin C, Ge Y, Ren Z, Tao J, Liu Y. 2022. Albumin (ALB) and protein disulfide isomerase family A member 4 (PDIA4) are novel markers to predict sperm freezability of Erhualian boar. *Cryobiology* **109**:37-43. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2022.09.006.
- Torres MA, et al. 2016. Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It? *Public Library of Science one* **11**(8):e0160988. DOI: 10.1371/journal.pone.0160988.
- Tsakmakidis IA, Khalifa TA, Boscós CM. 2012. Age-related changes in quality and fertility of porcine semen. *Biological research* **45**(4):381-386. DOI: 10.4067/S0716-97602012000400009.
- Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L. 2019. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology* **137**:2-7. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.030.
- Wiebke M, Hensel B, Nitsche-Melkus E, Jung M, Schulze M. 2022. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science* **246**:106822. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106822.
- Wongtawan T, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, Rodríguez-Martínez H. 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology* **65**(4):773-787. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.003.
- Yeste M, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. 2017. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Molecular Reproduction and Development* **84**(9):802-813. DOI: 10.1002/mrd.22840.
- Yeste M, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Bonet S. 2010. A diet supplemented with l-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. *Theriogenology* **73**(5):577-586. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.10.013.

Yimer N, Kaka A, Yusoff R, Haron AW. 2016. Cryopreservation in Eukaryotes. InTech, Chorvatsko. ISBN 978-953-51-2780-2

Zhang XG, Yan GJ, Hong JY, Su ZZ, Yang GS, Li QW, Hu JH. 2015. Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17 degrees C. *Reproduction in Domestic Animals* **50**(2):263–269. DOI: 10.1111/rda.12481.

6 Seznam použitých zkratk a symbolů

AI – umělá inseminace

ATP – adenosintrifosfát (energie pro buňku)

BSA – bovinní sérový albumin

BTS – Beltsville – ředidlo pro krátkodobou konzervaci

CASA (computer assisted sperm analysis) – analýza spermií pomocí počítače

DMA – dimethylacetamid

DMF – dimethylformamid

In vitro – v umělých podmínkách (mimo tělo)

In vivo – v živém organismu

IRPS – sloučenina extrahovaná z kořene Isatis

KD – krmná dávka

ROS – reaktivní formy kyslíku

7 Seznam obrázků

Obrázek 1 Popis spermie (vlastní ilustrace autorky)	12
Obrázek 2 Schéma Bürkerovy komůrky (Kos et al. 2019).....	15
Obrázek 3 Spermie v Bürkerovy komůrce pod mikroskopem (Kos et al. 2019).....	15
Obrázek 4 Fixace kance na fantomu (Kos et al. 2019).....	24
Obrázek 5 Metody ředění spermatu, převzato a upraveno z (Sebastián-Abad et al. 2021).....	27
Obrázek 6 Nádoby na uskladnění kančího spermatu (Singleton 1997).....	31
Obrázek 7 Poškození kančích spermií během zmrazování, převzato a upraveno z Yeste et al. (2017).....	34
Obrázek 8 Nádrž s tekutým dusíkem (Yimer et al. 2016)	39

8 Seznam tabulek

Tabulka 1 Složení ředidel používaných pro kančí sperma (Louda et al. 2001)	30
--	----