

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

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

Bakalářská práce

**Autor práce Vojtěch Bouda
Program nebo obor studia
Chov hospodářských zvířat**

**Vedoucí práce
Ing. Ptáček Martin, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 21. 4. 2023

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a cenné rady během psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat PhDr. Lence Peškové, která mi velice pomohla s hledáním literárních zdrojů do mé práce a všem, kteří mi při psaní mé bakalářské práce byli oporou.

Perspektivní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u malých přežvýkavců

Souhrn

Cílem této práce je literární shrnutí poznatků o perspektivních kryoprotektorech, které jsou používány při konzervaci spermatu malých přežvýkavců – koz a ovcí. Bakalářské práce byla psána formou literární rešerše.

Spermie hospodářských zvířat mají různý stupeň kryotolerance v závislosti na jejich jedinečných vlastnostech, jako je velikost, tvar a složení lipidů. V důsledku toho není možné vytvořit jednotný postup ředění, zmrazování a jednotné možnosti použití stejných ředidel pro různé druhy zvířat. Vývoj úspěšného kryoprotektoru a postupu kryokonzervace spermatu umožní rozšíření umělé inseminace v každodenní produkci a dlouhodobé uchování genetických zdrojů malých přežvýkavců. Nicméně rozsáhlé používání umělé inseminace u ovcí a koz, je navzdory své dlouhé historii provázeno obtížemi, zejména při použití zmrazeného spermatu. Sperma je během procesu zmrazování a rozmrazování fyzicky a chemicky poškozeno. Toto poškození je u beranů a kozlů výrazně vyšší ve srovnání s jinými druhy hospodářských zvířat, jako např. u skotu. Z tohoto důvodu se řada studií zabývala faktory ovlivňující fertilizační schopnost zmrazených a rozmrazených spermií. V ředidlech jsou běžně používány ochranné složky jako glycerol, vaječný žloutek nebo odtučněné mléko. Navzdory úspěchu při používání vaječného žloutku a mléka jako složky semenných ředidel však mohou existovat problémy s možným přenosem patogenů. Proto byly uskutečněny pokusy nahradit vaječný žloutek jinými zdroji, jako například sojovým lecitinem či kokosovou vodou. Navíc řada studií sledovala vliv přídatku dalších kryoprotekčních látek v definovaných koncentracích.

Další studie by mohly být zaměřeny na ověření kombinace dílčích kryoprotektantů, které souběžně působící mohou mít příznivější vliv na přežitelnost spermií po zmrazení, rozmrazení a následné použití při inseminaci. Jako velmi perspektivní pro tuto strategii se jeví dobré výsledky při použití směsi glycerolu a dimethylsulfoxidu. Tyto výsledky by mohly být dále ověřovány při obohacení o další kryoprotektivní látky jako ethylenglykol, propylenglykol, trehalóza nebo LDL.

Klíčová slova: CASA, inseminace, koza, ovce, průtoková cytometrie, ředidlo

Promising cryoprotectors used for the ram semen preservation in small ruminants

Summary

The aim of this paper is to summarize the literature knowledge about prospective cryoprotectants used in semen preservation of small ruminants - goats and sheep. The bachelor thesis was written in the form of a literature search.

Farm animal sperm have varying degrees of cryotolerance depending on their unique characteristics such as size, shape and lipid composition. As a result, it is not possible to establish a uniform dilution procedure, freezing and uniform options for using the same diluents for different species. The development of a successful cryoprotectant and semen cryopreservation procedure will allow the expansion of artificial insemination in daily production and the long-term preservation of genetic resources of small ruminants. However, the widespread use of artificial insemination in sheep and goats, despite its long history, is accompanied by difficulties, particularly when frozen semen is used. Semen is physically and chemically damaged during the freezing and thawing process. This damage is significantly higher in rams and goats compared with other livestock species such as cattle. For this reason, a number of studies have addressed the factors affecting the fertilisation capacity of frozen and thawed semen. Protective ingredients such as glycerol, egg yolk or skimmed milk are commonly used in diluents. However, despite the success of using egg yolk and milk as ingredients in semen extenders, there may be problems with the possible transmission of pathogens. Therefore, attempts have been made to replace egg yolk with other sources such as soy lecithin or coconut water. In addition, a number of studies have investigated the effect of the addition of other cryoprotectants at defined concentrations.

Further studies could be aimed at verifying the combination of partial cryoprotectants, which acting in parallel may have a more favourable effect on sperm survival after freezing, thawing and subsequent use in insemination. Good results using a mixture of glycerol and dimethyl sulfoxide appear to be very promising for this strategy. These results could be further verified when enriched with other cryoprotective substances such as ethylene glycol, propylene glycol, trehalose or LDL.

Keywords: CASA, insemination, goat, sheep, flow cytometry, diluent

Obsah

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
3.1	ODBĚR SPERMATU.....	9
3.1.1	<i>Elektroejakulace (EEJ)</i>	9
3.1.2	<i>Umělá vagina (AV)</i>	10
3.1.3	<i>Odběr spermatu po kastraci nebo postmortem</i>	11
3.1.4	<i>Porovnání metod odběru</i>	12
3.1.5	<i>Hodnoty ejakulátu berana a kozla</i>	13
3.2	HODNOCENÍ EJAKULÁTU	13
3.2.1	<i>Makroskopické hodnocení ejakulátu</i>	13
3.2.2	<i>Mikroskopické hodnocení</i>	14
3.2.2.1	CASA.....	14
3.2.2.2	Průtoková cytometrie	15
3.2.2.2.1	Životaschopnost a akrosomální stav.....	16
3.2.2.2.2	Hodnocení stavu kapacity spermíí.....	17
3.2.2.3	Test hypoosmotického bobtnání (HOST)	17
3.2.2.4	Tepelný test přežitelnosti	17
3.3	UMĚLÁ INSEMINACE (AI).....	17
3.3.1	<i>Vaginální (percervikální) inseminace</i>	18
3.3.2	<i>Transcervikální (intracervikální) inseminace</i>	18
3.3.3	<i>Laparoskopická intrauterinní inseminace</i>	19
3.3.4	<i>Transcervikální intrauterinní inseminace</i>	20
3.4	KONZERVACE SPERMATU	20
3.4.1	<i>Krátkodobá konzervace</i>	21
3.4.2	<i>Dlouhodobá konzervace</i>	22
3.4.2.1	Postup kryokonzervace.....	22
3.4.2.2	Osmolalita.....	23
3.4.2.3	pH	24
3.4.3	<i>Kryoprotektory</i>	24
3.4.3.1	Kryoprotektivní látky obsažené v komerčních ředidlech	24
3.4.3.2	Cukry.....	25
3.4.3.3	Syntetická a přírodní antioxidanty	26
3.4.3.4	Další kryoprotektivní látky se specifickou funkcí	27
3.4.4	<i>Metoda ultra rychlého zmrazení</i>	29
3.4.5	<i>Lyofilizace</i>	31
4	ZÁVĚR	33
5	LITERATURA	34
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	47

1 Úvod

Konzervace spermatu je klíčovou strategií pro udržení genetického bohatství vzácných a ohrožených druhů, a to zejména u malých přežvýkavců, kteří se vyskytují v různých částech světa a čelí hrozbám, jako jsou ztráta biotopu, stres, nemoci a genetická homogenizace. Uchování spermatu těchto druhů je tak klíčové pro udržení jejich genetické diverzity a pro budoucí možnosti jejich reprodukce a obnovy.

V současnosti existuje mnoho metod konzervace spermatu, z nichž většina se zaměřuje na zmrazení spermatu. Tyto metody však často vedou k poškození spermatu a snižují jeho fertilizační schopnost, což ztěžuje jeho úspěšné znovuobnovení. Proto je důležité hledat nové a účinnější metody konzervace spermatu, které by minimalizovaly negativní účinky zmrazení a umožňovaly uchování vysoké kvality spermatu.

Kryoprotektory se jeví jako perspektivní řešení, protože pomáhají chránit sperma před poškozením způsobeným zmrazením a udržují jeho vysokou kvalitu. Tyto látky se přidávají do roztoku, ve kterém je sperma uchováno, a slouží k ochraně spermatu před poškozením, které by jinak mohlo být způsobeno zmrazením. Tato práce se zaměřuje na posouzení účinnosti a vhodnosti různých kryoprotektorů, které se používají při konzervaci spermatu u malých přežvýkavců a pomáhá poskytnout vhled do perspektivních řešení této problematiky.

2 Cíl práce

Obecně je známo, že sperma u malých přežvýkavců má nízkou toleranci vůči dlouhodobé konzervaci v tekutém dusíku. Proto všechny informace, které vedou ke zlepšení kryokonzervace, jsou důležité s ohledem na rozšíření inseminace v chovech ovcí a koz. Cílem bakalářské práce je soupis aktuálních poznatků tematicky zaměřených na využití perspektivních kryoprotektorů při konzervaci semene. Dalším cílem bakalářské práce bude navržení možných postupů pro optimalizaci výroby inseminačních dávek, popř. potenciálního zlepšení úspěšnosti při následné inseminaci.

3 Literární rešerše

3.1 Odběr spermatu

K získání ejakulátu je třeba použít samce v reprodukčním věku. To je vhodný věk pro chovná zvířata, aniž by bylo ohroženo jejich zdraví nebo budoucí vývoj. U raných plemen se zařazují do chovu v 8 až 10 měsících a u ostatních ve 12 až 18 měsících. Věk není tak podstatný jako úroveň fyzického vývoje zvířat, která je ovlivněna jejich výživou a chovatelskými postupy. Zvířata by měla být použita k chovu až po dosažení 70–75 % jejich dospělé hmotnosti. V úvahu se berou také vyvíjející se varlata samců, která měří 10 cm na délku, 5 cm na šířku a váží 275 g. (Horák 2012).

Ke sběru spermií lze použít elektrickou stimulaci nebo umělou vagínu. Je však třeba zdůraznit, že elektrická stimulace nemusí být pro kozu úspěšná, protože může změnit složení semenné plazmy, což snižuje toleranci spermií ke kryozraněním, a tím snižuje kvalitu spermatu (Nutí 2007). Aby se zabránilo tepelnému šoku, šoku z chladu, kontaminaci vodou, dezinfekčními prostředky, slunečním zářením a vzduchem, jakož i dalším procesům nebo faktorům, které mohou snížit životaschopnost spermií, musí se s odebraným spermatem nakládat opatrně. Je důležité vyhodnotit kvantitativní a kvalitativní charakteristiky ejakulátu co nejdříve po odběru. Obvykle se hodnotí koncentrace spermií (norma: 3,5 až 6,0 miliard), pohyblivost (vlnový pohyb/hmotnostní pohyb a individuální progresivní pohyb dopředu/motilita spermií při ředění vzorku nástavcem; norma: 80–90 %) a morfologie (norma: 70–80 %). Kromě toho se provádějí i další zkoušky, jako je zkouška tepelné odolnosti, akrozom a integrity membrány, hypoosmotické bobtnání (HOST) nebo oplodnění in vitro lze použít k posouzení kvality spermatu (Flaig 2012).

3.1.1 Elektroejakulace (EEJ)

Při metodě elektroejakulace (EEJ) se používá elektroejakulátor (transrektální sonda s elektrodou), který dodává do samčího konečníku elektrické impulsy o nízkém napětí a nízkém proudu, což způsobuje erekci penisu, uvolnění a následnou ejakulaci (Abril-Sánchez a kol. 2018; Kang a kol. 2021). Nejčastěji používanými přístroji jsou Baileyho a Ruakurova beraní sonda. Ruakurova sonda produkuje výstup 10–15 V; při suchém rektu se doporučuje 15 V (Laurans a kol. 1950). Před zavedením sondy do hloubky 15–20 cm je třeba sondu lubrikovat (Etson a kol. 2004). Je zajímavé, že k odběru spermatu EEJ dochází bez ohledu na sexuální pud berana (Terrill a kol., 1940). Beran ejakuluje již po třech až pěti stimulacích přídatných žláz (10 až 15 s). Při lehkém tlaku směrem dolů, který směřuje na pánevní dno, se stimulace provádí sondou v rytmu zapnuto/vypnuto (3–5 s zapnuto a 5–15 s vypnuto) (Shipley a kol. 2007).

Nejnovější přístroj je vybaven přepínačem vysoké/nízké hodnoty a umožňuje naprogramovat nebo ručně zvýšit elektrický náboj (vysoké nastavení je vhodnější pro berany, zatímco nízké je vhodnější pro kozly). S ejakulátorem pro berany Lane je třeba prostatu masírovat 8–10krát, na rozdíl od přístrojů Bailey a Ruakura. Podle pokynů společnosti Lane Manufacturing Inc. se stimulace provádí také rytmickým zapínáním a vypínáním (4–6 sekund zapnuto a 5–8 sekund vypnuto, včetně masáže ještě jednou během klidového intervalu) (Evans

a kol. 1987). Ejakulace se provádí při průměrné hodnotě 4 V a 90 mA po dobu zhruba 3 minut pomocí tříelektrodové sondy (250 mm 30 mm) připojené k elektroejakulátoru, která zajišťuje regulaci napětí a proudu. Se správným vybavením je tato technika jednoduchá (Etson a kol. 2004). Odběr spermatu od mnoha netrénovaných beranů nebo divokých samců pro účely chovu díky přístupu EEJ je jednodušší a snazší.

Tato metoda má však některá omezení, z nichž jedno spočívá v tom, že EEJ má nižší míru výtěžnosti (80%) než metoda odběru pomocí umělé vagíny (AV) (100%) z důvodu kontaminace moči nebo nedostatečné reakce na stimulaci EEJ (Barrios a kol., 2005). Během odběru a po něm by mělo být sperma chráněno před přímým slunečním zářením a teplotním šokem a pohyblivost spermií by měla být vyhodnocena do 10 minut (Edmondson a Pugh 2012).



Obrázek 1: Elektroejakulátor
zdroj: (Kos a kol., 2019)

3.1.2 Umělá vagína (AV)

Pro odběr semene berana se nejčastěji používá umělá vagína (Liu a Ott 2018). Berani i osoba, která sperma odebírá, musí být řádně vyškoleni. Majitel musí své berany dobře znát, ochočit si je a aklimatizovat se na ně. S berany je třeba často manipulovat a držet je v ohradách (Steyn 2003).

Pevný plášť a vložka, které tvoří AV, jsou k sobě pevně připevněny pomocí gumiček. Lze je zakoupit v obchodě nebo vytvořit doma, ale musí být vodotěsné, protože jakýkoli přímý kontakt s vodou spermie zabije. Pro zavedení vody a vzduchu, regulaci teploty a tlaku se do pouzdra provrtá kohout nebo jiný mechanismus (Shipleý a kol. 2007). Teplota uvnitř vložky by se měla pohybovat mezi 42–45 °C, to je nezbytné pro úspěšný odběr. Pokud je AV naplněna vodou, která má teplotu mezi 50 °C a 55 °C, obvykle se tím dosáhne správné vnitřní teploty. Teplota zařízení je ovlivněna teplotou prostředí, proto je třeba provést úpravy. Pro určení správné vnitřní teploty a teploty vody použijte teploměr. Sběrná trubice by měla být před odběrem zahřátá na teplotu 30–37 °C, aby se zabránilo studenému šoku (Steyn 2003).

K mazání otevřeného konce se používá lubrikační gel, který není spermicidní a je sterilní (Shipleý a kol. 2007). Po nasazení berana se měkce uchopí umělá vagína a penis se přesměruje na otevřený konec AV. Ejakulace nastala při silném tahu nahoru a dopředu. AV se otočí sběrným sklem směrem dolů, uvolní se tlak vložky a sklo se spermatem se vloží do teplé lázně o teplotě 30 až 34 °C (Steyn 2003).



Obrázek 2: Odběr ejakulátu berana pomocí umělé vagíny
zdroj: (Kos a kol. 2019)

3.1.3 Odběr spermatu po kastraci nebo postmortem

Nadvarle je orgán, kde dochází k modifikaci plazmatické membrány spermie, která jí dává schopnost pohybu a oplodnění (Osugwuh 2017). Spermie beranů si v tělísku specificky rozvíjejí pohyblivost a schopnost vázat vajíčka (Jones 1998). Spermie lze získat z kaudy epididymis post mortem nebo po odstranění samčích pohlavních orgánů. Postup zahrnuje odběr varlat a nadvarlat s použitím roztoku 0,9 % NaCl, 100 UI/ml penicilinu G a 100 mg/ml streptomycin sulfátu. Varlata pak mohou být dopravena do laboratoře do 2 hodin po pitvě a udržována při teplotě mezi 4 a 8 °C nebo při pokojové teplotě (22 °C), aniž by došlo k poškození kvality spermií (Mujitaba a kol. 2022). Nadvarle lze oddělit od varlete a po odstranění tuniky vaginalis dále jej očistit pomocí Dulbeccova fosfátového pufovaného roztoku (DPBS) při teplotě 37 °C. Spermatické buňky se následně extrahují mletím nebo krájením nožem (Ganaie a kol. 2009). Alternativně je lze odebírat také technikou řezu. Po oddělení kaudy nadvarlete od chámovodu lze provést šest až osm podélných řezů ve ventrální oblasti kaudy nadvarlete. Aby mohly spermie vyplavat do pufru při pokojové teplotě, umístí se naříznutá kauda nadvarlete na 30 minut do 3 ml Trisova pufru v Petriho misce o průměru 35 mm (Mujitaba a kol. 2022). Nakonec lze naříznuté nadvarle opláchnout 1 ml pufru a dvakrát propláchnout ve 4 ml pufového roztoku odstředěním při 885 g po dobu 10 minut. Poté je možné pelet naředit (Ahmed a kol., 2019). Několik autorů nahradilo pufrý prodlužovači spermatu zahřátými na 35 °C po dobu 5 minut (Bergstein-Galan a kol. 2017).

Ve srovnání s ejakulovaným spermatem má nadvarletní sperma (EPS) obvykle menší objem, ale je mnohem koncentrovanější a má vyšší procento cytoplazmatických kapének. Avšak ejakulované semeno berana obsahuje vyšší redukující cukr (fruktózu) než nadvarle, které obsahuje kyselinu askorbovou jako primární redukující cukr. V důsledku toho si ejakulované spermie mohou udržet vyšší pohyblivost za anaerobních podmínek (White a Wales 1961). Chromatin epididymálních spermií je navíc méně kondenzovaný než chromatin ejakulovaných spermií, takže je poněkud citlivější na podněty z vnějšího prostředí (Brognia a kol. 2021). Naproti tomu EPS berana odebraná v 0 a 48 hodinách po smrti vykazuje podobnou schopnost oplození jako ejakulované spermie (Kaabi a kol. 2003). Srovnávací studie in vitro fertilizace (IVF) s použitím AV a EPS u ovcí tento závěr rovněž potvrdila (Bergstein-Galan a kol. 2017). Stejně jako ejakulát může tedy EPS přinést vynikající výsledky. Na kvalitu spermií má však vliv část nebo segmenty (caput, corpus a cauda) nadvarlete, ze kterých jsou spermie odebrány.

Vyšší míry březosti - 80,0 % (16/20) a 78,0 % (29/37) – bylo dosaženo, když byly bahnice inseminovány laparoskopicky pomocí EPS odebraných z distální a proximální kaudy nadvarlete namísto ejakulovaných spermií, které vedly k březosti pouze 72,0 % (21/29) (Parra-Forero a kol. 2015).

3.1.4 Porovnání metod odběru

Vliv technik odběru na vlastnosti spermatu před zmrazením a po rozmrazení byl prokázán řadou výzkumů. EEJ-odebraný ejakulát má větší objem a nižší koncentraci než AV-odebraný ejakulát u beranů i kozlů (Jiménez-Rabadán a kol. 2016). Matthews a kol. (2003) uvádí, že technika odběru neměla žádný vliv na morfologii spermií beranů. Quinn a kol. (1968) došli k závěru, že spermie beranů byly citlivější na chladový šok, když byly vystaveny semenné plazmě EEJ, přičemž spermie odebrané AV byly odolnější. Podobně Álvarez a kol. (2012) zaznamenali, že kvůli větší citlivosti na vysokou koncentraci glycerolu byl odběr spermií EEJ po rozmrazení méně kvalitní. Naopak po heterologním in vitro fertilisation (IVF) vykazovaly zmrazené a inkubované spermie EEJ výrazně větší podíl nepoškozených akrozomů, mitochondriálních membránových potenciálů a rychlost štěpení než posmrtně odebraná spermie. Tato zjištění jsou v souladu se zprávou Marco-Jiménez a kol. (2012) prokázali, že ejakuláty získané pomocí EEJ měly po rozmrazení podstatně vyšší intaktní akrozomy a živé buňky, které nebyly znehodnoceny, než ejakuláty získané pomocí AV. Podle Marco-Jiménez a kol. (2012) v důsledku použití EEJ při odběru spermatu se může změnit sekreční schopnost jedné nebo více přídatných pohlavních žláz. Upravuje složení semenné plazmy. Je v souladu se zjištěními Barriose a kol. (2005) a Maxwell a kol. (2007), že objem a složení plazmy, včetně hladiny bílkovin, jsou ovlivněny technikou odběru.

Změny ve struktuře spermií způsobené změnami v semenné plazmě snižují odolnost jejich membrány (Marco-Jiménez a kol. 2012) to má špatný vliv na plodnost, životaschopnost a schopnost zmrazení vzorku (Matthews a kol. 2003).

Další nevýhodou metody EEJ je zvýšená pravděpodobnost kontaminace močí a/nebo sekrety přídatných žláz. Možnost kontaminace močí by však mohla být snížena výměnou sběrné trubice mezi jednotlivými ejakulacemi (Quinn a kol. 1968). Při odběru spermatu pomocí EEJ se zvyšuje koncentrace nízkomolekulárních proteinů, což může mít pozitivní vliv na schopnost spermií odolávat zmrazování a rozmrazování. Roční období má také vliv na proteiny spermatické plazmy, přičemž v zimě a na podzim lze nejlépe pozorovat zvýšení pohyblivosti zmrazených rozmrazených spermií. Kvalita spermatu po rozmrazení se proto liší v závislosti na ročním období a technice odběru. (Marco-Jiménez a kol. 2008).

Ve srovnání se spermiemi odebranými pomocí AV byly spermie odebrané pomocí EEJ kvalitnější a odolnější vůči kryokonzervaci (Marco-Jiménez a kol. 2005). Podle studií, které byly analyzovány, byly ejakuláty získané pomocí AV čerstvější a koncentrovanější než ejakuláty získané pomocí EEJ. Naopak ejakuláty získané EEJ obsahují větší množství spermií a téměř všechny ostatní ukazatele kvality se významně neliší od ukazatelů kvality spermií získaných AV. Většina parametrů ve vzorcích po rozmrazení mezi oběma technikami odběru se jasně nerozlišuje. To ukazuje, že metoda EEJ by mohla být použita místo metod AV. Ejakuláty rozmrazené AV vykazují větší podíl celkové pohyblivosti, progresivní pohyblivosti

a linearity, i když se od sebe výrazně neliší. Podle některých zpráv je linearita nejlepším a nejdůvěryhodnějším prediktorem plodnosti (míry štěpení) (Quinn a kol. 1968).

3.1.5 Hodnoty ejakulátu berana a kozla

TABULKA 1 HODNOTY EJAKULÁTU BERANA A KOZLA

	Beran	Kozel
Objem	1–1,5 (min. 0,5) cm ³	0,4–3 (prům. 1) cm ³
Hustota	2–5 mil. spermií/mm ³	0,7–5 (prům. 3) mil./mm ³
Pach	nevýrazný	nevýrazný
Aktivita	cca 70%	85%
Barva	slonová kost	bílá, nažloutlá
Patologické spermie	do 15%	do 15%
Konzistence	zrnitá	zrnitá
Nezrálé spermie	do 2%	do 2%
pH	6,2-6,9	6,2-7,5

zdroj: (Louda a Hegedušová 2009)

3.2 Hodnocení ejakulátu

Analýza spermatu je důležitou součástí andrologického screeningu a pomáhá nám odhalit situace zjevné neplodnosti nebo dokonce perspektivní subfertility. Je zřejmé, že ejakulát musí být před zpracováním pro umělé oplodnění nebo oplodnění in vitro (IVF) vyhodnocen, aby se posoudil stupeň jeho normality. Toto hodnocení často zahrnuje záznam objemu, vzhledu, koncentrace a pohyblivosti spermií. Někdy se bere v úvahu také morfologie spermií a přítomnost cizích buněk (Rodríguez-Martínez 2006).

3.2.1 Makroskopické hodnocení ejakulátu

Makroskopické vyšetření spermatu zahrnuje všechna měření provedená lidským okem, jako je objem, barva, pach, konzistence a viskozita spermatu (Bopape a kol. 2015).

Objem spermatu je důležitým parametrem při hodnocení kvality spermatu. Objem spermatu se může u jednotlivých jedinců značně lišit, ale normální hodnoty se u spermatu koz a beranů pohybují v rozmezí 0,5 až 2,5 ml, resp. 0,5 až 1,5 ml (Gamčík a kol. 1992). Objem spermatu se často měří pomocí odměrných zkumavek a nízký objem může naznačovat problém s přídatnými pohlavními žlázami nebo nízký počet spermií (Dorado a kol. 2017).

Barva spermatu může také poskytnout cenné informace o kvalitě spermatu. Normální kozí sperma je obvykle bílé nebo mírně nažloutlé, zatímco normální beraní sperma je obvykle bílé nebo mírně neprůhledné (Ritar a kol. 1992). Abnormální barva spermatu, například červená nebo hnědá, může naznačovat přítomnost krve v ejakulátu, která může být způsobena zánětem, infekcí nebo traumatem (Gamčík a kol. 1992).

Normální kozí sperma má specifického nebo normálního charakteristický mléčný zápach, zatímco normální beraní sperma je obvykle bez zápachu nebo mírně zatuchlé (Wurlina a kol. 2020). Nepříjemné nebo abnormální pachy, jako je odporný nebo hnilobný zápach, mohou naznačovat přítomnost bakteriální kontaminace nebo infekce (Gamčík a kol. 1992).

Viskozita spermatu je měřítkem odporu tekutiny proti proudění. Normální kozi a beraní sperma by mělo mít smetanovitou viskozitu. Nakloněním vzorkovací nádoby a vyhodnocením přilnavosti kapaliny ke stěně subjektivně určíme viskozitu (Kos a kol. 2019). Vysoká viskozita může naznačovat problém s funkcí přídatných pohlavních žláz a nízká viskozita může naznačovat problém s pohyblivostí spermií (Ducha a kol. 2021).

Přítomnost cizorodých látek ve spermatu může ovlivnit kvalitu spermatu. Normální sperma by nemělo obsahovat žádné cizí příměsi, jako je krev, hnis, moč, písek, prach, lubrikační gel, chlupy nebo předkožkové nečistoty (Gamčík a kol. 1992).

3.2.2 Mikroskopické hodnocení

Jedním z přístupů, který byl vytvořen k eliminaci lidských chyb, je počítačem asistovaná analýza spermií (CASA), a je jedním z nejdůležitějších. Ve srovnání s manuálními přístupy je CASA užitečným nástrojem pro hodnocení spermií, protože umožňuje objektivní a rychlejší vyhodnocení pohybových parametrů spermií. Pro určení schopnosti in vivo nebo IVF vzorků spermatu je hodnocení parametrů pohyblivosti spermií zásadní. Pohyblivost hodnocená systémem CASA nabízí konzistentní odhady různých kritérií pohybu spermií (Konyali 2012).

Pro přesnější určení kvality spermií ve vzorku (čerstvé, chlazené nebo rozmražené) je třeba provést mnoho laboratorních testů. Životaschopnost spermií, známá také jako integrita membrány spermií, je měřítkem často používaným k posouzení kvality spermií. Vzorek se obarví a v závislosti na použitém barvení pro stanovení integrity membrány spermií se poté vyšetří pod mikroskopem s jasným polem nebo fluorescenčním mikroskopem. Barviva používaná pro analýzu v jasném poli jsou cenově dostupná, umožňují odhad tohoto parametru pomocí jednoduchého vybavení a umožňují průtokovou cytometrickou analýzu vzorků. Při průtokové cytometrii se současně měří a analyzuje mnoho fyzikálních vlastností jednotlivých částic, typicky buněk, které se pohybují pomocí laserového paprsku v proudu tekutiny (Konyali 2012). Pomocí průtokové cytometrie pro analýzu spermií lze objektivně, rychle a současně analyzovat obrovské množství spermií a výsledky těchto analýz lze použít k odhadu plodnosti vzorku spermatu. Mnoho analýz spermií, jako je počet spermií, životaschopnost, ukazatele podobné apoptóze, pohyblivost, akrozomová reakce spermií nebo obsah a integrita DNA, lze provádět pomocí průtokové cytometrie s využitím jednoho nebo více fluorescenčních barviv (Nethenzheni 2017).

Touto metodou lze za jednu minutu spočítat přibližně 50 000 spermatických buněk, což je jedna z jejích silných vlastností. Všechny metody barvení jsou rychlé a snadné; pozorovat lze buď na vzduchu vysušené spermatické buňky fixované ve fluorescenčním fixativu, nebo živé spermatické buňky. V současné době lze fluorescenční sondy použít k hodnocení téměř všech vlastností buňky, které bychom chtěli pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem (Matshaba 2010).

3.2.2.1 CASA

Za posledních 20 let došlo k výraznému pokroku ve vývoji hardwaru i softwaru, což způsobilo revoluci v systémech CASA, přičemž většina systémů nabízí vysokou úroveň kontroly a ověřování kvality (Mortimer a kol. 2015). Na rozdíl od tradičního subjektivního vyšetření motility pomohla počítačem asistovaná analýza spermatu (CASA), která je založena

na pohybech hlavičky spermie, zvýšit přesnost a spolehlivost měření motility spermií (Palacín a kol. 2013). Porovnání výsledků a schopnost odhalit nepatrné změny mezi jednotlivými samci nebo léčebnými postupy jsou umožněny dostupností údajů shromážděných pomocí CASA (Verstegen a kol. 2002). Na výsledky analýzy pohyblivosti pomocí CASA však může mít vliv i řada proměnných, včetně technika, optiky, nastavení softwaru, nastavení pořizování snímků, počtu vyšetřovaných polí, koncentrace a ředění vzorku a analytické komory (Contri a kol. 2010).

Stále více domácích zvířat je hodnoceno z hlediska kvality a funkce spermií pomocí CASA (Ngcauzele 2018). Kromě toho některé systémy CASA nabízejí v rámci automatizované analýzy kromě funkčních prvků, jako je penetrace sliznice spermií a hyperaktivace, také morfologii, vitalitu, fragmentaci a akrozomovou reakci (Van Der Horst a kol. 2018).

Silnou stránkou systémů CASA je schopnost zkoumat vzorec pohybu hlavičky spermie ve dvou rozměrech, přičemž se ignoruje skutečnost, že se hlavička pohybuje v ose Z i ve stísněné mělké komůrce. Systémy rovněž zaznamenávají změny tvaru bičíku. Metoda zavádí omezení, která pravděpodobně zabrání tomu, aby jednotlivé spermie ve vzorku nebo z několika vzorků samců vykazovaly vzájemné odchylky (Amann a Waberski 2014).

K měření pohyblivosti spermií byl použit analyzátor CASA a mikroskop Olympus BX40 se 100násobným zvětšením a vyhřívaným stolcem nastaveným na 37 °C. V různých experimentech byly hodnoceny tyto proměnné pohyblivosti: procento motility spermií (MS, %), procento progresivní motility (PS, %), rychlost v křivce (VCL, $\mu\text{m/s}$), rychlost v přímce (VSL, $\mu\text{m/s}$), průměrná dráhová rychlost (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearita spermií (LIN, jako míra křivočaré dráhy, VSL/VCL), přímočarost (STR, jako linearita průměrné dráhy, VSL/VAP), kolísání (WOB, míra oscilace skutečné dráhy kolem průměrné dráhy, VAP/VCL), amplituda bočního posunu hlavičky spermie (ALH, μm) a křížová frekvence rytmu (BCF, Hz) (Mortimer 1997). Rovněž bylo zaznamenáno množství spermií v jednom poli a typ pohybu vpřed (rychlý, pomalý a pohyblivý, ale neprogresivní) na základě celkového počtu pohyblivých spermií. Spermie s VCL $<75 \mu\text{m/sg}$ a STR $\geq 80 \%$ byly považovány za pomalu progresivní, zatímco spermie s VCL $\geq 75 \mu\text{m/sg}$ a STR $\geq 80 \%$ byly považovány za rychle progresivní (Palacín a kol. 2013).

3.2.2.2 Průtoková cytometrie

Při analýze spermií průtoková cytometrie postupně nahradila časově náročné metody náchylné k chybám. Je příslibem pro nové metody analýzy kvality spermií, jejichž cílem je integrace různých testů s cílem získat hlubší porozumění funkčnosti spermií díky její schopnosti analyzovat více vlastností spermií současně (Petrunkina a kol. 2007). Zlepšení hardwaru, fluorescenčních sond a metod značení navíc vedlo ke zvýšení citlivosti (Martínez-Pastor a kol. 2010).

Průtokové cytometry mohou být zařazeny do vysoce výkonných postupů, protože mohou analyzovat tisíce buněk během několika sekund a zaznamenávat četné charakteristiky každé z nich. Jiné metody jen stěží dosahují jejich opakovatelnosti (typická analýza 10 000 spermií vede k 95% C. I. 1 %). Během vyšetřování průtokovou cytometrií jsou označené spermie hnány laminárním prouděním a posílány po jedné přes buňku, kde jsou osvětleny jedním nebo více lasery, aby mohly být vyšetřeny. Zrcadla a filtry zaostřují rozptýlené nebo emitované světlo,

než se dostane do několika fotodetektorů, kde se signály zesílí. Údaje se pak digitalizují a poskytují výzkumníkovi v různých jednotkách intenzity fluorescence. Data se ukládají do běžných souborů flow Cytometry Standard (FCS) (Lo a kol. 2008). To umožňuje později extrahovat a analyzovat data z každého detektoru pro každou spermii. Po manuální klasifikaci typické analýzy spermií obvykle zobrazují několik populací. Přesto s ohledem na obrovské objemy dat, které mohou být generovány, navrholo několik autorů použití sofistikovaných statistických metod k využití výhod průtokové cytometrie (Martínez-Pastor a kol. 2010).

Průtoková cytometrie je metoda měření jednotlivých buněk, které v suspenzi postupně proudí kolem snímacího bodu. Průtokový cytometr je ideální pro hodnocení heterogenních populací, jako jsou spermie, protože dokáže během několika minut shromáždit údaje o všech subpopulacích ve vzorku. Když byla průtoková cytometrie použita ke stanovení obsahu DNA ve spermiích, byl tento postup nejprve přizpůsoben hodnocení spermií (Evanson a kol. 1980). Vyšetření vlastností, jako je životaschopnost buněk, akrozomální integrita, mitochondriální funkce, stav kapacity, fluidita membrán a stav DNA ve spermatu, se nyní provádí pomocí průtokové cytometrie. Pro průtokovou cytometrickou analýzu spermií může být přínosem pokračující vývoj nových fluorescenčních barviv a metod (Gillan a kol. 2005).

3.2.2.2.1 Životaschopnost a akrozomální stav

Nejpoužívanějšími barvivy na životaschopnost jsou membránově nepropustné sondy propidium jodid (PI) a ethidium homodimer (EH). Jejich použití je rychlé, jednoduché a lze je aktivovat laserem o vlnové délce 488 nm, který se nachází ve většině cytometrů. Tato barviva vstupují do buněk přes poškozenou buněčnou membránu a při navázání na nukleové kyseliny vykazují červenou fluorescenci (PI: 636 nm; EH: 617 nm) (Gillan a kol. 2005). Ostatní sondy životaschopnosti při vstupu do metabolicky aktivních buněk svítí zeleně (např. karboxyfluorescein diacetát) (Garner a kol. 1986). Pravděpodobně nejpoužívanější kombinací je kombinace PI a sondy vázající nukleové kyseliny SYBR-14. Všechny hlavičky spermií se barví zeleně barvivem SYBR-14, které propouští membránu. Fluorescence SYBR-14 je vytěsněna nebo potlačena, když PI pronikne do spermií s porušenou membránou (Martínez-Pastor a kol. 2010). Několik autorů navrholo 7-amino-aktinomycin-D (7-AAD) jako marker životaschopnosti, protože jeho emisní maximum je při 647 nm (červená barva), čímž se zamezí interferenci se zelenými nebo oranžovými barvivy (spektrální překryv) (Perticarari a kol. 2007). V jedné práci bylo k rozlišení životaschopných a neživotaschopných spermií použito kyaninové barvivo TO-PRO®-3 (stimulované 635-nm He-Ne laserem) (Domínguez-Rebolledo a kol. 2010). Fixovatelná životaschopná barviva jsou nově dostupnou volbou (Perfetto a kol. 2006). Fixovatelná barviva jsou po fixaci zachována, což umožňuje odložit analýzu. Použití analýzy životaschopnosti ve spojení s metodami vyžadujícími propustnost má další výhodu (což může způsobit ztrátu jiných barviv životaschopnosti) (Martínez-Pastor a kol. 2010).

Akrozomální stav byl stanoven s využitím sond, které detekují cíle uvnitř akrozomu, a označují tak spermie s poškozenými nebo reagujícími akrozomy. Spermie, které byly označeny lektinem nebo protilátkou, mohou být fixovány, což v případě potřeby umožní pozdější vyšetření. Akrozomální sondy jsou obvykle kombinovány s barvivy PI nebo EH a konjugovány se zeleným fluorochromem fluorescein isothiokyanátem (FITC) (Martínez-

Pastor a kol. 2010). V současné době jsou k dispozici i ve spojení s fluorochromy emitujícími různé vlnové délky. Bylo například navrženo použití PNA konjugovaného s oranžovým fluorochromem fykoerytrinem (PE-PNA), který zapadl mezi zelený SYBR-14 a červený PI, a úspěšně se podařilo použít PNA konjugovaný s oranžovým fluorochromem tetrametylrhodamin isothiokyanátem (TRITC), a to v trojím barvení s YO-PRO®-1 a MitoTracker® Deep Red FM (Domínguez-Rebolledo a kol. 2010).

3.2.2.2.2 Hodnocení stavu kapacity spermií

Důležitým faktorem úspěšného oplodnění je kapacitace spermií (Martínez-Pastor a kol. 2010). Pomocí fluorescenčního antibiotika chlortetracyklinu (CTC) byl hodnocen stav kapacity prostřednictvím změn způsobených vápníkem. Buněčnou membránou spermie prochází neutrální a nekomplexované CTC, která se poté přesouvá do nitrobuněčných kompartmentů obsahujících volný vápník (Tsien 1989). Když se CTC dostane do těchto kompartmentů, získá záporný náboj, váže vápník a zesiluje své světelné vlastnosti. Komplex CTC a vápníku se přednostně se váže na hydrofobní oblasti, jako je buněčná membrána a vytváří barevné vzory, které jsou specifické pro nekapacitované (F-), kapacitované (B-) a akrozomálně reagující (AR-vzor) spermie (Gillan a kol. 2005).

3.2.2.3 Test hypoosmotického bobtnání (HOST)

Analýzy spermatu kozlů jsou založeny na technikách používaných u jiných domácích druhů. V případě testu hypoosmotického bobtnání (HOST), který se používá k potvrzení integrity membrány spermií, je proto důležité testovat a přizpůsobit techniku zvláštnostem kozího spermatu (Cabrita a kol. 1999). Biochemicky aktivní spermie zvětšují svůj objem, když jsou vystaveny hypoosmotickým roztokům, aby bylo dosaženo rovnováhy mezi tekutinovým kompartmentem uvnitř spermie a vnějším prostředím. Mikroskop s fázovým kontrastem lze použít k posouzení toho, jak bobtnání mění velikost a tvar buněk. Bičík je v důsledku tohoto procesu bobtnání nucen svinout se dovnitř membrány, což vede k podpoře kulovitého rozšíření buněčné membrány pokrývající ocásek (Fonseca a kol. 2018).

3.2.2.4 Tepelný test přežitelnosti

Za účelem vyhodnocení životnosti pohyblivosti jako podmínky pro přijetí zmrazeného spermatu k použití v terénu byl proveden tepelný test přežitelnosti inkubací zmrazeného rozmrazeného spermatu ve vodní lázni při 37 °C po dobu 3 hodin (Aboagla a kol. 2003). Zmrazené rozmrazené spermie byly inkubovány ve vodní lázni při 37 °C buď ihned po rozmrazení, nebo po promytí v ředidle na bázi Tris (TCG) odstředěním při 1 600 × g po dobu 5 minut při 30 °C. Po 1, 2 a 3 hodinách inkubace byly vzorky spermií z každého ošetření vyhodnoceny za účelem zjištění pohyblivosti a progresivní motility (Aboagla a kol. 2011).

3.3 Umělá inseminace (AI)

Odvětví malých přežvýkavců se změnilo díky umělému oplodnění, které umožnilo zlepšit genetiku, lépe zvládat pohlavně přenosné choroby a reprodukci, šířit cenné genetické informace a zachovat genetiku vzácných plemen (Cseh a kol. 2012). Klíčovým nástrojem v produkčních

systémech je časovaná umělá inseminace (TAI), která snižuje náklady na pracovní sílu spojenou s identifikací říje, což má přímý dopad na nákladovou efektivitu. Hormonální léčba však musí zaručit přijatelnou míru březosti a být finančně rentabilní, aby TAI byla komerčně výhodná (Menchaca a Rubianes 2004).

Při umělém oplodnění (AI), což je druh technologie asistované reprodukce, se do samičího reprodukčního kanálu pomocí nástrojů vstříkne dávka spermatu (Alvares a kol. 2015). V závislosti na zvolené možnosti uložení spermatu existuje mnoho druhů přístupů k umělé oplodnění. S čerstvým spermatem je možné dosáhnout dobré míry otěhotnění (50–70 %) při vaginální (pericervikální depozice spermatu), cervikální (intracervikální depozice spermatu) nebo intrauterinní (laparoskopická technika) aplikaci (Faigl a kol. 2012).

Laparoskopické nebo transcervikální intrauterinní inseminace jsou však jedinými způsoby, jak dosáhnout přijatelného počtu těhotenství při použití zmrazeného spermatu (Taqueda a kol. 2011; Cseh a kol. 2012; Kumar a Naqvi 2014). Taqueda a kol. (2011) dosáhli 45,8 %, 25,7 % a 15,4 % březosti při použití intrauterinní, hluboké cervikální, resp. cervikální AI se zmrazeným spermatem. Jen malé procento zmrazených nebo rozmražených spermií může projít děložním hrdlem, protože kryokonzervace snižuje vitalitu a pohyblivost. Proto, aby se dosáhlo vysoké míry otěhotnění se zmrazeným spermatem, musí být sperma umístěno přímo do děložního lumenu, v místě oplodnění (Gillan a Maxwell, 1998; Kershaw a kol. 2005).

Umělé oplodnění koz je obvykle zcela srovnatelné s umělým oplodněním ovcí. Protože je však děložní čípek koz podstatně přístupnější než děložní čípek ovcí, je provedení nitroděložní inseminace přes děložní čípek u koz na rozdíl od ovcí podstatně jednodušší (Chemineau a kol. 1991; Shipley a kol. 2007).

3.3.1 Vaginální (percervikální) inseminace

Ve spojení s vaginální inseminací se používá sperma čerstvé nebo zmrazené. Bez snahy o dosažení děložního hrdla se sperma uloží do kraniální části pochvy (v nejnižším bodě/fundusu pochvy) (nepoužívá se vizuální kontrola). Při použití čerstvého nebo chlazeného spermatu může tento postup přinést nízký, ale stále přijatelný počet březostí. Je také velmi rychlý a jednoduchý na provedení v terénu. Míra březosti získaná při použití zmrazeného spermatu je nepřijatelná a odráží extrémně neefektivní využití spermatu. Navíc po farmaceutické synchronizaci říje jsou počty počtů podobně podprůměrné. Během přirozené reprodukční sezóny, po identifikaci říje, je tedy nejvhodnější používat intravaginální AI. Před ovulací nebo 12 až 18 hodin po začátku říje je nejlepší doba pro AI (Evans a Maxwell 1987). Objem spermatu by měl být 0,2 ml a podle doporučení by mělo být použito nejméně 400×10^6 progresivně pohyblivých spermií (Faigl a kol. 2012).

Intravaginální inseminace je účinná při použití přímo inseminovaného čerstvého spermatu, selhává však při použití chlazeného nebo zmrazeného spermatu. Samice by měly být inseminovány nejméně 12 hodin po prvním zaznamenání říje po zjištění přirozené říje (Nutti 2007).

3.3.2 Transcervikální (intracervikální) inseminace

Transcervikální inseminaci lze kombinovat s použitím čerstvého a chlazeného spermatu, přičemž po hormonální regulaci říje se dosahuje přiměřené míry zabřeznutí (40–80 %).

Transcervikální umělá inseminace (AI) je metodou volby u malých přežvýkavců, kdy se pomocí osvětlení lokalizuje nebo zviditelní zevní cervikální os a inseminační pipeta se poté zavede přes spekulum do děložního hrdla (jemně a do hloubky 5 až 12 mm) bez použití nadměrné síly (Chemineau a kol. 1991).

Nejvhodnější doba pro AI je 55 hodin po odstranění intravaginálních progesteronových vložek nebo 15 až 17 hodin po začátku detekovatelné říje (Salamon a Maxwell 2000). Pokud jsou nutné dvě inseminace, měly by být provedeny 50 a 60 hodin po odstranění vložky (Anel a kol. 2005; Paulenz a kol. 2005). Vzhledem k nízkým procentům zabřeznutí (25 až 35 %), kterých bylo dosaženo při cervikální AI, bylo použití zmrazeného spermatu nejprve omezeno. V důsledku snížené životaschopnosti zmrazených spermií se do místa oplození dostával nízký počet zdravých nebo neporušených spermií. V dnešní době však s rozvojem schopností cervikální AI počet březostí stoupá (Salamon a Maxwell 2000).

Potřebný inseminační objem je 0,2 ml a množství pohyblivých spermií min 200×10^6 (Faigl a kol. 2012).

3.3.3 Laparoskopická intrauterinní inseminace

Nejvýznamnějším pokrokem v oblasti umělého oplodnění malých přežvýkavců v posledních letech je bezpochyby inovace laparoskopické intrauterinní inseminace malých přežvýkavců (Shiplea a kol. 2007; Parkinson 2009). Složitá struktura děložního čípku ztěžuje průchod spermií děložním hrdlem a omezuje průchod inseminační pipety do kanálu děložního hrdla. Laparoskopická přímá děložní inseminace pomáhá překonat problém průchodu děložním hrdlem (Killeen a Moore 1970). Jelikož je pro každou inseminaci potřeba méně spermií a množství inseminovaných spermií je úměrně větší, lze použít vhodnější míry ředění, což vede k lepšímu uchování a ochraně spermií během kryokonzervace (Shiplea a kol. 2007; Parkinson 2009).

Pomocí laparoskopu je sperma zavedeno přímo do dělohy přes děložní stěnu. Je nutné použít lokální anestezii a sedativa. Čerstvé i zmrazené rozmražené sperma má vysokou míru plodnosti a zabřeznutí. Je možné použít menší počet spermií, obvykle 40 až 80 milionů spermií na jednu inseminaci (Sayre a Lewis 1997). Úspěšnost této metody se při správném provedení pohybuje kolem 60–75 %, avšak toto číslo se liší v závislosti na kvalitě spermatu, ročním období, zdravotním stavu malých přežvýkavců a zručnosti inseminátorů (Perkins a kol. 1996). Požadovaný inseminační objem a množství pohyblivých spermií je 0,05 ml a 20×10^6 (minimálně) spermií (Salamon a Maxwell 1995; Salamon a Maxwell 1995; Perkins a kol. 1996; Parkinson 2009). Průměrný ejakulát může při správném naředění inseminovat až 50 bahnic a zkušený tým může být schopen inseminovat 250–300 bahnic za jediný den (Cseh a kol. 2012).

Nevýhodou je nutnost použití moderního laparoskopického vybavení, provedení invazivního chirurgického zákroku a potřeba větší technické zručnosti pro provedení zákroku. Do střední části každého děložního rohu by měla být vstříknuta polovina celého množství spermatu bez ohledu na to, kde došlo k ovulaci (Killeen a Caffery 1982; Evans a Maxwell 1987).

3.3.4 Transcervikální intrauterinní inseminace

Použití technologie inseminace je značně omezeno neexistencí nechirurgických metod pro ovce. Přestože přímý přenos spermatu pomocí laparoskopického přístupu vedl k uspokojivému počtu březostí, má řadu nevýhod. Mezi další metody patří Guelphův přístup transcervikální inseminace, který byl vyvinut a upraven tak, aby umožnil hluboké a bezbolestné umístění spermatu do děložních rohů (Buckrell a kol. 1994; Wulster-Radcliffe a Lewis 2002; Wulster-Radcliffe a kol. 2004; Sohnrey a Holtz 2005). Postup zavádění inseminačního katétru do děložního hrdla je však spojen se snížením počtu březostí a jehňat. Podle některých teorií může katetrizace aktivovat dráhy, které mohou předčasně ukončit březost tím, že způsobí poškození děložního hrdla a vaginální/děložní stimulaci (Parkinson 2009). Perry a kol. (2010) zjistili, že aplikace hyaluronanu intracervikálně 52 hodin po odstranění houby zlepšila cervikální relaxaci, zvýšila cervikální penetraci a podpořila transcervikální inseminaci u ovcí. Pokud by se sperma mohlo uložit pouze do jednoho děložního rohu, bylo by možné transcervikální inseminaci provést ještě snadněji.

Potřebný inseminační objem a minimální počet pohyblivých spermií je 0,2–0,5 ml a $100\text{--}200 \times 10^6$ (Faigl a kol. 2011). Až u 75–85 % bahnic může být děložní hrdlo překonáno kvalifikovanými odborníky; u jehniček však tento zákrok úspěšně provést nelze. Tento přístup je spojen s nízkou mírou březostí, poškozením děložního hrdla, abscesy a infekcemi. Ve srovnání s laparoskopickou inseminací je míra zabřeznutí často nižší (čerstvé sperma: 40–80 %; mražené sperma: 30–70 %) (Cseh a kol 2012).

3.4 Konzervace spermatu

Spermie podléhají ultrastrukturálnímu, biochemickému a funkčnímu poškození v důsledku skladování, zejména pokud jsou zmrazeny, což snižuje jejich pohyblivost, životaschopnost, schopnost transportu a plodnost. Tyto otázky byly předmětem rozsáhlého zkoumání, přesto je plodnost konzervovaného spermatu obvykle nižší než plodnost čerstvého spermatu (Roy 1957).

Navzdory schopnosti prodloužit funkční životnost spermií, nízké teploty vystavují gamety neobvyklému stresu (Salamon a Maxwell 2000; Stornelli a kol. 2005), což snižuje jejich funkčnost a životaschopnost (Salamon a Maxwell, 1995; Watson, 2000) a schopnost oplodnění (Milczewski a kol. 2000; Watson 2000). Aby se tyto negativní důsledky kryokonzervace snížily, musí se do prodlužovacího média přidávat kryoprotektanty (Salamon a Maxwell 2000).

Zvláštním problémem při konzervaci kozího spermatu byl nepříznivý vliv semenné plazmy na životaschopnost spermií v ředidlech obsahujících vaječný žloutek nebo v mléčných médiích (Roy 1957). Enzym známý jako vaječný žloutkový koagulační enzym (EYCE) ze sekretu bulbouretrální žlázy (BUS) v semenné plazmě byl označován za původce problému s ředidly vaječného žloutku (Iritani a kol. 1961). Příčinou sníženého přežívání spermií po skladování v ředidlech mléka je proteinová složka rovněž z kozího BUS (pojmenovaná SBUIII), která interaguje s mléčnými složkami v ředidle a silně ovlivňuje pohyblivost kozlích spermií. Složka bulbourethralu, která je za tento důsledek zodpovědná, byla nedávno purifikována, charakterizována a identifikována jako tricylglycerolová lipáza (Pellicer 1995).

3.4.1 Krátkodobá konzervace

Hlavním způsobem, jak uchovat zředěné sperma v tekutém stavu, je skladovat je při nízkých teplotách kolem +5 °C. Vzhledem k malému objemu ejakulátu je při přímé inseminaci náročné řídit množství spermatu, proto se při většině postupů umělé inseminace u bahnic a ovcí používá čerstvé sperma, které bylo prodlouženo přidáním jednoduchých ředidel (Flaigl a kol. 2012). Na počátku 60. let 20. století se pro ředění spermatu beranů běžně používal glukóza-citrát-vaječný žloutek. V současné době se pro běžné použití spermatu beranů doporučují ředidla na bázi Tris (Tris-glukóza-vaječný žloutek, Tris-citrát-fruktóza-vaječný žloutek) (Salamon a Maxwell 2000). Mléko lze rovněž použít jako základní složku roztahovače, musí však být tepelně upraveno, aby se zničila spermicidní bílkovina „lactenin“ (přednostně se používá odstředěné nebo ultra-high temperature (UHT) ošetřené mléko). Během posledních desetiletí vzrostl zájem o vývoj chemicky lépe definovaných prodlužovačů spermatu (CDE), zejména ředidel bez chemických látek živočišného původu. Těmito studiemi se podařilo dosáhnout dvou cílů: zvýšení biologické bezpečnosti spermatu a zlepšení uniformity zpracování spermatu (Moustacasa a kol. 2011). Podle Rodriguez-Irazoqui a kol. (2003) se Bioxell (který neobsahuje žádné přísady živočišného původu) jeví jako alternativa k tradičnímu mléčně-žloutkovému ředidlu pro zmrazení spermatu beranů a nabízí srovnatelné výsledky reprodukce po cervikální umělé inseminace (AI) za extenzivních podmínek managementu.

Po zředění se teplota spermatu postupně snižuje z teploty odběru (+32 °C) na teplotu skladování (+15 °C nebo +5 °C) (Maxwell a Salamon 1993). Cílem poklesu teploty je zpomalit základní metabolismus organismu a prodloužit dobu, po kterou spermie žijí od ejakulace do AI. Je třeba se vyhnout náhlým změnám teploty chladicí směsi a zředěného spermatu. Spermie uchovávané v kapalně formě mají krátkou životnost, což ztěžuje jejich přepravu na velké vzdálenosti a znemožňuje dlouhodobé uchovávání. Přesto lze oplodnit velké množství samic pouze malým množstvím spermií, náklady na skladování jsou nízké a sperma lze snadno použít v terénu (Flaigl a kol. 2012). Sperma, které bylo naředěno, by mělo být použito do 8 až 10 hodin od odběru, protože během skladování se jeho plodnost rychle snižuje. Snížená pohyblivost a morfologická integrita spermií je příčinou poklesu plodnosti, ke kterému dochází rychlostí 10-35 % každý den skladování (Salamon a Maxwell 2000). Motilita a morfologická integrita spermií se snižuje, což má za následek snížení plodnosti. Výše uvedené procesy vedou ke zhoršení transportu a přežívání spermií v samičím pohlavním ústrojí a ke snížení plodnosti. Podobně jako skladování ve zmrazeném stavu může skladování v tekutém stavu urychlit zrání membrán spermií, což vede k vyššímu procentu buněk, které jsou kapacitní a mají akrozomální reakci. Tyto buňky mají sníženou vitalitu a omezenou schopnost oplození po AI. Poruchy raného embryonálního vývoje byly u několika druhů spojeny s oplozením vyvolaným stárnoucími spermii (Parkinson 2009).

Do tekutého skladovaného spermatu lze přidat antioxidanty, které prodlouží jeho užitečnou dobu skladování a následně zvýší jeho reprodukční potenciál. Pomoci může také dobře načasovaná inseminace a výběr techniky (Maxwell a Watson 1996). Podle údajů, které byly nedávno zjištěny, má sperma beranů zchlazené na 15 °C a skladované při této teplotě kratší životnost než sperma zchlazené na 5 °C. Ve srovnání se skladováním při 15 °C si skladování při 5 °C zachovalo uspokojivou pohyblivost a životaschopnost po dobu až 72 hodin (O'Hara a kol. 2010). Aby bylo dosaženo uspokojivého počtu březostí, musí být cervikální inseminace

provedena do 24 hodin po odběru spermatu. Za určitých okolností však lze sperma beranů uchovávané při teplotě 5 °C použít k cervikální inseminaci i 3 dny po odběru (Cseh a kol. 2012).

3.4.2 Dlouhodobá konzervace

Bernstein a Petropavlovskij provedli první studie zmrazení ovčích spermií v roce 1937. Při svých pokusech použili ke zmrazení spermatu při teplotě -21 °C propustné kryoprotektanty obsahující 9,2 % glycerolu (Salamon a Maxwell 2000). V 50. letech 20. století byly zpočátku prováděny studie účinků glycerolu na kozí sperma (Smith a Polge 1950). Další významnou změnou v kryokonzervaci spermatu v průběhu 50. let 20. století bylo nahrazení suchého ledu (-79 °C) tekutým dusíkem (-196 °C). Při teplotě -196 °C lze životaschopnost spermií udržet po neomezenou dobu. Ačkoli metabolická aktivita spermií při -79 °C zcela nepřestává, poškozuje to jejich plodnost (Foote 2010). Od té doby se mnoho výzkumů zaměřilo na výběr nejlepších kryoprotektantů a zdokonalení postupů zmrazování a rozmrazování ve snaze zmírnit účinky kryoinvaze na savčí spermie. Nicméně i přes tyto objevy může zmrazení a rozmrazení způsobit ztrátu životaschopnosti až 50 % spermií (Watson 2000). U ovcí je po rozmrazení stále pohyblivých 40–60 % spermií berana. Pouze 20–30 % z nich je však biologicky využitelných (Medeiros a kol. 2000). Je zajímavé, že vliv zmrazení na kozí spermie může být účinnější než na spermie beranů (Foote 2002).

Vzhledem k tomu, že veškerá metabolická aktivita je ve zmrazeném stavu zcela potlačena, kryokonzervace výrazně prodlužuje dobu, po kterou lze savčí spermie uchovávat *in vitro*. Spermie beranů si podle Salamon a kol. stále zachovávají schopnost oplodnění *in vivo* pomocí intrauterinní umělé inseminaci i po 35 letech kryokonzervace (Salamon a kol. 2004)

3.4.2.1 Postup kryokonzervace

Po vyhodnocení kvality spermatu lze ovčí sperma ředit přímo s použitím mrazicích roztavných prostředků na bázi tris, fruktózy nebo glukózy, kyseliny citronové, glycerolu, antibiotik a vaječného žloutku. Aby se při tomto vyšetřování zabránilo „efektu ředění“, měl by se proces ředění provádět pečlivě. Míra ředění se v dřívějších výzkumech pohybovala od 11 do 26násobku (Evans a Maxwell 1987). Přesto se podle doplňkových složek v mrazicích nástavcích běžně schvaluje pro mražení ovčího spermatu dvou až pětinašobná míra ředění (Salamon a Maxwell 2000; Evans a Maxwell 1987). Při dvoustupňovém postupu se k prvnímu zředění ovčího spermatu použijí mrazicí rozšiřující přípravky bez glycerolu. Poté se k dalšímu prodloužení zředěného spermatu použijí mrazicí rozšiřující prostředky obsahující glycerol. Naproti tomu při použití jedностupňového postupu se sperma ředí ihned pomocí mrazicích ředidech s obsahem glycerolu, a to před vyrovnáním při nízké teplotě. Typické rozmezí koncentrací je 4–6 % (Salamon a Maxwell 2000).

V závislosti na použité rychlosti chlazení je třeba ovčí sperma postupně chladit na 5 °C po dobu minimálně 1,5–2 hodin (Cseh a kol. 2012; Shipley a kol. 2007; Faigl a kol. 2012). Poté se studené sperma dále stabilizuje po dobu 2–4 hodin při této teplotě. Během ekvibrace se spermie musí přizpůsobit nižšímu metabolismu. Kromě toho proces ekvibrace způsobuje vstup kryoprotektantů do buněk (hlavně glycerolu), což vede k rovnovážnému stavu mezi intracelulární a extracelulární koncentrací glycerolu nebo jiných osmoticky aktivních látek (Evans a Maxwell 1987).

Po ekvilibraci je možné předmrazení zředěného spermatu ve formě pejet (0,1–0,2 ml) po dobu 3–4 minut na povrchu suchého ledu ($-79\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Faigl a kol. 2012). Typická pejeta, která je snadno dostupná v obchodech, má délku 130 mm, průměr 2,6 mm, šířku 1,9 mm a tloušťku stěny 0,35 mm. Je vyrobeno z polypropylenu nebo polyvinylchloridu (Sansiřena a kol. 2012). Ke zmrazení zchlazeného spermatu v pejetách lze také použít chlazený stojan nebo automatický mrazák s rychlostí zmrazování $-8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Pejety se často předmrazují 7–10 minut v parách kapalného dusíku (mezi $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$), pokud se používá chlazený stojan (4–6 cm nad povrchem kapalného dusíku). Sperma se nakonec ihned ponoří do kapalného dusíku (Faigl a kol. 2012). Obvykle se pejety rozmrazují ve vodní lázni o teplotě $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30–60 sekund. Spermatické pejety však lze rozmrazovat buď v ohřátém rozmrazovacím roztoku (mokré rozmrazování), nebo v suchých skleněných zkumavkách (suché rozmrazování) (Shipley a kol. 2007; Chemineau 1991).

Kromě odstranění nepříznivých účinků vyvolaných semennou plazmou jsou ostatní operace podobné kryokonzervaci ovčího spermatu. Přijatelné plodnosti lze dosáhnout se zmrazenými kozími spermii s koncentrací spermií mezi $80\text{--}500 \times 10^6$ buňkami/ml (Ritar a kol. 1990; Karatzas a kol. 1997; Purdy 2006).



Obrázek 3: Plnič pejet
zdroj: (Kos a kol. 2019)

3.4.2.2 Osmolalita

Kozí spermie mohou přežít kryokonzervaci a jsou stále životaschopné v různých médiích. Kryokonzervační médium může obsahovat širokou škálu cukrů, solí a pufců v různých molárních koncentracích, aniž by došlo k poškození spermií. Kozí spermie dávají při kryokonzervaci přednost hyperosmotickému médiu, i když osmolalita média se může v určitých mezích měnit (Pudry 2006). Salamon a Ritar (1982) pozorovali, že ideální tonicita média pro kozí spermie obsahujícího tris-glukosu a kyselinu citronovou je 948 kPa (540 mOsm). Porovnáním směsí pufru Tris a cukrů v různých osmotických koncentracích, které se pohybovaly v rozmezí 737 až 1112 kPa, byl učiněn závěr, že se jedná o optimální tonicitu pro toto médium (Salamon and Ritar 1982). Bowen a kol. (1988) uvedl, že při zmrazení kozích spermií v ředidlech s osmolalitou mezi 425 a 525 mOsm došlo k menšímu poškození než u médií s osmolalitou 325 nebo 625 mOsm.

3.4.2.3 pH

Výrazné změny pH spermatu mohou spermie poškodit nebo je dokonce usmrtit. Proto je pro zachování životaschopnosti a oplozovací schopnosti spermií zásadní udržovat správné prostředí řízením změn pH v kryokonzervační tekutině. Seminální plazma má několik funkcí, z nichž jednou je ochrana spermatických buněk před změnami pH, k čemuž však má docházet *in vivo*, a nikoli v podmínkách *in vitro*, k nimž dochází při kryokonzervaci (Mann 1954). Aby se snížily změny, obsahují kryokonzervační média často chemické látky, které pufrují výkyvy pH. U médií pro kozí spermie by měl mít pufrovací roztok obvykle tyto vlastnosti: pKa 7,0 (rozmezí pH 6,0-8,0), být rozpustný ve vodě a nepropustný pro membrány, mít minimální interakce se solemi, být minimálně ovlivněn koncentrací pufru, teplotou a obsahem iontů na disociaci pufru, mít komplexotvorné vlastnosti pro kovy a být schopen odolávat enzymatické a neenzymatické degradaci (Graham a kol. 1972).

Ačkoli účinky pH na kozí spermie byly podrobně studovány, zprávy o pH kryokonzervačních médií se uvádějí jen zřídka. Roztoky pro ředění kozích spermií na bázi vaječného žloutku nebo mléka by však obvykle měly mít pH mezi 6,75 a 6,8 (Chauhan a kol. 1994). Fukuhara a Nishikawa (1973) zjistili, že pH ředidla je rozhodující pro zvýšení respirace a pohyblivosti kozích spermií. K maximálnímu příjmu kyslíku kozími spermii dochází mezi pH 7,2 a 7,5 a k nejlepší pohyblivosti spermatických buněk dochází mezi pH 7,0 a 7,2, což naznačuje, že pH 7,2 je ideální pH média pro přežití kozích spermií *in vitro*.

3.4.3 Kryoprotektory

Aby se snížil fyzikální a chemický stres, který způsobuje chlazení, zmrazování a rozmrazování spermatických buněk, přidává se kryoprotektant do kryokonzervačního média. Existují dva typy kryoprotektantů: penetrující a nepenetrující. Pronikající kryoprotektant je propustný pro membránu a působí jak intra-, tak extracelulárně. Pronikající kryoprotektanty jsou rozpuštěné látky, které prostřednictvím osmoticky řízeného toku vody, který se liší v závislosti na molekule, dehydratují spermie. Kryoprotektant a voda se během krátké doby vyrovnají a výsledkem jsou stejná intracelulární a extracelulární množství (Amann 1999). Méně intracelulární vody znamená, že bod mrznutí spermatické buňky je nižší a bude se tvořit méně intracelulárního ledu, což je výhodné, protože intracelulární led způsobuje odumírání buněk a snižuje plodnost vzorku spermatu. Pronikající kryoprotektanty také mění složení lipidů a proteinů v membráně, čímž zvyšují tekutost membrány, způsobují větší dehydrataci při nižších teplotách a zlepšují schopnost přežít kryokonzervaci (Holt 2000). Pronikající kryoprotektanty, které jsou také známé jako rozpouštědla, rozpouštějí soli a cukry v kryokonzervačním médiu. Nepenetrující kryoprotektant nemůže proniknout plazmatickou membránou spermie, a proto působí pouze extracelulárně. V důsledku toho může nepenetrující kryoprotektant změnit plazmatickou membránu buňky nebo působit jako rozpouštědlo a snížit teplotu mrznutí média (Purdy 2006).

3.4.3.1 Kryoprotektivní látky obsažené v komerčních ředidlech

Mezi funkce kryokonzervačního ředidla patří poskytovat spermatickým buňkám zdroje energie, chránit je před poškozením způsobeným teplotou a udržovat prostředí, které spermii

umožní po určitou dobu přežít. Proto byla každá z mnoha složek média zkoumána samostatně i v kombinaci s cílem maximalizovat životaschopnost a plodnost spermií po rozmrazení. Médium pro kryokonzervaci kozích spermií obvykle obsahuje penetrující kryoprotektant (ethylenglykol, glycerol nebo dimethylsulfoxid), nepenetrující kryoprotektant (vaječný žloutek nebo mléko), pufr (Tris nebo Test), jeden nebo více cukrů (laktózu, rafinózu, glukózu, sacharózu nebo trehalózu), soli (citronan sodný, kyselina citronová) a antibiotika (penicilin, streptomycin) (Evans a Maxwell 1987).

Pro kryokonzervaci kozího spermatu se nejčastěji používá odtučněné sušené odstředěné mléko (Corteel 1974) nebo tris-glukóza (Salamon a Ritar 1982). Zkoumání těchto modifikací ředidel přineslo řadu výsledků (Blash a kol. 2000). Keskintepa a kol. (1998); Blash a kol. (2000) se v jejich výzkumech snažily odpovědět na aktuální otázky, zda existují vhodná média pro kryokonzervaci, zda spermie kozlů dávají přednost nějakému konkrétnímu médiu před ostatními a jaká by měla být ideální koncentrace složky. K řešení těchto problémů jsou uvedeny specifikace týkající se kryokonzervačního média pro kozí sperma (osmolalita, pH a pufr, cukry, kryoprotektanty), aby bylo možné pochopit jejich účinky na kozí sperma a následně určit jejich zařazení nebo vyloučení z ředícího roztoku.

3.4.3.2 Cukry

Protože semenná plazma obsahuje cukry, je smysluplné zařadit cukry do kryokonzervačního ředidla. Kozí sperma snadno využívá glukózu, fruktózu a laktózu a další cukry k dýchání a tyto cukry také zajišťují osmotickou rovnováhu a kryoprotekci, ale v čistém kozlím spermatu má fruktóza ze všech cukrů největší molární koncentraci (Aboagla a Terada 2003). V ředidlech spermatu je přítomna řada cukrů s širokým rozsahem osmolality (6–375 mM) (Evans a Maxwell 1987). Při rozhodování, který cukr použít jako ředidlo, lze zohlednit funkčnost chemické látky. Vzhledem k tomu, že fruktóza je hlavním palivem pro glykolýzu v kozlím semenné plazmě, zařazení tohoto cukru do média dává smysl (Pellicer-Rubio a kol. 1997). Podobně jako u jiných organismů je glukóza vynikajícím substrátem v metabolismu kozích spermií a je nezbytná pro dodávání energie, aby spermatické buňky mohly normálně fyziologicky fungovat (Corteel 1974).

Corteel (1974) zjistil, že odstranění semenné plazmy ze spermií koz zlepšuje jejich schopnost zmrazení v mléčném ředidle. Proto bylo nezbytné, aby tato kryokonzervační směs obsahovala glukózu, aby spermie měly snadno dostupný zdroj energie, což vede ke zvýšení pohyblivosti spermií (30 % pohyblivosti s glukózou ve srovnání s 10 % pohyblivosti bez glukózy; $P < 0,05$) po kryokonzervaci. Tyto výsledky jsou v souladu s Fukuhara a Nishikawa (1973), kteří vysvětlili funkci semenné plazmy, konkrétně její povinnost dodávat spermatickým buňkám energii a ochranu. Proto musí kryokonzervační médium splňovat stejné požadavky, zejména při použití spermatických buněk, které byly zbaveny semenné plazmy.

Až dosud se téma cukrů omezovalo na nízkomolekulární sloučeniny (fruktóza a glukóza), které mohou procházet plazmatickou membránou spermie. Přidání cukrů, jako je laktóza, sacharóza, rafinóza, trehalóza nebo dextransy, do ředícího činidla může mít různé dopady, protože nemohou difundovat přes plazmatickou membránu. V těchto situacích cukry vytvářejí osmotický tlak, který způsobuje dehydrataci buněk, a v důsledku toho snižuje pravděpodobnost tvorby intracelulárního ledu. Tyto cukry také interagují s fosfolipidy plazmatické membrány,

a to vede k tomu, že spermie jsou odolnější vůči procesu kryokonzervace (Aisen a kol. 2002). Na rozdíl od jednoduchých cukrů glukózy a fruktózy působí tyto disacharidy převážně jako kryoprotektanty. Trehalosa byla nedávno přidána do ředidel používaných ke zmrazování kozích spermií (Purdy 2006).

Bylo zjištěno, že trehalóza jako zázračný oligosacharid zlepšuje kvalitu zásobního spermatu po rozmrazení. Kryoprotektivní mechanismus trehalózy během kryokonzervace nicméně dosud nebyl zcela objasněn (Jia a kol. 2021). Někteří výzkumníci navíc předpokládali, že trehalóza má lepší kryoprotektivní účinky na spermie drobných přežvýkavců než jiné oligosacharidy, jako je sacharóza (Schulz a kol. 2017). Bylo uvedeno, že sacharóza i trehalóza mají podobnou schopnost zachovat pohyblivost zmrazených spermií beranů (Molinia a kol. 1994). Na rozdíl od glukózy nebo fruktózy nemůže trehalóza pronikat plazmatickou membránou. Trehalosa proto působí především jako extracelulární kryoprotektant (Quan a kol. 2012). V současné době se ke kryokonzervaci spermií beranů využívá trehalóza a dřívější výzkumy prokázaly, že trehalóza může zvýšit toleranci spermií beranů vůči kryopoškození (Akhtarshenas a kol. 2018).

Procesy, které stojí za schopností trehalosy chránit savčí spermie před zmrznutím, jsou zatím neznámé. Trehalosa má podstatně vyšší teplotu skelného přechodu (-30 °C) než jiné běžné kryoprotektanty, jako je ethylenglykol (-85 °C) a glycerol (-65 °C), které se rovněž používají ve stejných aplikacích (Pereira a Marques 2008). Trehalosa proto může napomáhat vzniku extracelulárnímu ultra rychlému zmrazování a snižovat tvorbu ledových krystalů. Za druhé, protože trehalosa je nepropustný disacharid, může zvýšit extracelulární osmotický tlak, dehydratovat buňky a zabránit tvorbě smrtícího intracelulárního ledu (Holt 2000). "Hypotéza o náhradě vody" uvádí, že trehalosa může prostřednictvím vodíkové vazby nahradit vodní obal makromolekul a zabránit kryopoškození, což je poškození způsobené procesem zmrazování a rozmrazování (Crowe a kol. 2001). Trehalóza může také restrukturalizovat plazmatickou membránu, spojit se s fosfolipidy v plazmatické membráně a zajistit přežití spermií při kryokonzervaci (Barbas a Mascarenhas 2009). Trehalózu lze také integrovat do plazmatických membrán a zabránit tak nadměrné dehydrataci spermií během kryokonzervace, čímž se minimalizuje fyzické poškození způsobené abnormálními výkyvy objemu buněk (Cseh a kol. 2012). Kryoprotektivní vlastnosti trehalosy mohou navíc souviset s její antioxidační aktivitou (Iqbal a kol. 2016).

3.4.3.3 Syntetická a přírodní antioxidanty

Pro optimální buněčnou činnost je nezbytná správná rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty. Tvorba oxidantů za různých stresových podmínek poškozuje buňky fyzikálně i funkčně (Aitkin 2020). Spermatické buňky mají ve srovnání s jinými buňkami výrazně nižší antioxidační kapacitu, což je činí náchylnějšími k oxidačnímu stresu (Nair a kol. 2006). Enzymy (superoxiddismutáza, kataláza a glutathionperoxidáza), nízkomolekulární antioxidanty (askorbát, alfa-tokoferol a beta-karoten), transferin, laktoferin a ceruloplasmin jsou jen některé z antioxidantů, které se nacházejí v seminální plazmě a spermiích (Aitkin 2020). Spermie jsou mimořádně citlivé na peroxidační procesy, protože během spermatogeneze dochází ke ztrátě značného procenta cytoplazmy a s ní spojených složek, včetně antioxidantů. Některé druhy spermií také obsahují značné množství polynenasycených mastných kyselin, které se rychle

oxidují a snižují plodnost spermií. Bylo prokázáno, že doplnění ředidla spermatu antioxidanty zajišťuje konstantní hladinu reaktivních druhů a snižuje reaktivitu volných radikálů, což by mohlo pomoci udržet kvalitu a funkčnost kryokonzervovaných spermií (Moretti a kol. 2012).

Bylo zjištěno, že pyruvát je užitečným antioxidantem pro konzervaci spermií beranů, zatímco butylovaný hydroxytoluen (BHT) zvýšil pohyblivost spermií po rozmrazení (Upreti a kol. 1998). Kromě toho četné výzkumy odhalily přinejmenším některé příznivé účinky vitamínu E (Kheradmand a kol. 2006), vitamínu B12 (Hamedani a kol. 2013), BHT (Watson a Anderson 1983), cysteinu a glycinu (Khalili a kol. 2010) na zmrazené spermie beranů. Při přidání mnoha antioxidantů do ředidel beraního spermatu bylo rovněž zaznamenáno zlepšení kvality spermatu zmrazených rozmražených spermií (Bucak a kol. 2007). Při kryokonzervaci spermií beranů v médiu na bázi sójového lecitinu doplněném o 4 % a 6 % rozmarýnového extraktu (*Rosmarinus officinalis* L.) byla zaznamenána větší pohyblivost spermií a menší tvorba malondialdehydu (Khodaei Motlagh a kol. 2014). Ochranný účinek silymarinu proti toxicitě bisfenolu A (BPA) na kvalitu spermií uvedl Purdy a kol. (2004) a prokázal, že flavonoidy, silibinin a katechin, zlepšují pohyblivost ředěného chlazeného kozího spermatu. Kvalita spermií beranů po rozmrazení byla podobně zlepšena silymarinem (Silva a kol. 2012). Nicméně přidání silymarinu a kvercetinu do kryokonzervačního média významně snížilo vitalitu spermií beranů, akrozomální integritu, obsah malondialdehydu a parametry CASA (Delfanipour 2015).

Etanolový extrakt ze semen fenyklu (*Foeniculum vulgare*) úspěšně zlepšil většinu kvalitativních parametrů spermatu beranů zpracovaného v ředidlech na bázi Tris, včetně řady vlastností CASA (Mohammadian 2017).

Antioxidanty hypotaurin a cysteamin po rozmrazení spermatu angorských koz zlepšily pohyblivost, morfologii a funkční integritu membrán spermií, přičemž neměly vliv na tvorbu ROS a zvyšovaly antioxidační kapacitu (Bucak a kol. 2009b). Pyridoxin zvýšil vitalitu a snížil parametry oxidačního stresu kryokonzervovaných spermií u západoafrických zakrslých koz, a to buď samostatně, nebo v určitých kombinacích s vitamínem E, vitamínem C nebo melatoninem (Daramola a kol. 2017).

3.4.3.4 Další kryoprotektivní látky se specifickou funkcí

Spermie kozlů byly testovány s řadou membránově propustných kryoprotektantů, včetně glycerolu, dimethylsulfoxidu, ethylenglykolu a propylenglykolu a jejich kombinacemi, ale nejběžněji používaným penetrujícím kryoprotektantem je glycerol (Purdy 2006). Přídavek glycerolu může být proveden v 1, 2 nebo 3 krocích při 37 °C nebo 5 °C (Salamon a Ritar, 1982). Konečná koncentrace penetračního kryoprotektantu v médiu se liší v závislosti na toxicitě chemické látky a také na tom, jak účinně chrání spermie. Glycerol, (Me₂SO) a ethylenglykol se obvykle používají v rozmezí 1–8 %, avšak glycerol se ukázal jako neúčinnější po rozmrazení spermií (Kundu a kol. 2000). S úspěšnými výsledky byly použity také směsi kryoprotektantů, jako je glycerol a Me₂SO (Purdy 2006). V porovnání se spermii zmrazenými s ethylenglykolem (13 %) nebo Me₂SO (21 %) bylo zjištěno, že použití samotného glycerolu (6 %) jako kryoprotektantu vede k vyššímu procentu pohyblivých spermií po kryokonzervaci (35 %). Při společném použití glycerolu (6 %) a Me₂SO (5,9 %) došlo k synergickému účinku kryoprotektantů (Kundu a kol. 2000). Při samostatném použití glycerolu a Me₂SO média byla

pohyblivost po rozmrazení 33 %, avšak při použití obou kryoprotektantů byla pohyblivost po rozmrazení 45 % progresivně pohyblivých spermií (Kundu a kol. 2001).

Nejčastěji používanými nepenetrujícími kryoprotektanty jsou odtučněné mléko (10 %) a vaječný žloutek (2–20 %). V poslední době bylo objeveno několik chemických látek, které jsou membránově nepropustné a mohly by být použity jako kryoprotektanty. (Purdy 2006). Pomocí spermií z ocasu nadvarlete a média bez vaječného žloutku a glycerolu prokázali, že aminokyseliny (l-prolin, l-alanin, glycin nebo lglutamin) lze použít jako kryoprotektiva v médiích pro kryokonzervaci kozích spermií a dosáhnout lepších výsledků po rozmrazení (8–14 % přímočaré pohyblivosti a 11–19 % celkové obnovy pohyblivosti, 100–150 mM) ve srovnání s kontrolní skupinou (0 % pohyblivých buněk s 0 mM aminokyselin). Když byly aminokyseliny spojeny s glycerolem a dimethylsulfoxidem, měly mnohem větší ochranný účinek, což vedlo k progresivní pohyblivosti po rozmrazení o 50–55 % (Kundu a kol. 2001). Ve stejném vaječném žloutku a bezglycerolovém médiu lze jako nepenetrující kryoprotektanty použít také dextrany (10–2000 kDa), které po rozmrazení poskytují 23 a 25 % celkové a progresivní pohyblivosti (Kundu a kol. 2002). Při kombinaci 6,27 mM 10 kDa dextranu s glycerolem (0,87 M) a dimethylsulfoxidem (0,76 M) a ve srovnání s kontrolou (22 % přímá pohyblivost a 25 % celková pohyblivost spermií) bylo pozorováno nejvyšší procento přímé (58 %) a celkové pohyblivosti spermií (60 %) (Purdy 2006). Vzhledem k jejich různým molekulovým hmotnostem se předpokládalo, že kombinace glycerolu, Me₂SO a dextranu bude mít během kryokonzervace příznivý účinek. Spermie budou dehydratovány a sníží se vývoj intracelulárního ledu, protože glycerol a Me₂SO jsou membránově propustné. Dextran má vzhledem ke své membránové nepropustnosti větší vliv mimo spermatickou buňku, nejspíše tím, že přeruší extracelulární tvorbu ledu (Kundu a kol. 2002).

Použití vaječného žloutku v přípravcích na prodloužení spermatu bylo kritizováno z několika důvodů, včetně: 1) Připravit standardní koncentrace žloutku v ředidle je téměř nemožné, protože koncentrace lipoproteinů ve žloutku se mění a je ovlivněna genetikou ptáka, počtem dní v produkci a podmínkami skladování vajec (Moussa a kol. 2002), 2) ve žloutku jsou přítomny také lipoproteiny o vysoké hustotě, které mohou do určité míry působit proti účinnosti LDL (Tonieto a kol. 2010), 3) ve žloutku je přítomen progesteron, který může urychlit kapacitaci spermií (Bencharif a kol. 2008), 4) inseminace naředěného spermatu by v případě znečištění žloutku zvýšila pravděpodobnost kontaminace samice (Gil a kol. 2000), 5) některé složky žloutku zvyšují viskozitu ředidla, což snižuje pohyblivost a životnost spermií tím, že brání buněčnému dýchání (Aires a kol. 2003), 6) ve zředěném spermatu brání určité složky žloutku hodnocení spermií, zejména pomocí CASA (Vera-Munoz a kol. 2009), 7) nižší procento nepoškozených akrozomů souvisí se zvýšeným obsahem žloutku v ředidle (Fukui a kol. 2007), 8) jak již bylo uvedeno, ředění kozího spermatu ředidlem obsahujícím vaječný žloutek může být pro spermatické buňky škodlivé (Zamiri 2020).

Příznivé účinky se připisují obsahu lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) ve vaječném žloutku; úloha (úlohy) žloutkových bílkovin a lipidů, pokud vůbec nějaká, v tomto procesu však nebyla objasněna. Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) ve vajíčku zvýšily odolnost spermií beranů vůči chladovému šoku (Tonieto a kol. 2010). Navázáním na bílkoviny spermatické plazmy lipoproteiny o nízké hustotě brání fosfolipidům a cholesterolu opustit membránu spermie. Lipidy obsažené v LDL navíc vytvářejí fyzickou bariéru, která chrání membránu před chladovým šokem (Bergeron a Manjunath 2006). Membránové fosfolipidy, které se během

procesu zmrazování a rozmrazování neustále ztrácejí a jsou nahrazeny fosfatidylcholinem a fosfatidylserinem obsaženými v LDL (Graham a Foote 1987).

Sérový albumin, LDL a sójový lecitin byly mezi navrhovanými náhradami, které měly překonat nevýhody vaječného žloutku (Zamiri 2020). V ředidlech pro berany byl místo vaječného žloutku použit hovězí sérový albumin (Fukui a kol. 2007). Podle Fukui a kol. (2007) nebyly při doplňování spermatu beranů v ředidlech obsahujících 10 % hovězího sérového albuminu nebo 20 % vaječného žloutku zaznamenány žádné významné rozdíly v míře březosti a počtu jehňat. Navíc vaječný žloutek i albumin mohou obsahovat mikrobiální kontaminaci, protože jsou oba živočišnými produkty (Zamiri 2020).

Podle publikovaných zjištění byl LDL při použití jako ředidla spermatu kozlů a beranů přinejmenším stejně účinný jako vaječný žloutek nebo dokonce lepší (Tonieto a kol. 2010; Ali Al-Ahmad a kol. 2008). Přípravky LDL mají bohužel omezenou kapacitu pro skladování a postupy extrakce a purifikace LDL jsou složité a časově náročné, což vyžaduje nepřetržitou extrakci (Zamiri 2020).

Lecitin tvoří přibližně 10 % fosfolipidů žloutku a vzhledem ke strukturální podobnosti mezi fosfolipidy vaječného žloutku a sóji byla sója navržena jako potenciální náhrada vaječného žloutku v sérových ředidlech, čímž se snižuje riziko kontaminace z živočišných produktů (Fukui a kol. 2008). Ve většině studií sójový lecitin zlepšil alespoň některé vlastnosti spermií více než vaječný žloutek (kde se koncentrace sójového lecitinu pohybovala od 0,4 % do 1 %) (Zamiri 2020). Podle Chelucciho a kol. (2015) zmrazení spermatu kozla Sarda při 1 % lecitinu v Tris ředidlu poskytlo nejvíce životaschopných, poměrně rychle a progresivně pohyblivých spermií a výsledky integrity DNA po rozmrazení. Vyšší míra oplození ve srovnání s komerčním ředidlem a ředidlem obsahujícím vaječný žloutek byla důkazem, že Tris-lecithin lépe zachoval funkčnost spermií během testu oplození in vitro. U kryokonzervovaných spermií koz Chongming White měla ředidla na bázi tris doplněná o 20 % vaječného žloutku nebo 2 % sójového lecitinu srovnatelné výsledky (Sun a kol. 2020).

Navzdory úspěchu při používání vaječného žloutku a mléka jako složky semenných ředidel však mohou existovat problémy s možným přenosem patogenů, což by mohlo vést k omezení vývozu spermatu (Moreira 2017). Vzhledem k výše uvedenému se zvyšuje hledání ředidla, které snižuje možnost kontaminace živočišnými patogeny (Reis a kol. 2023). Kokosová voda byla s dobrými výsledky použita jako semenný ředidlo a získala si větší oblibu mezi biotechnologiemi (Del Valle a kol. 2013). Kromě toho, že se kokosová voda skládá z vody, sacharidů, bílkovin, solí a vitaminů, je také levná a snadno se připravuje (Macedo a kol. 2008). Studie s použitím kokosové vody navíc již prokázaly zlepšení integrity a životaschopnosti spermatických buněk u malých přežvýkavců (Brito a kol. 2019).

Bylo proto navrženo, že kokosová voda používaná jako ředidlo spermatu pomáhá udržet parametry spermatu, zachovat životaschopnost spermatu u malých přežvýkavců a zajistit použití po chlazení nebo kryokonzervaci (Reis a kol. 2023).

3.4.4 Metoda ultra rychlého zmrazení

Ačkoli se při uchování spermatu drobných přežvýkavců hojně používají klasické metody kryokonzervace, tyto metody nemohou zcela zabránit tvorbě ledových krystalů, což způsobuje značné smršťování buněk a strukturální poškození (Watson 1995; Gao 1995). Ultra rychlé

mražení bylo navrženo jako náhradní postup, aby se zabránilo negativním účinkům vyvolaným tvorbou ledových krystalů. Proces ultra rychlého mrazení, který se liší od běžného zmrazování, zahrnuje přímý fázový přechod vodných roztoků z kapalného do sklovitého stavu, aniž by procházel fází tvorby ledových krystalů (Chunrong a kol. 2019).

Hlavními charakteristikami ultra rychlého mrazení jsou vysoká koncentrace kryoprotektiva a rychlá rychlost zmrazení/ohřátí. Tyto dva prvky společně rychle zvyšují viskozitu roztoků ultra rychlého mrazení a následně brání tvorbě ledových krystalků. Ultra rychlé zmrazení bylo úspěšně použito pro kryokonzervaci savčích embryí. Vzhledem k extrémní zranitelnosti spermií vůči toxickému a osmotickému stresu se však přímé použití metod vultra rychlého mrazení embryí při kryokonzervaci spermií nedoporučuje (Isachenko a kol. 2003). Embrya mají také mnohobuněčnou strukturu. Proto i když některé buňky embrya utrpí poškození v důsledku kryoinvaze, zbývající živé buňky se mohou dále dělit a nahradit poškozené nebo odumřelé buňky (Moussa a kol. 2014). Spermie, které jsou jednotlivými buňkami bez schopnosti transkripce nebo translace, se nemohou z kryoinvaze zotavit. Spermie, které jsou jednotlivými buňkami bez schopnosti transkripce nebo translace, se nemohou z kryoinvaze zotavit. Při použití metody intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI) pro oplození však může být vliv integrity membrány a akrozomu přehlížen vzhledem k funkčnímu významu spermií jako transportu mužské DNA. Ve skutečnosti se ocásky spermií při ICSI obvykle ručně odstřihávají, aby se usnadnil postup. V důsledku toho není úspěch ICSI závislý na strukturální integritě spermií (Chunrong a kol. 2019).

Ultra rychlé mrazení může být v několika ohledech výhodnější než tradiční techniky kryokonzervace (Jiménez-Rabadán a kol. 2015). Ultra rychlé mrazení může snížit negativní účinky, které přináší nadměrná koncentrace rozpuštěných látek během procesů zmrazování a zahřívání, a zabránit tvorbě intracelulárního ledu. Další výhodou je rychlost ultra rychlého mrazení, která trvá jen několik sekund. Kromě toho nemusí být pro ultra rychlé mrazení savčích spermií nezbytné přidání vaječného žloutku. Všeobecně se uznává, že největší nevýhodou vaječného žloutku je jeho nejasné složení, což může být hlavní příčinou nejednotných výsledků různých výzkumných skupin. Kromě toho existuje riziko bakteriální kontaminace a přenosu onemocnění prostřednictvím vaječného žloutku. Vzhledem ke škodlivé interakci mezi fosfolipázou A v seminální plazmě a vaječným žloutkem je odstranění vaječného žloutku zvláště významné pro kozí sperma (Pudry 2006). Kromě toho nemusí být glycerol zapotřebí, pokud se spermie skladují pomocí vitifikace (Arando a kol. 2017). Glycerol sice zvyšuje schopnost kryotoleranci spermií, ale může je také vystavit osmotickému a toxickému stresu (Chunrong a kol. 2019).

Účinnost ultra rychlého mrazení spermií však může být ovlivněna několika omezeními. Zpočátku je sklovitý stav vzorků ultra rychlého mrazení poměrně křehký a snadno se ztrácí. Při zahřívání spermií tak může hrozit vysoké riziko neúspěšného procesu ultra rychlého mrazení. Nedávný výzkum ukázal, že poškození související se zahříváním může být závažnější než poškození související se zmrazením (Quan 2017). Kromě toho utrarchy zmrazené spermie kvůli vysoké citlivosti na osmotické a chemicky nebezpečné stresory obvykle ztrácejí svou pohyblivost, a proto je tradiční umělá inseminace nepravděpodobná (Jin a kol. 2014).

V současné době je bohužel nedostatek informací o ultra rychlém mrazení spermatu malých přežvýkavců (Chunrong a kol. 2019). Podle zjištění Aranda a kol. (2017) byla kvalita ultra rychle mrazených ovčích spermií byla výrazně horší než kvalita čerstvých spermií, ale

sacharóza může zlepšit celkovou pohyblivost, životaschopnost a fungování membrán, když byly spermie před ultra rychlým zmrazením nejprve ekvilibrovány při 5 °C. Za účelem ultra rychlého mrazení ovčích spermií vědci předpokládali, že sacharóza by mohla fungovat jako potenciální kryoprotektant. Kromě toho může ekvilibrace při 5 °C zmírnit kryoinvaze, které u ovčích spermií způsobuje kryokonzervace vyvolaná ultra rychlým zmrazením (Arando a kol. 2017). V jiné studii Jiménez-Rabadán a kol. (2015) zjistili, že při absenci vaječného žloutku ultra rychlé zmrazení směsi sacharózy a glycerolu výrazně snižuje kvalitu zmrazených ovčích spermií. Naopak spermie ultra rychle zmrazené směsí vaječného žloutku a glycerolu v nejnižší koncentraci vykazovaly uspokojivou životaschopnost, akrozomální integritu a index fragmentace DNA, i když ultra rychlé zmrazení pořád vážně poškozovala pohyblivost spermií, což ukazuje, že vaječný žloutek může napomáhat přežití ultra rychle zmrazených ovčích spermií. Hlavním nedostatkem těchto dvou výzkumů je zjištění, že vaječný žloutek je prospěšný pro kryoživotnost ultra rychle zmrazených ovčích spermií. Přesto je dobře známo, že ultra rychlé zmrazení spermií má tu výhodu, že zabraňuje negativním účinkům vaječného žloutku (Chunrong a kol. 2019).

Je také důležité mít na paměti, že ultra rychlé zmrazení nemusí být vhodná pro každodenní výrobu, protože k dosažení rychlého zmrazení/ohřátí a zaručení sklovitého stavu je zapotřebí omezený objem. Přesto je ultra rychlé zmrazení přínosné a má širokou škálu potenciálních aplikací jako prostředek pro uchování genetických zdrojů hospodářských zvířat. Pomocí technologie ICSI lze vajíčko oplodnit spermii i v době, kdy je životaschopnost ultra rychle zmrazených spermií nevyhovující nebo zcela zničená (Chunrong a kol. 2019).

3.4.5 Lyofilizace

Lyofilizované spermie lze skladovat bez použití tekutého dusíku, což přináší několik výhod, například nižší náklady na přepravu či skladování a žádné riziko virové infekce (Bielanski a Vajta 2009). Postup lyofilizace je složitější než kryokonzervace, protože zahrnuje další krok sušení nebo dehydratace. Postup lyofilizace obvykle zahrnuje primární a sekundární sušení a dva fázové přechody (Keskintepe a Eroglu 2015). Během procesu primárního sušení se vzorky nejprve zmrazí na teplotu nižší, než je jejich eutektická teplota, aby se změnila z kapalné fáze na ledové krystaly. Poté, aniž by prošla přechodnou kapalnou fází, se zmrzlá voda ve vakuové atmosféře převede na vodní páru. Vzorky po primárním sušení stále obsahují ~8 % až 10 % vlhkosti v závislosti na složení vzorku. Zbývající nezmrzlá vázaná voda musí být dále odstraněna desorpcí při sekundárním sušení, aby byla zachována stabilita vzorku při podstatně vyšší teplotě, například při pokojové teplotě. Aby se vázaná voda v tomto okamžiku přeměnila na vodní páru, zahřívají se vzorky v co nejnižším vakuu. Vysušené vzorky lze po provedení primárního a sekundárního sušení uchovávat při pokojové teplotě nebo v chladničce (Chunrong 2019).

V současné době se občas objevují zprávy o lyofilizaci spermií u drobných přežvýkavců (Chunrong 2019). Olaciregui a kol. hodnotili vliv teploty skladování a kyseliny rozmarýnové na integritu DNA lyofilizovaných ovčích spermií. U oocytů mikroinjektovaných lyofilizovanými spermii byl také testován jejich vývojový potenciál. Tato zjištění ukázala, že ovčí spermie uchovávané lyofilizací mohou být uchovávány při 4 °C a teplotě okolí po celý rok. Kromě toho může kyselina rozmarýnová snížit poškození DNA spermií vzniklých

lyofilizací. Nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi lyofilizovanými spermii a zmrazenými spermii, pokud jde o tvorbu blastocyst (Olaciregui a kol. 2017). Anzalone a kol. (2018) nedávno uvedli další potvrzení, že lyofilizované ovčí spermie podporují vývoj blastocyst po ICSI, což naznačuje, že lyofilizace nabízí jiný, cenově dostupný způsob uchovávání pro zachování biodiverzity. V jejich výzkumu byly oocyty chemicky aktivovány ionomycinem, aby zahájily embryonální vývoj po ICSI s lyofilizovanými spermii.

Vývoj technologie ICSI koexistuje s oživením lyofilizace spermii. K provedení oplodnění oocyty je nutná technika ICSI, protože lyofilizované spermie zcela ztrácejí schopnost pohybu. V současné době je velký prostor pro zlepšení kvality lyofilizovaných spermii. Není pochyb o tom, že dodatečné postupy sušení využívané při lyofilizaci mají za následek závažnější poškození spermii než kryokonzervace (Chunrong 2019).

Hlavním cílem konzervace spermii je zachování plné samčí genetické výbavy. Vzhledem k tomu může lyofilizace sloužit jako životaschopná náhrada konvenčních metod kryokonzervace. Pro kryokonzervaci je nezbytný kapalný dusík, aby se zastavil metabolismus spermii. Dlouhodobá kryokonzervace vyžaduje stálý přísun tekutého dusíku a mechanickou údržbu mrazicího zařízení. Zmrazené spermie ztrácejí životaschopnost, jakmile se zastaví dodávka tekutého dusíku, zejména v případě neplánovaných katastrof, jako je zemětřesení nebo tajfun (Kaneko a kol. 2014). Na rozdíl od kryokonzervace má lyofilizace jednoduché a zvládnutelné požadavky na skladování. Kvůli vyšší teplotě skladování však může být skladovací stabilita lyofilizovaných spermii nižší než u kryokonzervace (Chunrong 2019).

4 Závěr

Cílem bakalářské práce je soupis poznatků zaměřených na využití perspektivních kryoprotektorů při konzervaci semene malých přežvýkavců.

Ze souhrnu celé práce vyplývá, že je velmi důležité, jak budou všechny postupy provedeny, jaké bude zvolené ředidlo a jaký bude zvolen kryoprotektor. Pro konzervaci je velmi důležité zvolit správnou metodu odběru spermatu, protože jak víme, odběr je první důležitý krok pro úspěšné zvládnutí procesu konzervace. Po odběru je třeba vyhodnotit parametry spermatu. K tomu se používá makroskopické a mikroskopické hodnocení. Nejlepší možností je využití technologií CASA nebo průtokové cytometrie.

Dalším krokem je důležité vybrat co nejlepší kryoprotektor, který zabraňuje poškození spermie, zajišťuje přežitelnost a dobrou oplozovací schopnost po rozmrazení. Jako perspektivní kryoprotektory byly zvoleny směs glycerolu s dimethylsulfoxidem, sojový lecitin, LDL nebo kokosová voda. Při samostatném použití glycerolu a Me₂SO média byla pohyblivost po rozmrazení 33 %, avšak při použití obou kryoprotektantů byla pohyblivost po rozmrazení 45 % progresivně pohyblivých spermií.

Podle publikovaných zjištění byl LDL při použití jako ředidla spermatu kozlů a beranů přinejmenším stejně účinný jako vaječný žloutek nebo dokonce lepší. Přípravky LDL mají bohužel omezenou kapacitu pro skladování a postupy extrakce a purifikace LDL jsou složité a časově náročné, což vyžaduje nepřetržitou extrakci.

Ve většině studií sojový lecitin zlepšil alespoň některé vlastnosti spermií více než vaječný žloutek (kde se koncentrace sojového lecitinu pohybovala od 0,4 % do 1 %). Vyšší míra oplození ve srovnání s komerčním ředidlem a ředidlem obsahujícím vaječný žloutek byla důkazem, že Tris-lecithin lépe zachoval funkčnost spermií během testu oplození in vitro.

Studie s použitím kokosové vody navíc již prokázaly zlepšení integrity a životaschopnosti spermatických buněk u malých přežvýkavců.

Z těchto zjištěných výsledků se jeví jako nejvíce perspektivní směs glycerolu a dimethylsulfidu, která měla velmi příznivé výsledky při porovnání se samostatným glycerolem. Dalším dvou ředidlům jako je sojový lecitin a kokosové mléko by se mělo věnovat více pozornosti a více se zaměřit na jejich problematiku, protože z výsledků je zřejmé, že jsou velmi dobrou náhradou vaječného žloutku a mají možnost vytěsnit možnost přenosů patogenů. LDL se také jeví jako perspektivní, ale velkou nevýhodou je složitost skladování a časová náročnost extrakce, která je nežádoucí.

Jako nejvíce vypovídající zkouškou úspěšnosti je inseminace. Zde je potřeba vybrat vhodnou metodu inseminace jak z hlediska nákladnosti, tak z hlediska úspěšnosti dané metody. Ze studií zatím vyplývá, že laparoskopické nebo transcervikální intrauterinní inseminace jsou však jedinými způsoby, jak dosáhnout přijatelného počtu zabřeznutí při použití zmrazeného spermatu. Ve vztahu k tomuto bylo zjištěno, že lepších výsledků bylo dosaženo po inseminaci čerstvým spermatem.

5 Literatura

- Aboagla, E. M. E., & Maeda, T. 2011. Arbutin's suppression of cryodamage in goat sperm and its mechanism of cryoprotection. *Theriogenology*, 76(3), 538-546.
- Aboagla, E. M. E., & Terada, T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction*, 69(4), 1245-1250.
- Abril-Sánchez, S., Crosignani, N., Freitas-de-Melo, A., Terrazas, A., Damián, J. P., Beracochea, F., ... & Ungerfeld, R. 2018. Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. *animal*, 12(12), 2598-2608.
- Ahmed, Touqeer, et al. 2019. Cryopreservation of ram cauda epididymal spermatozoa using different buffers and sugar combinations. *Journal of Animal Research*, , 9.6: 927-933.
- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269-279.
- Aisen, E. G., Medina, V. H., & Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *theriogenology*, 57(7), 1801-1808.
- Aitken, R. J. 2020. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction*, 159(4), R189-R201.
- Akhtarshenas, B., Karami Shabankareh, H., Hajarjian, H., Bucak, M. N., Abdolmohammadi, A. R., & Dashtizad, M. 2018. The protease inhibitor antipain has a beneficial synergistic effect with trehalose for ram semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(6), 1359-1366.
- Alvares, C. T. G., da Cruz, J. F., & Ferreira, M. L. 2015. Técnicas de inseminação artificial e implicações fisiopatológicas em ovinos. *Pubvet*, 9, 195-251.
- Álvarez, M., Tamayo-Canul, J., Martínez-Rodríguez, C., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel, L., ... & De Paz, P. 2012. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Animal Reproduction Science*, 132(3-4), 145-154.
- Amann, R. P., & Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17.
- Amann, R.P. 1999. Kryokonzervace spermií. In: Knobil, E., Neill, J. D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, Burlington, MA, s. 773-783.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., ... & De Paz, P. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*, 63(4), 1235-1247.

- Anzalone, D. A., Palazzese, L., Iuso, D., Martino, G., & Loi, P. 2018. Freeze-dried spermatozoa: an alternative biobanking option for endangered species. *Animal Reproduction Science*, 190, 85-93.
- Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., & Perez-Marín, C. C. 2017. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal reproduction science*, 181, 175-185.
- Arthur, G. H., Noakes, D. E., Pearson, H., & Parkinson, T. J. 1996. *Veterinary reproduction and obstetrics.. ed. 7*. WB Saunders.
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10, 49-62.
- Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26(4), 539-549.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., ... & Tainturier, D. 2008. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 70(9), 1478-1488.
- Bergeron, A., & Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular reproduction and development*, 73(10), 1338-1344.
- Bergstein-Galan, T. G., Weiss, R. R., Kozicki, L. E., & Bicudo, S. D. 2017. Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. *Animal reproduction science*, 187, 20-27.
- Bielanski, A., & Vajta, G. 2009. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human reproduction*, 24(10), 2457-2467.
- Blash, S., Melican, D., & Gavin, W. 2000. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, 54(6), 899-905.
- Bopape, M. A., Lehloenya, K. C., Chokoe, T. C., & Nedambale, T. L. 2015. Comparison of electro ejaculator and artificial vagina on semen collection from South African indigenous goat following assessment by computer aided sperm analysis. *Open Journal of Animal Sciences*, 5(02), 210.
- Bowen, J. A., Fonda, E. S., & Kooyman, D. L. 1988. Ultrastructural study of goat spermatozoa frozen at different diluent osmolalities. In *Proceedings, annual meeting-Western Section, American Society of Animal Science (USA)*.
- Brito, B. F., Santos, B. M. B., Cabral, L. A. R., Lima, D. B. C., de Melo Salgueiro, C. C., & Nunes, J. F. 2019. Influence of Coconut Powder Water-Based Conservation Medium (APC-102c) for Maintaining Mitochondrial Activity of Cryopreserved Ram Sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*, 47.

- Brogna, R., Fan, J., Sieme, H., Wolkers, W. F., & Oldenhof, H. 2021. Drying and temperature induced conformational changes of nucleic acids and stallion sperm chromatin in trehalose preservation formulations. *Scientific Reports*, 11(1), 14076.
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060-1067.
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Ulutaş, P. A., Çoyan, K., Başpınar, N., & Özkalp, B. (2009). Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in veterinary science*, 87(3), 468-472.
- Buckrell, B. C., Buschbeck, C., Gartley, C. J., Kroetsch, T., McCutcheon, W., Martin, J. P. W. K., ... & Walton, J. S. 1994. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42(4), 601-611.
- Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., & Carluccio, A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, 74(3), 424-435.
- Corteel, J. M., & Baril, G. 1974. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 14, No. 4B, pp. 741-745). EDP Sciences.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolkers, W., & Tablin, F. 2001. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43(2), 89-105.
- Cseh, S., Faigl, V., & Amiridis, G. S. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal reproduction science*, 130(3-4), 187-192.
- Daramola, J. O., Adekunle, E. O., Oke, O. E., Onagbesan, O. M., Williams, T. J., Iyasere, O. S., ... & Oyewusi, J. A. 2017. Effects of pyridoxine in combination with different antioxidants on viability and oxidative stress parameters of cryopreserved goat buck semen. *Archivos de zootecnia*, 66(253), 15-21.
- Del Valle, I., Souter, A., Maxwell, W. M. C., Muino-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. 2013. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal reproduction science*, 138(3-4), 213-219.
- DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A., FERNÁNDEZ-SANTOS, M., BISBAL, A., ROS-SANTAELLA, J., Carmona, M., Martinez-Pastor, F., & GARDE, J. 2010. Suitability of novel antioxidants for protecting thawed spermatozoa from red deer. *Reprod Fertil Dev*, 1.
- Ducha, N., Budijastuti, W., & Rahayu, D. A. 2021. Senduro Goat Semen Characteristics as A Candidate for Low Temperature Storage. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 328, p. 08010). EDP Sciences.
- Edmondson, M. A., Roberts, J. F., Baird, A. N., Bychawski, S., & Pugh, D. G. 2012. *Theriogenology of sheep and goats, in sheep and goat medicine*.

- Etson, C. J., Waldner, C. L., & Barth, A. D. 2004. Evaluation of a segmented rectal probe and caudal epidural anesthesia for electroejaculation of bulls. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(3), 235.
- Evans, G., & Maxwell, W. C. 1987. *Salamons' artificial insemination of sheep and goats* (No. Ed. 2). Butterworths.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210(4474), 1131-1133.
- Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., & Cseh, S. 2012. Artificial insemination of small ruminants—A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115-129.
- Fonseca, J. F., Torres, C. A. A., Maffili, V. V., Borges, A. M., Santos, A. D. F., Rodrigues, M. T., & Oliveira, R. F. M. 2018. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction (AR)*, 2(2), 139-144.
- Foot, R. H. 2010. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim. Sci.*, 80, 1-10.
- Fukuhara, R., & Nishikawa, Y. 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 44, 266-270.
- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., & Hiwasa, M. 2007. Fertility of ewes inseminated intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4), 959-962.
- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., & Okabe, K. 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, 54(4), 286-289.
- Ganaie, B. A., Islam, R., & Khan, M. Z. 2009. Epididymal sperm reserve in Rams with different testicular and epididymal weight. *The Indian Journal of Small Ruminants*, 15(1), 51-54.
- Gančík, P., Kozumplík, J., Mesároš, P., Schvarc, F., Vlček, Z., & Zibrín, M. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. *Príroda*.
- Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., ... & Critser, J. K. 1995. Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10(5), 1109-1122.
- Garner, D. L., Pinkel, D., Johnson, L. A., & Pace, M. M. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34(1), 127-138.
- Gil, J., Januskauskas, A., Håård, M., Håård, M. G. M., Johanisson, A., Söderquist, L., & Rodríguez-Mártinez, H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animals*, 35(2), 69-77.

- Gillan, L., & Maxwell, W. M. C. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT*-, 271-283.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
- Graham, E. F., Crabo, B. G., & Brown, K. I. 1972. Effect of Some Zwitter Ion Buffers on the Freezing and Storage of Spermatozoa I. *Bull. Journal of Dairy Science*, 55(3), 372-378.
- Graham, J. K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal reproduction science*, 68(3-4), 239-247.
- Graham, J. K., & Foote, R. H. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24(1), 42-52.
- Hamedani, M. A., Tahmasbi, A. M., & Ahangari, Y. J. 2013. Effects of vitamin B12 supplementation on the quality of Ovine spermatozoa. *Open veterinary journal*, 3(2), 140-144.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 3-22.
- Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58.
- HORÁK, František 2012. *Chováme ovce*. Vyd. v češtině 1. Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda, ISBN 978-80-209- 0390-7
- Chauhan, M. S., Kapila, R., Gandhi, K. K., & Anand, S. R. 1994. Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia*, 26(1), 21-26.
- Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., ... & Berlinguer, F. 2015. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, 83(6), 1064-1074.
- Chemineau, P., Guérin, Y., Orgeur, P., & Vallet, J. C. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats (Vol. 83, pp. 222-p). FAO.
- I. Nuti, RS Youngquist, WR Threlfall (Eds.) 2007, *Současná terapie v teriogenologii velkých zvířat* (2. vydání), Saunders-Elsevier, St. Louis, MO s. 529-534
- Iqbal, S., Andrabi, S. M. H., Riaz, A., Durrani, A. Z., & Ahmad, N. 2016. Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nili Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 85(5), 954-959.
- Iritani, A., Nishikawa, Y., & Fukuhara, R. 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat sperm: I. Localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating. *Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto University*, 89-96.

- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., & Nawroth, F. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive biomedicine online*, 6(2), 191-200.
- Jia, B., Memon, S., Liang, J., Lv, C., Hong, Q., Wu, G., & Quan, G. 2021. Trehalose modifies the protein profile of ram spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 171, 21-29.
- Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., ... & Soler, A. J. 2015. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71(1), 85-90.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., ... & Garde, J. J. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal reproduction science*, 167, 103-108.
- Jin, B., Kleinhans, F. W., & Mazur, P. 2014. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology*, 68(3), 419-430.
- Jones, R. 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 53, 73-84.
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Rouissi, H., ... & Anel, L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, 60(7), 1249-1259.
- Kaneko, T., Ito, H., Sakamoto, H., Onuma, M., & Inoue-Murayama, M. (2014). Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PloS one*, 9(11), e113381.
- Kang, S. S., Kim, U. H., Ahn, J. S., Won, J. I., & Cho, S. R. 2021. Improvement of pregnancy rate after deep uterine artificial insemination with frozen-thawed cauda epididymal spermatozoa in Hanwoo cattle. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 36(2), 82-90.
- Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli, S., & Brikas, P. 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, 48(6), 1049-1059.
- Kershaw, C. M., Khalid, M., McGowan, M. R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., & Scaramuzzi, R. J. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, 64(5), 1225-1235.
- Keskintepe, L., Simplicio, A. A., & Brackett, B. G. 1998. Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. *Theriogenology*, 49(7), 1265-1274.
- Khalili, B., Jafaroghli, M., Farshad, A., & Paresh-Khiavi, M. 2010. The effects of different concentrations of glycine and cysteine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3), 318-325.

- Killeen, I. D., & Moore, N. W. 1970. Transport of spermatozoa, and fertilization in the ewe following cervical and uterine insemination early and late in oestrus. *Australian Journal of Biological Sciences*, 23(5), 1271-1278.
- Killen, I. D., & Caffery, G. J. 1982. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal*, 59(3), 95-95.
- Konyali, C. 2012. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on buck sperm quality after cryopreservation with different extenders.
- Kos, V. a kol., 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie.
- Kumar, D., & Naqvi, S. M. K. 2014. Effect of time and depth of insemination on fertility of Bharat Merino sheep inseminated trans-cervical with frozen-thawed semen. *Journal of Animal Science and Technology*, 56(1), 1-6.
- Kundu, C. N., Das, K., & Majumder, G. C. 2001. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. *Cryobiology*, 42(1), 21-27.
- Kundu, C. N., Chakrabarty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., & Majumder, G. C. 2002. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 123(6), 907-913.
- Kundu, C. N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., & Majumder, G. C. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 40(2), 117-125.
- Laurans, R., & Clement, P. 1950. Nouvelles Electrodes pour l'Electroejaculation des Ovins et de Bovins. *Comp. rend. acad. agr. France*, 36, 450.
- LIU, Wansheng a OTT, Troy. 2018. Sheep Overview. In Michael K. Skinner (ed.). *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Academic Press, s. 515-520. ISBN 9780128151457.
- Lo, K., Brinkman, R. R., & Gottardo, R. 2008. Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(4), 321-332.
- Louda, F., & Hegedúšová, Z. 2009. Inseminace ovcí-intenzifikační faktor šlechtitelské práce. *Agrovýzkum Rapotín*.
- Ly, C., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. 2019. Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. *Biopreservation and biobanking*, 17(2), 171-182.
- Mann, T. 1954. The biochemistry of semen. *The biochemistry of semen*.
- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J. S., & Viudes-de-Castro, M. P. 2005. Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8), 1756-1765.

- Marco-Jiménez, F., Vicente, J. S., & Viudes-de-Castro, M. P. 2008. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reproduction in domestic animals*, 43(4), 403-408.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & De Paz, P. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in domestic animals*, 45, 67-78.
- Matshaba, B. 2010. Characterization and cryopreservation of South African unimproved indigenous goat semen (Doctoral dissertation, University of the Free State).
- Matthews, N.; Bester, N.; Schwalbach, L.M.J. 2003. A Comparison of Ram Semen Collected By Artificial Vagina and Electro-Ejaculation. *SA Anim. Sci.* 4, 28–30.
- Maxwell, W. M. C., & Watson, P. F. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 55-65.
- Maxwell, W. M. C., De Graaf, S. P., Ghaoui, R. E. H., & Evans, G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 13.
- Maxwell, W. M., & Salamon, S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 613-638.
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Menchaca, A., & Rubianes, E. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 403-413.
- Milczewski, V., Kozicki, L. E., & Neves, J. P. 2000. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. *Archives of Veterinary Science*, 5(1).
- Mohammadian, M., 2017. Effect of extender containing fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extract on characteristics of frozen – thawed ram sperm. M.Sc. Thesis, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran (In Persian with English abstract).
- Molinia, F. C., Evans, G., Casares, P. Q., & Maxwell, W. M. C. 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.
- Moreira, N. 2017. Exame andrológico e criopreservação de sêmen em felídeos selvagens. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1), 312-315.
- Moretti, E., Mazzi, L., Terzuoli, G., Bonechi, C., Iacoponi, F., Martini, S., ... & Collodel, G. 2012. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reproductive Toxicology*, 34(4), 651-657.
- Mortimer, S. T. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human reproduction update*, 3(5), 403-439.

- Mortimer, S. T., Van der Horst, G., & Mortimer, D. 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian journal of andrology*, 17(4), 545.
- Motlagh, M. K., Sharafi, M., Zhandi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., Soleimani, M., & Zeinoaldini, S. 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. *Cryobiology*, 69(2), 217-222.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.
- Moussa, M., Shu, J., Zhang, X., & Zeng, F. 2014. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Science China Life Sciences*, 57, 903-914.
- Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Loaiza-Eccheverri, A. M., Varago, F. C., Neves, M. M., ... & Henry, M. 2011. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 75(2), 300-307.
- Mujitaba, M. A., Egerszegi, I., Kútvölgyi, G., Nagy, S., Vass, N., & Bodó, S. 2022. Alternative Opportunities to Collect Semen and Sperm Cells for Ex Situ In Vitro Gene Conservation in Sheep. *Agriculture*, 12(12), 2001.
- Nair, S. J., Brar, A. S., Ahuja, C. S., Sangha, S. P. S., & Chaudhary, K. C. 2006. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*, 96(1-2), 21-29.
- Nethenzheni, L. P. 2017. Effect of bioxcell and triladyl extenders and removal of seminal plasma of equilibrated and cryopreserved goat semen (Doctoral dissertation).
- Ngcauzele, A. 2018. Seasonal differences in the semen quality and sperm functionality of Tankwa goats. Unpublished master's thesis. University of the Western Cape, Bellville, South Africa.
- Noakes, D. E., Parkinson, T., & England, G. 2009. Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. Noakes D, Parkinson T, England G. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 9th ed. United Kingdom (UK): Saunders. p, 3-60.
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541-549.
- Olaciregui, M., Luño, V., Domingo, P., González, N., & Gil, L. 2017. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific reports*, 7(1), 1096.
- Osuagwuh, 2017. UI Porovnání metod odběru spermatu (elektroejakulace vs. umělá vagína) na kvalitu spermií berana Araesa před a po rozmrazení. Ph.D. Disertační práce, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Španělsko.

- Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., & Yániz, J. L. 2013. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small ruminant research*, 112(1-3), 128-135.
- Parra-Forero, Lyda Y., a kol. 2015. Hodnocení spermií nadvarlete plemene Azteca: srovnání kvality spermií hlavy, těla a kaudy. *Advances in Reproductive Sciences*, 3.03: 57.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A. B., & Andersen Berg, K. 2005. Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Veterinary record*, 156(12), 372-375.
- Pellicer, MT, 1995. Purifikace a charakterizace složky bulbouretrální asekce kozího samce, která se na ní podílí. Zhoršení kvality spermií zředěných v mléce. Diplomová práce. University of Murcia.
- Pellicer-Rubio, M. T., Magallon, T., & Combarous, Y. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biology of reproduction*, 57(5), 1023-1031.
- Pereira, R. M., & Marques, C. C. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and tissue banking*, 9, 267-277.
- Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K., Lamoreaux, L., Nguyen, R., Ambrozak, D., Koup, R. A., & Roederer, M. 2006. Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 313(1-2), 199-208.
- Perkins, N. R., Hill, J. R., & Pedrana, R. G. 1996. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized merino ewes. *Theriogenology*, 46(3), 541-545.
- Perry, K., Haresign, W., Wathes, D. C., & Khalid, M. 2010. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*, 74(9), 1685-1690.
- Perticarari, S., Ricci, G. I. U. S. E. P. P. E., Granzotto, M., Boscolo, R., Pozzobon, C., Guarnieri, S., ... & Presani, G. 2007. A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Human Reproduction*, 22(2), 485-494.
- Petrunkina, A. M., Waberski, D., Gunzel-Apel, A. R., & Topfer-Petersen, E. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*, 134(1), 3-17.
- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*, 63(3), 215-225.
- Purdy, P. H., Ericsson, S. A., Dodson, R. E., Sternes, K. L., & Garner, D. L. 2004. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. *Small Ruminant Research*, 55(1-3), 239-243.
- Quan, G. B., Hong, Q. H., Shao, Q. Y., Yang, H. Y., & Wu, S. S. 2012. The effects of trehalose and sucrose on frozen spermatozoa of Yunnan semi-fine wool sheep during a non-mating season. *CryoLetters*, 33(4), 307-317.

- Quan, G., Wu, G., & Hong, Q. 2017. Oocyte cryopreservation based in sheep: The current status and future perspective. *Biopreservation and Biobanking*, 15(6), 535-547.
- Quinn, P. J., Salamon, S., & White, I. G. 1968. The effect of cold shock and deep-freezing on ram spermatozoa collected by electrical ejaculation and by an artificial vagina. *Australian Journal of Agricultural Research*, 19(1), 119-128.
- Ritar, A. J., Ball, P. D., & O'may, P. J. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 2(1), 27-34.
- Ritar, A. J., Mendoza, G., Salamon, S., & White, I. G. 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *Reproduction*, 95(1), 97-102.
- Rodriguez- Irazogui, M., Lundeheim, N., Soderguist, I. a Rodriguez-Martinez, H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioxell. *Theriogenology*, roč. 59, s. 1157-1170.
- Rodríguez-Martínez, H. 2006. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, fertility and development*, 19(1), 91-101.
- Rondon, R. M. M., Rondon, F. C. M., Nunes, J. F., Alencar, A. A., Sousa, F. M., & Carvalho, M. A. M. 2008. Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozoides de capote (*Numida meleagris*). *Revta Bras. Saúde. Prod. Anim*, 9(4), 848-854.
- Roy, A. 1957. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, 179, 318-319.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38(1-2), 1-36.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 77-111.
- Salamon, S., & Ritar, A. J. 1982. Deep freezing of Angora goat semen: effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 35(3), 295-304.
- Salamon, S., Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. 2004, August. Fertility of ram semen after 35 years of frozen storage. In *Proceedings of the International Congress of Animal Reproduction*, Porto Seguro, Brazil.
- Sansiñena, M., Santos, M. V., Zaritzky, N., & Chirife, J. 2012. Comparison of heat transfer in liquid and slush nitrogen by numerical simulation of cooling rates for French straws used for sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 77(8), 1717-1721.

- Sayre, B. L., & Lewis, G. S. 1997. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*, 48(2), 267-275.
- Shibley, C. F. B., BUCKRELL, B. C., Mylne, M. J. A., POLLARD, J., & Hunton, J. R. 2007. Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In *Current therapy in large animal theriogenology* (pp. 629-641). WB Saunders.
- Schulz, M., Risopatrón, J., Matus, G., Pineda, E., Rojas, C., Isachenko, V., ... & Sánchez, R. 2017. Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm. *Andrologia*, 49(9), e12757.
- Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722-1726.
- Smith, A. U., & Polge, C. 1950. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, 166, 668-669.
- Sohnrey, B., & Holtz, W. 2005. Transcervical deep cornual insemination of goats. *Journal of animal science*, 83(7), 1543-1548.
- Steyn, J. J. 2003. Application of Artificial Insemination (AI) on commercial sheep and goat production. *Proceeding Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte*, 2, 367-379.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., Savignone, C. A., & Stornelli, M. A. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*, 25.
- Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D. 2020. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92, 146-150.
- Taqueda, G. S., Azevedo, H. C., Santos, E. M., Matos, J. E., Bittencourt, R. F., & Bicudo, S. D. 2011. Influência de aspectos técnicos e anatômicos nos índices de fertilidade baseado no desempenho da inseminação artificial. *Ars Veterinária*, 127-133.
- Terrill, C. E. 1940. Comparison of ram semen collection obtained by three different methods for artificial insemination. *Journal of Animal Science*, 1940(1), 201-207.
- Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C., & Lucia Jr, T. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, 93(2-3), 206-209.
- Tsien, R. Y. 1989. Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods in cell biology*, 30, 127-156.
- Upreti, G. C., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D. M., Vishwanath, R., & Smith, J. F. 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science*, 51(4), 275-287.

- van der Horst, G., Maree, L., & du Plessis, S. S. 2018. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 875-888.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vasquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., ... & Tainturier, D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. *Theriogenology*, 71(6), 895-900.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149-179.
- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
- Watson, P. F., & Anderson, W. J. 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *Reproduction*, 69(1), 229-235.
- White, I. G., & Wales, R. G. 1961. Comparison of epididymal and ejaculated semen of the ram. *Reproduction*, 2(3), 225-237.
- Wulster-Radcliffe, M. C., Wang, S., & Lewis, G. S. 2004. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology*, 62(6), 990-1002.
- Wurlina, W., Safitri, E., Susilowati, S., & Meles, D. K. 2020. The effect of crude guava leaf tannins on motility, viability, and intact plasma membrane of stored spermatozoa of Etawa crossbred goats. *Veterinary World*, 13(3), 530.
- Youngquist, R. S., & Threlfall, W. R. 2006. *Current therapy in large animal theriogenology*. Elsevier Health Sciences.
- Zamiri, M. J. 2020. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. *Journal of livestock science and technologies*, 8(1), 1-15.

6 Seznam použitých zkratk a symbolů

EEJ	Elektroejakulace
HOST	Test hypoosmotického bobtnání
AV	umělá vagína
DPBS	Dulbeccova fosfátového pufovaného roztoku
EPS	epidimální (nadvarletní) sperma
IVF	in vitro fertilizace
IV	in vitro
CASA	Počítačem asistovaná analýza spermií
MS	motilita spermií
PS	progresivní motilita
VLC	rychlost v křivce
VSL	rychlost v přímce
VAP	průměrná dráhová rychlost
LIN	linearita spermií
STR	přímočarost
WOB	kolísání
ALH	amplituda bočního posunu hlavičky spermie
BCF	křížová frekvence rytmu
FCS	flow cytometry standard
TCG	Tris-based extender
EYCE	vaječný zloutkový koagulační žloutek
BUS	sekret bulborentální žlázy
SBUIII	protejnová frakce z kozího bulborenta
UHT	ultra-high temperature
CDE	definovaný prodlužovač spermatu
AI	umělá inseminace
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermií
TAI	časovaná umělá inseminace
NaCl	chlorid sodný
Me ₂ SO	dimethylsulfoxid
μm	mikrometr
kPa	kilopascal

mOsm	osmolalita
kDa	kilodalton
<	menší než
≥	je větší nebo rovno
×	krát