

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

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

Bakalářská práce

**Věra Pavlíková
Živočišná produkce**

Ing. Martin Ptáček, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 20. 4. 2023

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkovala Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky, které mi poskytl při vypracování této práce.

Moderní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u malých přežvýkavců

Souhrn

Mrazení spermatu je významnou metodou dlouhodobého uchování pohlavních buněk a má široké využití ve výzkumu, v chovatelské praxi i v oblasti uchovávání genetických zdrojů. Navzdory širokým možnostem uplatnění stále neumíme dokonale využít potenciál, který nám nabízí. Vývoj kryokonzervačních prostředků probíhá už téměř sto let, avšak anatomické a fyziologické rozdíly mezi živočišnými druhy brání nalezení jedné standardizované všeobecně platné metody. Hledání vhodných kryokonzervatů je stále aktuální téma. Tato práce shrnula informace o nejdiskutovanějších postupech konzervace spermatu v minulosti i současnosti a pokusila se formulovat možný budoucí vývoj.

Klíčová slova: kryokonzervace, malí přežvýkavci, sperma,

Contemporary kryoprotectors used for sperm conservation of small ruminants

Summary

Sperm freezing is an important method of long-term preservation of sex cells, which is widely used in research, in breeding practice and in the field of preserving genetic resources. Despite the wide range of possibilities, we still cannot fully utilize the potential it offers us. The development of cryopreservation agents has been going on for almost a hundred years, but the anatomical and physiological differences between animal species prevent finding one standardized, universally applicable method. Finding suitable cryopreservatives is still a current topic. This work summarized information about the most discussed sperm conservation procedures in the past and present and tried to formulate possible future developments.

Keywords: cryoconservation, small ruminants, sperm

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce	9
3	Malí přežvýkavci	10
3.1	Charakteristika spermatu malých přežvýkavců	10
3.1.1	Semenná plazma	10
3.1.2	Spermie	11
3.1.2.1	Hlavička spermie	11
3.1.2.2	Bičík spermie	11
3.2	Fyziologické a biochemické procesy probíhající ve spermích	11
3.2.1	Pre-ejakulační procesy ve spermatu	12
3.2.1.1	Zrání spermií	12
3.2.1.2	Metabolismus spermie	12
3.2.1.3	Oxidace.....	12
3.2.2	Post-ejakulační procesy ve spermatu	12
3.2.2.1	Kapacitace spermií	12
3.3	Odběr a zpracování spermatu	13
3.3.1	Odběr spermatu.....	13
3.3.2	Hodnocení kvality spermatu bezprostředně po odběru.....	14
4	Kryokonzervace.....	14
4.1	Kryokonzervace spermatu	15
4.2	Historie kryokonzervace.....	15
4.3	Výhody kryokonzervace	16
4.4	Nevýhody kryokonzervace	16
4.5	Faktory ovlivňující kryokonzervaci	17
4.5.1	Exogenní faktory ovlivňující kryokonzervaci	17
4.5.2	Endogenní faktory ovlivňující kryokonzervaci	17
4.6	Postup kryokonzervace.....	18
4.7	Vliv složení semenné plazmy	19
5	Kryoprotektanty.....	20
5.1	Nepenetrující kryoprotektanty	20
5.1.1	Trehalóza	20
5.2	Penetrující kryoprotektanty.....	20
5.2.1	Vaječný žloutek	21
5.2.2	Sójový lecitin	21
5.2.3	Glycerol	21

5.2.4	Ethylenglykol.....	22
5.3	Moderní kryoprotektanty spermů malých přežvýkavců	22
5.3.1	Jednoduché cukry	22
5.3.2	Hormony	22
5.3.3	Mastné kyseliny	23
5.3.4	Antioxidanty	23
5.3.5	Postupy zabráňující kryokapacitaci	23
6	Ředění ejakulátu	25
6.1	Voda.....	26
6.2	Pufry	26
6.3	Antibiotika	27
7	Ředidla spermů.....	27
7.1	Vlastnosti ředidel.....	27
7.2	Klasifikace ředidel (dle Salamona a Maxwella)	27
7.2.1	Ředidla na bázi citrátu	27
7.2.2	Ředidla na bázi mléka.....	28
7.2.3	Ředidla na bázi laktózy	28
7.2.4	Ředidla na bázi sacharózy.....	28
7.2.5	Ředidla na bázi rafinózy	29
7.2.6	Ředidla na bázi Tris	29
7.2.7	Ředidla na bázi pufrů, obsahující zwitterion, dextran a hydroxyškrob	29
7.2.8	Ředidla na bázi sójového lecitinu	29
8	Závěr	30
9	Literatura	31

1 Úvod

Využití biotechnologických metod v chovu malých přežvýkavců má dosud řadu omezení. Vyplývá to z technologie chovu i z biologických vlastností chovaných zvířat. V České republice chov malých přežvýkavců, především ovcí a koz, stagnuje, ovšem ve světovém měřítku jsou malí přežvýkavci díky své schopnosti poskytovat maso, vlnu, kůži nebo mléko, chápáni jako důležitá součást živočišného průmyslu, avšak i zde dochází vzhledem k intenzifikaci zemědělství a upřednostňování plemen s vysokou produkcí k oslabení genetické diverzity (Lv, Chunrong et al. 2019).

Kryokonzervace, jakožto metoda uchování genetického materiálu, má velký význam pro zachování genetických zdrojů v genových bankách, ale zároveň pomáhá snižovat v mnoha ohledech náklady na chov zvířat tím, že umožňuje využití umělé inseminace. (Lv, Chunrong et al. 2019). Tvoří též základ pro ostatní biotechnologické metody.

Použití mrazeného spermatu u malých přežvýkavců má dlouhou historii. Ačkoli výzkum v oblasti ochrany spermatických buněk před chladovým poškozením přinesl řadu cenných poznatků, kryokonzervace u malých přežvýkavců nedosahuje dostatečně uspokojivých výsledků, proto je potřeba revidovat dosavadní poznatky a hledat nové druhy efektivních kryoprotektantů, které by zároveň byly použitelné v široké chovatelské praxi. Ačkoli výzkum se věnuje především farmově chovaným malým přežvýkavcům, a to hlavně ovcím a kozám, jeho výsledky mohou napomoci i záchraně druhů volně žijících v přírodě, jako jsou jelenovítí apod.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo shromáždit a utřídit poznatky o krykonzervaci spermatu malých přežvýkavců s přihlédnutím k významu kryoprotektivních látek v rámci jednotlivých metod kryokonzervace a mechanismu jejich působení na přežití a oplozeníschopnost spermií.

Vzhledem k tomu, že mrazení ejakulátu a jeho uchovávání je komplexní metoda složená z řady vzjemně se ovlivňujících kroků, která musí brát v potaz i specifické vlastnosti zpracovávaného materiálu, bylo mým záměrem uvést tyto poznatky do souvislosti a na základě pozorovaných výsledků formulovat možný směr dalšího výzkumu, vedoucího ke zlepšení dosud ne zcela uspokojivých výsledků.

3 Malí přežvýkavci

3.1 Charakteristika spermatu malých přežvýkavců

Vzhledem ke svému složení a biologickým vlastnostem sperma klade specifické nároky na proces mrazení a rozmrazování. Sperma malých přežvýkavců v porovnání s ejakulátem ostatních savců vykazuje rozdíly, které se týkají fyzikálních vlastností semene (objem, poměr jednotlivých složek, barva a pH), morfologie buněk i chemického složení semenné plazmy. Tyto vlastnosti, které se liší i napříč zvířecími rody, druhy, se liší zároveň mezi jedinci v rámci jednoho druhu. Poměry složek spermatu jsou variabilní i vzhledem k sezónnost zvířat.

Sperma se skládá z buněčné složky, tvořené spermiiemi a ze semenné plazmy. Oproti všežravcům, šelmám a lichokopytníkům mají přežvýkavci menší objem ejakulátu, semeno však obsahuje větší koncentraci spermatických buněk na 1 ml (Marvan 2017).

Druh	Objem (ml)	Množství spermii (milióny) v 1 ml	Množství spermii (miliardy) v ejakulátu
Beran	0,7–3	0,5–5	2–10
Kozel	0,5–2	0,5–4	2–8

Tabulka 1: Parametry spermatu beranů a kozlů (Marvan 2017).

3.1.1 Semenná plazma

Srovnáme-li poměr složek ejakulátu beranů a kozlů, 70–75 % tvoří semenná plazma, jejíž úlohou je výživa, transport a stimulace pohybu spermii (Cibulka et al 2004). Je to tekutina, která obsahuje výměšky přídatných pohlavních žláz, sekrety z varlat, nadvarlat, chámovodu a močové trubice, přičemž každá tato složka ovlivňuje konečné vlastnosti ejakulátu.

Sekret z nadvarlat obsahuje výživné látky. Svým mírně kyselým pH blokuje motilitu spermii během setrvávání v nadvarletí, kde spolu s nízkou hladinou kyslíku, zvýšenou hladinou oxidu uhličitého a sníženou teplotou zabraňuje jejich předčasnému energetickému vyčerpání (Marvan 2017).

Výměšek tubulózních žláz chámovodu a bělavý slabě zásaditý sekret měchýřkovité žlázy se mísí s mléčně zakaleným řídkým sekretem zásadité povahy produkovaným roztroušenými buňkami předstojné žlázy, který je nositelem charakteristického pachu, a dále pak se sekretem bulbouretrální žlázy. Výsledná semenná plazma má smetanovou barvu a pH v rozmezí 6,2–7,5 (Cibulka et al 2004).

Po stránce chemické obsahuje semenná plazma celou řadu látek, jako fruktóza, kyselina askorbová, aminokyseliny, bílkoviny, enzymy, prostaglandiny, androgeny, estrogeny, minerální látky, které vytvářejí přirozené prostředí pro spermatické buňky (Cibulka et al 2004). Pro kryokonzervaci spermatu kozlů je limitující přítomnost fosfolipázy A a SBUIII, zatímco u beranů je to L-aminooxidáza.

3.1.2 Spermie

Spermie tvoří 25–30 % objemu ejakulátu (Cibulka et al 2004). Je to haploidní buňka s minimem cytoplazmy (Eddy 2006). Skládá se z hlavičky a bičíku, přičemž specifická morfologie, fyziologie, chemické složení jednotlivých částí a enzymatická aktivita spermatické buňky s sebou nese náchylnost k mrazovému poškození. Naopak vliv tvaru a velikosti na kryostabilitu buňky nebyl prokázán (Gao et al. 1997).

3.1.2.1 Hlavička spermie

Hlavička spermie je nositelkou genetické informace. Vytváří se během metamorfózy (spermiohistogeneze) z jádra spermatidy. Je pokryta cytoplazmatickou membránou, charakteristickou vysokým podílem alifatických nenasycených mastných kyselin a obsahem glykolipidů, fosfolipidů a sterolů, z nichž má významnou úlohu cholesterol, který ovlivňuje tekutost membrány. Na konci zrání je z buňky vypuzen přebytek cytoplazmy, přední část hlavičky tvoří akrozóm, vzniklý z Golgiho komplexu a v zadní části se nachází postakrozomální zóna.

Hlavička spermie obsahuje kondenzovaný chromatin navázaný na polypeptid protamin, zatímco akrozóm je naplněn hydrolytickými enzymy (Bailey 2003). Hlavní funkci mají akrozín a hyaluronidáza, avšak je zde i mnoho dalších enzymů, mezi něž patří fosfatáza, arylamidáza, arylsulfatáza A, β -N-acetylglukozamidáza, fosfolipázy, kolagenázy či esterázy (Yanagimachi 1994).

Vlivem ztráty endoplazmatického retikula a vysoce kondenzované DNA ve spermii neprobíhá transkripce ani syntéza nových proteinů a lipidů (Bailey 2003).

3.1.2.2 Bičík spermie

Bičík spermie nasedá na implantační jamku na bázi spermatické hlavičky a je složen ze 4 částí. Krček bičíku obsahuje chordy a fibrózní pochvu. Spolu s hlavičkou spermie tvoří kloubní spojení. Na krček navazuje spojovací oddíl, který obsahuje řetěz mitochondrií, stočený spirálově kolem osových vláken. Vlákna jsou základem hlavního oddílu bičíku, zakončeného terminální částí (Cibulka et al 2004). Mitochondrie produkují adenosintrifosfát (dále ATP), jakožto zdroj energie nutný k udržení pohybu (Medeiros et al. 2002).

3.2 Fyziologické a biochemické procesy probíhající ve spermiiích

Spermatická buňka během svého vzniku prodělává vývojová stádia, spojená s morfologickou i biochemickou přestavbou, přičemž část těchto dějů je zahájena před ejakulací v těle samce. Následují však děje, které jsou zahájeny až po ejakulaci mimo tělo samce a jsou vyvolány reakcí na prostředí samičího reprodukčního traktu. Kryokonzervace vstupuje mezi

tyto procesy a má za úkol je oddálit. Volba správné metody je proto zásadní pro zachování životních funkcí spermie.

3.2.1 Pre-ejakulační procesy ve spermatu

3.2.1.1 Zrání spermii

Zrání stádium je poslední fází spermiogeneze. Spermie, které dosud nemají schopnost pohybu, jsou uvolněny do semenných cest a splavovány do ocasu nadvarlete, kde cytoplazmatická membrána hlavičky spermie prochází strukturální proměnou a spermie získává schopnost pohybu.

3.2.1.2 Metabolismus spermie

Biosyntetická funkce je u spermii velmi malá a je založena na katabolické aktivitě (Barbas & Mascarenhas 2009), při které dochází k látkové přeměně prostřednictvím štěpení makromolekul ATP na menší molekuly za současného uvolnění energie. Vlivem převahy katabolických procesů má spermie omezené množství energie, které svým metabolismem postupně vyčerpává. Dochází k produkci kyseliny mléčné a tím i k poklesu pH. Zastavení a opětovné spuštění těchto procesů je úkolem efektivní metody kryokonzervace.

3.2.1.3 Oxidace

Sperma obsahuje enzym lipoxygenázu, NADPH oxidázu (NOX5), ve spermiích beranů je významná L-aminooxidáza (Upreti et al. 1998). Spolu s oxidačními procesy, které probíhají v mitochondriích se tyto enzymy v buňce podílejí na vzniku reaktivních druhů kyslíku (dále ROS), které jsou původci oxidačního stresu při kryokonzervaci spermii (Zamiri 2020).

3.2.2 Post-ejakulační procesy ve spermatu

3.2.2.1 Kapacitace spermii

Vstupem spermie do pohlavního ústrojí samice je zahájen proces kapacitace, založený na fyziologických a biochemických změnách spermatické buňky, které jsou nezbytné pro úspěšné oplodnění vajíčka. Cibulka et al. (2004) upozorňují, že jde o reverzibilní proces vyvolaný sekrety pohlavního ústrojí samice a v podmínkách *in vitro* jej lze moderovat přidáním semenné plazmy, která dokáže proces kapacitace zastavit a vrátit spermie do původního stavu.

Kapacitaci doprovází proces hyperaktivace spermie, při němž se zvýší frekvence kmitání bičíku. Yanagimachi (1994) uvádí, že hyperaktivace spermii a akrozomální reakce nastává změnou uspořádání cytoskeletárních proteinů, jejich fosforylací, ztrátou povrchových proteinů a uhlovodíků. Hyperaktivace je podněcována zvýšenou koncentrací vápenatých iontů v bičíkové části spermie (Ho & Suarez 2003). Visconti a Kopf (1998) uvádí, že Ca^{2+} a NaHCO_3

aktivují uvnitř spermatické buňky adenylátcyklázu, čímž se spouští produkce cyklického adenosinmonofosfátu (dále cAMP), který aktivuje cAMP dependentní proteinkinázu A, a tím ovlivňuje nárůst tyrosinové fosforylace v bičíku spermie.

Během kapacitace spermie získává schopnost oplodnit oocyt. V důsledku biochemických změn v cytoplazmatické membráně je spuštěna akrozómová reakce, umožňující průnik spermie do vajíčka. Proces je zahájen odštěpením glykoproteinů z cytoplazmatické membrány, která se rozpadá. Z akrozómu se uvolňuje enzym hyaluronidáza. Spermie se dostává svou akrozomální částí do kontaktu se *zonou pellucidou* oocyty. Za působení hormonu akrozínu se cytoplazmatická membrána vajíčka a spermie spojí a dochází ke splynutí obou buněk. I zde hraje roli zvýšená hladina vápenatých iontů, která má také za následek depolymeraci proteinů aktinu a serinu, které jsou součástí cytoskeletu a díky tomu membrány spermie a vajíčka mohou splynout. Molekulární podstata děje však doposud není zcela objasněna (Bailey et al. 2003).

Významnou úlohu v procesu kapacitace hraje albumin. Vyskytuje se v reprodukčním traktu samice a má schopnost vázat cholesterol. Yanagimachi (1994) uvádí, že snížením koncentrace cholesterolu v plazmatické membráně dojde ke zvýšení její tekutosti. Změna postavení proteinů a lipidů způsobí otevření iontových kanálů, což má za následek změnu membránového potenciálu spermatogonií.

Hyperpolarizace membrán, procesy spojené s absorpcí vápníku a produkcí ROS však mohou být vyvolány i reakcí spermií na chlad a představují tak problém zvaný kryokapacitace (Purdy 2006). Úkolem metod kryokonzervace je minimalizace těchto dějů volbou správného postupu a vhodných kryokonzervačních látek.

3.3 Odběr a zpracování spermatu

3.3.1 Odběr spermatu

Odběr ejakulátu pro potřeby kryokonzervace se provádí pomocí umělé vagíny nebo elektrostimulací. Nuti (2007) uvádí, že u kozlů může elektrostimulace vést ke změně složek semenné plazmy. Tibary a Manar (2017) uvádějí, že existují studie, které ukazují, že sperma sbírané elektroejakulací vykazuje lepší kryotoleranci než sperma sbírané do umělé vagíny. Jiné studie neprokázaly rozdíl mezi těmito dvěma metodami odběru a některé dokazují naopak umělou vagínu u kozlů jako lepší pro zachování motility po rozmrazení (Jimenez-Rabadan et al. 2012)

V případě získávání genetických zdrojů či záchrany ohrožených druhů má význam i odběr ejakulátu nebo spermií post mortem z ocasu nadvarlete. Vzhledem k tomu, že u malých přežvýkavců dochází během říje ke změnám fyzikálních i biochemických poměrů v ejakulátu samců, má tento fyziologický jev vliv na kvalitu odebíraného spermatu. Odběr spermatu se provádí po očištění plemeníka za použití sterilních nástrojů nejčastěji do umělé vagíny zahřáté v termostatu na 41–43 °C.

3.3.2 Hodnocení kvality spermatu bezprostředně po odběru

Vzhledem k tomu, že metoda kryokonzervace slouží především biotechnologickým metodám, z nichž nejrozšířenější je umělá inseminace (dále AI), jejím posláním je uchování kvalitního biologického materiálu, v tomto případě spermatu pečlivě vybraných, veterinárně prověřených samců. Odebrané sperma musí dosahovat stanovených parametrů. Nesmí být kontaminováno patogeny a močí.

	Hustota (spermie v 1mm ³)	Aktivita (minimálně)	Morfologie (bez abnormalit-minimálně)
Beran	2,5 × 10 ⁶	60 %	80 %
Kozel	2,8 × 10 ⁶	70 %	86 %

Tabulka 2: Požadavky na kvalitu spermatu beranů a kozlů.

Dorado et al. (2010) však uvádí, že 20–30 % spermií ztrácí po rozmrazení oplozovací schopnost, proto doporučují vybírat jen vysoce kvalitní ejakulát s hodnotami aktivity >90 %. Nesmí být kontaminován patogeny a močí. Do deseti minut po odběru se provádí při pokojové teplotě 20 až 25 °C makroskopické a mikroskopické vyšetření ejakulátu. Zjišťuje se objem, barva, konzistence, pach, obsah příměsí, hustota spermatu, aktivita spermií a výskyt abnormalit, případně se provádějí další testy: test tepelné odolnosti, test integrity akrozomu a membrány, in vitro fertilizace, nebo HOS test (Faigl 2012, Lv et al. 2019), který se osvědčil při predikci oplozovací schopnosti spermií (Lv et al. 2019).

Z hlediska kryokonzervace je významným ukazatelem především koncentrace, pohyblivost a morfologie spermií. Posouzení životaschopnosti spermií je základní metodou posouzení kvality ejakulátu, protože schopnost oplodnit vajíčko má jen životaschopná spermie (Věžník et al. 2004).

Lv et al. (2019) však uvádí, že navzdory proběhlým studiím, které se snažily postihnout korelaci mezi oplozovací schopností spermie a ostatními parametry, jako motilita, membránový potenciál nebo DNA spermií, doposud není snadné predikovat fertilitu na základě pouze jednoho parametru. Navíc oplození vajíčka spermií je složitý proces, na kterém se podílí řada faktorů jako plodnost samice, říjový cyklus, sezónnost, metoda inseminace (Lv et al. 2019). Tyto parametry ovlivňují také výsledky hodnocení pokusů, týkajících se kryokonzervace spermatu, protože je v tomto ohledu složité dosáhnout srovnatelných podmínek. Louda et al. (2001) ale upozorňují, že výsledky testů ejakulátu vykazují vysokou korelaci s následnou plodností.

4 Kryokonzervace

Kryokonzervace je pomalá technika mrazení, využívající par tekutého dusíku ke konzervaci biologického materiálu za účelem jeho dlouhodobého uchování při teplotě -196°C. Používá se k uchovávání spermií, oocytů, embryí a zárodečných tkání. Zatímco chlazení

spermatu poskytuje jen dočasnou ochranu, u kryokonzervace se předpokládá neomezená doba skladování (Lv et al. 2019).

S rozvojem biotechnologií, především intracytoplazmatické injekce spermie, byla v posledních letech znovu oživena metoda vitrifikace, jakožto metoda rychlého mrazení, která spolu s lyofilizací otevírá nové možnosti uchování biologického materiálu. Metoda vitrifikace spermatu má v porovnání s vitrifikací embryí horší výsledky. Navíc technologické a ekonomické aspekty zatím neumožňují její široké použití v praxi.

4.1 Kryokonzervace spermatu

Jakožto postup k uchování spermatických buněk má mrazení spermatu široké uplatnění napříč obory. Kromě reprodukční medicíny, zemědělství a akvakultury, zaujímá významné místo v oblasti biotechnologie a ochrany ohrožených živočišných druhů (Holt 1997, Andrabi & Maxwell 2007). Salamon a Maxwell (2000) zmiňují význam konzervovaného spermatu pro zachování národních plemen. Své místo našlo v biomedicínském výzkumu, zaměřeném na produkci transgenních organismů. Zavedení kryokonzervace do praxe přispělo k expanzi reprodukční techniky (Medeiros et al. 2002).

4.2 Historie kryokonzervace

Vývoj metody kryokonzervace souvisí s touhou člověka objevit biologickou podstatu rozmnožování a těchto poznatků využít v chovu hospodářských zvířat či v medicíně.

Když v roce 1678 Leeuwenhoek a Hamm poprvé v mikroskopu pozorovali samčí pohlavní buňky, jejich objev vyvolal zájem o uchování spermatu a jeho další využití. První známý pokus konzervovat sperma za použití teploty pod bodem mrazu provedl italský duchovní, profesor přírodních věd a fyziolog L. Spallanzani v roce 1776, kdy jako mrazicí médium použil sníh (Ciani et al. 2012). Otevřel tak cestu AI. O devět let později se Spallanzanimu podařilo úspěšně inseminovat fenu (Goericke-Pesch & Hoffmann 2007).

Metody konzervace spermatu, výroby inseminačních dávek a umělé inseminace se od té doby vyvíjejí ve vzájemné těsné souvislosti. Už v roce 1885 formuloval Repiquet myšlenku využití AI pro šlechtění (Goericke-Pesch & Hoffmann 2007). I. I. Ivanov a V. K. Milovanov ji aplikovali v chovu ovcí a v roce 1927 už existovaly velké šlechtitelské programy chovu skotu (Salamon & Maxwell 2000; Goericke-Pesch & Hoffmann).

Přestože chlad umožňoval uchování spermatu, negativně ovlivňoval jeho fyziologické vlastnosti. Zmírnění účinku chladového šoku na odebrané sperma přidáním vaječného žloutku se stalo historickým milníkem ve vývoji kryokonzervace (Salamon a Maxwell 2000).

V roce 1937 byl poprvé popsán kryoprotektivní účinek 9,2% roztoku glycerolu na vzorek spermatu při teplotě -21 °C (Bernstein & Petropavlovsky 1937) a v roce 1949 jej Polge et al. (1949) použili jako kryoprotektant spermatu drůbeže. V téže době byly uskutečněny první

pokusy o vitryfikaci žabích spermií ošetřených hypertonickým roztokem sacharózy (Luyet & Hodapp 1938).

Jako další milník v historii kryokonzervace uvádí Lv et al. (2019) změnu mrazícího média. Nahrazení suchého ledu (-79 °C) kapalným dusíkem (-196 °C) během padesátých let dvacátého století významně prodloužilo dobu použitelnosti zmrazeného spermatu.

Lv et al. (2019) dále uvádí, že od té doby se pozornost vědců soustředila na výběr kryoprotektantů. V roce 1952 se narodilo první tele metodou AI s použitím zmrazeného spermatu, přičemž sperma bylo mrazeno při -79 °C v ampulích (Polge & Rowson 1952).

Technika mrazení vyvolala experimenty, týkající se rychlosti mrazení a rozmrazování materiálu, stejně jako nové metody skladování v peletách a pejetách. Pozornost věnovaná kryoprotektivním látkám přešla v současnosti nový směr. Konvenční, komerčně vyráběná ředidla jsou obohacována o vitamíny, antioxidanty a další látky, které mají teoretický potenciál pozitivně ovlivnit vitalitu a oplozovací schopnost spermií.

4.3 Výhody kryokonzervace

Jak už bylo zmíněno, jednou z velkých výhod kryokonzervace je, že semeno ve zmrazeném stavu může být teoreticky uchováno neomezenou dobu (Lv et al. 2019). Z hlediska ekonomiky, managementu chovu i welfare zvířat má význam i skutečnost, že veškerý odebraný materiál prochází zdravotní kontrolou, zvířata není nutné transportovat na vzdálená místa a životnost zmrazeného ejakulátu přesahuje délku života vynikajících plemenů. Avšak konzervace biologického materiálu za použití nízkých teplot přináší i rizika.

4.4 Nevýhody kryokonzervace

Přes pokrok, kterým kryokonzervace prošla, stále až 50 % spermií po rozmrazení ztrácí životaschopnost (Watson 2000). Medeiros et al. (2002) uvádí u berana 40–60 % pohyblivých a pouhých 20–30 % biologicky funkčních spermií po rozmrazení. V případě ovcí autoři upozorňují na problém s intracervikální AI v důsledku anatomické stavby jejich reprodukční soustavy a uvádějí zvýšenou embryonální mortalitu (Gillan et al. 2004, Barbas & Mascarenhas 2009).

Z hlediska ekonomiky a managementu uchovávání biologického materiálu v tekutém dusíku je nevýhodou spotřeba chladícího média a potřeba technických prostředků. Technologické vybavení se však týká i metod vitryfikace a lyofilizace.

4.5 Faktory ovlivňující kryokonzervaci

Beraní a kozlí spermie jsou náchylnější k poškození chlazením a mrazením než spermie jiných hospodářských zvířat (Evans & Maxwell 1987). Ačkoli zmrazením ejakulátu by mělo dojít k potlačení metabolických funkcí spermií, Bailey et al. (2003) uvádí, že během procesu zmrazení a rozmrazení značný podíl spermií ztratí oplozovací schopnost. La Falci et al. (2002) rozdělili vlivy ovlivňující kvalitu zmrazeného spermatu na řadu endogenních a exogenních faktorů, které stojí za letálním a subletálním poškozením buněk mrazem. Lv et al. (2019) uvádí, že mechanismus kryopškození není doposud znám a vidí cestu k odhalení tohoto procesu ve výzkumech proteinů a RNA.

4.5.1 Exogenní faktory ovlivňující kryokonzervaci

Mezi exogenní faktory La Falci et al. (2002) řadí rod, druh, plemeno, sezónní odchylky kvality spermatu i individuální odchylky jedince, dané krmením. Objevily se v té souvislosti pokusy ovlivnit výsledky kryokonzervace úpravou krmných dávek odebíraných jedinců. Purdy (2006) analyzoval a potvrdil podíl mezidruhových rozdílů na kryosenzitivitě. Vliv plemen, odchylky jedinců v rámci plemen i variabilitu ejakulátu hodnotili Medrano et al. (2010) nebo Ramón et al. (2013), kteří tuto variabilitu taktéž potvrdili.

4.5.2 Endogenní faktory ovlivňující kryokonzervaci

Endogenní faktory dle La Falci et al. (2002) zahrnují stavbu a biochemické vlastnosti spermatu. Proces kryokonzervace vychází z předpokladu, že ve spermatu za běžné pokojové teploty probíhají metabolické děje, které vedou k vyčerpání energie, okyselení vnitřního prostředí buňky a snížení oplozovacích schopností spermií, kterým se dá zabránit mrazením, avšak stejně tak dochází ke snížení plodnosti z důvodu poškození spermií mrazením a rozmrazováním, protože teplota pod bodem mrazu způsobuje fyzikální a chemické změny v membránách spermií, následné poškození funkčnosti či buněčnou smrt (Zamiri 2020).

Purdy (2006) uvádí, že toto poškození je částečně ireverzibilní. Kromě modifikace membrány spermií však k poškození spermií dochází spolupůsobením chladového šoku, oxidačního stresu, kolísáním osmotického tlaku, tvorby ledových krystalů v buňce i toxicitou kryoprotektantů. Poškozené spermie pak mají sníženou oplozovací schopnost.

Medeiros et al. (2002) potvrdili vliv složení plazmatické membrány spermií na schopnost překonat zmrazení.

Salamon a Maxwell (1995) uvádí, že u ovcí je uspokojujících výsledků oplodnění zmrazeným spermatem dosaženo jen za předpokladu, že se použije laparoskopická metoda AI a sperma se vkládá přímo do vejcovodu ovce. Vyslovili spolu s tím myšlenku, že rozmrazené sperma berana není schopné úspěšně projít rozmnožovacím ústrojím ovce.

Bailey et al. (2003) analyzovali povahu subletálního poškození spermií a všimli si kromě snížené pohyblivosti i faktu, že počet živých spermií se po rozmrazení také snižuje, a navíc se u přeživších spermií snižuje oplozovací schopnost.

4.6 Postup kryokonzervace

Kryokonzervace spermatu probíhá v následujících krocích: ředění, kryoprotekce, chlazení, mrazení, skladování a rozmrazení. Pro jednotlivé druhy hospodářských zvířat existují standardizované postupy. Přes dlouhou historii a probíhající výzkum však výsledky stále nejsou uspokojivé. Každý z kroků v rámci metody kryokonzervace má vliv na výsledný efekt, proto je nutné posuzovat proces jako vzájemně propojený celek.

Obecně používanou teplotou mrazení spermatu je $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, což je bod varu tekutého dusíku. Je to teplota, kdy ustávají veškeré biochemické procesy v buňce. Úkolem správné techniky kryokonzervace je minimalizovat dopady působení metabolitů látkové přeměny uvnitř spermie, ředidel spermatu, osmotického tlaku, tvorby intracelulárních ledových krystalů.

V současnosti se používají tři metody kryokonzervace: pomalé mrazení, rychlé mrazení a vitrifikace. Metoda lyofilizace také obsahuje krok spojený s mrazením spermatu, její hlavní podstatou je však vysušení, které ale působí destruktivně, zejména pokud jde o pohyb spermií.

Pomalé mrazení je dvou až třikroková metoda mrazení spermatu, při které dojde ke zmrazení buněk v rozmezí 2-4 h. Sperma se zchladuje postupně v krocích, během nichž jsou ke spermatu přidávány kryoprotektivní látky v dávkách, aby nedocházelo k toxickému šoku a aby buňky byly schopny redukovat osmotický tlak. Sperma je zmrazeno z $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $1-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Vzorky v peletách či pejetách jsou ponořeny do tekutého dusíku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mrazení se provádí ručně nebo za pomoci programovatelných mrazáků, které zmrazí vzorek z běžné pokojové teploty na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a poté $6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Jakmile vzorky dosáhnou nastavené teploty, jsou přemístěny tekutého dusíku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Holt 2000).

Metoda rychlého mrazení je známa od 90. let 20. století. Spočívá v mrazení vzorků v parách tekutého dusíku po dobu 8-10 min. Vzorek spermatu se nejprve naředí kryoprotektantem, naplní se do pejet a nechá se inkubovat po dobu 10 minut při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pejety jsou umístěny horizontálně 15-20 cm nad hladinou tekutého dusíku a mrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 min a poté jsou ponořeny do tekutého dusíku. Metoda má nevýhodu v tom, že teplotní křivku nelze přesně kontrolovat a teplota může kolísat.

Pokud jde o vitrifikaci, Isachenko (2003) vidí výhody metody v tom, že je rychlá a pro její provedení není potřeba drahého vybavení. Nevýhodou ve vztahu ke vzorku jsou vysoké hladiny kryoprotektantů, které zde činí 30-50 %, zatímco při pomalém mrazení se jejich hladina pohybuje v rozmezí 5-7 %. Taková hladina kryoprotektantu je pro buňky toxická a vystavuje je velkému osmotickému tlaku. Vysoká hladina kryoprotektantu však způsobuje snížení bodu mrznutí roztoku a místo tvorby ledových krystalů dochází k jeho houstnutí až sklovatění, což vede k menšímu riziku buněčné zranění ledovými krystaly.

Jakmile je sperma naředěno, chladí se na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při této teplotě je přidán kryoprotektant (Polge et al. 1949). Proces přechodu ze zchlazeného do zmrazeného stavu představuje pro spermatickou buňku chladový stres. Dochází k přeskupení a destabilizaci složek plazmatické membrány a influxu vápenatých iontů (Bailey et al. 2003).

Medeiros et al. (2002) formulovali faktory, které způsobují mezidruhovému rozdíly v působení chladového stresu. Jsou jimi: množství cholesterolu, poměr fosfolipidů, obsah lipidů ve dvojvrstvě, stupeň nasycení uhlovodíkových řetězců a bílkovin v buňkách.

Membránová permeabilita se chlazením zvyšuje, stává se netěsnou. Je ovlivněna regulace vápníku a tím i buněčné funkce. Jak bylo zmíněno dříve, příjem vápníku během chlazení

navozuje u spermií kryokapacitaci, který vede k fúzi mezi plazmatickou a akrozomální membránou, což vede k poškození akrozómu (Purdy 2006). Watson (2000) vyslovil myšlenku, že struktura membrány podléhá genetickým vlivům, způsobí, že sperma některých jedinců v rámci plemene je odolnější vůči poškození mrazem. White (1993) uvádí, že spermie jsou složeny z fosfolipidů druhově specifickým způsobem a každý fosfolipid má přesnou teplotu fázového přechodu. Stupeň strukturálního poškození tedy závisí na teplotě a lipidovém složení. Spekuloval též o tom, že zvýšená propustnost membrány je způsobena nevratností strukturální změny v membránové architektuře, způsobené chlazením pod termotropním fázovým přechodem membránových fosfolipidů. Na přechodu teplot dochází k náhlé změně z gelu na fázi tekutých krystalů membránových fosfolipidů, což vede k nevratným změnám membránové stavby a způsobuje její zvýšenou propustnost.

Plazmatická membrána je hlavním místem poškození spermie během zmrazení a rozmrazení (Hammerstedt et al. 1990). Když je sperma mrazeno, tvoří se v extracelulární prostoru ledové krystaly, mění se osmotický tlak a intracelulární tekutina difunduje ze spermie, čímž se buňka dehydruje. Při tání jev probíhá obráceně. Osmotický stres působí deformaci membrány.

4.7 Vliv složení semenné plazmy

Lv et al. (2019) uvádí, že semenná plazma kozlů na rozdíl od beraní obsahuje enzym koagulující vaječný žloutek (dále EYCE), který může ohrozit životaschopnost spermií v přítomnosti mléka nebo vaječného žloutku. Jedná se o fosfolipázu A produkovanou bulbouretrální žlázou kozlů. Fosfolipáza A koaguluje vaječný žloutek a hydrolyzuje lecitin na mastné kyseliny a spermicidní lysolecitiny. Také vyvolává akrozomální reakci a dekondukcii chromatinu (Purdy 2006). Dalším enzymem, který produkuje bulbouretrální žláza kozlů je 55-60 kDa glykoprotein lipáza (dále SBUIII), která může vyvolat akrozomální reakci a následně snížit přežití kozlích spermií zmrazených v ředidlech na bázi mléka, a navíc může hydrolyzovat triolein i mléčné triglyceridy na volné mastné kyseliny, které silně poškozují motilitu spermií a plazmatickou membránu (Pellicer-Rubio & Combarous 1998). Nuti (2007) se domnívá, že EYCE a SBUIII představují tentýž protein. V každém případě mají tyto látky negativní vliv na kryokonzervaci spermatu kozlů při použití ředidel na bázi mléka či vaječného žloutku, proto se ze spermatu kozlů semenná plazma odstraňuje centrifugací při 550–950 g po dobu 10–15 minut. Odstraňování semenné plazmy má však i negativní vliv, protože plazma obsahuje látky nutné pro metabolismus spermií.

Upreti et al. (1998) studovali přítomnost L-aminooxidázy ve spermatu některých zvířecích druhů (býk, hřebec, beran). Tato látka reaguje s ředidly na bázi vaječného žloutku a je významným zdrojem škodlivých ROS spolu s Mitochondriemi, lipoxigenázou a NADPH oxidázou (NOX5). Mechanismy vzniku oxidačního stresu ve spermiích definoval Aitken (2020). Oxidační stres vede k peroxidaci membránových lipidů a produkci aldehydů, které se vážou na DNA a poškozují ji.

5 Kryoprotektanty

Kryoprotektanty mají ochrannou funkci tím, že chrání buněčné struktury vně i zevnitř před poškozením ledovými krystaly, osmózou nebo chladovým šokem. Dělí se na penetrující a nepenetrující.

5.1 Nepenetrující kryoprotektanty

Nepenetrující kryoprotektanty působí pouze z vnější strany buněčné membrány a mají tak méně negativních účinků i menší toxicitu. Mezi nepenetrující kryoprotektanty patří bílkoviny, aminokyseliny a cukry, které se chovají jako osmoprotektanty. Zároveň mají schopnost mírnit poškození způsobená penetrujícími kryoprotektanty.

Osmoprotektanty přispívají k udržení osmotického tlaku uvnitř buňky. Mají nižší molekulární hmotnost, nepronikají do buňky, a proto nejsou pro buňku toxické. Patří mezi ně bovinní sérový albumin, trehalóza a sacharóza, polyvinylpyrrolidon. Pozitivní vliv trehalózy na mrazené buňky prověřili Eroglu et al. (2000)

5.1.1 Trehalóza

Trehalóza (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranosid) a cukry jako je rafinóza a sacharóza jsou v centru pozornosti výzkumu reprodukce. Jejich osmoprotektivní účinek spočívá v tom, že působením vyššího osmotického tlaku vytlačují z buňky vodu, jež je za teploty pod bodem mrazu zdrojem tvorby ledových krystalů uvnitř buňky. Trehalóza navíc reaguje s membránovými fosfolipidy a jejich přestavbou zajišťuje jejich větší tekutost a snižuje poškození membrány během změny skupenství lipidů z tuhého na sklovité (Molinia et al. 1994a)

5.2 Penetrující kryoprotektanty

Penetrující kryoprotektanty mají schopnost procházet plazmatickou membránou a mohou tak chránit buňku zevnitř i zvnějšku. Zvyšují tekutost membrán pomocí přestavby membránových lipidů a bílkovin, které se projevuje větší dehydratací buňky při nižších teplotách. Tím se snižuje tvorba ledových krystalů uvnitř buněk. Do této skupiny patří glycerol a vaječný žloutek.

Většina penetrujících kryoprotektantů jsou sacharidové látky, které vytváří koloidy. Patří sem glycerol, diethylsulfoxid, ethylenglykol, propylenglykol, které jsou testovány na kozlích spermích.

5.2.1 Vaječný žloutek

Vaječný žloutek je jedním z nejdéle používaných kryoprotektantů. Jeho ochranná schopnost je založena na přítomnosti LDL proteinů a fosfolipidů, pronikajících do spermie. Aby se zamezilo nežádoucí reakci se sekrety bulbouretrální žlázy kozlů, hledala se řešení v promývání spermií v roztoku PBS a následné centrifugaci (Batista et al. 2014) nebo v použití ředidla s velmi nízkým 2-3% obsahem žloutku. Některé studie testovaly žloutky vajec různých ptačích druhů, jako kuře domácí (*Gallus gallus domesticus*), husa (*Anatidae anser*), krůta (*Meleagris gallopavo*), kachna (*Anatidae anas platyrhynchos*), křepelka japonská (*Coturnix japonica*) a orebice čukar (*Alectoris chukar*) na kvalitu spermatu po kryokonzervaci semene berana. Výsledky ukázaly, že vaječný žloutek orebice má nejlepší kryoprotektivní účinek na motilitu i vyšší procento životaschopnosti (59%) spermií. Integritu membrány nejlépe zachoval žloutek křepelčích vajec, jinak nebyly pozorovány větší rozdíly (Kulaksiz et al. 2010).

Vaječný žloutek je běžnou součástí ředidel spermatu. Chrání spermatické buňky před chladovým šokem během mrazení a rozmrazování. Při mrazení spermií malých přežvýkavců má horší výsledky než při mrazení býčího spermatu. Salamon a Maxwell (2000) uvádějí, že v počátcích výzkumu mrazení beraních spermií bylo používáno 30–50 % vaječného žloutku v ředidle spermatu, pro ředění beraního spermatu v ampulích však uvádí 3–6 % a pro mrazení v peletách 15 %. Dále uvádějí studie, v nichž přidáním komplexu sacharóza – EDTA – CaNa₂ bylo možné snížit dávku vaječného žloutku na 4–5 % a naopak při mrazení beraního spermatu bez použití glycerolu bylo nutné navýšit obsah vaječného žloutku na 20–30 %.

5.2.2 Sójový lecitin

Vývojové tendence v oblasti kryoprotektantů se odklánějí od použití ředidel obsahujících složky živočišného původu. Vznikly studie, hledající cestu v použití sójového lecitinu (Del Valle et al. 2013, Salmani et al. 2014). Sójový lecitin je fosfolipid, složený z mastných kyselin, glycerolu, kyseliny fosforečné a cholinu. Přispívá emulgaci tuků ve vodném prostředí, přestavbou lipidů. Salmani (2014) zjistil, že optimální koncentrace lecitinu v ředidle spermatu je 1,5 % a sójový lecitin je vhodnou alternativou žloutku pro kryokonzervaci spermatu kozlů.

Jerez et al. 2016 zkombinoval sójové mléko a glycerol, které porovnával s DMF a zjistil, že sójové mléko a glycerol je vhodnější pro kryokonzervaci semene beranů.

5.2.3 Glycerol

Glycerol chrání spermie před mechanickým poškozením ledovými krystaly tak, že snižuje bod mrznutí intracelulární i extracelulární tekutiny pod bod mrazu a omezuje změny osmotického tlaku. Vysoké koncentrace glycerolu způsobují pomalým průchodem přes buněčnou membránu osmotické poškození (Guthrie et al. 2002).

Glycerol je jeden z nejpoužívanějších penetrujících kryoprotektantů. 1-8% glycerol, diethylsulfoxid, ethylenglykol jsou používány v ředidlech pro kryokonzervaci kozlích spermií (Tuli & Holtz 1994), přičemž jsou testovány i kombinace těchto látek. Množství glycerolu,

kteřé je možné přidat ke spermatu je ovlivněno jeho toxicitou. Optimální koncentrace glycerolu závisí na složení ředidla spermatu a částečně na jeho osmotickém tlaku (Salamon 1968, Lightfoot & Salamon 1969a, cit. dle Salamon & Maxwell 2000).

5.2.4 Ethylenglykol

Mezi novějšími penetrujícími kryoprotektanty se objevil ethylenglykol, dvojmocný alkohol, používaný běžně v nemrznoucích směsích, který se však osvědčil hlavně pro kryokonzervaci embryí. Proto se jím nezabýváme podrobněji.

5.3 Moderní kryoprotektanty spermatu malých přežvýkavců

5.3.1 Jednoduché cukry

Spermatické buňky potřebují energii, pokud mají přežít v *in vitro* podmínkách. Za tím účelem se do ředidel přidávají jednoduché cukry, jako například fruktóza, laktóza nebo kyselinu citrónovou (Amirat et al. 2005).

Přítomnost cukrů také pravděpodobně zvyšuje odolnost membrán k rychlým fyzikálním a morfologickým změnám, které nastávají při rychlém vyloučení vody ze spermií. Má se za to, že je to dáno vznikem vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami cukrů a polárními konci fosfolipidů, takže nahrazují molekuly vody při dehydrataci spermií. Cukry rovněž mohou pomáhat při prevenci poškození spermií zachytáváním solí do viskózních a až téměř sklovitých fází (Woelders et al. 1997).

Akhter et al. (2014) zjišťovali vliv přídavku fruktózy do ředidel na procento březosti u krav. Byla použita ředidla na bázi sušeného mléka s přídavkem fruktózy a bez přídavku. Podíl březích krav po inseminaci byl vyšší u dávek s přídavkem fruktózy.

5.3.2 Hormony

Přidání melatoninu zkoumali Gallego-Calvo et al. (2015), avšak osvědčil se pouze pro konzervaci čerstvého spermatu kozlů, pro kryokonzervaci nevykazoval žádný přínos.

5.3.3 Proteiny

Dle Lv et al. (2019) přidáním nízkomolekulárních proteinů 15-25 kDa může zlepšit integritu buněčné membrány a motilitu spermií po rozmrazení vzorku. Stejnou funkci ale přisuzuje také přidání adhesinu do semenné plasmy.

Přidání semenné plazmy ke zmrazeným spermiím zlepšilo fertilitu u ovcí inseminovaných transcervikálně (Maxwell et al. 1999). Proteiny jako spermadhesin, SPINK3 (Serine Protease Inhibitor Kazal Type 3 nebo caltrin) zamezují kapacitaci cestou stabilizace

membrány nebo inhibice transportu vápníku (Maxwell et al. 2007, Zalazar et al. 2016, cit. dle Tibary & Manar 2017).

Vysoká koncentrace SPINK3 byla nalezena v semenné plazmě beranů s dobrou mrazicí schopností spermatozoí (Rickard et al. 2016, cit. dle Tibary & Manar 2017). Tento protein je známý svou schopností modulovat hladinu vápníku prostřednictvím ovlivňování signálních drah vedoucích ke kapacitaci. Přidání rekombinantního SPINK3 proteinu zlepšilo kvalitu rozmrazeného spermatu, progresivní motilitu a redukovalo akrozomové poškození (Zalazar et al. 2016, cit. dle Tibary & Manar 2017).

5.3.4 Mastné kyseliny

Vzhledem k tomu, že kryokonzervace spermatu snižuje množství lipidů a fosfolipidů v ejakulátu, lze předpokládat, že přídavek mastných kyselin může zlepšit kvalitu ejakulátu po rozmrazení. Ejaz et al. (2014) zkoumali vliv přídavku kyseliny arachidonové do ředidla.

V experimentu byly použity dvě skupiny ředidel s obsahem vaječného žloutku (ng/ml) a s obsahem kyseliny arachidonové (ng/ml). Vzorky s přídavkem kyseliny arachidonové vykazovaly po rozmrazení lepší motilitu, integritu akrozómu i větší podíl živých spermií.

5.3.5 Antioxidanty

V posledním desetiletí se výzkum metody kryokonzervace ejakulátu beranů a kozlů zaměřil na přidávání antioxidantů do ředidel spermatu. (Tibary & Manar 2017). Buněčná membrána spermií obsahuje vysokou koncentraci polynenasycených mastných kyselin, proto je extrémně náchylná k oxidačnímu stresu během kryokonzervace (Del Olmo et al. 2015, Amidi et al. 2016, Toker et al. 2016, cit. dle Tibary & Manar 2017). Spermatozoa jsou přitom před oxidací chráněna řadou antioxidantů a enzymů s antioxidačními vlastnostmi, obsažených v semenné plazmě i samotných spermatických buňkách (Saraswat et al. 2013). Ředidla doplněná o antioxidanty zlepšují po rozmrazení parametry spermatu jako je motilita a membránová integrita (Bucak et al. 2010)

5.3.5.1 Vitamín E

Vitamín E narušením řetězce oxidační reakce redukuje oxidační stres a odstraňuje volné radikály (Saraswat et al. 2013). Významnou úlohu hrají i látky patřící do skupiny thiolů, které taktéž plní detoxikační a antioxidační roli. (Saraswat et al. 2013) Vitamín E, butylovaný hydroxytoluen (BHT) a Tempo měly vliv na přežití spermií integritu membrány a redukovaly ztrátu motility.

5.3.5.2 Vitamín C

Vitamín C v kombinaci s glutathionem (GSH) pozitivně ovlivnil sperma kozlů během skladování při teplotě 5 °C.

5.3.5.3 Glutathion

Mezi enzymatické antioxidanty patří **Glutathion** (GSH), Superoxiddismutáza (SOD), kataláza, přičemž přidáním SOD, GSH a mimetikum superoxid dismutázy (MNTBAP) se snižuje akrozomální poškození (Budai et al. 2014).

5.3.5.4 Trolox

Tibary a Masnar (2017) uvádějí, že aplikaci Troloxu zkoumali Maira et al. (2010), Sicherle et al. (2011), Silva et al. (2013) a Camara et al. 2016. Dospěli k závěru, že Trolox ve spojení s ředidlem na bázi vaječného žloutku potlačuje peroxidaci lipidů membrány spermatických buněk berana. Soares et al. (2015) dokázal, že Trolox přidáný do ředidla na bázi odstředěného mléka má pozitivní vliv na integritu cytoplazmatické membrány ve spermatických buňkách kozla (Soares et al 2015, cit. dle Tibary & Masnar 2017).

5.3.5.5 Aminokyseliny

Aminokyseliny hrají při kryokonzervaci důležitou roli díky svým antioxidačním vlastnostem. Literatura uvádí, že přídavek cysteinu do ředidel zlepšil motilitu a životaschopnost rozmrazených spermií (Sariozkan et al. 2009).

5.3.5.6 Glutamin

Glutamin může vyvolat expresi HSP proteinů v *in vivo* i *in vitro* prostředí. Přídavek glutaminu do ředidel lze využít jako kryoprotektiva pro zlepšení rozmrazených spermií (Yamada et al. 2011).

Studie ukázaly, že přídavek glutaminu do ředidla před zmrazením měl za následek vysokou kvalitu spermií po zmrazení (Bucak et al. 2009). Topraggaleh et al. (2014) prokázali, že přídavek 7,5 mmol cysteinu a 15 mmol glutaminu výrazně zvýšil motilitu spermií a integritu membrán po rozmrazení spermií.

5.3.5.7 Syntetické blokátory vzniku ledových krystalů v buňkách

Zamezení vzniku ledových krystalů během zmrazovacího a rozmrazovacího procesu, je základní problém, kterému kryobiologové čelí (Lv et al. 2019). Lv et al. (2019) dále uvádí, že v roce 1969 De Vries a Wohlschlag objevili v krvi antarktických ryb AFP proteiny (antifreeze proteins), díky kterým tyto ryby dokážou přežít v chladných vodách. Tyto proteiny snižují teplotu mrznutí buněčných tekutin, zamezují tak tvorbě ledových krystalů a v současnosti jsou využívány při kryokonzervaci spermatu beranů, býků, myši či šimpanzů (Lv et al. 2019). U beraního spermatu jsou schopné zlepšit integritu akrozómu po rozmrazení, avšak komerčně

dostupné jsou pouze AFP I, AFP III a glykoprotein, které mají tuto funkci, navíc jejich cena je vysoká, proto se hledají kryoprotektanty, které by mohly AFP nahradit (Lv et al. 2019).

Ukázalo se, že tu funkci by mohl mít modifikovaný polyvinylalkohol (Wowk et al. 2005, cit. dle Lv et al. 2019). 1,3,5-cyklohexantriol, 1,3-cyklohexandiol a 1,4-cyklohexandiol má vlastnosti schopné měnit parametry vzniku ledových krystalů Taylor et al. 2004, cit. dle Lv et al. 2019). Lv et al. (2019) dále uvádí, že cyklohexantriol dokáže zabránit apoptóze betaních spermií během mrazení a rozmrazování.

5.3.6 Ostatní látky

Rather et al. (2016) prokázali pozitivní vliv taurinu a butylovaného hydroxytoluenu na beraní sperma chlazené na 4 °C po dobu 72 h.

Vhodný model ředidla beraního spermatu hledali Bucak et al. (2022) zkoumáním různých kombinací vysokých (5 %) a nízkých (3 %) koncentrací glycerolu, trehalózy a různých dávek boru. Dospěli k názoru, že zvýšení koncentrace boru v ředidle spermatu může mít významné nepříznivé účinky na parametry spermií po rozmrazení, nicméně přiměřené množství boru může snížit kryopoškození kryokonzervace savčích spermií.

Extrakt z hřebíčkových pupenů (*Syzygium aromaticum*) v koncentracích 0, 35, 75 a 115 µg/ml přidali do ředidla ovčího spermatu Baghshavi et al. (2014). Dospěli k závěru, že extrakt z pupenů hřebíčku měl antioxidační potenciál, díky kterému je užitečný jako přísada do ředidel spermatu, a že nejlepších výsledků se dosáhne s maximálním množstvím extraktu z pupenů hřebíčku 75 µg/ml. Navíc bylo zjištěno, že kombinace vaječného žloutku a detergentu zlepšuje kvalitu spermií v procesech chlazení, mrazení a rozmrazování.

6 Ředění ejakulátu

Ejakulát obsahuje větší množství spermií, než je potřeba k oplodnění jedné samice, proto se sperma ihned po odběru ředí vhodným ředidlem, čímž je umožněno použití spermatu osvědčeného samce pro více samic (Zamiri 2020). Dochází tím k optimálnímu využití buněčného potenciálu obsaženého ve spermatu.

Úkolem ředidla je zajistit podmínky vhodné pro přežití spermie mimo organismus. Sperma musí být ředěno sterilním ředidlem za stálého míchání do 15 min. po kontrole ejakulátu, aby bylo zajištěno přežití co největšího počtu spermatických buněk. Pro zabránění chladovému šoku musí mít sperma i ředidlo stejnou teplotu. Rozmezí teplot se uvádí ± 1 °C. Parametry ředidla popsal Louda et al. (2001): ředidlo má být zdrojem energie, má udržovat osmotický tlak, správné pH, elektrolytickou aktivitu a nesmí být pro spermie toxické. Spermie se ředí obvykle při teplotě blízké tělesné teplotě 30–39 °C.

Bailey et al. (2003) uvádí, že složení ředidel a jejich koncentrace hraje velkou úlohu v zachování životních funkcí spermií a že při vysoké úrovni ředění funkce spermií klesá. Evans

a Maxwell (1987) zjistili, že i rychlost ředění spermatu má vliv na přežití spermií při procesu mrazení.

Sperma je před plněním do pelet či pejet ředěno za účelem získání co největšího počtu inseminačních dávek z každého odběru. Saraswat et al. (2013) uvádí, že záměrem je zajistit co nejvyšší míru oplodnění co nejmenším počtem inseminací dávkami s co nejnižším počtem spermatických buněk, aby odebraný materiál byl efektivně využit a při definování volby vhodného poměru semene a ředidla se opírá o výsledky studií Evanse a Maxwella (1987) či Ritara et al. (1990a, b), které uvádějí jako vhodný poměr 1:1 až 1:23. Vhodná koncentrace je $80\text{--}500 \times 10^6$ buněk/ml (Ritar et al. 1990a, b, Karatzas et al. 1997, Purdy 2006, cit. dle Saraswat et al. 2013).

Ředidla se skládají z vody, kryoprotektantu, pufru, cukerné složky, aminokyselin, mastných kyselin, antibiotik a antioxidantů, přičemž poměry jednotlivých složek se vzájemně ovlivňují. Kryoprotektanty, cukerné složky, antioxidanty, aminokyseliny a mastné kyseliny byly popsány v předcházející kapitole, avšak i voda, pufrы a antibiotika mají kryoprotektivní funkci.

6.1 Voda

Sterilní Bi-destilovaná voda či nano-voda tvoří základní médium pro jednotlivé složky ředidel. Murawski et al. (2015) při svých experimentech s mrazením spermatu beranů studovali použití nano-vody, která je zbavena klastrů v nízkoteplotním plazmovém reaktoru, čímž získává specifické vlastnosti, které by mohly mít potenciál zlepšit životaschopnost spermatu po zmrazení a rozmrazení. Pokus, ve kterém porovnali deionizovanou vodu a s nano-vodou ukázal, že při použití nano vody se mrazením vytvářely větší extracelulární krystaly vody. Po rozmrazení sperma vykazovalo nižší hladinu aspartátaminotransferázy a alkalické fosfatázy. Použití nano-vody přineslo podstatné zlepšení oplodňovací schopnosti beraního semene.

6.2 Pufry

Kryoprotektivní účinek pufrů v ředidlech spermatu spočívá v regulaci pH. Tibary a Manar (2017) řadí mezi hlavní pufrы používané pro ředění spermatu malých přežvýkavců kyselinu citrónovou, Tris, případně pufrы obsahující zwitterion, které mají schopnost stabilizovat pH v rozmezí 6,4 – 6,8 a zabránit aglutinaci spermií.

Vlivem pufrů na zranitelnost spermií se zabývali Siddique et al. (2006), kteří k ředění ejakulátu použili ředidla o různé koncentraci TRIS, citrátu sodného, kyseliny citrónové, fruktózy, glukózy, laktózy, vaječného žloutku, glycerolu a antibiotik (penicilinu a dihydroxystreptomycinu). Došli k závěru, že nejvhodnějším ředidlem ke kryokonzervaci bylo takové, které obsahovalo TRIS a citrát sodný v poměru 1:1.

6.3 Antibiotika

Přidání antibiotik do ředidel má za cíl chránit ejakulát před bakteriálními nebo virovými infekcemi. Každé ředidlo má odlišný obsah antibiotik v různém poměru. Antibiotika nemají vliv na aktivitu spermií po rozmrazení (Ennem 1976).

Na druhou stranu, některé studie prokázaly, že je možné odstranit bakterie ze semene fyzicky, bez nutnosti přidání antibiotik (Morrell et al. 2014) metodou SLC (Single layer Centrifugation) pomocí druhově specifického koloidu (Morrell & Wallgren 2011) a bylo prokázáno zlepšení kvality spermií u různých druhů zvířat.

7 Ředidla spermatu

Ředidla jsou tekutiny na bázi vody a přidaných látek, jejichž spolupůsobení má pozitivní vliv na uchování ejakulátu co nejdelší dobu při současném zachování jeho fyziologických a chemických vlastností. Hrají proto zásadní roli v procesu kryokonzervace ejakulátu.

7.1 Vlastnosti ředidel

Ředidla mají za úkol vytvořit vhodné prostředí pro přežití spermatických buněk, poskytovat jim energii, chránit je před poškozením vlivem změny teploty (Purdy 2006), proto by měla mít správné pH, pufrční schopnost, osmolalitu a měla by chránit buňky před poškozením mrazem (Salamon & Maxwell 2000). Louda et al. (2001) poukazuje na to, že by ředidla měla i ekonomicky dostupná. Jako hodnotící kritérium pro vlastnosti ředidel se nejčastěji využívají výsledky testů přežití a oplodňovací schopnosti spermatických buněk po rozmrazení.

7.2 Klasifikace ředidel (dle Salamona a Maxwella)

V roce 1995 Salamon a Maxwell publikovali studii, v níž hodnotili do té doby známá ředidla spermatu, přičemž je seřadili chronologicky podle doby jejich vzniku či uvedení do praxe.

7.2.1 Ředidla na bázi citrátu

Citrátová ředidla vstoupila do praxe na sklonku 60. let 20. století. Jedná se o kombinaci citrátu a vhodné cukerné složky. Salamon a Maxwell (1995) popsali výsledky dosavadních výzkumů a zmiňují, že některé studie, které provedli Emmens & Blackshaw (1950), Markovič (1956) a First et al. (1961a, b) vykazovaly lepší výsledky při použití 0,9 – 1,25% arabinózy,

jiné zase s použitím 1,25% fruktózy (Blackshaw 1960b, Martin 1961, cit. dle Salamon & Maxwell 1995), či 1,5 – 4,0% glukózy (Lopatko 1962), Morozov 1957a, cit. dle Salamon & Maxwell 1995), případně obohacením 5,85% arabinózou o 2,4 % urey (Kuzněcov & Kuprijanova 1959, cit. dle Salamon & Maxwell 1995) a uvedli též, že jednoduché cukry prostupují buněčnou membránou spermií a dokážou tak vyrovnávat osmotický tlak mezi buňkou a vnějším prostředím. Evans & Maxwell (1987) již dříve zmiňují časté požívání hypertonických ředidel při ředění beraního a kozlího ejakulátu.

7.2.2 Ředidla na bázi mléka

Ředidla na bázi mléka působí pozitivně na přežití spermií po rozmrazení především díky obsahu proteinových frakcí, a to zejména kaseinu (Medeiros et al. 2002). Pro ředění beraního spermatu se používá upravené naředěné či odstředěné formě v kombinaci s arabinózou, fruktózou a vaječným žloutkem. Salamon & Maxwell (2000) uvádí, že dosavadní některé srovnávací studie prokázaly u pasterizovaného mléka či pasterizovaného naředěného a odstředěného mléka stejnou účinnost jako u ředidel o složení citrát – vaječný žloutek, mléko – glukóza – vaječný žloutek a citrát – glukóza – vaječný žloutek, avšak vyskytly se i studie, které vykazovaly lepší výsledky při použití odstředěného mléka, než měly pokusy s ředidly citrát – vaječný žloutek nebo ředidla na bázi fruktózy a laktózy. Naředěné mléko ve výše zmíněných kombinacích vstoupilo do praxe, na rozdíl od zahřátého homogenizovaného mléka, které nezvýšilo míru přežití spermií po rozmrazení (Salamon & Maxwell 2000).

7.2.3 Ředidla na bázi laktózy

Úspěšné použití ředidel s obsahem laktózy při ředění býčího spermatu vyvolalo pokusy o aplikaci těchto ředidel na beraní sperma, avšak s rozporupnými výsledky (Salamon & Maxwell 2000). Salamon a Maxwell (2000) dále popsali, že ředidlo laktóza – vaječný žloutek bylo použito pro glycerolované i neglycerolované dávky spermatu s následným přidáním glycerolovaného INRA média. Disacharidy laktóza a sacharóza, zejména v kombinaci EDTA – Na₂ a diethylaminem vykazovaly menší tvorbu ledových krystalů v průběhu mrazení než monosacharidy (Platov 1977 cit. dle Salamon & Maxwell 2000). Salamon a Maxwell (2000) popisují i pokusy s ředidly obsahujícími laktózu, polysacharidem arabskou gumou, arabinovou kyselinu a dextranem, avšak jejich výsledky nebyly příliš uspokojivé.

7.2.4 Ředidla na bázi sacharózy

Sacharóza tvoří hlavní složku syntetických ředidel, díky schopnosti chránit integritu akrozómu spermie lépe než glukóza, fruktóza nebo laktóza (Milovanov & Sokolovskaja 1980b cit. dle Salamon & Maxwell 2000). Podle Salamona a Maxwella (2000) jsou syntetické antioxidanty přidávány do ředidla, aby zabránily peroxidaci spermatických fosfolipidů a nenasycených mastných kyselin, čehož lze dosáhnout i zajištěním anaerobního prostředí.

7.2.5 Ředidla na bázi rafinózy

Rafinóza se dostala do popředí zájmu s výzkumem konzervace býčího spermatu, který prováděli Nagase a Graham (Nagase & Graham 1964, cit. dle Salamon & Maxwell 2000) a bylo zjištěno, že trisacharidy mají lepší protektivní účinek při mrazení spermatu než monosacharidy a disacharidy (Salamon & Maxwell 2000).

7.2.6 Ředidla na bázi Tris

V 70. letech 20. století Salamon a Visser (1972) učinili pokus se začleněním Tris do ředidel beraního spermatu (cit. dle Salamon & Maxwell 2000). Bylo zjištěno, že sperma beranů odolává koncentraci 250–400 mM a glukóza je lepší cukernou složkou ředidla obsahujícího Tris než fruktóza, laktóza nebo rafinóza. Dle Saraswat et al. (2013), Fisher et al. (1987) uvádějí, že Tris má nejlepší schopnost zachování integrity akrozómu spermie a motility, když má rozmrazované sperma osmolalitu 375 mOsm/kg a obsahuje 2 % vaječného žloutku. Komerčně vyráběné ředidlo Triladyl®, založené na bázi Tris má dobré výsledky při transcervikální inseminaci ovcí a přidání 2% hovězího séra dále zvyšuje integritu akrozómu spermií (Salamon & Maxwell 2000).

Purdy (2006) uvádí, že v současnosti je ředidlo Tris – vaječný žloutek – glukóza a sušené odtučněné odstředěné mléko nejčastěji používané pro krykonzervaci spermatu kozlů. Avšak přidání vaječného žloutku nejenže snižuje motilitu spermií a jejich přežití, ale zvyšuje výskyt akrozomálního poškození u řady živočišných druhů (Aboagla et al. 2004, Ritar et al. 1991, Julian et al. 2006, cit. dle Saraswat 2013). Stejně tak protein z bulbouretrální žlázy kozlů (SBUIII), označovaný jako 55–60kDa glykoprotein lipáza (BUSgp60), hydrolyzuje triglyceridy plazmatické membrány a odstředěného mléka za vzniku mastných kyselin, které jsou pro spermie toxické (Pellicer-Rubio & Combarous 1998).

7.2.7 Ředidla na bázi pufrů, obsahující zwitterion, dextran a hydroxyškrob

Salamon a Maxwell (2000) uvádí, že výsledky testů s použitím ředidla Tes, Hepes a Pipes se pohybují od špatných po uspokojivé, avšak Tes v kombinaci s odstředěným mlékem nebo Tes, Hepes a Pipes v kombinaci se zwitterionovým pufrem vykazuje u rozmraženého spermatu vyšší podíl pohyblivých spermií než při ředění ředidlem složeným z Tris – glukóza – vaječný žloutek. Naopak dextran a hydrogenškrob v kombinaci s roztokem složeným z Tes, citrátu, glycinu, laktózy, rafinózy, fruktózy a kyseliny citrónové v prvním kroku ředění s následným druhým krokem ředění ředidlem mléko – citrát má lepší kryoprotektivní účinek než laktóza – vaječný žloutek.

7.2.8 Ředidla na bázi sójového lecitinu

Nahrazení vaječného žloutku ředidly na bázi sójového lecitinu vedlo ke zvýšení motility spermií po rozmrazení (Roof et al. 2012, cit. dle Saraswat et al. 2013), protože tím došlo k odstranění negativní reakce vaječného žloutku s lipázou, obsaženou ve spermatu kozlů.

8 Závěr

Dosavadní téměř stoletý vývoj kryokonzervace naznačil řadu možností, kterými se tato metoda může ubírat. V průběhu let bylo testováno mnoho látek, z nichž řada má schopnost efektivně konzervovat sperma malých přežvýkavců, i když výsledky stále nejsou uspokojivé. Biochemické vlastnosti spermatu malých přežvýkavců kladou zvýšené nároky na složení ředidel spermatu a volbu kryokonzervantů.

Výzkumy posledního desetiletí ukázaly cestu ke zlepšení testováním účinků proteinů, vitamínů, antioxidantů a dalších látek. Prověřují se i nepřímé cesty ke zvýšení oplozníschopnosti spermií, a to prostřednictvím výživy zvířat, či působením specifických druhů záření na spermie. Velké naděje vzbuzují poznatky z oblasti genetiky. Nicméně vyvstává otázka použitelnosti zkoumaných metod v praxi. V našich podmínkách jsou malí přežvýkavci chováni především v malochovech a hobby chovech, chovů střední velikosti není mnoho. Proto je důležité najít takové metody, které jsou aplikovatelné v těchto podmínkách.

Hledání nových kryokonzervačních činidel naráží stále na neobjasněnost některých fyziologických mechanismů buněčných dějů. Zároveň musí být stále bráno v úvahu, že kryokonzervace je mnohokroková metoda, jejíž jednotlivé části tvoří provázaný celek. Metoda ředění ovlivňuje poměry použitých kryokonzervačních prostředků.

Z dosavadních poznatků vyplývá, že antioxidanty mohou do budoucna pomoci zlepšit výsledky kryokonzervace spermatu malých přežvýkavců, je však zapotřebí dalších studií k ověření jejich efektivity. V každém případě je však třeba se zaměřit na látky, které jsou snadno získatelné, ekonomicky dostupné, snadno uchovatelné a co nejméně toxické, aby mohly být zavedeny do široké praxe.

9 Literatura

- Andrabi SMH, Maxwell WMC. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal reproduction science* 99:223–243.
- Aitken RJ. 2020. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction* 159:R189–R201.
- Akhter S. 2014. Effect of Fructose in Extender on Fertility of Buffalo Semen. *Pakistan Journal of Zoology* 46
- Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 129:535–543. Bioscientifica.
- Bailey J, Morrier A, Cormier N. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Canadian journal of animal science* 83:393–401.
- Baghshahi H, Riasi A, Mahdavi AH, Shirazi A. 2014. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology* 69:482–487. Elsevier BV.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking* 10:49–62.
- Batista M, Nino T, Santana M, Alamo D, Cabrera F, Gonzalez F, Gracia A. 2014. Post-thaw quality of buck semen samples cooled at 5 degrees C up to 2 days before cryopreservation. *Small Ruminant Research* 121:101–105.
- Bernstein AD, Petropavlovsky VV. 1937. Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull Eksp Biol Med* 3:41–43.
- Bucak MN et al. 2022. Combination of trehalose and low boron in presence of decreased glycerol improves post-thawed ram sperm parameters: A model study in boron research. *Andrology* 10:585–594. Wiley.
- Ciani F, Cocchia N, Esposito L, Avallone L. 2012. Fertility Cryopreservation. Pages 225–248 in B. Wu, editor. *Advances in Embryo Transfer*. IntechOpen, London.
- Cibulka J, Fučíková A, Härtlová H, Jílek F, Lánská V, Sedmíková M. 2004. *Základy fyziologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Del Valle I, Souter A, Maxwell WMC, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2013. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal reproduction science* 138:213–219.

- Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology* 74:795–804. Elsevier BV.
- Eddy E. 2006. The Spermatozoon. Pages 3–54 in Neill JD, Wassarman P, editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press. Elsevier.
- Ejaz R, Ansari MS, Rakha BA, Ullah N, Husna AU, Iqbal R, Akhter S. 2014. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi buffalo bull semen. *Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]* 49:122–125. Wiley
- Ennen BD, Berndtson WE, Mortimer RG, Pickett BW. 1976. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in .25-ML straws. *Journal of animal science* 43:651–656. Oxford University Press (OUP).
- Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H, Toner M. 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature biotechnology* 18:163–167.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's artificial insemination of sheep and goats*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Faigl V, Vass N, Jávora A, et al. Artificial insemination of small ruminants - A review. 2012. *Acta Veterinaria Hungarica* 60:115–129.
- Gao D, Mazur P, Critser JK. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. Pages 263–328 in Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive Tissue Banking*. Academia Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-399770-8.X5000-X
- Gillan L, Maxwell WMC, Evans G. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, fertility, and development* 16:447–454.
- Goericke-Pesch S, Hoffmann B. 2007. Cryopreservation of Spermatozoa in Veterinary Medicine. *Journal fur Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 4:101–105.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine Spermatozoa1. *Biology of reproduction* 67:1811–1816.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl* 11:73–88.
- Ho H-C, Suarez SS. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of reproduction* 68:1590–1596.
- Holt WV. 1997. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, fertility, and development* 9:309–319.
- Isachenko V et al. 2003. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology* 59:1209–1218.

- Jerez R, González N, Olaciregui M, Luño V, Blas I de, Gil L. 2016. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small ruminant research: the journal of the International Goat Association* 134:34–38.
- Kulaksız R, Çebi Ç, Akçay E, Daşkın A. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small ruminant research: the journal of the International Goat Association* 88:12–15.
- La Falci VSN, Tortorella H, Rodrigues JL, Brandelli A. 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57:1035–1048.
- Louda F, Čeřovský J, Jeřková A, Stádník L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnologických metod. ČZU, Praha.
- Luyet BJ, Hodapp EL. 1938. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 39:433–434.
- Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. 2019. Spermatozoa cryopreservation: State of art and future in small ruminants. *Biopreservation and biobanking* 17:171–182.
- Marvan F. 2017. Morfologie hospodářských zvířat. Vydání šesté. Česká zemědělská univerzita v Praze v nakladatelství Brázda, Praha.
- Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57:327–344.
- Medrano A, Terrazas A, Soto R. 2010. Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. *Small ruminant research: the journal of the International Goat Association* 89:140–143.
- Morrell JM, Wallgren M. 2011. Control of bacterial contamination in boar semen doses. *Strana Science and Technology Against Microbial Pathogens. WORLD SCIENTIFIC.* Dostupné z http://dx.doi.org/10.1142/9789814354868_0059.
- Morrell JM, Wallgren M. 2014. Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. *Pathogens* 3:934–946. MDPI AG.
- Murawski M et al. 2015. The utility of nanowater for ram semen cryopreservation. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 240:611–617.
- Nuti L. 2007. Techniques for artificial insemination of goats. Pages 529–534 in *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Elsevier.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. 1999. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium. *Theriogenology* 51:461–472.
- Pellicer-Rubio M-T, Combarrous Y. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Reproduction* 112:95–105.

- Polge C, Rowson LEA. 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79° C. *Nature* 169:626–627.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research: the journal of the International Goat Association* 63:215–225.
- Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ERS, Garde JJ. 2013. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. *Biology of reproduction* 89:110.
- Ritar AJ, Ball PD, O'May PJ. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, fertility, and development* 2:27–34. CSIRO Publishing.
- Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology* 68:276–280.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal reproduction science* 38:1–36.
- Salamon S, Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Animal reproduction science* 62:77–111.
- Saraswat S, Jindal SK, Kharche SD. 2013. Kryopreservation of sperm in ruminants - A review. *Wayamba Journal of Animal Science*.
- Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A. 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58:134–138. Elsevier BV.
- Siddique M, Ali R, Raza A. 2006. Short communication: effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *J Agr Soc Sci* 2:117–119.
- Tibary A, Manar S. 2018. Cryo-preservation of sperm and embryos in small ruminants.
- Toker MB, Alcay S, Gokce E, Ustuner B. 2016. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology* 72:205–209.
- Topraggaleh TR, Shahverdi A, Rastegarnia A, Ebrahimi B, Shafiepour V, Sharbatoghli M, Esmaili V, Janzamin E. 2014. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia* 46:777–783. Wiley.

- Tuli RK, Holtz W. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42:547–555. Elsevier BV.
- Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF. 1998. Studies on aromatic amino oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science* 51:275–287.
- Věžník Z, Švecová D, Zajícová A, Přenosilová P. 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno.
- Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of reproduction* 59:1–6.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science* 60-61:481–492.
- Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. 2021. Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell transplantation* 30. SAGE Publications. DOI: 10.1177/0963689721999617
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, fertility, and development* 5:639–658.
- Woelders H, Matthijs A, Engel B. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35:93–105. Elsevier BV.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. Pages 189–317 in Knobil E, Neill JD, editoři. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.
- Zamiri M. 2020. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. *Journal of Livestock Science and Technologies* 8:1–15.
- Zeng Y, Clark EN, Florman HM. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Developmental biology* 171:554–563.

