

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Charakteristika kvalitativních a kvantitativních ukazatelů  
ejakulátu beranů a kozlů**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Anna Boudová**

**Obor studia: Živočišná produkce**

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

© 2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Charakteristika kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu beranů a kozlů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2019

---

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a cenné rady při konzultacích a kompletaci bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přáteli, za jejich podporu po celou dobu mého studia.

# Charakteristika kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu beranů a kozlů

## Souhrn

Hodnocení kvality ejakulátu beranů a kozlů je důležitým krokem pro konzervaci spermií a přípravu inseminačních dávek pro účely reprodukce. Prostřednictvím analýz dochází k hodnocení životaschopnosti, pohyblivosti, koncentrace spermií, neporušenosti jejich plazmatické membrány a mitochondriální aktivity spermií.

V práci byly popsány metody používané pro rutinní laboratorní vyšetření ejakulátu představované hemocytometrickou a spektrofotometrickou metodou a metodou fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční mikroskopie je používána pro hodnocení strukturální neporušenosti plazmatické membrány, která je zjišťována pomocí speciálních látek, které mají schopnost pronikat do porušených buněk, obarvit jejich DNA a způsobit fluorescenci. Pro vyhodnocení je využíváno mikroskopické techniky. Popsané metody mají nevýhody představované časovou náročností a nízkým počtem pozorování. Toto řeší metoda průtokové cytometrie, představující rychlou, přesnou a automatickou metodu, která může být použita jako případná alternativa či efektivní doplněk k fluorescenční mikroskopii. Při jejím použití je sledován velký počet spermií a metoda poskytuje velmi objektivní výsledky.

Klíčovou roli v oblasti reprodukce ovcí a koz hraje proces kryokonzervace ejakulátu, který však nebyl doposud optimalizován. V bakalářské práci byl proto kladen důraz na vliv jednotlivých aditiv, ředidel, poměru ředění, rychlost zmrazování a rozmrazování vzorku, teplota skladování, vliv vybraných proteinů, enzymů a pH. Popsán byl vliv enzymu fosfolipázy A, která je produktem bulbouretrálních žláz kozla a negativně ovlivňuje životaschopnost spermií po reakci s mlékem či vaječným žloutkem, u berana se tento enzym nevyskytuje. Lyofilizace a vitifikace byly popsány jako alternativní metody ke klasické kryokonzervaci. Nevýhoda těchto metod spočívá ve snížení až ztrátě pohyblivosti spermií, což neumožňuje jejich použití pro umělou inseminaci.

Kryokonzervace ejakulátu představuje nenahraditelnou součást umělé inseminace pro přenos genetických informací od významných plemenů v chovu ovcí a koz. Předkládaná bakalářská práce naznačuje určité perspektivy, které mohou být předmětem dalšího studia a potencionálně přispět k optimalizaci postupu kryokonzervace.

**Klíčová slova:** inseminace, průtoková cytometrie, aktivita, koncentrace, přežitelnost

# Characteristics of qualitative and quantitative traits in ram and buck ejaculate

## Summary

The assessment of rams' and buck' ejaculate quality is an important step for sperm conservation and preparation of insemination doses for reproduction purposes. Viability, motility, and concentration of sperm, and their plasma membrane integrity and sperm mitochondrial activity are assessed through analyses.

The methods used for routine laboratory examination of ejaculate, represented by hemocytometric and spectrophotometric method and fluorescence microscopy method, were described in this thesis. Fluorescence microscopy is used to evaluate the structural integrity of a plasma membrane, which is detected using special substances that have the ability to penetrate into damaged cells, stain their DNA and cause fluorescence. Microscopic techniques are used for the assessment. The described methods have disadvantages represented by time-consuming nature and low number of observations. This is solved by the flow cytometry method, a fast, precise, and automatic method that can be used as an alternative or effective supplement to fluorescence microscopy. Using this method, a large quantity of sperm is monitored and the method gives very objective results.

A key role in sheep and goat reproduction is played by the ejaculate cryopreservation process, which, however, has not been optimized yet. Therefore, the thesis focused on the influence of individual additives, diluents, dilution ratio, freezing and thawing rates, storage temperature, influence of selected proteins and enzymes, and pH. The effect of the enzyme of phospholipase A, which is the product of the bulbourethral glands of a buck and negatively affects viability of sperm after reaction with milk or egg yolk, has been described. Lyophilization and vitrification have been described as alternative methods to cryopreservation. The disadvantage of these methods lies in the reduction or even loss of sperm motility, which does not allow its use for artificial insemination.

The ejaculate cryopreservation is an indispensable part of artificial insemination for the transfer of genetic information from significant breeding males in sheep and goat breeding. This bachelor thesis suggests certain perspectives that may be the subject of further study and potentially contribute to the optimization of a cryopreservation process.

**Keywords:** insemination, flow cytometry, activity, concentration, survival

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Přehled literatury.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Pohlavní orgány berana a kozla.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Ejakulát.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Spermie.....	12
3.2.2 Kvalitativní a kvantitativní vlastnosti ejakulátu.....	12
3.2.2.1 Koncentrace spermií.....	12
3.2.2.2 Pohyblivost spermií.....	13
3.2.2.3 Objem.....	14
3.2.2.4 Morfologie spermií.....	15
3.2.3 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu.....	17
3.2.3.1 Obvod šourku.....	17
3.2.3.2 Věk.....	18
3.2.3.3 Plemeno.....	19
3.2.3.4 Sezóna a teplota.....	19
3.2.3.5 Výživa.....	22
3.2.3.6 Metoda odběru ejakulátu.....	23
3.2.4 Metody hodnocení ukazatelů ejakulátu.....	24
3.2.4.1 Makroskopické vyšetření ejakulátu.....	24
3.2.4.2 Mikroskopické vyšetření ejakulátu.....	25
<b>3.3 Průtoková cytometrie.....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Princip.....	31
3.3.2 Hodnocení spermií pomocí průtokové cytometrie.....	32
3.3.3 Hodnocení jednotlivých parametrů.....	33

3.3.3.1	Hodnocení životnosti spermií.....	33
3.3.3.2	Hodnocení mitochondriální funkce .....	34
3.3.3.3	Hodnocení akrozomu spermií.....	34
<b>3.4</b>	<b>Metody mražení spermatu .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Obecný postup .....	37
3.4.2	Ředidla a komponenty používané při mražení ejakulátu.....	38
3.4.2.1	Kvalita ejakulátu po kryokonzervaci a rozmražení .....	40
<b>4</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>56</b>

# 1 Úvod

Chov ovcí a koz má v České republice velmi bohatou historii. Ovce a kozy přispívají k celosvětové produkci potravin a vláknů. Jsou to sezónně polyestrická zvířata, což brání jejich celoroční reprodukci. Cílem chovatele malých přežvýkavců je produkce potomků po kvalitním samci a získání co největšího množství zdravých potomků. Plodnost ovcí a koz představuje jednu z nejdůležitějších užitkových vlastností, která je ovlivněna celou řadou vnitřních i vnějších faktorů. Rozlišujeme dva druhy plemenitby, plemenitbu přirozenou a inseminaci (Cseh et al. 2012).

Inseminace je jedna z nejstarších technik asistované reprodukce používaných u hospodářských zvířat. U ovcí a koz hraje důležitou roli zejména v intenzivních produkčních systémech. Jedná se o metodu, která umožňuje rychlé rozšíření cenných genů v populaci a tím intenzivnější genetický pokrok, lepší kontrolu reprodukce, eliminaci pohlavně přenosných chorob, šíření hodnotné genetiky ohrožených plemen a zvýšení počtu potomků na jednoho samce. Při použití umělé inseminace je využíván podstatně menší počet plemenných samců oproti plemenitbě přirozené, protože inseminace umožňuje ředění ejakulátu a tvorbu inseminačních dávek, které obsahují nižší koncentraci spermií, nežli je zjistitelná u čerstvě odebraného ejakulátu (Leboeuf et al. 2006; Cseh et al. 2012).

Při výběru samců pro umělou inseminaci je důležité určit, zda sperma, které produkují, má odpovídající kvalitu, přičemž použití čerstvého ejakulátu je využíváno minimálně, a proto je optimalizace procesu konzervace a metod pro interpretaci výsledků zcela elementární. Kvalita ejakulátu se zjišťuje ihned po odběru makroskopickým a mikroskopickým hodnocením. Metody zahrnují kontrolu objemu ejakulátu, koncentrace spermií, morfologie spermií, posouzení vzhledu, pohyblivosti spermií a dalších parametrů (Pezzanite et al. 2010).

Ve své práci se zaměřuji na metody hodnocení ejakulátu, faktory ovlivňující jeho kvalitu a následné použití pro metody asistované reprodukce prezentované umělou inseminací.



## **2 Cíl práce**

Cílem práce bylo hodnocení kvality ejakulátu pro uspokojivé reprodukční ukazatele ve stádě, stejně jako pro produkci inseminačních dávek.

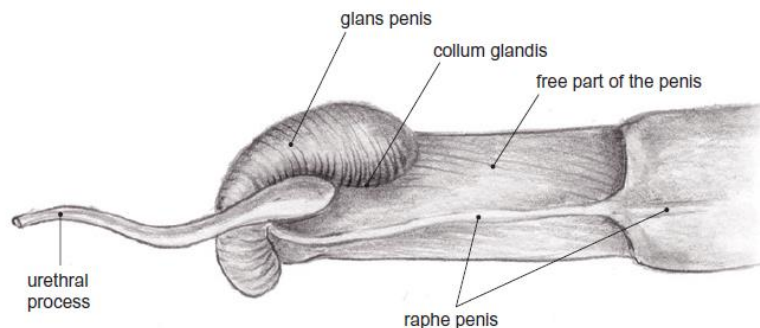
Předmětem studie byl soupis aktuálních poznatků kvalitativních a kvantitativních ukazatelů ejakulátu beranů a kozlů. Práce byla zaměřena na popis vybraných metod analýz pro jednotlivé ukazatele. Součástí byl i soupis některých vnitřních a vnějších faktorů ovlivňujících kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu.

Na základě diplomové práce budou stanoveny metody pro konzervaci a uchování ejakulátu kozlů a beranů a praktické vyšetření ejakulátu s použitím průtokové cytometrie.

### 3 Přehled literatury

#### 3.1 Pohlavní orgány berana a kozla

Pohlavní orgány samců hospodářských zvířat jsou tvořeny pohlavními žlázami, vývodnými cestami, přídatnými pohlavními žlázami a kopulačním orgánem. Pohlavní žlázy jsou představovány párovými varlaty, která jsou uložena v šourku. Ve varlatech dochází k tvorbě samčích pohlavních buněk, spermií. Endokrinní část varlat (Leydigovy buňky) je zodpovědná za tvorbu testosteronu. Varlata mají vejčitý tvar a jsou ze stran zploštělá, u kozla se hmotnost varlat pohybuje od 145 – 150 g, u berana je hmotnost vyšší o 50 až 150 g. Na varlata navazují párová nadvarlata tvořená kličkami vývodných kanálků varlete, která představují zásobárnu spermií, které zde získávají schopnost pohybu. Nadvarlata jsou tvořena hlavou, tělem a ocasem. U ocasu nadvarlete začíná chámovod, který ústí do močové trubice a u berana i kozla se před vyústěním rozšiřuje v ampuli chámovodu. Močová trubice představuje od vyústění chámovodu společnou vývodnou cestu močovou a pohlavní. U berana se za žaludem táhne výběžek močové trubice dlouhý asi 4 cm, u kozla asi 2,5 cm (obrázek 1), při kopulaci dochází ke ztopoření výběžku a jeho zavedení až do krčku děložního samice. Zevní kopulační ústrojí samce představuje pyj, který umožňuje vpravení ejakulátu do pohlavních cest samice a tím případné oplodnění. Konec pyje je tvořen kožní duplikaturou, předkožkou. U berana a kozla je pyj fibroelastického typu, proto je i ve fázi ochabnutí tuhé konzistence. U berana a kozla se vyskytují všechny typy přídatných pohlavních žláz, to jest bulbouretrální žláza, prostata (roztroušená podoba), měchýřkovitá žláza a ampule chámovodu. Produktem přídatných pohlavních žláz je semenná plazma (Hafez 2000; Jelínek & Koudela 2003; Najbrt 1982).



Obrázek 1: Schéma penisu kozla (Constantinescu 2010)

## 3.2 Ejakulát

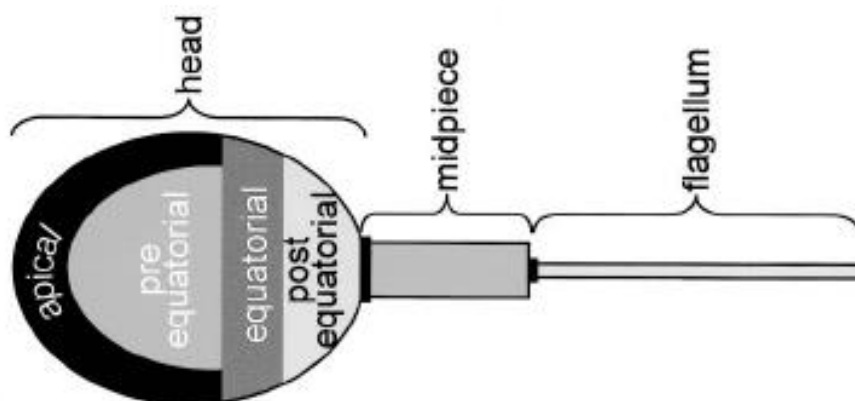
Ejakulát neboli semeno je složeno ze spermií, které jsou suspendovány v tekutém médiu, které se nazývá semenná plazma. Semenná plazma je komplexní tekutina, která zprostředkovává chemickou funkci ejakulátu. Jedná se o tekutinu, která je nejčastěji bělavé až šedavé barvy (Gamčík & Kozumplík 1984). Biochemické složky semenné plazmy jsou vylučovány ze sítě varlete, z nadvarlete a z přídatných pohlavních žláz samčího pohlavního traktu a podobně jako většina tělních tekutin obsahuje semenná plazma vysokou koncentraci proteinů (Domínguez et al. 2008). Složení bílkovin semenné plazmy se u jednotlivých druhů liší (Muiño-Blanco et al. 2006). Právě sekrety přídatných pohlavních žláz tvoří většinu objemu semenné plazmy. Hlavní úlohou semenné plazmy je, že představuje živné médium, které usnadňuje transport spermií. Složky semenné plazmy se účastní klíčových procesů týkajících se funkce spermií, oplodnění, vývoje embrya v ženském reprodukčním traktu (Mara et al. 2007). Semenná plazma je složena z iontů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}_2$ ), energetických složek (fruktóza, sorbitol, glycerylfosfocholin) a organických sloučenin (kyselina citronová, aminokyseliny, peptidy, lipidy, hormony, cytokiny). V semenné plazmě přežvýkavců se dále vyskytují dusíkaté látky, jako jsou amoniak, močovina, kyselina močová, kreatinin a také redukční látky, jako jsou například kyselina askorbová a hypotaurin. Složení semenné plazmy je dáno velikostí, skladovací kapacitou a sekreční činností jednotlivých samčích reprodukčních orgánů (Juyena & Stelletta 2011).

Tabulka 1: Složení semenné plazmy u berana a kozla (Juyena & Stelletta 2011)

Složka	Beran	Kozel
Fruktóza (mg/ dl)	150- 600	875
Glukóza (mg/ dl)	0,9- 1,6	4,8 - 8,8
Kyselina citronová (mg/ dl)	110- 260	/
Proteiny (g/dl)	2,30- 2, 50	0,77 - 1,48
Lipidy (mg/ dl)	254- 396	/
Fosfolipidy (mg/ dl)	/	57
Kyselina glutamová (mg/ dl)	4,5- 5,2	/
Na (mg/ dl)	120- 258	60- 183
K (mg/ dl)	50- 140	76- 255
Ca (mg/ dl)	6,0- 15	5,0- 15
P (mg/ dl)	4,8- 12	/
Cl (mg/ dl)	86	82- 215
Mg (mg/ dl)	2,0- 13	1,0- 4
Zn (mg/ dl)	56- 179	/

### 3.2.1 Spermie

Spermie jsou haploidní zárodečné buňky samců, které jsou produkovány v semenotvorných kanálcích varlat během procesu spermatogeneze (Gadella & Luna 2014). Spermatogeneze se skládá ze tří fází, proliferace spermatogonie, meiózy, jejímž výsledným produktem jsou spermatidy, které vznikají přes primární a sekundární spermatocyty a diferenciaci, kdy dochází ke vzniku specializovaných buněk, spermií. Savčí spermie sdílí podobnou strukturu a skládají se z hlavy, která obsahuje jádro a akrozom, krčku a bičíku (Malo et al. 2006). Hlava dosahuje průměru od 2 do 5  $\mu\text{m}$ . Bičík dosahuje délky 10 – 100  $\mu\text{m}$  a je složený z komplexu mikrotubulů a středové části, která je tvořená převážně mitochondriemi. Hlava je spojená se středovou částí pomocí spojovacího úseku a střední část je připojená k bičíku prstencem. Objem cytoplazmy spermie je velmi malý a nachází se především v hlavě spermie. Spermie postrádá orgány, ve kterých dochází k syntéze bílkovin, popřípadě nukleových kyselina a spermie slouží pouze k přenosu genetické informace do oocytu (Erikson & Health 2014).



Obrázek 2: Savčí spermie – hlava, krček, bičík (Erikson & Health 2014)

### 3.2.2 Kvalitativní a kvantitativní vlastnosti ejakulátu

#### 3.2.2.1 Koncentrace spermií

Koncentrace spermií je jedním z ukazatelů svědčících o biologické plnohodnotnosti ejakulátu. Koncentrace se vyjadřuje počtem spermií v 1  $\text{mm}^3$  ejakulátu (Gamčík & Kozumplík 1984). Normální koncentrace u berana se pohybuje mezi  $3,5 \times 10^9$  –  $6 \times 10^9$  spermií na ml ejakulátu. Koncentrace ejakulátu u kozla je o něco nižší než u berana a pohybuje se mezi  $2,5 \times 10^9$  –  $5 \times 10^9$  spermií na ml spermatu (Hafez 2000).

Khandoker (2013) ve své studii uvádí hodnocení reprodukční schopnosti kozlů, plemene černá bengálská koza, na základě posouzení kvality ejakulátu a plodnosti, přičemž

bylo hodnoceno 5 dospělých kozlů. Došel k závěru, že individualita má pouze nevýznamný vliv na koncentraci spermií v ejakulátu, která se pohybovala v rozmezí od  $2,827 \pm 0,76 \times 10^9$  spermií/ ml do  $3,132 \pm 0,88 \times 10^9$  spermií/ ml. Karagiannidis et al. (2000) uvádějí parametry ejakulátu odebraného od tří různých plemen chovaných v laboratorních podmínkách. Testována byla plemena sánská koza, alpská koza a koza damažská. Pro plemeno alpská koza byla zjištěna průměrná koncentrace spermií v ejakulátu  $3,610 \pm 70,0 \times 10^9$  spermií/ ml, u kozlů plemene koza sánská byla průměrná koncentrace spermií v ejakulátu  $3,630 \pm 60,0 \times 10^9$  spermií/ ml a pro plemeno damažská koza byla průměrná hodnota koncentrace spermií v ejakulátu  $3,69 \times 10^9$  spermií/ ml. Výsledky obou uvedených studií odpovídají obecnému rozmezí koncentrací spermií pro kozly, které uvádí Gamčík & Kozumplík (1984).

Carvajal-Serna et al. (2018) provedli studii týkající se kvality ejakulátu u plemen beranů romney marsh a hampshire. Významně vyšší koncentrace spermií byla prokázána u plemene hampshire, než romney marsh, přičemž průměrná koncentrace u plemene hampshire byla  $2,389 \pm 163,22 \times 10^9$  spermií/ml, oproti tomu u romney marsh pouze  $2,164 \pm 168,01 \times 10^9$  spermií/ml. U jednotlivých plemenů v rámci plemene však rozdíly mezi koncentracemi spermií v ejakulátu nebyly významné. Výsledky koncentrací spermií získané touto studií jsou nižší oproti rozmezí pro parametr koncentrace spermií, které uvádí Gamčík & Kozumplík (1984).

### 3.2.2.2 Pohyblivost spermií

Pohyblivost neboli motilita spermií je důležitým parametrem při hodnocení ejakulátu, který souvisí se schopností spermií procházet přes samičí pohlavní orgány a následně oplodnit vajíčko. Ukázalo se, že motilita spermií je významným parametrem, který ovlivňuje plodnost ovcí (David et al. 2015). Pohyblivost spermií se výrazně nemění během roku (Aguiar & Tilburg 2013).

Khandoker (2013) hodnotil parametry ejakulátu u pěti kozlů plemene černá bengálská koza. Pohyblivost spermií se pohybovala v rozmezí od  $77,07 \pm 1,06$  % do  $81,47 \pm 1,84$  %. Zjistil, že motilita spermií se výrazně nemění během sezóny. Karagiannidis et al. (2000) uvedli, že se liší procento pohyblivosti spermií mezi plemeny sánská koza a koza alpská. Uvedli, že průměrná hodnota pohyblivosti spermií pro plemeno koza alpská je  $59,88 \pm 0,62$  %, zatímco pro plemeno sánská koza byla o 4,52 % vyšší. Zjistili, že pohyblivost spermií se liší během sezóny, což je v rozporu s tím, co uvádí Khandorek (2013) pro plemeno černá bengálská koza. Významné rozdíly v pohyblivosti spermií byly zjištěny mezi plemeny ovcí

romney marsh a hampshire. Průměrná hodnota pohyblivosti spermií u plemene hampshire byla  $85,45 \pm 1,55$  % a u plemene romney marsh  $75,49 \pm 2,75$  % (Carvajal-serna et al. 2018). Karagiannidis et al. (2000) porovnávali pohyblivost spermií mezi plemeny chios a východofříská ovce, přičemž došli k závěru, že nejvyšší pohyblivost u obou plemen je během podzimu, kdy průměrná hodnota pro plemeno východofříská ovce dosahovala  $75,29 \pm 1,48$  %, zatímco pro plemeno chios byla o 0,29 % nižší. Naproti tomu k nejnižší pohyblivosti docházelo během jara a léta, kdy se průměrná hodnota pohybovala pro plemeno chios v rozmezí od  $69,35 \pm 1,171$  % do  $70,83 \pm 1,84$  % a pro východofřískou ovci od  $69,21 \pm 1,78$  % do  $70,76 \pm 1,04$  %. Z výsledků vyplývá, že sezóna má významný vliv na pohyblivost spermií, přičemž procento pohyblivosti kolísá mezi podzimem a jarem zhruba o 5- 6 %. Zásadní vliv na motilitu ejakulátu beranů a kozlů potvrdili také Qureshi et al. (2013), Malejane et al. (2014) a Catunda et al. (2011).

### 3.2.2.3 Objem

Objem ejakulátu je jeden z důležitých parametrů, který je předmětem hodnocení. Je to ukazatel ovlivňující reprodukční schopnost samců (Jha et al. 2018). Objem ejakulátu kozla je v průměru 1 ml a pohybuje se v rozmezí 0,5 – 1,2 ml (Hafez 2000).

Hernández et al. (2012) uvádějí, že objem ejakulátu u beranů suffolk, získaný odběrem pomocí umělé vagíny byl 1,2 ml. Khandorek (2013) provedl studii, ve které hodnotil parametry ejakulátu u plemene černá bengálská koza. Objem ejakulátu se pohyboval v rozmezí od  $0,58 \pm 0,17$  do  $1,04 \pm 1,1$  ml a bylo zjištěno, že individualita měla vliv na objem ejakulátu. Objem ejakulátu kolísá a je závislý na plemeni (Karagiannidis et al. 2000; Khandoker 2013), výživě (Almeida et al. 2007), respektive tělesné kondici plemeníka (Turri et al. 2016) a sezóně odběru (Domínguez et al. 2008). Objem ejakulátu je také ovlivněn metodou odběru, přičemž elektroejakulace poskytuje větší objem, oproti odběru do umělé vagíny (Jha et al. 2018).

Ve studii zaměřené na hodnocení ejakulátu u kozlů plemene alpská koza a koza sánská byly zjištěny průměrné hodnoty objemu ejakulátu  $1,27 \pm 0,03$  ml (alpská koza) a  $1,15 \pm 0,03$  ml (koza sánská). Větší objem ejakulátu byl během připouštěcí sezóny (léto, podzim), kdy u plemene alpská koza byla průměrná hodnota  $1,42 \pm 0,04$  ml, oproti tomu u plemene koza sánská byl objem ejakulátu v průměru  $1,27 \pm 0,04$  ml. Nižší objem byl potom zjištěn mimo připouštěcí sezónu, kdy průměrné hodnoty pro obě plemena klesly zhruba o 0,30 – 0,40 % (Karagiannidis et al. 2000). Ke stejnému stanovisku z hlediska vlivu sezóny došli ve své studii Talebi et al. (2009), kteří zjistili, že objem ejakulátu u plemene markhur je v průběhu

připouštěcí sezóny vyšší o 0,5 % oproti období mimo připouštěcí sezónu, kdy byla průměrná hodnota objemu ejakulátu  $0,6 \pm 0,03$  %. Také vliv plemenné příslušnosti na objem ejakulátu byl potvrzen řadou autorů, přičemž podrobnější výsledky a srovnání mezi jednotlivými plemeny a v rámci dvou odlišných druhů hospodářských zvířat, ovcí a koz, jsou detailněji popsány v tabulce 2.

Tabulka 2: Parametry ejakulátu u vybraných plemen ovcí a koz

Plemeno	Objem ejakulátu (ml)	Pohyblivost spermií (%)	Morfologie spermií (normální spermie) %	Koncentrace ejakulátu ( $\times 10^6$ /ml)	Zdroj
<b>Kozli</b>					
Černá bengálská koza	$0,58 \pm 0,17$ až $1,04 \pm 0,11$	$77,07 \pm 1,06$ až $81,47 \pm 1,84$	$78,75 \pm 1,83$ až $91,85 \pm 1,38$	$2827 \pm 0,76$ až $3132 \pm 0,88$	(Khandoker 2013)
Alpská koza	$1,27 \pm 0,03$	$59,88 \pm 0,62$	$89,73 \pm 0,30$	$3610 \pm 70,0$	(Karagiannidis & Karatzas 2000)
Sánská koza	$1,15 \pm 0,03$	$64,40 \pm 0,59$	$91,59 \pm 0,24$	$3630 \pm 60,0$	(Karagiannidis & Karatzas 2000)
<b>Berani</b>					
Romney marsh	$2,29 \pm 0,19$	$75,49 \pm 2,75$	$88,34 \pm 1,85$	$2164 \pm 168,01$	(Carvajal-Serna et al. 2018)
Hampshire	$2,81 \pm 0,17$	$85,45 \pm 1,55$	$94,07 \pm 0,85$	$2389 \pm 163,22$	(Carvajal-Serna et al. 2018)
Suffolk	$1,05 \pm 0,06$	30 až 80	x	$3281,7 \pm 108,6$	(Boland et al. 1985; Mickelsen et al. 1981)

### 3.2.2.4 Morfologie spermií

Všechny vzorky spermatu obsahují určité procento abnormálních spermií. Morfologické abnormality jsou v úzkém vztahu k plodnosti. Tepelný stres způsobuje vysoký počet poškozených spermií. Kombinace vysoké okolní teploty s vysokou vlhkostí může způsobit sterilitu samců až po dobu šesti týdnů (Mieusset et al. 2004; Hafez 2000). Velké množství abnormálních spermií se potom objevuje v ejakulátech, které jsou shromažďovány během obnovy reprodukční funkce. Zajištění dostatečného stínu a čisté studené vody pomáhá minimalizovat vliv tepelného stresu. U berana je negativní korelace mezi abnormálními spermii a pohyblivými spermii ( $r = -0,874$ ) (Karagiannidis et al. 2000). Pokud se

v ejakulátu vyskytuje 20 % a více abnormálních spermií, je plodnost berana sporná (Hafez 2000). Ejakuláty s vyšším počtem abnormálních spermií než 15 % by se neměly zpracovávat a používat pro umělou inseminaci, avšak Solti et al. (2012) uvádějí, že fyziologické rozmezí morfologicky normálních spermií se pohybuje od 70 do 80 %. Procento abnormálních spermií se mění sezónně, přičemž sledováním morfometrických parametrů spermií u devíti dospělých beranů se zabývali Bravo et al. (2014). Výsledky jejich studie ukazují, že průměrná délka spermií během podzimu a zimy kolísala od  $8,249 \pm 0,328 \mu\text{m}$  do  $8,359 \pm 0,343 \mu\text{m}$  a průměrná šířka se pohyboval od  $4,865 \pm 0,184 \mu\text{m}$  do  $4,970 \pm 0,183 \mu\text{m}$ , oproti tomu mimo připouštěcí sezónu, jaro a léto byla délka spermií zhruba o 0,1- 0,2  $\mu\text{m}$  kratší a šířka o 0,1  $\mu\text{m}$  menší. Vyšší výskyt abnormálních spermií můžeme pozorovat na jaře, přičemž počet klesá v průběhu připouštěcí sezóny. Různé modely morfologie a pohyblivosti spermií jsou prezentovány v tabulce 3 (Hafez 2000).

Pro hodnocení morfologie spermií by se měl používat vzorek, který je odebrán minimálně po dvou dnech a maximálně po sedmi dnech sexuální abstinence. Pokud je požadováno více vzorků, počet dní sexuální abstinence by měl být pokaždé stejný. Jelikož není možné zcela přesně charakterizovat kvalitu spermií na základě vyhodnocení jednoho vzorku, je vhodné zkontrolovat dva nebo tři vzorky. První vzorek ejakulátu dává správný výsledek nejméně v 85 % případů, ale variace mezi vzorky jsou velmi významné. Analýza morfologie spermií zahrnuje posouzení hlavičky, krčku, spojovacího oddílu a bičíku. Hodnocení hlavy spermií zahrnuje posouzení velikosti, tvaru, akrozomální oblasti (akrozomální index) a posouzení akrozomálních vakuol. Akrozomální index vzorku je vyjádřen jako procento spermií, které vykazovaly normální velikost akrozomu. Přítomnost akrozomálních vakuol se hodnotí pomocí vizuálního vyšetření (Lasiene et al. 2013; Hidalgo & Dorado 2009). Detailnější popis vyskytujících se abnormalit u spermií včetně jejich schématu je k dispozici v samostatných přílohách.



Tabulka 3: Modely morfologie a pohyblivosti spermií (Hafez 2000)

	<b>Kmitavý, kruhový pohyb</b>	<b>Házivý pohyb</b>	<b>Otáčivý pohyb</b>	<b>Nesouměrná hlava a/nebo bičík</b>	<b>Spermie s cytoplazm. kapkou</b>	<b>Aglutinované spermie</b>
Bičík spermie	Pomalé nebo rychlé chvění ze strany na stranu, kmitání různého druhu a frekvence, zakřivený tvar, nepohyblivý	Kmitání s vysokou rychlostí	Vlnění v malých amplitudách	Amplituda vlnění bičíku na obou stranách asymetrická	Amplituda vlnění je nepravidelná, rychlé kmitání	Pomalý, kmitavý pohyb
Hlava spermie	Nepohyblivá nebo kmitající na jednom místě	Nepravidelná, bez otáčení	Celá spermie se otáčí kolem své osy	Nepravidelná, obvykle žádná rotace	Nepravidelná, často se houpající, zřídka dochází k rotaci	Rozvleklá, houpající se
Pohyb spermií a progrese	Bez progresivního pohybu, kolmý, oblý, pohyb horizontálně po směru hodinových ručiček nebo proti směru hodinových ručiček	Minimální a nepravidelný pohyb, bloudivý	Rychlý progresivní pohyb v přímém směru	Pohyb po kruhové dráze, pokud nepostrádá rotaci	Kolmý, oblý, zřídka progresivní	Závislý na typu aglutinace

### 3.2.3 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu

#### 3.2.3.1 Obvod šourku

Obvod šourku má významný vliv na množství, kvalitu a oplodňovací schopnost spermií. Obvod šourku může kolísat během sezóny a v závislosti na tělesné hmotnosti. Obvykle je obvod větší během období rozmnožování a může se zmenšit o 2 až 3 cm v období mimo rozmnožování. Doporučuje se, aby beran, který bude použit k reprodukci, měl obvod šourku minimálně 33 cm. Pokud je obvod šourku menší, mělo by dojít k vyřazení berana, jelikož není schopný produkovat dostatečné množství ejakulátu pro oplodnění většího počtu samic během rozmnožovací sezóny (Pezzanite et al. 2010).

Braun et al. (1980) zjistili, že hodnocení parametrů obvodu šourku může být užitečné pro posouzení reprodukční výkonnosti. Provedli měření 717 beranů devíti různých plemen,

přičemž zjistili, že berani větších plemen mají větší obvod šourku, a že existuje pozitivní korelace mezi tělesnou hmotností a obvodem šourku ( $r=0,734$ ).

Al-ghalban et al. (2004) hodnotili obvod šourku u 38 kozlů plemene damašská koza. Hodnoceno bylo 17 dospělých beranů a 21 ročků. Obvody šourku byly zaznamenávány po dobu jednoho roku v měsíčních intervalech. Obvod šourku u dospělých beranů ve věku od 2 do 4 let (60- 80 kg) se pohyboval v rozmezí 29– 33 cm, u ročních beránků ve věku 10-12 měsíců (28– 59 kg) byl zjištěn obvod šourku pohybující se od 22,5 do 29 cm. Pezzanite et al. (2010) uvádějí, že berani a kozli mohou být klasifikováni jako vynikající, uspokojiví nebo pochybní při zařazení do plemenitby. Kozli a berani, kteří vykazují sporné výsledky, by měli být znovu přeměřeni za 4– 8 týdnů. Jako výborní jsou hodnoceni kozli, kteří dosáhli obvodu šourku ve věku nižším než 14 měsíců více než 25 cm a berani, kteří dosáhli obvodu šourku ve věku nižším než 14 měsíců více než 35 cm. Výsledky, které uvedl Al-ghalban et al. (2004) jsou nedostatečné pro hodnocení beranů jako vynikajících, jelikož v jeho studii dosahují hodnot nanejvýše 33 cm.



Obrázek 3: Měření obvodu šourku u berana (Pezzanite et al. 2010)

### 3.2.3.2 Věk

Za fyziologických podmínek zvířata rychle rostou v raném věku, přičemž růst se postupně zpomaluje po dosažení pohlavní dospělosti a je zcela zastaven po dosažení tělesné dospělosti. Vývoj varlat je rychlý v raném věku a po dosažení pohlavní dospělosti následuje období pomalého růstu (Karagiannidis et al. 2000). Věk ovlivňuje morfologii spermií u samců hospodářských zvířat. Dřívější studie ukázaly, že abnormální tvar hlavy spermií se vyskytoval ve věku do 2 let, poté se výskyt spermií s abnormální hlavou snižoval,

ale opět se zhoršil po 5. roce věku. Výskyt abnormálních spermií v raném věku je zřejmě způsoben nedokonalou spermiogenezí, s postupujícím věkem a s nástupem pohlavní dospělosti dochází k procentuálnímu zvyšování normálních spermií, přičemž pokles morfologicky normálních spermií se znovu objevuje ve starším věku nebo vlivem poruchy funkce varlat (Dowsett & Knott 1996). Zároveň bylo prokázáno, že tyto změny jsou doprovázeny změnami v obvodu šourku, přičemž počet abnormálních spermií se snižoval do věku 20 měsíců a současně se zvětšoval obvod šourku. Následně došlo k ustálení hodnot, které se týkaly obvodu šourku a výskytu abnormálních spermií. Od 2 do 5 let stáří se znovu začal vyskytovat vyšší počet abnormálních spermií oproti samcům ve věku od 1 do 2 let (Ferdinand et al. 2012; Bongso et al. 1982).

Vše naznačuje, že samci hospodářských zvířat by se měli používat k chovu nebo k odběru ejakulátu ve věku, kdy mají optimální růstové výkony a splňují atributy spermiogramu. Dále je vhodné hodnotit reprodukční ukazatele, které jsou důležité pro výběr plemenných zvířat a srovnávat je mezi různými plemeny ve stejném věku (Harder et al. 1995).

### 3.2.3.3 Plemeno

Plemeno je jedním z mnoha faktorů, které ovlivňují velikost těla, varlat a vlastnosti ejakulátu u hospodářských zvířat. Vliv plemene byl prokázán u koz plemene francouzská alpská, sánská a damašská a rozdíly mezi plemeny významně ovlivnily nejdůležitější charakteristiky (Karagiannidis et al. 2000). Velká plemena koz rostou rychleji, ale později pohlavně dospívají oproti malým plemenům. Stejně tak jsou velká plemena těžší a mají větší rozměry varlat než malá plemena.

Varlata se zvětšují až po dosažení pohlavní dospělosti (Al- ghalban et al. 2004). Bylo zjištěno, že plemeno má mimo jiné vliv na morfologii spermií u hospodářských zvířat, přičemž byly zjištěny změny v tvarech spermií. U koz byly zjištěny i prevalence mezi jednotlivými plemeny týkající se abnormálních spermií (Karagiannidis et al. 2000).

### 3.2.3.4 Sezóna a teplota

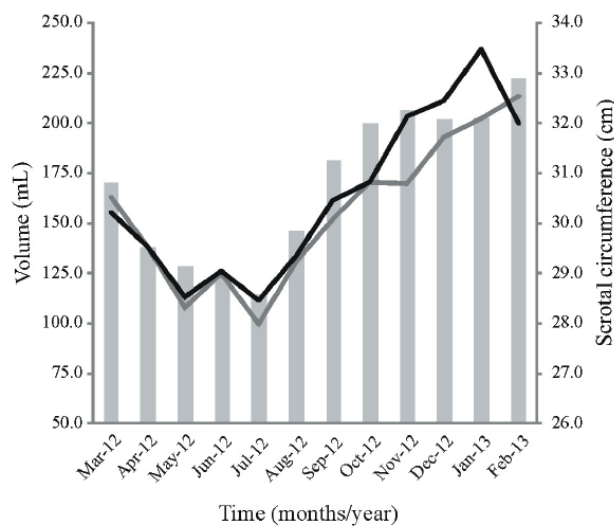
Reprodukční sezónnost je fenomén ovlivněný zejména každoročními výkyvy ve fotoperiodě. Sezónnost v reprodukci ovcí je velmi intenzivní u samic, u nichž se střídá perioda, která je vhodná pro reprodukci (reprodukční období), s periodou, kdy nejsou schopny

reprodukce (anestrus), zatímco spermatogeneze a sexuální aktivita u samců zůstává téměř konstantní. Mezi hlavní reprodukční charakteristiky, které se mění u kozlů a beranů vlivem sezóny je sexuální chování, tzv. libido sexualis, velikost varlat, sekrece hormonů a jednotlivé parametry ejakulátu (César et al. 2017; Santolaria 2011). Bylo prokázáno přímé působení melatoninu na motilitu spermií a na další charakteristiky ejakulátu berana v období mimo připouštěcí sezónu. Této skutečnosti bylo využito pro inseminaci ovcí během anestrusu čerstvým spermatem beranů, kterým byl implantován melatonin. Pomalé uvolňování implantovaného melatoninu se projevilo zvýšeným průměrem šourku a vyššími reprodukčními ukazateli bahnic inseminovaných během anestrus. Kvalita ejakulátu má nezastupitelný vliv na výsledky umělé inseminace (Santolaria 2011).

César et al. (2017) uvádějí sezónní změny reprodukčních charakteristik u samčích jedinců alpských koz z mírného regionu v tropickém podnebí a možný vliv těchto změn na plodnost. Maximální teplota, minimální teplota a světelnost byly zaznamenávány denně, zatímco hodnocení spermatu, hormonů a chování bylo prováděno každé dva týdny, přičemž odběr ejakulátu byl uskutečněn pomocí umělé vagíny při teplotě vody 40–42 °C. V jarních a letních měsících dochází k prodloužení světelného dne, naopak během podzimu a zimy ke zkrácení. Kozy a některá plemena ovcí jsou považovány za krátkodobé sezónní polyestry, jelikož samice začínají projevovat reprodukční aktivitu se zkracující se délkou světelného dne. Naopak s prodlužujícím se světelným dnem sexuální aktivita zaniká, končí reprodukční období a nastává období anestrus (reprodukčního klidu).

Abecia et al. (2012) uvádějí změny během sezóny při rozdílné délce světelného dne a její vliv na reprodukční aktivitu. César et al. (2017) ve studii sledovali sezónnost při rozdílné délce světelného dne v průměru o 2,48 hodin. Tento rozdíl se ukázal jako dostačující pro ovlivnění reprodukční aktivity ve sledovaném regionu (tropické klima- Brazílie), výsledky jsou prezentovány v tabulce 4. V této studii byly také zaznamenány pozitivní korelace mezi obvodem šourku a maximální teplotou ( $r = 0,48$ ). Variabilita jednotlivých znaků v průběhu roku je detailněji prezentována na obrázku 4. Makroskopické parametry (objem, barva a vzhled ejakulátu) a mikroskopické parametry (pohyblivost spermií, koncentrace a celkové odchylky spermií) mají rozhodující význam při analýze ejakulátu a jeho následném použití in vivo nebo in vitro. Ve skupině alpských kozlů byl zjišťován objem ejakulátu ve dvou po sobě jdoucích odběrech v intervalech o délce 10 minut, přičemž nejnižší objem ejakulátu je přisuzován reprodukčnímu období (březen–srpen), které nastupuje v období zimy a podzimu, tedy se zkracující se délkou světelného dne. Při posuzování zbarvení a vzhledu ejakulátu nebyly zaznamenány žádné změny při porovnání měsíčních

průměrů. Byla prokázána pozitivní korelace mezi barvou ejakulátu a pohyblivostí spermií ( $r= 0,62$ ). Barva ejakulátu byla hodnocena body 1- 3, přičemž 1 představovala bílou barvu, 2 bíložlutou a 3 nažloutlou. Dále byla zkoumána konzistence ejakulátu, která byla rovněž hodnocena body 1- 3, přičemž 1 představovala krémovou konzistenci, 2 mléčnou a 3 vodnatou. Vyšší zředění ejakulátu je dáno obsahem semenné plazmy, přičemž u kozlů je semenná plazma žlutě zbarvená. Čím větší je podíl semenné plazmy, tím intenzivnější je její žlutá barva. Čím vodnatější vzhled ejakulátu, tím nižší je koncentrace spermií u odebraného vzorku spermatu (César et al. 2017).



Obrázek 4: Změny objemu ejakulátu (ml) a obvodu šourku (cm) během roku (César et al. 2017)

Tabulka 4: Vliv sezóny na parametry ejakulátu kozlů plemene alpská koza v tropickém klimatu – Brazílii (César et al. 2017)

Měsíc	Objem (ml)	Barva (1- 3)	Vzhled (1- 3)	Pohyblivost spermii (0-100 %)	Koncentrace spermii ( $\times 10^9$ spermii/ml)	Celkové odchylky
Březen	1,6 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	85,8 $\pm$ 1,5	3,2 $\pm$ 0,4	38, 3 $\pm$ 4,6
Duben	1,2 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2	84,4 $\pm$ 1,8	2,7 $\pm$ 0,5	31,3 $\pm$ 5,8
Květen	1,9 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	85,0 $\pm$ 1,9	2,3 $\pm$ 0,2	43,6 $\pm$ 4,8
Červen	2,7 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	83,8 $\pm$ 1,6	2,5 $\pm$ 0,4	30,1 $\pm$ 6,5
Červenec	2,8 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,0	80,7 $\pm$ 2,0	2,7 $\pm$ 0,6	40,6 $\pm$ 5,9
Srpen	1,8 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	84,6 $\pm$ 1,8	3,5 $\pm$ 0,4	27,7 $\pm$ 4,6
Září	2,4 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2	84,4 $\pm$ 2,7	4,2 $\pm$ 0,8	33,4 $\pm$ 4,0
Říjen	2,9 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	82,5 $\pm$ 2,8	4,5 $\pm$ 0,7	22,4 $\pm$ 4,1
Listopad	3,2 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,1	80,0 $\pm$ 2,1	4,1 $\pm$ 0,5	32,3 $\pm$ 4,4
Prosinec	3,1 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,2	80,0 $\pm$ 2,5	3,7 $\pm$ 0,7	36,1 $\pm$ 6,3
Leden	3,0 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	79,6 $\pm$ 2,1	3,8 $\pm$ 0,5	39,3 $\pm$ 4,6
Únor	2,4 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2	85,0 $\pm$ 2,5	3,1 $\pm$ 0,5	28,6 $\pm$ 6,3

### 3.2.3.5 Výživa

Výživa je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují růst a produkci spermii u domácích zvířat (Widiyono et al. 2017). V tropickém podnebném pásu, kde se výrazně neprojevuje vliv fotoperiody je výživa jedním z hlavních modulátorů sexuální aktivity u malých přežvýkavců. Ve vyšších zeměpisných šířkách se však z větší části uplatňují sezónní faktory, nejde tedy výživou odvrátit snížení testikulární velikosti mimo sezónu. Bylo prokázáno, že vyšší úroveň krmiva urychluje obnovu velikosti varlat po oteplení. Hospodářská zvířata včetně malých přežvýkavců potřebují dostatek živin pro udržení svého tělesného metabolismu, následovaného růstem, produkcí a reprodukci. Zlepšení kvality krmiva zejména vyvážením obsahu bílkovin vede ke zlepšení tělesné kondice, velikosti varlat, a tím charakteristik spermatu respektive následné plodnosti. Zvýšení energetického příjmu bylo zaznamenáno jako příznivý vliv na růst varlat a produkci spermii (Gebre 2007). Důležitým aspektem je dotace mikro- a makroprvků v krmné dávce. Například Lukusa & Lehloenya (2017) zkoumali vliv selenu, jako antioxidantu, na kvalitu ejakulátu u skupiny dvaceti kozlů, přičemž polovina tvořila kontrolní skupinu a polovina měla krmnou dávku obohacenou o selen (0,34 mg/kg). Výsledky jasně ukazují, že kozli krmení dávkou bohatou na selen vykazovali vyšší parametry z hlediska kvality ejakulátu, přičemž například objem ejakulátu byl u pokusné skupiny o 0,20 ml vyšší oproti kontrolní skupině, ve které byla

průměrná hodnota 1,32 ml. Progresivní pohyb spermií byl oproti kontrolní skupině o 8 % vyšší, přičemž kontrolní skupina měla progresivně se pohybující spermie na úrovni 80 %. Vyvážená výživa dále také udržuje a zvyšuje sekreci gonadotropinů, a tím zvyšuje podíl morfologicky normálních spermií. Oproti tomu nedostatečné zásoby živin snižují růst a reprodukci u hospodářských zvířat. Poskytování nízké kvalitních krmiv snižuje podíl morfologicky normálních spermií a zvyšuje podíl nezralých spermií. Bylo prokázáno, že pokud krmivo není dostatečně bohaté na bílkoviny (podvýživa bílkovin), tak negativně ovlivňuje morfologii a motilitu spermií, dále vlivem nedostatku bílkovin dochází k depresi růstu varlat a potlačení spermiogeneze. Výživa březích ovcí chudá na bílkoviny a energii se projevuje sníženým počtem Sertoliho buněk varlete, a tím snížením budoucí kapacity pro produkci spermií a plodnosti u novorozených jehňat. Dále bylo prokázáno, že podvýživa způsobuje sníženou sekreci luteinizačního a folikulostimulačního hormonu, což se projevuje zpomalením růstu varlat u jehňat (Gebre 2007; Smith et al. 2010).

#### 3.2.3.6 Metoda odběru ejakulátu

U malých přežvýkavců, tedy i berana a kozla se ejakulát odebírá pomocí dvou možných metod, a to odběrem do umělé vagíny (AV) nebo pomocí elektroejakulace. Metoda elektroejakulace funguje na principu zavedení sondy nebo elektrody do rekta, přičemž elektrický proud stimuluje sympatické nervy postupným zvyšováním napětí, následkem čehož dochází k ejakulaci. Období elektrické stimulace se střídá se stejně dlouhým obdobím odpočinku tj. 3- 5 s (Stafford 1995). Dalším způsobem je odběr ejakulátu pomocí AV. Umělá vagína sestává z vnějšího válce, vnitřní vložky a sběrače, který je ze skla či plastu a slouží pro zachycení odebraného ejakulátu. Před odběrem dochází k desinfekci všech částí umělé vagíny a jejich následnému sestavení. Mezi vnější válec a vnitřní vložku je napuštěna teplá voda. Teplota vody uvnitř umělé vagíny je ovlivněna fyziologickými podmínkami v přirozené vagíně (41- 42 °C). Příliš vysoká teplota může způsobit poranění penisu. Berani a kozli jsou odebíráni do umělé vagíny skokem na fantom (Wulster-Radcliffe et al. 2001). Odběr s použitím umělé vagíny je upřednostňovanou metodou, ale tato metoda vyžaduje trénink.

Elektroejakulace se nejvíce používá jako přijatelná alternativa k bezpečnému a opakovanému odběru ejakulátu pro nezkušené samce, kteří nejsou naučeni odběru pomocí umělé vagíny. Ve výzkumu byl odebírán ejakulát berana a kozla do umělé vagíny a elektroejakulací ve stejný den. Ejakuláty byly po odběru zamrazeny a pro hodnocení zase rozmrazeny. Hodnocení se týkalo pohybu spermií a bylo provedeno metodou CASA, přičemž u beranů byla pohyblivost spermií vyšší u vzorků odebraných pomocí umělé vagíny oproti

ejakulátu získanému elektroejakulací. Bylo zjištěno, že metoda odběru negativně ovlivnila kvalitu spermií po rozmražení u beranů, ale nikoliv u kozlů. Dále proběhlo hodnocení pomocí průtokové cytometrie, při které byla hodnocena životnost spermií, stabilita membrány spermií a aktivita mitochondrií u rozmraženého ejakulátu, přičemž horší výsledky měly ejakulátu odebrané pomocí elektroejakulace oproti ejakulátům odebraným do umělé vagíny. V rámci mezidruhového srovnání vykazovaly horší výsledky vzorky odebrané od beranů oproti vzorkům od kozlů a to bez ohledu na způsob odběru. To může vést k závěru, že sperma beranů a kozlů má odlišnou odezvu na proces kryokonzervace v závislosti na použité metodě odběru ejakulátu, jelikož vzorky ejakulátu byly hodnoceny po rozmražení. Někteří autoři uvádějí, že ejakulát odebraný od kozlů pomocí elektroejakulace je více rezistentní vůči poškození mrazem oproti ejakulátu odebranému pomocí umělé vagíny (Jiménez-Rabadán et al. 2016).

Odběr pomocí elektroejakulace může pozměnit sekreční činnost jedné či více přídatných pohlavních žláz, následkem čehož dochází ke změně složení semenné plazmy, přičemž i složení bílkovin a jejich koncentrace se může lišit v závislosti na způsobu odběru. Některé tyto bílkoviny mohou hrát klíčovou roli při prevenci chladového šoku. Při změně koncentrace bílkovin může dojít k ovlivnění kryorezistence vzorků spermií (Juyena & Stelletta 2011).

### **3.2.4 Metody hodnocení ukazatelů ejakulátu**

#### **3.2.4.1 Makroskopické vyšetření ejakulátu**

Makroskopické vyšetření ejakulátu se provádí u čerstvého spermatu ihned po odběru (Gamčík & Kozumplík 1984).

Makroskopické vyšetření ejakulátu spočívá ve vizuálním posouzení jeho objemu, barvy a konzistence. Dále se v rámci tohoto vyšetření hodnotí pH, hustota a pach. Toto posouzení má do určité míry diagnostickou hodnotu při posouzení funkčnosti přídatných pohlavních žláz, k odhadu koncentrace spermatu či možném počtu inseminačních dávek vyrobených z ejakulátu. Netypická barva může signalizovat poškození či patologii vyskytující se v reprodukčním systému samce (Dhurvey et al. 2012).

Ejakulát berana by měl mít barvu mléčně bílou nebo jemně krémovou. Jiné zbarvení ejakulátu signalizuje patologii. Růžová barva ejakulátu svědčí o přítomnosti krve, a to jako následek poranění penisu během odběru ejakulátu. Infekce v reprodukčním traktu berana



se projevuje šedým nebo hnědým zbarvením ejakulátu. Při odběru semene elektroejakulací berani často močí, a pokud se moč dostane do hodnoceného vzorku, má ejakulát nažloutlou barvu, zředěnou konzistenci a silně zapáchá. Ejakulát znečištěný močí by měl být vyrazen. Objem ejakulátu se mění v závislosti na použité metodě jeho odběru. Vyšší objem získáme pomocí odběru elektroejakulací než pomocí odběru do umělé vagíny. Objem ejakulátu je ovlivněn věkem a kondicí berana, sezónou a frekvencí odběrů ejakulátu. Objem u dospělého berana by měl kolísat mezi 0,5 až 2 ml, u mladých zvířat potom v rozmezí od 0,5– 0,7 ml. Objem ejakulátu se zjišťuje pomocí kalibrované nádoby, kterou může být odměrný válec či zkumavky nebo sběrače označené stupnicí (Gamčík & Kozumplík 1984).

#### 3.2.4.2 Mikroskopické vyšetření ejakulátu.

Do mikroskopického vyšetření patří veškeré metody, které hodnotí koncentraci spermií, aktivitu spermií, cizí příměsi, morfologii spermií, přežitelnost a rezistenci spermií (Gamčík & Kozumplík 1984).

##### 3.2.4.2.1 Spektrofotometrická metoda

Spektrofotometry jsou přístroje upravené pro měření koncentrace spermií a to jako alternativa k časově náročnějšímu použití hemocytometrů (Barszcz et al. 2011). Přestože metoda nezajišťuje přesné vyčíslení spermií, relativně přesné výsledky lze získat, pokud jsou přístroje dostatečně zkalibrované a správně použité. Analýza pomocí spektrofotometru je poměrně rychlá a je k ní potřeba pouze malé množství vzorku. Nástroje a spotřební materiál jsou poměrně levné. Výhodou této metody je i jednoduché proškolení laboratorních techniků. Z těchto důvodů je spektrofotometrie nejběžnější metodou pro hodnocení koncentrace spermií v centrech pro zpracování ejakulátu. Spektrofotometry jsou speciální zařízení, která pracují na principu měření intenzity světla (Cardeal et al. 2017).

Metoda se používá pro kvantitativní měření přenosu světla roztoky. Vzorky spermatu obsahují mimo spermie i částice nespermatické povahy jako rozpustné organické a anorganické sloučeniny. Vzorky představují jakousi komplexní suspenzi, ve které nejsou charakteristiky přenosu světla určeny pouze počtem spermií. Světlo je forma elektromagnetického záření, které může být přenášeno suspenzí. Množství přenášeného světla souvisí s charakteristikami suspenze, což tvoří základ analýzy koncentrace spermií pomocí spektrofotometrů. Při analýze koncentrace chápeme absorpci jako rozdíl mezi intenzitou světla na počátku a po průchodu suspenzí. Platí totiž, že množství světla absorbovaného suspenzí je přímo úměrné koncentraci částic v roztoku a délce dráhy světla. Graf koncentrace

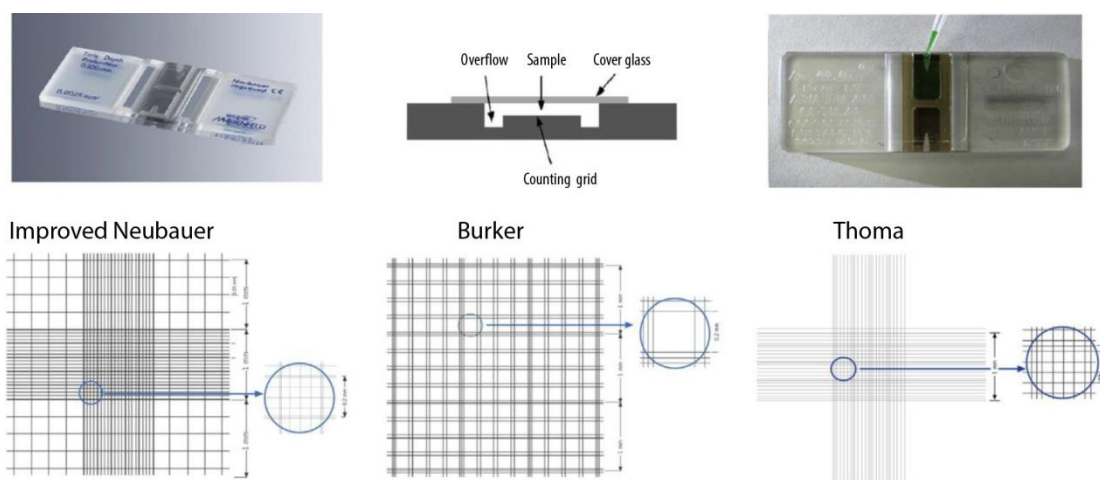
spermií dle absorpance vytváří přímku. Vše je závislé na vlnové délce, analýza se provádí za použití monochromatického světla. Pro hodnocení koncentrace spermií u domácích zvířat jsou používány vlnové délky mezi 500 a 650 nm (Brito et al. 2016).

#### 3.2.4.2.2 Hemocytometrické vyšetření

Mezi nejstarší metody hodnocení koncentrace spermií patří přímé spočítání spermií. Jedná se o poměrně jednoduchou a levnou metodu, při které je hodnocení spermií založeno na jejich přímé vizualizaci. Z těchto důvodů se tato metoda rozšířeně používá v andrologických laboratořích. Tato metoda vyžaduje použití komor, ve kterých jsou buňky pozorovány a počítány ve známé oblasti, což pak umožňuje výpočet počtu spermií na jednotku objemu. Hemocytometry jsou nejčastějším typem komor, které jsou používány k manuálnímu počítání spermií. Jedná se o tlusté podložní sklíčko obdélníkového tvaru, přičemž uprostřed se nachází střed sklíčka ve tvaru písmene „H“. Písmeno „H“ definuje dvě oddělené komory. Skleněné krycí sklíčko se drží ve specifické výšce nad povrchem počítacích ploch hřebeny, které se nacházejí po obou stranách písmene „H“. Někteří výrobci vyrábí speciální hemocytometry, avšak standardní hloubka počítacích komor je 100  $\mu\text{m}$ . Hemocytometr se připraví umístěním krycího sklíčka nad počítací mřížku. Přibližně 10  $\mu\text{m}$  vzorku se aplikuje po obou stranách počítacích komor do výřezu ve tvaru písmene V, přičemž kapalina je vtahována do komůrky na základě kapilárního účinku. Na každé počítací komůrce je vyrytá počítací mřížka, k dispozici jsou různé mřížkové vzory a hemocytometry jsou potom označovány názvem mřížkového vzoru (Brito et al. 2016; Hansen 2011).

Nejčastěji používaným mřížkovým vzorem pro hodnocení koncentrace spermií je tzv. Neubauer. Neubauer je mřížka, která je rozdělená do devíti velkých čtverců o velikosti 1  $\text{mm}^2$ . Čtverce umístěné ve čtyřech rozích mřížky jsou rozděleny do 16 menších čtverců (0,25  $\text{mm}^2$  nebo 0,0625  $\text{mm}^2$ ), zatímco centrální čtverec je rozdělen do 25 malých čtverců o ploše 0,2  $\text{mm}^2$  nebo 0,04  $\text{mm}^2$  (Jayme Barbedo 2013).

Dále je používána Bürkerova komůrka. Bürkerova komůrka je rozdělena na devět čtverců o velikosti 1  $\text{mm}^2$ . Ty jsou vymezeny třemi nepřerušovanými čarami (čtverce Q). Každý čtverec Q je rozdělen na 16 menších čtverců (0,2  $\text{mm}^2$  nebo 0,04  $\text{mm}^2$ ). Mřížka dle Thoma má centrální čtverec o rozměru 1  $\text{mm}^2$ , který je složený z 16 menších čtverců o ploše 0,2  $\text{mm}^2$  nebo 0,04  $\text{mm}^2$  (Brito et al. 2016).



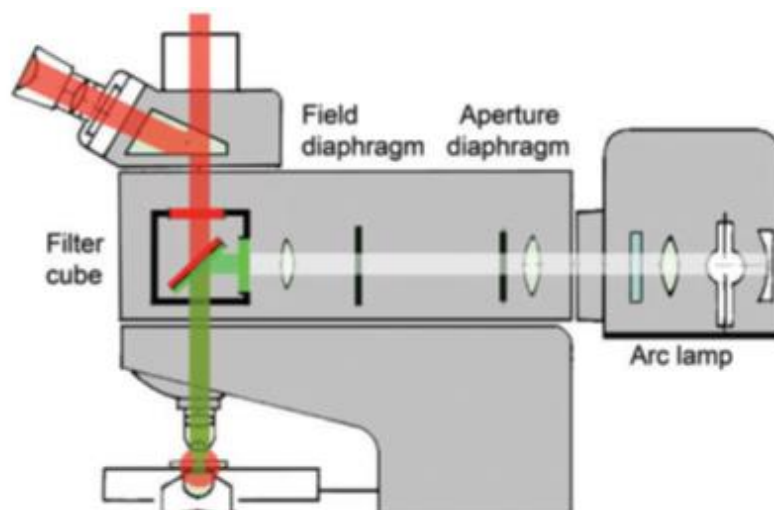
Obrázek 5: Možnosti počítacích mřížek. (Brito et al. 2016)

### 3.2.4.2.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je metoda, kterou lze sledovat fyziologii buněk. Jedná se o základní metodu používanou v oblasti buněčné biologie a biotechnologie, umožňující sledovat molekuly v živých či fixních buňkách (Shahsavani & Yousefi 2018). Pomocí fluorescenční mikroskopie lze například hodnotit integritu plazmatické membrány spermií, mitochondriální aktivitu, kapacitaci spermií a stav akrozomu. Jedná se o metodu, která představuje alternativu pro průtokovou cytometrii (Magistrini et al. 1997). Fluorescenční mikroskopie využívá toho, že buňky, které jsou předmětem zájmu, fluoreskují, tj. musí být schopné absorbovat energetické kvantum fotonů a uvolňovat energii emisí světla respektive fluorescencí. Fluorescence je emise světla, ke které dochází v nanosekundách. Dochází k filtraci světla s krátkou vlnovou délkou za účelem vizualizace světla s dlouhou vlnovou délkou. Důležitý faktor ovlivňující funkčnost fluorescenční mikroskopie je tzv. Stokesův posun, což je rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima. Stokesův posun určuje sílu fluorescence pro tzv. fluorofory, dobu fluorescence a intenzitu fluorescenčního signálu, který lze z fluoroforu získat. Na základě této skutečnosti volíme vhodná fluorescenční barviva (Sanderson et al. 2014).

Fluorofory jsou látky, které jsou používány v mikroskopii díky svým fluorescenčním vlastnostem a schopnosti excitace (přesun elektronů z valenčních orbitalů na vyšší energetickou hladinu po dodání energie). V důsledku nárazu fotonu na fluorofory dochází vlivem dodání energie k excitaci fluoroforů. Po ní mají fluorofory tendenci ztrácet energii emisí světla a vrací se na svou energetickou hladinu. Z hlediska fluorescence je nejdůležitější

valenční orbital, jelikož určuje fluorescenční vlastnosti, excitační a emisní vlnovou délku. Excitovaný stav je nestabilní a molekuly v něm nejsou schopny setrvat dlouhou dobu. Přechod elektronů na vyšší energetickou hladinu znázorňuje tzv. Jablonského diagram. Ten popisuje základní stav (S0) a excitovaný stav S1 a S2 (singletové stavy), přičemž S2 má vyšší energii než S1 a S1 má vyšší energii než S0. V průběhu emise setrvává elektron delší dobu v excitovaném stavu S1, jelikož energetická mezera mezi S1 a S0 je širší oproti mezeře mezi S1 a S2 (Ogundele et al. 2013; Lichtman & Conchello 2005).



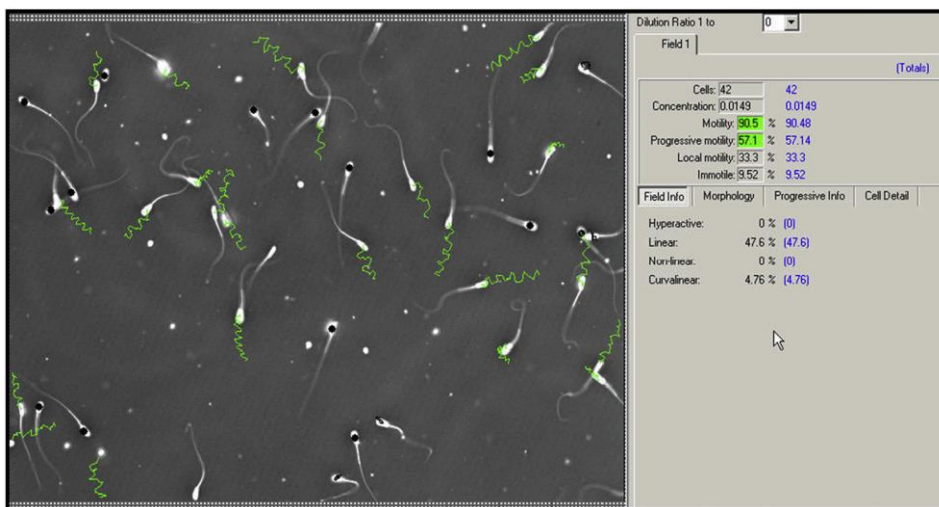
Obrázek 6: Schéma fluorescenčního mikroskopu (Lichtman & Conchello 2005)

#### 3.2.4.2.4 Počítačem asistovaná analýza spermií (CASA)

V případě počítačem asistované analýzy spermií (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis) mluvíme o automatizovaném systému (hardware a software), který vizualizuje a digitalizuje po sobě jdoucí obrazy. Jelikož je plocha obrazu známa, lze vypočítat objem a koncentraci spermií. CASA poskytuje přesné a smysluplné informace o pohyblivosti (motilitě) jednotlivých buněk (Amann & Katz 2004). Posouzení pohyblivosti spermií patří mezi důležité parametry jak při rutinní analýze spermií, tak i v experimentálních studiích. Systém CASA umožnil objektivnější hodnocení motility spermií (Palacín et al. 2013).

Některé systémy CASA dokáží hodnotit současně motilitu a morfologii spermií. Metoda může být mimo hodnocení motility použita i pro poměrně nenákladné a přesné odhady koncentrace spermií. Princip CASA je založen na vizualizaci a digitalizaci po sobě jdoucích snímků spermatu pomocí mikroskopu (hardwaru), po nichž dochází ke zpracování a analýze obrazu a následně identifikaci a počítání spermií (software). Existuje několik systémů CASA používaných pro analýzu zvířecích spermií, mezi systémy jsou rozdíly

především v hardwaru a softwaru (Amann & Waberski 2014). Systémy používají samostatné mikroskopy s nastavením, které je zabudováno ve speciálně navrženém zařízení. Manuální nebo automatické mechanické plošiny se používají k umístění vzorku na požadovanou souřadnici X/Y a pro nastavení zaostření na ose Z. Většina systémů využívá širokopásmové osvětlení ve viditelném spektru, přičemž je využíván mikroskop vybavený negativním (pozitivním) fázovým kontrastem. Snímky jsou následně zachyceny obrazovým snímačem CCD. Snímky jsou zachycovány v půlsekundových periodách s použitím předem stanovené frekvence pořizování snímků (např. 60 MHz), která je regulována pomocí spouště fotoaparátu nebo trváním impulsu osvětlení stroboskopem. Většina systému CASA používá patentovaný software k detekci spermií a vytváří tzv. centroid (tj. centrální bod na hlavě). Centroid se používá pro sledování trajektorií spermií. Detekce hlavy spermií je založena na definovaných parametrech, kterými jsou například rozměry, jas, počet pixelů. Změna těchto parametrů může výrazně ovlivnit výsledné stanovení koncentrace. Používají se různé algoritmy, a to pro rozlišení spermií s kříženou trajektorií nebo pro spermie, které se během hodnocení srazí. Další algoritmy jsou používány pro spermie, které vstoupí do hodnotící oblasti či z ní vystoupí v průběhu hodnocení. Vzorce, které se používají pro hodnocení spermií, jsou součástí softwarového balíčku. Oblast hodnocení je dána zvětšením, přičemž vyhodnocovaný objem je dán ještě hloubkou komory použité pro analýzu. Výpočty poskytují výsledné hodnoty popisující pohyb. Jedná se o parametry křivočará rychlost (VCL), průměrná rychlost (VAP), přímočará rychlost (VSL), amplituda laterálního posunu hlavy (ALH), linearita křivočará dráhy (LIN), přímot průměrné cesty (STR) a kmitočtová frekvence (BCF) (Brito et al. 2016).



Obrázek 7: Označení jednotlivých spermií dle pohyblivosti pomocí CASA (Brito et al. 2016)

Při počítačové analýze spermatu (CASA) je k detekci spermií používán software, na obrazovce (obrázek 7) je potom vidět, které spermie jsou nepohyblivé (v tomto případě označené černou tečkou) či které jsou pohyblivé (označeny zelenou linií). Počet spermií je automaticky kvantifikován. Je známa spousta faktorů, které ovlivňují výsledky CASA systému. Bylo prokázáno, že zvětšení, koncentrace spermií, rychlost snímání snímků, přítomnost nespermálních zbytků, které jsou rozlišeny jako spermie a typ komory výrazně ovlivňují výsledky CASA. Proto je nutné vzorky vizuálně pozorovat a případně zjištěné problémy odstranit úpravou vzorku (Brito et al. 2016). Primárním faktorem, který ovlivňuje výsledky hodnocení ejakulátu, je odborná způsobilost pracovníků, kteří musí být proškoleni, aby porozuměli systému metody CASA (Fraser & Group 1998).

### **3.3 Průtoková cytometrie**

Průtoková cytometrie je laserová technologie, která umožňuje uživateli zkoumat fenotypové a morfologické charakteristiky jednotlivých buněk (Kendall & Riley 2002).

Je to metoda, která byla zavedena v analýze ejakulátu znovu na počátku 80. let 20. století. Díky ní je možné reprezentativně analyzovat vzorek a to s ohledem na celý ejakulát. Bylo zjištěno, že pro analýzu ejakulátu je lepší vyhodnocovat vyšší počet spermií v řádech tisíců. Konvenční analýza představována hemocytometrickou metodou a fluorescenční mikroskopií toto hodnocení neumožňuje, ale lze ho dosáhnout s použitím průtokové cytometrie. Ta umožňuje lepší reprezentativnost analyzovaného vzorku, alespoň číselně, neboť s touto technikou lze během několika sekund snadno vyhodnotit tisíce spermií (Peña 2015). Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje rychlé a automatizované počítání velkého počtu spermií, dokonce i několika desítek tisíc. Schopnost rychlého počítání spermií v kombinaci se schopností vyloučit nespermatické komponenty ejakulátu a také další buněčné typy činí průtokovou cytometrii velmi přesnou metodou pro určení koncentrace spermií (Brito et al. 2016).

Průtoková cytometrie využívá při hodnocení spermií a jejich oddělení od jiných částic jejich rozptýlení v suspenzi (Hafez 2000).

Rutinní použití průtokové cytometrie je omezeno relativně vysokými náklady na vybavení, potřebou kvalifikovaného pracovníka a složitostí metod, kterými se připravují vzorky a hodnotí data. Dnes je tato metoda používána spíše pro výzkumné účely či ověření správnosti jiných metod. I přesto se použití této metody pro hodnocení spermatu v posledních letech zvýšilo (Brito et al. 2016).

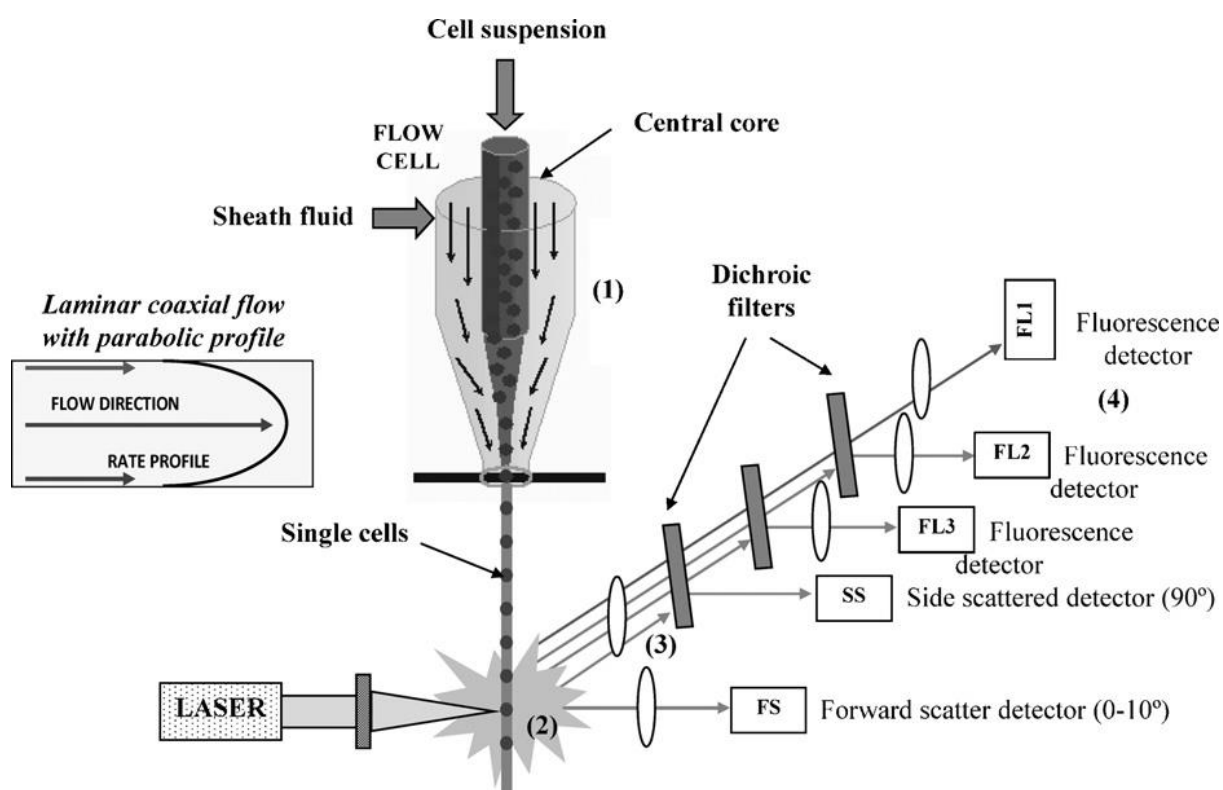
### 3.3.1 Princip

Průtoková cytometrie využívá detekci rozptylu světla a fluorescenci jednotlivých buněk k určení koncentrace spermií v ejakulátu a fenotypové a morfologické charakteristiky jednotlivých buněk. Aplikace vzorku je založena na přesných objemech, a to z důvodu eliminace odchylek vzniklých pipetováním, které se vyskytují u jiných metod. Přístroje pro dávkování přesných objemů, jsou buď opatřeny pevně umístěnými elektrodami, které detekují pokles hladiny kapaliny nebo vybaveny vysoce přesnými injekčními stříkačkami pro vstříkávání předem určených objemů vzorků do systému. Průtokové cytometry využívají hydrodynamickou nebo akustickou fokusaci, která umožňuje uspořádání náhodně rozptýlených spermií ve vzorku do proudu, ve kterém jsou seřazeny za sebou. Při průchodu vyšetřovací komorou jsou pak vystaveny laserovému paprsku. Spermie, kterými prochází paprsek, rozptylují světlo a pokud jsou obarveny fluorochromy, tak fluoreskují. Na základě rozptylu, lze určit velikost částic a separovat spermie od ostatních buněk a nečistot (Brito et al. 2016).

Hmotnostní cytometrie představuje nový přístup, který využívá pro označení stabilní izotopy kovů, jež jsou detekovány pomocí atomové hmotnostní spektroskopie. Pro analýzu jsou používány protilátky, které se navážou na stabilní izotopy kovů a tím je označí. Navázané protilátky jsou následně detekovány hmotnostním spektrometrem. Samotná analýza probíhá tak, že jsou buňky vstříkovány do argonové komory, kde se ionizují a atomizují, přičemž vytváří iontovou mlhu, která je analyzována hmotnostním spektrometrem. Ten měří obsah kovů v buňce. Výhoda hmotnostní cytometrie spočívá v současném hodnocení více než 40 buněčných parametrů, přičemž jsou rozlišeny jednotlivé buňky. Další výhodou je, že hmotnostní cytometrie není omezena na zkoumání jedné buněčné úrovně metabolismu, tedy hladiny proteinu, posttranslační modifikace a produkty proteolýzy mohou být kvantifikovány z jednoho experimentu. Nevýhodou hmotnostní cytometrie je, že během experimentu dochází ke zničení všech analyzovaných buněk, které nemohou být použity pro další vyšetření (Cosma et al. 2017).

Další modifikací představuje zobrazovací průtoková cytometrie, která kombinuje funkce průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Zobrazovací průtoková cytometrie umožňuje multiparametrickou fluorescenční a morfologickou analýzu několika tisíců buněk. Průtokový cytometr je schopný zachytit obraz každé částice, která prochází detektorem. IFC umožňuje hodnocení morfologických vlastností v jedné buňce i v populaci. Pomocí průtokové cytometrie lze třídit savčí spermie dle pohlaví. Metoda je založena na přesném barvení DNA

spermií fluoroforem, Hoechst 33342 který je specifický pro nukleovou kyselinu, přičemž dochází k rozlišení subpopulací X a Y. Zbarvené spermie se potom třídí pomocí vysokorychlostního třídiče. FACS je fluorescenčně aktivovaný buněčný třídič, který umožňuje současně barvit, analyzovat a třídit buňky. Lze roztrždit až 8 000 spermií za sekundu. Třídění tedy poskytuje subpopulace X nebo Y, přičemž ty jsou shromážděny do podpůrných médií a mohou být použity pro umělou inseminaci či oplodnění in vitro. Toto předurčení pohlaví lze využít u spousty druhů savců představující skot, ovce, kozy, prasata, kočky, psi a další (Garner 2006; Herzenberg et al. 2002).



Obrázek 8: Schéma průtokového cytometru (Díaz et al. 2010)

### 3.3.2 Hodnocení spermií pomocí průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je používána pro hodnocení spermií z hlediska posouzení více parametrů současně, proto poskytuje spolehlivější výsledky, které umožňují spolehlivější odhad oplodňovací schopnosti spermií (Peña 2015). Po provedení této analýzy jsou spermie obarveny a množství barviva absorbováno každou spermií je měřeno průtokovým cytometrem, který je schematicky znázorněn na obrázku 8. Informace o jednotlivých spermiích lze získat díky tomu, že jsou ze vzorku vstříkovány do uzavřeného kanálku, kterým



proudí tekutina (Graham 2001). Tekutina obsahující buňky opouští uzavřený kanálek a rozkládá se v určité vzdálenosti od trysky na jednotlivé kapky, z nichž každá má schopnost udržet jednu buňku. To je principem tzv. technologie jet-in-air. Velikost jednotlivých kapiček závisí na nastavení přístroje a velikosti otvoru trysky. Pohybuje se v rozsahu 40–200 mikronů. Proud kapiček potom prochází paprskem laseru, který způsobí fluorescenci jednotlivých barviv spojených se spermií. Nevýhodou proudových třídičů (jet-in-air) je, že kapičky pohybující se ve vzduchu poskytují horší optické rozlišení v porovnání s kyvetovými třídiči. Výhodou je vysoká rychlost třídění. Při použití kyvetových třídičů (cuvette-based cytometer) jsou buňky nuceny protékat kyvetou, která je opticky spojená s gelem, čímž je zajištěna interakce s laserem a dosažení lepšího rozlišení populace od pozadí (Schmid 2012).

Při průtokové cytometrii se využívá fotonásobič, tedy detektor schopný zachytit i slabé optické signály. Fotonásobič spojený s filtry umožňuje procházet pouze určitým vlnovým délkám světla a umožňuje určit, zda jednotlivé kapky obsahují či neobsahují buňku, a pokud buňku obsahují, tak zhodnotí specifickou barvu, s kterou je buňka spojena. Mimo toho, že je stanovena přítomnost či nepřítomnost fluorescenčních skvrn spojených s buňkami, je kvantifikováno i množství obarvení spojené s každou buňkou. Fluorescenční sondy jsou průtokovým cytometrem detekovány pouze ve spojení s buňkami (Drummond 2013). Fluorescenční sondy, které nejsou navázány na buňky, nemusí být před analýzou ze vzorku vymyty, ale je lepší barevný vzorek před analýzou průtokovou cytometrií promýt, aby se snížil tzv. signál pozadí, což je fluorescence pozadí, kterou vidět nechceme. Analýza spermií průtokovou cytometrií je založena na objektivním měření fluorescenčního barvení spojeného s buňkami objektivním způsobem. Touto metodou je možné měřit desítky buněk za sekundu a lze vyhodnotit více fluorescenčních barev současně v rámci jednotlivých spermií (Graham 2001).

### **3.3.3 Hodnocení jednotlivých parametrů**

#### **3.3.3.1 Hodnocení životnosti spermií**

V dnešní době existují postupy, které v rámci průtokové cytometrie současně vyhodnocují životaschopnost spermií, akrozomální integritu a funkci mitochondrií. Při této analýze jsou životaschopné spermie definovány jako buňky, které mají intaktní plazmatickou membránu. Tento parametr je hodnocen barvením vzorku spermií, např. propidium jodidem (PI), což je interkalační činidlo či jinými barvivy (Gillan et al. 2005). Buňky, které mají intaktní plazmatickou membránu, zabrání tomu, aby PI pronikal do buňky a barvil jádro.

Oproti tomu buňky, které mají poškozenou plazmatickou membránu, umožní pronikat PI do buňky a vázat se na DNA. Navázání činidla na DNA způsobí, že buňky fluoreskují červeně (Graham 2001). Stejně tak může být životnost spermií hodnocena barvením pomocí barviva ethidium homodimer (EH), které stejně jako PI proniká do buněk s poškozenou plazmatickou membránou, naváže se na DNA a způsobuje, že buňky fluoreskují rovněž červeně. Kombinace PI a SYBR-14 je pravděpodobně nejrozšířenějším barvením. SYBR-14 proniká i do spermií s neporušenou membránou (tedy je membránově propustný) a způsobuje u všech spermií zelenou fluorescenci. PI následně proniká do spermií s porušenou membránou a vytěsňuje, respektive zhasne fluorescenci způsobenou SYBR-14 (Anel & Paz 2010).

### 3.3.3.2 Hodnocení mitochondriální funkce

Hodnocení mitochondriální funkce u spermií je prováděno pomocí mitochondriální skvrny za pomoci rhodaminu123. Barva je transportována do aktivně dýchacích mitochondrií a akumulace rhodaminu123 následně způsobuje, že mitochondrie fluoreskuje zeleně. Tato metoda neumožňuje na základě zeleně fluoreskujících mitochondrií rozlišit různou respirační aktivitu mezi mitochondriemi (Anel & Paz 2010). Dále byla použita mitochondriální skvrna JC-1, a to k separaci spermií, které mají špatně funkční mitochondrii, od spermií, které mají vysoce funkční mitochondrii. JC-1 proniká rovněž jako rhodamin123 do mitochondrií a způsobuje fluorescenci funkčních spermií. V monomerním stavu fluoreskuje JC-1 zeleně stejně jako rhodamin123, nicméně jak se zvyšuje koncentrace JC-1 uvnitř mitochondrie, tak skvrna vytváří agregáty, které fluoreskují oranžově. Je tedy možné rozlišit buňky s vysoce funkčními mitochondriemi fluoreskujícími oranžově a buňky se slabě funkčními mitochondriemi fluoreskujícími zeleně (Gravance et al. 2000).

MitoTracker představují skupinu nedávno vyvinutých barviv, která akumulují a barví aktivní mitochondrie. Výhodou je, že jsou vysoce specifická, dostupná v širokém rozsahu emisní fluorescence a několik z nich je fixovatelných, což umožňuje oddálení analýzy (Anel & Paz 2010).

### 3.3.3.3 Hodnocení akrozomu spermií

Během procesu spermatogeneze dochází ke kontinuální modifikaci spermií, zrání spermií v nadvarleti a jejich kapacitaci v samičím pohlavním traktu. Pouze spermie po kapacitaci jsou schopné akrozomální reakce a mají schopnost penetrovat zonu pellucidu vajíčka (Tulsiani et al. 1998). Obvykle dochází k akrozomální reakci v ampuli vejcovodu.

Oxidační stres aktivovaný chlazením nebo mražením způsobuje nerovnováhu mezi reaktivními formami kyslíku a antioxidanty, které hrají důležitou roli při fyziologických procesech spermií, jako jsou kapacitace, akrozomální reakce a oplodnění vajíčka. Častou příčinou neplodnosti samců je absence či nedostatek spermií s intaktními akrozomy (Carretero et al. 2015).

Stav akrozomu může být posuzován na živých buňkách nebo na obarveném nátěru spermií. Po obarvení živých spermií může ihned dojít k jejich hodnocení pomocí mikroskopu nebo pomocí průtokové cytometrie. Existuje několik barvicích metod, které se používají pro barvení akrozomální oblasti, přičemž nedochází k obarvení postakrozomální oblasti hlavičky spermie. Pro barvení akrozomální oblasti lze použít Giemsovo barvení či Schiffovo činidlo, která jsou vhodná pro spoustu živočišných druhů. Při použití Giemsova barvení mohou být pozorovány čtyři různé modely spermií v případě obrazové průtokové cytometrie, (LAR: neobarvená oblast akrozomu a postakrozomální oblast), živé spermie s nepoškozeným akrozomem (LAI: růžový akrozom a neobarvená postakrozomální oblast), mrtvé spermie s akrozomem, u nichž proběhla akrozomální reakce (DAR: neobarvený akrozom, a tmavá postakrozomální oblast), mrtvé spermie s neporušeným akrozomem (obarvený akrozom a tmavá postakrozomální oblast). Bičíky spermií jsou také diferencované, u živých růžově zbarvené, u mrtvých tmavě zbarvené. Pomocí výše popsaných metod, lze odhalit pouze přítomnost či nepřítomnost akrozomálního obsahu, proto je možné pomocí nich vyhodnotit pouze dokončené akrozomální reakce. Vývoj metody trojitého fluorescenčního barvení umožnil současné vyhodnocení životaschopnosti spermií a neporušenosti akrozomu. Při použití průtokové cytometrie však může dojít k diskriminaci živých spermií s porušenou plazmatickou membránou, chybě při rozlišení spermií s poškozeným a nepoškozeným akrozomem a k chybnému rozpoznání specifických částic spermií od částic nespermatických (Budai et al. 2014).

### **3.4 Metody mražení spermatu**

Tolerance spermií hospodářských zvířat vůči zmrazení se mění podle jejich specifických vlastností, jako jsou velikost a tvar spermií a složení lipidů. Není proto možné vyvinout jednotný standardizovaný postup mražení spermií různých živočišných druhů. Proces zamražení spermatu umožňuje dlouhodobou ochranu genetických zdrojů u malých přežvýkavců a rozšíření umělé inseminace (AI) v denní produkci. Na rozdíl od beranů

obsahuje semenná plazma kozlů fosfolipázu A, která je produkována bulbouretrálními žlázami a která může ovlivnit negativně životaschopnost spermií po interakci s mlékem či vaječným žloutkem. Lepších výsledků kryokonzervace bylo dosaženo v období rozmnožování, kdy dochází k poklesu uvolňování fosfolipázy A bulbouretrálními žlázami (Ferreira et al. 2014). V současné době se jako ředidlo pro mražení ejakulátu používá sójový lecitin, který pro ejakulát kozlů představuje životaschopnou alternativu ředidel živočišného původu. Jako náhrada tradičního mražení ejakulátu může být použita vitrifikace nebo lyofilizace (Dessole et al. 2010).

Lyofilizace je proces, při kterém dochází k sušení buněk mrazem. Principem lyofilizace je sublimace ledových krystalků ve vzorku, nedochází tedy k přímému přechodu mezi kapalným a plynným skupenstvím, který bývá často spojen s poškozením buněk. Zmrazení ejakulátu je provedeno v lyofilizátoru, během prvotního sušení dochází ke snížení tlaku a aplikaci tepla na vzorek, čímž se iniciuje sublimace, přičemž výpary procházejí otvorem v uzávěru. Konec primárního sušení nastává, pokud jsou všechny ledové krystalky ze vzorku odstraněny. Sekundární sušení se uskutečňuje zvýšením teploty a snížením parciálního tlaku vodní páry v nádobě, výsledkem je lyofilizát spermií (Luño et al. 2014). Výhodou lyofilizace jsou nižší náklady, absence tekutého dusíku a následný malý prostor pro skladování spermií (Shahba et al. 2016). Nevýhodou lyofilizace je, že způsobuje nepohyblivost spermií a poškození jejich membrány. Nepohyblivé spermie mohou být sice aplikovány do vajíčka pomocí intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI), ale protože se jedná o vysoce komplikovanou metodu, nelze ji aplikovat jako alternativu umělé inseminace (Keskintepe & Eroglu 2014).

Další alternativu tradiční kryokonzervace představuje vitrifikace, což je metoda, která nevyžaduje použití kryoprotektantů používaných u konvenčního mražení spermatu. Principem je šokové zmrazení ponořením suspenze spermií přímo do tekutého dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), přičemž dochází k tuhnutí živých buněk bez tvorby ledových krystalků. Předpokládá se, že tak dochází k menšímu poškození spermií (Slabbert et al. 2015). Arando et al. (2019) provedli studii, ve které porovnávali motilitu spermií, akrozom a DNA u čerstvého, rozmraženého a vitrifikovaného ejakulátu beranů. Zjistili, že po vitrifikaci významně klesá motilita spermií, která se pohybovala od 2 do 7 %, naopak u čerstvého ejakulátu byla pohyblivost nejvyšší (92,2 %) a střední hodnotu pohyblivosti vykazovaly spermie u rozmraženého ejakulátu (42,2 %). Neporušenost akrozomu spermií byla zachována u čerstvého ejakulátu, u rozmraženého spermatu se výrazně snížila a ve vitrifikovaném vzorku byla téměř nulová. Rozdíly v DNA nebyly významné u jednotlivých vzorků. Proces mražení ejakulátu u malých

přežvýkavců se stále optimalizuje, jelikož jsou spermie náchylné k velmi nízkým teplotám a ty následně způsobují jejich poškození (Lv et al. 2018).

Mražení kozlího a beraního ejakulátu je komplexní proces. Výslednou kvalitu ejakulátu, a tím i úspěšnost následné umělé inseminace (AI) ovlivňuje celá řada faktorů. Spermie kozlů vyžaduje zvláštní podmínky pro maximalizaci životaschopnosti a plodnosti po rozmražení. Proces mrazení ejakulátu kozlů a jeho následné rozmrazení snižuje životaschopnost spermií, stejně jako u ostatních druhů hospodářských zvířat. Obecně platí, že přibližně 50–60 % populace spermií přežije kryokonzervaci. Pokud počet plně funkčních spermií klesne pod požadovanou hranici, pak je plodnost negativně ovlivněna. Míra oplodnění při použití rozmraženého kozlího ejakulátu se po intravaginální AI pohybuje v rozmezí 7–79 % (Bispo et al. 2011). Procentuální plodnost po použití rozmraženého ejakulátu kozlů v různých zemích je prezentován v tabulce 5. Mezi faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu, patří stejně jako u čerstvého semene sezóna, plemeno, věk kozlů a pracovní postupy zvolené pro práci se vzorkem (Gangawar et al. 2016).

### 3.4.1 Obecný postup

Procesu mrazení beraního i kozlího ejakulátu předchází posouzení kvality ejakulátu. Po posouzení dochází k ředění pomocí ředidel, která mohou být na bázi Tris, fruktózy, glukózy, kyseliny citronové, glycerolu, antibiotik a žloutku. Ředění je možné provést jednostupňovou nebo dvoustupňovou metodou. U dvoustupňové metody je ejakulát zředěn ředidlem, které neobsahuje glycerol, a následně je přidáno ředidlo glycerol obsahující. Při jednostupňové metodě je ejakulát před ekvilibrací ředěn při nízké teplotě ředidlem obsahujícím glycerol. Po zředění dochází k pomalému ochlazení (minimálně během 1,5–2 hodin) spermatu ovcí na teplotu 5 °C. Zchlazené sperma je ekvilibrováno při teplotě 5 °C po dobu 2 až 4 hodin. Během ekvilibrace se spermie přizpůsobuje redukovanému metabolismu. Ekvilibrační proces způsobuje, že kryoprotektanty (především glycerol) vstupují do buněk. Dochází k vytvoření rovnovážného stavu mezi extracelulární a intracelulární koncentrací glycerolu či jiných osmoticky aktivních látek. Po nastolení rovnováhy je zředěný ejakulát uložen v peletách (0,1–0,2 ml) a mražen na povrchu suchého ledu (-79 °C) po dobu 2–4 minut. Chlazené sperma může být zmrazené také v pejetách s použitím automatického mrazicího stroje, v němž je rychlost mrazení -8 °C/ min. Dále mohou být použity chlazené nosiče, při jejich použití se pejety 7–10 minut předem namrazí 4–6 mm nad kapalným dusíkem (-75 až -125 °C). Nakonec se předem zamrazené sperma ponoří do kapalného

dušiku. Pelety se obvykle rozmrazují během 30–60 sekund ve vodní lázni o 35–40 °C. Pelety se oproti tomu rozmrazují v předeřátém rozmrazovacím roztoku (mokrý cesta). Dále se pelety mohou rozmrazit suchou cestou, s použitím suchých skleněných tub. V případě mražení kozlího ejakulátu, může být glycerol doplněn ve dvou krocích. Konečná koncentrace glycerolu je 6–7 % (beran 4–6 %). Ejakulát kozla je zbaven nežádoucích složek plazmy, jinak vše probíhá obdobně jako při kryokonzervaci ejakulátu berana. Při koncentraci spermií 80–500 × 10<sup>6</sup> spermií/ml lze u zmrazených spermií kozlů dosáhnout přijatelné plodnosti (Lv et al., 2018).

Tabulka 5: Celková plodnost s použitím mraženého ejakulátu na různých místech světa (Gangawar et al. 2016)

Země	Procentuální plodnost (%)	Koncentrace spermií na dávku
Španělsko	43,6	200 × 10 <sup>6</sup>
Francie	60-83,5	120 × 10 <sup>6</sup>
Řecko	66,6	80 × 10 <sup>6</sup>
Austrálie	46,7	60 × 10 <sup>6</sup>
Norsko	73,6	75 × 10 <sup>6</sup>
Jižní Afrika	56	75 × 10 <sup>6</sup>

### 3.4.2 Ředidla a komponenty používané při mražení ejakulátu

Nejčastěji používaný prostředek pro kryokonzervaci kozlího ejakulátu je vaječný žloutek či odstředěné mléko. U obou však bylo prokázáno, že mohou poškozovat spermie. Kozlí spermie jsou náchylné k biochemickým a fyziologickým procesům, ke kterým dochází během mražení a rozmražení ejakulátu. V semenné plazmě jsou přesto přítomny specifické faktory zabraňující poškození způsobenému kryogenními postupy. Bylo prokázáno, že spermatické buňky udržují svou životaschopnost, pokud jsou zředěny žloutkovým médiem po odstranění semenné plazmy. Pokud je však celistvý ejakulát přidán do žloutkového média, dochází ke koagulaci a spermie umírá vlivem enzymu fosfolipáza A, který je součástí sekretu bulbouretrálních žláz, jež je známý jako enzym koagulující vaječný žloutek EYCE (Gangawar et al. 2016). Nunes et al. (2007) uvedli protein (SBU III) bulbouretrálního původu, který snižuje po kryokonzervaci vitalitu spermií při použití ředidel na bázi mléka.

Pro mražení ejakulátu se ukázalo jako optimální použití ředidla na bázi Tris s obsahem 6 % glycerolu. Jako alternativa byla navržena ředidla, která minimalizují interakci spermií

a semenné plazmy, kravské mléko bez lipidů, ředění bez triglyceridů. Následně bylo prokázáno, že neexistuje znatelný rozdíl mezi celistvým ejakulátem a ejakulátem zbaveným určitých složek. Ředidla používaná při kryokonzervaci jsou látky, které dodávají spermii energii, zajišťují ochranu před biochemickým a fyzikálním poškozením a udržují vhodné podmínky pro přežití. Ředidlo používané ke kryokonzervaci zahrnuje nepropustný kryoprotektant (mléko, žloutkové médium), penetrační kryoprotektant (glycerol, propylenglykol, dimethylsulfoxid), pufr (Tris), jeden či více cukrů (glukóza, laktóza, trehalóza), sůl (citrát sodný), organickou kyselinu (kyselina citronová), antibiotika jako penicilin a streptomycin (Purdy 2006).

Pro mražení ejakulátu se nejčastěji používá ředidlo bez sušeného mléka a ředidlo na bázi Tris obsahující glukózu. Různé modifikace těchto ředidel byly zkoumány s různými výsledky. Bylo zjištěno, že komerčně dostupné ředidlo na bázi sóji (Bioxcell®) je lepší než ředidlo na bázi vaječného žloutku (Irvine TYB), a to především z hlediska zachování motility mražených spermií při použití dvoustupňové metody (Roof et al. 2012).

Jiménez-Rabadán et al. (2012) porovnávali účinky ředidel u rozmraženého ejakulátu. Bylo porovnáváno komerčně vyráběné ředidlo na bázi vaječného žloutku Biladyl (20 % vaječného žloutku, 7% glycerol) a ředidlo na bázi sóji Andromed (přírasa na bázi sóji a 7% glycerol) s odstředěným mlékem (7% glycerol). Zjistili, že ředidlo na bázi přípravku vaječného žloutku Biladyl a ředidlo na bázi sóji Andromed je lepší než ředidlo na bázi odstředěného mléka. Nejnižší procento pohyblivých spermií v rozmraženém ejakulátu bylo při použití odstředěného mléka (17,7 %), nejvyšší hodnoty vykazoval vzorek s komerčně vyráběným přípravkem Biladyl (45,3 %) a střední hodnota byla zjištěna u přípravku Andromed (38,8 %). Při použití ředidla na bázi sóji (Andromed) bylo zjištěno nejvyšší procento spermií s neporušeným akrozomem (67,6 %), o něco méně spermií s neporušeným akrozomem vykazovalo ředidlo na bázi vaječného žloutku (61,3 %) a nejméně neporušených spermií bylo u odstředěného mléka (53,5 %). Výsledky několika studií ukazují, že Tris-kyselina citronová poskytuje nejvýhodnější pufovací systém a je nepřizpůsobivější ke spermii kozlů.

Významným faktorem ovlivňujícím spermie je pH. Změny pH semene mohou vést k buněčnému a subbuněčnému poškození spermií. Pro zachování životaschopnosti a oplození schopnosti je nezbytné udržovat vhodné prostředí. Důležitou roli hraje v tomto ohledu pufr obsažený v kryokonzervačních prostředcích. Ideální pufr by měl mít neutrální pH, vysokou rozpustnost ve vodě, minimální rozpustnost v ostatních rozpouštědlech, minimální účinky na soli, vyšší iontové síly a chemickou stabilitu. Pufr zvyšuje fyzikální a chemickou stabilitu

plazmatické membrány, přičemž neutralizuje kyseliny vznikající během skladování (Gangawar et al. 2016). Bylo zjištěno, že hodnota pH má významný vliv na motilitu a dýchání spermií, přičemž optimální hodnota pH pro spermie kozlů je 7,2 a pro spermie beranů 6–6,5. Při těchto hodnotách spermie vykazují nejvyšší příjem kyslíku a největší pohyblivost (Purdy 2006; Fukushara & Nishikawa 2011; Bartoov et al. 1980).

#### 3.4.2.1 Kvalita ejakulátu po kryokonzervaci a rozmražení

Lopez Saez et al. (2002) zkoumali různé účinky tří různých typů ředidel na kvalitu ejakulátu u beranů při skladování za teploty 5 °C po dobu šestnácti dní. Jako ředidlo bylo použito odstředěné mléko (M), TesT (TE) a ředidlo Tris-trehalosa (TR). Z parametrů ejakulátu byla zkoumána pohyblivost spermií a procento nepoškozených akrozomů. Hodnocení bylo prováděno každých 24 hodin a bylo zjištěno, že nejvyšší pohyblivost byla zachována u vzorku ejakulátu s použitím ředidla TR ( $94,7 \pm 1,36$  %), menší hodnota byla naměřena u ředidla TE ( $82,4 \pm 3,08$  %) a středních hodnot potom dosáhl vzorek s použitím ředidla M ( $89,3 \pm 2,17$  %). Nejvyšší procento spermií s neporušeným akrozomem bylo prokázáno u ředidla M ( $98,3 \pm 0,83$  %), zatímco nejnižší procento bylo zjištěno při použití ředidla TR, kde bylo o více než 6 % spermií s nepoškozeným akrozomem méně, střední hodnotu potom vykazovalo ředidlo TE ( $93,4 \pm 2,5$  %). Do média určeného ke konzervaci se přidávají sloučeniny různého charakteru, jednou z nich je trehalóza, což je syntetizovaný disacharid používaný jako zdroj energie pro spermie a jako kryoprotektant. Bylo prokázáno, že trehalóza chrání membrány buněk, a dále byl prokázán její pozitivní vliv na motilitu spermií u zmrazeného ejakulátu kozlů. Ve studii byl prokázán i významný vliv teploty skladování na kvalitu ejakulátu, přičemž bylo zjištěno, že spermie skladované při teplotě 5 °C vykazují vyšší parametry životaschopnosti a pohyblivosti po delší dobu oproti spermii skladovaným při teplotě 15 °C.

Soltanpour & Moghaddam (2014) zkoumali vliv ředidel, u kterých se lišilo procentuální zastoupení glycerolu a žloutku. Studie byla provedena na čtyřech dospělých beranech, přičemž ejakulát byl odebírán s pomocí umělé vagíny. Po odběru byly vzorky smíchány s ředidly. První ředidlo bylo naředěno v poměru 1:3, obsahovalo 3,786 g Tris, 2,172 g kyseliny citrónové a 1 g fruktózy ve 100 ml destilované vody, následně bylo doplněno 5 % (v/v) glycerolu a 5 % vaječného žloutku, penicilinem (100 000 IU) a streptomycinem (100mg). Druhé ředidlo bylo naředěno také v obsahu 1:3, přičemž obsahovalo 2,71 g Tris, 1 g kyseliny citrónové a 1,4 g fruktózy ve 100 ml destilované vody a dále doplněno o 7 % (v/v) glycerolu a 20 % vaječného žloutku, penicilin (100 000 IU) a streptomycin (100 mg).



Naředěné vzorky byly zamrazeny a v tekutém dusíku a po rozmrazení při 37 °C bylo posouzeno pH, životaschopnost spermií a pohyblivost v průběhu 3 dnů skladování po rozmražení. Tris působil jako pufr zabraňující výkyvům pH, fruktóza a kyselina citronová představovaly zdroj energie. U vaječného žloutku bylo prokázáno, že ochraňuje buněčnou membránu během chlazení a glycerol chrání spermie před poškozením membrány během procesu zmrazování. Z výsledků studie vyplynulo, že ředidlo obsahující 7 % glycerolu a 20 % vaječného žloutku prokázalo vyšší stupeň ochrany spermií než ředidlo obsahující 5 % glycerolu a 5 % vaječného žloutku. Přesnější výsledky jsou znázorněny v tabulce 6. Dále bylo prokázáno, že u rozmrazených ejakulátů s dobou skladování klesá procento životaschopných spermií a snižuje se pohyblivost spermií, což uvádí i Lopez Saez et al. (2002).

Afroz et al. (2008) zkoumali vliv ředidel, chlazení a rozmrazení na pohyblivost spermií u černých bengálských kozlů. Použita byla ředidla Tris a Triladyl, přičemž po naředění se pohyblivost spermií pohybovala v rozmezí 75–76,67 % pro ředidlo Triladyl a 73,33–80 % pro ředidlo Tris. Po ochlazení naředěného spermatu na 5 °C došlo k poklesu pohyblivosti spermií u obou vzorků. Ejakuláty, které byly naředěné pomocí Triladyl vykazovaly po 4 hodinách ekvilibrace pohyblivost 65–66,67 %, kdežto při použití Tris dosahovala pohyblivosti až 70 %. Dobu ekvilibrace trvající 4 hodiny uvádí jako optimální i Deka & Rao (1986). Poté byl ejakulát zmražen ponořením do tekutého dusíku a po rozmražení dosahovala u ředidla na bázi Triladyl hodnota pohyblivosti rozmezí 38,33–43,33 %, oproti tomu při použití ředidla na bázi Tris se pohybovali hodnoty pohyblivosti spermií u rozmrazeného ejakulátu pouze v rozmezí od 6 do 6,67 %. Azawi et al. (1993) však uvádí nejvyšší procento pohyblivosti spermií právě při použití ředidla na bázi Tris, což je v rozporu s tím, co ve své studii zjistili Afroz et al. (2008).

V rámci mražení ejakulátu byly vyzkoušeny různé typy aditiv za účelem delší doby skladovatelnosti a vyšší přežitelnosti spermií po rozmražení. Azawi & Hussein (2013) zkoumali vliv přídatku vitamínu C a vitamínu E do ředidla na bázi Tris na životnost spermií beranů plemene awassi při teplotě 5 °C, přičemž byly použity vzorky od šesti dospělých samců. Každý vzorek byl rozdělen na tři části, přičemž jedna část byla obohacena přídatkem 0,9 mg/ml vitamínu C, druhá část byla obohacena o 1 mg/ml vitamínu E a třetí část představovala kontrolu, tedy byla bez jakéhokoli přídatku. Vzorky byly skladovány po dobu pěti dnů a každých 24 hodin byly spermie obsažené ve vzorcích testovány na motilitu, vitalitu, abnormality spermií a defekty akrozomů. Výsledky studie ukázaly, že vzorky s přídatkem vitamínů C a E vykazovaly vyšší životaschopnost po dobu 120 hodin ve srovnání s kontrolní skupinou. Vyšší procento abnormálních spermií a defektů akrozomů vykazoval

vzorek bez přísadků vitamínu C, ve kterém se hodnoty pohybovaly od 37,6 do 71,5 %. Oproti tomu u vzorku obohaceného o vitamín C bylo procento výskytu abnormálních spermií a defektů akrozomu pouze 18,8–52,8 %. Z výsledků je zřejmé, že přísadek antioxidantů jako jsou vitamíny C a E do médií používaných pro uchování spermatu by mohl zlepšit kvalitu a životnost spermií. Stejně tak byl zjištěn pozitivní vliv přísadku selenu buď individuálně či v kombinaci s vitamínem E na parametry ejakulátu po rozmrazení (Zubair et al. 2015).

Sarma et al. (2015) studovali vliv tří různých rychlostí mražení ejakulátu v tekutém dusíku, přičemž ejakulát byl odebrán z devíti dospělých kozlů. Rozlišeny byly tři rychlosti mražení: rychlost mražení I (od 4 °C do -5 °C rychlostí mražení 4 °C/min; od -5 °C do -110 °C při rychlosti mražení 25 °C/min a od -110 °C do -140 °C rychlostí 35 °C/min), rychlost mražení II (od 4 °C do -12 °C rychlostí 4 °C/min; od -12 °C do -40 °C rychlostí 40 °C/min a od -40 °C do -140 °C rychlostí 50 °C/min), rychlost mražení III (od 4 °C do -10 °C rychlostí 5 °C/min, od -10 °C do -100 °C rychlostí 40 °C/min a od -100 °C do -140 °C rychlostí 20 °C/min). Ejakulát byl před hodnocením rozmražován ve vodní lázni o teplotě 40 °C po dobu 20 sekund. Byla studována motilita spermií a procento živých spermií v závislosti na rychlosti mražení. V této studii byla pohyblivost spermií po rozmrazení ( $69,73 \pm 1,19$  %) a procento živých spermiích ( $75,37 \pm 1,36$ %) nejvyšší při použití rychlosti mražení II. Z výsledků vyplývá, že procento pohyblivých a živých spermií je významně vyšší při rychlém způsobu mražení oproti metodám pomalého mražení (I, III). Podrobnější přehled poskytuje tabulka 6. Byrne et al. (2000) zkoumali vliv rychlosti mražení na kvalitu ejakulátu u šesti dospělých beranů. Spermie beranů jsou nejvíce náchylné k poškození mezi teplotami -10 °C až -25 °C. Cílem studie bylo zjistit, jak rychlost mražení v tomto kritickém teplotním rozpětí ovlivní fertilitu spermií. Byly použity dvě různé rychlosti mražení, rychlá (5 °C/min od 5 °C do -25 °C) a pomalá 0,5 °C/min od 5 °C do -25 °C. Přičemž i v této studii byly lepší výsledky spojené s vyšší rychlostí mražení spermií.

Další z faktorů, který může ovlivnit kvalitu ejakulátu po procesu kryokonzervace je metoda rozmražení. Nicolae et al. (2014) zkoumali vliv různých rozmrazovacích metod na kvalitu ejakulátu u pěti dospělých beranů. Bylo použito pět variant rozmrazování, rozmrazování při teplotě 90 °C po dobu 2 sekund, rozmrazování při teplotě 75 °C po dobu 10 sekund, rozmrazování při teplotě 75 °C po dobu 5 sekund, rozmrazování při teplotě 50 °C po dobu 30 sekund a rozmrazování při 39 °C po dobu 120 sekund. Výsledky studie ukázaly, že motilita a životaschopnost spermií byla významně vyšší při použití nižších teplot po delší dobu. Lepší výsledky vykazovaly ejakuláty rozmražené při teplotách 39 °C a 50 °C (pohyblivost  $39 \pm 2,08$  % pro 39 °C a  $45 \pm 2,24$  % pro 50 °C; životaschopnost  $45,61 \pm 1,83$  %

pro 39 °C a  $52,47 \pm 2,25$  % pro 50 °C) oproti ostatním způsobům rozmrazení, při kterých se pohyblivost spermií pohybovala od 10 % do 20 % a procento životaschopných spermií kolísalo od 7 % do 30 %.

Tabulka 6: Vliv tří různých rychlostí mražení na kvalitu ejakulátu (Sarma et al. 2015)

	pohyblivost spermií (%)	živé spermie (%)
rychlost mrazení I	$66,07 \pm 0,69$	$70,67 \pm 0,75$
rychlost mrazení II	$69,73 \pm 1,19$	$75,37 \pm 1,36$
rychlost mrazení III	$66,47 \pm 1,04$	$71,83 \pm 1,24$

Technika AI u ovcí musí být zvolena na základě typu použitého spermatu. Rozmražené sperma se nedoporučuje používat pro intravaginální inseminaci, ale může být použito pro inseminaci intracervikální. Výsledky plodnosti po intracervikální inseminaci jsou relativně malé, protože při použití intracervikální inseminace se pouze malé procento spermií dostane k vajíčku. Většina spermií aplikovaných do krčku dělohy je vlivem tlaku vyloučena přes vulvu nebo fagocytována v reprodukčním traktu samic (O'Meara et al. 2005). Vzhledem k anatomii děložního hrdla ovcí se pro umělou inseminaci dá použít pouze velmi malý objem ejakulátu. Děložní hrdlo u ovce je dlouhé a je tvořeno převážně pojivovou tkání, lumen je velmi spletitý vlivem přítomnosti cervikálních kroužků (4-7), které poskytují fyzickou bariéru pro vnější kontaminanty. Cervikální kroužky představují hlavní bariéru pro intracervikální inseminaci, jelikož vlivem jejich zvrásnění dochází často k nesprávnému nasměrování pipety a pipeta je zřídka zavedena do cervikálního kanálu na více než 1 cm (Kershaw et al. 2005). Objem ejakulátu používaný pro intracervikální inseminaci je menší než 0,25 ml a obsahuje relativně malý počet spermií ( $0,2 \times 10^9$ ), z důvodu zabránění zpětnému výtoku ejakulátu. Velikost ředění je v případě intracervikální inseminace omezena na 1:1 až 1:4, což představuje nedostatečnou ochranu ejakulátu vůči chladovému šoku, či mrazovému poškození. Největší význam má v dnešní době laparoskopická intrauterinní inseminace, při které je sperma aplikováno přímo do lumen děložních rohů, což je blíže místu oplodnění v porovnání s předchozími metodami. Díky laparoskopické inseminaci je možné obejít bariéru představovanou krčkem děložním a snížit množství ejakulátu používaného při AI. Počet spermií potřebných pro inseminaci je menší, přičemž objem dávky je vyšší, což umožňuje ředění ejakulátu ve vyšším poměru, a tím lepší ochranu spermií. Při použití laparoskopické AI je používán mražený ejakulát, což má potenciál při šíření cenných genotypů. Při správném provedení se úspěšnost této metody pohybuje v rozmezí 60–75 %. AI

koz je velmi podobná jako u ovcí, je však mnohem snadnější dosáhnout intrauterinní inseminace přes děložní hrdlo, jelikož to je daleko prostupnější než u ovcí (Solti et al. 2012).

Tabulka 7: Výsledky hodnocení rozmrazeného ejakulátu při použití dvou různých ředidel (Soltanpour & Moghaddam 2014)

	<b>pH</b>	<b>životaschopnost (%)</b>	<b>progresivní pohyb (%)</b>
vzorek 1	6,8 ± 0,08	60,33 ± 2,79	57,2 ± 2,76
vzorek 2	6,9 ± 0,07	65,5 ± 2,44	61,45 ± 2,43

## 4 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo podat ucelený přehled vybraných metod používaných pro hodnocení kvality ejakulátu beranů a kozlů. Hodnocení ejakulátu beranů a kozlů je v současné době realizováno rutinními laboratorními metodami, jejichž nevýhodou je časová náročnost a nepřesnost získaných výsledků. Metoda průtokové cytometrie představuje inovativní metodu, která není součástí rutinního vyšetření ejakulátu a je používána spíše pro výzkumné účely. Velký význam by mělo zavedení průtokové cytometrie jako metody pro hodnocení ejakulátu v praxi, jelikož přesnější výsledky poskytované touto metodou, by mohly představovat pokrok v optimalizaci konzervace a rozmrazení ejakulátu.

Kvalita ejakulátu po rozmrazení a předešlé kryokonzervaci se značně snižuje především z hlediska pohyblivosti, životaschopnosti a poškození akrozomu spermií. Rychlost zmrazení a rozmrazení ovlivňuje výše popsané parametry, přičemž lepší výsledky byly zjištěny při použití vysoké rychlosti zmrazení ejakulátu. Naopak pro rozmrazení ejakulátu byly vhodnější nižší teploty a delší doba rozmrazování. Pozitivní vliv na kvalitu spermií byl prokázán u některých aditiv, například selen, vitamin E a vitamin C. U kozla byl prokázán negativní vliv enzymu produkovaného bulbouretrálními žlázami kozla, fosfolipázy A, který při reakci s vaječným žloutkem či mlékem snižuje životaschopnost spermií. Enzym produkovaný bulbouretrálními žlázami kozla, fosfolipáza A, negativně ovlivňuje životaschopnost spermií při reakci s vaječným žloutkem, ale u berana se nevyskytuje.

Aplikace inhibitoru fosfolipázy A by mohla ovlivnit životaschopnost spermií u kozlího ejakulátu po kryokonzervaci. Přičemž optimalizace dalších faktorů, představujících rychlost mražení a rozmrazení ejakulátu, přidavek aditiv či ředidel a poměr ředění by mohly přinést zefektivnění procesu kryokonzervace u malých přežvýkavců.

## 5 Literatura

- Abecia JA, Forcada F, González-bulnes A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science* **130**:173–179. Elsevier B.V.
- Afroz S, Islam MR, Khandoker MAMY, Akter QS. 2008. Cryopreservation of Black Bengal buck semen: Effects of diluents and freezing on sperm motility and morphology. *Animal Science Journal* **79**:550–553.
- Aguiar G V, Tilburg MF Van. 2013. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season ' s influence on the cooling of semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **65**:6–12.
- Al-ghalban AM, Tabbaa MJ, Kridli RT. 2004. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small Ruminant Research* **53**:141–149.
- Almeida AM, Schwalbach LMJ, Cardoso LA, Greyling JPC. 2007. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Boer bucks fed winter veld hay: The effect of nutritional supplementation. *Small Ruminant Research* **73**:216–220.
- Amann RP, Katz DF. 2004. Reflections on CASA After 25 Years Andrology Lab Corner \*. *Journal of Andrology* **25**:317–325.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Theriogenology Computer-assisted sperm analysis ( CASA ): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**:5–17.e3. Elsevier Inc.
- Anel L, Paz P De. 2010. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:67–78.
- Arando A, Delgado J V., Arrebola FA, León JM, Alcalá CJ, Pérez-Marín CC. 2019. Vitrification induces critical subcellular damages in ram spermatozoa. *Cryobiology* **87**:52–59. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.02.005>.
- Azawi OI, Al-Dahash SYA, Juma FT. 1993. Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Ruminant Research* **9**:347–352.
- Azawi OI, Hussein EK. 2013. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at C. *Veterinary Research Forum* **4**:157–160.
- Barszcz K, Wiesetek D, Wasowicz M, Kupczynska M. 2011. Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science* **4**.
- Bartoov B, Bar-Sagie D, Mayevsky A. 1980. The Effect of pH on Ram Sperm Collective

- Motility Driven by Mitochondrial Respiration. *International Journal of Andrology* **3**:602–612.
- Bispo CAS, Pugliesi G, Galvão P, Rodrigues MT, Ker PG, Filgueiras B, Carvalho GR. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Ruminant Research* **100**:54–58. Elsevier B.V.
- Boland MP, Al-Kamali AA, Crosby TF, Haynes NB, Howles CM, Kelleher DL, Gordon I. 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. *Animal Reproduction Science* **9**:241–252.
- Bongso TA, Jainudeen MR, Siti Zahrah A. 1982. Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. *Theriogenology* **18**:513–524.
- Braun WF, Thompson JM, Ross CV. 1980. Ram scrotal circumference measurements. *Theriogenology* **13**:221–229.
- Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ. 2014. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Ruminant Research* **119**:114–119. Elsevier B.V.
- Brito LFC et al. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* **85**:1507–1527. Elsevier Inc.
- Budai C, Egerszegi I, Oláh J, Jávör A, Kovács A. 2014. Application of semen evaluation techniques. *Agrártudományi közlemények* **59**:5–12.
- Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science* **62**:265–275.
- Cardeal C, Alberton LR, Boscarato AG, Rocha MV, Marchetti LGL, Macedo GG, Lourenço ELB, Martins LF. 2017. Comparative study between the hemocytometric and spectrophotometric methods for measuring the sperm concentration of young Nelore bulls. *Semina:Ciencias Agrarias* **38**:3605–3612.
- Carretero MI, Fumuso FG, Neild DM, Giuliano SM, Cetica P, Miragaya MH. 2015. Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Animal Reproduction Science* **160**:1–11. Elsevier B.V.
- Carvajal-serna M, Cardozo JA, Grajales-lombana H, Cebrián-pérez JA, Muiño-blanco T. 2018. Sperm quality and seminal plasma proteins in three sheep breeds under high altitude and tropical conditions.
- Catunda AG V et al. 2011. Characterization of ejaculates from crossbreed male goats raised in

- tropical environment. *Revista portuguesa de Ciências Veterinárias* **110**:59–67.
- César J et al. 2017. *Revista Brasileira de Zootecnia* Seasonal variation in the reproductive activity of male goats raised under tropical climate conditions. *Brazilian Journal of Animal Science* **46**:192–201.
- Constantinescu GCI. 2010. Functional anatomy of the goat. Pages 89–137 *Goat science and production*. Available from <http://enooriyan.persianguig.com/Book/Goat Science and Production.pdf>.
- Cosma A, Nolan G, Gaudilliere B. 2017. Mass cytometry: The Time Settle Down. *Cytometry A*. **91**:12–13.
- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants ♂. *Animal Reproduction Science* **130**:187–192. Elsevier B.V.
- David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, Druart X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*.
- Deka BC, Rao AR. 1986. Effect of glycerol level in Tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology* **26**:231–238.
- Dessole S, Isachenko E, Nawroth F, Isachenko V, Katkov II. 2010. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online* **6**:191–200. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Dhurvey M, Gupta VK, Nema SP, Patidar A, Shivhare M, Singh N, Shakya V. 2012. Modern semen evaluation techniques in domestic animals : A review. *Dhr-Ijbls* **3**:62–83.
- Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* **48**:385–407.
- Domínguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sánchez E, Cesari A, Alberio RH. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* **69**:564–573.
- Dowsett KF, Knott LM. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* **46**:397–412.
- Drummond M. 2013. Principles of Flow Cytometry. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis* **16**:3–19.
- Erikson DW, Health O. 2006. Role of osteopontin in bovine sperm capacitation and fertilization /:1–124.



- Ferdinand N, Thomas TT, Augustave K, Henry DF, Fernand T, Etienne PT. 2012. Effects of Buck Age , Storage Duration , Storage Temperature and Diluent on Fresh West African Dwarf Buck Semen. *Journal of Reproduction and Infertility* **3**:58–66.
- Ferreira V da S, de Mello MRB, da Fonseca CEM, Dias állan CF, Cardoso JM, Silva RB, Júnior WPM. 2014. Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Revista Brasileira de Zootecnia* **43**:513–518.
- Fraser L, Group SI. 1998. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa **13**:142–145.
- Fukushara R, Nishikawa Y. 2011. Effects of pH, Sperm Concentration, Washing and Substrate Concentration on Respiration and Motility of Goat Spermatozoa. *Nihon Chikusan Gakkaiho* **44**:266–270.
- Gadella BM, Luna C. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology* **81**:74–84.
- Gamčík P, Kozumplík J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Priroda, Bratislava.*
- Gangawar C, Kharche S, Kumar S, Jindal S. 2016. Cryopreservation of goat semen : status and prospects. *Indian Journal of Small Ruminants* **22**:1–10.
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* **65**:943–957.
- Gebre YM. 2007. *Reproductive traits in Ethiopian male goats With special reference to breed and nutrition. Yoseph Mekasha, Uppsala.*
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* **63**:445–457.
- Graham J. 2001. Assessment of sperm quality : a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* **68**:239–247.
- Gravance C, Garner D, Baumber J, Ball B. 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* **53**:1691–1703
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproduction in farm animals. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.*
- Hansen PJ. 2011. Use of a Hemacytometer. *Animal Sciences*:11–12.
- Harder RR, Lunstra DD, Johnson RK. 1995. Growth of testes and testicular morphology after eight generations of selection for increased predicted weight of testes at 150 days of age in boars. *Journal of animal science* **73**:2186–2192.
- Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Juárez RE, Soto MYG, García RAD. 2012. Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status.

- Revista de salud animal **34**:78–83.
- Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. 2002. <The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry.pdf>. *Clinical chemistry* **48**:1819–1827.
- Hidalgo M, Dorado J. 2009. Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Ruminant Research* **87**:108–110.
- Jayne Barbedo. 2013. Automatic Object Counting in Neubauer Chambers.
- Jelínek P, Koudela K a kolektiv. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno
- Jha PK, Shahi G, Abdullah A, Mansur A. 2018. Selection of breeding rams by evaluating semen quality.
- Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-álvarez O, Maroto-morales A, Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Bisbal A, Fernández-Santos M, Garde J, Soler A. 2012. Effect of semen collection method ( artificial vagina vs . electroejaculation ), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science* **132**:88–95. Elsevier B.V..
- Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Fernández-Santos MR, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science* **167**:103–108. Elsevier B.V.
- Juyena NS, Stelletta C. 2011. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**:536–551.
- Karagiannidis A, Karatzas G, Varsakeli S. 2000a. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks and raised in Greece. *Theriogenology* **53**:1285–1293.
- Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I. 2000b. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research* **37**:125–130.
- Kendall LON V, Riley LK. 2002. *Flow Cytometry Method* : **41**:2002.
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* **64**:1225–1235.
- Keskintepe L, Eroglu A. 2014. Freeze-Drying of Mammalian Sperm. *Page Methods in molecular biology*.

- Khandoker MAMY. 2013. Study on buck evaluation based on semen quality and fertility. *Bangladesh Journal of Animal Science* **42** (2):101–108.
- Lasiene K, Gedrimas V, Vitkus A, Glinskyte S, Lasys V, Valanciute A, Sienkiewicz W. 2013. Evaluation of morphological criteria of sperm quality before in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Veterinary Sciences* **16**:773–785.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2006. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* **62**:113–141.
- Lichtman JW, Conchello J. 2005. Fluorescence Microscopy. *Nature Methods* **2**:910–919.
- Lipenský J, Lustyková A, Roztok M, Václavková E, Přinosilová P, Šípek J, Kunetková M, Kopecká V. 2014. Základy hodnocení morfologického obrazu spermií kance. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha.
- Lopez Saez A, Ortiz N, Gallego L, Garde J. 2002. Liquid Storage (5 0 C) of Ram Semen in Different Diluents . *Archives of Andrology* **44**:155–164.
- Lukusa K, Lehloenya KC. 2017. Selenium supplementation improves testicular characteristics and semen quality of Saanen bucks. *Small Ruminant Research* **151**:52–58. Elsevier.
- Luño V, Gil L, Martínez F, González N, Malo C, Olaciregui M. 2014. Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reproduction in Domestic Animals* **49**:72–81.
- Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. 2018. Spermatozoa Cryopreservation : Biopreservation and biobanking **00**:1–11.
- Magistrini M, Guitton E, Levern Y, Nicolle JC, Vidament M, Kerboeut D, Palmer E. 1997. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* **48**:1229–1235.
- Malejane C, Greyling J, Raito M. 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *South African Journal of Animal Science* **44**:26.
- Malo AF, Soler AJ, Roldan ER., Gomendio M, Lang-Lenton B, Garde J. 2006. Sperm design and sperm function. *Biology Letters* **2**:246–249.
- Mara L, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Marti E, Marti JI. 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* **67**:1446–1454.
- Mickelsen WD, Paisley LG, Dahmen JJ. 1981. The effect of scrotal circumference, sperm motility and morphology in the ram on conception rates and lambing percentage in the ewe. *Theriogenology* **16**:53–59.
- Mieusset R, Casares PQ, Partida LGS, Sowerbutts SF, Zupp JL, Setchell BP. 2004. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and

- embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Reproduction* **94**:337–343.
- Muiño-Blanco T, Fernández-Juan M, Cebrián-Pérez JA, Forcada F, Abecia A, Cardozo JA. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* **66**:841–850.
- Najbrt R. 1982. *Veterinární anatomie*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha
- Nicolae D, Stela Z, Dragomir C, Hortanase AA. 2014. Effect of thawing time and temperature variation on the quality of frozenthawed ram semen. *Romanian Biotechnological Letters* **19**:8935–8940.
- Nunes JF, Corteel J-M, Combarous Y, Baril G, Leboeuf B. 2007. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. *Reproduction Nutrition Développement* **22**:611–620.
- O'Meara CM, Hanrahan JP, Donovan A, Fair S, Rizos D, Wade M, Boland MP, Evans ACO, Lonergan P. 2005. Relationship between in vitro fertilisation of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology* **64**:1797–1808.
- Ogundele OM, Adekeye AO, Adeniyi PA, Ogedengbe OO, Enye LA, Saheed S, Omotosho DR, Anglais AE. 2013. Basic Principles of Fluorescence Microscopy. *World J Young Researchers* **3**:17–21.
- Palacín I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. 2013. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*.
- Peña F. 2015. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. *Animal Reproduction* **12**:351–355.
- Pezzanite L, Bridges DA, Neary DM, Hutchens T. 2010. Breeding Soundness Examination of Rams and Bucks. *Purdue Extension* **2**:1–4.
- Purdy PH. 2006. Review article A review on goat sperm cryopreservation &. *Small Ruminant Research* **63**:215–225.
- Qureshi MS, Khan D, Mushtaq A, Afridi SS. 2013. Effect of extenders, postdilution intervals, and seasons on semen quality in dairy goats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **37**:147–152.
- Roof DJ, Bowley S, Price LL, Matsas DJ. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* **77**:412–420. Elsevier Inc.
- Sanderson J, Smith I, Parker I, Bootman D. 2014. Fluorescence Microscopy. *Fluorescence Microscopy*:85–132.

- Santolaria P, Palacin I, Yániz J. 2011. Management factors affecting fertility in sheep. Pages 167–190 Artificial insemination in farm animal.
- Sarma JP, Sinha S, Biswas RK, Deka BC, Sarmah BC, Gogoi T, Bhattacharjya R. 2015. Effect of Freezing Rate on Quality of Cryopreserved Goat Spermatozoa Using a Programmable Freezer. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science Ver. II* **8**:2319–2372.
- Schmid I. 2012. How to develop a Standard Operating Procedure for sorting unfixed cells. *Methods* **57**:392–397.
- Shahba MI, El-Sheshtawy RI, El-Azab ASI, Abdel-Ghaffar AE, Ziada MS, Zaky AA. 2016. The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **5**:524–535. Elsevier B.V.
- Shahsavani MB, Yousefi R. 2018. *Fluorescence Microscopy*:2–3.
- Slabbert M, du Plessis SS, Huyser C. 2015. Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia* **47**:594–599.
- Smith NA, McAuliffe FM, Quinn K, Lonergan P, Evans ACO. 2010. The negative effects of a short period of maternal undernutrition at conception on the glucose-insulin system of offspring in sheep. *Animal Reproduction Science* **121**:94–100. Elsevier B.V.
- Soltanpour F, Moghaddam G. 2014. Effect of diluents on storage of ram semen. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* **2**:179–183.
- Solti L, Jávora A, Vass N, Amiridis G, Kulcsár M, Cseh S, Faigl V. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica* **60**:115–129.
- Stafford KJ. 1995. Electroejaculation : a welfare issue ? *Surveillance* **22**:15–17.
- Talebi J, Sourì M, Moghaddam A, Karimi I, Mirmahmoodi M. 2009. Characteristics and seasonal variation in the semen of Markhoz bucks in western Iran. *Small Ruminant Research* **85**:18–22.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BMJ. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Experimental Cell Research* **240**:151–164.
- Turri F, Madeddu M, Gliozzi TM, Gandini G, Pizzi F. 2016. Relationship between body weight, sexual secondary traits and epididymal semen quality in the Alpine goat. *Small Ruminant Research* **135**:81–84. Elsevier B.V.
- Widiyono I, Sarmin, Putro PP, Astuti P. 2017. Effects of nutritional status on semen

- characteristics of Kacang goats. *Pakistan Journal of Nutrition* **16**:678–683.
- Wulster-Radcliffe MC, Williams MA, Stellflug JN, Lewis GS. 2001. Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science* **79**:2964–2967.
- Zubair M, Ali M, Ahmad M, Sajid SM, Ahmad I, Gul ST, Sajid M. 2015. Effect of Selenium and Vitamin E on cryopreservation of semen and reproductive performance of animals (a review). ~ 82 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies* **3**:82–86.

## 6 Seznam použitých zkratek a symbolů

AV – umělá vagína

CASA – počítačem asistovaná analýza spermií

VCL – křivočará rychlost

VAP – průměrná rychlost

VSL – přímočará rychlost

ALH – amplituda laterárního posunu hlavy

LIN – linearita křivočaré dráhy

STR – přímota dráhy

BCF – kmitočtová frekvence

IFC – zobrazovací průtoková cytometrie

FACS – fluorescenčně aktivovaný buněčný třídič

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EH – ethidium homodimer

PI – propidium jodid

LAR – neobarvená oblast akrozomu a postakrozomální oblast

LAI – růžový akrozom a neobarvené postakrozomální oblast

DAR – neobarvený akrozom a tmavá postakrozomální oblast

AI – umělá inseminace

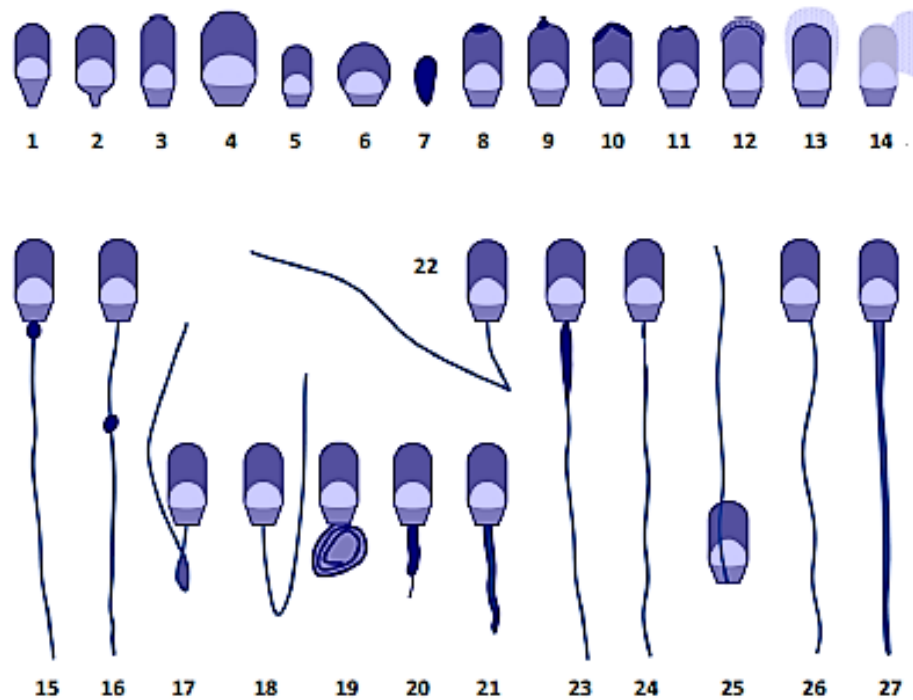
ICSI – intracytoplazmatická injekce spermií

M – ředidlo, odstředěné mléko

TE – ředidlo, TestT

TR – ředidlo, Tris – trehalosa

## 7 Samostatné přílohy



- |  |   |
|--|---|
| 1. Změněná báze - zúžená                     | 20. Hypogeneze bičíku                                 |
| 2. Změněná báze - zúžená                     | 21. Hypogeneze bičíku                                 |
| 3. Zúžená hlavička                           | 22. Zlomený bičík                                     |
| 4. Makrocefalie (gigantická hlavička)        | 23. Ztluštělá spojovací část                          |
| 5. Mikrocefalie (zmenšená hlavička)          | 24. Parciální absence mitochondriální spirály         |
| 6. Kulovitá hlavička                         | 25. Abnormální inzerce bičíku – retroaxiální nasazení |
| 7. Amorfní hlavička                          | 26. Abnormální inzerce bičíku – abaxiální nasazení    |
| 8. Perzistující akroblast                    | 27. Zdvojený bičík                                    |
| 9. Perzistující akroblast                    |   |
| 10. Kondenzace akrozomu                      |   |
| 11. Defekt akrozomu                          |   |
| 12. Zbobotnění akrozomu - počínající         |   |
| 13. Zbobotnění akrozomu - pokročilé          |   |
| 14. Uvolnění akrozomu                        |   |
| 15. Proximální cytoplazmatická kapénka       |   |
| 16. Distantní cytoplazmatická kapénka        |   |
| 17. Ohnutý bičík o distální kapénku (smyčka) |   |
| 18. Ohnutý bičík                             |   |
| 19. Primární svinutí bičíku - Dag defekt     |   |

Vzorník možných abnormalit vyskytujících se u spermií (Lipenský et al. 2014)