

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Porovnání vlivu rychlosti chlazení a mrazení na
kvalitu inseminační dávky hospodářských zvířat
Diplomová práce**

**Bc. Pavla Pokorná
Biotechnologie**

Ing. Martina Janošíková Ph. D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Porovnání vlivu rychlosti chlazení a mrazení na kvalitu inseminační dávky hospodářských zvířat " 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 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doktorce Ing. Martině Janošíkové Ph. D. za odborné vedení při psaní mé diplomové práce a cenné a Ing. Kristýně Petričákové za ochotnou a trpělivou pomoc v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala mé rodině za podporu při mých studiích.

Porovnání vlivu rychlosti chlazení a mrazení na kvalitu inseminační dávky hospodářských zvířat

Souhrn

Kryokonzervace gamet je klíčový krok v umělé inseminaci zvířat. U savců se daří optimalizovat mrazící protokoly a dosahuje se dostačujících výsledků. U ptáků stále není proces kryokonzervace spermií uspokojivě optimalizován. Je to způsobeno jejich odlišnou morfologickou stavbou. V práci byly porovnány odlišné výšky chlazení od hladiny tekutého dusíku a sledován vliv různých komerčních ředidel s přídavkem kryoprotektantu.

Inseminační dávky byly tvořeny směsným vzorkem ejakulátů od čtyř kohoutů plemene česká slepice zlatá kropenatá. Plemeno je zařazeno na seznam genových zdrojů České republiky a jedná se o geneticky ohrožený druh. Kohouti byli chováni za stejných podmínek v pokusné a demonstrační stáji při ČZU v Praze. Před a po zamrazení byla u spermií změřena celková motilita na mCASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan). Životnost spermií (PMI), celistvost plazmatické membrány (PMD), akrozomální poškození (ACRD) a dvojí poškození spermií (poškození plazmatické membrány i akrozomu) (PAD) bylo měřeno pomocí průtokového cytometru (Novocyte 3000, Acea Biosciences).

V prvním experimentu se hodnotil vliv výšky chlazení na funkční parametry spermií. Vybrány byly tři výšky – 3,5 cm, 5,0 cm a 7,5 cm. Celková motilita po rozmrazení byla nejvyšší u výšky 5,0 cm. Nejhorší funkční parametry vykazovaly spermie při chlazení na výšce 7,5 cm. Z měřených parametrů bylo nejvíce ovlivněné dvojí poškození spermií. Naopak nejméně bylo ovlivněno poškození akrozomu.

V druhém experimentu se hodnotil vliv přídavku tří různých ředidel (Poultry media[®], Raptac[®] a NeXcell[®]) s přídavkem 9% kryoprotektantu N-methylacetamid (NMA). Dále se hodnotil vliv teploty při rozmrazení (5 °C/100 sekund a 40 °C/30 sekund). Celková motilita byla na hladině významnosti $p < 0,0001$ nejvyšší u ředidel Poultry media[®] a Raptac[®]. Nejhorší výsledky byly u použití ředidla NeXcell[®] ($p < 0,05$). PMD bylo na hladině významnosti $p < 0,0001$ nejvyšší u ředidla NeXcell[®], ACRD dosahovalo na hladině významnosti $p < 0,0001$ nevyšších hodnot u ředidla Poultry media[®] a PAD bylo na hladině významnosti $p < 0,0001$ nevyšší u ředidla NeXcell[®]. Různé teploty při rozmrazení neměly statisticky významný vliv na sledované parametry spermií.

Jako nejvhodnější postup kryokonzervace kohoutích spermií bylo vyhodnoceno použití ředidla Poultry media[®] nebo Raptac[®] s 9 % NMA a chlazení 3,5 cm od hladiny tekutého dusíku. Nejméně vhodné se ukázalo ředidlo NeXcel[®] a výška chlazení 7,5 cm. Nicméně je nutné brát v potaz individualitu chovných jedinců i rozdíly mezi odběrovými dny.

Klíčová slova: ejakulát, mrazící křivka, kryokonzervace, ředidla, průtoková cytometrie

Comparison of the effect of cooling and freezing rate on the quality of the insemination dose of livestock

Summary

Cryopreservation of gametes is a key step in artificial insemination of animals. In mammals, freezing protocols are already being optimized and are achieving sufficient results. In avians, cryopreservation of sperm does not achieve nearly as good results. This is due to their different morphological structure of sperm. In this study different cooling heights from the level of liquid nitrogen were compared and the effect of different commercial diluents with the addition of cryoprotectant was investigated.

The insemination doses were made up of a mixed sample of ejaculates from four roosters of the Czech golden speckled hen breed. The breed is included in the list of genetic resources of the Czech Republic and is a genetically endangered species. The roosters were kept under the same conditions in the experimental and demonstration barn at the ČZU in Prague. Sperm were measured for total motility on mCASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Thailand) before and after freezing. Sperm viability (PMI), plasma membrane damage (PMD), acrosomal damage (ACRD) and double damage (both plasma membrane and acrosome damaged) (PAD) were measured using a flow cytometer (Novocyte 3000, Acea Biosciences).

In the first experiment, the influence of the cooling height on the functional parameters of the sperm was evaluated. We choose three heights – 3.5 cm, 5.0 cm and 7.5 cm. Total motility after thawing was highest at a height of 5.0 cm. The worst functional parameters of sperm were at height of 7.5 cm. Of the parameters measured, double damage was the most affected. On the contrary, acrosome damage was least affected.

In the second experiment, the effect of the addition of three different diluents (Poultry media[®], Raptac[®] and NeXcell[®]) with the addition of 9% cryoprotectant N-methylacetamide (NMA) was evaluated. Furthermore, the influence of temperature during thawing (5 °C/100 seconds and 40 °C/30 seconds) was evaluated. Total motility was the highest at the $p < 0.0001$ significance level with Poultry media[®] and Raptac[®] diluents. The worst results were with the use of NeXcell[®] diluent ($p < 0.05$). PMD was the highest at the $p < 0.0001$ significance level with NeXcell[®] diluent, ACRD was the highest at the $p < 0.0001$ significance level with Poultry media[®] diluent, and PAD was the highest at the $p < 0.0001$ significance level with NeXcell[®] diluent. Different temperatures during thawing did not have a statistically significant effect on the observed sperm parameters.

The use of Poultry media[®] or Raptac[®] diluent with 9% NMA and cooling 3.5 cm from the level of liquid nitrogen was found suitable procedure for cryopreservation of rooster sperm. The least suitable for us was NeXcel[®] and a cooling height of 7.5 cm. However, it is necessary to consider the individuality of the breeding individuals and the differences between sampling days.

Keywords: ejaculate, cooling rate, cryoconservation, extenders, flow cytometry

Obsah

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární řešerše	11
3.1	Ejakulát	11
3.1.1	Spermie	11
3.1.2	Semenná plazma	13
3.1.3	Odběr ejakulátu	14
3.1.3.1	Průtoková cytometrie	15
3.1.4	Izolace epididymálních spermií.....	17
3.2	Inseminační dávka	19
3.2.1	Příprava inseminační dávky	19
3.2.2	Typy ředidel.....	20
3.2.2.1	Ředidla na mléčné bázi.....	21
3.2.2.2	Ředidla na bázi žloutku	22
3.3	Kryokonzervace	25
3.3.1	Kryoprotektanty	25
3.3.2	Chlazení	26
3.3.3	Mrazení	27
3.3.4	Vitrifikace	28
4	Metodika	29
4.1	Zvířata zařazená do experimentu	29
4.2	Odběr materiálu	29
4.3	Zpracování materiálu	29
4.3.1	Experiment 1	30
4.3.2	Experiment 2	30
4.4	Příprava inseminačních dávek, chlazení a mrazení	30
4.4.1	Experiment 1	31
4.4.2	Experiment 2	31
4.5	Hodnocení inseminačních dávek po rozmrazení	31
5	Výsledky	34
5.1	Experiment 1	34
5.1.1	Základní statistické parametry - mCASA.....	34
5.1.2	Základní statistické parametry – průtokový cytometr	35
5.2	Experiment 2	37

5.2.1	Statistická analýza dat	37
5.2.2	Zakladní statistické parametry - mCASA.....	37
5.2.3	Základní statistické parametry hodnocené průtokovým cytometrem	39
5.2.3.1	Procento životaschopných spermií po rozmrazení.....	41
5.2.3.2	Zastoupení spermií s poškozenou plazmatickou membránou, poškozeným akrozomem a dvojitým poškozením.....	43
6	Diskuze	47
7	Závěr.....	50
8	Literatura	51
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	55
10	Seznam tabulek, grafů a obrázků.....	56

1 Úvod

S rostoucí poptávkou po živočišných produktech roste i poptávka po jednoduchých a rychlých formách produkce zvířat. Velký posun v tomto poskytlá umělá inseminace, díky které můžeme využívat ty nejlepší plemeny z celého světa, dokonce i takové, kteří již nežijí. Vzhledem k tomu, že majitel chovné samice může využít inseminační dávky, které se mohou skladovat i několik let, není již nutné čekat na správné načasování přítomnosti samce a vhodnou dobu inseminace samice. Umělá inseminace dále pomáhá zachovat ohrožené druhy a udržovat širší rozmanitost genetické informace druhů.

Při umělé inseminaci lze použít inseminační dávky čerstvé, chlazené nebo mražené. Obecně platí pravidlo, že čím déle chceme dávky skladovat, tím důkladněji a náročněji je musíme připravovat. Nativní ejakulát se nejdříve zcentrifuguje, aby se odstranila semenná plazma a poté je naředěna ředidly na požadovanou koncentraci spermií. Při mrazení působí na spermie nebezpečné fyzikální jevy spojené s poklesem teploty. Mezi ty nejpodstatnější patří tvorba ledových krystalů. Jako prevence proti tomuto jevu se do ředidel přidávají látky měnící vlastnosti vody při zamrznání – kryoprotektanty.

Mrazení inseminačních dávek se provádí podle přesných mrazících protokolů, které jsou odlišné pro každý živočišný druh. I mezi jedinci stejného druhu se vyskytují rozdíly ve schopnosti spermií odolávat negativním vlivům mrazení. Je snaha ucelit mrazící protokoly a najít optimum, které by vyhovovalo všem jedincům. U hospodářských zvířat z řad savců se již dosahuje poměrně dobrých hodnot inseminačních dávek po zamrznutí. Jinak je tomu u ptáků, konkrétně u kohoutů. Kohoutí spermie jsou specifické svým tvarem i složením plazmatické membrány, což znemožňuje použití klasických mrazících protokolů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce

Cílem diplomové práce je optimalizace chladících a mrazících křivek pro výrobu inseminačních dávek u hospodářských zvířat.

Hypotéza práce

Hypotézou práce je předpoklad, že různá rychlost poklesu teploty v průběhu kryokonzervace má významný vliv na kvalitativní charakteristiky semene hospodářských zvířat a tím i na kvalitu inseminační dávky.

3 Literární rešerše

3.1 Ejakulát

Ejakulátem se rozumí směs spermií a výměšků pohlavních žláz – semenné plazmy. Mezi hospodářskými zvířaty jsou velké rozdíly v jednotlivých parametrech. Dá se říct, že čím větší objem ejakulátu, tím je menší koncentrace spermií a naopak. Obecně se v ejakulátu nesmí vyskytovat žádné příměsi jako krev a hnis. Měl by být bez výrazného zápachu a bělavé barvy.

Zatím neexistuje žádný konkrétní parametr, který by přesně určoval míru schopnosti oplození ejakulátu. Některé sociální studie, například García-Vázquez et al. (2016), poukazují na fakt, že u koní přítomnost ostatních hřebců v chovu může ovlivnit kvalitu a celkové parametry ejakulátu. U myších samců byly dokonce zaznamenány i změny v počtu semenotvorných kanálků ve varleti. Rozdílné parametry ejakulátu u hospodářských zvířat uvádí tabulka číslo 1. Objem je ovlivněn množstvím semenné plazmy. Savci mají obecně větší procentuální zastoupení semenné plazmy než ptáci. Celková motilita může být ovlivněna odběrovým dnem, ale jsou i výrazné rozdíly mezi jedinci stejného druhu.

Tabulka 1: Základní parametry ejakulátu hospodářských zvířat. Převzato a upraveno z (Wiebke et al. 2021; Khodaei-Motlagh et al. 2022; Janosikova et al. 2023).

	Kanec	Býk	Hřebec	Kohout
Objem (ml)	100 (50-500)	4 (1,5-12)	40 (20-160)	0,6
Koncentrace spermií (10⁹/ml)	0,15 (0,1-1)	0,6 (0,5-2,5)	0,1 (0,08-0,35)	6-10
Celková motilita (%)	70	70	70	86,4

3.1.1 Spermie

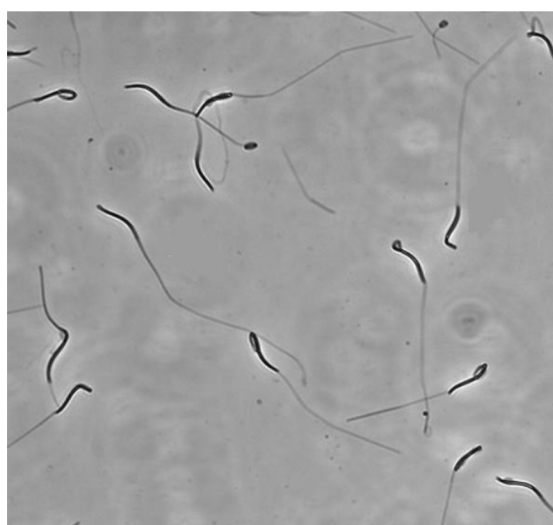
Spermie, samčí gamety, jsou vysoce specializované pohyblivé buňky, které vznikají v semenotvorných váčcích ve varleti procesem spermatogeneze. Odtud putují do nadvarlete, kde dozrávají. U ptáků je tvorba také započata ve varleti, ale dozrávají v chámovodu (Janosikova et al. 2023), kde také získávají motilitu a fertilizační schopnost (Partyka & Niżański, 2022). Délka spermatogeneze je druhově variabilní, zatímco u koně trvá 57 dní, u kohouta trvá pouze 12 dní (Jamieson 2007). Její délka se u hospodářských zvířat pohybuje od 47 do 114 μm (García-Vázquez et al. 2016). Spermie se mezi druhově liší tvarem hlavičky, složením plazmatikové membrány i kinematickými parametry. Tyto rozdíly mají za následek různé vlastnosti spermií, jako například přežitelnost spermií v samičím pohlavním traktu – spermie dobytka přežijí pouze několik hodin, zatímco spermie kohouta přežijí i několik dní (Partyka & Niżański, 2022). Někteří vědci, např. Roldan (2019), tvrdí, že délka spermie může být evoluční

výhodou pro samce při kompetici spermií od více samců. Morfologicky se dělí na dvě základní části – hlavičku a bičík.

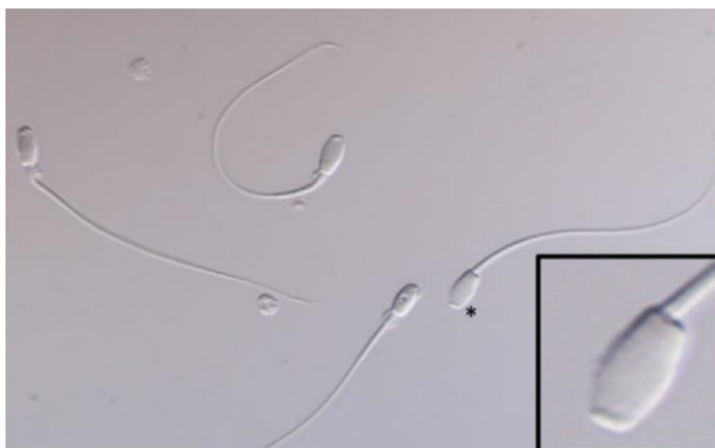
Tabulka 2: Rozměry spermií u jednotlivých druhů hospodářských zvířat (převzato a upraveno z García-Vázquez et al. 2016, Chenoweth & Lorton, 2014).

Druh spermie	Hřebeč	Kanec	Býk	Kohout
Hlava – šířka (μm)	3,90	4,41	4,30	0,5-0,7
Hlava – délka (μm)	7,00	9,08	6,77	12
Střední část bičíku (μm)	9,80	10,00	9,38	3,7
Hlavní část bičíku (μm)	43,80	36,10	36,93	64
Celková délka bičíku (μm)	53,60	46,57	46,76	70
Celková délka spermie (μm)	60,60	55,65	53,53	95

Hlavička spermie je největší část spermie obsahující haploidní sadu chromozomů. Každý živočišný druh má rozdílné tvary hlavičky i velikosti jednotlivých částí spermie, viz tabulka 2. Například spermie hospodářských zvířat jsou oválného až kulatého tvaru, ale spermie hlodavců má výrazný háčkovitý tvar a je mnohem větší (Chenoweth & Lorton, 2004). Spermie ptáků je naopak podlouhlá s úzkou hlavičkou. Průměr hlavičky je podobný jako průměr bičíku (Janosikova et al. 2023). Rozdílný tvar hlavičky ptačí a savší spermie je ukázán na obrázku 1 a 2. U některých druhů je modifikace tvaru evoluční mechanismus, jak si spermie navzájem napomáhají, aby se jich k oocyту dostalo větší množství. Na apikální straně se nachází sekreční organela akrozom.



Obrázek 1: Kohoutí spermie (převzato a upraveno z Li et al. 2020).



Obrázek 2: Spermie hřebce (Hernández-Avilés et al. 2023).

Bičík je nejdelsí částí spermie. Jeho hlavní funkcí je pohyb spermie. Poslední výzkumy odhalují, že bičík se nepohybuje pouze v jedné rovině, nýbrž že rotuje kolem své osy a tím posouvá spermii vpřed. Bičík je vysoce specializovaná buněčná struktura skládající se z více než tisícovky proteinů. Lze ho dále rozdělit na spojovací část připojenou přímo k hlavičce, střední, hlavní a koncovou část. Vnitřní uspořádání bičíku se nazývá axonema. Skládá se z centrálně uloženého páru mikrotubulů, kolem kterých je kruhovitě uspořádaných devět párů mikrotubulů. Pohyb je zajištěn pomocí mnoha metabolických drah. Mezi ty nejvýznamnější patří Ca^{2+} dráha a cAMP dependentní proteinkinázová dráha (Kumar & Singh, 2021).

3.1.2 Semenná plazma

Semenná plazma se skládá z výměšků přídatných pohlavních žláz – semenných váčků, předstojné žlázy, bulbouretrální žlázy a z nadvarlat. Jedná se o složitou tekutinu, která má mnoho funkcí. Každý živočišný druh má rozdíly v objemu a ve složení, které se může do jisté míry lišit i mezi jedinci stejného druhu. U ptáků přídatné pohlavní žlázy zcela chybí a ejakulát je vysoce koncentrovaný. Je nosičem pro spermie, vyživuje a chrání spermie v pohlavním traktu samice. Zajišťuje a upravuje vhodné pH pro přežití spermií. Semenná plazma je klíčová pro přežití spermií při přirozeném oplodnění *in vivo*. Při dlouhodobém uchování spermií na ně ale má negativní vliv. Při přípravě inseminačních dávek se běžně odstraňuje i více než 90 % objemu semenné plazmy. Je rozporuplný efekt přidání semenné plazmy po rozmrazení ke spermiím. Některé studie uvádějí, že přidání 50 % plazmy do dávky zvýšilo motilitu spermií i po 4 hodinách. Mnoho studií ale naopak uvádí, že přidání stejného množství přispělo k předčasné kapacitaci a po 4 hodinách se snížila životaschopnost (viabilita) (Recuero at al. 2019). Je však jisté, že po odstranění semenné plazmy dochází ke zpomalení spermií, je tedy nutné dodat alespoň některé proteiny a antioxidanty ze semenné plazmy (Yáñez-Ortiz at al. 2022).

Složení je plazma bohatá na cukry, oligosacharidy, glykany, lipidy, různé proteiny a mnoho dalších látek. Ne u všech látek známe přesnou funkci a jejich vliv v procesu fertilizace.

U mnoha živočišných druhů (z hospodářských zvířat např. hřebec a kanec) je ejakulát vypuzován ve frakcích, kdy každá frakce má jiné složení podle toho, která přídatná pohlavní žláza zrovna vylučuje. Toho lze využít při odběru do umělé vagíny, kdy se odebírají pouze určité frakce. První frakce je předspermiová a obsahuje výměšky předstojné žlázy. Slouží k pročištění močové trubice. Následuje frakce bohatá na spermie. I když se spermie nacházejí převážně v druhé frakci, zhruba 10-20 % z celkové počtu spermií je rozptýleno i do ostatních frakcí. Třetí frakce je chudá na spermie, a právě ta se často neodebírání, aby nedošlo k naředění druhé frakce. Poslední čtvrtá frakce obsahuje hlavně výměšky z bulbouretrální žlázy. Oddělování jednotlivých frakcí navíc zvyšuje mrazuvzdornost spermií, protože spermie z prvních a posledních dvou frakcí nemají tak dobré výsledky po kryokonzervaci (Recuero et al. 2019).

3.1.3 Odběr ejakulátu

Při odběru ejakulátu je důležité dodržovat veškerá hygienická opatření, aby nedošlo ke kontaminaci spermatu. Odběry se provádějí na odběrových stanicích do umělých vagín buď s pomocí fantoma nebo s pomocí říjné samice. Samci využívaní k umělé inseminaci by měli být důkladně vybráni a zapsáni v plemenné knize.

Dnes již existuje několik typů umělých vagín s rozdílnou váhou, velikostí nebo druhem materiálu, ze kterých je vyrobena. Obecně všechny materiály a látky, které se dostanou do styku s ejakulátem, nesmí mít spermicidní účinek. Umělá vagína je konstruována tak, aby pokud možno co nejvíce simulovala pohlavní trakt samice. Skládá se z několika částí – pevného obalu a dvou vnitřních vložek, na konci je zakončena sběrací nádobkou. Mezi pevný obal a první vložku se nalévá voda ohřátá na teplotu 44-48 °C. Chladnější voda by mohla samci způsobit teplotní šok, a naopak teplejší voda by působila spermicidně. Můžeme se setkat i s modely využívajícími vzduch. Vnitřní vložka je pro větší ochranu a sterilitu navíc často doplněna o jednorázovou vložku (Dascanio & McCue 2014). Pro větší pohodlí samce se na vnitřní vložku nanáší vazelína či komerčně dostupné lubrikační gely (Serafini et al. 2019).

Ne každý samec má ejakulát vhodný k mrazení. To je určeno semennou plazmou a samotnými spermii. Ejakulát je vylučován ve frakcích, kdy na spermie, jak již bylo uvedeno, je nejbohatší prostřední frakce. Ihned po odběru je nutné z ejakulátu odstranit nepotřebné frakce a ejakulát přecedit. Poté je ejakulát, pokud možno co nejrychleji, dopraven do laboratoře k dalšímu zpracování. Musí se hlídat, aby veškerý materiál, který přijde do styku s ejakulátem, byl vyhřát na 38 °C. Nejlepších parametrů je dosahováno při skocích s nejmenším sexuálním stimulem a během jednoho skoku (C. Aurich, 2008). U kohoutů zlepšuje kvalitu ejakulátu pravidelný odběr ideálně 2-3 x týdně (Janosikova et al. 2023).

Při neschopnosti samce přirozené ejakulace, ať už v důsledku zranění nebo vrozené vady, je možné získat ejakulát díky chemické stimulaci. Takto získaný ejakulát je koncentrovaný (Dascanio & McCue 2014). Další možností získání spermií je elektroejakulace. U té je ale častá kontaminace močí (Melo et al. 2010).

Po úspěšném odběru je nutné zkontrolovat a ověřit kvalitu ejakulátu. Ihned po odběru se provádí vizuální kontrola objemu, pachu, barvy a čistoty. Měření objemu se může provádět

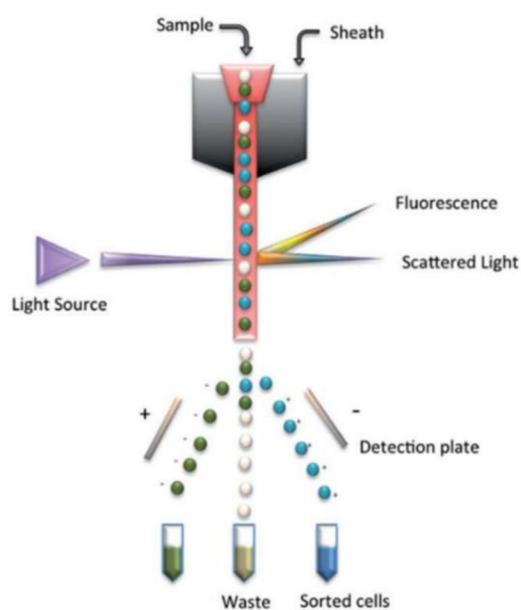
pomocí odměrného válce nebo na kalibrovaných vahách (Morel 2008). Následuje mikroskopické vyšetření v laboratoři pomocí různých přístrojů. Mezi důležité parametry ejakulátu patří počet vitelinních spermií, jejich koncentrace a motilita. V dnešní době již existují přístroje, které jsou schopny přesně změřit více parametrů najednou a celý proces přípravy inseminační dávky se tím zrychluje a ulehčuje. V ejakulátu je mnoho spermií, které se sice pohybují, ale mají například špatnou trajektorii nebo se pohybují pouze namíste. Pro oplození schopné spermie je důležitý pohyb vpřed, případně ve velkých kruzích, přímo za hlavičkou. Takovému pohybu se říká progresivní. Motilita klesá se stářím ejakulátu. Mění se i s teplotou, při které je ejakulát uchován nebo s měnícím se pH vzorku. Při zkoumání motility pod mikroskopem je výsledek značně ovlivněn lidským faktorem. Proto se dnes měří motilita nejčastěji na přístroji CASA (computer-assisted semen analysis) (Love 2016). Standartní CASA je nastavená na kulovitý tvar hlavičky savců. Ptáci mají rozdílný tvar, který je podlouhlý a v porovnání se savčími i tenký. Proto má měření ptačích spermií pomocí CASA určitá technická omezení (Janosikova et al. 2023). Jedna z možností, jak si ověřit kvalitu spermatu pro inseminační dávky, je měření motility po určitých časových intervalech (Love 2016). Dalším ukazatelem kvality je morfologie spermií. Poškození spermií se dělí na primární a sekundární. Primární poškození vzniká při spermatogenezi. Jedná se o zdvojení hlavičky či bičíku nebo změnu tvaru některé části spermie. Sekundární poškození je způsobeno nešetrným zacházením s ejakulátem po odebrání (Morel 2008).

U ptáků je odběr ejakulátu poněkud náročnější, protože nemají pyj jako savci, ale ejakulace je vylučována z kloaky. Nejúčinnější a dnes nejčastější je odběr pomocí abdominální masáže. Odběr spočívá v ruční stimulaci, která probíhá rychlou masáží jednou rukou na břišní straně hned pod pánevními kostmi (Burrows & Giunn 1937).

3.1.3.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je komplexní a složitá přístrojová metoda, která se hojně využívá v asistované reprodukci. Slouží ke změření a případnému rozdělení buněk podle navolených kritérií. Na počátku se v cytometru dalo pracovat pouze s buňkami, dnešní nejmodernější přístroje zvládají již takové částice, jakou jsou viry nebo chromozomy. Objevení průtokové cytometrie umožnilo zrychlení zpracování buněčných vzorků, protože jsou schopny zpracovat a změřit až 5000 částic za sekundu a vzorky o vysoké koncentraci. Jediná podmínka je, že měřené buňky musejí být menší než 30 μm , aby prošli tenkými kapilárami. Než se buňky začnou zpracovávat, je nutné je obarvit fluorescenčními barvami podle našich požadavků. V případě ejakulátu se nejčastěji hodnotí podíl živých a mrtvých spermií, neporušenost plazmatické membrány a mitochondriální aktivita. Poté jsou buňky osvětlovány lasery a snímány fotodetektory. Na základě světelných signálů, jsou rozděleny podle nastavených kritérií (Givan 2011).

Fotodetektory jsou vlastně soustava čoček, filtrů a různých zrcadel, které napomáhají předat signály o konkrétních vlnových délkách správným detektorům. Světelný paprsek dopadající na buňku se od ní odrazí do dvou směrů. Ve směru laseru se odráží přímý rozptyl – FSC (forward scatter). Ten udává velikost částice. Druhý boční odraz – SSC (side scatter) je kolmý k paprsku laseru a dává informace o struktuře buněčné membrány a o organelách uvnitř buňky. Pokud má průtokový cytometr i schopnost rozdělení buněk, jsou navíc jednotlivé buňky elektrostaticky nabitý a poté jsou vychýleny do jednotlivých sběracích nádobek. Základní schéma průtokové cytometrie s následným rozdělením buněk ukazuje obrázek 3 (Adan et al. 2017).



Obrázek 3: Základní schéma průtokové cytometrie (Adan et al. 2017).

Průtoková cytometrie spočívá v tom, že buňky jsou rozděleny do suspenze, kde nejsou spojené žádné dvě buňky k sobě. Ideální koncentrace měřeného roztoku je $5 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$. Nosné médium suspenze zároveň zabraňuje opětovnému shlukování. Do přístroje je vzorek vložen ve zkumavce, z jejíhož dna vede tenká kapilára. Z té jsou jednotlivé částice strhávány pláštovou tekutinou. To se děje na základě rozdílných tlaků kapalin. Celá směs je poté odváděna do průtokové komory. Nejběžněji používanou pláštovou tekutinou je pufovaný fyziologický roztok. Pro důkladné měření například DNA se používá pomalý tok, aby mohla být každá částice řádně osvětlena. Naopak pro kvantitativní měření vzorku o velkému počtu částic se používá rychlejší průtok. Pro správný výsledek je nutné nemít ve vzorku žádné vzduchové bublinky a zajistit, aby se vzorek pohyboval laminárním prouděním, ne turbulentním (Adan et al. 2017). Vzorky se osvětlují monochromatickým světelným paprskem, jinak řečeno laserem. Dnešní přístroje většinou obsahují dva až tři lasery. Nejběžněji to je argonový laser o vlnové délce 488 nm, fialový laser o vlnové délce 408 nm a UV laser o vlnové délce 350 nm.

Čím více laserů je použito, tím více se může použít fluorescentních značek a zkoumat více parametrů během jednoho měření (Givan 2011).

Výsledkem průtokové cytometrie je graf. Pokud měříme jeden parametr, má podobu histogramu. V případě měření více parametrů má podobu dot plot grafu (Adan et al. 2017).

Speciálním případem použití průtokové cytometrie je sexování spermií nebo embryí. Sexováním rozumíme rozdělení podle pohlaví. U savců určuje pohlaví plodu spermie s chromozomem X nebo Y, kdy samice je XX a samec XY. Pro obarvení DNA se používá barva propustná přes buněčnou membránu Hoechst 33342. Rozdělení probíhá na základě malého rozdílu v množství chromozomální DNA (Moore & Hasler 2017). Se sexováním spermií se začalo u skotu, kde je velká poptávka po kravách pro produkci mléka, a naopak býků pro masný průmysl (Aurich & Schneider 2014). Nevýhoda sexovaných spermií je jejich nízká kvalita a nutnost zvýšit koncentraci spermií v inseminačních dávkách. Přesnost se pohybuje okolo 90 % (Squires 2020).

3.1.4 Izolace epididymálních spermií

S moderními technikami je odběr spermatu možný i *post mortem*. Tvorba spermií je započata v semenotvorných kanálcích ve varleti, odkud putují nezralé spermie do nadvarlete, kde dále dozrávají a je tu i jejich rezervoár. Nadvarle se skládá ze tří částí – hlavy, těla a ocasu. Izolace se provádí z posledního úseku – ocasu. Chovatel k izolaci epididymálních spermií přistupuje nejčastěji po nečekaném úhynu, kastraci samce nebo vážném zranění, po kterém již dále nebude možné samce využívat jako plemeníka. Tomuto odběru spermií se též říká terminální odběr a je tím zajištěna poslední možnost využít genetický potenciál plemeníka jakožto chovného jedince. Spermie získané *post mortem* sice vykazují nižší motilitu než spermie získané po kastraci, ale po správném promytí a ošetření se jejich hodnoty výrazně zlepšují (Gloria et al. 2016). Po úmrtí samce zůstávají spermie životaschopné až do 48 hodin po úmrtí (Alvarenga et al. 2016).

Po izolaci nadvarlete je důležité podvázat chámovod, aby nedošlo ke ztrátě jeho obsahu. Následuje opláchnutí fyziologickým roztokem nebo laktátovým Ringerovým roztokem od krve či jiných nečistot. Varlata a nadvarlata se buď přímo zpracovávají na místě nebo se převážejí ve speciálně upravených chladících boxech bez přístupu vzduchu. Ke zpracování by mělo dojít, pokud možno co nejdříve po izolaci. Spermie se z ocasu nadvarlete získávají několika způsoby – aspirací, rozkrájením nebo retrográdním proplachem. Proplach se provádí proudem tekutiny z injekční stříkačky, která je připevněná na chámovod. Proud je veden přes ocas a vyplavené spermie jsou zachyceny v misce. Retrográdní proplach má oproti ostatním metodám výhodu, že získáme pouze čisté spermie bez znečištění ostatními buněčnými strukturami. Některé studie dokonce uvádějí, že při odběru epididymálních spermií je vyšší výtěžnost, než při odběru do umělé vagíny (Melo et al. 2010).

Přítomnost semenné plazmy je u spermií určených k tvorbě inseminačních dávek poměrně rozporuplná záležitost. Díky tomu, že epididymální spermie žádnou semennou plazmu nemají, nemusejí se před samotnou přípravou inseminačních dávek centrifugovat. Na

druhou stranu při pokusech, kdy byla k equinním epididymálními spermii semenná plazma uměle přidána, došlo až u 62 % vzorků ke zlepšení (Miró et al. 2020).

Kryokonzervace spermií by měla být provedena nejdéle 96 hodin po odběru při skladování do 4 °C. Při pokusech nebyl zaznamenán rozdíl v motilitě u zachlazených a následně zamrazených nebo rovnou mrazených spermií. V tabulce 3 je vidět, že epididymální spermie vykazují vyšší odolnost vůči mrazu než spermie odebrané do umělé vagíny (Melo et al. 2010).

Tabulka 3: Funkční parametry epididymálních, ejakulovaných spermií a spermií odebraných po kastraci po 24 hodinách při skladování při 5 °C – celková motilita (MOT – total motility), progresivní motilita (PM – progressive motility), membránová integrita (PMI – plasma membrane integrity) G1 – spermie odebrané do umělé vagíny, G2 – spermie získané ihned po kastraci, G3 – epididymální spermie skladované (Melo et al. 2010).

	MOT	PM	PMI
G1	60,2 ± 16,99	30,8 ± 14,22	41,2 ± 20,32
G2	85,1 ± 5,85	46,1 ± 8,46	74,9 ± 10,49
G3	83,1 ± 7,52	38,3 ± 7,14	71,7 ± 9,85

Při inseminaci klisen dávkami o koncentraci $2 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ nemrazenými epididymálními spermii se dosáhlo březosti u 45 % z nich. Po inseminaci rozmrazenými dávkami o stejné koncentraci klesla u klisen míra březosti více jak o polovinu. Po zdvojnásobení koncentrace míra březosti vzrostla až na 66, 6 % (Melo et al. 2010).

3.2 Inseminační dávka

V chovu hospodářských zvířat se ve světě stále častěji přistupuje k některé z mnoha možných forem umělé inseminace (AI – artificial insemination). Například v chovu koní byla v Německu v roce 1985 AI použita pouze u 2 % sportovních klisen. V dnešní době se používá u více jak 90 % klisen (Aurich 2012). Chovatelé mají možnost využít čerstvých, mrazených i kryokonzervovaných dávek. AI poskytuje chovatelům mnoho výhod. Díky možnosti dopravit již připravené dávky odpadají náklady na přepravu zvířat a s tím spojený stres pro zvířata. Přirozená plemenitba s sebou přináší i značné riziko poranění zvířat a přenosu pohlavních chorob. Vzhledem k možnosti kryokonzervace inseminačních dávek a jejich uchování po mnoho let může chovatel využít plemeníka, který již není živý nebo žije na druhé straně zeměkoule. Tím dochází k rozšíření jeho cenné genetické informace.

3.2.1 Příprava inseminační dávky

U spermatu vhodného k inseminaci je důležité se rozhodnout, jak dlouho chceme dávku skladovat. Dávky určené k okamžitému použití do 48 hodin po odběru stačí pouze přefiltrovat od nečistot a použít buď u jedné samice nebo naředit a použít u více samic. Opět platí pravidlo, že vše, co přijde do styku s ejakulátem, by mělo mít teplotu 38 °C (Aurich 2012). Při krátkém skladování a použití dávky maximálně do 72 hodin po odběru, stačí dávku pouze naředit a skladovat při teplotě 5 °C. I při přepravě je klíčové používat speciální nádoby, které jsou schopné udržet požadovanou teplotu (Aurich 2008). Díky objevení antibiotik je možné inseminační dávky skladovat po delší dobu a nedochází k mikrobiálnímu růstu patogenů (Aurich 2012). Obecně platí pravidlo, že čím déle chceme dávky skladovat, tím více je musíme upravit. Pro delší skladování je nutné odstranit 80-95 % semenné plazmy. Nejčastěji se tak děje pomocí centrifugace, která ale není moc šetrná ke spermii a dochází při ní ke ztrátě až 25 % spermií (Loomis 2011). U koní se centrifuguje 10 minut při síle 600 g (Alvarenga et al. 2016). Po centrifugaci je supernatant odstraněn a peleta se spermii znovu rozpuštěna. V některých laboratořích se snaží najít alternativy k centrifugaci a odstraňují semennou plazmu pomocí filtrace přes hydrofilní membrány, které zachytí spermie a plazma jimi proteče (Loomis 2011). Na membránu se nanese trocha ředidla, ke kterému se přidá ejakulát. Jeden filtr lze použít u stejného samce až desetkrát za sebou se stejnou účinností (Alvarenga et al. 2016). U koní se lze odebrat pouze frakci bohatou na spermie, ostatní frakce se neodebírají. U drůbeže není centrifugace nutná, protože ptáci přídatné pohlavní žlázy nemají vyvinuté a jejich ejakulát má malý objem a vysokou koncentraci spermií. Při ještě delším skladování je nutné dávky zamrazit pomocí tekutého dusíku. Aby nedošlo ke znehodnocení dávky vlivem zamrazení, přidávají se ke spermii kryoprotektanty. Zamrazení by mělo probíhat co nejpomaleji, udává se $0,3\text{ }^{\circ}\text{C / min}$, oproti tomu rozmrazení by mělo být co nejrychlejší (Aurich 2008). Některé studie udávají vložit brčka o objemu 0,5 ml do 46 °C po dobu 20 sekund, jiné doporučují rozmrazovat při teplotě 37 °C po dobu 60 sekund (Alvarenga et al. 2016).

U koní byly zaznamenány pokusy, kdy se vzala semenná plazma od hřebců, jejichž spermie měly dobré pohybové vlastnosti, a přidala se ke spermii hřebců se špatnými pohybovými vlastnostmi. Po rozmrazení vykazovaly tyto spermie jejich zlepšení. To by nasvědčovalo tomu, že účinnost semenné plazmy na spermie se liší podle konkrétního stavu spermii u daného jedince (Rigby et al. 2001). Stejně pokusy byly provedené i v chovu prasat, kde se došlo ke stejným výsledkům. To by odpovídalo tomu, že odstranění semenné plazmy je nutné pouze u samců se špatnými vlastnostmi ejakulátu, kdežto u jedinců s dobrou mrazitelností nemá žádný pozitivní vliv na pohybové vlastnosti spermii po kryokonzervaci. Stejně pokusy prováděné u býků nevedly k žádným změnám (Recuero et al. 2019). Některé studie hledají a selektují ze semenné plazmy pouze některé proteiny, které následně přidávají do inseminační dávky na ochranu před chladovým šokem. U jednotlivých druhů hospodářských zvířat se dělají inseminační dávky o různých koncentracích a objemech. Tyto rozdíly hodně souvisí s tím, do jakých míst pohlavních cest samice se inseminační dávka vkládá. S rostoucí vzdáleností od dělohy, roste i koncentrace spermii nutná k úspěšnému oplodnění. Proto inseminační dávky v chovu prasat mají mnohonásobně vyšší koncentraci, protože se dávka vkládá do děložního hrdla. Naopak koňské inseminační dávky mohou mít koncentraci nižší, protože se inseminace provádí přímo do dělohy. Jednotlivé parametry inseminačních dávek jsou uvedeny v tabulce číslo 4 (Wiebke et al. 2021).

Tabulka 4: Základní parametry inseminačních dávek u hospodářských zvířat (převzato a upraveno z Wiebke et al. 2021).

	Kanec	Býk	Hřelec	Kohout
Objem (ml)	50-90	0.23-0.5	10-20	0,25
Počet spermii/dávka	1,5-3,5*10 ⁹	2-10*10 ⁶	≥600*10 ⁶	25*10 ⁶
Místo inseminace	Děložní krček	Děloha	Děloha	Kloaka

3.2.2 Typy ředidel

Pomocí ředidel se nezvyšuje pouze objem, aby se mohlo z jednoho ejakulátu vytvořit více dávek, ale primárně mají prodloužit schopnost spermii oplození. Obsahují látky, které spermie vyživují, udržují stálé pH dávky, chrání spermie před nepříznivými vlivy chlazení, ale i je ochraňují před jejich vlastními metabolity. Obecně ředidla obsahují látky, jakou jsou lipidy, sacharidy, antibiotika a kryoprotektanty. Antibiotika umožňují delší skladování dávek. Je vždy vhodné volit takové kombinace, aby pokryli co největší škálu bakterií za použití co nejmenších koncentrací antibiotik. Koncentrace ale nesmí být zase moc nízká, protože by mohla vznikat u bakterií rezistence (Hernández-Avilés et al. 2019). U kanců se často používá gentamicin. Dnešní ředidla se nejčastěji vyrábějí na bázi kravského mléka nebo vaječného žloutku, ale

existují i alternativy ze sóji nebo kokosového mléka (Wiebke et al. 2021). Zároveň sušené mléko a vaječný žloutek mohou fungovat i jako kryoprotektanty (Saha et al. 2022).

Spermie jsou kvůli svému zredukovanému obsahu cytoplazmy extrémně citlivé na zvýšené množství volných kyslíkových radikálů (ROS) (Bahrami et al. 2020). Mezi ROS řadíme hydroxylový radikál OH^\cdot , super oxid O_2^\cdot a peroxid vodíku H_2O_2 . Jejich malá koncentrace je nutná pro další fungování spermií, ale nesmí překročit určitou mez (Yáñez-Ortiz et al. 2022). Volné radikály vznikají neustále jako konečný produkt mnoha buněčných dějů a značně poškozují chromozomy, mitochondrie a nukleové kyseliny. Přirozeně jsou vycytávány extracelulárními antioxidantními mechanismy v semenné plazmě, ta je ale z velké části během spermatogeneze před příchodem spermií do epididymis odstraněna. Zvýšené množství ROS má za následek poškození mitochondrií a narušení integrity DNA, což způsobuje smrt buňky (Yáñez-Ortiz et al. 2022). Při oplodnění *in vivo* se spermie vyskytují téměř výhradně v anaerobním prostředí a v ovidukální tekutině samice se vyskytuje taurin, který také napomáhá chránit spermie před vysokými koncentracemi ROS. Při manipulaci se spermii pro účely umělé inseminace se ale spermie dostávají do aerobního prostředí, což může vést ke zvýšení koncentrací ROS ve spermiích (Foote et al. 2002). Z toho důvodu je nutné do ředidel přidávat antioxidanty jako třeba katalázu, glutathionperoxidázu, glutamin nebo koenzym Q10 (Bahrami et al. 2020). Při použití ředidel na bázi kravského mléka může jako antioxidant fungovat i mléčná bílkovina kasein (Foote et al. 2002). Jako antioxidanty se můžou použít i výtažky z rostlin, například z rozmarýnu, moringy olejnodárné nebo z hřebíčkovce kořenného.

3.2.2.1 Ředidla na mléčné bázi

Ředidla na bázi kravského mléka mají dobré puфраční vlastnosti a pozitivně působí na motilitu spermií. Používají se pro pozorování spermií, centrifugaci a skladování. Ředidla se připravují z odstředěného odtučněného mléka nebo ze sušeného mléka. Výhoda těchto ředidel je to, že už sama o sobě obsahují kaseinové micely. Sice není známý princip, jak micely ochraňují spermie, ale v kombinaci s glycerolem a laktózou jsou výsledky po zamrazení dobré. Nicméně při použití pouze vyfiltrovaných kaseinových micel a laktózy jsou výsledky horší (Loomis 2011). Další látky pozitivně působící na spermie je fosfokasein a β -laktoglobulin (Pagl et al. 2006). Další látky, které je nutné do ředidel přidat, jsou puфраční roztoky, jako například 7,5% roztok hydrogenuhličitanu sodného (Jasko et al. 1993). Na trhu je mnoho komerčně prodávaných ředidel, které se mohou lišit sacharidy, antibiotiky nebo obsahem puфраčních roztoků. Ředidla se prodávají sušená, která je nutné naředit redestilovanou vodou, již naředěná nebo zamrazená (Loomis 2011). Na trhu se objevují i ředidla, která nejsou přímo na bázi kravského mléka, ale obsahují mléčné proteiny a cukry (Aurich et al. 2007).

Komerční ředidla na bázi kravského mléka:

INRA 82 (Batellier et al. 1998)

- Glukóza
- Laktóza
- Rafinóza
- Citrát sodný
- Citrát draselný
- HEPES
- Destilovaná voda

Kenneho ředidlo (NFDSMG) (Batellier et al. 1998)

- Sušené mléko
- Glukóza

3.2.2.2 Ředidla na bázi žloutku

Díky vysokému obsahu fosfolipidů a lipoproteinů, které napomáhají udržet integritu membrány při chlazení i kryokonzervaci, jsou často používána ředidla na bázi vaječného žloutku. Z lipoproteinů jsou ve žloutku zastoupeny převážně nízkodenzitní lipoproteiny LDL (low density lipoprotein), které se pravděpodobně váží na membránu rychleji než škodlivé plazmatické peptidy. Některé studie dokonce tvrdí, že by se LDL mohly zabudovávat přímo do membrány a tím nahradit poškozené membránové fosfolipidy (Bergeron & Manjunath 2006). Jiné studie tvrdí, že po navázání vytvoří LDL ochranný obal kolem plazmatické membrány spermie a tím ji stabilizují (Yánez-Ortiz et al. 2022). Býčí proteiny semenné plazmy s nimi skvěle reagují, ale reagují i s cholesterolem, což není při kryokonzervaci vhodné, protože odstranění cholesterolu z membrány je klíčové pro následnou kapacitaci. Negativní či pozitivní ovlivnění závisí na přesné koncentraci, časovém intervalu působení i na množství semenné plazmy ponechané v ejakulátu (Bergeron et Manjunath 2006). Oproti ředidlům z kravského mléka jsou náročnější na přípravu. Obecně obsahují redestilovanou vodu, sacharidy (glukózu a laktózu), vinan sodno-draselný, žloutek, kyselinu paraaminobenzoovou a různou kombinaci antibiotik (Pagl et al. 2006).

Komerční ředidla na bázi vaječného žloutku:

Tris (Verberckmoes et al. 2005)

- Chlorid sodný
- Dihydrát chloridu vápenatého
- Glukóza, fruktóza
- Vaječný žloutek
- Kyselina citronová
- Glycin
- Antibiotika
- Hexahydrát chloridu hořečnatého
- Hydrogen uhličitan sodný
- Trisma-79

CEP-2 (Verberckmoes et al. 2005)

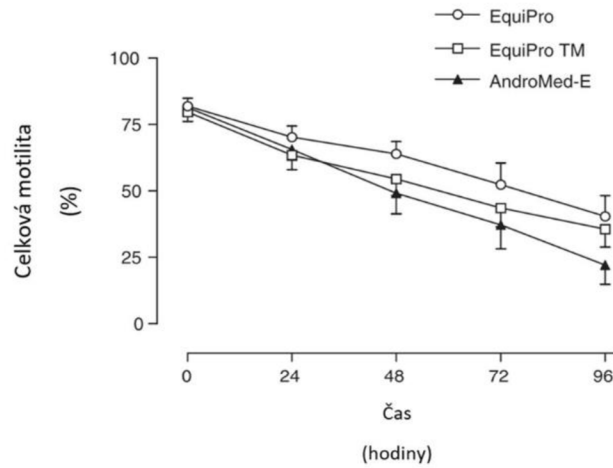
- Chlorid sodný
- Chlorid draselný
- Dihydrát chloridu vápenatého
- Hexahydrát chloridu hořečnatého
- Hydrogen uhličitán sodný
- Síran sodný
- Síran draselný
- Fruktóza
- Sorbitol
- BSA
- Trisma-79
- Vaječný žloutek
- Kyselina citronová
- Antibiotika

Snaha je vytvořit média o přesně definovaném složení, kde každá šarže ředidla bude přesně stejná. Bohužel u ředidel vyrobených z živočišných produktů jako je kravské mléko a vaječný žloutek toho nelze vždy dosáhnout. To může mít za následek negativní ovlivnění kvality inseminační dávky (Pagl et al. 2006). Proto dnes existují i ředidla vyrobená pouze z chemických sloučenin, která neobsahují látky živočišné produkce.

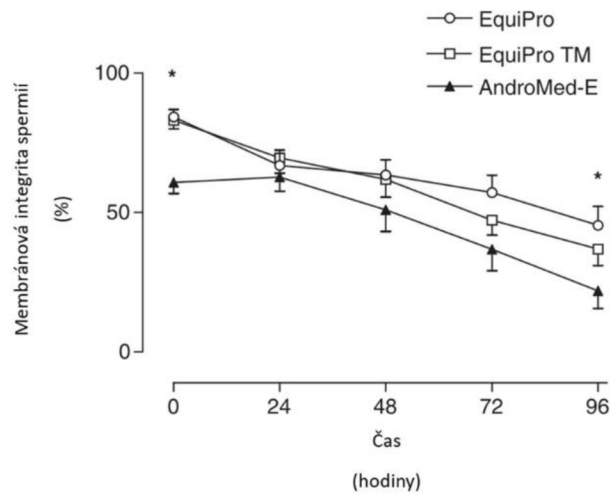
Modifikované Lake ředidlo (Mosca et al. 2016)

- D-fruktóza
- Octan draselný
- Glutaman sodný
- Polyvinyl pyrrolidon
- Octan hořečnatý
- Glycin

V roce 2007 publikoval tým vědců Aurich et al. (2007) studii, kde porovnával dvě ředidla na mléčné bázi (EquiPro, EquiPro TM) a jedno ředidlo na bázi žloutku (AndroMed-E). Ve studii měřil kvalitu hřebčího ejakulátu ihned po odebrání a poté vždy 24 hodin po dobu čtyř dnů. Kvalitu posuzoval na základě celkové motility a integrity plazmatické membrány. V den odběru byla celková motilita u všech vzorků téměř shodná. Při dalších dnech kontinuálně klesala. Po 24 hodinách byla nejnižší u EquiPro TM, po 48 hodinách byla motilita nejnižší u Andro-Med-E, viz graf 1. Integrita membrány byla při všech měřeních nejnižší u ředidla Andro-Med-E, viz graf 2. Zajímavé je, že i když by měla mít média EquiPro a EquiPro TM stejná složení, dosahovala jiných výsledků. Jedním z možných vysvětlení je to, že ředidlo EquiPro je prodáváno sušené a je nutné ho před použitím naředit redestilovanou vodou, která může být různé kvality. Na základě výsledků ze studie lze tvrdit, že pro dávky, které se použijí v den odběru, přicházejí v úvahu všechna tři ředidla. Při použití po 24 hodinách po odběru je vhodnější použít ředidlo EquiPro.



Graf 1: Celková motilita (%) spermii po přidání ředidel při skladování při 5 °C po 96 hodin (Aurich 2007).



Graf 2.: Integrita plazmatické membrány (%) po přidání ředidel při skladování při 5 °C po 96 hodinách (Aurich 2007).

3.3 Kryokonzervace

Při normální teplotě je možné gamety či embrya skladovat pouze několik hodin, maximálně dní. Pro delší skladování až v řádu několika desítek let, je nutné buněčné struktury zchladit na co nejnižší možnou teplotu, což je teplota tekutého dusíku $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Procesu zamrazení na takto nízkou teplotu se říká kryokonzervace. Vzhledem k tomu, že při takto nízkých teplotách se mění veškeré fyzikální vlastnosti buněk a ředidla, je nutné k běžným ředidlům dodat speciální látky tzv. kryoprotektanty. Ty ochrání buňky před nepříznivými vlivy vzniklými mrazením. Množství kryoprotektantů se mění v závislosti na velikosti a typu vzorku. Dělí se na prostupující a neprostupující membránou (Yánez-Ortiz et al. 2022).

Kryokonzervace se provádí podle mrazících protokolů, které jsou pro každý živočišný druh odlišné. Jejich standardizace a optimalizace je stále velkým tématem, protože existují velké rozdíly mezi druhy, ale i mezi jedinci stejného druhu. Přes veškeré snahy o optimalizaci stejně po rozmrazení dochází u skotu ke snížení životaschopnosti až o 50 %, u prasat o 60 % a nejhůře jsou na tom koně, kde jsou ztráty až 70 % spermií (Yánez-Ortiz et al. 2022).

U savců je možnost kryokonzervovat spermie, oocyty i embrya. Jiná situace je tomu u ptáků, kde je samičí gameta modifikována do velkého vejce a vývoj zárodku probíhá v něm. Kvůli těmto změnám je u ptáků možné mrazit pouze spermie (Janosikova et al. 2023). Navíc kvůli specifickým vlastnostem se zde stále nedosahuje tak dobrých výsledků a v dnešní době se kryokonzervace ptačích spermií spíše využívá pro zachování genetické informace ohrožených druhů v genových bankách (Partyka & Niżański, 2022).

3.3.1 Kryoprotektanty

Při poklesu teploty pod $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ dochází ve vodném prostředí ke vzniku ledových krystalů, které mají pro buňky destrukční účinky. Bez přidání látek, zabraňujícím vzniku těchto krystalů, by při zamrazení došlo k roztrhání většiny buněk a vzorek by tím byl zničen. Vznikající krystaly k sobě přitahují veškerou vodu z okolí. Tím v okolí vznikají místa s vysokou koncentrací látek. Buňky nacházející se v těchto oblastech se v důsledku osmotických tlaků sice zmenší, ale nejsou roztrhány. Kryoprotektanty fungují na principu zabraňujícím vzniku krystalů svojí nižší teplotou tání. Při nízkých teplotách dochází ke zpomalení až úplnému zastavení metabolických jevů v buňce (Loomis & Graham 2008).

Vznik krystalů není jediné riziko, které buňce při zamrazování hrozí. Při poklesu teplot dochází v membráně buněk k přesmyku fosfolipidů a proteinů a tím se z fluidní membrány stává gelová. K přesmykům nedochází jen při mrazení, ale i při opětovném zahřívání. Kryoprotektanty chrání buňky i před těmito jevy (Loomis & Graham 2008).

Kryoprotektanty se dělí na dvě skupiny podle toho, jestli prostupují nebo neprostupují buněčnou membránou. Nejčastěji používané prostupující jsou glycerol, ethylenglykol a propylenglykol (Loomis 2011). Prostupují díky své nízké molekulové hmotnosti (Saha et al. 2022). Tím, jak prostupují membránou pomalu nahrazují vodu, která je naopak z buňky vytahována. Riziko nastává při rozmrazování, když se naopak vymývají z buněk ven. K jejich

odstranění se používá fyziologický roztok, který do buněk proniká rychleji než kryoprotektanty z buňky ven (De Coster et al. 2020). U kryoprotektantů je klíčové hlídat správnou koncentraci a expoziční teplotu, která se u jednotlivých druhů hospodářských zvířat může výrazně lišit. Pro savčí spermie je toxický glycerol v koncentraci vyšší než 5-7 %, u koní je dokonce toxická hodnota vyšší než 3, 5 % (Yánez-Ortiz et al. 2022). Kohoutí spermie jsou na glycerol extrémně citlivé. Při jeho použití v koncentracích více jak 2 % způsobuje celkovou neplodnost. Jeho úplné vymytí ze spermií zase působí toxicky (Neville et al. 1971). Možnou náhradou za glycerol by mohly být amidy, např. methylformamid. Díky své nižší molekulové hmotnosti, než má glycerol, způsobují menší osmotické poškození. Nejlepších výsledků je dosahováno kombinací amidů a glycerolu (Yánez-Ortiz et al. 2022). Slibně se jeví práce u kohoutů používající nemrznoucí proteiny. Ty kineticky zabraňují tvorbě ledových krystalů a zabraňují tím vzniku tepelnému šoku. Nevýhodou těchto proteinů je jejich vysoká pořizovací cena (Janosikova et al. 2023). U hřebců se špatnou mrazitelností spermií vedlo použití amidů na místo glycerolu ke zlepšení motility a viability (Alvarenga et al. 2016). Neprostupující kryoprotektanty jsou často zastoupeny různými sacharidy, které zvyšují viskozitu roztoku. Běžně používaná je sacharóza, trehalóza nebo rafinóza (Consuegra et al. 2019). Jako neprostupující kryoprotektanty se můžou používat i LDL z vaječného žloutku v optimální koncentraci 9 %. Aby se zabránilo případné kontaminaci z vaječného žloutku, zkouší se LDL nahradit sójovým lecitinem, ale s ním se zatím nepodařilo docílit stálých výsledků. Kontaminaci lze zabránit dehydratací nebo pasterizací (Yánez-Ortiz et al. 2022). Jiná studie od Shahverdi et al. (2015) uvádí jako nejlepší přidání 4% LDL. Další látky živočišné produkce zlepšující parametry spermií po kryokonzervaci jsou fetální bovinní sérum a bovinní albuminové sérum (Janosikova et al. 2023). Blank et al. (2020) uvádí, že přidáním 5-10% séra zlepšuje parametry inseminačních dávek. V praxi se nejběžněji používají kombinace prostupujících a neprostupujících kryoprotektantů, čímž se snižuje jejich toxicita (De Coster et al. 2020).

Aby kryoprotektanty, obzvláště ty prostupující, fungovaly tak jak mají, musejí v dostatečném množství proniknout do buňky. Ptačí spermie mají svým tvarem hlavičky lepší predispozice, aby do nich mohlo kryoprotektantů proniknout více. Nicméně možnost zvětšení objemu buněk a tím i úroveň mrazitelnosti spermií úzce souvisí s obsahem cholesterolu v membráně. Zatímco u savců se často setkáváme s příliš vysokým zastoupením cholesterolu v membráně, u drůbeže je tomu přesně naopak. Membrána není elastická a při větších změnách osmotických tlaků dojde snadno k lýzi buněk (Janosikova et al. 2023).

3.3.2 Chlazení

Kančí spermie obsahují méně cholesterolu v plazmatické membráně, takže špatně snášejí nízké teploty. Standardně se uchovávají při teplotě mezi 15 a 18 °C. Takto uchovaná inseminační dávka je pro účely umělého oplodnění použitelná maximálně 10 dní po odběru. I kvůli trendu nadužívání antibiotik je i v rámci AI snaha o používání co nejmenších dávek antibiotik, a tak se dnešní výzkum zaměřuje na možnost uchovávání kančích inseminačních

dávek při nižších teplotách okolo 5 °C (Wiebke et al. 2021). Ve studii Paschoal et al. (2020) bylo porovnáváno pět chladících protokolů, kdy nejlépe vyšly ty protokoly, kde byly dávky ochlazeny pomalu až na teplotu 5 °C. Konkrétně nejlépe vyšel vzorek, kde byly dávky chlazeny 0.01 °C / min na teplotu 25 °C, poté 0.03 °C / min na teplotu 10 °C a poté opět rychlostí 0.01 °C / min až na konečnou teplotu 5 °C. Během chlazení se setrvalo 2–6 hodin na teplotě 22 °C, konkrétně v nejlepší vzorku se setrvalo 6 hodin. Toto pozastavení ochlazování přispívá k navyknutí spermií na chlad a tím k zabránění vzniku teplotního šoku. Pozorování a měření motility spermií probíhalo následujících 144 hodin od odběru.

Oproti tomu býčí spermie snášejí nízké teploty skvěle. V roce 1998 bylo po celém světě vyrobeno přes 260 milionů inseminačních dávek a z toho bylo celých 95 % kryokonzervováno.

U koní se chlazené sperma běžně skladuje při teplotě okolo 5 °C. Jakmile klesne teplota pod 19 °C, jsou spermie citlivé na chladový šok a je nutné ochlazování zpomalit až na 0.05 °C / min. Při této teplotě si dávka uchová přijatelné parametry do 48 hodin po odebrání (Wiebke et al. 2021).

3.3.3 Mrazení

Ve chvíli, kdy chceme uskladnit inseminační dávky po delší dobu než jen pár dní, je nutné je zamrazit, aby se zastavily veškeré metabolické děje uvnitř spermie. Mrazení je velice složitý proces, kdy se musí správně vyladit rychlost snižování teploty. Při zamrazování se ve spermiích děje mnoho změn, které jsou pro použitelnost spermie poměrně náročné. Teplota mezi +5 a -15 °C je kritická z důvodu fázových změn v lipidových membránách, kdy dochází ke změně fluidity membrány – polotekutá membrána se stává tuhou gelovou membránou. Snižování teploty musí být tak pomalé, aby voda stihla bez poškození opustit buňky, ale zároveň tak rychlá, aby nedošlo k jejich dehydrataci. Postupné ochlazování až zmrazování většinou probíhají v parách tekutého dusíku. Samotné uchování zamrazených dávek probíhá v tekutém dusíku při teplotě -196 °C (Saha et al. 2022). Další možností ochlazování a zamrazení je použití automatických přístrojů, které vše ohlídnají samy. Bylo zjištěno několik parametrů, které dávají alespoň základní informaci o tom, jak dobře je ejakulát mrazitelný. U prasat a koní je to protein AKAP4 a HSP90AA1. Dále jsou důležité aquaporiny nebo třeba proteiny upravující množství kanálů v mitochondriích pro transport iontů (Yáñez-Ortiz et al. 2022).

Standardně je sperma po odebrání vyšetřeno a naředěno základním ředidlem v poměru zhruba 1:1 (v případě koncentrovaného ejakulátu 2:1), poté je změřena koncentrace spermií. Následuje centrifugace k odstranění semenné plazmy. Peleta se spermiemi je naředěna ředidly s kryoprotektivy na požadovanou koncentraci spermií. Vzniklé inseminační dávky jsou naplněny do plastových brček o požadovaném objemu a zamrazeny (Alvarenga et al. 2016). Některé mrazící protokoly nechávají dávky několik hodin (4 hodiny) již naředěné ekvilibrovat při teplotě 4 °C a až poté je chladí a mrazí 10 minut 4 cm nad hladinou tekutého dusíku. Poté jsou do něj přímo vloženy. Při měření viability a stupně poškození spermií po jednotlivých krocích se zjistilo, že k největšímu poškození dochází při samotném zamrazení. Plazmatická membrána vykazovala velké procento poškození již při ekvilibraci

s ředidlem, což je vysvětlováno velkými změnami osmotických tlaků v buňce (Khalil et al. 2018). Vhodné rychlosti chlazení a mrazení se liší u jednotlivých druhů, ale i na základě použitého ředidla. Jiný mrazicí protokol tak u výroby equinních inseminačních dávek ochlazuje na 5 °C rychlostí 3-5 °C/min, poté rychlostí 20-50 °C/min až na konečnou teplotu -196 °C. Výrobci u ředidla INRA 96 doporučují chlazení 2 hodiny na 5 °C, u ButoCrio doporučují vyčkat při 5 °C alespoň 20 minut. (Alvarenga et al. 2016). Kontrola viability a motility spermií by se měla ideálně provádět hned po odebrání ejakulátu, po naplnění brček a po rozmrazení. Při kryokonzervaci epididymálních spermií je nutné je nechat alespoň 10 minut inkubovat s ředidlem, aby se zvýšila jejich motilita (Alvarenga et al. 2016).

U mrazení ptačích spermií se zatím dosahuje pouze špatných výsledků a není tedy zatím běžně prováděno v chovech. Špatná mrazitelnost je pravděpodobně způsobena odlišným složením plazmatické membrány, kde je mnohem větší zastoupení polynenasycených mastných kyselin, které se při nízkých teplotách chovají odlišně a vyžadují mnohem větší zastoupení antioxidantů v ředidle než savčí spermie. Běžně používaná ředidla mohou pro ptačí spermie působit až toxicky. Dalším důvodem větší náchylnosti k chladovému šoku je také menší zastoupení proteinů vůči fosfolipidům, než je tomu u savců. V začátcích kryokonzervace kohoutích spermií se používaly protokoly s pomalým mrazením až 1-10 °C/min. Dnes se více používají protokoly s rychlejším mrazením 20-100 °C/min, ale existují i protokoly, kde se teplota snižuje až o 1 000 °C/min. Při tomto ultra rychlém mrazení je nutné použít vysoké koncentrace kryoprotektiv, které už mohou být pro spermie toxické (Janosikova et al. 2023).

3.3.4 Vitřifikace

Speciálním případem kryokonzervace je vitřifikace. Jedná se o proces, při kterém jsou buňky zmrazeny tak, aby se nevytvořily ledové krystaly. Tomuto stavu říkáme nekystalické nebo amorfní tuhnutí. Lze toho dosáhnout dvěma způsoby. První způsob je použití vysokých koncentrací kryoprotektiv, až okolo 80 %. Takto vysoké dávky jsou ale pro spermie toxické. Druhý způsob je rychlé zamrazení, pomocí tekutého dusíku. Při této metodě je možné použít méně kryoprotektantů a vzorek s buňkami přechází rovnou do nekystalického stavu (De Coster et al. 2020). Gamety zamrazené pomocí vitřifikace dosahují po rozmrazení lepších výsledků. U spermií se většinou přidávají neprostupující kryoprotektanty. Spermie jsou nejprve ochlazeny v parách dusíku na 5 °C během jedné hodiny a následně jsou vloženy přímo do tekutého dusíku (Consuegra et al. 2019). Oocyty a embrya nejsou tak citlivé na změny osmotických tlaků a snesou vyšší koncentraci kryoprotektiv, takže se u nich více používají prostupující kryoprotektanty (Hidalgo et al. 2018).

4 Metodika

4.1 Zvířata zařazená do experimentu

Odběr materiálu do experimentu byl získáván od čtyř kohoutů plemene česká zlatá kropenatá. Průměrný věk zvířat byl 68 týdnů. Kohouti byli chováni odděleně v klecovém chovu v Demonstrační a pokusné stáji u České zemědělské univerzity v Praze v kontrolovaných podmínkách, při teplotě 20 °C a vlhkosti vzduchu 50-60 %. Během celého trvání pokusu měli přístup k čerstvé vodě *ad libitum* a krmeni byli speciální komplexní krmnou směsí vyrobenou na míru pro chovy ČZU firmou Sehnoutek a synové s.r.o též *ad libitum*.

Plemeno Česká zlatá kropenatá bylo vybráno z toho důvodu, že se jedná o původní české plemeno, které je zařazeno do genových zdrojů České republiky. Na našem území se chová již po několik století.

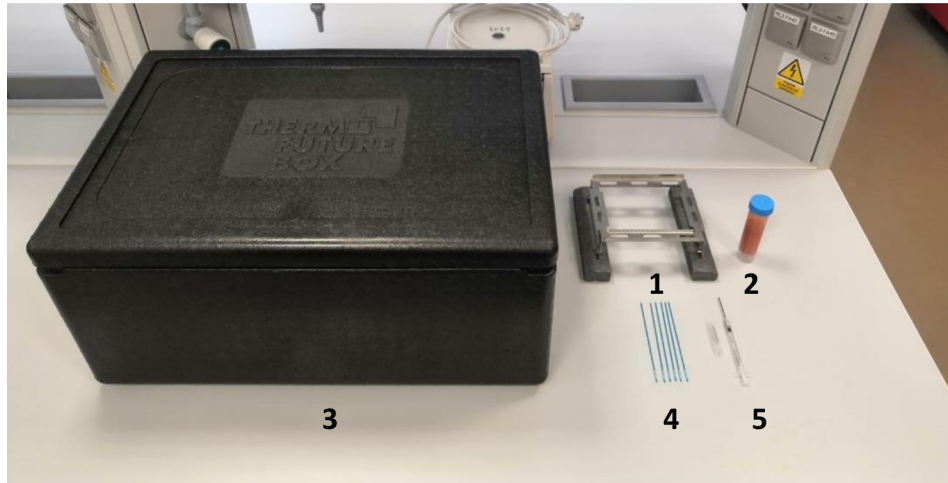
4.2 Odběr materiálu

Odběry ejakulátu probíhaly v období v průběhu ledna až února 2022 jednou až dvakrát týdně vždy v 8 hodin ráno pomocí dorzo-abdominální masáže, ejakulát byl zachycen do mikrozkrumavek. Odběr prováděl vždy stejný člověk za stejných podmínek v prostředí stáje. Odebraný ejakulát byl uchováván při teplotě 5 °C do dalšího zpracování.

4.3 Zpracování materiálu

Po odebrání ejakulátu, byl vzorek přepraven do laboratoří Katedry chovu hospodářských zvířat FAPPZ k dalšímu zpracování. Do experimentu byly vybírány pouze vzorky bez výrazného znečištění. Nejdříve byla u všech nenaředěných vzorků změřena koncentrace spermií pomocí mobilní CASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan), viz obrázek 4. Před každým měřením na mCASA byly vzorky naředěny na doporučenou koncentraci od výrobce $30 \cdot 10^6$ spermií. Vybrané ejakuláty od všech čtyř kohoutů byly smíchány do jednoho směsného vzorku, u kterého se změřil celkový objem. Během veškeré manipulace bylo vše, co přišlo do styku se spermiemi, vychlazeno na 5 °C.

v pravidelných rozestupech. Rack byl umístěn nad hladinu tekutého dusíku po dobu 10 minut. Zchlazené pejety byly vhozeny přímo do tekutého dusíku. Chlazení a mrazení probíhalo v polystyrenových mrazících boxech (obrázek 5). Zmrazené inseminační dávky byly až do dalšího zpracování skladovány v tekutém dusíku v kryotanku CD cryo diffusion.



Obrázek 5: Vybavení potřebné k mrazení inseminačních dávek (1 – plovoucí rack, 2 – těsnicí prášek, 3 – polystyrenový mrazící box, 4 – pejety, 5 – plnička na pejety) (archiv autora).

4.4.1 Experiment 1

V prvním experimentu se hodnotil vliv výšky chlazení na výslednou kvalitu inseminačních dávek. Plovoucí rack byl nastaven na tři různé výšky – 3,5 cm, 5,0 cm a 7,5 cm.

4.4.2 Experiment 2

Při druhém experimentu probíhalo chlazení 5 cm nad hladinou tekutého dusíku a rozmrazení při 5 °C.

4.5 Hodnocení inseminačních dávek po rozmrazení

Rozmrazení probíhalo ve vodní lázni o teplotě 5 °C po dobu 100 sekund v experimentu 1. Ve druhém experimentu se inseminační dávky rozmrazovaly ve vodní lázni o 5 °C po dobu 100 sekund nebo při teplotě 40 °C po dobu 30 sekund. Z rozmrazené dávky bylo opět odebráno 10 µl, které byly hodnoceny pomocí mobilní CASA, kde se zjišťovala motilita a progresivní motilita spermií. Vzorky vhodné k použití jako inseminační dávky byly dále hodnoceny pomocí průtokového cytometru (Novocyt 3000, Acea Biosciences), obrázek 6. Cytometr disponuje lasery emitující fialové (405 nm), modré (488 nm) a červené (640 nm) záření.

V průtokovém cytometru byly vzorky hodnoceny na 96 jamkových destičkách (mikrotitrační destička P) (Gama group a.s.). Každý vzorek byl měřen v tripletech. Veškeré přípravy a ekvilibrace vzorků probíhala na vyhřívané desce o teplotě 38,5 °C 15 minut bez přístupu světla. Vzorek spermií byl naředěn na koncentraci $30 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

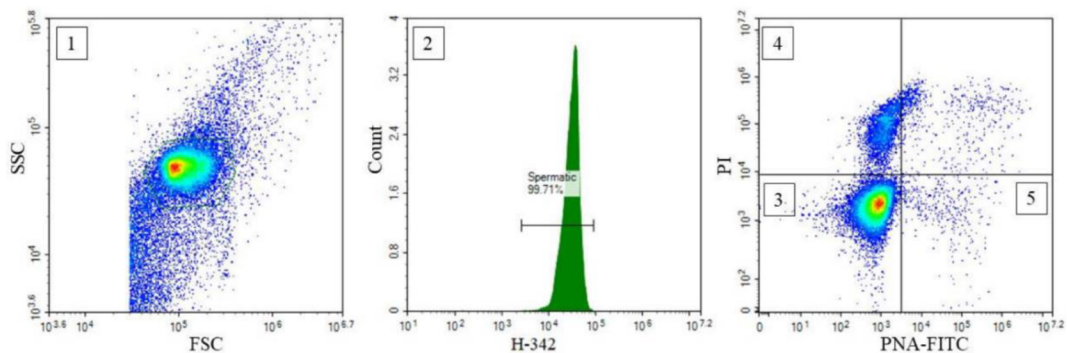
V jedné jamce bylo:

- 100 μl fosfátového pufru (PBS)
- 10 μl master mixu
 - 2 μl Hoechst 33342
 - 2 μl PI
 - 2 μl PNA-FITC
 - 4 μl MTR DR
- 10 μml vzorku spermií

Vzniklé vzorky byly měřeny průtokovým cytometrem a vyhodnoceny softwarem NovoExpress 1.3.0. Pomocí fluorescenční barvy Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) byla hodnocena integrita DNA. Propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich) slouží k hodnocení celistvosti plazmatické membrány, PNA-FITC (ThermoFischer Scientific) barví akrozom a MTR DR (MitoTracker Deep Red) (Sigma Aldrich) dává informace o membránovém potenciálu mitochondrií. Příklad výsledku z průtokového cytometru ukazuje obrázek 7.



Obrázek 6: Průtokový cytometr - Novocyt 3000, Acea Biosciences (archiv autora).



Obrázek 7: „Gating strategy“ – výsledek z průtokového cytometru: 1 – bodový graf znázorňující sílu signálu FSC oproti SSC poskytuje informaci o populaci buněk. 2 – spermatické buňky identifikovány pomocí barvy Hoechst-33342. 3 – spermatické buňky s intaktní plazmatickou membránou i akrozomem. 4 - spermie s poškozenou membránou 5 – spermie s poškozeným akrozomem (Petricakova et al. 2022).

5 Výsledky

5.1 Experiment 1

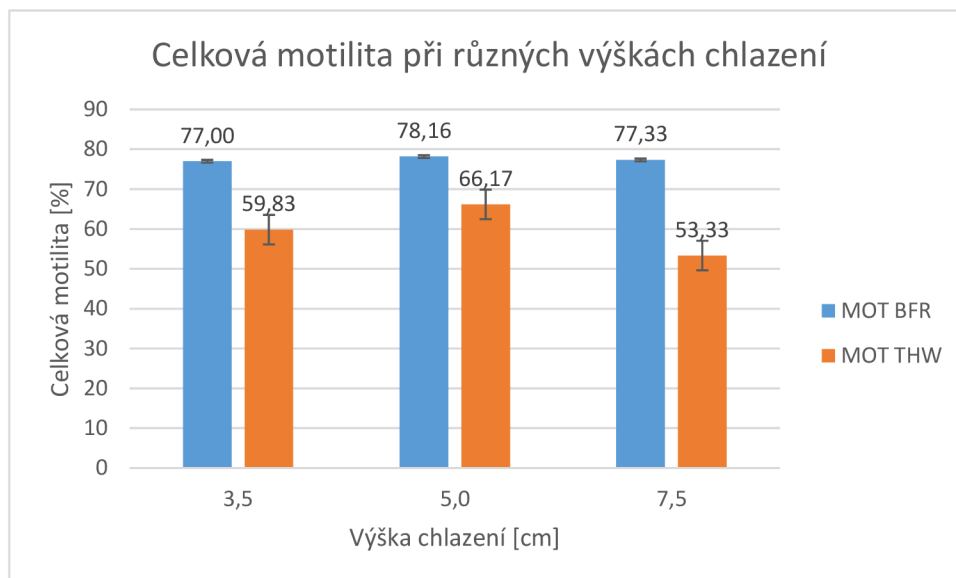
5.1.1 Základní statistické parametry - mCASA

Vliv výšky chlazení nad hladinou tekutého dusíku na celkovou motilitu spermií byl měřen během tří odběrových dnů vždy před mrazením a půl hodiny po rozmrazení inseminační dávky. Každý odběrový den se v dané výšce chladily dva vzorky, dohromady šest vzorků pro každou výšku. Procentuální celková motilita před mrazením a po rozmrazení pro každou inseminační dávku je zanesena v tabulce 5.

Tabulka 5: Průměrná celková motilita před mrazením (MOT BFR) a po rozmrazení (MOT THW) při chlazení na třech různých výškách, číslo n je počet vzorků v měření, σ značí směrodatnou odchylku.

Odběrový den	n	Výška [cm]	MOT BFR [%] $\pm \sigma$	MOT THW [%] $\pm \sigma$
1	2	3,5	70,0 \pm 7,0	59,5 \pm 8,5
1	2	5,0	81,5 \pm 7,5	69,0 \pm 4,0
1	2	7,5	79,0 \pm 1,0	56,5 \pm 2,5
2	2	3,5	81,5 \pm 11,5	64,5 \pm 3,5
2	2	5,0	81,5 \pm 1,5	62,5 \pm 2,5
2	2	7,5	74,0 \pm 1,0	51,0 \pm 1,0
3	2	3,5	79,5 \pm 3,5	55,5 \pm 3,5
3	2	5,0	71,5 \pm 8,5	67,0 \pm 7,0
3	2	7,5	79,0 \pm 1,0	52,5 \pm 2,5

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi výškou chlazení 3,5 cm a 5,0 cm ($p < 0,05$), kdy celková motilita u výšky 3,5 cm klesla ze 77 % \pm 5,02 na 59,83 % \pm 3,68, u výšky 5,0 cm byl pokles o něco nižší a to ze 78,16 % \pm 4,71 na 66,17 % \pm 2,72. Největší pokles byl u výšky chlazení 7,5 cm, kdy celková motilita klesla ze 77,33 % \pm 2,36 na 53,33 % \pm 2,32, viz graf 3.



Graf 3: Celková motilita před mrazením (MOT BFR) a po rozmrazení (MOT THW) při třech různých výškách chlazení nad hladinou tekutého dusíku.

5.1.2 Základní statistické parametry – průtokový cytometr

Životaschopnost spermií byla hodnocena měřeními na průtokovém cytometru. Životaschopnost spermií (PMI) se hodnotila na základě poškození plazmatické membrány (PMD), celistvosti akrozomu (ACRD) a dvojího poškození čili poškození plazmatické membrány i poškození akrozomu (PAD).

Nejnižší pokles životaschopnosti spermií s neporušenou plazmatickou membránou byl při výšce chlazení 5,0 cm a to z $84,51 \% \pm 0,06$ na $66,29 \% \pm 0,06$. Nejvyšší pokles byl při výšce 7,5 cm z původních $85,60 \% \pm 0,07$ na $46,67 \% \pm 0,10$.

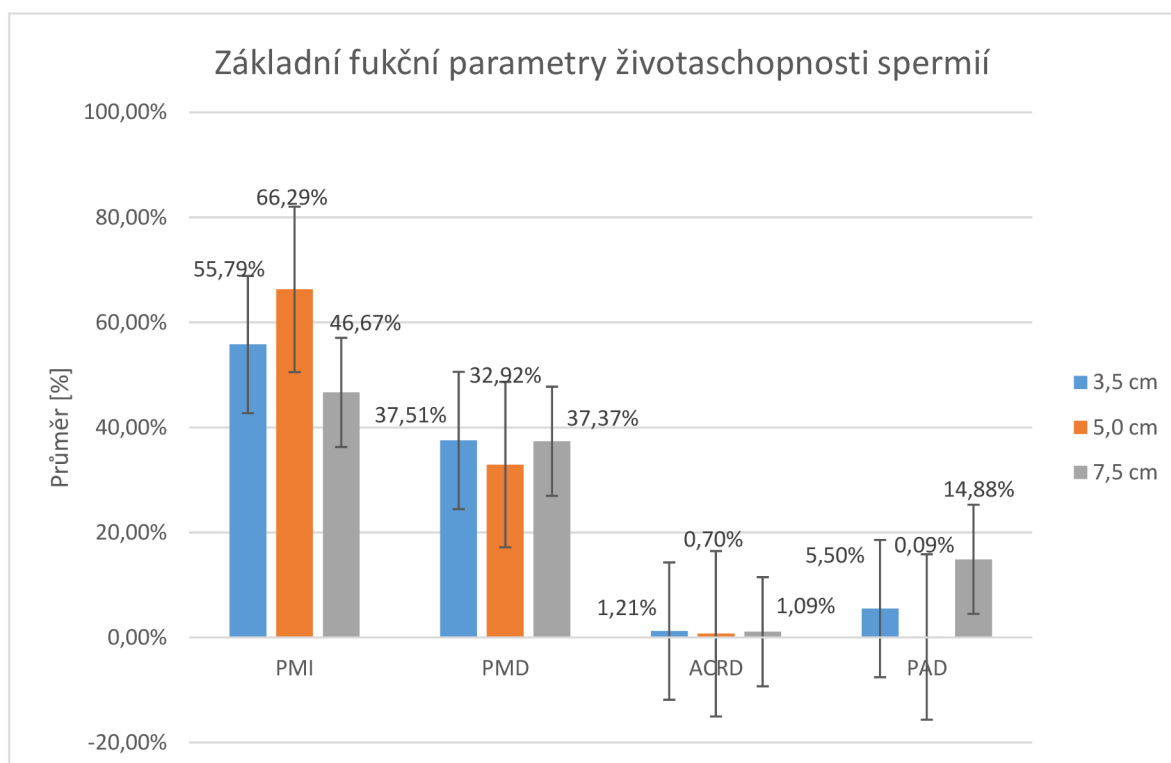
K poškození plazmatické membrány docházelo na všech výškách chlazení, ale nejmenší bylo pozorováno u výšky chlazení 5,0 cm. Z původních $12,94 \% \pm 0,05$ vzrostlo na $32,92 \% \pm 0,06$. Nejvyšší poškození bylo u výšky chlazení 3,5 cm, kde z $11,48 \% \pm 0,05$ se zvýšilo na $37,51 \% \pm 0,06$.

Poškození akrozomu bylo nejmenší při výšce 5,0 cm, z $1,66 \% \pm 0,01$ kleslo na $0,70 \% \pm 0,00$. Naopak nejvyšší poškození bylo při výšce chlazení 3,5 cm. Z původních $1,47 \% \pm 0,01$ kleslo na $1,21 \% \pm 0,01$.

Dvojí poškození spermií bylo nejmenší při výšce chlazení 5,0 cm – z $0,90 \% \pm 0,01$ kleslo na $0,09 \% \pm 0,00$. Naopak výrazné zhoršení bylo při výšce 7,5 cm, kde z $1,00 \% \pm 0,01$ vzrostlo na $14,48 \% \pm 0,10$.

Z grafu 4 je vidět, že výška chlazení nejvíce ovlivňuje dvojí poškození spermií a životaschopnost spermií jako takovou. Naopak nejméně bylo ovlivněné poškození akrozomu.

Z našeho měření můžeme usoudit, že vliv na poškození plazmatické membrány, akrozomální poškození a dvojí poškození spermií nemá den odběru, ale výška chlazení nad hladinou tekutého dusíku.



Graf 4: Základní funkční parametry spermií pro různé výšky chlazení po rozmrazení (3,5 cm, 5,0 cm, 7,5 cm) – životaschopné spermie (PMI), spermie s poškozenou plazmatickou membránou (PMD), spermie s akrozomálním poškozením (ACRD), spermie s dvojím poškozením (PAD).

5.2 Experiment 2

5.2.1 Statistická analýza dat

Veškerá statistická vyhodnocení byla získána pomocí statistického programu SAS (SAS/STAT, 2013). Následná analýza variance byla provedena za použití generalized linear model procedury. Jako závislé proměnné byly vyhodnocovány jednotlivé parametry průtokové cytometrie PMI, PMD, ACRD, PAD.

Statistické modely pro vyhodnocení parametrů průtokové cytometrie po ekvilibraci hodnocené v definovaném časovém intervalu jsou uvedeny níže:

- 1) $VIAeqijkl = \mu + DENi + EXj + TEMPk + EX * TEMPjk + eijkl$
- 2) $PMeqijkl = \mu + DENi + EXj + TEMPk + EX * TEMPjk + eijkl$
- 3) $ACReqijkl = \mu + DENi + EXj + TEMPk + EX * TEMPijk + eijkl$
- 4) $PMACReqijkl = \mu + DENi + EXj + TEMPk + EX * TEMPijk + eijkl$

kde $VIAeqijk$ = celková viabilita buněk po ekvilibraci, $PMeqijk$ = podíl spermií s poškozenou plazmatickou membránou po ekvilibraci, $ACReqijk$ = podíl spermií s poškozeným akrozomem po ekvilibraci, $PMACReqijk$ = podíl spermií s dvojnásobným poškozením - poškozený akrozom i plazmatická membrána; $DENi$ = fixní efekt i-tého odběrového dne ($i = 1$. odběrový den, $n=5$; $i = 2$. odběrový den, $n= 17$; $i = 3$. odběrový den, $n = 12$; $i = 4$. odběrový den, $n = 18$; $i = 5$. odběrový den, $n = 18$); EXj = fixní efekt přídatku j-tého ředidla ($j =$ přídatek ředidla Poultry media® + 9% NMA, $n = 15$; $j =$ přídatek ředidla Raptac® + 9% NMA, $n = 15$; $j =$ přídatek ředidla NeXcell® + 9% NMA, $n = 15$); $TEMPk$ = fixní efekt k-té teploty ekvilibrace po rozmrazení ($k=$ varianta ekvilibrace při teplotě 5°C, $n = 58$; $k=$ varianta ekvilibrace při teplotě 40°C, $n= 68$). $EX * TEMPijk$ = interakce variant přídatku ředidel a teploty ekvilibrace po rozmrazení; $eijkl$ = residuální chyba.

Statistické rozdíly mezi odhadnutými průměry byly detekovány na hladině významnosti $P < 0,05$.

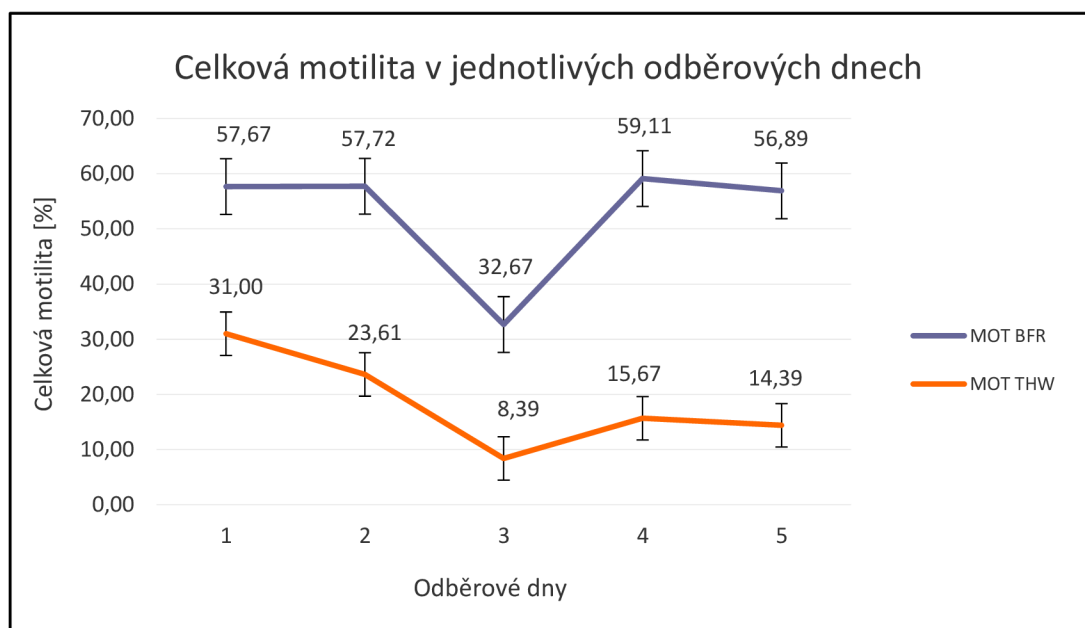
5.2.2 Základní statistické parametry - mCASA

Před každým zamrazením již s přidanými ředidly a půl hodiny po rozmrazení se měřily základní parametry pro celkovou motilitu. Hodnoceny byly vzorky odebrané v pěti dnech. Hodnocení probíhalo na mCASA. Naměřené údaje jsou v tabulce 6. Celková motilita se měřila na 81 vzorcích, kdy celková motilita před mrazením dosahovala průměrně 52,27 %. Půl hodiny po rozmrazení výrazně klesla na průměrných 16,98 %. To značí, že během mrazení došlo k výraznému poškození spermií, které vedlo ke snížení celkové motility.

Tabulka 6: Průměrné hodnoty motility před mrazením (MOT BFR) a půl hodiny po rozmrazení (MOT THW), číslo n udává počet vzorků, σ je směrodatná odchylka.

	n	Motilita [%] $\pm \sigma$	Min [%]	Max [%]
MOT BFR	81	52,27 \pm 17,23	17,00	84,00
MOT THW	81	16,98 \pm 18,40	0,00	68,00

Celkovou motilitu v jednotlivých odběrových dnech před a po mrazení ukazuje graf 5. Nejlepší motilita před mrazením byla druhý odběrový den 57,72 %. Naopak nejhorší byla třetí den 32,67 %. Po rozmrazení byla celková motilita nejlepší první den 31,00 % a nejhorší třetí den 8,39 %.



Graf 5: Celková motilita před mrazením (MOT BFR) a celková motilita po rozmrazení (MOT THW)

Předchozí údaje jsou spojené z měření inseminančních dávek naředěnými různými ředidly. Při měření celkové motility u jednotlivých ředidel vyšly podobné výsledky u ředidel Poultry media® a Raptac®. Při použití Poultry media® klesla celková motilita z 50,33 % \pm 15,50 na 23,96 % \pm 18,80. U Raptacu® klesla z 53,15 % \pm 15,36 na 23,52 % \pm 20,13. Výrazně nejhůře vyšlo ředidlo NeXcell®, kde po rozmrazení dosahovala průměrná celková motilita nízkých

hodnot pouze 4,22 % ± 1,91 z původních 53,33 % ± 19,58. Změřené údaje jsou zaneseny v tabulce 7. Každé ředidlo bylo použito u 27 dávek.

Tabulka 7: Účinek vybraného ředidla na celkovou motilitu po rozmrazení – celková motilita před mrazením (MOT BFR), celková motilita po rozmrazení (MOT THW), n udává počet vzorků, σ udává směrodatnou odchylku, indexy a, b ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ($P < 0,05$).

Ředidlo	n	MOT BFR [%] ± σ	MOT THW [%] ± σ
Poultry media®	27	50,33 ± 15,50	23,96 ± 18,80 ^a
Raptac®	27	53,15 ± 15,36	23,52 ± 20,13 ^a
NeXcell®	27	53,33 ± 19,58	4,22 ± 1,91 ^b

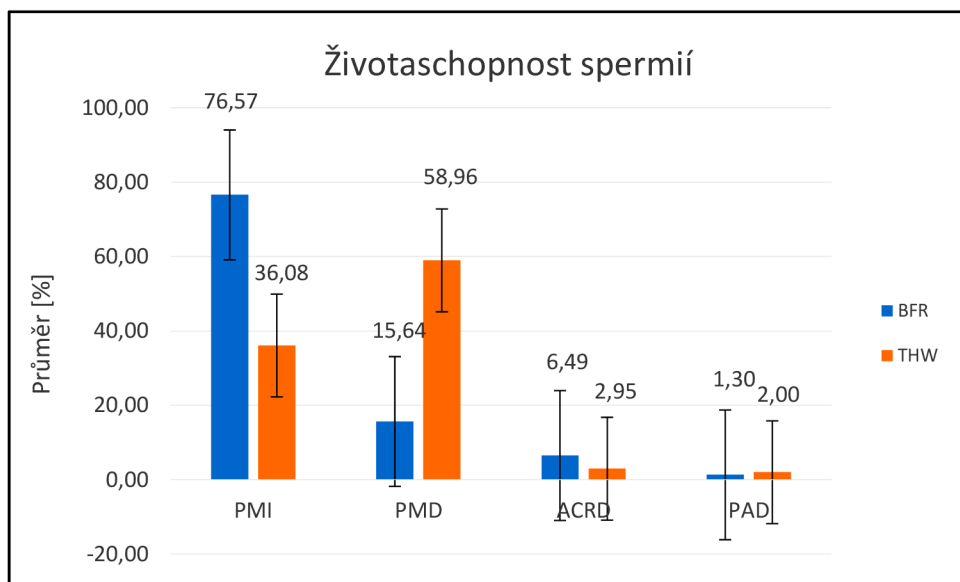
5.2.3 Základní statistické parametry hodnocené průtokovým cytometrem

Po ekvilibraci byly hodnoceny 3 vzorky s dvěma opakováními, kde procento životaschopných spermií (PMI) bylo 76,57 % ± 9,15. Před mrazením mělo 15,64 % ± 6,69 spermií poškozenou plazmatickou membránu (PMD). 6,49 % ± 7,13 spermií mělo před zmrazením poškozený akrozom (ACRD) a 1,30 % ± 1,43 spermií trpělo poškozením plazmatické membrány i akrozomu (PAD). Po mrazení se hodnotilo 81 vzorků (80 u dvojího poškození), kde 36,08 % ± 21,70 spermií byla životaschopných. 58,96 % ± 21,84 spermií trpělo po rozmrazení na poškozenou membránu a 2,95 % ± 4,03 spermií mělo poškozený akrozom. Na dvojí poškození – porušení plazmatické membrány a akrozomu bylo postiženo 2 % ± 2,81 spermií. Změřené hodnoty jsou zaneseny v tabulce 8.

Tabulka 8: Funkční parametry spermií před a po rozmrazení – procentuální zastoupení životaschopných spermií před mrazením (PMI BFR), spermie s poškozenou plazmatickou membránou před mrazením (PMD BFR), s poškozeným akrozomem před mrazením (ACRD BFR), spermie s dvojím poškozením – plazmatické membrány a akrozomu před mrazením (PAD BFR), životaschopné spermie po rozmrazení (PMI BTHW), spermie s poškozenou plazmatickou membránou po rozmrazení (PMD THW), s poškozeným akrozomem po rozmrazení (ACRD THW), spermie s dvojím poškozením – plazmatické membrány a akrozomu po rozmrazení (PAD THW), n udává počet vzorků, σ je směrodatná odchylka.

	n	Průměr [%] ± σ	Min [%]	Max [%]
PMI BFR	9	76,57 ± 9,15	64,37	93,73
PMD BFR	9	15,64 ± 6,69	4,77	28,02
ACRD BFR	9	6,49 ± 7,13	0,08	24,96
PAD BFR	9	1,30 ± 1,43	0,17	5,55
PMI THW	81	36,08 ± 21,70	3,04	58,65
PMD THW	81	58,96 ± 21,84	27,50	94,96
ACRD THW	81	2,95 ± 4,03	0,12	13,56
PAD THW	80	2 ± 2,81	0,25	12,03

Z grafu 6 je patrné, že po zamrazení došlo k výraznému poklesu počtu životaschopných spermií. Výrazně stoupl procento spermií, které mělo poškozenou plazmatickou membránu. Poškození akrozomu se u rozmrazených spermií snížilo a u dvojího poškození spermií nedošlo k výrazným změnám.



Graf 6: Průměrné naměřené hodnoty měřených parametrů na průtokovém cytometru: spermie bez poškozené plazmatické membrány (PMI), spermie s poškozenou plazmatickou membránou (PMD), spermie s poškozeným akrozomem (ACRD), spermie s dvojím poškozením – s poškozenou plazmatickou membránou i akrozomem (PAD).

5.2.3.1 Procento životaschopných spermií po rozmrazení

5.2.3.1.1 Popis modelu

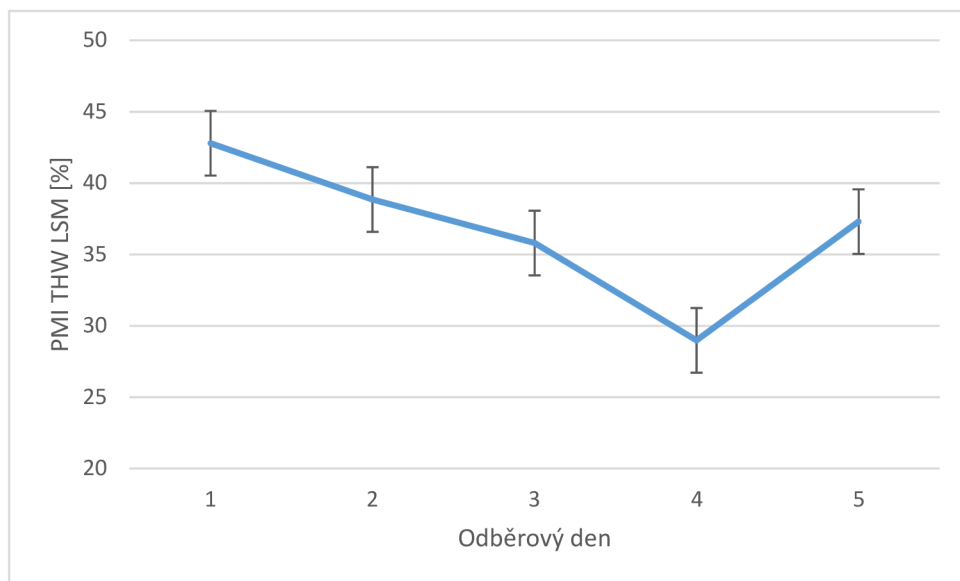
Proměnlivost ukazatele byla prokázána z 97, 45% ($P < 0,0001$). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv sledovaných faktorů: vliv odběrového dne ($P < 0,0001$) a vliv přídávku zvoleného ředidla ($P < 0,0001$). Statisticky průkazný vliv nebyl prokázán u sledovaných parametrů: teplota ekvibrace po rozmrazení, účinek přídávku zvoleného ředidla a teploty ekvibraci při rozmrazení. Dále jsou uvedeny fixní vlivy odběrového dne a použité metody mrazení.

5.2.3.1.2 Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií po rozmrazení

Během experimentu jsme si všimli, že je statisticky výrazný rozdíl v životaschopnosti spermií 30 minut po rozmrazení mezi jednotlivými odběrovými dny, viz graf 7. Nejvyšší životaschopnost byla první den, kdy po byla rozmrazení $42,9 \% \pm 1,3$. Výsledky nebyly statisticky výrazně lepší než 2. den. Naopak statisticky nejhorší byl čtvrtý odběrový den, kdy po rozmrazení dosahovala pouze $28,98 \% \pm 0,86$. Přehled viability po rozmrazení v jednotlivých dnech uvádí tabulka 9.

Tabulka 9: Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií po rozmrazení (PMI THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).

Odběrový den	PMI THW LSM [%] $\pm \sigma$	P < 0,05
1	$42,90 \pm 1,30$	1: 3, 4, 5
2	$38,85 \pm 0,86$	2: 4
3	$35,80 \pm 0,86$	3: 1, 4
4	$28,98 \pm 0,86$	4: 1, 2, 3, 5
5	$37,30 \pm 0,86$	5: 1, 4



Graf 7: Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií po rozrazení (PMI THW), použita metoda nejmenších čtverců (LSM).

5.2.3.1.3 Vliv použitého ředidla na životaschopnost spermií po rozmrazení

Životaschopnost spermií po rozmrazení byla výrazně ovlivněna použitým ředidlem, viz tabulka 10. Nejlepší výsledky byly získány za použití ředidla Raptac[®], kde po rozmrazení byla 52,04 % ± 0,72. Výsledky nebyly statisticky prokazatelně lepší než při použití ředidla Poultry media[®] – 51,11 % ± 0,72. Statisticky výrazný rozdíl byl při použití ředidla NeXcell[®], kde životaschopnost spermií po rozmrazení byla pouze 7,07 % ± 0,72.

Tabulka 10: Účinek vybraného ředidla na viabilitu po rozmrazení (PMI THW), použita metoda nejmenších čtverců (LSM), σ značí směrodatnou odchylku, různé indexy ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ($P < 0,05$)).

Ředidlo	PMI THW LSM [%] ± σ
Poultry media [®]	51,11 ± 0,72 ^a
Raptac [®]	52,04 ± 0,72 ^a
NeXcell [®]	7,07 ± 0,72 ^b

5.2.3.1.4 Vliv teploty ekvilibrace při rozmrazování

Vliv rozdílné teploty (5 °C a 40 °C) při ekvilibraci po rozmrazení shrnuje tabulka 11. Během rozmrazení docházelo při obou teplotách k poškození plazmatické membrány. Při obou teplotách docházelo ke statisticky nevýrazným rozdílům u poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu a dvojímu poškození – poškození plazmatické membrány a akrozomu.

Tabulka 11: Vliv teploty ekvilibraci po rozmrazení na viabilitu spermií (PMI THW), poškození plazmatické membrány (PMD THW), poškození akrozomu (ACRD THW) a dvojího poškození spermií (PAD THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ), shodné indexy a značí, že nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Teplota rozmrazení	PMI THW LSM [%] $\pm \sigma$	PMD THW LSM [%] $\pm \sigma$	ACRD THW LSM [%] $\pm \sigma$	PAD THW LSM THW [%] $\pm \sigma$
5 °C	36,87 \pm 0,55 ^a	57,62 \pm 0,62 ^a	2,85 \pm 0,14 ^a	2,65 \pm 0,13 ^a
40 °C	36,61 \pm 0,67 ^a	57,48 \pm 0,76 ^a	3,04 \pm 0,17 ^a	2,87 \pm 0,16 ^a

5.2.3.2 Zastoupení spermií s poškozenou plazmatickou membránou, poškozeným akrozomem a dvojím poškozením

5.2.3.2.1 Popis modelu

Proměnlivost ukazatele poškození plazmatické membrány byl průkazný z 96,75 % ($P < 0,001$) V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv sledovaných faktorů: vliv odběrového dne ($P < 0,001$) a vliv zvoleného ředidla ($P < 0,001$). Teplota ekvilibrace při rozmrazení a interakce variant přidaného ředidla neměly statisticky významný vliv. Dále v textu jsou uvedeny fixní vlivy odběrového dne a použité metody mrazení.

Proměnlivost ukazatele poškození akrozomu byl průkazný z 95,4 % ($P < 0,001$). V modelové rovnici byl statisticky významný vliv odběrového dne ($P < 0,001$).

Proměnlivost ukazatele dvojího poškození – poškození plazmatické membrány a akrozomu byl průkazný z 91,7 %. Vliv odběrového dne byl v rovnici statisticky průkazný ($P < 0,001$).

5.2.3.2.2 Vliv odběrového dne na poškození plazmatické membrány

Na poškození plazmatické membrány mělo vliv, z jakého odběrového dne dávka byla, viz tabulka 12. Nejvyšší poškození bylo 3. odběrový den, kdy dosahovala 63,33 % \pm 0,98. Výsledek se statisticky nelišil od 5. dne. Nejmenší poškození bylo první odběrový den, kdy bylo pouze 44,98 % \pm 1,47. Tento den se statisticky významně lišil od všech zbylých odběrových dnů.

Tabulka 12: Vliv odběrového dne na poškození plazmatické membrány po rozmrazení (PMD THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).

Odběrový den	PMD THW LSM [%] $\pm \sigma$	P <0,05
1 (n = 9)	44,98 \pm 1,47	1: 2-5
2 (n = 17)	58,80 \pm 0,98	2: 1, 2, 5
3 (n = 12)	63,33 \pm 0,98	3: 1, 2, 4
4 (n = 18)	59,23 \pm 0,98	4: 1, 3
5 (n = 18)	61,42 \pm 0,98	5: 1

5.2.3.2.3 Vliv odběrového dne na akrozomální poškození

Nejvyšší akrozomální poškození bylo 4. odběrový den, kdy bylo 10,19 % \pm 0,21. Výsledek se statisticky výrazně lišil od všech ostatních odběrových dnů. Naopak nejmenšího poškození se dosáhlo 3. odběrový den a to 0,24 % \pm 0,21. To se statisticky výrazně nelišilo od 2. a 5. dne. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Vliv odběrového dne na akrozomové poškození po rozmrazení (ACRD THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).

Odběrový den	ACRD THW LSM [%] $\pm \sigma$	P <0,05
1 (n = 9)	2,73 \pm 0,32	1: 2-5
2 (n = 17)	1,00 \pm 0,21	2: 1, 4
3 (n = 12)	0,24 \pm 0,21	3: 1, 4
4 (n = 18)	10,19 \pm 0,21	4: 1-3, 5
5 (n = 18)	0,56 \pm 0,21	5: 1, 4

5.2.3.2.4 Vliv odběrového dne na dvojí poškození – plazmatické membrány i akrozomu

Dvojí poškození spermie bylo nejvyšší 1. odběrový den 9,52 % \pm 0,30, což se statisticky výrazně lišilo od všech zbylých odběrových dnů. Nejmenší poškození plazmatické membrány a zároveň akrozomu bylo 3. odběrový den 0,62 % \pm 0,20. Tento výsledek se statisticky výrazně nelišil od 2. a 5. odběrového dne. Údaje jsou zaneseny v tabulce 14.

Tabulka 14: Vliv odběrového dne na dvojí poškození spermií po rozmrazení (PAD THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ).

Odběrový den	PAD THW LSM [%] $\pm \sigma$	P <0,05
1 (n = 9)	9,52 \pm 0,30	1: 2-5
2 (n = 17)	1,33 \pm 1,21	2: 1
3 (n = 12)	0,62 \pm 0,20	3: 1, 4
4 (n = 18)	1,61 \pm 0,20	4: 1, 3, 5
5 (n = 18)	0,73 \pm 0,20	5: 1, 4

5.2.3.2.5 Vliv zvoleného ředidla na poškození plazmatické membrány

Plazmatická membrána byla po rozmrazení nejvíce poškozena při použití ředidla NeXcell® z 87,03 % \pm 0,82. To bylo ze statistického hlediska výrazně odlišné od zbylých dvou ředidel. Naopak nejmenšího poškození se dosáhlo za použití Raptacu® 42,57 % \pm 0,82. Tento výsledek nebyl statisticky odlišný od použití ředidla Poultry media®, viz tabulka 15.

Tabulka 15: Vliv zvoleného ředidla na poškození plazmatické membrány po rozmrazení (PMD THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ), různé indexy ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly (P <0,05)).

Ředidlo	PMD THW LSM [%] $\pm \sigma$
Poultry media®	43,06 \pm 0,82 ^a
Raptac®	42,57 \pm 0,82 ^a
NeXcell®	87,03 \pm 0,82 ^b

5.2.3.2.6 Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu

Akrozomální poškození po rozmrazení bylo nejvyšší při použití ředidla Poultry media® 3,36 % \pm 0,18. Nejmenšího poškození se dosáhlo s ředidlem Nexcell® 2,59 % \pm 0,18. Oba tyto výsledky se statisticky nelišily od výsledků s použitým ředidlem Raptac®. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 16.

Tabulka 16: Vliv zvoleného ředidla na akrozomální poškození po rozmrazení (ACRD THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ), shodné indexy a značí, že nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Ředidlo	ACRD THW LSM [%] $\pm \sigma$
Poultry media [®]	3,36 \pm 0,18 ^a
Raptac [®]	2,87 \pm 0,18 ^a
NeXcell [®]	2,59 \pm 0,18 ^a

5.2.3.2.7 Vliv zvoleného ředidla na dvojí poškození

Poškození plazmatické membrány a zároveň akrozomální poškození je zaneseno v tabulce 17. Nejvyšší bylo u dávek s ředidlem NeXcell[®] 3,28 % \pm 0,17. To se statisticky lišilo od dávek s jinými použitými ředidly. Nejmenší dvojí poškození bylo u ředidla Raptac[®] 1,53 % \pm 0,17. Tyto hodnoty se statisticky nelišily od hodnot poškození s použitím ředidla Poultry media[®].

Tabulka 17: Vliv zvoleného ředidla na dvojí poškození - plazmatické membrány i akrozomu po rozmrazení (PAD THW), metoda nejmenších čtverců (LSM), směrodatná odchylka (σ), shodné indexy a značí, že nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$).

Ředidlo	PAD THW LSM [%] $\pm \sigma$
Poultry media [®]	2,47 \pm 0,17 ^a
Raptac [®]	1,53 \pm 0,17 ^a
NeXcell [®]	3,28 \pm 0,17 ^a

6 Diskuze

Kryokonzervace inseminačních dávek je důležitým nástojem k uchování cenné genetické informace ohrožených zvířat a její následné šíření po celém světě i napříč generacemi. Standardně je využívána v chovech zvířat. Tam, kde již existují úspěšné mrazící protokoly, se pro připouštění používají výhradně inseminační dávky. Bohužel tomu stále tak není u všech druhů hospodářských zvířat, zejména u ptáků.

Kohoutí spermie jsou od savčích spermií morfologicky natolik odlišné, že běžné mrazící protokoly u nich nefungují. Inseminace mraženými inseminačními dávkami dosahuje nízké míry úspěšnosti. Navíc, při použití glycerolu jakožto nejběžnějšího kryoprotektiva, je téměř nulová.

Kryokonzervace je závislá na zvoleném ředidle a kryoprotektantivech. U hospodářských zvířat se používají ředidla Inra 96, Tris nebo univerzální Kenneho ředidlo. U drůbeže jsou komerčně dostupnými a používanými ředidly Poultry media[®], Raptac[®] a NeXcell[®]. Jejich výhodou je snadná manipulace a nízká pořizovací cena. Vzhledem k tomu, že to jsou komerční ředidla, mají vždy přesně stejné složení a všechny šarže si odpovídají.

Cílem této studie bylo najít optimální výšku chlazení nad hladinou tekutého dusíku a porovnat jednotlivá ředidla. V prvním experimentu se předpokládalo, že optimální bude mrazení 5,0 cm nad hladinou, což bylo potvrzeno. Spermie po rozmrazení dosahovaly ve všech parametrech nejlepších hodnot. Výška chlazení 3,5 cm oproti 7,5 cm dosahovala větší míry životaschopnosti spermií a menšího dvojího poškození spermií. V poškození plazmatické membrány téměř nebyl rozdíl s výškou chlazení 7,5 cm. Oproti tomu výška chlazení 7,5 cm vykazovala menší hodnoty akrozomálního poškození. Ze všech sledovaných parametrů byl nejvyšší rozdíl ve dvojím poškození spermií. Naopak nejmenší rozdíly byly v poškození akrozomu.

U ředidla NeXcell[®] výrobce uvedl, že je obohaceno o antioxidanty, proto byl v experimentu 2 předpoklad, že z vybraných tří ředidel bude nejlepší. Tato hypotéza se nepotvrdila. Spermie naředěné ředidlem Nexcel[®] měly po rozmrazení životaschopnost pouze 7,07 % ± 0,72. Oproti tomu vzorky s ředidlem Raptac[®] měly životaschopnost 52,04 % ± 0,72. Výsledek byl statisticky shodný s ředidlem Poultry media[®]. Poškození plazmatické membrány bylo statisticky nejvyšší právě s použitím ředidla NeXcell[®], naopak akrozomální poškození bylo nejmenší. Při porovnání ředidel Poultry media[®] a Raptac[®] nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly ve sledovaných parametrech. Ředidlo Poultry media[®] též obsahuje antioxidanty, a navíc i látky podporující integritu plazmatické membrány, což má nejspíše vliv na dobré parametry spermií po rozmrazení.

V druhém experimentu se sledoval vliv teploty, ve které se inseminační dávky rozmrazovaly, na funkční parametry spermií. Byla zvolena teplota 5 °C a 40 °C. Teplota 40 °C měla simulovat teplotu, které jsou spermie vystaveny v pohlavních cestách samice. Teplota 5 °C byla zvolena jako testovací. Oběma teplotám byly inseminační dávky vystaveny 100 sekund po vyndání z tekutého dusíku. Předpokladem bylo, že lepší funkční parametry budou mít spermie, které se budou rozmrazovat při teplotě 5 °C, což se nepotvrdilo. Po rozmrazení nevykazovaly vzorky žádné statisticky významné rozdíly.

Při tvorbě inseminačních dávek je důležité zvolit správný poměr ředění, aby se z jednoho ejakulátu vyrobilo co nejvíce dávek, u kterých je stále zachována schopnost oplození. Ta je dána dostatečným množstvím životaschopných spermií v inseminační dávce. U hospodářských zvířat, jejichž ejakulát obsahuje větší procento semenné plazmy, jsou spermie přirozeně v mnohem nižších koncentracích, než je tomu u ptáků. Kvůli absenci přídatných pohlavních žláz, mají ptáci koncentrovaný ejakulát s malým procentuálním zastoupením semenné plazmy. Zatím neexistují žádné průkazné studie o ideální koncentraci spermií v inseminační dávce, a proto se koncentrace v různých studiích liší. Studie Mosca et al. (2016) využívala inseminačních dávek o malé koncentraci $100 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ spermií. Naopak ve studii Shahverdi et al. (2015) používali v experimentech inseminační dávky o koncentraci $400 \cdot 10^6$. Jsou i studie, kde byla použita střední koncentrace $300 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (Abouelezz et al. 2017). Pro náš experiment bylo zvoleno ředění na koncentraci $100 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

Při kryokonzervaci jsou kryoprotektivní látky nezbytné pro přežitelnost spermií, avšak neméně důležitá je i jejich koncentrace. Při malých koncentracích pomáhají spermiím přežít nízké teploty, ale při vyšších koncentracích mohou být toxické. Spermie každého živočišného druhu mají rozdílnou toleranci ke koncentracím kryoprotektiv. Mezi nejběžněji používaná prostupující kryoprotektiva patří glycerol (GLY), dimethylacetamid (DMA), dimethylformamid (DMF) a N-methylacetamid (NMA). Recentní studie uvádějí, že koncentrace kryoprotektiv by měla být v rozmezí od 6 % do 9 % (Partyka & Niżański 2022). U našeho experimentu jsme vycházeli ze studií Sasaki et al. (2010) a Mosca et al. (2020). V experimentu Sasaki et al. (2016) použili koncentraci 9% NMA a inseminační dávky chladili na výšce 4,0-4,5 cm po dobu 30 minut nad hladinou dusíku. Ve studii Mosca et al. (2020) porovnávali koncentraci NMA 6 % a 9 % a teplotu vodní lázně při rozmrzání 5 °C a 38 °C. Inseminační dávky chladili na výšce 3,0 cm po dobu 10 minut. V provedeném experimentu byla zvolena koncentrace NMA 9 %.

Naposlední problém v kryokonzervaci je výška chlazení nad hladinou tekutého dusíku a tím i rychlost, kterou jsou dávky zmrazeny. Většina studií volí během mrazení jednu výšku po různě dlouhou dobu, jsou ale i studie, například Blank et al. (2020), kde dávky nejprve chladí při výšce 11,0 cm po 12 minut a poté výšku sníží na 3,0 cm po dobu 5 minut. Madeddu et al. (2016) provedli studii, kde porovnávali různé výšky chlazení – v prvním experimentu porovnávali výšku 1,0 cm, 3,0 cm a 5,0 cm. V druhém experimentu porovnávali výšku 3,0 cm, 7,0 cm a 10,0 cm. V první skupině nebyly žádné statistické rozdíly a ve druhé skupině byla nejlepší výška chlazení 3,0 cm nad hladinou tekutého dusíku. Brčka byla vždy po 10 minutách ponořena přímo do tekutého dusíku. Tyto výsledky se v našem experimentu nepotvrdily. V našem experimentu 1 bylo nejlepších funkčních parametrů dosaženo při chlazení na výšce 5,0 cm po dobu 10 minut.

V procesu kryokonzervace gamet je velmi důležitá i rychlost a teplota, při které se gamety rozmrazí. Ve studiích Miranda et al. (2018) a Mosca et al. (2020) porovnávali dvě teploty rozmrazování: 5 °C po dobu 120 sekund (100 sekund) a 37 °C (38 °C) po dobu 30 sekund. V obou studiích měly spermie lepší funkční parametry při rozmrzání ve vodní lázni o teplotě 5 °C. To se v našem experimentu nepotvrdilo. Při použití vodní lázně o teplotě 5 °C

a 40 °C nevykazovaly inseminační dávky žádné statisticky významné rozdíly v měřených parametrech.

Hlavní hypotézou této práce bylo ověřit tvrzení, že různá rychlost poklesu teploty v průběhu kryokonzervace má významný vliv na kvalitativní charakteristiky semene hospodářských zvířat a tím i na kvalitu inseminační dávek. Tuto hypotézu se nepovedlo vyvrátit ani potvrdit, protože konečné výsledky inseminačních dávek jsou výrazně ovlivněny použitými ředidly, odběrovými dny a individualitou jedince. Nejlepších sledovaných parametrů spermií bylo dosaženo při chlazení 5,0 cm nad hladinou tekutého dusíku. Celková motilita spermií byla po rozmrazení $66,17 \% \pm 2,72$.

7 Závěr

Kryokonzervace gamet je náročný proces, který představuje možnost, jak zefektivnit chov hospodářských zvířat. U savců se již daří optimalizovat a standardizovat mrazící protokoly. Bohužel u ptáků se stále nedaří najít optimální mrazící protokoly. To je převážně způsobeno rozdílným tvarem hlavičky jejich spermií a pozměněným složením plazmatické membrány. V dostupných studiích je velká rozmanitost v použitých postupech mrazení, použitých ředidel i přídavku kryoprotektantů.

Cílem diplomové práce byla optimalizace chladících a mrazících křivek pro výrobu inseminačních dávek u hospodářských zvířat.

V experimentech jsme na mCASA měřili celkovou motilitu po rozmrazení a na průtokovém cytometru životaschopnost spermií, poškození plazmatické membrány, akrozomální poškození a dvojí poškození spermií – poškození plazmatické membrány i akrozomu.

V prvním experimentu jsme zjišťovali vliv výšky chlazení nad hladinou tekutého dusíku (3,5 cm, 5,0 cm a 7,5 cm) na parametry spermií. Ve druhém experimentu jsme měřili vliv různých ředidel na kvalitu inseminační dávky (Poultry media[®], Raptac[®] a NeXcell[®]). Pokusili jsme se do experimentu vybrat taková ředidla, která jsou snadno dostupná a je s nimi snadná manipulace v laboratoři. Dále jsme hodnotili vliv teploty (5 °C a 40 °C) vodní lázně při rozmrazení.

V prvním experimentu jsme nejlepších výsledků dosáhli při výšce chlazení 5,0 cm, kde měly spermií po rozmrazení nejvyšší celkovou motilitu, nejvyšší míru životaschopnosti, nejmenší poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu i dvojí poškození. Naopak nejhorší výsledky byly zaznamenány při výšce chlazení 7,5 cm.

Ve druhém experimentu bylo nejlepších výsledků dosaženo s ředidlem Raptac[®], ale výsledky nebyly statisticky rozdílné s ředidlem Poultry media[®]. Naopak nejhůře vyšlo ředidlo NeXcell[®]. Rozdílné teploty vodní lázně po rozmrazení neměly žádný statisticky významný vliv na výsledky.

Pro další studie by bylo určitě vhodné pokračovat v hledání optimálních mrazících protokolů pro ptačí spermií. Přínosné by bylo zvážit přídavek i jiných kryoprotektantů (např. neprostupujících), které by mohly mít pozitivní vliv na funkční parametry spermií po rozmrazení.

8 Literatura

- Abouelezz FMK, Sayed MAM, Santiago-Moreno J. 2017. Fertility disturbances of dimethylacetamide and glycerol in roster sperm diluents: Discrimination among effects produced pre and post freezing-thawing process. *Animal Reproduction Science* **184**: 228–234.
- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**(2): 163–176.
- Alvarenga MA, Papa FO, Neto CR. 2016. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **32**: 521–530.
- Aurich C., Seeber P, Müller-Schlösser F. 2007. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. *Reproduction in Domestic Animals* **42**(4): 445–448.
- Aurich C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* **107**: 268–275.
- Aurich C, Schneider J. 2014. Sex determination in horses-Current status and future perspectives. *Animal Reproduction Science* **146**(1–2): 34–41.
- Aurich JE. 2012. Artificial Insemination in Horses-More than a Century of Practice and Research. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**(8): 458–463.
- Bahrami A, Divar MR, Azari M, Kafi M. 2020. Nicotinic Acid (Niacin) Supplementation in Cooling and Freezing Extenders Enhances Stallion Semen Characteristics. *Journal of Equine Veterinary Science* 94 (103236) DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103236.
- Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, Magistrini M. 1998. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 °C under aerobic conditions. *Theriogenology* **50**: 229-236
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Molecular Reproduction and Development* **73**: 1338–1344.
- Blank M, Silva VC, Rui BR, Novaes GA, Castiglione VC, Pereira RJG. 2020. Beneficial influence of fetal bovine serum on in vitro cryosurvival of chicken spermatozoa. *Cryobiology* **95**: 103–109.
- Burros WH, Quinn JP. 1937. The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry science* **16**: 19-24.
- Chenoweth PJ, Lorton SP. 2014. *Animal andrology: theories and applications*. CABI, Wallingford, UK.
- Consuegra C, Crespo F, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Pereira B, Ortiz I, Hidalgo M. 2019. Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Animal Reproduction Science* **206**(May): 69–77.
- Dascanio J, McCue P. 2014. *Equine reproductive procedures*. Wiley blackwell, Iowa.

- De Coster T, Velez DA, Van Soom A, Woelders H, Smits K. 2020. Cryopreservation of equine oocytes: Looking into the crystal ball. *Reproduction, Fertility and Development* **32**(5): 453–467.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science* **71**: 13–23.
- García-Vázquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV. 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology* **18**: 844–850.
- Givan AL. 2011. Flow cytometry: An Introduction. Pages 1-29 in Hawley TS, Hawley RG editors. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York.
- Hernández-Avilés C, Love CC, Serafini R, Teague SR, Varner DD. 2019. Supplemental Antibiotics in a Commercial Extender for Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **80**: 33–35.
- Hernández-Avilés C, Ramírez-Agámez L, Varner DD, Love CC. 2023. The stallion sperm acrosome: Considerations from a research and clinical perspective. *Theriogenology* **196**: 121–149.
- Hidalgo M, Consuegra C, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Ortiz I, Pereira B, Sanchez R, Crespo F. 2018. Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. *Animal Reproduction Science* **196**(April): 91–98.
- Jamieson BGM. 2007. *Reproductive biology and phylogeny of birds*. SCIENCE PUBLISHERS. United States of America.
- Janosikova M, Petricakova K, Ptacek M, Savvulidi FG, Rychtarova J, Fulka J. 2023. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa. *Poultry science* 102 (102386) DOI: 10.1016/j.psj.2022.102386.
- Jasko DJ, Bedford S, Cook NL, Mumford EL, Squires EL, Pickett BW. 1993. Effects of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **40**: 885–893.
- Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE, Mohey-Elsaeed O. 2018. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* **6**: S49–S56.
- Khodeai-Motlagh M, Masoudi R, Karimi-Sabet MJ, Hatefi A. 2022. Supplementation of sperm cooling medium with Zinc and Zinc oxide nanoparticles preserves rooster sperm quality and fertility potential. *Theriogenology* **123**: 36-40
- Kumar N, Singh AK. 2021. The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of Reproduction* **104**(3): 508–520.
- Li Y, Sun Y, Ni A, Shi L, Wang P, Isa AM, Ge P, Jiang L, Fan J, Ma H, Yang G, Chen J. 2020. Seminal Plasma Proteome as an Indicator of Sperm Dysfunction and Low Sperm Motility in Chickens. *Mol Cell Proteomics* **19**(6): 1035–1046.
- Loomis P, Graham J. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* **105**(1–2): 119–128.

- Loomis P. 2011. Basic Principles and Techniques for Semen Freezing. Pages 1-5. XVII SIVE International Congress. Palco, Montesilvano.
- Love CC. 2016. Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* **32**(3): 531–546.
- Miranda M, Kulíková B, Vašíček J, Olexiková L, Iaffaldano N, Chremek P. 2018. Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm quality. *Reproductive Domestic Animal* **53**: 93-100.
- Miró J, Morató R, Vilagran I, Taberner E, Bonet S, Yeste M. 2020. Preservation of Epididymal Stallion Sperm in Liquid and Frozen States: Effects of Seminal Plasma on Sperm Function and Fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* **88** (102940) DOI: 10.1016/j.jevs.2020.102940.
- Moore SG, Hasler JF. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science* **100**(12): 10314–10331.
- Morel D. 2008. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. Cabi, Cambridge.
- Mosca F, Madeddu M, Sayed AA, Zaniboni L, Iaffaldano N, Cerolini S. 2016. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology* **73**: 343–347.
- Mosca F, Zaniboni L, Sayed AA, Iaffaldano N, Soglia D, Schiavone A, Cerolini S. 2020. Effect of N-Methylacetamide Concentration and Thawing Rate on Chicken Sperm Quality after Cryopreservation. *Animals* **10** (824) DOI: 10.3390/ani10050824.
- Neville WJ, Macpherson JW, Reinhart B. 1971. Contraceptive action of glycerol in chickens. *Poultry Science* **50**: 2047–2053.
- Pagl R, Aurich JE, Müller-Schlösser F, Kankofer M, Aurich C. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology* **66**(5): 1115–1122.
- Partyka A, Niżański W. 2022. Advances in storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* **246** (106921) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106921.
- Paschoal AFL, Luther AM, Jäkel H, Scheinpflug K, Mühldorferl K, Bortolozzo FP, Wabersk D. 2020. Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5°C. *PLOS ONE* **15**(6) (e0234339) DOI: 10.1371/journal.pone.0234339.
- Petricakova K, Janosikova M, Ptacek M, Zita L, Savvulidi FG, Partyka A. 2022. Comparison of Commercial Poultry Semen Extenders Modified for Cryopreservation Procedure in the Genetic Resource Program of Czech Golden Spotted Hen. *Animals* **12** (2886) DOI: 10.3390/ani12202886.
- Recuero S, Fernandez-Fuertes B, Bonet B, Barranco I, Yeste M. 2019. Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* **137**: 36-42.
- Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD. 2001. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal reproduction science* **68**: 171–180.

- Roldan ERS. 2019. Sperm competition and the evolution of sperm form and function in mammals. *Reproduction in Domestic Animals* **54**: 14–21.
- Saha A, Asaduzzaman M, Bari FY. 2022. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm. *Veterinary Medicine International* (7378379) DOI: 10.1155/2022/7378379.
- Sasaki K, Tatsumi T, Tsutsui M, Niinomi T, Imai T, Naito M, Tajima A, Nishi Y. 2010. A method for cryopreserving semen from yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotective agent. *Japan poultry science association* **47**: 297–301.
- SAS Institute Inc. Base SAS 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures, 2nd ed.; Statistical Analysis System Institute Inc.: Cary, NC, USA, 2013.
- Serafini R, Ghosh S, Love CC, Medrano JMR, Teague SR, LaCaze KA, Varner DD. 2019. Effect of artificial vagina lubricants on stallion sperm quality. *Theriogenology* **139**: 121–125.
- Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Yekta AA, Esmaeili V, Sharbatoghli M, Janzamin E, Hajnasrollahi M, Mostafayi F. 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology* **83**: 78–85.
- Squires E. 2020. Current Reproductive Technologies Impacting Equine Embryo Production. *Journal of Equine Veterinary Science* 89 (102981) DOI: 10.1016/j.jevs.2020.102981.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* **63**: 912–922.
- Wiebke M, Hensel B, Nitsche-Melkus E, Jung M, Schulze M. 2021. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal reproduction science* 246 (106822) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106822.
- Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. 2022. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal reproduction science* 246 (106904) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106904.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACRD	poškození akrozomu
AI	umělá inseminance
BFR	před mrazením
cAMP	dependentní proteinkinázová dráha
DMA	dimethylacetamid
DMF	dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FSC	přímý rozptyl
GLY	glycerol
LDL	nízkodenzitní lipoproteiny
LSM	metoda nejmenších čtverců
mCasa	computer-assisted semen analysis
MOT	celková motilita
MTR DR	MitoTracker Deep Red
NMA	N-methylacetamid
PAD	dvojitě poškození – plazmatické membrány i akrozomu
PBS	fosfátový pufr
PI	Propidium iodine
PM	progresivní motilita
PMD	poškození plazmatické membrány
PMI	integrita plazmatické membrány
ROS	volné kyslíkové radikály
SSC	boční rozptyl
THW	po rozmrazení

10 Seznam tabulek, grafů a obrázků

Tabulka 1: Základní parametry ejakulátu hospodářských zvířat (řevzato a upraveno z (Wiebke et al. 2021, Janosikova et al. 2023).	11
Tabulka 2: Rozměry spermií u jednotlivých druhů hospodářských zvířat (převzato a upraveno z García-Vázquez et al. 2016, Chenoweth & Lorton, 2014).	12
Tabulka 3: Funkční parametry epididymálních, ejakulovaných spermií a spermií odebraných po kastraci po 24 hodinách při skladování při 5 °C (Melo et al. 2010)	18
Tabulka 4: Základní parametry inseminačních dávek u hospodářských zvířat (převzato a upraveno z Wiebke et al. 2021).	20
Tabulka 5: Průměrná celková motilita před mrazením (MOT BFR) a po rozmrazení (MOT THW) při chlazení na třech různých výškách	34
Tabulka 6: Průměrné hodnoty motility před mrazením (MOT BFR) a půl hodiny po rozmrazení (MOT THW)	38
Tabulka 7: Účinek vybraného ředidla na celkovou motilitu po rozmrazení	39
Tabulka 8: Funkční parametry spermií před a po rozmrazení	39
Tabulka 9: Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií po rozmrazení	41
Tabulka 10: Účinek vybraného ředidla na viabilitu po rozmrazení	42
Tabulka 11: Vliv teploty při ekvibraci po rozmrazení na viabilitu spermií (PMI THW), poškození plazmatické membrány (PMD THW), poškození akrozomu (ACRD THW) a dvojího poškození spermií (PAD THW)	43
Tabulka 12: Vliv odběrového dne na poškození plazmatické membrány po rozmrazení (PMD THW)	42
Tabulka 13: Vliv odběrového dne na akrozomové poškození po rozmrazení (ACRD THW)	44
Tabulka 14: Vliv odběrového dne na dvojí poškození spermií po rozmrazení (PAD THW)	45
Tabulka 15: Vliv zvoleného ředidla na poškození plazmatické membrány po rozmrazení (PMD THW)	45
Tabulka 16: Vliv zvoleného ředidla na akrozomální poškození po rozmrazení (ACRD THW) ..	46
Tabulka 17: Vliv zvoleného ředidla na dvojí poškození - plazmatické membrány i akrozomu po rozmrazení (PAD THW)	46
Graf 1: Celková motilita (%) spermií po přidání ředidel při skladování při 5 °C po 96 hodin (Aurich 2007).	24
Graf 2: Integrita plazmatické membrány (%) po přidání ředidel při skladování při 5 °C po 96 hodinách (Aurich 2007).	24
Graf 3: Celková motilita před mrazením (MOT BFR) a po rozmrazení (MOT THW) při třech různých výškách chlazení nad hladinou tekutého dusíku	35
Graf 4: Základní funkční parametry spermií pro různé výšky chlazení po rozmrazení	36
Graf 5: Celková motilita před mrazením (MOT BFR) a celková motilita po rozmrazení (MOT THW)	38
Graf 6: Průměrné naměřené hodnoty měřených parametrů na průtokovém cytometru	40
Graf 7: Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií po rozmrazení	42

Obrázek 1: Kohoutí spermie (převzato a upraveno z Li et al. 2020).	12
Obrázek 2: Spermie hřebce (Hernández-Avilés et al. 2023).	13
Obrázek 3: Základní schéma průtokové cytometrie (Adan et al. 2017).	16
Obrázek 4: 1 – mCASA (iSperm, Aidmics Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan), 2 – optická aparatura, base a cover chip (archiv autora).	30
Obrázek 5: Vybavení potřebné k mrazení inseminačních dávek (1 – plovoucí rack, 2 – těsnící prášek, 3 – polystyrenový mrazicí box, 4 – pejetý, 5 – plnička na pejetý) (archiv autora)	31
Obrázek 6: Průtokový cytometr - Novocyte 3000, Acea Biosciences (archiv autora).	32
Obrázek 7: „Gating strategy“ – výsledek z průtokového cytometru (Petricakova et al. 2022)..	33