

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Optimalizace rozmrazovacích protokolů
u kryokonzervovaného beraního spermatu plemene
valašská ovce**

Diplomová práce

**Kristýna Zemanová
Chov hospodářských zvířat**

**Vedoucí práce: Ing. Filipp G. Savvulidi, Ph.D.
Konzultant: Ing. Martin Ptáček, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Optimalizace rozmrazovacích protokolů u kryokonzervovaného beraního spermatu plemene valašská ovce" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.4.2023

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filippu G. Savvulidi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky během zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D., za pomoc a vstřícný přístup při zpracování dat v této práci. Také bych ráda poděkovala Ing. Anežce Málkové, za veškerou pomoc, kterou mi poskytla v laboratoři během experimentu. Děkuji také svým rodičům a blízkým za podporu a trpělivost během mého studia a psaní této práce.

Optimalizace rozmrazovacích protokolů u kryokonzervovaného beraního spermatu plemene valašská ovce

Souhrn

Cílem diplomové práce byla analýza kvalitativních parametrů kryokonzervovaného beraního spermatu (Valašské ovce) v závislosti na použití různých rozmrazovacích protokolů.

S ohledem na horší mrazitelnost inseminačních dávek u beranů, je důležité optimalizovat jak mrazitelnost, tak i rozmrazení dávek, aby bylo možné zachovat co nejlepší kvalitu spermatu pro následnou inseminaci.

Inseminační dávky pro tuto práci byly získány od dvou beranů výše uvedeného plemene. Ejakulát byl odebrán vždy od obou beranů, a poté byly oba vzorky smíchány a naředěny ředidlem AndroMed. Inseminační dávky byly mrazeny v polystyrenovém mobilním mrazicím boxu, kde bylo možné kontrolovat výšku vzorků nad hladinou tekutého dusíku, a tím regulovat mrazicí křivku. Rozmrazení probíhalo při teplotách 45, 50, 55 a 65 °C v intervalech 2, 5, 8, 11 a 14 sekund. Všechny naměřené hodnoty byly porovnány se standardem, který byl rozmrazen při 38 °C po dobu 30 sekund.

Dle vyhodnocených dat, které byly vyhodnoceny v této diplomové práci bylo potvrzeno, že rozdílné teplotní gradienty a doba při rozmrazování inseminačních dávek má vliv na kvalitativní parametry spermií. Pro tuto práci byly stanoveny hlavní kvalitativní parametry a to: viabilita, mitochondriální membránový potenciál, motilita a progresivní motilita.

Naměřené hodnoty při teplotě 45 °C se dle statistického vyhodnocení nejvíce blížily výsledkům standardu. Vyšší teploty 60 a 65 °C v kratším časovém úseku rozmrazení měly dle průtokové cytometrie lepší hodnoty než standard, avšak dle statistického vyhodnocení nebyly statisticky významné. Metoda CASA navíc odhalila u těchto teplot narušení progresivní motility, což snižuje potenciál spermatických buněk pro oplodnění vajíček.

Pro praktické využití v chovu hospodářských zvířat je nejlepší využití standardní metody, kdy probíhá rozmrazení při 38 °C. V externích podmínkách by bylo použití jiných teplot složitější z hlediska dosažení přesné teploty a času.

Klíčová slova: průtoková cytometrie, CASA, inseminační dávka, ovce, spermie

Optimizing thawing procedures of cryoconserved ram sperm in Wallachian sheep breed

Summary

The present work aimed to analyze the qualitative parameters of cryopreserved Wallachian ram sperm depending on the use of various thawing protocols.

Given the poorer freezing tolerance of insemination doses in rams, it is important to optimize both freezing and thawing protocols to maintain the best semen quality for subsequent artificial insemination.

The insemination doses for this work were obtained from two mature healthy Wallachian rams with the use of an artificial vagina. On each semen collection day, ejaculates were collected from both rams, then both samples were mixed and diluted with commercial semen diluent AndroMed. Only good quality sperm was used for the insemination doses processing. Processed insemination doses were frozen by a protocol previously optimized for Wallachian ram sperm cryopreservation. Thawing of insemination doses took place at temperatures of 38, 45, 50, 55, or 65 °C at intervals of 2, 5, 8, 11, 14, or 30 seconds.

According to the obtained results, it was confirmed that various temperature gradients during the thawing of insemination doses affect the post-thaw quality of sperm. For this work, the main qualitative parameters were determined with the use of flow cytometry and CASA: viability, mitochondrial membrane potential, mobility, and progressive mobility. All measured values were compared with a standard thawing protocol (38 °C for 30 seconds). Obtained results can be described shortly as follows: according to the statistical evaluation, the standard protocol of thawing is the optimal protocol to thaw Wallachian ram sperm.

Only measured values at 45 °C turned out to be the closest to the results of the standard. Higher temperatures of 60 and 65 °C with a shorter thaw time had numerically better values compared to the standard according to flow cytometry data, but they were not statistically significant by statistical evaluation. Furthermore, the CASA method revealed a progressive impairment of motility at higher temperatures, which reduces the ability of spermatozoa to fertilize eggs.

In conclusion, for practical use, I recommend using the standard method, as in outdoor conditions, using other (especially higher) temperatures would be more difficult in terms of achieving accuracy, and, therefore, unsafe for sperm cells.

Keywords: flow cytometry, CASA, insemination dose, sheep, sperm

1 Obsah

1	Obsah	6
2	Úvod	8
3	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
4	Literární rešerše	10
4.1	Valašská ovce	10
4.1.1	Historie.....	10
4.1.2	Charakteristika plemena.....	10
4.2	Genetické zdroje zvířat v ČR	11
4.2.1	Důvody pro zařazení Valašské ovce.....	11
4.3	Pohlavní ústrojí samce	11
4.4	Ejakulát	12
4.4.1	Spermie.....	12
4.4.2	Semenná plazma.....	13
4.5	Faktory ovlivňující kvalitu spermatu	13
4.5.1	Výživa	14
4.5.2	Zdravotní stav	14
4.5.3	Věk	14
4.6	Odběr ejakulátu	15
4.6.1	Odběr semene do umělé vagíny.....	15
4.6.2	Odběr semene elektroejakulací.....	15
4.7	Hodnocení kvality spermatu	16
4.7.1	Makroskopické posouzení	16
4.7.2	Mikroskopické vyšetření.....	16
4.7.3	Průtoková cytometrie	17
4.7.4	CASA.....	19
4.8	Konzervace beraního spermatu	20
4.9	Rozmrazení ID	22
4.9.1	Faktory ovlivňující kvalitu ID	24
4.9.2	Poškození spermií	24
4.10	Umělá inseminace ovcí	25
4.10.1	Vaginální inseminace	26
4.10.2	Intracervikální inseminace	26

4.10.3	Transcervikální inseminace.....	26
4.10.4	Laparoskopická inseminace	26
5	Metodika	28
5.1	Plemeníci	28
5.2	Odběr a zpracování ejakulátu	28
5.2.1	Analýza odebraného ejakulátu pomocí průtokové cytometrie a CASA ...	28
5.3	Rozmrazení ejakulátu	29
5.4	Statistická analýza dat	31
6	Výsledky	33
6.1	Výsledky FC	33
6.2	Výsledky CASA.....	36
7	Diskuse	39
8	Závěr	42
9	Literatura.....	43
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	50
11	Samostatné přílohy	I
11.1	Průtoková cytometrie hlavní parametry T2	I
11.2	CASA hlavní parametry T2	II
11.3	Průtoková cytometrie vedlejší parametry T1 a T2	III
11.4	CASA vedlejší parametry T1 a T2.....	V
11.5	Statistické významnosti průtokové cytometrie.....	X
11.6	Statistické významnosti CASA	XII
11.7	Nastavení regionů pro analýzu průtokové cytometrie	XIV

2 Úvod

Z důvodu větší intenzity šlechtění se inseminace stala běžnou součástí chovu hospodářských zvířat. Z důvodu biologické rozmanitosti je důležité uchování genetických materiálů, aby nedošlo k zániku některých plemen. Valašská ovce byla zařazena mezi genetické zdroje České republiky kvůli vlastnostem a původu. Tyto ovce jsou často využívány pro údržbu a obnovu horských oblastí.

Jejich plemenitba probíhá především přirozeně, ale inseminace má svoje benefity, mezi které patří maximální využití kvalitních plemeníků, kontrola kvality spermatu, eliminace pohlavních chorob a další. Z toho důvodu je potřeba se zaměřit na optimalizaci uchování a rozmrazení inseminačních dávek u beranů, protože tato oblast není tolik probádána jako například u býků. Jedině tak můžeme úspěšně uchovat a následně efektivně použít jejich genetický materiál.

3 Vědecká hypotéza a cíle práce

Je předpokládáno, že rozdílné teplotní gradienty při rozmrazování inseminačních dávek konzervovaných v tekutém dusíku ovlivňují jejich kvalitativní parametry. Důležitým bodem záchranného programu původních českých plemen ovcí je dostatečný zásobník kvalitních inseminačních dávek dlouhodobě uchovávaných v tekutém dusíku a určených k inseminaci. Manipulace s inseminační dávkou před inseminací v tomto směru zásadním způsobem ovlivňuje kvalitu spermatických buněk, a přímo tak podmiňuje úspěšnost samotné inseminace.

Cílem diplomové práce je analýza kvalitativních parametrů kryokonzervovaného beraního spermatu valašských ovcí v závislosti na použití různých rozmrazovacích protokolů.

4 Literární rešerše

4.1 Valašská ovce

4.1.1 Historie

Valašské ovce se do České republiky dostaly spolu s valašskou kolonizací Karpat během 15.-16. století na území Slezska a Beskyd. Posun chovu valašské ovce byl ukončen v 18. století, kdy se založilo několik salaší v Chřibech (Ochodnický 1986., Milerski, 2016)

K zušlechťování valašských ovcí docházelo na přelomu 40 – 50, let minulého století. Několik původních zvířat bylo koupeno a zařazeno do vzorníku plemen ovcí na účelovém hospodářství Vysoké školy zemědělské v Praze. Na Slovensku byl v roce 1992 založen Klub chovatelů původní valašky. Ten se zaměřil na vyhledávání zvířat typově odpovídajících původní Valašce. Z této populace byl dovezen jeden plemenný beran, a ten se stal základem pro regeneraci černé varianty valašských ovcí u nás (Milerski, 2016).

K roku 2021 činí populace valašské ovce zhruba 1 000 bahnic, které jsou v aktivní plemenitbě. Bahnice jsou rozmístěny v 55 chovech. V plemenitbě je 124 beranů (Mátlová, et al, 2021).

4.1.2 Charakteristika plemena

Valašská ovce se vyznačuje živým temperamentem, nenáročností a vysokou přizpůsobivostí k extrémním klimatickým podmínkám (Horák a Treznerová, 2010). Jedná se o hrubovlnné plemeno s trojstrannou užitkovostí (maso, vlna a mléko), a řadí se do skupiny cápových ovcí (Horák et al, 2004)

Je charakterizována menším až středním tělesným rámcem, konstituční pevností, výbornou chodivostí a pastevní schopností. Mají pevné končetiny a tvrdou rohovinu paznehtu. Hlava je vysoko nesená s výrazným živým okem. Uši jsou krátké a směřují do stran. Rohy jsou většinou šroubovitého tvaru. Berani i bahnice jsou převážně rohatí. Zbarvení může být různé – bílé, šedé, černé nebo strakaté. Na hlavě a končetinách se často vyskytují černé skvrny. Živá hmotnost bahnic se pohybuje kolem 40–50 kg a u beranů dosahuje 50–65 kg (Milerski, 2016).

Je to pozdní plemeno s výrazně sezonní pohlavní aktivitou. Jehnice se poprvé zapouští ve věku 16.-18. měsíce při minimální živé hmotnosti 32 kg (Horák a Treznerová, 2010).

4.2 Genetické zdroje zvířat v ČR

Genetickým zdrojem pro zemědělské účely je považována část biologické rozmanitosti, která vzniká cíleným výběrem a později šlechtěním v zemědělských podmínkách. Tyto genetické zdroje neslouží jen pro jejich produkční vlastnosti, ale i pro jejich možnosti reagovat v budoucnu na nepředvídatelné události, jako například nové choroby, změna klimatu (Mátlová, et al, 2021).

Řada živých organismů má jedinečné geny a vlastnosti, které mohou hrát významnou roli při šlechtění nových plemen. Cílem je uchování genetických zdrojů pro budoucí potřebu, protože jsou zde zvířata, které nejsou momentálně populární mezi zemědělci a mohlo by dojít k jejich zániku. Mezi hlavní nástroje pro zachovu genů na mezinárodní úrovni patří Úmluva o biologické rozmanitosti – Convention on Biological Diversity (Roudná, et al., 2007., Ministerstvo zemědělství, 2017).

Mezi dlouhodobé cíle patří udržení diverzity genetických živočišných zdrojů pro současné potřeby i pro budoucnost aplikací vědecko-výzkumných a ekonomicky efektivních programů zaměřených na jejich ochranu. Záchova ohrožených a málopočetných původních populací hospodářských zvířat a plemen, která mají historické a kulturní spojení s ČR (Ministerstvo zemědělství, 2017).

4.2.1 Důvody pro zařazení Valašské ovce

Valašská ovce byla zařazena do genetických zdrojů České republiky především pro jejich jedinečné vlastnosti a původ. Toto plemeno je velmi dobře přizpůsobeno chovu v horských oblastech. Má historický a kulturní význam, protože je spjato s osídlováním Karpat. Ovce mohou být využity díky svým vlastnostem pro údržbu a obnovu neoplocených horských pastvin, které jsou významné z hlediska botanického a krajinytvorného. V současné době je největší hrozbou výskyt vlka obecného, který napadá stáda ovcí a může tak snižovat jejich populaci (Mátlová, et al, 2021., Ministerstvo zemědělství, 2017).

4.3 Pohlavní ústrojí samce

Pohlavní soustava samců je soubor orgánů, který slouží k rozmnožení a zachování konkrétního druhu. U samců jsou buď gonády neboli pohlavní žlázy, dále vývodné pohlavní cesty a zevní orgány (Horák, 2012). Anatomicky je pohlavní soustava beranů stejná jako u ostatních přežvýkavců. Tvoří ji varlata, nadvarlata, chámovod, přídatné pohlavní žlázy a penis (Pugh a Baird, 2012).

Varlata – samčí párový pohlavní orgán, v němž dochází k tvorbě spermií a pohlavního hormonu testosteronu. Má vejčitý tvar s ze strany je mírně zploštělý. Hmotnost obou varlat u dospělých samců se pohybuje kolem 200 – 400 g (Marvan a kol., 1998; Pugh a Baird, 2012). Varlata jsou uložena v šourku, kde je hlavní funkcí udržet pohlavní orgány v nižší teplotě, než je teplota těla, protože uvnitř těla je příliš vysoká teplota, která neumožňuje tvorbu oplození schopných spermií (Cottle, 2010).

Nadvarle – zde dochází ke shromáždění a dozrávání spermií. Má tři hlavní části – hlava, tělo a ocas. Hlava tvoří v horním pólu nadvarlat a ocas se nachází na dolním pólu, je ukončen nadvarletním vývodem (Horák et al., 2004). Vývod nadvarlat u berana, který dále přechází v chámovod dosahuje délky 52 – 58 cm (Červený, 2011).

Chámovod – je umístěn podél nadvarlete směrem nahoru k tříselnému kanálu. V pánevní dutině dochází k odklonu od cév a pokračuje dále samostatně, než se oboustranné chámovody přiblíží, a nakonec se spojí v ejakulačním vývodu (Cottle, 2010).

Přídavné pohlavní žlázy – nachází se v pánevní oblasti u močové trubice. Jejich sekrety vytváří semennou plazmu. Skládají se ze semenných váčků, které zajišťují cukry pro energii potřebnou pro spermie. Dále žláza předstojná, jinak také nazývaná prostata a bulbouretrální žlázy, které tvoří sekret pro neutralizaci zbytků kyseliny močové v močové trubici (Věžník et al., 2004).

Pyj – pářící orgán, který slouží k transportu semene do pohlavního ústrojí samice. Základem je párové topořivé těleso, houbovitě těleso pyje, močová trubice a pomocné svaly. Mezi pomocné svaly pyje patří napřimovač a hladký zatahovač. Délka pyje během erekce je u malých přežvýkavců 30 – 50 cm (Marvan et al., 1998)

4.4 Ejakulát

Ejakulát je tekutina složená ze dvou hlavních částí. Skládá se z buněčné složky (spermie) a z tekuté části, kterou tvoří semenná plazma. Má druhově specifickou konzistenci, barvu i pach. U malých přežvýkavců bývá objem ejakulátu menší, ale je zde vyšší koncentrace spermií (Marvan a kol., 1998). Objem beraního ejakulátu je zhruba 0,5 – 2 ml, v němž je 1,5 – 5,0 x 10⁹ spermií na 1 ml (Cottle, 2010).

4.4.1 Spermie

Spermie jsou nejdůležitější složkou ejakulátu. Druhově specifický je tvar a velikost spermií. Skládá se ze dvou hlavních částí, hlavičky a bičíku. Celková délka spermie je 50 - 80 μm. Hlavička je dlouhá 5 – 10 μm a bičík 50 – 70 μm. Hlavička je zploštělá a má oválný tvar.

Uvnitř je kondenzovaný chromatin, který obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu nesoucí genetickou informaci. Přední část hlavičky je kryta akrozomem (Jelínek a Koudela, 2003). Bičík je spojen s hlavičkou pomocí krčku, jehož délka je 2 – 3 μm . Obsahuje mitochondrie a cytoskeletární struktury, díky nimž umožňuje spermiím pohyb (Hafez a Hafez, 2000).

Základní ochranu celé spermie tvoří dvouvrstvá cytoplazmatická membrána, která je acidorezistentní a vysoce permeabilní. Cytoplazmatická membrána nepropouští některá barviva (eozin, fluorochromy). K poškození permeability může dojít při dlouhodobé konzervaci spermií, což může mít za následek snížení oplozovací schopnosti (Jelínek a Koudela, 2003).

Pouze minimální množství spermií se dostane do vejcovodu. Jen několik desítek spermií se přiblíží k vajíčku, a pouze jedna se účastní oplození (Reece, 2011).

4.4.2 Semenná plazma

V ejakulátu má semenná plazma největší objemový podíl, tvoří 70 - 75%. Hlavním úkolem semenné plazmy je vytvoření ideálního prostředí pro spermie a ochrana před nepříznivými vlivy. Je zdrojem pro výživu spermií (Marvan a kol., 1998). Obsahuje bílkoviny, minerální látky, cukry, enzymy, kyselinu citronovou a askorbovou a biologicky aktivní složky jako například prostaglandiny, estrogeny a androgeny (Jelínek a Koudela, 2003).

Semenná plazma je výsledným produktem přídatných pohlavních žláz, varlat a nadvarlat. Biochemické složení plazmy se může lišit mezi jednotlivými druhy zvířat. Semenná plazma je důležitá pro přežití, metabolismus a transport spermií do samičího pohlavního ústrojí. U beranů je pH semenné plazmy mírně kyselé, tato vlastnost je druhově specifická (Juyena a Stelletta 2011).

U semenné plazmy beranů se objevuje několik dalších specifíků v porovnání s jinými druhy hospodářských zvířat. Například u beranů byly nalezeny specifické proteiny, jako například Berdefensin a Ovispirin, které mají antimikrobiální vlastnosti a mohou chránit sperma před patogenními mikroorganismy. Dále byla zjištěna vysoká koncentrace zinku v semenné plazmě beranů, který má významný vliv na kvalitu spermií (Amiri, 2022).

4.5 Faktory ovlivňující kvalitu spermatu

Berani jsou narozdíl od samčího pohlaví plodní během celého roku. Přesto se během roku kvalita spermatu mění. Beraní ejakulát je nejkvalitnější na podzim, což se může odrazit na kvalitě zmrazených inseminačních dávek (Horák, 1999). Ntemka (et al., 2019) uvádí, že berani starší 13 let si stále zachovávají vysokou kvalitu spermatu, přičemž roční období ovlivňuje funkci membrány spermií a morfologii hlavičky.

U beranů se pozoruje sezónní vliv na složení semenné plazmy. V letních měsících se zvyšuje koncentrace lipidů a hormonů, což může mít vliv na kvalitu spermií (Amiri, 2022).

4.5.1 Výživa

Zhruba 6 týdnů před zahájením odběru spermatu je vhodné berany přikrmovat (Menzies, 2015). Pro zlepšení kvality a pohyblivosti spermií je vhodné beranům aplikovat vitamin E a selen zhruba 6 – 8 týdnů před začátkem připouštění. Vhodné je i umožnit přístup na kvalitní pastvinu a přikrmovat koncentrátem s obsahem bílkovin. Ideální kondice by měla být na čísle 4 (Horák, 2012). V připouštěcím období musí být výživa zvířat kvalitní. Musí se doplňovat Ca, P a NaCl. Základem krmné dávky je šťavnaté krmivo, seno, oves a dostatek vody. Obsah bílkovin může být doplněn pomocí vlčích bobů (Menzies, 2015). U dospělých jedinců je velikost varlat snadno ovlivnitelná výživou. Hmotnost varlat se může pohybovat v rozmezí 100 – 800 g. Produkce spermií je ovlivněna i velikostí obvodu šourku. S nárůstem varlat a vyšší produkcí spermií je i zvyšován požadavek na množství bílkovin a energie (Gootwine, 2016). Důležitá je i kontrola zubů, protože stav chrupu může ovlivnit příjem krmiva (Axmann, 2012).

4.5.2 Zdravotní stav

Zásadní je kontrola zdravotního stavu jedince. Před připouštěním je vhodné berany odčervit i vakcinovat. Dále je dobré ostříhat vlnu z důvodu spermiogenní činnosti a pohlavní aktivity v době připouštění (Louda, 2001).

Důležitá je i péče o paznehty. V přípravném období je potřeba zajistit ošetření paznehtů (Horák, 2012). Jakékoli narušení zdravotního stavu, které způsobuje bolest může snížit reprodukční výkonnost. Berani s onemocněním pohlavního ústrojí by měli být ihned léčeni nebo brakováni (Cottle, 2010). Probíhá i kontrola pohlavních orgánů, během které se kontroluje velikost a konzistence varlat, nadvarlat, schopnost vysunutí pyje a čistota předkožky (Louda a Hegedušová, 2009).

4.5.3 Věk

Beranci dosahují pohlavní dospělosti ve věku 3 – 6 měsíců, záleží však na plemeni, zdravotním stavu a výživě. Chovatelské dospělosti dosahují ovce v 7 – 10 měsících při dosažení zhruba 70% z konečné hmotnosti. Vrchol plodnosti je u ovcí mezi 3 – 5 rokem života. Po dosažení 6 let začíná plodnost klesat (Kuchtík et al., 2007). Dle Horáka (2012) se raná plemena zařazují do chovu ve věku 8 – 10 měsíců a ostatní ve 12 – 18 měsících. Významnějším aspektem než věk je stupeň tělesného vývoje a vývoj varlat. Hassan (2009) uvádí, že byla zjištěna vyšší aktivita spermií u beranů starších dvou let (75 – 76%) než u ročních beranů (68%).

4.6 Odběr ejakulátu

Na odběr ejakulátu je potřeba plemeníka postupně navykat. Úkolem je napodobit situaci jako při přirozené plemenitbě. Pro tento účel můžeme použít fantom, jiného berana nebo ovci. Navykání na odběr spermatu by mělo být postupné. Následně se intervaly mezi odběry zkracují. Během přípravného období se i zvyšuje kvalita spermatu (Štolc et al., 2007).

4.6.1 Odběr semene do umělé vagíny

Vlastní odběr se provádí pomocí umělé vagíny, která se skládá z vnějšího válcovitého pláště (tepelně odolného plastu) a měkké vnitřní vložky. Místo mezi vnějším pláštěm a vnitřní vložkou je naplněno zhruba z poloviny teplou vodou (42 – 45°C), a zbytek je dofouknut vzduchem. Vrchní vstupní část je vymazána parafínem nebo vazelínou. Sběrné místo pro ejakulát je na druhém konci.

Ve chvíli, kdy skočí beran na fantoma, tak se penis mírně odkloní do strany a je vložen do umělé vagíny. U začínajících beranů je vhodné, aby měl na začátku přístup k říjící bahnici (Cottle, 2010).

Odběr se většinou provádí 1 – 2x denně, 5 dní v týdnu. U mladých nebo začínajících beranů je tato frekvence nižší. V připouštěcím období lze od jednoho berana získat v průměru 50 – 200 inseminačních dávek za týden (Louda a Hegedušová, 2009).

4.6.2 Odběr semene elektroejakulací

Elektro ejakulace je metoda, při níž dochází k vyvolání peristaltické kontrakce pohlavních vývodných cest. Prostřednictvím elektrických impulzů se stimulují pánevní nervy. Elektrické impulzy jsou v rozmezí 0 – 15 V. Pro jednotlivé druhy zvířat existují specifická schémata pro pozvolný nárůst napětí. Nevýhodou této metody je počáteční investice do vybavení a případná sedace nebo anestezie zvířat (Kos et al., 2019). Pro stimulaci beranů je doporučena křivka od výrobce přístroje pro malé přežvýkavce, kde je nejprve potřeba docílit erekce, a následně ejakulace, to probíhá vzestupně od 0,5 do 5V (po 0,5V) při celkových 40 cyklech stimulace (Minitübe manual, 2018).

Dle studie se uvádí, že sperma získané pomocí elektroejakulace je vhodnější pro kryokonzervaci než ejakulát odebraný pomocí umělé vagíny. Sperma odebrané pomocí umělé vagíny mělo vyšší procento poškození. Proti tomu odběr do umělé vagíny nebo pomocí elektroejakulace nemá vliv na kvalitu semenné plazmy (Ledesma et al., 2015). Pomocí elektroejakulace lze získat vyšší počet živých buněk bez poškození akrozomu (Jiménez et al., 2005).

4.7 Hodnocení kvality spermatu

Odebrané sperma je nutné označit, a ihned přemístit do laboratoře pro makroskopické a mikroskopické posouzení. Beraní ejakulát je charakteristický menším objemem, ten se pohybuje od 1 do 1,5 cm³ (Louda, 2001). Kvalita spermatu je úzce spjata s ročním obdobím. V podzimním období bývá kvalita nejlepší, proto je vhodné používat tyto inseminační dávky. Na jaře lze pozorovat mírné zlepšení kvality spermatu, hlavně co se týče jejich aktivity. Barani, kteří jsou chováni v inseminační stanici mívají vyšší kvalitu spermatu, než berani používaní pro přirozenou plemenitbu (Louda a Hegedúšová, 2009).

Je nutné brát ohled na variabilitu výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. Za poslední roky byla snížena chybovost díky automatickým systémům, protože většina analýz probíhá pomocí počítače. Je zde však stále lidský faktor, který může ovlivnit výsledek. Jedná se především o manipulaci, ředění, vliv prostředí a další (Baláži et al., 2020).

4.7.1 Makroskopické posouzení

Během makroskopického hodnocení se posuzuje barva, zrnitost, zápach a objem, který zjistíme pomocí pipety s přesností 0,1 cm³ (Louda, 2001). Objem ejakulátu by měl být 0,5 – 2ml, může být ovlivněn věkem, plemenem, hmotností, ročním obdobím nebo způsobem odběru (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Konzistenci a zrnitost posuzujeme pomocí dopadajícího nebo procházejícího světla. Sperma by mělo být neprůhledné, husté s vysokou viskozitou.

Barva spermatu by se měla posuzovat na dobrém světle. Optimální je krémová až mléčně bílá barva. V některých případech může být barva až šedá, to signalizuje přítomnost infekce. Sperma zbarvené žlutě nebo zeleně značí příměs hnisu, moče nebo nežádoucích mikroorganismů. Takový ejakulát velmi zapáchá a je znehodnocen. Nevhodný je i ejakulát s příměsí krve (Louda, 2001., Gamčík a Kozumplík, 1992).

Pach nebo přítomnost cizích příměsí posuzujeme sensoricky. Hodnotu pH zjistíme pomocí pH metru, nebo diagnostickými proužky (Kos et al., 2019). Hodnota pH u berana se pohybuje v rozmezí 6,4 – 7,2. Zvýšení pH nad 7 značí pokles koncentrace spermií. Odebrané sperma má zápach po beranovi (vlně). Změna zápachu ukazuje na změnu kvality ejakulátu (Gamčík a Kozumplík, 1992).

4.7.2 Mikroskopické vyšetření

Mikroskopické posouzení nám umožní odhalit poškození, pohyblivost a abnormality spermií (Aisen, 2004).

Hemocytometrické stanovení v komůrkách je základní vyšetřovací metodou. Jedná se o nejstarší metodu manuálního počítání buněk. Tato metoda je velmi levná, ale časově náročná. V každé počítací komůrce je vyryta mřížka, díky které si můžeme určit daný sektor. Vzor mřížky se může lišit dle výrobce. Používají se 3 typy komůrek – Bürkrova, Neubauerova a Thomova. Sperma se nejprve naředí Hayemovým roztokem, nebo hypertonickým roztokem NaCl k devitalizaci spermií a důkladně homogenizovat. Dle druhu zvířete ředíme 100x nebo 200x. Naředěný vzorek dáme do komůrky a pozorujeme pod zvětšením 200x nebo 400x. Počítáme spermie, které se nachází uvnitř stanoveného sektoru. Díky spočítání spermií je potom umožněn výpočet koncentrace. (Kos et al., 2019., Brito et al. 2016., Hansen 2011).

4.7.3 Průtoková cytometrie

Jedná se o široce používanou metodu pro analýzu spermií a pomalu nahrazuje časově náročné techniky, které jsou i s větší chybovostí. Její schopnost analyzovat více charakteristik spermií najednou z ní činí slibnou metodu pro analýzu kvality spermií, které sledují integraci různých testů k dosažení lepšího pochopení funkčnosti spermií. Zlepšuje se citlivost fluorescenčních sond a technika značení (Martínez-Pastor, et al., 2010).

Průtokovou cytometrii lze zahrnout do vysoce výkonných technik, protože je zde schopnost analyzovat tisíce buněk během několika sekund, a během toho dokáže zachytit mnoho vlastností každé z nich (Martínez-Pastor, et al., 2010). Vyhodnocení takového množství spermatických buněk jako u cytometru nedovoluje žádná předchozí metoda (Peña, 2015).

I přes velký počet analyzovaných spermií tato automatizovaná metoda minimalizuje statistické chyby. Tyto důležité vlastnosti podporují její používání pro rutinní analýzu (Niu, Z. H., et al., 2011). Principem je průchod jednotlivých buněk měřícím zařízením. Označené spermie poháněny laminárním tokem procházejí jedna po druhé kyvetou, kde jsou osvětlena jedním nebo více lasery. Průtokový cytometr využívá lasery pro zaznamenání a rozptýlení světelných signálů. Tyto signály jsou následně zachyceny detektory, kterými mohou být fotodiody nebo fotonásobiče. Rozptýlené nebo emitované světlo je filtrováno zrcadly a filtry a dostává se k několika fotodetektorům, kde jsou signály zesíleny. Signál je převeden do elektronického signálu, který již může analyzovat počítač. Pro analýzu v počítači je potřeba příslušný software. Průtokový cytometr rozezná některá fluorescenční barviva, díky kterým může detekovat DNA, životaschopnost, poškození buňky a další (McKinnon, 2018., Shapiro, 2003., Martínez-Pastor, 2010).

U cytometru probíhá dělení na základě dvou měření, fyzikálního nebo chemického. U fyzikálního měření zaznamenáváme přední rozptyl (forward scatter) a boční rozptyl (side scatter). Pomocí předního rozptylu je možné odhadnout velikost procházející buňky. Dále dokáže rozlišit živá a mrtvá buňky. Boční rozptyl nám udává informace o vnitřní struktuře

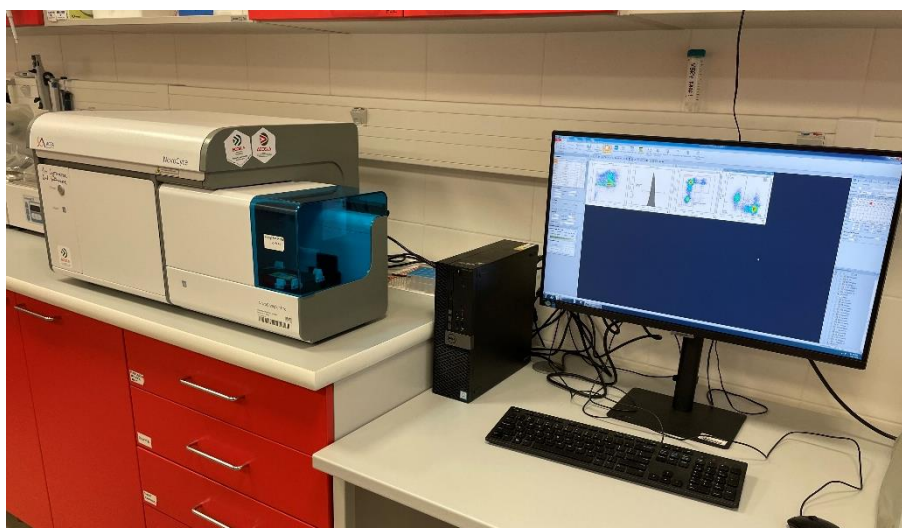
buňky (Jahan-Tigh, et al., 2012). Na buňky se předem váže fluorescenční barvivo (fluochromy), které následně absorbují a emitují světlo určité vlnové délky. Díky fluorescenčním barvivům lze sledovat narušení struktur buněk. Takto lze detekovat změny mitochondriálního membránového potenciálu (Pekarčíková et al., 2014).

Protože žádná dosavadní metoda není schopna spočítat všechny odebrané spermie, je potřeba vytvořit dílčí vzorek. Cílem je získat reprezentativní vzorek, který obsahuje dostatečný počet spermií, aby mohlo být provedeno počítání. Míra ředění se u beranů může pohybovat od 1:1000 u vysoce koncentrovaných vzorků. Stanovení koncentrace spermií je důležitou součástí analýzy odebraného spermatu. Běžné použití průtokového cytometru je však nákladné. Jeho pořizovací hodnota je vysoká. Pro přípravu a vyhodnocení vzorků je potřeba zkušený pracovník. (Brito et al., 2016).

Využívá se pro hodnocení kvality spermií. Jedná se o analýzu jednotlivých buněk na základě fluorescenčního signálu. Následně dochází k roztřídění buněk do definovaných subpopulací. Hodnotí se potenciál spermií, integrita plazmy, membrána akrozomu, DNA a další. Barviva se vždy vážou na specifickou buněčnou strukturu (Grieblová, 2018). Tyto aspekty lze vyhodnotit v jakémkoli vzorku zvířecího spermatu (Vašíček, et al., 2022)

Martínez-Pastor (et al., 2010) ve své studii uvádí několik barviv, pro použití během této metody. Mezi základní barviva patří Mitotracker Green FM. Toto fluorescenční barvivo se selektivně váže na funkční mitochondrie, což umožňuje kvantifikovat počet a kvalitu mitochondrií v spermatu. Dále se používá Propidium jodid k detekci mrtvých spermií. Neproniká do živé spermie, ale proniká do spermie s poškozenou membránou, kde se váže na DNA. Barvivo SYBR-14 se používá k detekci živých spermií. To je schopné proniknout do spermatické membrány a navázat se na DNA, což umožňuje detekci živých spermií. Pro detekci akrozomální integrity spermií použili FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate - peanut agglutinin). Akrozom je struktura, která umožňuje spermii proniknout do vajíčka. Pokud je akrozom poškozen, je narušena fertilizační schopnost spermií.

Autorům Martínez-Pastor, et al. (2010) uvádí, že použití Hoechst 33342 umožňuje rychlé a přesné měření chromatinové struktury spermií. Konkrétně se jednalo o stanovení tzv. indexu DNA fragmentace, kde se udává procento buněk s poškozenou chromatinovou strukturou. Použití barviva Hoechst 33342 umožňuje odlišit spermii s intaktní a poškozenou chromatinovou strukturou.



Obrázek č. 1: Průtokový cytometr v laboratoři (Archiv Autora)

4.7.4 CASA

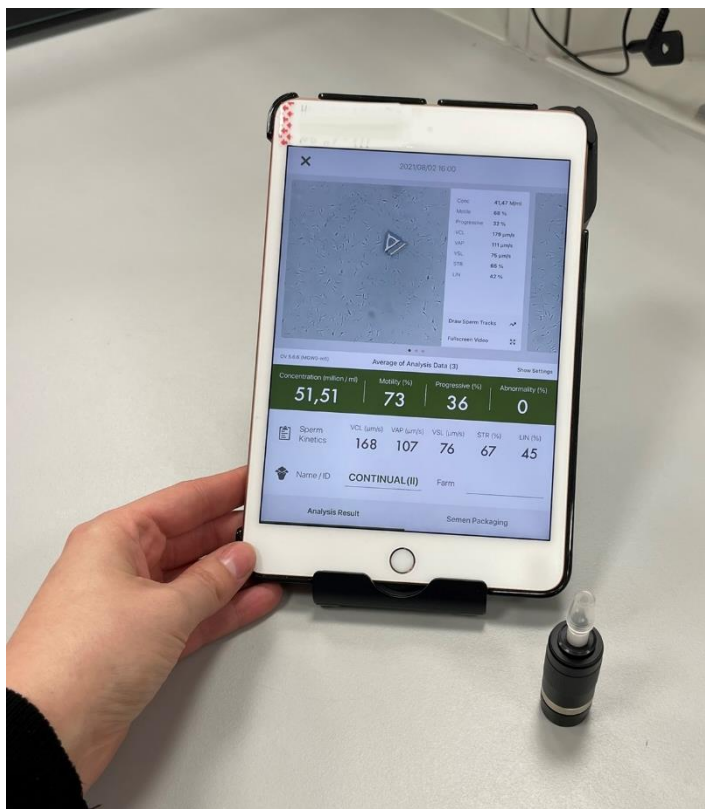
Zkratka pro "Computer-Assisted Sperm Analysis" jedná se o metodu pro kvantitativní a kvalitativní analýzu spermií. Tato metoda se využívá při posuzování kvality spermií. Je založena na digitálním zpracování obrazu spermií. Počítačový program vyhodnocuje různé parametry, jako například pohyblivost, rychlost, morfologie a koncentrace spermií. Tato metoda je rychlejší a přesnější než tradiční manuální metody (Amann and Waberski, 2014).

CASA umožňuje rychlé a vcelku levné mikroskopické hodnocení spermií. Je zde poměrně přesný odhad koncentrace a motility spermií. Principem je vizualizace a digitalizace spermií pomocí mikroskopu, a pomocí daného softwaru dochází ke zpracování a analýze snímků (Baláži et al., 2020).

Jedná se o standardní způsob pro hodnocení motility a kinetických vzorců spermií. Poskytuje objektivní data o pohybu spermií v řádech tisíců. Výsledná data může ovlivnit nastavení snímkové frekvence, snímkového pole, teplota při rozmrazování, koncentrace vzorku a média, která byla použita pro ředění. Snímková frekvence významně ovlivňuje parametry motility. Vysoká koncentrace vzorku výrazně omezuje provedení správné analýzy. Médium, které se použije pro ředění vzorku má zásadní vliv na detekci hlavičky, s čímž souvisí výsledky o motilitě spermií (Contri et al., 2010).

Umožňuje přesnou kvantifikaci různých parametrů spermií, jako jsou rychlost pohybu, počet pohybů, trajektorie, velikost a tvar hlavy, délka ocasu a další. Tyto parametry jsou důležité pro diagnostiku a hodnocení kvality spermií, stejně jako pro optimalizaci technik umělé inseminace a asistované reprodukce (Amann and Waberski, 2014).

Motilita i progresivní motilita je udávána v %, další hodnoty, které se dají pomocí CASA metody získat jsou průměrná rychlost dráhy v $\mu\text{m/s}$ (VAP), přímá rychlost v $\mu\text{m/s}$ (VSL), křivočará rychlost v $\mu\text{m/s}$ (VCL), amplituda posunutí hlavičky v μm (ALH), křížová frekvence v Hz (BCF), přímost v % (STR), linearita v % (LIN) (Goovaerts et al., 2006).



Obrázek č. 2: Přístroj pro metodu CASA (Archiv Autora)

4.8 Konzervace beraního spermatu

Kryokonzervace může poskytovat genetické zdroje velkému počtu samic od malého počtu geneticky cenných plemenů. Rozhodující je optimalizace kryokonzervačních postupů pro dosažení co nejvyšší kvality spermatu po rozmrazení (Masoudi et al., 2016).

Zmrazené sperma umožňuje rozšíření genů na národní i mezinárodní úrovni. Je skladováno v kapalném dusíku při teplotě -196°C . Díky zmrazení jsou zastaveny metabolické reakce spermií, což umožňuje dlouhodobé uchování genetického materiálu (Aisen, 2004).

Pomocí kryokonzervace je minimalizována drahá přeprava zvířat. Dochází k eliminaci stresu, poranění zvířat a přenosu onemocnění. Tato metoda umožňuje zachování genetického materiálu u zvířat, kterým hrozí vyhynutí a zachovává genetickou informaci u plemen, u kterých dochází k neustálému šlechtění za účelem lepší užitkovosti (Gibbons et al., 2019).

Konzervace může být buď krátkodobá nebo dlouhodobá. Krátkodobá konzervace je po dobu 8 – 12 hodin, a používají se stejná ředidla jako u býčího ejakulátu (ANDROMED, OVIPRO, TRYLADYL, mléčné ředidlo). Ejakulát naředěný komerčními ředidly (andromed, tryladyl, ovipro) je schopen oplození i po 40 hodinách, ovšem pravděpodobnost zabřeznutí se výrazně snižuje (Louda a Hegedúšová, 2009).

U dlouhodobé konzervace se ejakulát naředí a naplní do pejet, které mají objem 0,25 – 0,50 cm³. Teplota během ředění by měla být kolem 30°C. Ekvilibrace probíhá při teplotě 5°C zhruba 1,5 – 2 hodiny. Mražení pejet se provádí v horizontální poloze 3 – 4 cm nad hladinou tekutého dusíku, který má teplotu -80 až -100°C po 8 minutách se pejety vloží do kontejneru s tekutým dusíkem (Louda and Hegedúšová, 2009).

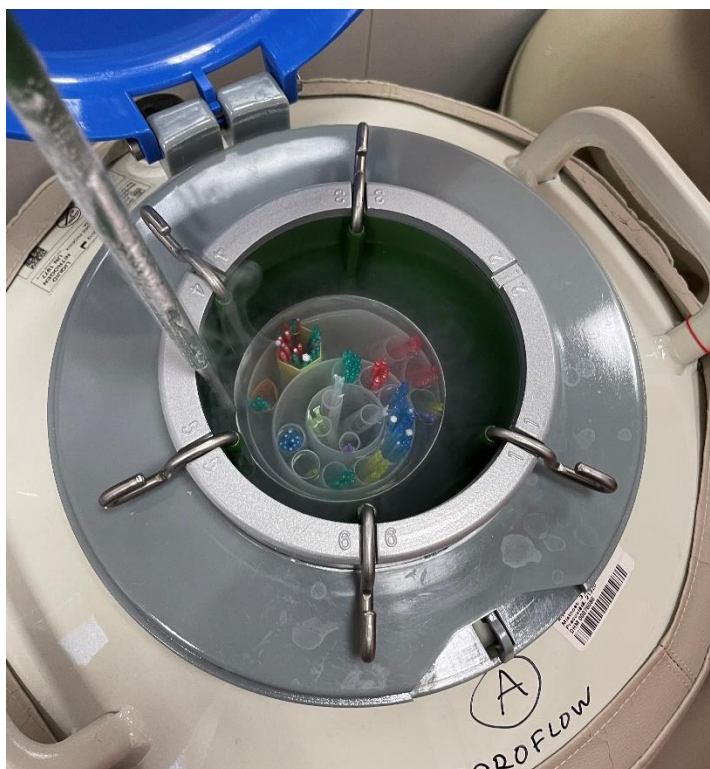
Jednou z dalších metod zmrazení spermatu je Vitřifikace, při které se tekutina rychle ochladí na extrémně nízkou teplotu (-196 °C) pomocí kryoprotektivních látek a následně se uchovává v kapalném dusíku. Používá se i u zvířat k zachování jejich reprodukčních buněk (spermie, vajíčka) a kryokonzervaci embryí pro reprodukční účely. Ukázala se jako účinná metoda pro kryokonzervaci spermie různých druhů zvířat, včetně hospodářských zvířat a ohrožených druhů. Výhody vitřifikace v porovnání s tradičními metodami je rychlost procesu, snížené riziko poškození buněk ledovými krystaly a zvýšenou úspěšnost při postupné regeneraci buněk po rozmrazení (Ma, et al., 2017).

U ovcí je hlavním problémem při kryokonzervaci spermatu nízká koncentrace spermií v ejakulátu, a jejich vysoká variabilita mezi jednotlivými jedinci. Odborníci se snaží optimalizovat protokoly kryokonzervace, včetně přidání kryoprotektantů a použití různých metod koncentrace spermií před zmrazením. Kromě toho byly vyvinuty nové techniky, jako jsou inovativní extendery a vitřifikace spermatu, které mají za cíl zlepšit účinnost kryokonzervace spermatu u ovcí (Yáñez-Ortiz, et al., 2021).

Během kryokonzervace může dojít k poškození spermií. Mezi nejčastější subletální změny v průběhu kryokonzervace patří modifikace ve složení a propustnosti membrány, nadměrná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), změny obsahu bílkovin a lipidů. Dále dochází k poškození mitochondriální aktivity, úbytku ATP a snížení motility spermií (Peris-Frau et al., 2020).

V semenné plazmě se vyskytují proteiny „binder of sperm proteins (BSPs)“, které mají vysoce ochranné účinky na beraní spermie během chladového šoku. Jedná se o protikladné tvrzení ve vztahu k býčím spermiím. Tam BSPs způsobují poškození spermií, během manipulace in vitro (Pini et al., 2018).

Dle Harairy et al., (2018) bylo při přidání ethanolového extraktu z propolisu do roztoků pro uchovávání semen beranů sledováno, jak tato přísada ovlivňuje kvalitu spermatu (jeho charakteristiky), poškození lipidových molekul a enzymatickou aktivitu v semenné plazmě během chlazení spermatu. Výsledky naznačují, že přídavek propolisu může zlepšit některé parametry spermatu, snížit poškození lipidů a modulovat enzymatickou aktivitu v semenné plazmě. To může přispět ke zlepšení kvality a uchovatelnosti spermatu pro umělé oplodnění u beranů.



Obrázek č. 3: Kontejner s inseminačními dávkami (Archiv Autora)

4.9 Rozmrazení ID

Při rozmrazování spermatu dochází k řadě nepříznivých vlivů, které mohou negativně ovlivnit kvalitu spermatu, a tím i jeho schopnost oplodnit vajíčka. Mezi tyto faktory patří například oxidativní stres, který může poškodit membrány spermií a způsobit jejich deformaci a fragmentaci DNA (Yánez-Ortiz, et al., 2021).

K rozmrazování pejet dochází buď z důvodu inseminace nebo hodnocení kvality dávek. Postupuje se opatrně, tak že se do hrdla kontejneru vysune závěs s dávkami, aby bylo možné je identifikovat. V tomto případě je nutné postupovat velmi rychle. Když se dávky začínají rozmrazovat, a poté se opět zmrazují v tekutém dusíku uvnitř kontejneru může dojít k jejich

znehodnocení. Pejety určené k rozmrazení se vyjmou peanem nebo pinzetou, a poté se ihned ponoří do vodní lázně (Šimoník, et al., 2016).

Aby bylo možné minimalizovat negativní účinky rozmrazování, výzkumníci zkoumají různé postupy, jako je například přidání různých antioxidantů do kryokonzervačního média nebo použití různých technik rozmrazování, jako je postupné zvyšování teploty nebo použití speciálního zařízení pro rozmrazování. Tyto postupy mají za cíl minimalizovat škodlivé účinky rozmrazování a zlepšit úspěšnost kryokonzervace spermatu u zvířat (Yáñez-Ortiz, et al., 2021).

Pro rozmrazení inseminačních dávek se používá vodní lázeň o teplotě 35 – 37 °C. Doba pro přemístění ID z kontejneru do vody by neměla překročit 5 sekund. V případě rozmrazení více dávek současně by neměl být převyššen počet 3 pejet. Inseminační dávky se ve vodní lázni rozmrazí do 40 sekund. Po rozmrazení by měla do 15 minut následovat inseminace. Rozmrazené dávky již není možné opětovně zmrazit a vrátit zpět do kontejneru (Louda et al., 2008).

Existuje několik speciálních zařízení, která se používají k rozmrazení spermatu. Jedním z těchto zařízení je tzv. termočlánekový systém, který umožňuje postupné a kontrolované zvyšování teploty vzorků spermatu. Tento systém umožňuje rychlejší rozmrazení spermatu a minimalizuje tak účinky stresu na buňky spermatu. Dalším zařízením je speciální vodní lázeň, která dokáže udržovat stabilní teplotu vzorků spermatu během rozmrazování. Tato vodní lázeň umožňuje rychlé a efektivní rozmrazování spermatu, aniž by došlo k jeho přehřátí nebo změně teploty (Yáñez-Ortiz, et al., 2021).

Studie Nema et al., (2009) zkoumala rozmrazení v 5 °C po dobu 8 minut a další způsob pomocí mikrovlnné trouby 360 W po dobu 25 sekund. Výsledky ukázaly, že rozmrazení ve vodní lázni bylo vhodné pro zachování kvality spermií. Naopak rozmrazení v mikrovlnné troubě bylo z hlediska poškození buněk destruktivní a tato metoda nebyla dále doporučena.

Daghigh et al., (2018) uvádí ve své práci čtyři různé postupy rozmrazení. V jejich studii bylo zjištěno, že pomalé rozmrazování ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 10 sekund mělo nejlepší vliv na kvalitu spermatu beranů plemene Ghezel. Tento postup vedl k nejvyššímu procentu motilních spermií a nejnižšímu poškození buněk. Naopak, nejhorší vliv na kvalitu spermatu mělo rychlé rozmrazování ve vodní lázni o teplotě 60 °C po dobu 4 sekund.

Wang et al. (2021) se ve své práci věnovali rozmrazování kančích inseminačních dávek v různých časech a vyšších teplotách. Výsledky ukázaly, že pomalé rozmrazování při teplotě 37 °C bylo nejlepší pro zachování pohyblivosti spermií a minimalizaci poškození buněk. Rychlejší rozmrazování při vyšší teplotě, zejména při teplotě 70 °C, vedly k většímu poškození spermií a horší kvalitě inseminační dávky. Konkrétně se ukázalo, že rychlost rozmrazování ovlivňuje rychlost a délku pohybu spermií, počet buněk s poškozenými membránami a počet buněk s poškozenou DNA.

Dále Šichtář et al., (2017) uvádí, že při rozmrazování hřebčího ejakulátu je nutno držet se protokolu výrobce ředidla ejakulátu. Teplota vhodná pro rozmrazování inseminačních dávek hřebců je 37 – 46 °C po dobu 15 - 20 sekund.

Postup při rozmrazování pejet s ejakulátem psa je obdobný, pejety se vloží do vodní lázně o teplotě 38 °C po dobu 60 sekund (Šimoník, et al., 2016).

4.9.1 Faktory ovlivňující kvalitu ID

Faktor, který může ovlivnit výslednou kvalitu inseminační dávky může být postup chlazení během kryokonzervace (Muiño et al., 2009). Před zmrazením se používá kryoprotektant, který se přidává ke spermii. Výběr kryoprotektantu může ovlivnit kvalitu spermatu, má chránit buňky před poškozením při zmrazování a rozmrazování.

Rychlost rozmrazení má také velký vliv na spermie. Příliš rychlé rozmrazení může vést k poškození buněk, naopak pomalé rozmrazení může zapříčinit nízkou životaschopnost. Podobné negativní účinky může mít i použití nízkých nebo vysokých teplot během rozmrazení.

Vliv na kvalitu inseminačních dávek může mít i neodborná manipulace (Louda et al., 2008).

Jak ve své studii uvádí Šichtář et al., (2018) kvalitu rozmrazených inseminačních dávek může ovlivnit i typ použitého obalu, ve kterém je inseminační dávka uchovávána. Zkoumali vliv obalu jak u dobře, tak špatně mrazitelných hřebců. Na základě výsledků bylo zjištěno, že kvalitu sperma špatně mrazitelných hřebců lze zvýšit mrazením do 5ml aluminiových tub.

Kryokonzervace spermatu může zvýšit produkci ROS (reaktivní forma kyslíku), což může vést k poškození spermií. Proto jsou v současné době zkoumány různé metody a látky, které by mohly pomoci při ochraně spermatu před oxidativním stresem během kryokonzervace. Jednou z možností je například použití antioxidantů, jako jsou vitaminy C a E, glutation nebo enzymatické antioxidanty. Tyto látky mohou snížit množství ROS a chránit tak spermatu před jejich škodlivými účinky (Yánez-Ortiz, et al., 2021).

Dalším problémem během rozmrazování je změna osmotického tlaku, který může vést k poškození buněk. Kromě toho mohou být při rozmrazování narušeny energetické procesy v buňkách spermií, což může ovlivnit jejich pohyblivost a další funkci (Yánez-Ortiz, et al., 2021).

4.9.2 Poškození spermií

Postupy při zmrazování a rozmrazování inseminačních dávek mají velký vliv na poškození spermií. Způsobují několik typů poškození, které vedou ke zkrácení jejich životaschopnosti a možnosti oplodnění vajíčka (Masoudi et al., 2016).

V případě, že jsou spermatické buňky vystaveny extrémním podmínkám, které pro ně nejsou fyziologické začne docházet k biochemickým a morfologickým změnám s nástupem

nekrobiotického procesu. Počátkem nekrózy je zhoršená schopnost buňky zachovat si homeostázu a dochází tak k influxu vody a extracelulárních iontů. Nejdříve dochází k poškození akrozomu, povrchové membrány, změně struktury mitochondrií a bičíku (Věžník et al., 2009).

Bylo zjištěno, že po rozmrazení je také velmi důležitý stav mitochondrií. Pouze spermie s funkčními mitochondriemi jsou po rozmrazení pohyblivé (testováno ve viskózním médiu). Pro úspěšnou inseminaci je velmi důležité mitochondriální dýchání, které hraje velkou roli při proniknutí beraního spermatu do děložního krčku. Dá se předpokládat, že poškození mitochondrií se pravděpodobně podílí na nízké úspěšnosti inseminace rozmrazeným semenem (Windsor, 1997). Mitochondrie jsou důležité také kvůli tvorbě energie (ATP), která je hlavním zdrojem pro buněčnou homeostázu a motilitu spermií. U některých druhů je primárním zdrojem energie pro spermie glykolýza. U beranů tomu tak pravděpodobně není, přesto mají změny v glykolytické dráze účast na mitochondriální dysfunkci spermií a oxidační nerovnováhu. Inhibice glykolýzy může mít vliv na změnu kinetiky spermií snížením dostupnosti ATP v distální části bičíku (narušení bičíkového rytmu) (Losano et al., 2017).

Posouzení membrán spermií je důležitý z funkčního hlediska ejakulátu. Jen spermie, které mají funkční plazmatickou membránu zajišťují pohyb látek dovnitř a ven z buňky (Eilts, 2005).

Volné radikály se podílejí na peroxidaci lipidů, a také na poškození DNA a membrány spermie. To může vést ke snížení pohyblivosti spermií nebo buněčné smrti. Zajištění rovnováhy mezi produkcí volných radikálů a jejich detoxikací může být důležitým faktorem pro funkčnost spermií před, během a po kryokonzervaci (Uysal and Bucak, 2007).

4.10 Umělá inseminace ovcí

Umělá inseminace ovcí hraje velkou roli v některých oblastech světa, především s ohledem na testaci potomstva. První snahy inseminace ovcí byly ve 20. letech 20. století. Umělá inseminace může být prostředkem k porovnávání genetických vlastností beranů. Ovšem technologie inseminace u ovcí je omezena na nízkou úroveň. Pro lepší výsledky byla na počátku 80. let zavedena aplikace inseminačních dávek pomocí laparoskopie. To vedlo k nárůstu úspěšnosti inseminace, ale ve srovnání s počtem ovcí byla tato úspěšnost malá a náročná (Gordon, 2004).

Je to metoda, díky které dochází k aplikaci a množení cenných genů napříč celou populací ovcí. Díky umělé inseminaci se dosahuje nejvyšší možných počtů získaných potomků s vysokou genetickou hodnotou v porovnání s technologickými investicemi do produkčního systému (Gibbons et al., 2019).

4.10.1 Vaginální inseminace

Provádí se díky své snadné aplikaci a možnosti provést úkon v terénu. Jedná se o velmi ekonomickou metodu. Používá se buď čerstvé nebo chlazené sperma. Během přípravy inseminační pipety se nejprve nasaje malé množství vzduchu, a teprve potom inseminační dávka. Sperma se deponuje co nejhluběji do vagíny (Olivera et al., 2005, Louda a Hegedušová, 2009).

4.10.2 Intracervikální inseminace

U intracervikální (vnitrokrčková) inseminace se aplikuje dávka 1 – 2cm hluboko do děložního krčku. K této metodě je potřeba poševní zrcadlo, které se zavádí do pochvy 10 – 13 cm hluboko. Inseminace se provádí pomocí spekula a inseminační sondy (Čunát et al., 2013). Nízké procento úspěšného oplodnění touto metodou má dva důvody. Prvním je omezení v důsledku anatomie reprodukční soustavy ovcí. Vzniká zde fyzická bariéra, která ztěžuje transport spermií. Druhým problémem je nízká odolnost beraního spermatu vůči kryokonzervaci. Ve srovnání s ostatními druhy jsou tyto spermie citlivější na tepelný stres (Gibbons et al., 2019).

4.10.3 Transcervikální inseminace

Tato metoda umožňuje uložení semene hluboko do děložního rohu (Buckrell et al., 1994). Přesto má tato transcervikální inseminace nižší procento zabřeznutí než metoda laparoskopická (čerstvé sperma: 40-80 %; zmrazené sperma: 30-70 %) (Cseh et al., 2012). Na nižší míru zabřeznutí může mít vliv špatná manipulace s inseminačním katetrem, dochází k poranění děložního čípku a následně vznikají abscesy a infekce. Transcervikální inseminace je i časově náročnější než laparoskopická metoda (Casali et al., 2017).

4.10.4 Laparoskopická inseminace

Klasická inseminace neměla dostatečné výsledky. Kvůli nesprávným metodám kryokonzervace a skladování byla inseminace málo úspěšná. Proto se začala používat metoda laparoskopické inseminace, kde se inseminační dávka aplikuje přes břišní stěnu přímo do děložního rohu. Tato metoda může mít i podobnou míru zabřeznutí jako při inseminaci čerstvým spermatem nebo přirozeným pářením. Úspěšnost této metody je 60–75 %. Zmíněná procenta závisí na kvalitě spermatu, ročním období, zdravotním stavu ovce a zkušenosti inseminátora (Faigl et al., 2012).

Pro laparoskopickou inseminaci se využívá převážně zmrazené semeno. Dávky jsou aplikovány do obou děložních rohů. Inseminační dávky by měly mít dobrou kvalitu. Progresivita spermií by měla být na úrovni 30 – 50% (Čunát et al., 2013).

Mezi nevýhody pro laparoskopickou inseminaci patří především náklady na vybavení, nároky na místo provedení, stres zvířat. Zákrok musí provádět odborně způsobilá osoba (Gibbons et al., 2019).

5 Metodika

5.1 Plemeníci

Inseminační dávky pro účely této diplomové práce byly vyrobeny od dvou beranů plemene valašské ovce. Ejakulát byl získán vždy od obou beranů, a poté byly vždy oba odběry smíchány. Berani byli označeni ušními známkami (ušní známka 77808/072, linie Beskyd, narozen 14.1. 2014; ušní známka 74801/081, linie Juras, narozen 31. 3. 2016). Oba jedinci byli ustájeni v zázemí Demonstrační a pokusné stáje České zemědělské univerzity v Praze. Berani byli ustájeni ve skupinovém kotci s neomezeným přístupem do venkovního pastevního výběhu. Ustájovací prostory, venkovní plochy a technologické vybavení bylo dle vyhlášky o minimálních standardech pro ochranu hospodářských zvířat č. 208/2004 Sb.

Hlavní část krmné dávky během celého roku tvořil pastevní porost v kombinaci s lučným senem z vlastní produkce, které bylo zkrmováno ad libitum. Další složku krmné dávky tvořily granule (1580 OVCE UNI, De Heus a.s., Bučovice, ČR) v množství 300–500 g/ks/den s ohledem na kondici zvířat. Ad libitně byla poskytnuta voda a přístup k minerálním lizům. Plemeníci byli po celou dobu pod veterinárním dohledem a po čas experimentu nevykazovali příznaky žádných onemocnění.

5.2 Odběr a zpracování ejakulátu

Pro odběr ejakulátu byla použita umělá vagína určená pro malé přežvýkavce (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo). Ejakulát byl odebrán do nespermicidního latexového sběrače. Před odběrem byla vstupní část nalubrikována vazelínou. Po odběru byl ejakulát udržován při teplotě 38 °C a naředěn ředidlem AndroMed (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), který je určený pro kryokonzervaci býčího ejakulátu s obsahem glycerolu 6-7 %. Vzorky se během transportu do laboratoře udržovaly při teplotě v rozmezí 20 – 25 °C. Při práci v laboratoři byly vzorky při teplotě 25 °C až do ekvilibrace.

5.2.1 Analýza odebraného ejakulátu pomocí průtokové cytometrie a CASA

V laboratoři byl každý odběr podroben analýze. Byla hodnocena koncentrace pomocí kalibrovaného spektrofotometru (Genesys™ 10vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Po zhodnocení koncentrace bylo sperma dále ředěno na finální koncentrace zhruba 200 mil. spermií/ ml. Takto připravený ejakulát byl naplněn do pejet o objemu 0,25 ml. Pejety byly následně uzavřeny pomocí polyvinylalkoholu (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Připravené pejety byly uloženy do chladicího boxu při teplotě 5–10 °C po dobu 2–4 hodin. V této době probíhala ekvilibrace.

Před mrazením (po ekvilibraci) byla provedena analýza pomocí průtokového cytometru (NovoCyte 3000, Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, California, USA). Cytometr byl vybaven lasery emitující fialové (405 nm), modré (488 nm) a červené (640 nm) záření. Pro analýzu bylo použito do každé jamky 10 μ l spermatu 100 μ l PBS, a to vše bylo obarveno pomocí 5 μ l mixu fluorescenčních barviv, Hoechst-33342 o finální koncentraci 10 μ g/mL, který barví DNA, PI o finální koncentraci 8 μ g/mL, jenž barví buňky, u kterých je poškození plazmatické membrány, PNA-FITC o finální koncentraci 0.5 μ g/mL, barví buňky s poškozeným akrozomem a Mitotracker Deep Red o finální koncentraci 80 nM, který je vysoce fluorescenční v buňkách s živými mitochondriemi. Vzorky byly následně inkubovány v termostatu po dobu 7 minut ve tmě, při teplotě 38 °C.

Dále byla provedena analýza CASA (model iSperm, Aidmics Biotechnology Co., LTD, Taipei City, Taiwan), kde byla hodnocena motilita a progresivita spermií. Byl použit vzorek ejakulátu 7 μ l, který byl naředěn 100 μ l AndroMedu (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Připravený vzorek byl aplikován v objemu 7 μ l na analyzační jednorázovou komůrku, která byla následně nasazena na optickou čočku, a pomocí iPadu byly vyhodnoceny výsledky.

5.3 Rozmrazení ejakulátu

Dávky, které byly použity pro účely této práce se mrazily v polystyrenovém mobilním mrazicím boxu, kde bylo možné kontrolovat výšku vzorků nad hladinou tekutého dusíku, a tím regulovat mrazicí křivku (Ptáček et al. 2019). Pro účel mrazení byla použita dříve optimalizována mrazicí křivka Nr. 2 (Savvulidi et al. 2021).

Při každém měření bylo rozmrazeno vždy 12 pejet. Pejety byly rozmrazeny ve vodní lázni vždy po dvou kusech. Testovalo se rozmrazení při několika teplotách 45, 50, 55 a 65 °C vždy v intervalech 2, 5, 8, 11 a 14 vteřin. Pro každý interval byly použity 2 pejety. Proti tomu byl vždy rozmrazen standard ve vodní lázni o teplotě 38 °C po dobu 30 vteřin. Měření bylo u všech teplot provedeno opakovaně, a to minimálně 4x. U teploty 45 a 50 °C bylo měření provedeno 5x.

Po rozmrazení byly vzorky použity k analýze. Nejdříve se vzorky připravily pro průtokovou cytometrii. Veškerá manipulace se vzorky probíhala na vyhřívané desce, kvůli udržení teploty. Pro přípravu plejtu bylo použito do každé jamky 10 μ l spermatu 100 μ l PBS, a to vše bylo obarveno pomocí 5 μ l fluorescenčního barviva, které se skládalo z 1 μ l Hoechst-33342, 1 μ l PI, 1 μ l PNA-FITC a 2 μ l Mitotracker Deep Red. Vzorky z každého časového intervalu (2, 5, 8, 11 a 14 vteřin) byl aplikovány do 3 jamek. Celkově tak vzniklo 18 jamek pro jednu analýzu včetně standardu. Vzorky byly inkubovány v termostatu po dobu 7 minut ve tmě, při teplotě 38 °C. Následně se vložily k analýze do cytometru.

Poté byla provedena analýza CASA. Pro přípravu vzorků bylo použito 7 μ l ejakulátu, a 100 μ l AndroMedu. Připravený vzorek byl aplikován v objemu 7 μ l na analyzační jednorázovou komůrku.

Po rozmrazení probíhaly analýzy ve dvou intervalech. První měření bylo ihned po rozmrazení – T1, a druhé měření probíhalo za 2 hodiny – T2. Mezi prvním a druhým měřením byly vzorky uloženy do termostatu při teplotě 38,5 °C. Vždy byla provedena průtoková cytometrie a CASA.

5.4 Statistická analýza dat

Naměřené hodnoty z průtokové cytometrie a CASA analýzy byly exportovány do Microsoft Office Excel 2019, ve kterém se vytvořily tabulky pro následné vyhodnocení pomocí SAS software (SAS/STAT® verze 9.3., 2011). Jako závisle proměnné byly vyhodnocovány jednotlivé parametry průtokové cytometrie (celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozením akrozomu, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl buněk s vysokou a s nízkou mitochondriální aktivitou). V případě použité CASA metody byly primárně sledované parametry celková motilita spermií a progresivní motilita spermií.

Detailní popis modelové rovnice včetně úrovní jednotlivých faktorů a jejich četnosti ve skupinách je uveden níže:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{DEN}_i + \text{VAR}_j + e_{ijk}$$

Průtoková cytometrie:

Y_{ijk} = hodnota závisle proměnné

μ = průměrná hodnota závisle proměnné

DEN_i = i -tá varianta odběrového dne (i = odběrový den 1, $n = 18$; i = odběrový den 2, $n = 36$; i = odběrový den 3, $n=18$; i = odběrový den 4, $n=54$; i = odběrový den 5, $n=54$; i = odběrový den 6, $n=36$; i = odběrový den 7, $n=18$; i = odběrový den 8, $n=18$; i = odběrový den 9, $n=18$; i = odběrový den 10, $n=36$; i = odběrový den 11, $n=18$; i = odběrový den 12, $n=36$; i = odběrový den 13, $n=36$)

VAR_j = j -tá varianta metody rozmrazování inseminačních dávek (j = varianta 39/30, $n = 66$; j = varianta 45/2, $n = 15$; j = varianta 45/5, $n=15$; j = varianta 45/8, $n=15$; j = varianta 45/11, $n=15$; j = varianta 45/14, $n=15$; j = varianta 50/2, $n=15$; j = varianta 50/5, $n=15$; j = varianta 50/8, $n=15$; j = varianta 50/11, $n=15$; j = varianta 50/14, $n=15$; j = varianta 55/2, $n=12$; j = varianta 55/5, $n=12$; j = varianta 55/8, $n=12$; j = varianta 55/11, $n=12$; j = varianta 55/14, $n=12$; j = varianta 60/2, $n=12$; j = varianta 60/5, $n=12$; j = varianta 60/8, $n=12$; j = varianta 60/11, $n=12$; j = varianta 60/14, $n=12$; j = varianta 65/2, $n=12$; j = varianta 65/5, $n=12$; j = varianta 65/8, $n=12$; j = varianta 65/11, $n=12$; j = varianta 65/14, $n=12$)

e_{ijk} = reziduální chyba.

CASA:

Y_{ijk} = hodnota závisle proměnné

μ = průměrná hodnota závisle proměnné

DEN_i = i -tá varianta odběrového dne (i = odběrový den 1, $n = 25$; i = odběrový den 2, $n = 36$; i = odběrový den 4, $n=54$; i = odběrový den 5, $n=36$; i = odběrový den 8, $n=18$; i = odběrový

den 9, n=18; i = odběrový den 10, n=36; i = odběrový den 11, n=18; i = odběrový den 12, n=33;
i = odběrový den 13, n=15

VAR_j = j-tá varianta metody rozmrazování inseminačních dávek (j = varianta 39/30, n = 43; j = varianta 45/2, n = 15; j = varianta 45/5, n=15; j = varianta 45/8, n=15; j = varianta 45/11, n=15; j = varianta 45/14, n=15; j = varianta 50/2, n=9; j = varianta 50/5, n=9; j = varianta 50/8, n=9; j = varianta 50/11, n=9; j = varianta 50/14, n=9; j = varianta 55/2, n=10; j = varianta 55/5, n=10; j = varianta 55/8, n=10; j = varianta 55/11, n=10; j = varianta 55/14, n=10; j = varianta 60/2, n=9; j = varianta 60/5, n=9; j = varianta 60/8, n=9; j = varianta 60/11, n=9; j = varianta 60/14, n=9; j = varianta 65/2, n=6; j = varianta 65/5, n=6; j = varianta 65/8, n=6; j = varianta 65/11, n=6; j = varianta 65/14, n=6

e_{ijk} = reziduální chyba.

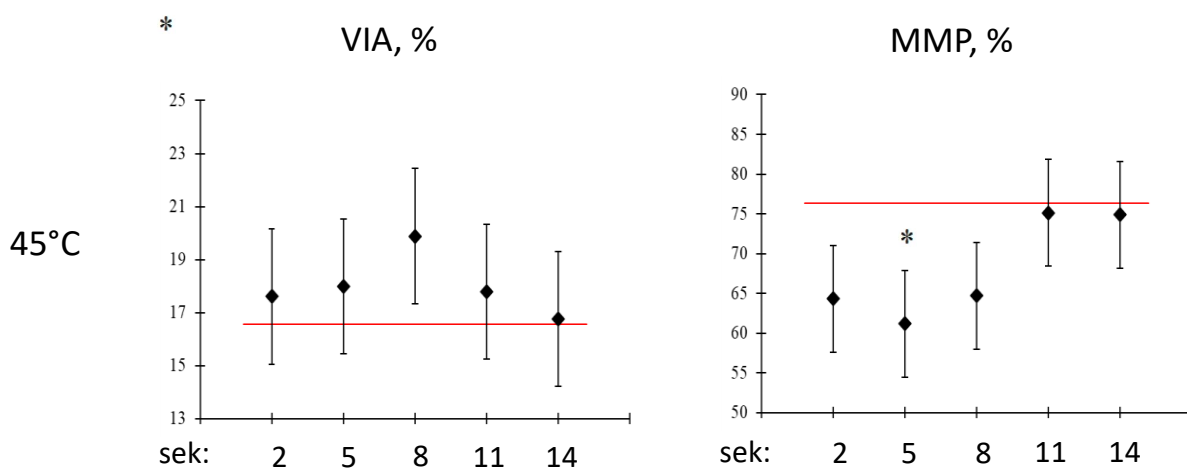
Statisticky průkazné rozdíly byly definovány podle Tukey – Kramerova testu na hladině významnosti $p < 0,05$.

6 Výsledky

6.1 Výsledky FC

V jednotlivých grafech jsou promítnuty výsledky měření z průtokové cytometrie. Jedná se o hlavní parametry, které stanoví, zda jsou spermie životaschopné a mají mitochondriální membránový potenciál. Grafy jsou rozděleny podle intervalu rozmrazení, a to T1 (ihned po rozmrazení) a v příloze Graf č.: 11 jsou grafy T2 (dvě hodiny po rozmrazení). V horní části je uvedena zkratka sledovaného parametru. Ve spodní části je doba (sekundy) rozmrazení vzorků. Na levé straně je uvedena teplota, při které byly vzorky rozmrazeny. Graf vždy protíná vodorovná čára, která je barevně odlišena, jedná se o naměřené hodnoty standardu (38 °C/30 sekund). Pro lepší analýzu dat získaných z průtokového cytometru byly vytvořeny jednotlivé regiony viz. Obrázek č. 4.

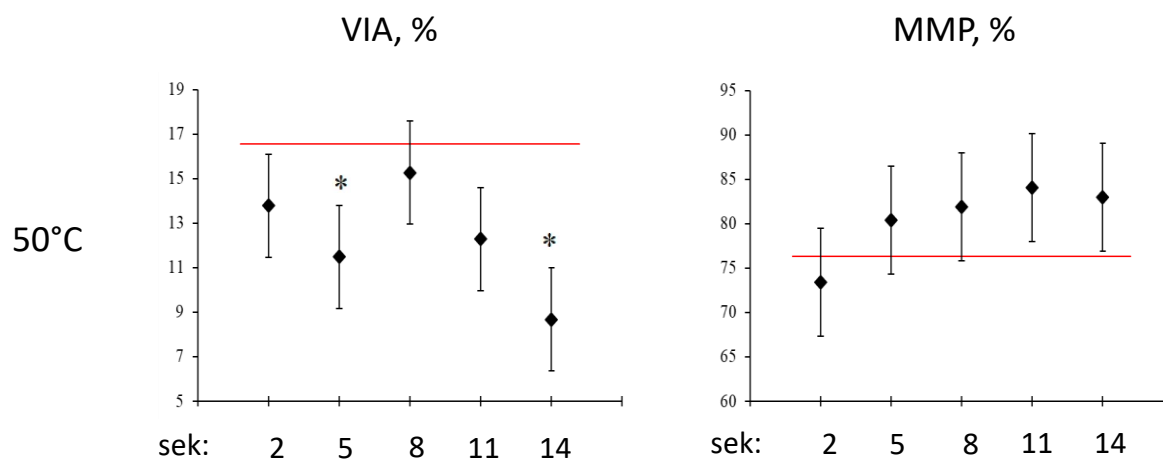
Graf č. 1: Výsledek průtokové cytometrie T1/45 °C viabilita a mitochondriální membránový potenciál



Symbol: Statisticky významný rozdíl $p < 0,05$ mezi naměřenou hodnotou a standardem

U rozmrazení při teplotě 45 °C po dobu 8 sekund byly zjištěny lepší hodnoty viability spermií, ale nebyl zde prokázán statisticky významný rozdíl, ten byl zaznamenán při rozmrazení po dobu 5 sekund v případě poškození mitochondriálního membránového potenciálu.

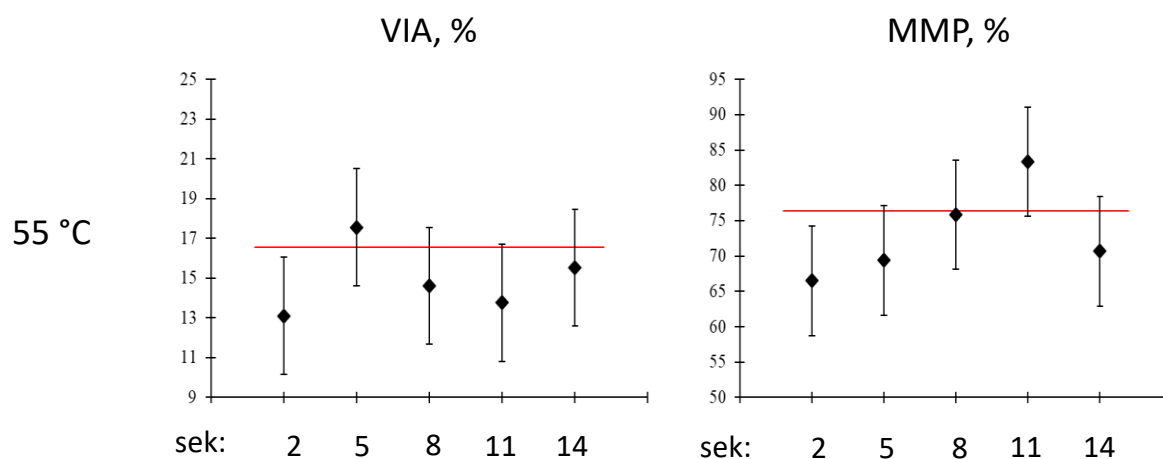
Graf č. 2: Výsledek průtokové cytometrie T1/50 °C viabilita a mitochondriální membránový potenciál



Symbol: * Statisticky významný rozdíl $p < 0,05$ mezi naměřenou hodnotou a standardem

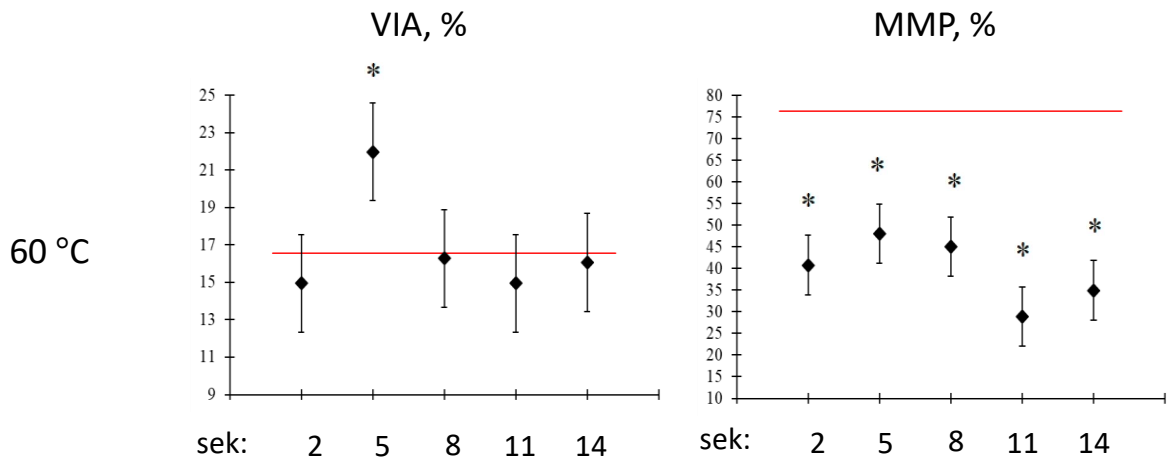
Ve výše uvedených grafech můžeme pozorovat statisticky významný rozdíl u viability buněk. Vidíme, že s delší dobou rozmrazování ve vodní lázni klesá procento jejich životaschopnosti, oproti tomu sledovaný parametr mitochondriálního potenciálu mírně vzrůstá a má lepší výsledky než standard, ale tento rozdíl není statisticky významný.

Graf č. 3: Výsledek průtokové cytometrie T1/55 °C viabilita a mitochondriální membránový potenciál



U teploty 55 °C nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl. Hodnoty obou sledovaných parametrů bylo podobné nebo nižší než u standardu.

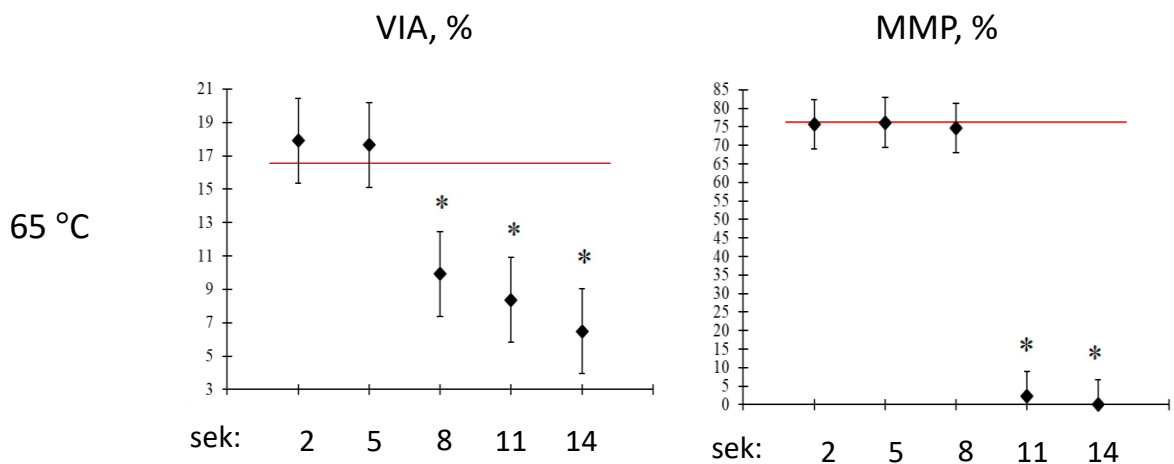
Graf č. 4: Výsledek průtokové cytometrie T1/60 °C viabilita a mitochondriální membránový potenciál



Symbol: * Statisticky významný rozdíl $p < 0,05$ mezi naměřenou hodnotou a standardem

Při rozmrazení ve vodní lázni o teplotě 60 °C je vidět významný rozdíl v době 5 sekund, kdy byly naměřené vysoké hodnoty životaschopnosti spermatických buněk. Ovšem mitochondriální potenciál byl při této teplotě ve všech případech pod hranicí standardu.

Graf č. 5: Výsledek průtokové cytometrie T1/65 °C viabilita a mitochondriální membránový potenciál



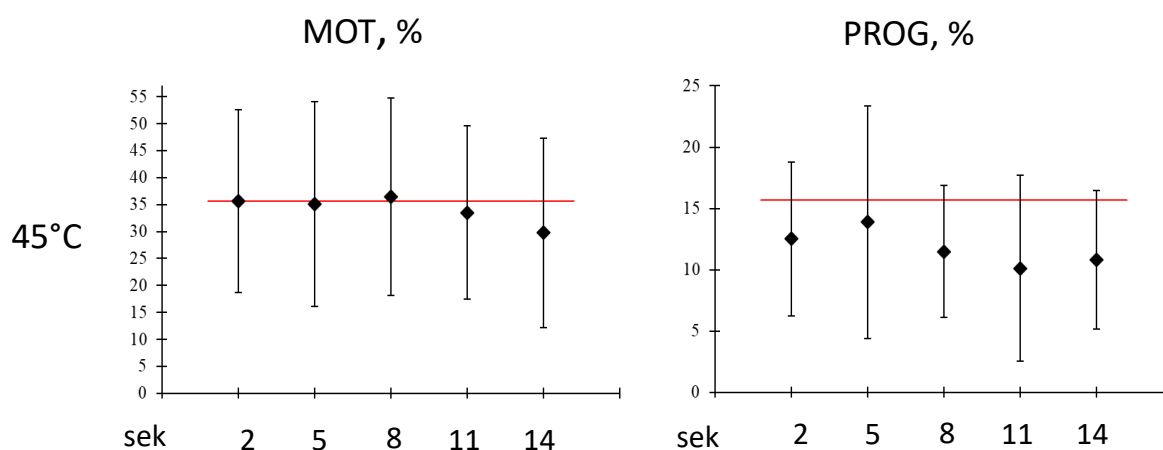
Symbol: * Statisticky významný rozdíl $p < 0,05$ mezi naměřenou hodnotou a standardem

Teplota 65 °C má statisticky významný vliv na viabilitu i poškození membrány mitochondrií především delších časových intervalech ve vodní lázni. Naproti tomu v kratších době 2 a 5 sekund byly hodnoty srovnatelné se standardem jak v oblasti životaschopnosti, tak i mitochondriálního membránového potenciálu.

6.2 Výsledky CASA

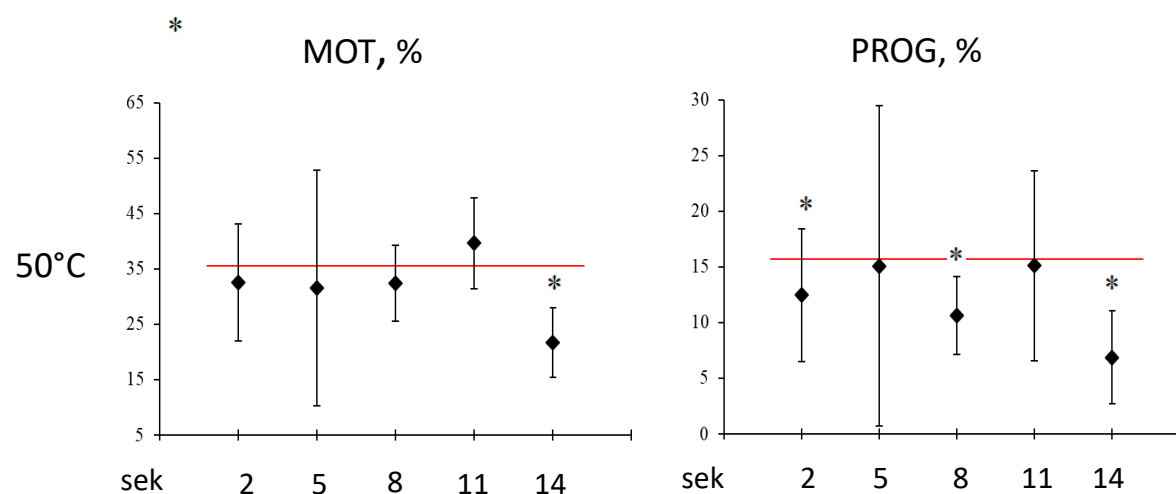
V níže zobrazených grafech jsou promítnuty výsledky metody CASA. Jedná se o hlavní parametry, které stanoví, zda jsou spermie schopné pohybu a mají potenciál k oplodnění vajíček. Grafy jsou rozděleny podle intervalu rozmrazení, a to T1 (ihned po rozmrazení) a T2 (dvě hodiny po rozmrazení), které jsou uvedeny v příloze Graf č.: 12. V horní části je uvedena zkratka sledovaného parametru. Ve spodní části je doba (sekundy) rozmrazení vzorků. Na levé straně je uvedena teplota, při které byly vzorky rozmrazeny. Graf vždy protíná horizontální čára, která je barevně odlišena, jedná se o naměřené hodnoty standardu (38 °C/30 sekund).

Graf č. 6: Výsledek CASA T1/45 °C motilita a progresivní motilita



Výsledky metody CASA při teplotě 45 °C byly srovnatelné s naměřenými hodnotami standardu. Mírný pokles byl pouze u progresivní motility, ale nebyl zde zjištěn statisticky významný rozdíl.

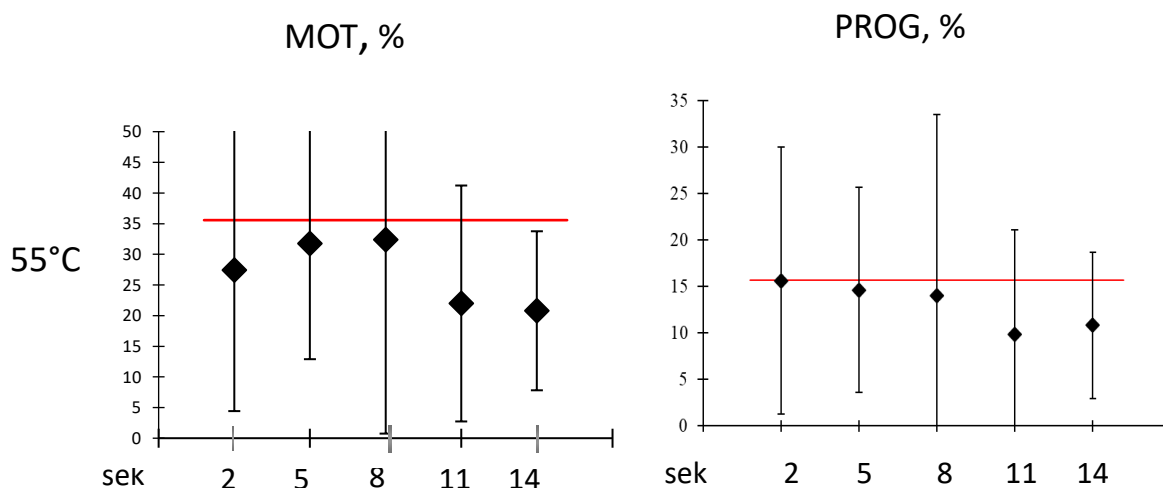
Graf č. 7: Výsledek CASA T1/50 °C motilita a progresivní motilita



Symbol: * Statisticky významný rozdíl $p < 0,05$ mezi naměřenou hodnotou a standardem

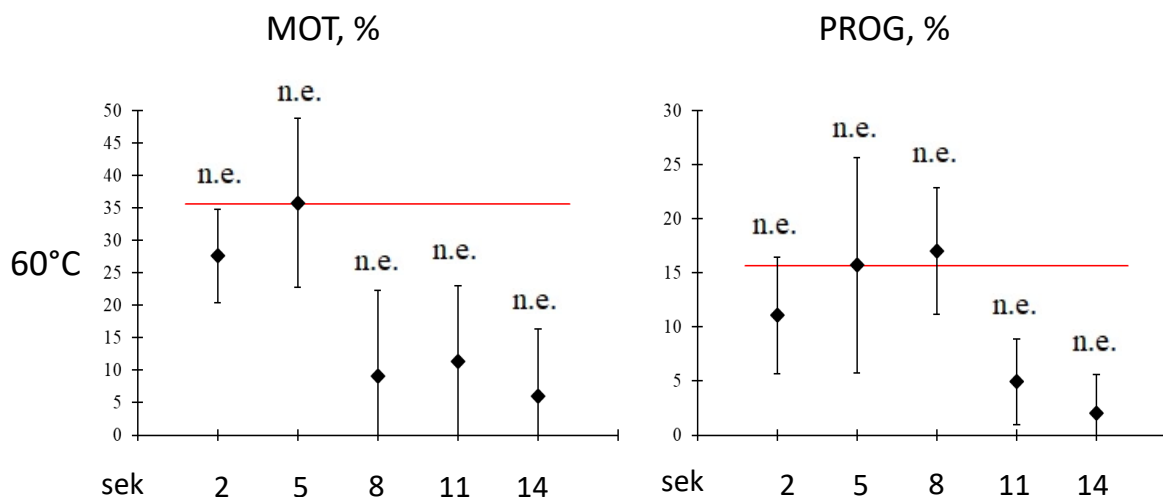
Při rozmrazení vzorku po dobu 14 sekund v 50 °C byl zjištěn statisticky významný rozdíl, kdy jsou hodnoty nižší než u standardu, jak v celkové, tak i progresivní motilitě. U progresivní motility byly zaznamenány celkem 3 statistické významnosti, ale vždy se jednalo o zhoršení kvality vzorku oproti standardu.

Graf č. 8: Výsledek CASA T1/55 °C motilita a progresivní motilita



U teploty 55 °C nebyl ani v jednom případě zjištěn statisticky významný rozdíl. Naměřené hodnoty byly velice podobné výsledkům standardu.

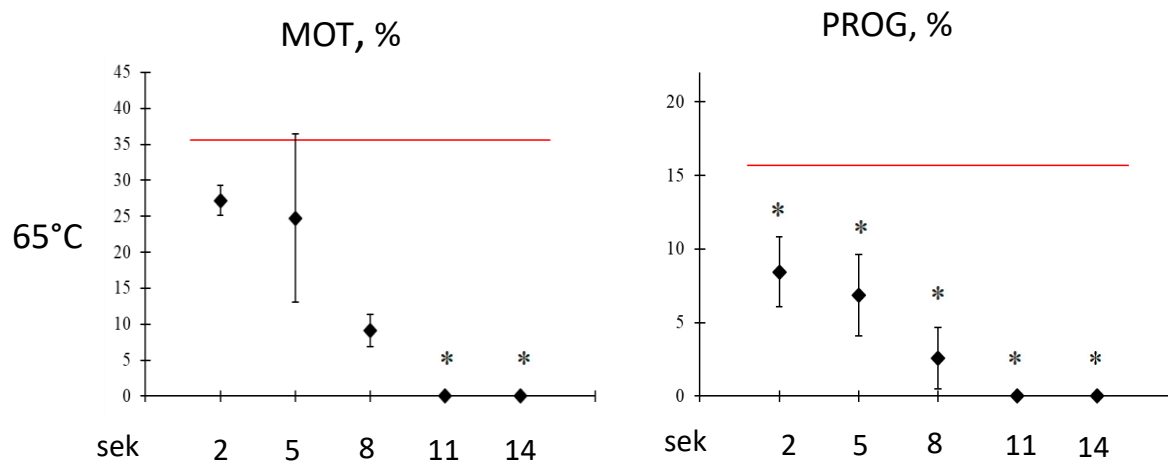
Graf č. 9: Výsledek CASA T1/60 °C motilita a progresivní motilita



Zkratka: n.e. – nebylo hodnoceno

Výsledky měřených parametrů po rozmrazení při teplotě 60 °C nebyly statisticky průkazné.

Graf č. 10: Výsledek CASA T1/65 °C motilita a progresivní motilita



Symbol: * Statisticky významný rozdíl mezi naměřenou hodnotou a standardem

Při nejvyšší sledované teplotě 65 °C byl pozorován statisticky významný rozdíl u obou parametrů. Vysoká teplota měla negativní vliv na spermatické buňky, a při delší době ve vodní lázni došlo k narušení pohybu spermií. Při 11 a 14 sekundách již nebyl zaznamenán žádný pohyb buněk.

7 Diskuse

Cílem diplomové práce byla analýza kvalitativních parametrů kryokonzervovaného beraního spermatu valašských ovcí v závislosti na rozdílných teplotních gradientech během rozmrazení inseminačních dávek. Optimalizace kryokonzervace a rozmrazení inseminačních dávek malých přežvýkavců není tolik probádána, a proto je potřeba se na tuto oblast také zaměřit. Inseminační dávky byly rozmrazeny vždy ve vodní lázni a u každé rozmražené dávky byl pro porovnání standard 38 °C/ 30 sekund. Života schopné buňky byly hodnoceny tak, že jsou bez poškození plazmatické membrány a bez poškozeného akrozomu.

Ve výzkumu Chaudhari et al., (2015) se inseminační dávky rozmrazovaly ve 30 °C, 25 °C a 20 °C. Nejhorší výsledky byly u teploty 20 °C, kdy došlo k poškození integrity akrozomu, ale motilita spermií byla zachována a od standardu se příliš nelišila. Závěrem studie bylo uvedeno, že nejlepší výsledky přinesla teplota 25 °C, kdy byly kvalitativní parametry srovnatelné se standardem rozmrazeným při 37 °C.

V diplomové práci kromě standardu byla sledována nejnižší teplota 45 °C. U této teploty byla viabilita buněk vždy s lepším výsledkem, než vzorek standardu, ale nebyl zde zjištěn statisticky významný rozdíl. U T1 došlo k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu, ale vzorky po dvou hodinách (T2) ukázaly srovnatelný výsledek se standardem. CASA také ukázala podobné hodnoty jako u standardu, akorát zde došlo k mírnému poklesu progresivní motility, ale nebyla zde naměřena statistická významnost. Tímto by se dala teplota 45 °C brát jako další způsob rozmrazení inseminačních dávek. Přesto, že výsledky nebyly statisticky významné, tak jejich hodnoty odpovídají běžně používanému způsobu rozmrazení 38 °C/ 30 sekund.

U 50 °C vyšly nejlepší výsledky v oblasti mitochondriálního membránového potenciálu. U výsledků teploty 60 °C u metody CASA hodnotící software SAS nebyl schopen vyhodnotit statistický rozdíl vůči standardu z důvodu malého množství dat. Důvodem byla absence zařízení CASA v laboratoři z technických důvodů.

Výsledky hodnotící poškození plazmatické membrány byly nejhorší u teplot nad 55 °C. Při vyšších teplotách a delším časovém úseku ve vodní lázni dochází k poškození membrány. Ovšem akrozomální poškození nebylo v těchto teplotách proti standardu statisticky významné. Nedošlo zde k fatálnímu poškození akrozomu. Pontbriand et al. (1989) prokázali, že není rozdíl v pohyblivosti spermií nebo integritě akrozomu při rozmrazování slávek ve vodní lázni při vyšší teplotě (60 °C/8 sekund) oproti standardu (37 °C/20 sekund). Uvádí, že pokud jsou spermie rozmrazovány při 50 °C po dobu 9 sekund místo při 70 °C po dobu 5 sekund, nebyl žádný rozdíl v pohyblivosti nebo integritě membrány. V mých výsledcích jsem

došla k podobnému závěru. Nedošlo k poškození akrozomu ani narušení motility u teplot 55, 60 a 65 °C v časovém intervalu do 8 sekund ve vodní lázni.

To znamená, že extrémně vysoké teploty, nemusí mít pro buňky fatální následky. Při teplotě 65 °C čase 2 a 5 sekund, byly výsledky srovnatelné s hodnotou standardu. Přesto, že výsledky nebyly těchto časech statisticky významné, naproti tomu studie Daghigh et al., (2018) uvádí, že při teplotě 60 °C po dobu 4 sekund byl pozorován negativní vliv na spermie, kdy došlo k jejich poškození a byla vyhodnocena snížená motilita buněk.

Použití vyšších teplot s sebou nese velký důraz na správnou dobu ve vodní lázni. Hraniční doba pro teploty 60 a 65 °C je 8 sekund, poté dochází ke smrti buněk. Dle autorů Yánez-Ortiz, et al., 2021 má ale rychlé rozmrazení negativní vliv na kvalitu spermatu. Může dojít ke změnám v permeabilitě buněčných membrán a ke snížení vitality a motility spermií. Toto tvrzení potvrdily i výše uvedené výsledky práce, kdy v kratší časové úseky rozmrazení mají dle cytometrie lepší hodnoty než standard, ovšem potenciál těchto buněk pro oplodnění vajíček je nižší z důvodu narušení progresivní motility.

Výsledky měřené ihned po rozmrazení (T1) a dvě hodiny po rozmrazení (T2 – Graf č. 11 a 12) ukazují drobné rozdíly především u dvou parametrů, kterými jsou mitochondriální membránový potenciál a motilita buněk. Zde můžeme pozorovat, mírné zlepšení u měření po dvou hodinách, a to ve všech teplotách. Důvodem může být pozitivní vliv kryokonzervačního roztoku na činnost mitochondrií. Z těchto výsledků by se dalo usoudit, že chvilkový odpočinek spermatických buněk v termostatu může mít pozitivní vliv na kvalitu inseminační dávky. Mitochondrie jsou důležité skrze tvorbu energie, která je hlavním zdrojem pro buněčnou homeostázu a motilitu spermií. U beranů pravděpodobně není hlavním zdrojem energie glykolýza, přesto mají změny v glykolytické dráze účast na mitochondriální dysfunkci spermií a oxidační nerovnováhu. Inhibice glykolýzy může mít vliv na změnu kinetiky spermií snížením dostupnosti ATP v distální části bičíku (Losano et al., 2017).

Vedlejší kinetické parametry, které se pozorovaly pomocí metody CASA byly také sledovány v čase T1 a T2. Co se týče linearity (Graf č. 18), VCL (Graf č. 16) a STR (Graf č. 19) byly hodnoty ihned po rozmrazení a dvě hodiny po rozmrazení poměrně srovnatelné, nedošlo zde k výrazným výkyvům hodnot. U rychlosti přímky (Graf č. 17) a tím pádem i průměrné rychlosti dráhy (Graf č. 15) tomu bylo jen nepatrně jinak. Zde bylo zjištěno, že především u teplot 55 a 60 °C došlo ke snížení hodnot, to může mít za následek snížení pravděpodobnosti na úspěšné oplodnění vajíčka.

Na celkovou vitalitu spermií může mít samozřejmě vliv spousta faktorů. Mezi ty hlavní patří zdravotní stav, ustájení, roční období, krmivo, ale i dalším faktorem může být samotná mrazitelnost spermatu od daného berana a celkový proces kryokonzervace. Ve studii Saha et. al., (2022) výsledky ukázaly, že účinnost různých kryopresevačních technik na kvalitu

spermií beranů po rozmrazení se liší v závislosti na faktorech, jako jsou použité kryoprotektanty, doba rozmrazení a teplotní podmínky. Zkoumané kryopresevační techniky měly vliv na různé parametry spermií, jako je motilita, morfologie, acrozomální integrita a poškození mitochondrií. V případě inseminačních dávek pro tuto diplomovou práci byl použit kryoprotektant AndroMed.

Pro využití v praxi je nejlepší variantou standardní metoda rozmrazení inseminačních dávek při teplotě 38 °C. Daghigh et al., (2018) ve své studii také potvrzují, že pomalé rozmrazení při teplotě 37 °C mělo nejlepší vliv na kvalitu spermatu beranů.

8 Závěr

S ohledem na horší mrazitelnost inseminačních dávek u beranů a malých přežvýkavců celkově, je nutné co nejvíce optimalizovat jak mrazitelnost, tak i rozmrazení dávek, aby bylo možné zajistit jejich nejlepší kvalitu.

Cílem diplomové práce byla analýza kvalitativních parametrů kryokonzervovaného beraního spermatu valašských ovcí v závislosti na použití různých rozmrazovacích protokolů.

Na základě a vyhodnocení dat, které byly získány pro tuto diplomovou práci bylo potvrzeno, že rozdílné teplotní gradienty při rozmrazování inseminačních dávek v závislosti na době ponoření ve vodní lázni mají vliv na kvalitativní parametry spermií.

Z veškerých testovaných teplot se výsledky 45 °C, především v hlavních parametrech, nejvíce blížili standardu. U této teploty vyšly hodnoty viability, mitochondriálního membránového potenciálu, motility a progresivní motility podobně se standardem.

Vyšší teploty 60 a 65 °C v kratších časovém úseku rozmrazení mají dle cytometrie lepší hodnoty než standard, ovšem dle výsledků CASA je potenciál těchto buněk pro oplodnění vajíček nižší z důvodu narušení progresivní motility.

Pro praktické využití v chovu valašských beranů je nejlepší variantou využívat standardní metody, kdy probíhá rozmrazení při 38 °C. V externích podmínkách by bylo použití vyšších teplot složitější z hlediska dosažení přesné teploty a času.

Pro přesnější a statisticky významné výsledky by bylo nutné získat větší množství dat se zacílením na kratší časové úseky při vysokých teplotách.

9 Literatura

Aisen E. G., 2004. Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires. Intermédica. 206 p.

Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17.

Baláži, A., Vašíček, J., Svoradová, A., Macháč, M., Jurčík, R., Huba, J., ... & Chrenek, P. (2020). Comparison of three different methods for the analysis of ram sperm concentration. *Slovak Journal of Animal Science*, 53(02), 53-58.

Brito L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G. & Waberski D. (2016). Andrology laboratory review: evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.002>

Buckrell BC., Buschbeck C., Gartley CJ., Kroetsch T., McCutcheon W., Martin J., Penner WK., Walton JS. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*. 1994;42(4):601-11. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90377-U](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(94)90377-U). PMID:16727566.

Casali R., Pinczak A., Cuadro F., Guillen-Muñoz JM., Mezzalira A., Menchaca A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*. 2017; 103:30-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.021>. PMID:28772112.

Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., & Carluccio, A. (2010). Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, 74(3), 424-435.

Cottle D.J., 2010. International sheep and wool handbook. Nottingham. Nottingham University Press. ISBN 978-1-904761-86-0.

Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*. 2012;130(3-4):187-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.014>. PMID:22333390.

Červený Č., 2011. Vademecum anatomie domácích savců pro studium a veterinární praxi. Vyd. 1., 271 s. Praha. ISBN 978-80-209-0389-1.

Čunát L., Hegedušová Z., Vejnar J., Štolc L., Louda F., Vejčík A., 2013. Využití inseminace ovcí v chovatelské praxi. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2428-2.

Daghigh Kia, H., Vatankhah, S., Ebrahimi, M., & Moghaddam, G. (2018). Effect of different thawing procedures on frozen semen quality of Ghezel rams. *Journal of Ruminant Research*, 6(2), 117-132.

Eilts BE 2005: Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 64: 692-697.

El Amiri, B. (2022). Factors influencing seminal plasma composition and its relevance to succeed sperm technology in sheep: an updated review. *Small Ruminant Research*, 106759.

El-Harairy, M. A., Khalil, W. A., Khalifa, E. I., & Saber, A. A. (2018). Effect of propolis ethanolic extract supplementation to ram semen extenders on sperm characteristics, lipid peroxidation and some enzymatic activities in seminal plasma in chilled semen. *Journal of Animal and Poultry Production*, 9(4), 235-243.

Faigl V, Vass N, Javor A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. Artificial insemination of small ruminants – a review. *Acta Vet Hung.* 2012;60(1):115-29. <http://dx.doi.org/10.1556/AVet.2012.010>

Gamčík P., Kozumplík J., 1992. *Andrológia a umela inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava.

Gibbons, A. E., Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal reproduction*, 16, 803-809.

Gootwine E., 2016. *Sheep: Reproductive Management*. Reference Module in Food Science. Elsevier.

Goovaerts, I. G. F., Hoflack, G. G., Van Soom, A., Dewulf, J., Nichi, M., de Kruif, A., & Bols, P. E. J. (2006). Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*, 66, 323–330

Gordon I., 2004. *Reproductive technologies in farm Animals*. CABI Publishing. 332s. ISBN 0-85199-862-3.

- Grieblová, A. (2018). Flow cytometry in sperm quality assessment. *Výzkum v Chovu Skotu*, 60(1), 6-12.
- Hafez ESE., Hafez B., editors., 2000. *Reproduction in Farm Animals* 7 edition. Wiley Blackwell, Philadelphia.
- Hassan M. R., a kol., 2009. Influence of age on the spermiogramic parameters of native sheep. *Bangladesh Univ.* 7(2): 301-304
- Horák F., 2004. *Ovce a jejich chov*. Praha, 304 s. ISBN 80-209-0328-3.
- Horák F., a kol., 1999. *Chov ovcí*. Praha. 156 s.
- Horák F., a kol., 2012. *Chováme ovce*. Praha. 384 s.
- Horák F., Tereznerová K., 2010. *Světový genofond ovcí a koz*. Brno. Svaz chovatelů ovcí a koz. ISBN 978-80-904140-6-8.
- Jahan-Tigh R. R., Ryan C., Obermoser G., Schwarzenberger K., 2012. *Flow Cytometry. The Society for Investigative Dermatology*. Vol 132
- Jelínek P., Koudela K., 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Brno. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7644-1.
- Jiménez F. M., Puchades S., Gadea J., Vicente J. S., Viudes de Castro M. P., 2005. Effect of semen collection method on pre and post thaw Guirra ram spermatozoa. Vol. 64., page 1756 – 1765.
- Juyena, N. S., Stelletta, C., 2011. Seminal Plasma. An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(October), 536–551. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583>
- Kos V., Andrlíková M., Ledabylová A., Marková B., Koudelová A., Novotný R., Vránová L., Čech S., 2019. *Příručka pro praktická cvičení z andrologie*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- Kuchtík J., Hošek M., Axmann R., Milerski M., 2007. *Chov ovcí*. Vyd. 1. Brno. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 110 s. ISBN 078-80-7375-094-7.

Ledesma A., Manes J., Ríos G., Aller J., Cesari A., Alberio R., Hozbor F., 2015. Effect of seminal plasma on post-thaw quality and functionality of Corriedale ram sperm obtained by electroejaculation and artificial vagina. *Reproduction in domestic animals* 50, 386-392.

Losano, J., Angrimani, D., Dalmazzo, A., Rui, B., Brito, M., Mendes, C., Nichi, M. (2017). Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(2), 289–297. doi:10.1111/rda.12901

Louda F., a kol., 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biochemických metod. Česká zemědělská univerzita. Praha. 225 s.

Louda F., Hegedüšová Z., 2009. Inseminace ovcí – intenzifikační faktor šlechtitelské práce. Rapotín. ISBN 978-80-260-0718-0.

Louda F., Vaněk D., Ježková A., Stádník L., Bjelka M., Bezdíček J., Pozdíšek J., 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín. ISBN: 978-80-87144-05-3.

Ma, C., Liu, C., Li, X., Lu, T., Bai, C., Fan, Y., ... & Guo, Y. (2017). Cryopreservation and multipotential characteristics evaluation of a novel type of mesenchymal stem cells derived from Small Tailed Han Sheep fetal lung tissue. *Cryobiology*, Volume 78, 2017, Pages 1-9, ISSN 0011-2240.

Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & De Paz, P. (2010). Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in domestic animals*, 45, 67-78.

Marvan F., 2003. Morfologie hospodářských zvířat. Vyd. 3. Česká zemědělská univerzita v Praze v nakl. Brázda. ISBN 80-213-1172-X.

Masoudi, R., Sharafi, M., Shahneh, A. Z., Towhidi, A., Kohram, H., Esmaili, V., Davachi, N. D. (2016). Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*, 73(1), 69-72.

Mátlová, V., Němeček, T., Drobílková, K. Ministerstvo zemědělství, (2021). GENETICKÉ ZDROJE ZVÍŘAT a jejich praktické využití. ISBN 978-80-7434-636-1. Dostupné z: https://eagri.cz/public/web/file/656764/Geneticke_zdroje_zvirat_A5_WEB.pdf

McKinnon K. M., 2018. Current protocols in immunology. Flow cytometry. PMID: PMC5939936

Milerski M. (2016) Metodika uchování genetického zdroje zvířat. Plemeno: Valašská ovce. Dostupné z: <http://genetickezdroje.cz/wp-content/uploads/2019/11/Metodika-uchov%C3%A1n%C3%AD-GZ-OV.pdf>

Ministerstvo zemědělství, (2017). Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství na období 2018–2022. ISBN 978-80-7434-385-8. Dostupné z: https://eagri.cz/public/web/file/552763/Narodni_program_konzervace_FINAL.pdf

Muiño, R., Peña, A. I., Rodríguez, A., Tamargo, C., & Hidalgo, C. O. (2009). Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*, 72(6), 860-868.

Nema, S. P., Dhami, A. J., & Kavani, F. S. (2009). Effect of thawing regime on post-thaw quality of ram semen frozen in tris, citrate and phosphate based diluents. *Indian Veterinary Journal*, 86(5), 478-480.

Niu, Z. H., Huang, X. F., Jia, X. F., Zheng, J., Yuan, Y., Shi, T. Y., ... & Feng, Y. (2011). A sperm viability test using SYBR-14/propidium iodide flow cytometry as a tool for rapid screening of primary ciliary dyskinesia patients and for choosing sperm sources for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 95(1), 389-392.

Ntemka A., Kiossis E., Boscós C., Therdoridis A., Kourousekos G., Tsakmakidis I., 2019. Impact of age and season on Chios ram semen quality. September 2019. vol. 178., pages 15-17. Ochodnický D., Chováme ovce a kozy, Příroda, Bratislava, 1986, 145 s.

Olivera J, Gil J, Araujo A, Gamarra J, Teixeira V, Fierro S. I- Preservación seminal para la IA cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: semen refrigerado (24 y 48 horas). Uruguay: INIA; 2005. INIA Serie Actividades de Difusión.

Pekarčíková, L., Knopfová, L., Ondroušková, E., & Šmarda, J. (2014). Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti. *Klinická onkologie*, 27(3), 15-21. Peña, F., 2015. Multiparametric flow cytometry, a relevant tool for sperm function evaluation. *Animal Reproduction*, 12(3), 351–355

Peris-Frau, P., Martín-Maestro, A., Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Ajofrín, I., Cesari, A., Garde, J. J., Soler, A. J. (2020). Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*, 145, 100-108.

Pini, T., Farmer, K., Druart, X., Teixeira-Gomes, A. P., Tsikis, G., Labas, V., Graaf, S. P. (2018). Binder of sperm proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Cryobiology*, 82, 78-87.

Pontbriand, D., Howard, J. G., Schiewe, M. C., Stuart, L. D., & Wildt, D. E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26(4), 341-354.

Ptáček, M., Stádníková, M., Savvulidi, F., & Stádník, L. (2019). Ram semen cryopreservation using egg yolk or egg yolk-free extenders: Preliminary results. *Scientia agriculturae bohemia*, 50(2), 96-103.

Pugh D., Baird An., 2012. *Sheep and Goat Medicine*. Elsevier. ISBN 9781437723533.

Roudná, M., & Dotlačil, L. (2007). *Genetické zdroje-význam, využívání a ochrana*. Ministerstvo životního prostředí. Praha. ISBN 978-80-7212-469-5.

Saha, A., Asaduzzaman, M., & Bari, F. Y. (2022). Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary Medicine International*, 2022.

Savvulidi, F., Ptacek, M., Savvulidi Vargova, K., & Stadnik, L. (2019). Manipulation of spermatogonial stem cells in livestock species. *Journal of animal science and biotechnology*, 10, 1-18.

Savvulidi, F. G., Ptacek, M., Malkova, A., Beranek, J., & Stadnik, L. (2021). Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science*, 66(2), 55-64.

Shapiro H. M., 2003., *Practical Flow Cytometry*. New Jersey. ISBN 0-471-41125-6.

Šichtař, J., & Janošíková, M. (2017). *Využití epididymálních spermií v asistované reprodukci koní*.

Šichtař, J., Bubeníčková, F., Šimoník, O., & Nehasilová, A. (2018) Rychlost spermií po rozmrazení je u dobře a špatně mrazitelných hřebců závislá na typu použitého obalu inseminační dávky.

Šimoník, O., Šichtař, J., Rajmon, R., Svobodová, I., Folková, P., Dokoupilová, A., ... & Palacká, A. (2016). *Odběr, hodnocení a kryokonzervace ejakulátu psů*. Česká zemědělská univerzita.

Štolc L., Nohejlová L., Štolcová J., 2007. *Základy chovu ovcí*. Praha. ISBN 978-80-7271-000-3.

Uysal, O., Bucak, M. N. (2007). Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), 383-390.

Vašíček, J., Baláži, A., Svoradová, A., Vozaf, J., Dujíčková, L., Makarevich, A. V., ... & Chrenek, P. (2022). Comprehensive Flow-Cytometric Quality Assessment of Ram Sperm Intended for Gene Banking Using Standard and Novel Fertility Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5920.

Věžník Z., Přinosilová P., Zajícová A., 2009. Stanovení membránové resistance spermií kance modifikovaným testem HOS. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Czech Republic. <http://www.respigbreed.cz/2009/2/11.pdf>

Wang, L., Jia, X. B., Chen, Y. J., Chen, X. G., Zhang, X. X., Liu, Y. F., ... & Liu, Y. S. (2021). Effect of different thawing rates on the quality of frozen-thawed boar spermatozoa. *Animal reproduction science*, 230, 106797.

Windsor, D. P. (1997). Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reproduction, fertility and development*, 9(3), 279-284.

Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2021). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 106904.

10 Seznam použitých zkratk a symbolů

T1 – hodnocení vzorky ihned po rozmrazení

T2 – hodnocení vzorku 2 hodiny po rozmrazení

VIA – životaschopnost

MMP – mitochondriální membránový potenciál

PMD – poškození plazmatické membrány

ACRD – poškození akrozomu

PMAD – poškození plazmatické membrány a akrozomu

MOT – motilita

PROG – progresivní motilita

VAP – průměrná rychlost dráhy

VCL – křivočará rychlost

VSL – rychlost přímky

LIN – linearita

STR – přímost

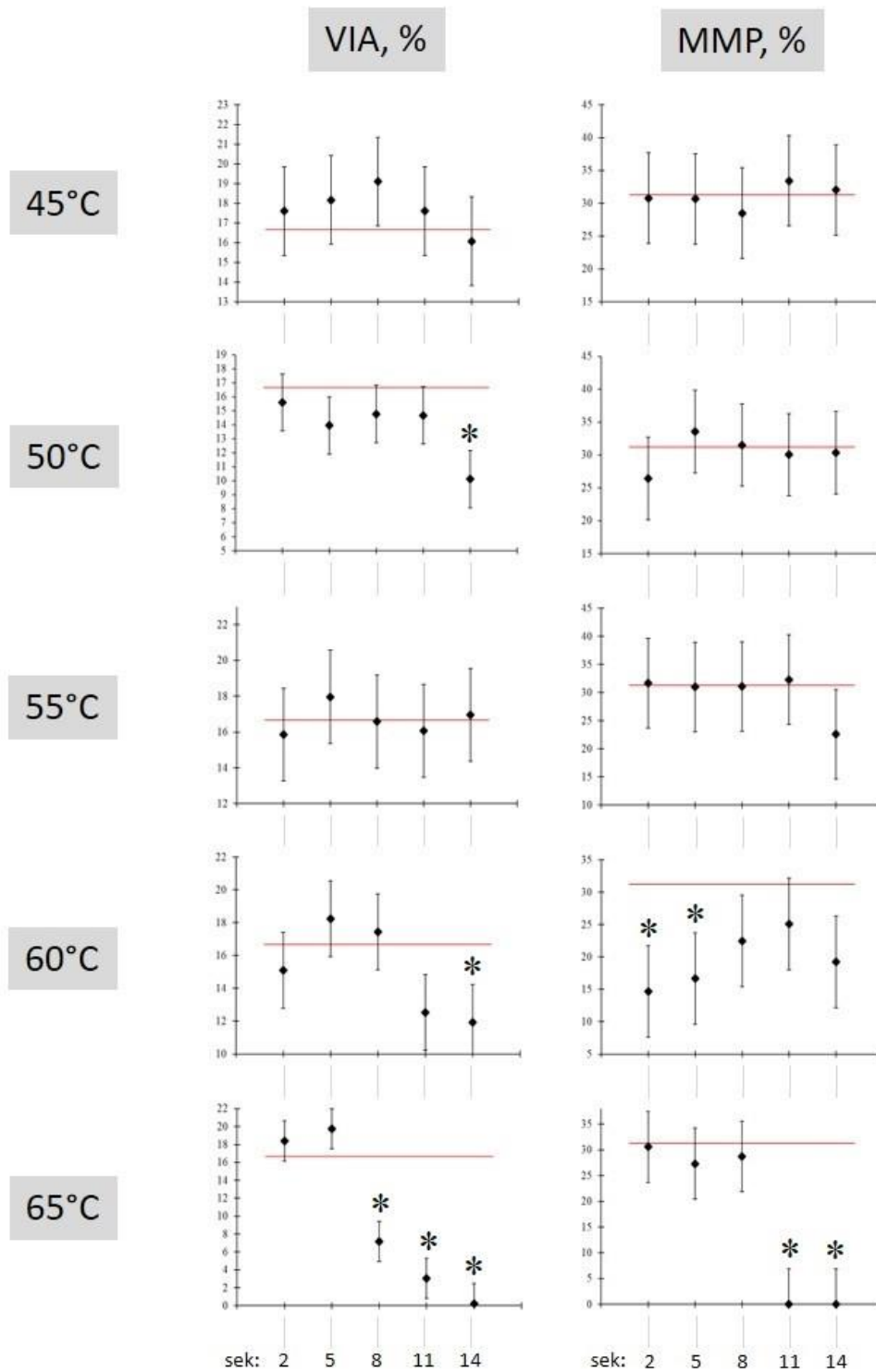
n.e. – nebylo hodnoceno

* Statisticky významný rozdíl $p < 0,05$ mezi naměřenou hodnotou a standardem

11 Samostatné přílohy

11.1 Průtoková cytometrie hlavní parametry T2

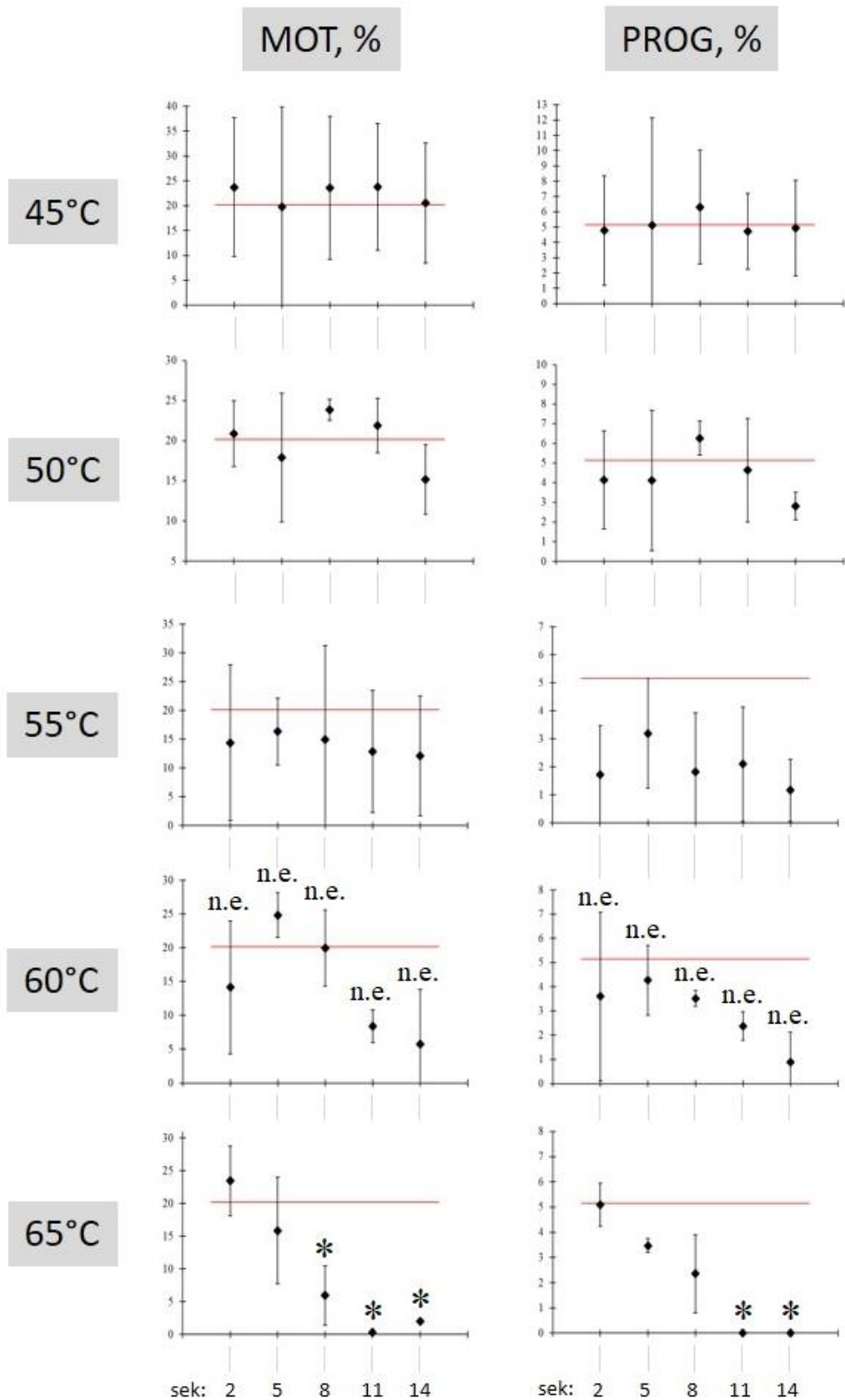
Graf č. 11: Výsledek průtokové cytometrie T2 hlavní parametry variabilita a mitochondriální membránový potenciál



* Statisticky významný rozdíl mezi naměřenou hodnotou a standardem

11.2 CASA hlavní parametry T2

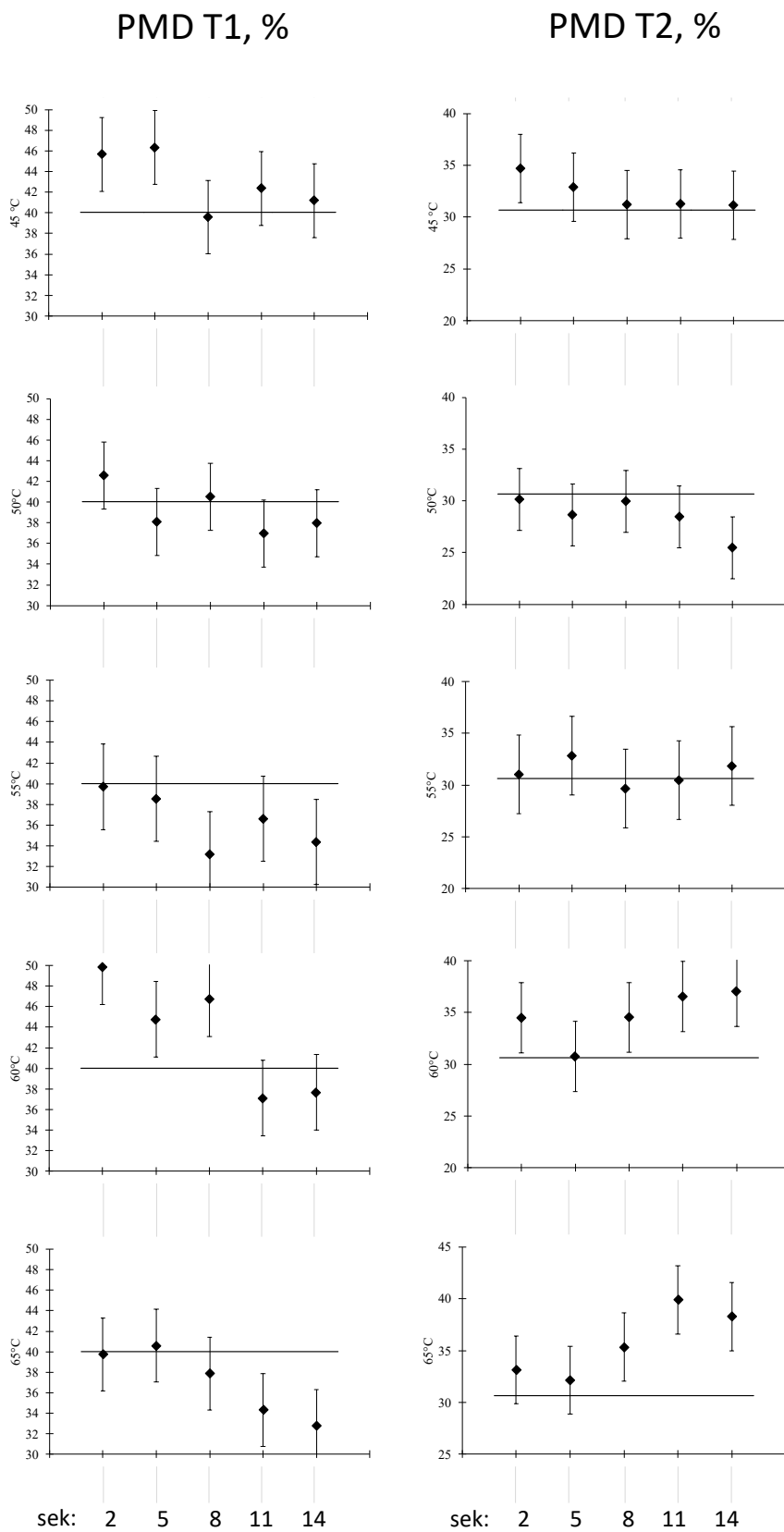
Graf č. 12: Výsledky CASA hlavní parametry T2 motilita a progresivní motilita



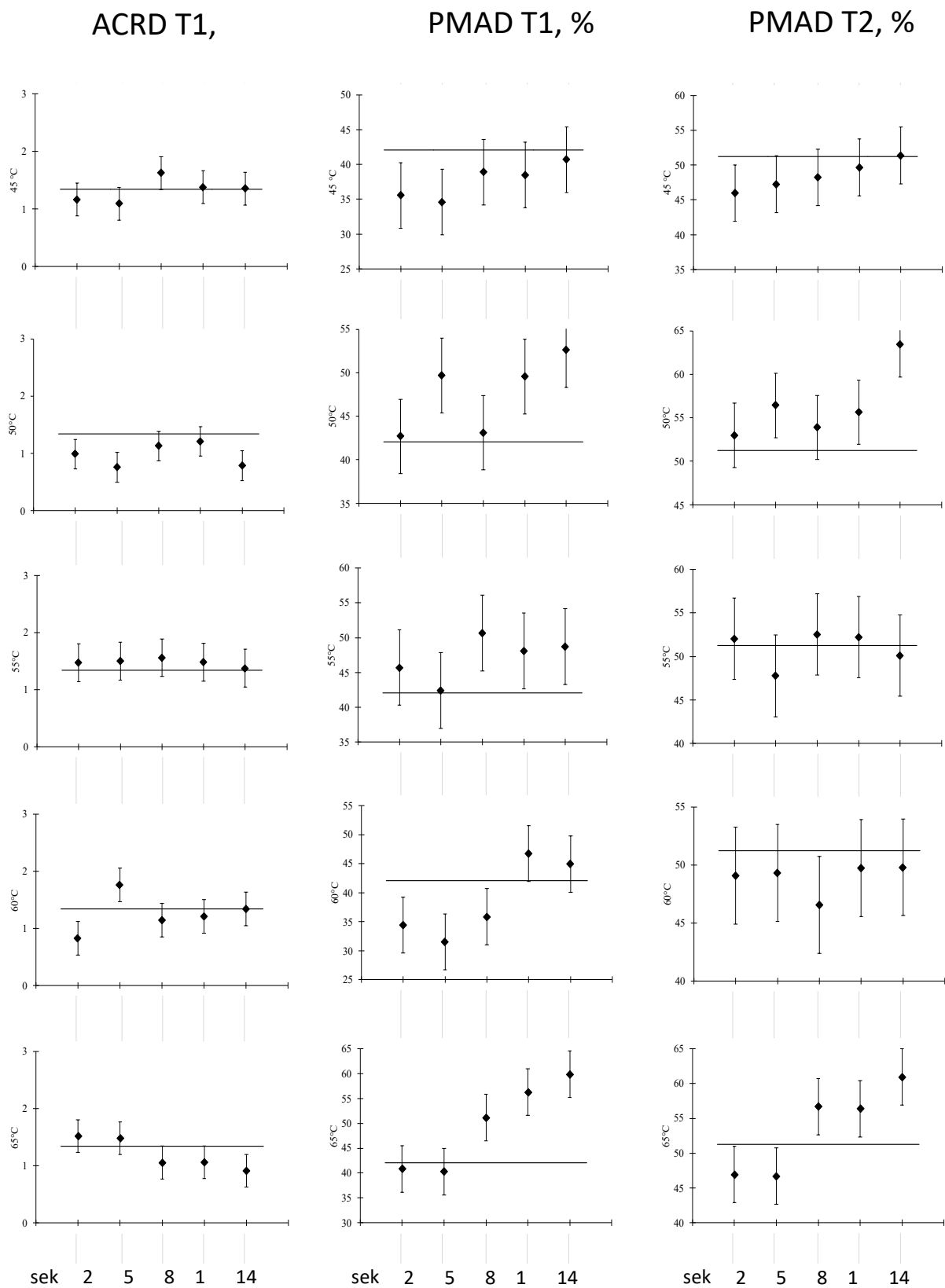
* Statisticky významný rozdíl mezi naměřenou hodnotou a standardem
n.e. – nebylo hodnoceno

11.3 Průtoková cytometrie vedlejší parametry T1 a T2

Graf č. 13: Výsledek průtokové cytometrie T1 a T2 poškození plazmatické membrány

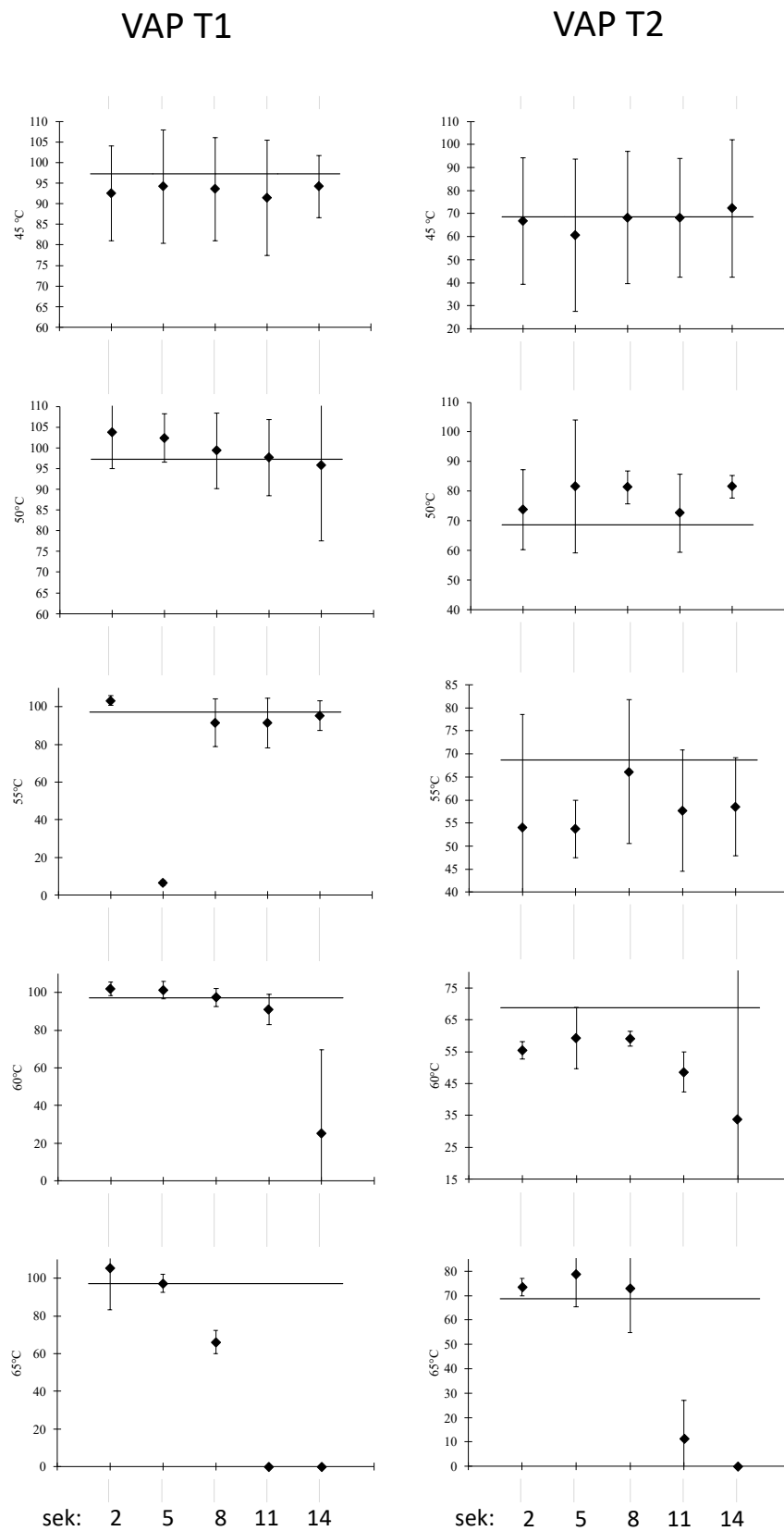


Graf č. 14: Výsledek průtokové cytometrie T1 a T2 poškození akrozomu a plazmatické membrány



11.4 CASA vedlejší parametry T1 a T2

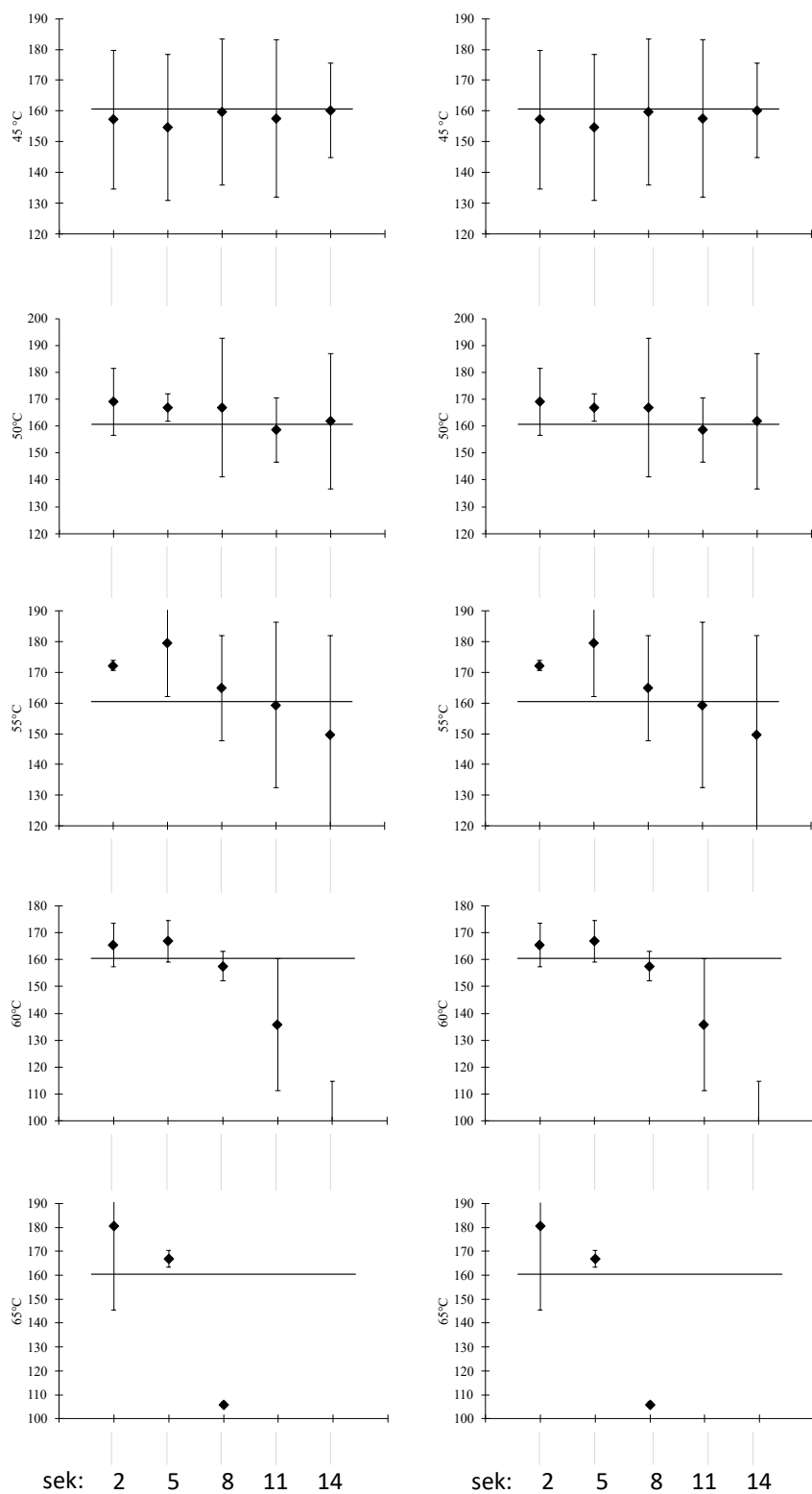
Graf č. 15: Výsledky CASA průměrná rychlost dráhy (jednotky $\mu\text{m/s}$)



Graf č. 16: Výsledky CASA křivočará rychlost (jednotky $\mu\text{m/s}$)

VCL T1

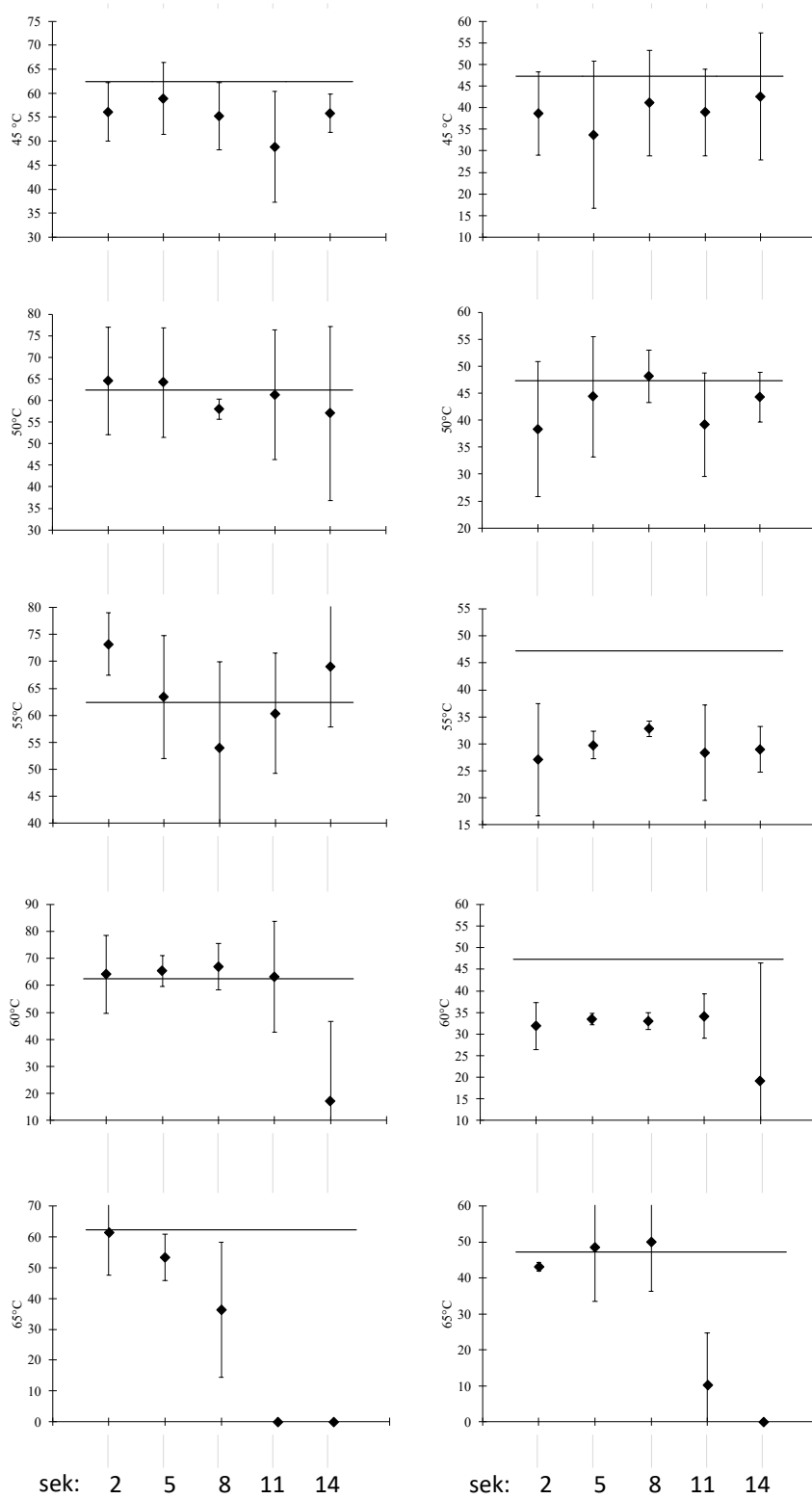
VCL T2



Graf č. 17: Výsledky CASA rychlost přímky (jednotky $\mu\text{m/s}$)

VSL T1

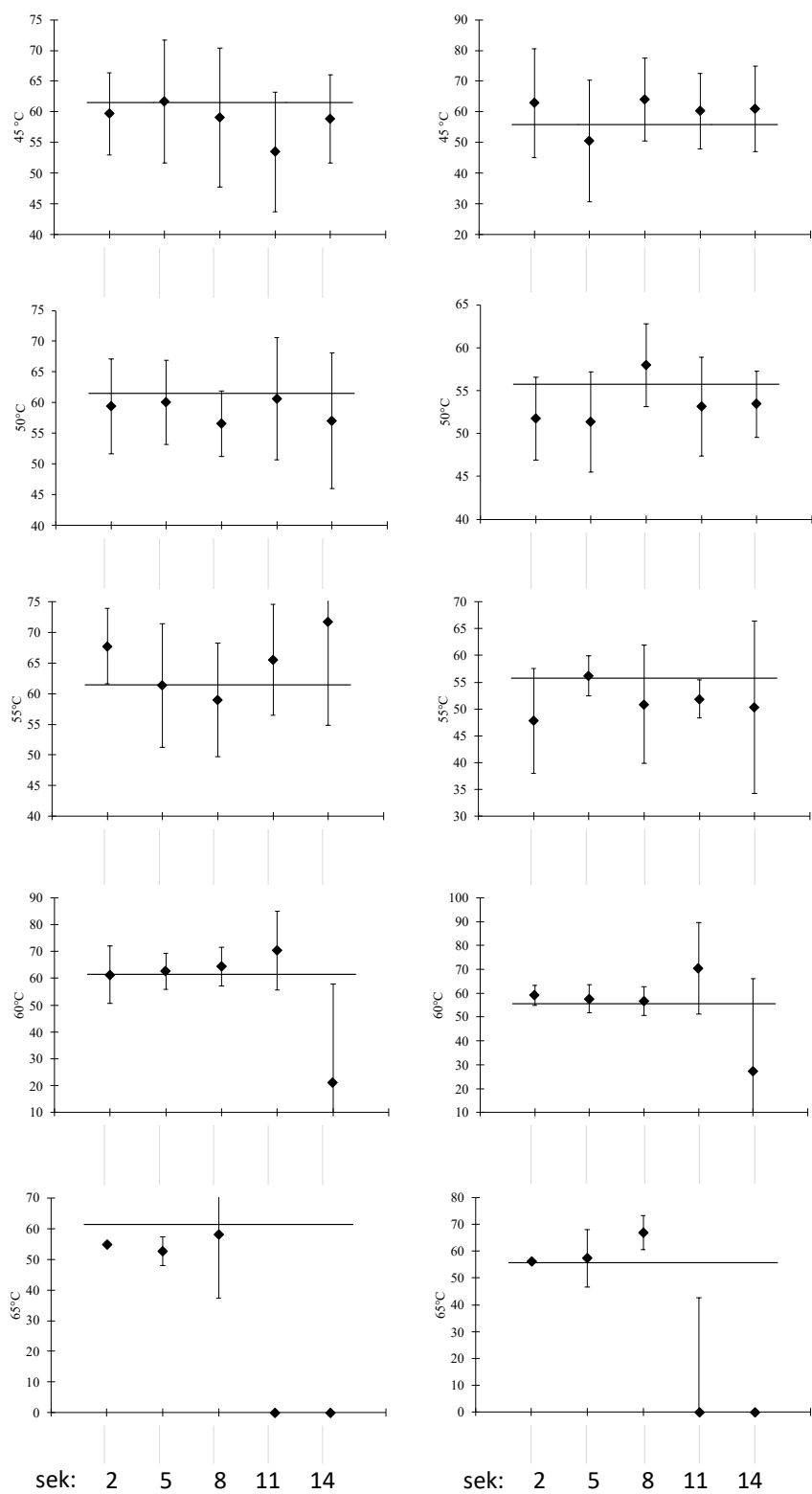
VSL T2



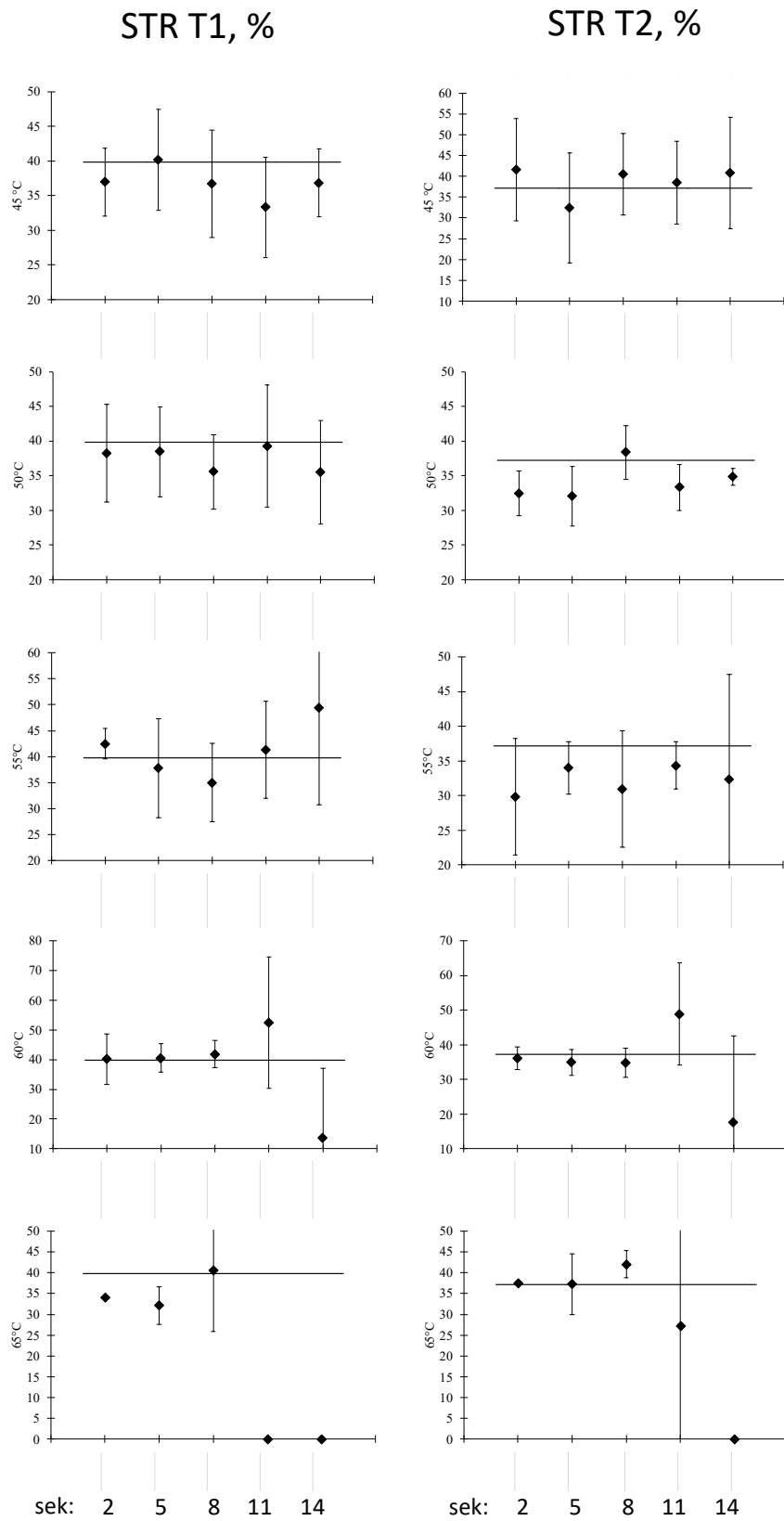
Graf č. 18: Výsledky CASA linearita

LIN T1, %

LIN T2, %



Graf č. 19: Výsledky CASA přímost



11.5 Statistické významnosti průtokové cytometrie

Tabulka č. 1: Významnosti mezi variantou teplota/čas vůči standardu T1
Statisticky významný rozdíl (P <0,05)

	VIA1	PMD1	PMAD1	ACRD1	MMP1
45/2	0.7074	0.1574	0.2152	0.5746	0.1086
45/5	0.6102	0.1141	0.1544	0.4313	0.0435
45/8	0.2401	0.9108	0.5442	0.3751	0.1194
45/11	0.6615	0.5583	0.4927	0.9115	0.8710
45/14	0.9394	0.7710	0.7923	0.9716	0.8452
50/2	0.2536	0.4562	0.8924	0.1930	0.6457
50/5	0.0385	0.5630	0.0912	0.0341	0.5218
50/8	0.5947	0.8877	0.8186	0.4292	0.3834
50/11	0.0803	0.3627	0.0965	0.6262	0.2227
50/14	0.0015	0.5424	0.0204	0.0434	0.2951
55/2	0.2772	0.9397	0.5333	0.7008	0.2380
55/5	0.7507	0.7360	0.9565	0.6394	0.4033
55/8	0.5402	0.1232	0.1444	0.5304	0.9532
55/11	0.3792	0.4442	0.3037	0.6835	0.4012
55/14	0.7461	0.2032	0.2578	0.9123	0.4951
60/2	0.5527	0.0110	0.1272	0.0968	<.0001
60/5	0.0478	0.2134	0.0367	0.1615	0.0001
60/8	0.9190	0.0802	0.2159	0.5365	<.0001
60/11	0.5533	0.4404	0.3529	0.6795	<.0001
60/14	0.8546	0.5334	0.5689	0.9956	<.0001
65/2	0.6059	0.9387	0.7959	0.5345	0.9293
65/5	0.6762	0.8829	0.7130	0.6193	0.9840
65/8	0.0129	0.5558	0.0635	0.3399	0.8125
65/11	0.0023	0.1208	0.0041	0.3500	<.0001
65/14	0.0002	0.0491	0.0004	0.1526	<.0001

Tabulka č. 2: Významnosti mezi variantou teplota/čas vůči standardu T2
Statisticky významný rozdíl (P<0,05)

	VIA2	PMD2	PMAD2	ACRD2	MMP2
45/2	0.7066	0.2723	0.2419	0.2247	0.9529
45/5	0.5474	0.5394	0.3760	0.3588	0.9394
45/8	0.3290	0.8870	0.5043	0.8483	0.7206
45/11	0.7072	0.8720	0.7240	0.8025	0.7757
45/14	0.8113	0.8932	0.9794	0.9609	0.9189
50/2	0.6171	0.8608	0.6538	0.6119	0.4603
50/5	0.2059	0.5185	0.1820	0.0597	0.7233
50/8	0.3777	0.8130	0.4929	0.9160	0.9673
50/11	0.3516	0.4745	0.2559	0.4791	0.8529
50/14	0.0027	0.0979	0.0021	0.0868	0.8901
55/2	0.7740	0.9269	0.8742	0.2196	0.9596
55/5	0.6407	0.5913	0.4913	0.9257	0.9761
55/8	0.9769	0.8056	0.7966	0.4765	0.9870
55/11	0.8347	0.9668	0.8485	0.4833	0.9014
55/14	0.9151	0.7735	0.8189	0.2913	0.3122
60/2	0.5142	0.2741	0.6187	0.6150	0.0255
60/5	0.5089	0.9798	0.6578	0.3509	0.0489
60/8	0.7484	0.2703	0.2817	0.9237	0.2310
60/11	0.0870	0.0961	0.7271	0.3489	0.4032
60/14	0.0500	0.0721	0.7407	0.4598	0.1033
65/2	0.4525	0.4626	0.3036	0.7559	0.9240
65/5	0.1818	0.6583	0.2784	0.8083	0.5780
65/8	<.0001	0.1681	0.1946	0.0163	0.7210
65/11	<.0001	0.0074	0.2202	0.0030	<.0001
65/14	<.0001	0.0261	0.0221	0.0009	<.0001

11.6 Statistické významnosti CASA

Tabulka č.3: Významnosti mezi variantou teplota/čas vůči standardu CASA T1

Statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$)

n.e. – nebylo hodnoceno

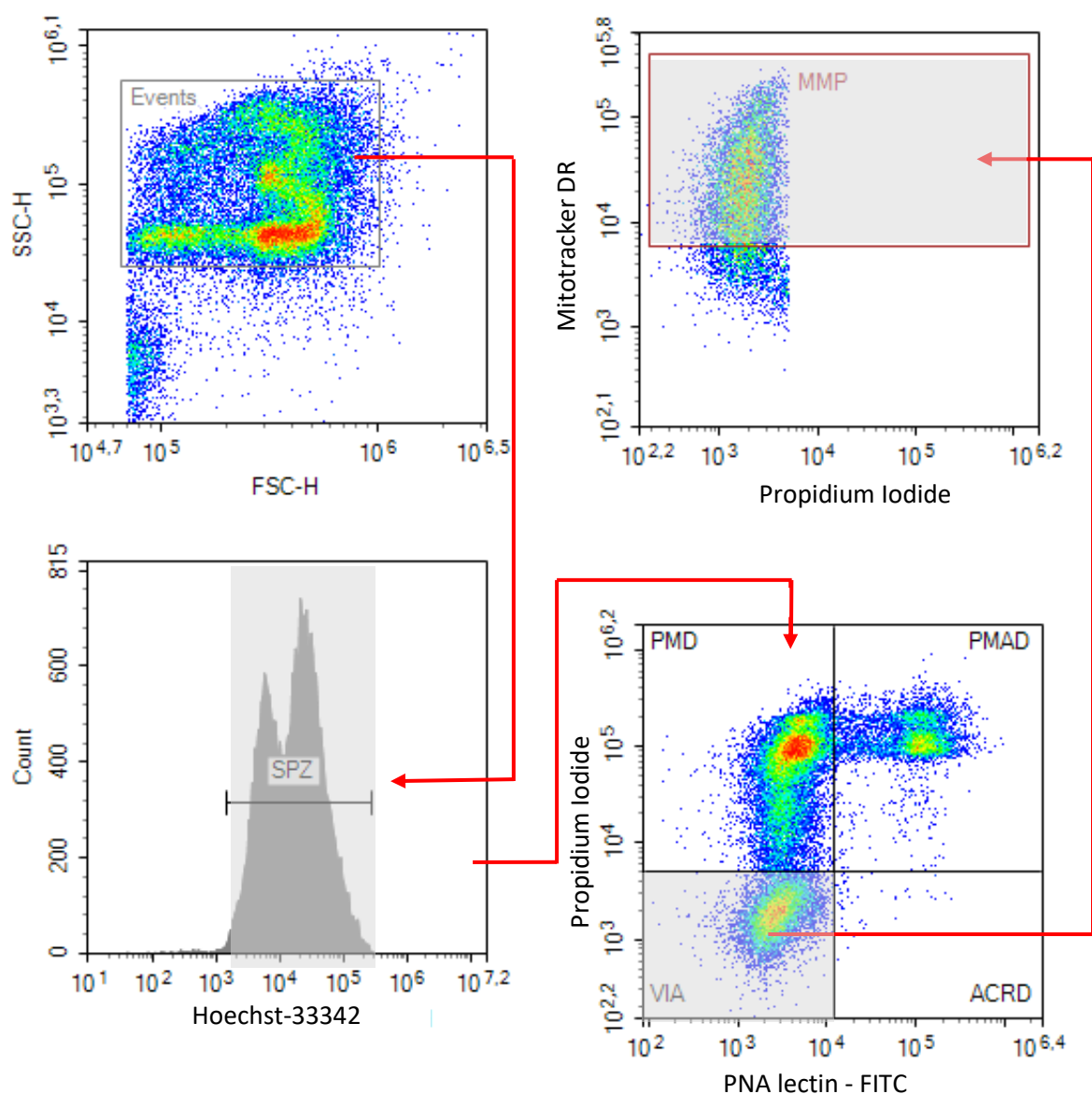
	MOT1	PROG1	VAP1	VCL1	VSL1	LIN1	STR1
45/2	0.9782	0.7723	0.8173	0.4506	0.5098	0.4593	0.5103
45/5	0.9034	0.5121	0.9912	0.3489	0.2977	0.2987	0.2235
45/8	0.9149	0.9929	0.9261	0.5701	0.5844	0.5198	0.5417
45/11	0.7081	0.7209	0.7044	0.4700	0.7411	0.8530	0.9887
45/14	0.3191	0.8622	0.9885	0.5978	0.5297	0.5385	0.5237
50/2	0.2764	0.0283	0.7635	0.2854	0.3165	0.3038	0.1829
50/5	0.2221	0.1071	0.8902	0.3540	0.2957	0.3467	0.1943
50/8	0.8752	0.0096	0.8318	0.3539	0.0791	0.1663	0.0845
50/11	0.9398	0.1095	0.6845	0.6966	0.1689	0.3853	0.2386
50/14	0.0103	0.0008	0.5376	0.5513	0.0612	0.1859	0.0821
55/2	0.9212	0.5059	0.4183	0.5476	0.2709	0.5694	0.6076
55/5	0.6446	0.6466	0.4402	0.3037	0.9449	0.8665	0.8970
55/8	0.5882	0.7476	0.7009	0.8565	0.3546	0.6602	0.6105
55/11	0.4302	0.5935	0.6840	0.8865	0.8026	0.7515	0.7229
55/14	0.3473	0.7349	0.9892	0.4816	0.5024	0.3010	0.1490
60/2	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/5	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/8	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/11	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/14	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
65/2	0.1361	0.0094	0.7298	0.1377	0.2061	0.1559	0.0882
65/5	0.0744	0.0038	0.6332	0.4677	0.0393	0.0970	0.0506
65/8	0.0004	0.0003	0.0006	0.0078	0.0003	0.2891	0.3908
65/11	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
65/14	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Tabulka č. 4: Významnosti mezi variantou teplota/čas vůči standardu CASA T2
 Statisticky významný rozdíl (P <0,05)

n.e. – nebylo hodnoceno

	MOT2	PROG2	VAP2	VCL2	VSL2	LIN2	STR2
45/2	0.7795	0.6002	0.3509	0.1229	0.4018	0.9066	0.8400
45/5	0.4088	0.7684	0.1179	0.0932	0.1363	0.0926	0.1729
45/8	0.8027	0.6441	0.4311	0.3794	0.6054	0.9755	0.9934
45/11	0.7626	0.5730	0.4288	0.3916	0.4213	0.6545	0.7338
45/14	0.5381	0.6813	0.7105	0.6980	0.7559	0.7296	0.9487
50/2	0.9936	0.4187	0.3165	0.7303	0.0334	0.7046	0.5937
50/5	0.4631	0.4107	0.0920	0.3315	0.1439	0.7349	0.5523
50/8	0.4710	0.7056	0.0963	0.4702	0.3003	0.2871	0.7380
50/11	0.8085	0.5934	0.3674	0.7283	0.0416	0.5931	0.6851
50/14	0.1622	0.1245	0.0922	0.4384	0.1419	0.5720	0.8528
55/2	0.9725	0.3404	0.3446	0.1709	0.4277	0.5295	0.6485
55/5	0.6942	0.8222	0.3319	0.2183	0.6087	0.8367	0.9251
55/8	0.9257	0.3622	0.9846	0.9095	0.8410	0.7446	0.7556
55/11	0.7160	0.4408	0.5126	0.2598	0.5113	0.8202	0.8891
55/14	0.5909	0.2179	0.5553	0.3563	0.5541	0.7024	0.8968
60/2	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/5	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/8	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/11	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
60/14	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
65/2	0.5956	0.7937	0.4777	0.9046	0.1609	0.4923	0.9041
65/5	0.2761	0.2912	0.2624	0.5078	0.3875	0.4318	0.9238
65/8	0.0021	0.1134	0.5062	0.7769	0.4706	0.0911	0.4784
65/11	<.0001	0.0077	0.0001	<.0001	<.0001	0.0673	0.2343
65/14	<.0001	0.0077	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

11.7 Nastavení regionů pro analýzu průtokové cytometrie



Obrázek č. 4: Regiony (Archiv Autora)

1. charakteristický rozptyl s rozptylovým signálem (SSC, FSC), které jsou typické pro spermatické buňky.
2. Pík se spermatickými buňkami, které obsahovaly DNA (Hoechst-33342).
3. Region procentuálně analyzovaný jako životaschopné (VIA, bez poškozené plazmatické membrány a bez poškozeného akrozomu); jako buňky s poškozenou pouze plazmatickou membránou (PMD); jako buňky s poškozenou jak plazmatickou membránou, tak i akrozomem (PMAD); a jako buňky s poškozeným pouze akrozomem (ACRD).
4. Hodnocení vysoké mitochondriální aktivity (MMP) spermií z VIA buněk.