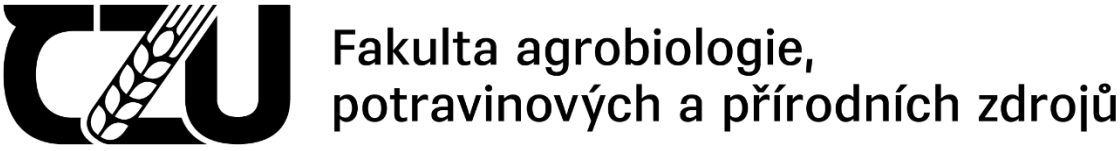
Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



Optimalizace procesu výroby inseminačních dávek pro účel umělé inseminace ovcí

Diplomová práce

Bc. Hana Beranová
Reprodukční biotechnologie

Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci "Optimalizace procesu výroby inseminačních dávek pro účel umělé inseminace ovcí" 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 21.4.2024 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Filippovi Georgijevičovi Savvulidimu Ph.D. za pomoc s diplomovou prací, jakožto vedoucímu práce. Velké díky patří Ing. Martinu Ptáčkovi PhDr. za pomoc při zpracování výsledků. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého mého studia.

Optimalizace procesu výroby inseminačních dávek pro účel umělé inseminace ovcí

Souhrn

Cílem diplomové práce je analýza mass motility neboli vířivého pohybu spermatu berana Valašské ovce a následně jeho ovlivnění přidanými ředidly. Je třeba optimalizovat ředění, abychom uchovali vířivý pohyb i při teplotě 38 °C, což je teplota děložního hrdla ovce během inseminace. Zachováním dobrého vířivého pohybu při této teplotě by mohlo dojít k prodloužení přežitelnosti spermií v reprodukčním traktu samice a následnému zvýšení šance na oplození.

Sperma bylo odebráno od dvou samců plemene Valašská ovce. Ejakulát byl vždy odebrán od obou beranů. Ejakulát je velmi citlivý na teplotní šoky a proto je při manipulaci s ním důležité mít vše nahřáté na teplotu 37 – 38 stupňů Celsia. Jako první byl určen vstupní vířivý pohyb obou vzorků. Na předem vyhřáté podložní sklíčko byla nanesena kapka nativního spermatu a pod mikroskopem s přiblížením 40 x až 100 x, byl určen vířivý pohyb. Hodnocení je na škále od 0 do 5, kdy 5 je bráno jako nejkvalitnější. Za kvalitní vzorek se považuje od vířivého pohybu 3 a vyšší.

Následně byly oba vzorky naředěny pěti ředidly v poměru 1:2, kdy celkový objem tvořil 180 mikrolitrů. Použita byla ředidla PBS, UHT mléko 3,5 %, Inra96, Optixcell, Diluent K, který byl poté nahrazen ředidlem SLAD. INRA 96, Optixcell, PBS a SLAD jsou komerční ředidla narozdíl od mléka 3,5% UHT a Diluentu K. Diluent K je vždy nutné připravit předem v laboratoři. Složení Diluentu K je 0,8 g glukózy, 2,9 g citronanu sodného, 20 ml vaječného žloutku a 100 ml destilované vody. Vždy byla ředidla předem nahřátá na teplotu 38 stupňů Ceslsia.

U každého z beranů byla ponechána i varianta nenaředěného ejakulátu. Inseminační dávky byly následně analyzovány a hodnoceny po dobu 6 hodin ve 30 minutových intervalech. Výjimkou byl vzorek nenaředěného ejakulátu, který jsem hodnotila každou hodinu. Vždy po zhodnocení vířivého pohybu byly vzorky uloženy do vodní lázně s optimální teplotou 37 – 38 °C

Z nasbíraných dat vyplývá, že vybraná ředidla mají různé vlivy a znatelně ovlivňují vířivý pohyb spermií. Překvapením bylo zjištění, že v některých případech jsou reakce na ředidla odlišná v závislosti na samci. To dokazuje, že pozitivní vliv na motilitu daného ředidla nelze se stoprocentní jistotou určit plošně na celou populaci Valašské ovce. Do budoucna by bylo vhodné ověřit kvalitu inseminačních dávek v in vivo podmínkách a zhodnotit míru plodnosti.

Klíčová slova: inseminace, ID, ovine, CASA, průtoková cytometrie, přežitelnost, analýza vířivého pohybu

Optimization of the procedure for the production of insemination doses for the purpose of artificial insemination of sheep

Summary

The aim of the thesis is to analyse the mass motility or the vortex movement of the semen of the Wallachian ram and its subsequent influence by added diluents. It is necessary to optimize the dilution in order to preserve the swirling motion even at 38 °C, which is the temperature of the sheep's cervix during insemination. By maintaining good vortex motion at this temperature, sperm survival in the reproductive tract of the female could be prolonged and the chance of fertilisation increased.

Semen was collected from two male Wallachian sheep. The ejaculate was always collected from both rams. Ejaculate is very sensitive to temperature shocks and therefore it is important to keep everything warmed up to a temperature of 37-38 degrees Celsius when handling it. The first step was to determine the initial swirling motion of both samples. A drop of native semen was applied to a pre-heated slide and under a microscope with a magnification of 40 x to 100 x, the swirling motion was determined. The rating is on a scale of 0 to 5, with 5 being taken as the best quality. A swirling motion of 3 or higher is considered to be a quality sample.

Subsequently, both samples were diluted with five diluents in a 1:2 ratio, with a total volume of 180 microliters. The diluents used were PBS, UHT milk 3.5%, Inra96, Optixcell, Diluent K, which was then replaced by SLAD. INRA96, Optixcell, PBS and SLAD are commercial diluents unlike 3.5% UHT milk and Diluent K. Diluent K must always be prepared in advance in the laboratory. The composition of Diluent K is 0.8 g glucose, 2.9 g sodium citrate, 20 ml egg yolk and 100 ml distilled water. The diluents were always preheated to a temperature of 38 degrees Cesslsius.

A variant of undiluted ejaculate was also retained for each of the rams. The insemination batches were then analyzed and evaluated for 6 hours at 30 minute intervals. The exception was the undiluted ejaculate sample, which was evaluated every hour. Each time, after evaluation of the vortex motion, the samples were placed in a water bath with an optimal temperature of 37-38 °C

The data collected showed that the selected diluents have different effects and noticeably influence the swirling motion of spermatozoa. It was surprising to find that in some cases the responses to diluents differed depending on the male. This shows that the positive effect on motility of a given diluent cannot be determined with 100% certainty over the whole population of Wallachian sheep. In the future, it would be useful to verify the quality of insemination doses under in vivo conditions and to assess the fertility rate.

Keywords: insemination, ID, ovine, CASA, flow cytometry, survivability, mass motility

Obsah

1 Úvod 8

2 Vědecká hypotéza a cíle práce 9

3 Literární rešerše 10

3.1 Valašská ovce 10

3.1.1 Genetický zdroj 10

3.2 Pohlavní soustava 11

3.2.1 Ejakulát 11

3.2.2 Spermie 12

3.2.3 Semenná plazma 12

3.3 Faktory ovlivňující kvalitu spermatu 13

3.3.1 Věk 13

3.3.2 Strava 13

3.3.3 Zdravotní stav 13

3.3.4 Obvod šourku 13

3.4 Odběr ejakulátu 14

3.4.1 Odběr pomocí umělé vagíny 14

3.4.2 Elektrostimulace 15

3.4.3 Post mortem 15

3.5 Hodnocení kvality spermatu 15

3.5.1 Makroskopické posouzení 16

3.5.2 Mikroskopické posouzení 17

3.6 Průtoková cytometrie 18

3.6.1 Princip fungování 18

3.7 CASA 19

3.8 Metabolismus spermií 20

3.9 Motilita spermií 21

3.9.1 Hodnocení motility 22

3.9.2 Ovlivnění motility 23

3.10 Zpracování a uchování ejakulátu 23

3.10.1 Dlouhodobé 23

3.10.2 Krátkodobé 24

3.11 Ředění 24

3.11.1 Ředidla 25

3.11.2 Optimalizace používaných ředidel 25
3.12 Umělá inseminace ovcí 28
3.12.1 Metody inseminace 28
4 Metodika 31
4.1 Berani 31
4.2 Odběr ejakulátu 31
4.3 Ředění vzorku a hodnocení vířivého pohybu 31
4.4 Statistická analýza dat 32
5 Výsledky 34
6 Diskuze 39
7 Závěr 41
8 Literatura 42
9 Seznam použitých zkratek a symbolů 51

1 Úvod

Inseminace hospodářských zvířat je v dnešní době zcela běžná záležitost. Jedním z hlavních důvodů inseminace je větší možnost šlechtění a udržení požadovaných standardů daného plemene. Přestože jejich rozmnožování probíhá také přirozeně, inseminace má značné výhody. Tyto výhody zahrnují kontrolu kvality ejakulátu a využití spermatu nejkvalitnějších plemeníků. Díky ředění semene vzniká větší množství inseminačních dávek a je možné jednoho kvalitního samce použít pro více samic. Plemeno valašské ovce je zařazeno mezi genetické zdroje naší republiky a to díky jeho typickým vlastnostem, jako je znovuobnovení a zachování horských oblastí.

Právě reprodukční biotechnologie zahrnující také inseminaci, napomáhají udržet genetické standardy a zachovávat zdraví zvířat.

Inseminace nemraženým naředěným spermatem má ve srovnání s inseminací mraženým spermatem lepší výsledky. Přesto je zapotřebí zoptimalizovat přežití spermií při teplotách reprodukčního traktu samice. Proto se má diplomová práce tímto tématem zabývá. Hlavním cílem je určit nejoptimálnější ředidlo, které zachová kvalitní motilitu spermií v řádu několika hodin při teplotě 37 – 38 °C. Pouze poté je možné sperma dosáhnout přežití inseminované dávky v pohlavním ústrojí samice a tím zvýšit šanci na oplození.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Předpokládáme, že na úspěšnost umělé inseminace ovcí naředěným nemraženým spermatem má vliv použité ředidlo.
Umělá inseminace ovcí naředěným nemraženým spermatem (především v případě využití metodiky cervikální inseminace) má evidentní výhody ve srovnání se spermatem mraženým. V dnešní době je snahou odborníků najít optimální ředidlo, které by poskytovalo, co nejefektivnější uchování viability spermatických buněk. Dnešní znalosti poukazují na to, že jedním z nejdůležitějších kvalitativních parametrů spermatických buněk je jejich pohyblivost. Také je známo, že komponenty ředidel můžou mít, jak pozitivní tak negativní účinek na motilitu spermatických buněk.

Cíl: Hlavním předmětem diplomové práce je ověřit danou hypotézu, že běžně dostupná komerční ředidla mají vliv na vířivý pohyb. Zjistit, které ředidlo se svým složením dle analýzy jeví jako nejoptimálnější.

3 Literární rešerše

3.1 Valašská ovce

Jejich původ pramení z cápových ovcí, které se standardně vyskytují na Balkáně a Karpatech. Vlivem kolonizace se toto plemeno dostalo v 15. – 16. století i na naše území (Milerski, 2016) Jeden z důvodů chovu valašské ovce je že jsou velmi dobře přizpůsobeny extrémním podmínkám v horských oblastech (Horák a Treznerová, 2010).
Jejich užitkovost je kombinovaná, což znamená, že se zaměřuje na vlnu, mléko a maso. Mezi jejich charakteristické vlastnosti se řadí chodivost v členitém terénu, otužitelnost, temperament a silný stádový pud (Horák et al., 2004). Díky těmto vlastnostem jsou vhodné pro chov na neoplocených horských pastvinách. Právě pro tyto oblasti jsou salašnictvím charakteristické. Jejich další využití se týká historického původu a jsou oblíbené při folklorních a historických akcích, kde prezentují salašnictví a salašnické výrobky.
Jedná se o plemeno, které je charakteristické menším až středním vzrůstem, pevnou konstitucí a pastevní schopností. Končetiny jsou pevné s menšími paznehty, které jsou tvořené tvrdou rohovinou. Hlava je suchá s úzkými čelistmi. Uši jsou krátké a směřují do stran. Samci jsou zpravidla rohatí, u samic jsou možné obě varianty. Zbarvení je u tohoto plemene různé, od bílé, šedé až po černou. Častým znakem jsou tmavé černé skvrny na hlavě a končetinách. Smíšené rouno s krátkou podsadou a dlouhými pesíky je hlavním charakteristickým znakem plemene. Toto spojení vytváří zvlněné pramínky, které se navzájem překrývají a tím zajišťují ochranu před deštěm. Výše zmíněné vlastnosti jim dávají schopnost přežít v extrémních podmínkách. Rouno hraje významnou roli i při termoregulaci. Vlna se nevyskytuje na končetinách a hlavě. Co se týká hmotnosti, samci váží 50 – 65 kg, samice jsou o něco menší a váží v průměru 40 – 50 kg (Milerski, 2016).

3.1.1 Genetický zdroj

Podstatou vytvoření genových zdrojů je zachování ohrožených druhů. Cílem není zlepšování reprodukčních a produkčních schopností daného plemene.
Důvodem vymírání druhů zvířat jsou změny klimatu, choroby, genetické problémy a selekce. Biologickou rozmanitost můžou ovlivnit i přírodní katastrofy. Jak již bylo zmíněno, tyto genetické zdroje neslouží primárně ke změně produkčních vlastností, ale jako možnost reagovat v budoucnosti na nepředvídatelné změny (Mátlová et al., 2021).
Každý organismus má charakteristické vlastnosti a může být nápomocen při šlechtění jiných druhů. Cílem je uchovat genetické zdroje u druhů momentálně pro hospodáře neperspektivních a tím pádem hrozí jejich vymření. Další jejich velkou hrozbou a důvodem možného vymření jsou útoky vlka obecného, který napadá celá stáda a tím snižuje jejich počet (Mátlová et al., 2021., Ministerstvo zemědělství, 2017).
Listina platící na mezinárodní úrovni je Úmluva o biologické rozmanitosti – Convention on Biological Diversity (Ministerstvo zemědělství 2017).
Valašská ovce bylo do toho seznamu zahrnuta zejména pro její výše zmíněné vlastnosti. Dále z důvodu historického a kulturního (Ministerstvo zemědělství, 2017).

3.2 Pohlavní soustava

Pohlavní soustava zahrnuje orgány, které slouží k rozmnožování a zachování druhu (Horák, 2012). Pohlavní soustava berana je totožná jako u ostatních přežvýkavců. Skládá se z varlat, nadvarlat, přídatné pohlavní žlázy, chámovodu a pyje (Pugh a Baird, 2012).

Varlata – jedná se o párový pohlavní orgán. Hlavní úlohou je tvorba spermií a samčích pohlavních hormonů, zejména testosteronu. Varlata potřebují pro správnou funkci nižší teplotu než je tělesná teplota, proto jsou uloženy mimo dutinu břišní v šourku, kde je teplota pro ně optimální (Cottle, 2010).
Nadvarle – dělí se na tři části hlava, tělo a ocas. Hraje zásadní roli v dozrávání spermií a slouží jako jejich rezervoár. Hlava nadvarlete se nachází v horní části a přes tělo přechází do ocasu. Konec ocasu tvoří tzv. nadvarletní vývod přecházející do chámovodu (Horák et al., 2004).
Přídatné pohlavní žlázy – Jejich hlavním produktem je sekret, který je vyplavován do močové trubice. Sekret je nazýván semenná plazma a po spojení s výměškem nadvarlat společně tvoří ejakulát (Reece 2011). Patří sem i prostata neboli žláza předstojná společně s bulborektálními žlázami, neboli Copwerovými žlázami, a chámovodem. Přídatné pohlavní žlázy jsou druhově rozdílné a mohou dokonce i chybět.
Chámovod – Patří mezi přídatné pohlavní žlázy (Reece 2011). Nachází se podél nadvarlete a směřuje nahoru k tříselnému kanálu. Jedná se o nepárovou žlázu, jejíž sekret je alkaický s velkým množstvím proteinů. Po své délce je hojně cévně zásoben, kromě pánevní dutiny, kde se chámovod od cév odděluje a poté se spojí v ejakulační vývod (Cottle, 2010).
Pyj – Kopulační orgán, přes který dochází k přenosu semene do pohlavního ústrojí samice. Pro správnou funkci jsou zapotřebí topořivá tělesa, která se zde vyskytují v páru, dále močová trubice, houbovité těleso pyje a pomocné svaly. Délka je individuální, ale pohybuje se v rozmezí od 30 – 50 cm (Marvan, 2003).

3.2.1 Ejakulát

Ejakulátem se rozumí výměšek samčích pohlavních žláz, který je složen ze spermií a semenné plazmy. K produkci spermií dochází ve varlatech a semenná plazma se tvoří v přídatných pohlavních žlázách, které jsou podrobněji popsány v předchozí kapitole.
Co se týká chemického složení ejakulátu je lehce zásaditý. Jeho pH se pohybuje okolo 7,2 – 7,8.
Celkové vlastnosti ejakulátu, což zahrnuje barvu, pH, množství, zápach a hustotu, závisí na druhu. Všeobecně u malých přežvýkavců se jedná o menší objem s vetší koncentrací spermií (Marvan, 2003).
Objem se pohybuje okolo 0,2 – 0,5 ml s koncentrací s 1,5 – 5,0 x 10^9 spermií na 1 ml (Cottle, 2010).
Kvalita ejakulátu je důležitá zejména při určování vhodnosti samce k plemenitbě.

3.2.2 Spermie

Spermie je samčí pohlavní buňka neboli gameta, která je velmi specializovaná k vyhledání a oplození vajíčka (Marvan, 2011). K produkci spermií dochází v semenotvorných kanálcích varlat v procesu zvaném spermatogeneze, kdy vznikají buňky s haploidním počtem chromosomů (Gadella & Luna 2014).
Jejich velikost a tvar se liší podle druhu. Pro spermie všech druhů je společná pohyblivost a schopnost oplodnit vajíčko. Spermie se dělí na tři hlavní části, kterými jsou hlavička, krček a bičík. Rozměry hlavičky spermie se pohybují okolo 0,5 až 1 mikrometr. Její utváření je též druhově závislé. Hlavička je oválného tvaru ze stran sploštělá, na její přední části se nachází čepička tzv. akrosom (Jelínek a Koudela, 2003). Jeho hlavní úlohou je vyplavení obsahujících enzymů a rozštěpení glykoproteinového obalu vajíčka tzv. zony pellucidy. (Chłopik et Wysokińska 2019). Hlavička je tvořena především jádrem s chromatinem nesoucím genetickou informaci daného jedince (Chłopik et Wysokińska 2019). Pomocí krčku je s hlavičkou spojen bičík, který díky mitochondriím a cytoskeletátní stuktuře, zajišťuje pohyb spermie (Hafez & Hafez, 2000).
Celý povrch je pokryt dvouvrstevnou cytoplazmatickou membránou, která není nikde přerušena a tím chrání spermii. Je charakteristická svojí permeabilitou, acidorezistencí a citlivostí na změny osmotického tlaku. Výše zmíněná permeabilita membrány umožňuje látkovou výměnu. Toho lze využít například při letálně vitálním barvení, kterého se využívá pro rozlišení živých a mrtvých spermií. K poškození permeability může dojít například při mražení spermií a tím se naruší oplozovací schopnost (Jelínek a Koudela, 2003).

3.2.3 Semenná plazma

Tvoří 70 – 75 % ejakulátu a primární úlohou je vytvořit pro spermie vhodné prostředí. Zajišťuje ochranou a i výživnou funkci (Marvan, 2011). Všechny komponenty semenné plazmy jsou tvořeny ve varlatech, nadvarleti a přídatných pohlavních žlázách. Obsahuje zejména proteiny, které mají funkci navázání se na plasmatickou membránu spermie a tím ovlivňují její vazebné schopnosti (Domínguez et al. 2008). Poměr a složení bílkovin semenné plazmy je druhově závislý (Muiño-Blanco et al., 2006).
Mustafa Hitit et al. (2021) se ve své studii zaměřuje na obsah bílkovin v beraním spermatu a vlivu na oplozovací schopnost. Berani (n = 66) s vyšším procentem zabřeznutí (89,4 ± 7,2 %) byly zařazeni do skupiny s vyšší plodností (GF n = 31; 94,5 ± 2,8 %). Naopak samci s nižším procentem byly zařazeni do skupiny s nižší plodností (LF; n = 25; 83,1 ± 5,73 %; P = 0,028). Následně byly vzorky od beranů s nejvyšší a nejnižší plodností (n = 6, míra březosti; 98,4 ± 1,8 % a 76,1 ± 3,9 %) použity pro hodnocení proteinů. Dohromady bylo nalezeno 997 proteinů, z nichž 840 se vyskytovalo v obou skupinách a naopak 57 a 93 bylo obsaženo pouze v GF a LF. Z dále detekovaných 190 bílkovin 124 bylo u GF a 66 bylo více zastoupeno ve skupině LF. Z výsledků vyplývá, že existuje rozdíl ve složení proteinů a lze podle nich odhadnout oplozovací schopnosti.
Dále obsahuje živiny a enzymy, které sehrávají důležitou roli při samotném procesu ejakulace až po oplození vajíčka. Nelze opomenout fruktózu, cukry a kreatin, bioaktivní složky jako například estrogeny, androgeny a prostaglandiny (Jelínek a Koudela, 2003).

Obsahuje značné množství minerálních látek jako zinek, vápník, hořčík a také sodík. Zastoupení jednotlivých složek v semenné plazmě je závislé na sekreci, velikosti a kapacitě samčích pohlavních žláz (Juyena & Stelletta 2011). Beraní semenná plazma je specifická oproti semenné plazmě ostatních hospodářských zvířat. Rozdíl je, že obsahuje specifické bílkoviny s antimikrobiálním účinkem Berdefensin a Ovispirin. Jako další přiklad uvedu vyšší koncentraci zinku, který má pozitivní účinky na kvalitu spermií (El Amiri, 2022).

3.3 Faktory ovlivňující kvalitu spermatu

Přestože jsou samci plodní během celého roku i tak se kvalita jejich spermatu během roku mění. Udává se, že sperma je nejkvalitnější na podzim (Horák, 2004).

3.3.1 Věk

Věk ovlivňuje kvalitu spermatu u mnohých savců a proto i hospodářská zvířata nejsou výjimkou. Konkrétně beran dosahuje pohlavní dospělosti okolo 3 – 6 měsíců, ale i tak je to individuální a záleží na plemeni a dalších faktorech. Co se týká chovatelské dospělosti, té dosahují přibližně v 7 – 10 měsíci, kdy by měli mít zhruba 70 % konečné váhy. Mezi nejplodnější období patří věk od 3 do 5 let. Po překlenutí 6 roku plodnost začíná pomalu klesat (Kuchtík et al., 2007). Mimo věk má na plodnost velký vliv hlavně tělesný vývoj a vývoj varlat.

3.3.2 Strava

Během připouštění musejí mít samci kvalitní stravu. Vhodné je doplňovat minerály jako je vápník a fosfor. Pro lepší pohyblivost spermií se do výživy přidává vitamin E a selen několik týdnů před připustěním (Horák, 2012). Seno, oves a dostatek vody je základem. Kvalita krmiva má dopad na velikost varlat. Velikost a obvod šourku určuje tvorbu spermií, čím vyšší, tím větší požadavky na bílkoviny a energii ve stravě (Gootwine, 2016).

3.3.3 Zdravotní stav

Kontrola a udržování dobře tělesné kondice a zdraví je důležitá pro reprodukční činnost. Před připouštěním je vhodné berany odčervit a naočkovat. Doporučuje se berany ostříhat (Louda, 2001). Samozřejmostí je kontrola pohlavního ústrojí tzn. varlat, nadvarlat, správná činnost pyje a čistota předkožky (Louda a Hegedüšová, 2009). Beran s jakoukoliv vadou či onemocněním pohlavní soustavy by měl být léčen nebo brakován (Cottle, 2010).

3.3.4 Obvod šourku

Parametr, který má významný vliv na kvalitu a fertilní schopnost spermií. Obvod šourku se může měnit na základě ročního období, jelikož souvislí s váhou samce a pohlavní aktivitou. V období pohlavní aktivity má obvod šourku větší rozměry, naopak mimo období rozmnožování může dojít ke zmenšení obvodu v rámci 2 – 3 cm (Pezzanite et al. 2010). Podle obvod šourku lze rozhodnout o vhodnosti zařazení samce do plemenitby. Jako minimální

obvod se uvádí 33 centimetrů, pokud je obvod menší je vhodné samce vyřadit, jelikož není schopen vyprodukovat požadovaný objem ejakulátu.
Podle studie Braun et al. (1980) který měřil obvod šourku u 717 samců bez ohledu na plemeno, z jeho výsledků vyplývá, že existuje přímá úměra mezi váhou samce a obvodem šourku. Všeobecně větší plemena mají větší obvod šourku.
Podle velikosti obvodu šourku lze berany rozdělit do tří skupin: vynikající, uspokojivý a pochybný. Měření se provádí před začleněním samce do plemenitby (Pezzanite et al. 2010)

3.4 Odběr ejakulátu

Inseminace se využívá v procesu rozmnožování u hospodářských zvířat velmi hojně. Provádí se aktivně a záměrně, aby se předešlo přímému pohlavnímu styku partnerů. Hlavním rozdílem mezi pářením a inseminací je časová přestávka, která slouží ke zhodnocení ejakulátu a k jeho úpravě, aby se dalo využít pro vetší počet plemenic. Díky tomu lze používat menší počet plemeníků. Je to dáno zejména tím, že dnešní technologie umožňují ředění ejakulátu a tím dojde k navýšení jeho objemu.
Co se týká získávání ejakulátu od beranů musí nejdříve dosáhnout chovné dospělosti. Tím se rozumí věk, kdy je samec zařazen do chovu, aniž by to mělo vliv na jeho další vývoj nebo zdravotní stav. Konkrétně u raných plemen v 8. – 10. měsících a u ostatních ve 12. – 18. měsíci. Zařazení do plemenitby neurčuje pouze věk, ale stupeň tělesného vývoje, který by měl dosahovat alespoň 70 – 75 % hmotnosti dospělého zvířete. Konkrétně u beranů se bere v potaz i vývoj varlat (Kuchtík et al., 2007).
Fyzická zdatnost a případné abnormality by měly být vyšetřeny ještě před odběrem spermatu. Ve všech stádech lze nalézt berany s fyzickou abnormalitou, která ovlivňuje kvalitu semene a i snižovat libido beranů. U všech beranů by měl být zkontrolován šourek, pyj a předkožka (Louda a Hegedüšová, 2009).

3.4.1 Odběr pomocí umělé vagíny

Umělá vagína je pro sběr beraního spermatu nejvyužívanější metoda. Přesto je náročná na trénink a přípravu samce. Doba potřebná k zácviku samce může být několik dní i týdnů v závislosti na samci (Wulster-Radcliffe et al., 2001). Je možné použít umělou vagínu, jaká se využívá u býku, pouze v kratším rozměru (Romano & Christians, 2009).
Vagína se před použití musí zahřát zavedením teplé vody (40 – 50 °C) a vzduchu mezi pláštěm, který je na vnější straně, a vnitřní měkkou membránou (Romano & Christians, 2009). Následně se vazelínou nebo sonografickým gelem namaže místo, kam dochází k zasunutí penisu a upevnění kónického jímacího skla nacházejícího se na druhém konci (Kos et al. 2019). Jednorázový sběrač může být z různých materiálů, převážně skleněný nebo z nespermicidní fólie.
Beran musí být před samotným zákrokem očištěn. Zaměřujeme se hlavně na břicho, zadní končetiny a šourek. Je možné předkožku předtím vyčistit fyziologickým roztokem NaCl a následně se otvor osuší sterilní rouškou. Poté co dojde k ejakulaci se umělá vagína drží kolmo vzhůru, aby se ejakulát v co nejkratším čase dostal do sběrače.

Pro urychlení ejakulace a zvýšení objemu ejakulátu se využívá přítomnost ovce v říji (Cottle, 2010). Odběr se standartně provádí 1 – 2 x za den, 5 x v týdnu. Frekvence odběru se zvyšuje se stářím samce. Ve výše zmíněné frekvenci odběru lze od jednoho berana získat za týden až 50 – 200 inseminačních dávek (Louda a Hegedüšová, 2009).

3.4.2 Elektrostimulace

Elektrostimulace se řadí k další možnosti odběru beranního spermatu. Metoda se využívá pokud beran není naučen odběru pomocí umělé vagíny (Napolitano et al., 2020). Při této metodě je beran fixován v poloze na boku. Princip této metody je založený na vložení lubrikované bipolární elektrody do konečníku a na základě elektrických výbojů dojde k ejakulaci (Brindley 1981). Elektrické impulsy dráždí hypograstrický plex okolo semenného váčku, prostatu a ductus deferens. Zároveň dochází ke stimulaci nervu, inervujícímu močovou trubici a tím vznikají kontrakce uterinních svalů, které mají za následek ejakulaci semene (Abril-Sánchez et al., 2019).
Elektroda se před zavedením očistí roztokem NaCL a díky vlhkosti je elektrická stimulace snadnější (Wernerová 2015). Penis je pro lepší odběr ejakulátu fixován gázou.
Tato metoda je méně spolehlivá než pomocí umělé vagíny, díky tomu i méně využívána. Mezi hlavní důvody patří rozdílnost kvality spermatu, když při elekrostimulaci může dojít ke kontaminaci močí. Pro zvířata je stresující a bolestivé její zavedení a je nutné podat sedativa či anestetika, které narušují kvalitu semene (Abril-Sánchez et al., 2017). Samotný úkon trvá několik minut a k ejakulaci dochází během 3-5 stimulacích (Shipley et al. 2007)

3.4.3 Post mortem

Tento způsob označuje odběr ejakulátu po smrti zvířete. Jedná se o chirurgický výkon a je vhodné ho provést, co nejdříve po smrti zvířete. Výzkumy uvádí nejdéle do 24 hodin. Podle jiných zdrojů i do 48 hodin (Kaabi et al., 2003). Pokud není možné provést odběr z nadvarlete okamžitě, uchovává se celé sperma při teplotě 5 °C a poté se do 24 hodin odebere vzorek (Kishikawa H et al., 1999, Shaken et al., 2008).
Jak již bylo zmíněno jedná se o zákrok, kdy se z ocasu nadvarlete, který slouží jako rezervoár pro spermie, extrahuje ejakulát. Odebraný vzorek se uchovává s ředidlem při teplotě 37 °C. Tento způsob odběru je výhodný pro získání genetické informace u vzácných a ohrožených druhů zvířat (Abu et al., 2016).

3.5 Hodnocení kvality spermatu

Hodnocení kvality spermatu zahrnuje množství, kvalitu a oplozovací schopnost. Naším cílem je zhodnotit kvalitu snadno, rychle a finančně dostupně (Kubovičová 2011).

Vzorek musí projít makro a mikroskopickým laboratorním vyšetřením (Edmondson et al., 2012).

Důležité je po odběru vzorky označit, aby nedošlo k záměně a byl zřejmý původ ejakulátu. V co nejkratší době by vzorek měl být donesen do laboratoře, aby se makroskopicky a

mikroskopicky zhodnotil. Nejlépe do 1 hodiny od odběru, poté dochází ke změně kvality a je to způsobené časovou prodlevou.
Pohyblivost spermií znatelně klesá po 2 hodinách. Sperma se při transportu umisťuje do inkubátoru s teplotou 37 °C. Jak již bylo výše zmíněno beranní sperma má menší objem a vyšší koncentraci spermií.
Kvalita je závislá na ročním období, kdy nejlepší výsledky vykazuje na podzim. Lze pozorovat i rozdíly v kvalitě beranů chovaným v inseminační stanici a beranů v přirozené plemenitbě (Louda a Hegedüšová, 2009).
Díky systémům pro analýzu nejsou výsledky napříč laboratořemi tolik variabilní. Přesto je několik kroků při přípravě ID, které lze lidskou prací někdy negativně ovlivnit, jako například ředění, manipulace, mražení a mnoha dalších (Baláži et al., 2020).

3.5.1 Makroskopické posouzení

Hlavním cílem tohoto posouzení je barva, objem, zápach a zrnitost (Heidari et al., 2021)

3.5.1.1 Objem

Objem lez zjistit pipetou s přesností na 0,1 cm^3 (Louda et al., 2001). Další možností je válec nebo stříkačka. Co se týká objemu by měl být v rozmezí od 0,5 do 2 ml, pokud neodpovídá je několik faktorů, které to mohou ovlivnit. Nižší objem může souviset se sníženou funkcí či jiným poruchou přídatných pohlavních žláz.

3.5.1.2 Zrnitost a konzistenci

Posuzujeme proti světlu, aby zkumavkou procházelo. Zkumavka se nakloní a díky přulnutí ke stěně posuzující zhodnotí viskozitu (Kos a kol. 2019). Sperma je charakteristické hustotou, neprůhledností a vysokou viskozitou (Gamčík & Kozumplík 1992). Jakkékoliv odchýlení od standardu značí problem s kvalitou ejakulátu. Pokud je viskozita vysoká může se jedna o poruchu přídatných pohlavních žláz, naopak při snížené viskozitě lze očekávat zhoršenou motilitu spermií (Ducha a kol. 2021).

3.5.1.3 Barva a zápach

Stejně tak pro posouzení barvy spermatu je nutné dobré světlo. Krémová až bílá barva, světle žlutá je považována za optimální. Možnou přítomnost infekce naznačuje našedlá barva. Naopak jasně žlutá barva signalizuje přítomnost hnisu, moče nebo cizích mikroorganismů. Dalším příznakem cizích mikroorganismů je zápach (Gamčík a Kozumplík, 1992). Takový ejakulát je znehodnocen. V ejakulátu lze také najít známky krve (Louda, 2001., Gamčík a Kozumplík, 1992). Normální beraní sperma je bez zápachu nebo je mírně cítit zatuchlinou, nesnesitelný nebo hnilobný pach může signifikovat infekci (Wurlina a kol., 2020).

3.5.1.4 pH hodnota

Další kritérium je pH hodnota, kterou lze snadno stanovit pH metre nebo pH proužky (Kos et al., 2019). Vyšší pH než je norma může značit nižší koncentraci spermií.

3.5.2 Mikroskopické posouzení

Oproti makroskopickému, které se provádí pouhým okem nebo jednoduchou diagnostikou je mikroskopické posouzení konkrétnější a podrobnější. Zaměřuje se na pohyblivost, koncentraci v mm^3, abnormality a poškození spermií (Gamčík a Kozumplík, 1992). Lze říct, že se zaměřuje na spermatogenezi.

3.5.2.1 Koncentrace

Koncentrace je jedna z hlavních ukazatelů kvality, jejím stanovením zjistíme kvalitu a možnost zpracování při tvorbě inseminačních dávek. Její hodnotu lze stanovit více způsoby, například odhadem, fotometricky, hemocytometricky a v poslední řadě počítačově (Wernerová 2015). Rozmezí koncentrace spermií u berana je 2 – 5 milionů spermií na 1 mm^3. Hodnotí se podle 6 skupin. Od velmi hustého ejakulátu s hodnotou 4 – 5 x 10^6 spermií až po velmi řídký ejakulát s hodnotou 1x10 spermií v 1 mm^3. Pro krátkodobé uchování lze využít ejakulát s koncentrací alespoň 2x10^6 v 1 mm^3. Pro dlouhodobé uskladnění je vhodný ejakulát s mírně vyšší koncentrací 2,8x10^6 /1 mm^3. Pokud by došlo k úplné absenci spermií v ejakulátu je tento jev označován jako azoospermie (Johansson et al., 2008).

3.5.2.2 Hodnocení patologických spermií

Jedná se o morfologické vyšetření, které je nejobjektivnější. Provádí se před inseminací, tak i pro vědecké účely (de Paz 2011). V každém ejakulátu je určitá koncentrace morfologicky odlišných spermií, pokud je toho zastoupení okolo 5 – 10 % nemá zásadní vliv na fertilizace. Vliv na oplození schopnost spermií lze očekávat při množství abnormálních spermií více než 25 % (Bearden, 2004)
Touto metodou se určuje procento spermií s normální morfologií a spermií se změněnou morfologií (Wernerová 2015). Lze sledovat morfologické procesy během spermatogeneze. Hodnotí se čerstvě odebraný ejakulát. V minulosti se používaly metody barvení dle Wels nebo Brandon – Farellyho, kdy se nanesla kapka na podložní sklíčko a následně se obarvila. V dnešní době se používá přístroj CASA (Kliment et al. 1989).
Změny se pozorují zejména na hlavičce, v akrozomu a mitochondriální části. Tyto změny ukazují na poruchu semenotvorného a vývodného systému. K sekundárním změnám může dojít při nadměrné době strávené v ocasu nadvarlete. Sekundární změny způsobují změny na bičíku, které vznikají nedokončením procesu zrání. Může k nim dojít také při nesprávném odběru a zpracování. Jako další změny lze uvést roztrhnutí akrosomu, hlavičky a bobtnání (Věžník et al. 2004).

3.5.2.3 Vady na hlavičce

Patří mezi nejčastější poruchy vyskytující se při spermiogenezi. Defekt se dělí na poruchy samotné hlavičky nebo na akrosomu. Poruch hlavičky nesmí být v inseminační dávce více než 5 % a poruch akrosomu více než 10 %. Někdy dochází k odchylkám tvaru či velikosti hlavičky. Mezi tyto odchylky patří gigantická hlava, zúžená hlava, vícero hlaviček na jedné spermii, malá hlavička, hruškovitý tvar a další (Kliment et al. 1989).

3.5.2.4 Vady na akrosomu

Jedna z nejčastějších vad je nabobtnání akrosomu, ke kterému dochází při manipulaci, pokud se do sběrače umělé vagíny dostane voda. Dále lze zmínit kondenzace akrosomu na předním okraji hlavičky či granulace akrosomu (Gamčík a Kozumplík, 1984).

3.5.2.5 Vady na bičíku spermie

Vady se dělí podle jejich lokalizace na bičíku. Odchylky se mohou týkat uložení, ale délky, počtu či kvality. Například krátký bičík, zdvojený, zlomený, ohnutý, stočený či oddělený od hlavičky spermie (Louda et al. 2001). Výše zmíněné defekty se projevují na mitochondriální pochvě. Jde o důsledek oslabení celé spojovací části a následné zlomení či odtržení bičíku. Všechny zmíněné abnormality jsou spojené s nepohyblivostí a tím sníženou schopností oplození. Vše zmíněné je ovlivněno i geneticky (Barth et al., 1989).

3.6 Průtoková cytometrie

Cytometr všeobecně je využíván pro počítání a měření fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých buněk v roztoku (McKinnon, 2018). Průtokový cytometr je speciální druh cytometru, který se od ostatních cytometrů liší tím, že přes něj prochází jednobuněčná suspenze v proudu tekutiny a lze určit její velikost a zrnitost (Adan et al., 2016). Skládá ze tří hlavních částí: fluidiky, optiky a elektroniky. Využívá lasery jako zdroj světla k produkci signálů fluorescenčního i rozptýleného světla, které jsou následně čteny detektory, mezi které patří fotodiody nebo fotonásobiče. Získané světelné signály jsou dále převedeny na elektrické signály a posléze analyzovány počítačem a v konečné fázi zapsány do datového souboru v daném formátu. Daná populace buněk je buď analyzována nebo purifikována s ohledem na jejich fluorescenční charakteristiku nebo charakteristiku rozptylu světla. Pro získání fluorescenčních charakteristik jsou využívány fluorescenční činidla. Ty obsahují jak fluorescenčně konjugované protilátky, barviva vázající nukleové kyseliny, barviva pro životaschopnost, iontová indikátorová barviva a fluorescenční expresní proteiny (McKinnon, 2018).

3.6.1 Princip fungování

Průtoková cytometrie je složena z několika hlavních parametrů – elektroniky, optiky, fluidiky a analýzy dat. Pojem fluidika označuje proudění buněk v proudu kapaliny (Givan, 2001). Průtokové cytometry zvládnou zachytit více měření na jedné buňce. Tato vlastnost je brána jako nejužitečnější a je tak upřednostněna před jinými přístroji.

Klasický průtokový cytometr je složen ze tří částí

1. Laserové světlo se snímacím systémem
2. Optika
3. Počítačový systém

Průtoková cytometrie funguje na principu snímání jednotlivé buňky v kapalném roztoku. Buňky jsou předem nabarveny jedním nebo více fluorochromy, které jsou označené markery. Paprsek laseru zachycuje jednotlivé buňky, pokud jsou obarvené tak absorbují fotony a vyzařují fluorescenci. Vyzařující světlo z buněk je zachyceno fotonásobiči. Elektrický impulz je následně přepsán na záznam v počítači pomocí digitálních dat (Dey, 2021).

Hlavním úkolem průtokového cytometru je zhodnotit, zda byly v roztoku přítomny buňky. Pokud ano, tak určit jejich počet. Dále určit druh vyskytujících se buněk a určit jejich vlastnosti. Její měření je zapotřebí zejména v biologii, pro zkoumání kvalitativní a kvantitativní za použití ředidel (Givan, 2001).

Průtokový cytometr má hojné využití i v reprodukční biologii. Její využití je primárně k hodnocení spermií všech druhů včetně člověka. Lze jejím použitím zjistit jadernou morfologii, mitochondrie, uspořádání chromatinu a schopnost spermií přežít. Přesné zhodnocení DNA je schopné určit podíl spermií s X a Y chromozomem a následně určit pohlaví (Spanò & Evenson, 1993).

3.7 CASA

CASA neboli computer assisted semen analysis je počítačová metoda, určující koncentraci spermií v ejakulátu. Metoda je známá od 80. let minulého století, postupně se osvědčila a v dnešní době se rutinně využívá (Lu et al., 2014). Od začátku používání prošla mnoha inovacemi a neustále se zdokonalovala. Největší změny probíhaly na softwaru a hardwaru, tím dosahuje vysoké úrovně kvality a kontroly (Horst, 2020). CASA je schopna analyzovat velké soubory dat.
Princip je založen na videokameře, která digitálně zpracovává a analyzuje výsledky, které jsou vyhodnoceny pomocí počítače. To že jsou údaje zachycené kamerou převedeny do digitální formy pomocí snímků je bezpochyby její velká výhoda.
Přístroj CASA dokáže rozpoznat spermie pokud jsou na tmavém poli nebo pokud je použit vysoký fázový kontrast. Tím pádem jsou hlavičky spermií dobře rozeznatelné na černém pozadí. Jádro hlavičky nebo nejjasnější bod je jedním z údajů pro určení trajektorie spermie. Počítač hledá souvislé body v dané oblasti, po jejich zachycení lze určit trajektorii spermie (Akashi et al., 2005). Kritéria pohybu spermie jsou základní tři veličiny mezi které patří rychlosti pohybu, tří hodnot poměru rychlosti a tří odrážejících charakteristik kývání pohybu. Zmíněné rychlosti pohybu jsou křivočará rychlost (VCL), přímočará rychlost (VSL) a průměrná rychlost určité vzdálenosti (VAP) (“WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” 2010).
Jak dříve tak i dnes obsluha CASA vyžaduje odborné znalosti, aby byla zachována funkce. I přes snahy největší automatizace fungování CASA, je zapotřebí zásah zkušeného člověka při chybném zachycení nebo pokud se ztratí spermie z analyzovaného místa (Amann & Katz, 2004). Ruční hodnocení morfologie není ideální z důvodu, že je subjektivní a vliv hraje i rozmanitost využívané techniky. Možné diagnostické chyby a odchylky mohou mít za následek špatnou interpretaci výsledků a tím mít vliv na následné uchopení problematiky a její řešení.

Z toho důvodu vývoj automatizovaného softwaru má znatelné výhody. Nabízí přesná a rychlejší morfologická data. Analýza morfologie a morfometrie je komplikovaný proces, ale díky technologickým inovacím je dnes CASA schopna určit morfometrické veličiny, přesně a objektivně zhodnotit tvar spermií (Horst et al., 2018).

Pro správné fungování je důležité myslet na několik faktorů, které ho ovlivňují. Důležité je zmínit hlavně přípravu vzorku, koncentraci spermií, počet snímků a jako poslední hloubku počítací komory. Objektivní a přesné výsledky jsou získány, pokud se dodrží daný postup. Během velmi krátké doby v rámci několika vteřin dokážou počítače analyzovat stovky spermií. Zaměřují se na jejich motilitu, koncentraci, morfometrii a kinematiku. Touto analýzou ovlivňují konečný počet a kvalitu inseminačních dávek.
Pro správnou analýzu je zásadní správná příprava vzorku, proto se na ni více zaměříme. Vzorky by měly být stejně jako u ostatních analýz řádně odebrány a následné připraveny. Pro správnou funkci je důležitá koncentrace, která se ovlivňuje ředěním. Pokud by koncentrace byla vyšší než CASA požaduje, je nutné vzorek odstředit a naředit semennou plazmou (Lu et al., 2014).
Sperma požaduje stálou teplotu 37 °C, proto CASA udržuje stálou teplotu.
Beraní sperma je obecně vysoce koncentrované ($> 3 \times 10^9$ / ml). Při vysoké koncentraci se spermie překrývají a narážejí do sebe a tím dochází k chybám při měření. Pro snížení koncentrace se používají také vhodná ředidla.

3.8 Metabolismus spermií

Spermie jsou složeny z nukleových kyselin, enzymů, tuků a bílkovin. Fosfolipidy jsou hlavní složkou mitochondriálního pouzdra nacházejícího se na bičíku. Spermie nemají možnost dělení, všechny složky nutné pro metabolismus a fungování jsou vytvořeny během spermatogeneze (Garner a Hafez, 2000).
Energii potřebnou pro správnou funkci získávají díky přítomným enzymům Krebsova cyklu, anaerobní glykolýzy, β-oxidace mastných kyselin a dýchacího řetězce, které jsou schopné rozkladu složitých látek na látky jednodušší (Varner a Johnson, 2011). Spermie jsou schopné přežít v anaerobním i aerobním prostředí (Garner a Hafez, 2000).
Energii získávají využitím exogenních i endogenních látek. Přesto převládá zisk energie rozkladem exogenních látek, především jednoduchých cukrů jako je glukóza a fruktóza. Právě díky tomu je glukóza považována za hlavní zdroj energie pro spermie (Varner a Johnson, 2011).
Jako endogenní zdroje lze dále zařadit glycerol, kyselinu mléčnou, mastné kyseliny a aminokyseliny. Naopak mezi endogenní patří fosfolipidy.
Během anaerobní glykolýzy je glukóza či fruktóza přeměněna na pyruvát, který je dále zpracován v Krebsově cyklu a jeho vzniklé produkty vstupují do dýchacího řetězce. Aerobní procesy probíhající v mitochondriích ve spojovací části bičíku. Energie získaná tímto způsobem se ukládá v podobě ATP (adenosintrifosfát) (Garner a Hafez, 2000). Pro spermie je energeticky výhodný aerobní způsob získávání energie, kdy je výsledné množství několikanásobně vyšší oproti anaerobní glykolýze (Varner a Johnson, 2011).

3.9 Motilita spermií

Motilita neboli pohyblivost spermií je jedna z nejdůležitějších vlastností, která je důležitá pro správné oplodnění vajíčka (Van de Hoek et al., 2004). Právě kvůli důležitosti kvalitního pohybu spermie je má diplomová práce zaměřena právě na motilitu. Její hodnota se vyjadřuje v procentech a do tohoto údaje se zahrnují pouze spermie se správným tzv. progresivním pohybem dopředu.

Typy pohybu spermie

-progresivní – přímočarý pohyb v kruzích
-neprogresivní – pohyb spermií je zřejmý, ale nepohybují se přímočaře a pouze v malých kruzích
-celkový – celkové procento spermií s progresivním i neprogresivním pohybem

Pohyb spermie zajišťuje koncová část bičíku, která neobsahuje mitochondrie. Mikrotubuly, které bičík obsahuje se navzájem posouvají a tím vytvářejí pohyb. Ke svému pohybu spermie potřebují energii, která je uložená v ATP (adenosintrifosfát). Zmíněnou energii získává spermie aerobně mitochondriemi ve spojovací části bičíku a nebo anaerobní glykolýzou v distální části bičíku (Gadella, 2014).
Konečný pohyb má za následek kombinace interakce mikrotubulů, ATP a dyneinem. Dynein je protein, jehož úkolem je hydrolýza ATP na ADP (adenosindisfosfát) a Pi (inorganic phosphate). Aktivita miktrotubulů má za následek vlnivý pohyb (Garner a Hafez, 2000).
Pohyb spermie ovlivňují extracelulární ionty. Pozitivní vliv na pohyb mají PO^{4-} a $Na^{2}CO3^{2-.}$ Lze také zmínit nízké koncentrace K a Mg. Opačný tedy inhibující účinek mají H, Mn, Ca a velké množství Mg.
Faktory ovlivňující hyperaktivaci

1. Regulace motily v rezervoáru spemií
2. Aktivace motility při ejakulaci
3. Hyperaktivace při kapacitaci ve vejcovodu

(Varner a Johnson (2011)
Potlačení motility v nadvarleti je pravděpodobně dáno kyselým pH. Dalším důvodem je, že ocas nadvarlete, který slouží jako jejich rezervoár, neobsahuje bikarbonát, který funguje jako jeden z hlavních aktivátorů motility.
Následně spermie prochází druhým kritickým bodem a to je ejakulace. Během ejakulace se spermie mísí s výměškem přídatných pohlavních žláz tvz. semennou plazmou. Jelikož obsahuje vysoké koncentrace hydrogenuhličitanu má pozitivní vliv na aktivaci pohybu. Pro proniknutí spermie do vejcovodu je aktivace motility nutná.
Proces aktivace spermie je náročný a probíhá pomocí signálních drah. Výše zmíněný hydrogenuhličitan patří společně s vápenatými ionty Ca^{2+} a cAMP (cyklický adenosin monofosfát) mezi hlavní signální sloučeniny. Tvorbu cAMP podmiňuje sAC (rozpustná adenylcykláza), která se nachází v bičíku. Hydrogenuhličitan a vápenaté ionty Ca se přímo podílí na její stimulaci. Zvýšení intracelulárního pH zapříčiní vstup hydrogenuhličitanu do cytoplazmy spermií a dochází k regulaci cAMP. Hodnota pH je ovlivněna Na a K –

ATPázovou aktivitou, výměnou kationtů Na a K přes membránu. Díky aktivitě Na a K – ATPáz vzniká sodíkový gradient, potřebný pro průchod iontů přes membránu. Výměna iontů přes membránu je nepostradatelná pro aktivaci pohybu spermie. Ionty Na jdou pomocí spřažených přenašečů do buňky a H^+ ionty do extracelulárního prostoru. Významnou úlohu sehrávají Ca^+ ionty otevřením transmembránových kanálů a regulací hodnoty pH.
Celého procesu se zúčastňují i PKA neboli proteinkinázy závislé na cAMP. Fosforylací PKA dochází k fosforylaci proteinů v bičíku důležitých pro pohyb.
Dynein nacházející se v bičíku je regulován vápenatými ionty. Zásadní je přítomnost proteinu kalmodulinu, který díky schopnosti na sebe vázat vápník přímo ovlivňuje funkci dyneinu a tím i pohyb bičíku (Varner a Johnson, 2011).

3.9.1 Hodnocení motility

Motilita je považována jako jeden z důležitých parametrů pro oplozovací schopnost spermie a z toho důvodu je její hodnocení důležité pro volbu vhodného spermatu pro inseminační dávky. Určení mass motility se provádí pod mikroskopem, kdy se hodnotí na škále od 0 do 5. Určuje se vstupní motilita nativního ejakulátu po přinesení do laboratoře. Všechny použité pomůcky musejí mít teplotu 37 °C, aby nedošlo k teplotnímu šoku a následnému znehodnocení semene. Kapka nativního ejakulátu 5 – 7 mikrolitrů se pomocí pipety aplikuje na vyhřáté podložní sklíčko s přiblížením. Hodnotící určí subjektivně motilitu dle škály.

Dle Goshme et al. (2021) vypadá hodnotící škála následovně
1. Velmi špatná: málo aktivní se slabým pohybem (cca 10 % aktivních spermií)
2. Špatná: málo aktivní (20–40 % aktivních spermií)
3. Slušná: pomalý pohyb (40–70 % aktivních spermií)
4. Dobrá: spermie vykazují hustý energetický pohyb (75–90 % aktivních spermií)
5. Velmi dobrá: hustý, zakalený a rychlý pohyb (>90 % aktivních spermií)

David et al. (2015) uvádí, že výřivý pohyb je úzce spjat se schopností oplození spermií samce. Ve své studii se specializoval na souvislost mezi vlnovým pohybem (mass motilitou) a fertilitou samce. Výzkum byl proveden na 711 562 ovcích různého plemene, které byly uměle nainseminovány. Inseminace byla provedena pěti různými inseminačními centry. Potvrdilo se, že úspěšnost fertilizace je ovlivněna věkem samce a vířivým pohybem spermií. Nicméně se potvrdila subjektivita hodnocení vířivého pohybu různými centry, kterou by bylo dobré eliminovat a zvolit počítačovou alternativu.
Subjektivní hodnocení vířivého pohybu je vhodná a levná forma, která frekventovaně využívána, ale přesto její subjektivita ji mírně znehodnocuje. Mikroskopický odhad vířivého pohybu provádí vždy jeden člověk, proto je riziko nepřesnosti a nemožnosti opakování.
Aby docházelo k přesnému hodnocení motility in vitro je nutné chápat faktory, které mají vliv na motilitu. Jedním z faktorů je i vliv morfologické odlišnosti napříč druhy a tím vliv na pohyb bičíku a celkově spermie. Další faktor je proces zrání, kapacitace a hyperaktivace, které mají vliv na funkci bičíku. Důležité je prostředí ve kterém se spermie nachází během cesty k oplodnění. Zejména je důležité pH, osmolarita a viskozita (Van de Hoek et al., 2004)

3.9.2 Ovlivnění motility

Ovlivnění motility spermie má vícero faktorů, které mají odlišný původ. Lze je rozdělit na faktory exogenní neboli vnější nebo naopak endogenní. Další rozdělení je na fyziologické a patologické. Ke znehodnocení ejakulátu dochází i při nesprávném postupu odběru semene, nevhodnou manipulací a zpracováním. Proto je důležité postupovat podle daných postupů, věnovat tomu patřičnou důležitost a možným chybám se vyhnout. Při snížené motilitě či úplné absenci pohybu lze mít na paměti faktory a brát je v potaz při hledání příčiny (Hodder a Liu, 2011).
Věk, roční období a kvalita zrání spermií patří mezi exogenní faktory, naopak manipulace, ředění a odběr spermatu řadíme mezi endogenní. U ředidel a kryokonzervačních medií je důležité jejich pH, osmolarita, teplota nebo toxické látky v nich obsažené. Vliv na spermie při odběru může mít zvolený lubrikant. Projeví se i vliv hormonální léčby, pokud je u samce aplikována (Hodder a Liu, 2011). K největšímu poškození dochází při mražení a rychlé změně teplot (Graham, 2011). U dlouhodobé konzervace se může motilita měnit v závislosti časového intervalu mezi rozmražením a hodnocením (Colenbrander a Stout, 2011)
Věk sehrává významnou roli, kdy peripubertální samci mají oproti pohlavně dospělým samcům motilitu sníženou. Pravidelnost odebírání ejakulátu sehrává také velký vliv na kvalitu. Po delší pauze dochází k nárůstu motility a snížení pohyblivosti, oproti ejakulátu u samců odebíraných pravidelně. Dochází k tomu v důsledku delší doby strávené v ocasu nadvarlete (Hodder a Liu, 2011).
Zdravotní problémy jako zánět šourku nebo varlat jsou označovány jako patologické faktory. V důsledku zánětů stoupá tělesná teplota a tím je ovlivněna spermatogeneze.
Pokud není sperma hodnoceno počítačově, lze zmínit subjektivitu lidské práce a tím odlišné hodnocení motility u stejného samce (Graham, 2011).

3.10 Zpracování a uchování ejakulátu

Proces, který vede k výrobě konečné inseminační dávky je dlouhý a náročný. Vede od zisku semene, přeš ředění, uchování až k inseminaci. Právě kvůli nutnosti provedení mnoha kroků, je zde velké riziko znehodnocení ejakulátu (Gamčík & Kozumplík 1992). Snažíme se o co největší využití spermatu a uchování oplozovací schopnosti po co nejdelší dobu (Šmerha 1980).
Nejzásadnější bod při procesu umělé inseminace je uchování spermatu buď v kapalné nebo mražené formě (Allai et al., 2018).
Uchování lze rozdělit na krátkodobé a dlouhodobé.

3.10.1 Dlouhodobé

Jak z názvu vyplývá, jedná se o uchování spermatu po delší dobu. Dochází k tomu díky mražení ejakulátu a tím zpomalení jeho metabolismu (Fiser et l., 1986). Aby došlo k co nejmenšímu poškození, využívají se kryoprotektiva obsažená v ředidlech. Kryokonzervace způsobuje letální a subletální poškození spermií (Pini 2018).

Pini et al (2018) se zaměřoval na změnu proteinů u berana během kryokonzervace při přidání vaječného žloutku do ředidla. Pokud byl do ředidla přidán žloutek poskytl spermiím 15 proteinů.
Ředidla se využívají komerční. Po naředění se ID plní do pejet, které se označí a následně ekvilibrují 1,5 – 2 hodiny při teplotě 5 °C. Po ekvilibraci se pejety mrazí v horizontální poloze nad tekutým dusíkem ve výšce 3 – 4 cm. Po 8 minutách jsou pejety zmraženy a uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem. Hojně se využívá od 50. let 20. století a stále se pracuje na jeho zdokonalování. Po mrazení si spermie zachovávají schopnost oplození po dlouhou dobu. Přesto je tento proces pro spermie náročný a v mnoha krocích může dojít ke zhoršení jejich kvality. Z tohoto důvodu se zamrazuje pouze vysoce kvalitní sperma, jelikož se počítá s možnou nižší kvalitou po rozmražení. I díky tomu vykazují mražené spermie horší kvalitu než pouze ředěné a nebo nativní sperma. Proto je má diplomová práce zaměřena na ředění a krátkodobé uchování, aby bylo dosáhnuto lepších výsledků.
Gordon (2004) ve své studii uvádí, že přestože je aktivita spermií po rozmražení uspokojivá naopak oplozovací schopnost je velmi špatná. Proces kryokonzervace snižuje životaschopnost až o 50 %. Negativní vliv mražení na kvalitu spermií je ovlivněn postupem kryokonzervace. Dle Yánez-Ortis et al. (2022) je kryokonzervace zásadní metoda pro zkvalitnění chovu a nepostradatelná metoda při vývoji asistované reprodukce.

3.10.2 Krátkodobé

Uchování spermatu v tekutém nemraženém stavu je v porovnání s kryokonzervací spermií méně náročné. Spermie nemusí projít tolika riziky jako je chladový šok, mechanické síly a vysoké ředění.
V letech 1930 až 1992 byly prováděny výzkumy uchování semene v tekutém stavu při různých teplotách. Varianty byly 0-5 °C, 10-15 °C a poslední byla pokojová teplota. Jako ředidla sloužily syntetizované pufry společně s cukry, vaječným žloutkem, různé druhy mléka a glycinem. Z těchto výzkumu byl proveden souhrn a bylo zjištěno, že s narůstajícím časovým intervalem je kvalita semene postupně snižována bez ohledu na teplotu, médium či koncentraci ředění. Hlavní změna je snížení motility spermií a tím snižující se schopnost projít ženským reprodukčním ústrojím.
Z výzkumů vyplývá, že docházelo ke snížení plodnosti, pokud bylo sperma uchováno po dobu delší než 24 hodin a následně použito pro cervikální metodu inseminace, naopak pokud byla zvolena varianta intrauterinní inseminace byla úspěšná i po 10 dnech uskladnění spermií (Maxwell, Salamon 1993).

3.11 Ředění

Naředěním semene před inseminací nebo mražením zajišťuje vhodné podmínky pro zachování životnosti spermií. Zároveň se navyšuje objem a tím dosáhne vytvoření většího počtu inseminačních dávek. (Mocé et al., 2020). Svým složením zajišťují energetickou zásobu pro spermie. Pro ředění spermatu beranů se používají tři skupiny ředidel extendory, protektory a implentory. Extendory se využívají k navýšení objemu pokud není další postup

mražení a sperma zůstane v čerstém stavu. Protektory taktéž navyšují objem a zároveň dlouhodobě zajišťují zdroj energie a vhodné prostředí. Implentory mají stejné využití jako protektory a obsahujícími látky navíc působí pozitivně na pohlavní ústrojí samice a tím přispívají k oplození (Stádník & Doležalová 2015).

3.11.1 Ředidla

Důvod jejich hojného využívání má dvě hlavní příčiny. První z nich je zajistit spermiím optimální prostředí pro mražení či udržení kvalit, po co nejdelší dobu i pokud není následně sperma zamraženo (Maksimovic et al., 2018). Druhým důvod je, že naředěním zároveň dochází k navýšení objemu a tím možnosti výroby většího počtu inseminačních dávek. Tento důvod souvisí i s ekonomikou trhu a využití kvalitního samce pro více samic. Složení všech ředidel je založeno na několika bázích. Obsah ředidel se navzájem liší, ale některé prvky mají společné. Komerčně prodávaná bi – destilovaná voda je součástí každého ředidla. Ostatní složky jako pufry, sacharidy, kryoprotektiva, antibiotika, aminokyseliny a v neposlední řadě mastní kyseliny jsou v ní rozpuštěny. Každá z výše zmíněných složek má svou úlohu. Pufry slouží jako stabilizátor pH, jelikož produktem dýchání spermie je kyselina mléčná, a tím se okyseluje prostředí. Kyselé prostředí spermií škodí a zpomaluje jejich metabolismus až dojde k anabióze a úmrtí (Mutalík et al., 2014). Pro zdroj energie je nutná přítomnost jednoduchých cukrů, například glukózy a fruktózy (Parkinson, 2009). Pro udržení sterility ejakulátu, jsou do ředidel přidávána antibiotika. Využívána jsou antibiotika typu penicilin nebo streptomycin (Curry, 2007). Pokud se používá mléko je možné využít jakoukoliv variantu od odstředěného přes odtučněné i UHT (Salamon & Maxwell 2000). Z toho vyplývá, že složení ředidla hraje velkou roli v kvalitě spermií. Dobré ředidlo musí mít správný osmotický tlak, podobný jako semenná plazma. Dalším úkolem je chránit spermie před chladovým šokem, mražením a rozmrazováním (Edmondson et al., 2012).
Součástí jsou živiny nutné pro metabolismus spermií. Vhodnost ředidla se stanovuje na základě požadované délky uchování spermií.

3.11.2 Optimalizace používaných ředidel

Neustálou úpravou ředidel dochází k jejich zlepšení a delšímu uchování živých spermií.
Z toho důvodu jsou do ředidel stále přidávány nové složky (Allai et al., 2018). Přesto v dnešní době není ředidlo, které by uchovalo stoprocentní životaschopnost spermií.

3.11.2.1 Antioxidanty

Enzymatické antioxidanty slouží jako protektor před reaktivní formou kyslíku a zachovávají fyziologickou spermatickou funkci (Baumber et al., 2000).
Dle Yánez-Ortiz et al. (2022) ve valné většině studií mělo zařazení jak neenzymatických tak enzymatických antioxidantů pozitivní vliv na spermie.
Caifeng Wu et al. (2021) se ve své studie zaměřoval na souvislost rychlosti mražení a přidání antioxidantů do ředidla při kryokonzervaci. Přidaným antioxidantem byl procyanidin a mitochinon. Při přidání 150 nM mitochinonu a rozmrazení při 70 °C se zlepšila pohyblivost, integrita membrány i akrosomu. Při přidání procyanidinu došlo ke zlepšení pouze

pohyblivosti a integrity membrány. Pokud byla přidána jejich kombinace navýšila se koncentrace superoxiddismutázy a glutathionperoxidázy, zároveň klesla hladina reaktivních forem kyslíku.

3.11.2.2 Vitamíny

Vitamíny patří mezi hlavní složky ředidel a jsou potřebné, aby došlo ke správnému uchování spermatu. Mezi nejpoužívanější lze zařadit alfa-tokoferol, vitamín E, trolox, kyselinu askorbovou a vitamín B12. Kyselina askorbová neboli vitamin C chrání spermie před oxidativním stresem a zachovává integritu membrány (Allai et al., 2018).
Během kryokonzervace může dochází k narušení membrány spermií, pokud se do ředícího média přidá vitamín E dojde ke snížení poškození spermií. Espina-Ávila et al. (2021) se ve svém výzkumu věnoval přidání vitamínu E do ředidla. Byly provedeny dva experimenty, přičemž v prvním bylo použito 32 ejakulátů. Ejakuláty byly rozděleny na dvě skupiny, první skupina byla konzervována s Triladylem a vitamínem E, druhá skupina pouze s Traladylem bez vitamínu E. Obě skupiny byly uchovány při teplotě 24 °C na 24 hodin. Druhý experiment měl stejný postup, rozdíl byl v sobě uskladnění, které bylo 48 hodin. Životaschopnost spermií byla měřena vždy před ředění a po uskladnění. Z výsledků vyplynulo, že v druhém experimentu přidání vitamínu E znatelně zlepšilo životaschopnost spermií.

3.11.2.3Aminokyseliny

Slouží taktéž jako antioxidanty v semenné plazmě. Hlavními aminokyselinami přidávanými do ředidel jsou taurin, hystidin, glycin, cystein a glutamin. Jejich přidání do ředidla je prospěšné díky jejich pozitivnímu vlivu na pohyb, celistvost membrány a životaschopnost spermií. Po jejich přidání dochází ke snížení fragmenatce DNA. Zmíněný cystein poskytuje spermiím ochranu před metabolity kyslíku při peroxidací lipidů, které jsou toxické (Bucak et al. 2008).

3.11.2.4 Cukry

Jednoduché cukry v ředidle slouží jako zdroj energie během zpracování (Fukuhara & Nishikawa 1973). Běžně používané monosacharidy jsou glukóza, galaktóza a fruktóza.
Z disacharidů se běžně využívá sacharóza a trehalóza. Dalším úkolem je zachování osmotické rovnováhy (Aboagla & Terada 2004).

3.11.2.5 Kryoprotektiva

Přidáním kryokoprotektiv, které pronikají do buňky dochází ke snížení tvorby ledu během kryokonzervace. Díky tomu dochází k eliminaci poškození spermie. Jejich nevýhodou je toxicita při přidání vyšší koncentrace (Best, 2015). Dle Besta (2015) je toxicita největším problémem a brání kryokonzervaci například i orgánů.

3.11.2.5.1 Glycerol

Je považován za hlavní kryoprotektor. Jsou dvě možnosti přidání glycerolu, buď jako samostatná složka nebo už jako součást daného ředidla (Salamon & Maxwell 2000). Přidání glycerolu je možné před ekvilibrací a nebo přidání až po ekvilibraci těsně před mražením (Savvulidi et al., 2023) I přes jeho hojné využívání má negativní účinku v podobě neplodnosti a důvod jeho negativního vlivu na spermie není znám (Hsiu-Lien Herbie Lin et at., 2023).

3.11.2.5.2 Vaječný žloutek

Poskytuje spermiím ochranu před chladovým šokem, udržuje membránu spermií a jejich pohyblivost. I přes svá pozitiva nese rizika kontaminace. Kvalitní náhradou za čerstvý žloutek je prášková forma, kdy žloutek prochází procesem pasterizace a je zbaven případných bakterií (Allai et al., 2018).
Optixcell je komerčně dostupné ředidlo, které je bezbílkovinné a jeho složení odpovídá vaječnému žloutku (Ansari et al., 2016). Kvůli již zmíněné možné kontaminaci ejakulátu vaječným žloutkem, je OptixCell vhodnou náhradou, jelikož nedojde k možnému šíření chorob. Byl použit i v našem výzkumu.

3.11.2.6 Mléko

Při experimentu pro účel mé diplomové práce bylo jako ředidlo použito UHT 3,5% mléko. Mléko je díky svému složení vhodné pro zachování životaschopnosti spermií. Mléko se využívá při krátkodobém uchování nebo okamžitém použití semene (Salamon & Maxwell 1995). Pokud se mléko využívá pro kryokonzervaci je to v kombinaci s vaječným žloutkem, fruktózou a arabinózou (Salamon & Maxwell 2000).

3.11.2.7 Semenná plazma

Během ředění spermatu při jeho zpracování na inseminační dávky dochází ke snížení procentuálního zastoupení semenné plazmy. Vícero studií udává, že po snížení koncentrace semenné plazmy má za následek destabilizaci membrány a tím snížení životaschopnosti spermií. V důsledku snahy vytvořit, co nejvíce inseminačních dávek, dochází k mnohonásobnému ředění a tím snižování semenné plazmy. Tomu lze zabránit následným přidání semenné plazmy během manipulace. Dlouhodobá interakce spermií a semenné plazmy vytváří nefyziologické prostředí. Během přirozeného procesu oplodnění jsou spermie od semenné plazmy po krátké době odděleny. Dlouhodobý vliv semenné plazmy je pro spermie nepříznivý (Höfner et al., 2020).
Höfner et al. (2020) se ve svém výzkumu zaměřovaly na funkci semenné plazmy během skladování semene v tekutém stavu. Do výzkumu byly zahrnuty čtyři druhy zvířat a jedním z nich byl beran, dále kanec, býk a hřebec. Byl kladen důraz na teplotu a dobu inkubace semenné plazmy a spermií. Bylo potvrzeno, že dlouhodobá expozice má negativní vliv na celistvost membrány.

3.12 Umělá inseminace ovcí

Umělá inseminace patří mezi metodami asistované reprodukce mezi nejpoužívanější a nejstarší. Hojně se využívá v živočišné výrobě, zejména u hospodářských zvířat (Nuti 2007). Tento pojem označuje zavedení inseminačních dávek spermatu do pohlavního ústrojí samice (Barbas & Mascarenhas, 2009).
Původní použití bylo z důvodu hygienického, aby nedocházelo k šíření pohlavních chorob. Mezi další výhody, díky kterým se umělá inseminace využívá je navýšení objemu spermatu a využití spermatu kvalitního samce u více samic. Využívá se sperma samce s vhodnými vlastnostmi a tím se šíří vhodné geny do budoucí populace (Parkinson, 2009). Jednoduché provedení, nízké náklady a vysoká úspěšnost zvyšují její oblibu. Kvůli využití jednoho berana pro více samic, není zapotřebí chov několika samců a nedochází k nechtěné příbuzenské plemenitbě (Nuti, 2007). Odběr spermatu je možný i po úhynu samce a tím dává možnost ohroženým druhům k reprodukci. Neustálé zlepšování konzervace a uchování motility po delší dobu, dává možnost transport spermatu na velké vzdálenosti.
K oplození je vhodné sperma čerstvě odebrané, mražené ale i chlazené (Chemineau et al., 1996)

3.12.1 Metody inseminace

Inseminace ovcí je kvůli anatomii děložního čípku náročnější než u ostatních hospodářských zvířat (Fukui & Roberts, 1976). Přes čípek je těžké projít kvůli jeho klikatosti. Délka cervikálního kanálu je 7 centimetrů a stavba je uspořádána do prstenců. Prstence mají ochranou funkci proti vnějším infekcím, ale ztěžují průchod spermatu. Tímto faktorem je ovlivněna úspěšnost zabřeznutí po umělé inseminaci (Kershaw et al., 2005). Sperma se uloží buď do děložního krčku cervikální metodou nebo do dělohy přes děložní stěnu intrauterinní laparoskopickou nebo transcervikální metodou (Casali et al., 2017). Studie poukazují na fakt, že čím hlouběji se inseminační dávka aplikuje, tím se zvyšuje pravděpodobnost zabřeznutí samice. Na inseminaci ovcí se nejčastěji využívá intravaginální, intracervikální a intrauterinní metoda. Intrauterinní metoda se dále dělí podle způsobu provedení na laparoskopickou a transcervikální (Fair et al., 2007). Pokud se používá čerstvé sperma volí se intravaginální a intracervikální způsob. U mraženého spermatu intrauterinní (Parkinson, 2009).

3.12.1.1 Intravaginální metoda

K provedení je potřeba pipeta, která se zavádí bez použití poševních zrcadel. Inseminační dávka se zavádí na horní klenbu poševní, bez potřeby lokalizace děložního hrdla (Faigl et al., 2012). Aby nedošlo k zavedení do močové trubice je pipeta na svém konci mírně zahnuta směrem ke kosti křížové. Před nasátím inseminační dávky se do pipety nasaje trochu vzduchu a poté sperma (Youngquist & Threfall 2007).
Výhoda metody je rychlost provedení a nenáročnost. Intravaginální inseminaci lze provést bez potřeby přístrojů a speciálních prostor. Vysoká spotřeba spermatu na jednu inseminaci patří k jejím nevýhodám. Využívá se pouze čerstvé nebo chlazené sperma, mražené sperma není vhodné kvůli krátkodobé přežitelnosti v pochvě (Evans, 1988).

Objem inseminační dávky by měl být 0,3 až 0,5 ml a splňovat koncentraci 400 x 10^6 spermií. Míra úspěšnosti je 20 – 60 % (Macías et al., 2020).

3.12.1.2 Intracervikální metoda

Nejvíce využívaná metoda při inseminaci malých přežvýkavců. Narozdíl od intravaginální metody jsou zapotřebí poševní zrcadla se světlem, které se zasouvají do pohlavního ústrojí. Pipetou je sperma zavedeno na rozdíl od první metody do děložního hrdla (Faigl et al., 2012). Metodu je vhodné použít při všech možnostech uchování spermatu, přesto má metoda nejlepší výsledky při použití čerstvého nebo chlazeného spermatu. Inseminace mraženým a rozmraženým spermatem nevykazuje dostatečnou účinnost.
Požadované koncentrace se liší v závislosti na typu inseminační dávky. Čerstvý ejakulát by měl mít koncentraci 1×10^9 spermií. U chlazeného spermatu je zapotřebí 1,5 x vyšší koncentrace než u čerstvého ejakulátu. Nejvyšší koncentrace, 200 x 10^6 spermií, je zapotřebí při rozmraženém spermatu. Metoda vykazuje vyšší procento úspěšných zabřeznutí než předchozí metoda dvojnásobně, tedy 40 – 80 % (Fair et at., 2007).

3.12.1.3 Intrauterinní metoda

Tato metoda spočívá v zavedení spermatu přímo do dělohy. Objem spermatu zůstává stejný jako u předchozích metod, ale není zapotřebí vysoké koncentrace (Edmondson et al., 2012). Semeno je vpravováno do děložního krčku a podle způsobu provedení lze tuto metodu rozdělit na laparoskopickou a transcervikální.

3.12.1.3.1 Intrauterinní transcervikální metoda

Při této metodě musí být ovce fixována v poloze na zádech (Casali et al., 2017). Pro zavedení je využita inseminační pipeta, která se v této poloze snadněji zavádí do děložního čípku (Underwood et al., 2015). Kromě pipety se využívá i spekulum na pochvy a kleště, kterými se fixuje děložní čípek. Zavedení do dělohy je stejné jako u intracervikální nebo laparoskopické (Faigl et al., 2012).
Semeno se vpravuje pipetou přes klikatý krček na hranici krčku a dělohy, tento úkol vyžaduje odborné znalosti veterináře, aby nedošlo k poškození samice (Purdy et al., 2020). Inseminuje se zejména mraženým spermatem, který má zhoršenou schopnost procházet děložním krčkem a tím sníženou fertilní schopnost.
Objem je 0,1 – 0,5 ml a koncentrace je okolo 60–150 x 10^6 spermií. Procentuální úspěšnost oplození se výrazně neliší podle typu použitého spermatu. Čerstvé sperma má úspěšnost 40 – 70 %, u mraženého 30 – 70 % (Macías et al., 2020).
U této metody hrozí několik komplikací jako například poranění děložního čípku, zavedení infekce, abscesy (Perry et al., 2010).
Wulster-Radcliffe a kol. (2004) vynalezly nový přístroj pro transcervikální metodu inseminace, aby docházelo k co nejmenší míře poškození hrdla děložního. Zkoumal, zda má použití nového přístoje vliv na spermie, březost nebo počet mláďat. Bylo vybráno 20 bahnic, kdy 10 z nich bylo naiseminováno novým přístojem a zbylých10 klasickou laparoskopickou

metodou. Po 20 hodinách byly odebrány děložní rohy a vejcovody, které byly propláchnuty. V transportu spermií nebyly znatelné rozdíly (P>0,05).

3.12.1.3.2 Intrauterinní laparoskopická metoda

Stejně jako u transcervikální metody, musí být ovce před výkonem fixována na zádech. (Edmondson et al., 2012). Na rozdíl od ostatních zmíněných se provádí v celkové anestezii přes břišní stěnu. Do břišní stěny se dvěma vpichy zavede endoskop se sodnou. Sperma se zavádí do obou děložních rohů (Faigl et al., 2012).
Délka inseminace u jedné samice se pohybuje okolo 5 – 10 minut. Zkušený inseminátor je schopný nainseminovat desítky samic za jeden 250-300 (Cseh et al., 2012). Metoda obchází zavedení spermatu přes děložní čípek a tím se snižuje potřebné množství ejakulátu. Do každého rohu se inseminuje 0,05 – 0,10 ml o koncentraci 20–50 x 10^6 spermií. Díky potřebě nižší koncentrace spermií v semeni, je možné ejakulát více naředit a tím vzniká větší množství inseminačních dávek.
Inseminuje se všemi typy spermatu. Přestože tato metoda vykazuje nejlepší výsledky, je spojena s velkým počtem rizik jako infekce, poranění zvířete při výkonu, špatná reakce samice na anestezii (McCappin & Murray 2011). Nevýhodou je i finanční náročnost této metody a vysoké nároky na znalosti i praktické dovednosti. I přes ušetření na inseminačních dávkách se toto projeví a jejich cena opět vzrůstá. Mírně lepší výsledky jsou u čerstvého spermatu 40 – 70 %, u mraženého 30 – 70 % (Youngquist & Threfall 2007).

4 Metodika

Výzkum pro mou diplomovou práci probíhal od 24.10 do 28.3 během kterého bylo 10 výzkumných dní.

4.1 Berani

Ejakulát byl odebírán od samců plemena Valašské ovce. Samci odebíráni pro účel mé diplomové práce jsou ustájeni ve stájích České zemědělské univerzity v Praze. Při výzkumném dni byly použiti vždy minimálně dva ejakuláty od dvou různých beranů. Nejčetněji byl pro výzkum použit ejakulát beranů krevní linie Radhošť a Ondráš. Radhošť 9 odběrových dní a Ondráš stejně tak. Dvakrát byl do výzkumu z důvodu nedostatečného množství ejakulátu u výše zmíněných samců zařazen samec Soláň. Samec Beskyd byl do výzkumu ze stejného důvodu zařazen pouze jednou.
Berani jsou chováni v krytých dřevěných kotcích. Venkovní výběh mají nepřetržitě k dispozici, díky tomu mají neustálou možnost se pást a přístup k lučnímu senu. Granulové krmivo ENERGYS OVCE UNI od výrobce De Heus a.s., Bučovice je jim každodenně podáváno v dávkách 300-500 g. Složení krmiva je hrubý protein 16.20 %, hrubá vláknina 10.50 %, hrubý popel 8.70 %, hrubé oleje a tuky 2.90 %, vápník 1.50 %, fosfor 0.44 %, sodík 0.35 %, hořčík 0.20 %. Dostatek vody je zajištěn plastovými napáječkami, které mají trvale v kotcích. Zdravotní stav beranů je pravidelně kontrolován zvěrolékařem.

4.2 Odběr ejakulátu

Odběr spermatu byl prováděn metodou pomocí umělé vagíny. Postup odběru touto metodou je popsán výše v příslušné kapitole „Odběr spermatu“.
Před odběrem se v laboratoři připravily potřebné věci pro samotný odběr. To zahrnovalo přípravu vagíny (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo), teplou vodu do termosky, aby se udržela její teplota. Déle lubrikant, pipety, zkumavky na odebrané semeno, popřípadě líh k desinfekci. Aby vybavení udrželo stálou teplotu 38 °C bylo vše uloženo do polystyrenového boxu. Po úspěšném odběru jsou vzorky přepipetovány ze sběrače do předem označených zkumavek podle odebraného samce. Poté uložen do termoboxu a v co nejkratším čase doneseny do laboratoře.

4.3 Ředění vzorku a hodnocení vířivého pohybu

Před přinesením vzorků do laboratoře proběhla příprava věcí potřebných pro následnou manipulaci s ejakuláty. Ředidla byla nahřáta na teplotu 38 °C, byla zapnuta vodní lázeň a výhřevná deska, na které dochází k manipulaci se vzorky. Jako první byl u vzorků hodnocen vstupní vířivý pohyb neboli mass motilita. Jako mezní hranici mezi kvalitním a nekvalitním ejakulátem lze brát vířivý pohyb číslo 3. Ani jednou během všech testovacích dní nebyl vstupní vířivý pohyb nižší než 3, z tohoto důvodu byly vzorky vždy považovány za kvalitní a vhodné k výzkumu.

Vířivý pohyb byl měřen po aplikaci kapky vzorku na předem vyhřáté podložní sklíčko a poté pod světelným mikroskopem se zvětšením 100x zhodnocen.

Hodnocení vířivého pohybu:
Dle Goshme et al. (2021) vypadá hodnotící škála následovně
1. Velmi špatná: málo aktivní se slabým pohybem (cca 10 % aktivních spermií)
2. Špatná: málo aktivní (20–40 % aktivních spermií)
3. Slušná: pomalý pohyb (40–70 % aktivních spermií)
4. Dobrá: spermie vykazují hustý energetický pohyb (75–90 % aktivních spermií)
5. Velmi dobrá: hustý, zakalený a rychlý pohyb (>90 % aktivních spermií)

Poté byly oba vzorky naředěny s ředidly v poměru 1: 2 (vzorek : ředidlo). Celkem bylo použito 6 ředidel a jednou došlo k jejich kombinaci. Použitá ředidla byla INRA 96 (IMV Technologies, Francie), UHT mléko 3,5 % (Mlékárna Hlinsko, a.s., Česká republika), Phosphate Buffered Saline (Merck KGaA, Německo), Diluent K (glukóza 0,8g, citronan sodný 2,9 g, vaječný žloutek 20 ml, destilovaná voda 100ml) pouze při prvním měření, poté byl nahrazen komerčním ředidlem SLAD (Peking Beite, Čína) a nakonec Optixcell (IMV Technologies, Francie). Při posledním 10. měření došlo k namíchání ředidel SLAD a PBS v poměru 1:1. Zachována byla také varianta nenaředěného spermatu.
Ředidla byla označena čísly, kdy 1 byla INRA 96, 2 představovala UHT mléko 3,5 %, 3 značila Optixcell, jako číslo 4 byl označen PBS, 5 byl Diluent K a 6tkou byl označen SLAD. Nenaředěný ejakulát byl označen číslem 7 a kombinace SLAD + PBS byla označena 8. Následně byly zkumavky uloženy do vodní lázně a vířivý pohyb byl hodnocen každých 30 minut. Výjimkou bylo nativní sperma, které bylo hodnoceno po delších časových intervalech a to každých 60 minut. V době mezi měřením byly vzorky uloženy ve vodní lázni o teplotě 38 °C.
Sledoval se postupně snižující se vířivý pohyb dokud nespadl na číslo 0. Pokud byl vzorek vyhodnocen číslem 0, což znamená žádný pohyb spermií, byl vzorek po 30 minutách znovu zkontrolován a se stejným hodnocením 0 byl vyřazen z výzkumu.
Snaha byla kontrolovat vířivý pohyb po co nejdelší dobu, pokud vzorek vykazoval dobrou motilitu byl kontrolován i v rámci 5 – 6 hodin.

4.4 Statistická analýza dat

Získané hodnoty byly vloženy do programu Microsoft Office Excel 2019, ve kterém se vytvořily tabulky pro následné vyhodnocení pomocí SAS software (SAS/STAT® verze 9.3., 2011).

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

Závisle proměnná – vířivý pohyb
Nezávisle proměnné – den, ředidlo, samec

$VP_{ijkl} = \mu + DEN_i + ŘED_j + SAM_k + eijkl$

VP_{ijkl} = hodnota závisle proměnné
μ = průměrná hodnota závisle proměnné
DEN_i = i-ká varianta odběrového dne (i = odběrový den 1, n = 12; i = odběrový den 2, n = 12; i = odběrový den 3, n = 6; i = odběrový den 4, n = 12; i = odběrový den 5, n = 12; i = odběrový den 6, n = 12; i = odběrový den 7, n = 18; i = odběrový den 8, n = 18; i = odběrový den 9, n = 12; i = odběrový den 10, n = 21)
$ŘED_j$ = j-tá varianta použitého ředidla (j = varianta 1, n= 22; j = varianta 2, n = 22; j = varianta 3, n = 22; j = varianta 4, n = 22; j = varianta 5, n = 5; j = varianta 6, n =17;j = varianta 7, n = 22; j = varianta 8, n =3)
SAM_k = k-tá varianta odebraného samce (k = varianta 1, n = 55; k = varianta 2, n = 55; k = varianta 3, n = 19; k = varianta 4, n = 6)
eijkl = residuální chyba

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

Přestože všechny nezávisle proměnné ovlivňují výsledek závisle proměnné (vířivý pohyb), v interpretaci výsledků se zaměříme na vliv pouze ředidla.

5 Výsledky

V níže uvedených tabulkách jsou uvedeny hladiny významnosti mezi použitými ředidly v daných časových intervalech. Z toho nám vyplyne, zda je významný rozdíl v použitém ředidlu a má vliv na vířivý pohyb spermií. Tabulky jsou rozděleny podle časových intervalů od T0 do T12. T0 označuje měření ihned po naředění a dále každých 30 minut. Ředidla jsou značena od 1 do 8.
Přestože výběr berana a den odběru má na vířivý pohyb také vliv, zaměřily jsem se na vliv použitého ředidla, které je pro vířivý pohyb stěžejní.

Ředidlo 1 - INRA 96, 2 - mléko 3,5%, 3 – Optixcell, 4 – PBS, 5 – Diluent K, 6 – SLAD, 7 – nenaředěný ejakulát, 8 – SLAD + PBS

Tabulka č. 1 Výsledek vířivého pohybu v čase T0 (po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0,7572	0,2805	0,6430	0,9814	0,5442	0,6367	0,9519	1	4.273728 ± 0,12
2	0,7572		0.4402	0.4402	0.9255	0.3732	0.3546	0.9344	2	4.228274 ± 0,12
3	0,2805	0,4402		0.1241	0.6999	0.1106	0.0911	0.6609	3	4.114638 ± 0,12
4	0,6430	0,4402	0.1241		0.8426	0.8576	0.8772	0.7839	4	4.341910 ± 0,12
5	0,9814	0,9255	0.6999	0.8426		0.7909	0.7971	0.9833	5	4.264638 ± 0,12
6	0,5442	0,3732	0.1106	0.8576	0.7909		0.9706	0.7193	6	4.370520 ± 0,12
7	0,5367	0,3546	0.0911	0.8772	0.7971	0.9706		0.7298	7	4.364638 ± 0,12
8	0,9519	0,9344	0.6609	0.7839	0.9833	0.7193	0.7298		8	4.254507 ±0,30

Z tabulky lze zjisti, že v čase T0 není mezi ředidly významný rozdíl a v tomto časovém intervalu nelze říci, že by měl výběr ředidla vliv na motilitu.

Tabulka č. 2 Výsledek motility v čase T1 (po 30 minutách)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.8889	0.0134	0.7800	0.2198	0.6358	0.9659	0.1763	1	4.008281± 0,13
2	0.8889		0.0092	0.8889	0.2397	0.7298	0.9833	0.1571	2	4.031008± 0,13
3	0.0134	0.0092		0.0062	0.0324	0.0064	0.2360	0.8321	3	3.599190± 0,13
4	0.7800	0.8889	0.0062		0.2608	0.8281	0.9326	0.1395	4	4.053735± 0,13
5	0.2198	0.2397	0.0324	0.2608		0.3134	0.3389	0.0636	5	4.548053± 0,42
6	0.6358	0.7298	0.0064	0.8281	0.3134		0.8492	0.1174	6	4.092171± 0,15
7	0.9659	0.9833	0.2360	0.9326	0.3389	0.8492		0.2581	7	4.023544± 0,34
8	0.1763	0.1571	0.8321	0.1395	0.0636	0.1174	0.2581		8	3.523544± 0,34

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

Časový interval T1 označuje měření motility 30 minut po naředění. V čase T1 lze pozorovat mezi ředidly statisticky významné rozdíly. Nejvíce rozdílů je vidět u ředidla 3 – Optixcell, který vykazuje rozdíl se všemi ostatními ředidly, kromě nenaředěného ejakulátu a kombinace SLAD a PBS. V čase T1 dochází u vzorku s Optixcellem ke snížení motility oproti ostatním ředidlům. Ostatní ředidla zachovávají kvalitu semene.

Tabulka č.3 Výsledek vířivého pohybu v čase T2 (1 hodina po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.3137	0.0199	0.0944	0.3371	0.2972	0.5904	0.0552	1	3.478979 ± 0,28
2	0.3137		0.0010	0.5012	0.5621	0.9093	0.6376	0.0178	2	3.819888 ± 0,28
3	0.0199	0.0010		<.0001	0.0660	0.0017	0.0045	0.3982	3	2.683525 ± 0,28
4	0.0944	0.5012	<.0001		0.7447	0.6125	0.2538	0.0077	4	4.047161 ± 0,28
5	0.3371	0.5621	0.0660	0.7447		0.6035	0.4489	0.0432	5	4.338070 ± 0,87
6	0.2972	0.9093	0.0017	0.6125	0.6035		0.5837	0.0166	6	3.861600 ± 0,32
7	0.5904	0.6376	0.0045	0.2538	0.4489	0.5837		0.0309	7	3.660798 ± 0,28
8	0.0552	0.0178	0.3982	0.0077	0.0432	0.0166	0.0309		8	2.064214 ± 0,71

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

Tabulka v čase T2 vykazuje větší počet významných rozdílů napříč ředidly. K ředidlu 3 (Optixcell) se přidala i kombinace SLAD + DPBS (8). Přesto výsledky nejsou zcela průkazné z důvodu pouze jednoho odběrového dne. Z tabulky s motilitou, lze zjistit, že nejlepší motilitu vykazují v tomto čase ředidla 4 (PBS) a 5 (Diluent K), který byl také použit pouze během 1. odběrového dne. Velmi dobré výsledky vykazuje i ředidlo 2 (mléko 3,5%) a 6 (SLAD). Naopak velký pokles je u nenaředěného ejakulátu a Optixcellu.

Tabulka č. 4 Výsledek vířivého pohybu v čase T3 (hodinu a půl po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.0522	0.0872	0.0010	0.7364	0.0141	0.0144	0.3729	1	2.668881 ± 0,32
2	0.0522		0.0004	0.1559	0.6953	0.4896	0.1137	0.0763	2	3.418881 ± 0,32
3	0.0872	0.0004		<.0001	0.3298	<.0001	0.0015	0.9151	3	2.009790 ± 0,32
4	0.0010	0.1559	<.0001		0.3578	0.5360	0.3475	0.0164	4	3.964335 ± 0,32
5	0.7364	0.6953	0.3298	0.3578		0.5148	0.1785	0.3952	5	3.015472 ± 1,00
6	0.0141	0.4896	<.0001	0.5360	0.5148		0.2187	0.0373	6	3.706648 ± 0,37
7	0.0144	0.1137	0.0015	0.3475	0.1785	0.2187		0.0073	7	4.753707 ± 0,81
8	0.3729	0.0763	0.9151	0.0164	0.3952	0.0373	0.0073		8	1.920374 ± 0,81

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

Z tabulky v čase T3, lze vyčíst, že jsou napříč ředidly významné rozdíly, které souvisejí s narůstajícím časovým intervalem a snižujícím se vířivým pohybem. Nejvíce významných rozdílů lze pozorovat u ředidla 3 (UHT 3,5% mléko), ředidla 4 (PBS), které si v měření po 1,5 hodině zachovávají podobný vířivý pohyb. Stejně tak ředidlo číslo 6 (SLAD) vykazuje dobré výsledky. Dobrou motilitu spermií lze pozorovat i u nenaředěné varianty ejakulátu. Naopak u ostatních ředidel začíná být znatelný úpadek.

Tabulka č. 5 Výsledek vířivého pohybu v čase T4 (2 hodiny po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.1895	0.0290	0.8094	0.6980	0.5358	0.6084	0.4675	1	4.570795 ± 1,04
2	0.1895		0.3740	0.2831	0.9156	0.5527	0.4536	0.9046	2	2.9571594 ± 1,04
3	0.0290	0.3740		0.0512	0.6600	0.1590	0.1107	0.7712	3	1.8662503± 1,04
4	0.8094	0.2831	0.0512		0.7660	0.6912	0.7785	0.5381	4	4.2753412± 1,04
5	0.6980	0.9156	0.6600	0.7660		0.8948	0.8530	0.8702	5	3.3032677± 3,19
6	0.5358	0.5527	0.1590	0.6912	0.8948		0.9023	0.6803	6	3.7470432± 1,17
7	0.6084	0.4536	0.1107	0.7785	0.8530	0.9023		0.6329	7	3.9158474± 1,1
8	0.4675	0.9046	0.7712	0.5381	0.8702	0.6803	0.6329		8	2.6387395± 2,58

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

V čase T4 lze zhodnotit ředidlo 4 (PBS) a 1 (INRA96) za nejoptimálnější. K velkému poklesu v tomto čase u ředidla 3 (Optixcell). Dobrý výsledků nedosáhla ani zvolená kombinace SLAD + PBS, kdy po 2 hodinách od naředění dochází k rapidnímu snížení vířivého pohybu. Zbytek vzorku si zachovává stabilní vířivý pohyb.

Tabulka č.6 Výsledek vířivého pohybu v čase T5 (2,5 hodiny po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.9603	0.0186	0.0010	0.9889	0.0425	0.8838	0.3780	1	1.9448559 ± 0,39
2	0.9603		0.0212	0.0009	0.9963	0.0382	0.8592	0.3904	2	1.9221286± 0,39
3	0.0186	0.0212		<.0001	0.3838	<.0001	0.1022	0.8316	3	0.8539468± 0,39
4	0.0010	0.0009	<.0001		0.2060	0.2918	0.0502	0.0164	4	3.4903105± 0,3
5	0.9889	0.9963	0.3838	0.2060		0.4139	0.9284	0.5740	5	1.9278105± 1,20
6	0.0425	0.0382	<.0001	0.2918	0.4139		0.2208	0.0617	6	2.9645752± 0,44
7	0.8838	0.8592	0.1022	0.0502	0.9284	0.2208		0.3696	7	2.0511990± 0,71
8	0.3780	0.3904	0.8316	0.0164	0.5740	0.0617	0.3696		8	1.0656138 ± 0,97

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

Jako v předchozích tabulkách, se ukazuje ředidlo číslo 4 (PBS) jako nejlepší varianta. Stále oproti ostatním je zachována kvalitní mass motilita. U výše zmíněného UHT mléka 3,5% dochází k postupnému snižování vířivého pohybu. V tomto časovém intervalu je srovnatelné s ředidlem 1 (INRA 96) a ředidlem 5 (Diluent K), který nelze plnohodnotně zařadit z důvodu nízké frekvence využití při výzkumu. SLAD (6) stále zachovává dobré výsledky a v tomto čase se jeví jako druhá nejlepší varianta. Postupně dochází k úpadku nenaředěného ejakulátu.

Tabulka č.7 Výsledek vířivého pohybu v čase T6 (3 hodiny po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.8126	0.0388	0.0003	0.5324	0.0317	0.0366	0.4047	1	1.3968377± 0,40
2	0.8126		0.0217	0.0006	0.4758	0.0529	0.0606	0.3462	2	1.5104741± 0,40
3	0.0388	0.0217		<.0001	0.8746	<.0001	<.0001	0.8984	3	0.39683777±0,40
4	0.0003	0.0006	<.0001		0.0443	0.2019	0.1748	0.0116	4	3.1922923± 0,40
5	0.5324	0.4758	0.8746	0.0443		0.1441	0.1476	0.9655	5	0.5984055± 1,24
6	0.0317	0.0529	<.0001	0.2019	0.1441		0.9455	0.0599	6	2.5260521± 0,45
7	0.0366	0.0606	<.0001	0.1748	0.1476	0.9455		0.0646	7	2.4881139± 0,46
8	0.4047	0.3462	0.8984	0.0116	0.9655	0.0599	0.0646		8	0.5295458± 1,01

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

V čase T6 lze sledovat stejné výsledky jako u tabulky výše.

Tabulka č.8 Výsledek vířivého pohybu v čase T7 (3,5 hodiny po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.5461	0.0733	<.0001	0.6757	0.0888	0.4687	0.3667	1	0.9939900± 0,37
2	0.5461		0.0176	<.0001	0.5175	0.2514	0.7695	0.2365	2	1.2558947± 0,37
3	0.0733	0.0176		<.0001	0.7891	0.0010	0.0462	0.9556	3	0.2104977±0,37
4	<.0001	<.0001	<.0001		0.0256	0.0060	0.0071	0.0019	4	3.1034608± 0,38
5	0.6757	0.5175	0.7891	0.0256		0.2791	0.4589	0.8015	5	0.5159608±1,11
6	0.0888	0.2514	0.0010	0.0060	0.2791		0.5679	0.0826	6	1.7904610± 0,41
7	0.4687	0.7695	0.0462	0.0071	0.4589	0.5679		0.1977	7	1.4334447± 0,57
8	0.3667	0.2365	0.9556	0.0019	0.8015	0.0826	0.1977		8	0.1590693± 0,90

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

V tomto čase je možné znamenat rapidní snížení vířivého pohybu ve všech variantách kromě ředidla 4 (PBS), které stále vykazuje dobré výsledky. Lze říci, že tento časový interval T7 společně s T6 se jeví jako zlomový.

Tabulka č. 9 Výsledek vířivého pohybu v čase T8 (4 hodiny po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.3627	0.3622	<.0001	0.9999	0.1466	0.0050	0.7113	1	0.4651130± 0,36
2	0.3627		0.0660	0.0001	0.7320	0.5434	0.0344	0.4205	2	0.8449770± 0,35
3	0.3622	0.0660		<.0001	0.7319	0.0214	0.0004	0.9477	3	0.0846610±0,35
4	<.0001	0.0001	<.0001		0.0632	0.0014	0.1634	0.0059	4	2.6128606± 0,39
5	0.9999	0.7320	0.7319	0.0632		0.5719	0.2215	0.8136	5	0.4649170±1,08
6	0.1466	0.5434	0.0214	0.0014	0.5719		0.1271	0.2710	6	1.1128606± 0,39
7	0.0050	0.0344	0.0004	0.1634	0.2215	0.1271		0.0531	7	1.8971329± 0,45
8	0.7113	0.4205	0.9477	0.0059	0.8136	0.2710	0.0531		8	0.1418231± 0,85

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

Z následující tabulky lze vyčíst, že v tomto čase už spermie ve většině vzorků nejeví dobrý vířivý pohyb a nelze semeno považovat za kvalitní a schopné oplození. Výjimkou byla varianta s PBS a UHT 3,5% mlékem, které i v tomto čase vykazovaly dobrý vířivý pohyb. V tomto čase už během výzkumu docházelo k vyřazování vzorků z důvodu nulového pohybu.

Tabulka č.10 Výsledek vířivého pohybu v čase T9 (4,5 hodiny po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.4898	0.3723	0.0070	0.9797	0.6731	0.9411	0.9490	1	0.3716611± 0,30
2	0.4898		0.1097	0.0330	0.7757	0.8375	0.6862	0.8338	2	0.6092389± 0,29
3	0.3723	0.1097		0.0006	0.7563	0.2171	0.4884	0.6759	3	0.0642511±0,29
4	0.0070	0.0330	0.0006		0.2509	0.0276	0.0521	0.2593	4	1.4491738± 0,36
5	0.9797	0.7757	0.7563	0.2509		0.8469	0.9520	0.9489	5	0.3483837±0,89
6	0.6731	0.8375	0.2171	0.0276	0.8469		0.8127	0.9056	6	0.5319194± 0,34
7	0.9411	0.6862	0.4884	0.0521	0.9520	0.8127		0.9844	7	0.4088917± 0,47
8	0.9490	0.8338	0.6759	0.2593	0.9489	0.9056	0.9844		8	0.4272132± 0,86

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

V tomto časovém intervalu už nelze vzorky považovat za kvalitní. V tomto čase byly vždy vyřazeny všechny vzorky kromě varianty 4 (PBS) a 2 (2,5% mléko).

Tabulka č.11 Výsledek vířivého pohybu v čase T10 (5 hodin po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.2416	0.9742	0.0405	0.8761	0.2103	0.4280	0.7636	1	0.0277998± 0,21
2	0.2416		0.2467	0.2922	0.7647	0.8765	0.9017	0.8574	2	0.3128272± 0,21
3	0.9742	0.2467		0.0419	0.8856	0.2181	0.4363	0.7731	3	0.0353781±0,20
4	0.0405	0.2922	0.0419		0.4593	0.3811	0.3220	0.5134	4	0.6132813± 0,26
5	0.8761	0.7647	0.8856	0.4593		0.7247	0.8242	0.9233	5	0.1253350±0,61
6	0.2103	0.8765	0.2181	0.3811	0.7247		0.8048	0.8060	6	0.3541492± 0,23
7	0.4280	0.9017	0.4363	0.3220	0.8242	0.8048		0.9133	7	0.2743061± 0,29
8	0.7636	0.8574	0.7731	0.5134	0.9233	0.8060	0.9133		8	0.2061340± 0,59

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

Vzorky byly již vyřazeny kromě varianty 4 (PBS) a 2 (3,5% mléko), které vykazovaly vířivý pohyb 2 až 3 podle uvedené stupnice.

Tabulka č.12 Výsledek vířivého pohybu v čase T11 (5,5 hodiny po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.9021	0.9893	0.0022	0.9860	0.2073	0.9929	0.8965	1	0.0043530± 0,14
2	0.9021		0.9109	0.0033	0.9760	0.2633	0.9342	0.9365	2	0.0245765± 0,14
3	0.9893	0.9109		0.0022	0.9900	0.2088	0.9994	0.9006	3	0.00647790,13
4	0.0022	0.0033	0.0022		0.1843	0.0601	0.0144	0.1940	4	0.6077414± 0,17
5	0.9860	0.9760	0.9900	0.1843		0.6251	0.9905	0.9372	5	0.0118025±0,41
6	0.2073	0.2633	0.2088	0.0601	0.6251		0.3355	0.6768	6	0.2271254± 0,15
7	0.9929	0.9342	0.9994	0.0144	0.9905	0.3355		0.9066	7	0.0063235± 0,20
8	0.8965	0.9365	0.9006	0.1940	0.9372	0.6768	0.9066		8	0.0566549± 0,40

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

Jak lze vidět v následující tabulce, vzorky již nevykazovaly vířivý pohyb. Pouze pokud bylo přidáno ředidlo 4 (PBS) a 2 (3,5% mléko). V tomto čase již i u těchto vzorků byl vířivý pohyb snížen s hodnotou 1 či 2 dle stupnice nebo vyřazen.

Tabulka č.13 Výsledek vířivého pohybu v čase T12 (6 hodin po naředění)

	1	2	3	4	5	6	7	8	ředidla	motilita
1		0.9784	0.9593	0.0100	0.9977	0.3064	0.2762	0.8784	1	-0.0043540± 0,14
2	0.9784		0.9381	0.0099	0.9893	0.3075	0.2696	0.8699	2	-0.0089202± 0,14
3	0.9593	0.9381		0.0107	0.9870	0.3256	0.2871	0.8942	3	0.0039733±0,14
4	0.0100	0.0099	0.0107		0.2625	0.1208	0.2399	0.2968	4	0.5123068± 0,18
5	0.9977	0.9893	0.9870	0.2625		0.6790	0.6149	0.9157	5	-0.0031003±0,42
6	0.3064	0.3075	0.3256	0.1208	0.6790		0.8360	0.7648	6	0.1847455± 0,16
7	0.2762	0.2696	0.2871	0.2399	0.6149	0.8360		0.6917	7	0.2318252± 0,20
8	0.8784	0.8699	0.8942	0.2968	0.9157	0.7648	0.6917		8	0.0588142± 0,41

*Statisticky významné rozdíly označeny červenou barvou.

V čase T12 byly již všechny vzorky vyřazeny a nevykazovaly žádný vířivý pohyb.

6 Diskuze

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda má výběr ředidla vliv na vířivý pohyb spermie při teplotě 38 °C. Dosažené výsledky potvrzují danou hypotézu, že ředidla mají vliv na vířivý pohyb spermií. Přestože po určité době dojde ke snížení vířivého pohybu spermií u všech ředidel, tak výběr ředidla ovlivňuje dobu, po kterou si spermie zachovají kvalitní vířivý pohyb.

Semeno bylo vždy naředěno s 5 ředidly a vždy byla ponechána varianta nenaředěného ejakulátu, tím vzniklo 6 variant. Kvůli výměně Diluntu K za SLAD a kombinaci SLAD + PBS bylo celkem použito 7 ředidel. Vzorky byly uchovány ve vodní lázni při teplotě 37 – 38 °C. Tato teplota byla zvolena z důvodu imitace teploty v hrdle děložním u ovcí. Dle Rasada a Setiawana (2017) během estrální fáze cyklu dochází k nárůstu teploty i pH, což neprospívá metabolismu spermií. Z tohoto důvodu je volba optimálního ředidla zásadní.

V prvním odběrovém dni bylo použito ředidlo Diluent K, které je vždy připravováno před naředěním v laboratoři. Jeho složení je glukóza 0,8 g, citronan sodný 2,9 g, vaječný žloutek 20 ml a destilovaná voda 100 ml. Přestože vaječný žloutek poskytuje spermií proteiny, chrání je před chladovým šokem a udržuje fertilitu, stále se jedná o živočišný produkt a je zde možnost kontaminace semene, jak uvádí (Bousseau et al. 1998).

Další nevýhodou je rozdílné složení vaječných žloutků. Z těchto důvodů byl Diluent K vyřazen a místo něj bylo použito komerční ředidlo SLAD. Jelikož byl Dilunet K použit pouze první testovací den nelze výsledky brát jako stěžejní z důvodu nízké četnosti využití.

Využito bylo ředidlo Optixcell na bázi liposomů, které nahrazují svým složením nahrazují vaječný žloutek, opět z důvodů možné kontaminace. Přestože je Optixcell uváděn vícero zdroji včetně Ansari at al. (2015) jako vhodný pro zachování pohybu spermií při kryokonzervaci, jeho účinky v opačných vyšších podmínkách nebyly v našem výzkumu potvrzeny.

Nejlepších výsledků bylo dosáhnuto pokud bylo použito ředidlo PBS a UHT 3,5% mléko. PBS je ředidlo na vodní bázi obsahující hydrogenfosforečnan disodný a chlorid sodný, díky kterým udržuje stabilní pH, jak uvádí výrobce IMV Technologies. Zmíněné složení udržuje stálost buněk, zabraňuje jejich praskání a deformaci. To lze brát jako důvod, proč během výzkumu vykazovalo PBS nejlepších výsledků.

Dobré výsledky při použití UHT mléka potvrzuje Hozbor et al. (2016) ve své studii, kdy spermie naředěné s UHT mlékem vykazovaly vysokou hodnotu vířivého pohybu a neporušenou funkční plazmatickou membránou.

Přestože se také jedná o živočišný produkt, díky vysoko tepelné úpravě při 135 °C, jsou všechny případné mikroorganismy zničeny.

Další použité ředidlo INRA96 je primárně určeno pro hřebčí sperma, ale v praxi je běžně využívané i pro beraní sperma. Obsahuje mléčné micelární proteiny, jejichž funkcí je ochrana spermií. Nejlepší výsledky prokazuje při nižších teplotách 4 °C a pokojové teplotě 15 °C dle slov výrobce IMV Technologies. Při našem výzkumu bylo sperma uchováno při vyšších teplotách, kdy jsme zaznamenaly rychlejší pokles vířivého pohybu oproti UHT mléku 3,5% a PBS. Důvodem může být využití vyšší teploty při našem výzkumu než teplota prokazatelně vhodná pro INRU96.

Během měření bylo zjištěno, že pozitivní vliv ředidla na ejakulát je individuální. Bylo zpozorováno, že jeden samec velmi dobře reagoval na ředidlo PBS, kdežto u druhého došlo ke snížení vířivého pohybu a naopak velmi dobře reagoval na ředidlo SLAD. Z tohoto důvodu byla v poslední odběrový den namíchána varianta SLAD + PBS (1:1). Předpoklad byl, že kombinace by měla pozitivně působit na oba samce. Předpoklad nebyl potvrzen, přesto tento výsledek nelze brát jako signifikantní z důvodu nízké četnosti při výzkumu (n=1). Myslím, že toto zjištění je zajímavé a doporučila bych ho jako další předmět výzkumu.
Vliv ředidla byl prokázán při naředí ředidlem SLAD a PBS, kdy po naředění byla hodnota vířivého pohybu vyšší než vstupní vířivý pohyb. Ředidla obsahují cukry, které slouží pro spermie jako zdroj energie, jak uvádí (Fukuhara & Nishikawa 1973). Díky tomu po naředění došlo ke krátkodobému zvýšení vířivého pohybu. Při dalším měření za 30 minut, když došlo k vyčerpání energie se pohyb značně snížil.
Hameed et at. (2024) uvádí, že je dosáhnuto lepších výsledků pokud jsou spermií uchovány při nižších teplotách, například 4 - 5 °C. Naopak při vystavení spermií ve vyšším teplotám dochází k rychlejšímu zhoršení oplozovací schopnosti spermií. To se potvrdilo i v našem výzkumu, kdy byly spermie uskladněny v teplotách 37 – 38 °C a pozorovány byly po dobu 6 hodin, kdy po dosažení 6ti hodinového intervalu byly všechny vzorky vyřazeny s 0 vířivým pohybem.

7 Závěr

S ohledem na důležitost vířivého pohybu při oplození samice je nutné optimalizovat ředění semene a schopnost zachování vířivého pohybu spermií v teplotách obdobných reprodukčnímu traktu samice.
Cílem diplomové byla analýza vlivu ředidla na vířivý pohyb spermií při teplotě 37 – 38 °C.
Ze získaných dat vyplývá, že výběr ředidla hraje důležitou roli při zachování vířivého pohybu.
Ze všech testovaných ředidel se jako nejlepší jeví PBS a UHT 3,5% mléko.
Praktické využití těchto ředidel je reálné, obě jsou volně k dostání a cenově nenákladné.
Zajímavým zjištěním byla individualita ve vlivu ředidel na semeno se závislostí na samci.
Bylo zjištěno, že nelze plošně zhodnotit ideální ředidlo na všechny samce Valašské ovce.
Pro přesnější výsledky by byl nutný větší počet dat zaměřeným na vliv kombinace SLAD + PBS.

8 Literatura

Aboagla EM, Terada T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology. 2004 Sep 15;62(6):1160-72. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.013. PMID: 15289055.

Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Damián, J. P., Giriboni, J., Villagrá-García, A., Ungerfeld, R. 2017. Ejaculation does not contribute to the stress response to electroejaculation in sheep. Reproduction in Domestic Animals. 52 (3). 403–408. doi: 10.1111/RDA.12922.

Abril-Sánchez, Silvia, Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R. 2019. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. Animal Reproduction Science. 205 . 1–9. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.03.023

Abu AH, Kisani AI, Ahemen T. 2016. Evaluation of sperm recovered after slaughter from cauda epididymides of red Sokoto bucks. Veterinary World 9:1440–1444 Agca. 2002. Biology of Reproduction, Volume 67, Issue 5. Pages 1493–1501

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. 2016. Flow cytometry: basic principles and applications. Https://Doi.Org/10.3109/07388551.2015.1128876. 37 (2). 163–176. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.

Allai L, Benmoula A, Marciane da Silva M, Nasser B, El Amiri B. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. Anim Reprod Sci. 2018 May;192:6-17. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.03.019. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29615291.

Amann, R. P., Katz, D. F. 2004. Andrology Lab Corner*: Reflections on CASA After 25 Years. Journal of Andrology. 25 (3). 317–325. doi: 10.1002/J.1939-4640.2004.TB02793.X.

Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Ashiq M. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. Theriogenology. 2016 Feb;85(3):528-32. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.035. Epub 2015 Sep 26. PMID: 26522702.

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

Barbas, J.P, Mascarenhas R.D. 2009 Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. Cell Tissue Bank, 10, 49-62.

Barth A, Oko R. 1989.Abnormal Morphology of Brovine Spermatozoa. Ames, Iowa: Iowa State University Press.

Baumber J, Ball B.A, Gravance C.G, Medina V, Davies-Morel M.C. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. J. Androl. 21

Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. 2004. Applied animal reproduction sixth edition. Pearson Education Upper Saddle River, New Jersey.

Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. Rejuvenation Res. 2015 Oct;18(5):422-36. doi: 10.1089/rej.2014.1656. Epub 2015 Sep 22. Erratum in: Rejuvenation Res. 2018 Feb;21(1):87. PMID: 25826677; PMCID: PMC4620521.

Bousseau S., Brillard J. P., Marquant-Le Guienne B., Guerin B, Camus A., Lechat M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in 50 vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology 5. 699-706

Braun, W. F., Thompson, J. M., & Ross, C. V. (1980). Ram scrotal circumference measurements. Theriogenology, 13(3), 221–229.

Brindley, G. S. 1981. Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 44(1), 9-18.

Bucak M.N, Ateşşahin A, Varişli O, Yüce A, Tekin N, Akçay A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology 67, 1060–1067.

Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz J, Mezzalira A, Menchaca A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. Theriogenology.

Colenbrander, B., Stout, T. A. E. 2011. Techniques for Evaluating Frozen Semen. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 2994 – 3004. ISBN: 9780813819716.

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

Cseh, S., Faigl, V., Amiridis, G. S. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. Animal Reproduction Science, 130(3-4), 187–192.

Curry, M. R.. 2007. Cryopreservation of Mammalian Semen. In: Day, J. G., Stacey, G. N. (eds.). Methods in Molecular Biology, vol. 368: Cryopreservation and Freeze – Drying Protocols. 2nd ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 303 – 311. ISBN: 9781597453622.

David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, Druart X. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. Anim Reprod Sci. 2015 Oct;161:75-81. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.08.006 Add to Citavi project by DOI. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26364125

De Paz, Paulino. 2011The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. Theriogenology. 1313–1325

Dey, P. 2021. Introduction and History of Flow Cytometry. Diagnostic Flow Cytometry in Cytology. 3–8. doi: 10.1007/978-981-16-2655-5_1.

Domínguez, M. P., Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A., & Alberio, R. H. (2008). Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. Theriogenology, 69(5), 564–573. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.010

Ducha, N., Budijastuti, W., & Rahayu, D. A. 2021. Senduro Goat Semen Characteristics as A Candidate for Low Temperature Storage. In E3S Web of Conferences (Vol. 328, p. 08010). EDP Sciences.

Edmondson M, Roberts J, Baird A, Bychawski S, Pugh D. 2012. Theriogenology of Sheep and Goats. Sheep and Goat Medicine. Elsevier

El Amiri, B. (2022). Factors influencing seminal plasma composition and its relevance to succeed sperm technology in sheep: an updated review. Small Ruminant Research, 106759. El-Harairy, M. A., Khalil, W. A., Khalifa, E. I., & Saber, A. A. (2018). Effect of propolis ethanolic extract supplementation to ram semen extenders on sperm characteristics, lipid peroxidation and some enzymatic activities in seminal plasma in chilled semen. Journal of Animal and Poultry Production, 9(4), 235-243.

Espina-Ávila JA, Magaña-Monforte JG, Aké-Villanueva JR, Aké-López JR. Effect of the use of vitamin "E" in the diluent on the viability of ram sperm. Trop Anim Health Prod. 2021 May 17;53(2):330. doi: 10.1007/s11250-021-02764-6. PMID: 34002255.

Evans, G. 1988. Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. Australian Journal of Biological Sciences, 41(1), 103

Faigl V, Vass N, Jávor A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. Acta Veterinaria Hungarica.

Fair S, Hanrahan J, Donovan A, Duffy P, O'meara C, et al. 2007. Hormonal relationships during the periovulatory period among ewe breeds known to differ in fertility after cervical artificial insemination with frozen thawed semen. Animal reproduction science

FISER P. S, FAIRFULL R. W. 1986: The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. Cryobiology, 23(6): 518–524.

Fukuhara R, Nishikawa Y. 1973. Effects of pH, Sperm Concentration, Washing and Substrate Concentration on Respiration and Motility of Goat Spermatozoa. Nihon Chikusan Gakkaiho 44, 266–270.

Fukui Y, Roberts E. 1977. Repeatability of non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. Theriogenology. 8 (2-3). 77-8

Gadella, B. M. 2014. Sperm Preparation for Fertilization. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (eds.). Animal Andrology – Theories and Applications. CAB International. UK/USA. 57 – 75. ISBN: 9781780643168.

Gadella, B. M., & Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. Theriogenology, 81(1), 74–84. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.005

Gamčík P, Kozumplík J, et al. 1992. Andrológia a umela inseminácia hospodárských zvierat. Príroda. Bratislava.

Gamčík P, Kozumplík J. et al. 1984. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda, Bratislava.

Garner, D. L., Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 96 – 109. ISBN: 0683305778.

Givan, A. L. 2001. a Chapter 2 Principles of flow cytometry: An overview. Methods in Cell Biology. 63 (63). 19–50. doi: 10.1016/S0091-679X(01)63006-1.

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

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

Goshme S, Asfaw T, Demiss Ch, Besufekad S. 2021. Evaluation of motility and morphology of frozen bull semen under different thawing methods used for artificial insemination in North Shewa zone, Ethiopia. Heliyon 7(10) (e08183) DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08183.

Graham, J. K. 2011. Principles of Cryopreservation. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 2959 – 2963. ISBN: 9780813819716.

Hafez ESE., Hafez B., editors., 2000. Reproduction in Farm Animals7 edition. Wiley Blackwell, Philadelphia.

Heidari AH, Zamiri MJ, Nazem MN, Shirazi MRJ, Akhlaghi A, Pirsaraei ZA. 2021. Detrimental effects of long-term exposure to heavy metals on histology, size and trace elements of testes and sperm parameters in Kermani Sheep. Ecotoxicology and Environmental Safety 207: 111563

Hitit M, Özbek M, Ayaz-Guner S, Guner H, Oztug M, Bodu M, Kirbas M, Bulbul B, Bucak MN, Ataman MB, Memili E, Kaya A. Proteomic fertility markers in ram sperm. Anim Reprod Sci. 2021 Dec;235:106882. doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106882. Epub 2021 Oct 30. PMID: 34823050.

Hodder, A. D. J., Liu, I. K. M. 2011. Spermatozoal Motility. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 1292 – 1296. ISBN: 9780813819716.

Höfner L, Luther AM, Waberski D. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. Anim Reprod Sci. 2020 Sep;220:106290. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106290. Epub 2020 Jan 24. PMID: 32001046.

Horák F., 2004. Ovce a jejich chov. Praha, 304 s. ISBN 80-209-0328-3.

Horák F., a kol., 2012. Chováme ovce. Praha. 384 s.

Horák F., Tereznerová K., 2010. Světový genofond ovcí a koz. Brno. Svaz chovatelů ovcí a koz. ISBN 978-80-904140-6-8.

Horst, G. van der 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. Animal Reproduction Science. 220 . 106350. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2020.106350

Horst, G. van der, Maree, L., du Plessis, S. S. 2018. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development. 30 (6). 875–888. doi: 10.1071/RD17468.

Hozbor F, Ledesma A, Manes J, Ríos GL, Kaiser G, Cano A, Luciano C, Alberio R. Improve intra-uterine insemination in rabbits using ultra-high temperature skim milk as extender to keep semen at room temperature. Andrologia. 2016 Mar;48(2):231-4. doi: 10.1111/and.12445. Epub 2015 Jun 3. PMID: 26040428.

Chemineau P, Malpaux B, Pelletier J, Lebouef B, Delgadillo J, Deletang F, Pobel T, Brice G. 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. INRA Prod. Anim

Chłopik, A., Wysokińska, A. 2019. Canine spermatozoa-What do we know about their morphology and pkysiology? An overview. Reproduction in Domestic Animals. 55. 113-126.

Jelínek P., Koudela K., 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Brno. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7644-1.

Johansson C. S, Matsson F. C, Lehn-jensen H, Nielsen J. M, Petersen M. M. 2008. Equine spermatozoa viability comparing the nucleo counter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. Animal Reproduction Science.

Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2011). Seminal Plasma : An Essential Attribute to Spermatozoa. Journal of Andrology, 33(October), 536–551. https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583

Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Boixo J. C, Anel L, Paz P, Herraez P, Rouissi H. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem Theriogenology.

Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. Theriogenology 64:1225–1235

Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 48 C. J Reprod Fertil;116:217–22.

Kliment J, et al. 1989. Reprodukcia hospodárských zvierat. Bratislava.

Kos, V., Andrlíková, M., Ledabylová, A., Marková, B., Novotný, R. 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO.

Kubovičová E. 2011. Metody konzervace a hodnocení spermatu beranů: metodická příručka.

Kuchtík J., Hošek M., Axmann R., Milerski M., 2007. Chov ovcí. Vyd. 1. Brno. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 110 s. ISBN 078-80-7375-094-7.

Lin HH, Mermillod P, Grasseau I, Brillard JP, Gérard N, Reynaud K, Chen LR, Blesbois E, Carvalho AV. Is glycerol a good cryoprotectant for sperm cells? New exploration of its toxicity using avian model. Anim Reprod Sci. 2023 Nov;258:107330. doi: 10.1016/j.anireprosci.2023.107330. Epub 2023 Sep 17. PMID: 37734123.

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

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

Lu, J. C., Huang, Y. F., Lü, N. Q. 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. Andrologia. 46 (4). 329–338. doi: 10.1111/AND.12093.

Macías A, Martín E, Laviña A, Ferrer LM, Lidón I, Rebollar R, Tejedor MT. 2020. Cervical artificial insemination in sheep: sperm volume and concentration using an antiretrograde flow 37 device. Animal Reproduction Science 221: 106551.

Maksimovic N, Milovanovic A, Barna T, Caro Petrovic V, Pantelic V, Lazarevic M, Stojanov I. 2018. Short-terrn liquid storage of ram semen in various extenders. South African Journal of Animal Science 48:717–723. South African Society for Animal Science (SASAS).

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

Marvan, F., Hampl, A. 2011. Morfologie hospodářských zvířat. Vyd. 5. Praha: Vydala Česká zemědělská univerzita v Praze v nakladatelství Brázda. ISBN: 978-80-213-2188-5.

Málková A, Savvulidi FG, Ptáček M, Machová K, Janošíková M, Nagy S, Stádník L. Glycerol-Free Equilibration with the Addition of Glycerol Shortly before the Freezing

Procedure: A Perspective Strategy for Cryopreservation of Wallachian Ram Sperm. Animals (Basel). 2023 Mar 29;13(7):1200. doi: 10.3390/ani13071200. PMID: 37048456; PMCID: PMC10093609.

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

Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. Reprod Fertil Dev. 1993;5(6):613-38. doi: 10.1071/rd9930613. PMID: 9627724.

McCappin N, Murray R. 2011. Some factors affecting pregnancy rate in ewes following laparoscopic artificial insemination. Veterinary Record. 168 (4). 99-99.

McKinnon, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. Current Protocols in Immunology. 120 (1). 5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/CPIM.40.

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

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

Mocé E, Lozano-Palazón SA, del Mar Martínez-Granell M, Mocé ML, Gómez EA. 2020. Effect of the Refrigeration System on In Vitro Quality and In Vivo Fertility of Goat Buck Sperm. Animals 10: 2399.

Muiño-Blanco, T., Fernández-Juan, M., Cebrián-Pérez, J. A., Forcada, F., Abecia, A., & Cardozo, J. A. (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Theriogenology, 66(4), 841–850. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.058

Mutalík S, Salian S. R, Avadhani K, Menon J, Joshi H, Hegde A. R, Kumar P, Kalthur G, Adiga S. K. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium.

Napolitano, F., Arney, D., Mota-Rojas, D., De Rosa, G. 2020. Reproductive technologies and animal welfare. Reproductive Technologies in Animals, 275–286

Nuti I. 2007. Techniques for artificial insemination of goats. In: Youngquist, R. S. and Threlfall, W. R. (eds) Current Therapy in Large Animal Theriogenology. 2nd edition. SaundersElsevier, St. Louis, MO. pp. 529–534

Parkinson T. 2009. Artificial insemination of ewes. In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J. and England, G. C. W. (eds) Veterinary Reproduction and Obstetrics. 9th edition. SaundersElsevier, London, UK. pp. 765–808.

Perry K, Haresign W, Wathe, D. C, Khalid M. 2010. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. Theriogenology 74, 1685–1690.

Pezzanite, L., Bridges, D. A., Neary, D. M., & Hutchens, T. (2010). Breeding Soundness Examination of Rams and Bucks. Purdue Extension, 2, 1–4. https://www.extension.purdue.edu/extmedia/as/as-599-w.pdf

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

Pugh D., Baird An., 2012. Sheep and Goat Medicine. Elsevier. ISBN 9781437723533.
Roudná, M., & Dotlačil, L. (2007). Genetické zdroje-význam, využívání a ochrana. Ministerstvo životního prostředí. Praha. ISBN 978-80-7212-469-5.

Purdy, P. H., Spiller, S. F., McGuire, E., McGuire, K., Koepke, K., Lake, S., Blackburn, H. D. 2020. Critical factors for non-surgical artificial insemination in sheep. Small Ruminant Research, 106179. doi:10.1016/j.smallrumres.2020

Rasad, S., & Setiawan, R. 2017 Aug 17. Cytological Characteristics of Mucose Cell and Vaginal Temperature and pH During Estrous Cycle in Local Sheep. ANIMAL PRODUCTION. [Online] 19:1

Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat-2-, rozšířené vydání. Grada Publishing as. 480 p. ISBN: 978-80-247-3282-4.

Romano, J. E., Christians, C. J. 2009. Sperm loss using different artificial vaginas in rams. Small Ruminant Research. 83 (1–3). 85–87. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.04.004.

Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science, 37(3-4), 185– 249.

Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. 62. Sydney, s. 77-111.

Shaken M, Roshanfekr H, Mamoei M, Mirzadeh Kh. 2008. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 3(6), 400-408

Shipley C. F. B, Buckrell B. C, Mylne M. J. A, Pollard J, Hunton J. R. 2007. Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Elsevier.

Spanò, M., Evenson, D. P. 1993. Flow cytometric analysis for reproductive biology. Biology of the Cell. 78 (1–2). 53–62. doi: 10.1016/0248-4900(93)90114-T.

Stádník L, Doležalová M. 2015. Možnosti optimalizace oplozovací schopnosti inseminačních dávek býků, Intenzifikační faktory plodnosti skotu.

Šmerha j, a kol. 1980. Reprodukce hospodářských zvířat I., Státní pedagogické nakladatelství, Praha 270s.

Van de Hoek M, Rickard JP, de Graaf SP. Motility Assessment of Ram Spermatozoa. Biology (Basel). 2022 Nov 26;11(12):1715. doi: 10.3390/biology11121715. PMID: 36552225; PMCID: PMC9774426.

Varner, D. D., Johnson, L. 2011. From a Sperm´s Eye view: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 909 – 990. ISBN: 9780813819716.

Věžník Z, et al. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno.

Wernerová K. 2015. Hodnocení kvality ejakulátu beranů vybraných plemen. Brno. Diplomová práca. Mendelova univerzita v Brne, Agronomická fakulta, ústav chovu a šľachtenia zvierat.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. . Retrieved from https://apps.who.int/iris/handle/10665/343208

Wu C, Dai J, Zhang S, Sun L, Liu Y, Zhang D. Effect of Thawing Rates and Antioxidants on Semen Cryopreservation in Hu Sheep. Biopreserv Biobank. 2021 Jun;19(3):204-209. doi: 10.1089/bio.2020.0067. Epub 2021 Feb 24. Erratum in: Biopreserv Biobank. 2022 Dec;20(6):579. PMID: 33625896.

Wulster-Radcliffe MC, Wang S, Lewis GS. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. Theriogenology. 2004 Sep 15;62(6):990-1002. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.031. PMID: 15289042.

Wulster-Radcliffe, M. C., Williams, M. A., Stellflug, J. N., Lewis, G. S. 2001. Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. Journal of Animal Science. 79 (12). 2964–2967. doi: 10.2527/2001.79122964X.

Wurlina, W., Safitri, E., Susilowati, S., & Meles, D. K. 2020. The effect of crude guava leaf tannins on motility, viability, and intact plasma membrane of stored spermatozoa of Etawa crossbred goats. Veterinary World, 13(3), 530.

Yánez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. Anim Reprod Sci. 2022 Nov;246:106904. doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106904. Epub 2021 Dec 3. PMID: 34887155.

Youngquist R. S, Threfall W. R. 2007. Current therapy in large animal heriogenology. Saunders, Philadelphia.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ID - inseminační dávka
T0 – po naředění
T1 – 30 minut po naředění
T2 – 1 hodina po naředění
T3 – 1,5 hodiny po naředění
T4 – 2 hodiny po naředění
T5 – 2,5 hodiny po naředění
T6 – 3 hodiny po naředění
T7 – 3,5 hodiny po naředění
T8 – 4 hodiny po naředění
T9 – 4,5 hodiny po naředění
T10 – 5 hodin po naředění
T11 – 5,5 hodiny po naředění
T12 – 6 hodin po naředění
Tzv.- takzvaný
UHT – vysokotepelné ošetření
PBS - Phosphate Buffered Saline
ATP - adenosintrifosfát
cAMP - cyclic adenosin monofosfát
sAC - rozpustná adenosin cykláza
PAK – proteinkynázy
CASA – computer assisted semen analysis
VCL – křivočará rychlost
VSL – přímočará rychlost
VAP - průměrná rychlost určité vzdál