Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

Faktory zlepšující kryorezistenci spermatu kozlů u národních plemen koz

Bakalářská práce

Petra Mikasová

Chov hospodářských zvířat

Ing. Martin Ptáček, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Faktory zlepšující kryorezistenci spermatu kozlů u národních plemen koz" jsem vypracoval(a) 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 autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2023 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, rady a trpělivost při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a kamarádům za podporu a motivaci v průběhu mého studia.

Faktory zlepšující kryorezistenci spermatu kozlů u národních plemen koz

Souhrn

Bakalářská práce byla zaměřena na téma Faktory zlepšující kryorezistenci spermatu kozlů u národních plemen koz. V České republice je převaha malochovů koz, ve kterých se méně často využívá metoda inseminace koz s její návazností na kryokonzervaci spermatu. Přesto je důležité se v problematice konzervace spermatu a jeho odolnosti při skladování dále vzdělávat. Hlavně z důvodu udržení dostatečného počtu inseminačních dávek v programu na ochranu národního genofondu původních plemen, do kterého patří právě také tato dvě plemena koz. Koza bílá krátkosrstá a koza hnědá krátkosrstá jsou původní česká mléčná plemena zařazená do genetických zdrojů České republiky.

Faktory ovlivňující kvalitu a odolnost spermií před i po rozmrazení byly zpozorovány ještě před zpracováním spermatu. K těmto faktorům patřili například kvalita krmné dávky a vliv stopových prvků do ní přidaných, věk odebíraného samce, tělesná kondice spojená se zdravotním stavem, nakonec období a způsob odběru spermatu kozla.

V práci byly popsány základní způsoby vyšetření ejakulátu, díky kterým se zjišťuje kvalita spermatu. Nejdůležitější parametry charakterizující kvalitu čerstvého nebo rozmrazeného spermatu, hodnocenými buď CASA, průtokovou cytometrie nebo HOST testem, byly celistvost plazmatické membrány, životaschopnost, pohyblivost spermií a další.

Při dlouhodobém skladování spermatu je nutné spermie zmrazit při -196°C v tekutém dusíku. Kryokonzervace má na spermie vysoké fyzické i chemické nároky. Tudíž je potřeba používat taková ředidla s kryoprotektanty která zajistí dostatek energie a ochrany pro spermie během dlouhodobého skladování. Kryoprotektory se dělí na penetrační a nepenetrační. Jako nepetrační kryoprotektant byl používán nejvíce vaječný žloutek, který byl kvůli jeho hygienické nebezpečnosti nahrazen rostlinným sójovým lecitinem. Nejpoužívanějším penetračním kryoprotektantem byl glycerol, u něhož byla popsána důležitá ideální koncentrace přidaná do ředidla, která se lišila mezi plemeny koz. Do ředidel byly přidány další komponenty, které byly schopné výrazně ovlivnit schopnost kryoresistence spermií. Jednalo se o antioxidanty, cukry a aminokyseliny. V neposlední řadě byly spermie ovlivněné také způsobem a délkou ochlazování a následného zmrazení.

Klíčová slova: antioxidanty, ředidlo, kryoprotektiva, genetické zdroje

Factors improving buck sperm cryo-resitance in national goat breeds

Summary

The bachelor's thesis focused on Factors improving the cryo-resistance of goat sperm in national goat breeds. There is a predominance of small-scale goat breeding in the Czech Republic, in which the method of insemination of goats connected to the cryopreservation of sperm is used less frequently in the Czech Republic. Nevertheless, we must continue educating ourselves on sperm conservation and its resistance during storage. This is mainly due to maintenance for maintaining sufficient insemination doses in the program to protect the national gene pool of original breeds, including these two goat breeds. The White Short-haired Goat and the Brown Short-haired Goat are original Czech dairy breeds included in the genetic resources of the Czech Republic.

Factors affecting the quality and resistance of sperm before and after the freezing were observed even before its processing. These factors included, for example, the quality of the feed ration and the influence of trace elements added to it, the age of the male being sampled, the physical condition associated with health status, and finally, the period and method of goat sperm collection.

This thesis described basic methods of examination of the ejaculate to determine the quality of sperm. The most important parameters characterizing the quality of fresh or thawed sperm, evaluated by CASA, flow cytometry, or HOST test, were plasma membrane integrity, viability, sperm motility, and others.

During long-term storage of sperm, it is necessary to freeze the sperm at -196°C in liquid nitrogen. Cryopreservation places high physical and chemical demands on sperm. It’s required to use diluents with cryoprotectants that provide enough energy and protect for sperm during long-term storage. Cryoprotectants are divided into penetrating and non-penetrating. The egg yolk was used as a non-penetrating cryoprotectant, which was replaced by plant-based soy lecithin because of its hygienic risk. Glycerol is the most common use penetrating cryoprotectant. Glycerol has a significantly described ideal concentration added to the diluent, which differs between goat breeds. To the diluents were added other components, which were able to influence the ability of cryo-resistance of sperm signally. The components include antioxidants, sugar, and amino acids. The sperm was also affected by the method and duration of cooling and subsequent freezing.

Keywords: antioxidants, diluent, cryoprotectants, genetic resources

Obsah

1 Úvod 8

2 Cíl práce 9

3 Literární rešerše 10

3.1 Chov národních plemen koz 10

3.1.1 Národní plemena koz 11

3.1.1.1 Koza bílá krátkosrstá 11

3.1.1.2 Koza hnědá krátkosrstá 12

3.1.2 Program uchování genových rezerv 12

3.2 Ejakulát kozla 13

3.2.1 Sperma 13

3.2.2 Semenná plazma 13

3.3 Faktory ovlivňující parametry spermatu a kryotoleranci 15

3.3.1 Sezónnost 15

3.3.2 Věk 16

3.3.3 Zdraví 16

3.3.4 Tělesná kondice 16

3.3.5 Výživa 17

3.4 Odběr ejakulátu 18

3.4.1 Umělá vagina 19

3.4.2 Elektroejakulace 20

3.5 Hodnocení spermatu po odběru 21

3.5.1 Makroskopické hodnocení 22

3.5.2 Mikroskopické hodnocení 23

3.6 Konzervace spermatu 24

3.7 Ředidla 25

3.8 Extracelulární a intracelulární kryoprotektiva 26

3.8.1 Vaječný žloutek 26

3.8.2 Mléko 28

3.8.3 Glycerol 28

3.8.4 Cukry 29

3.8.5 Aminokyseliny 31

3.8.6 Antioxidanty 32

3.9 Laboratorní metody k ověření fertilizační schopnosti spermií po kryokozervaci 34

3.9.1 CASA 34

3.9.2 Průtoková cytometrie 35

3.9.3 HOST 36
3.10 Ekvilibrace 37
3.11 Rozmrazování 38
4 Závěr 39
5 Literatura 40
6 Seznam použitých zkratek a symbolů 54

1 Úvod

Kozy se těší oblibě na celém světě, hlavně v oblastech se špatnou terénní přístupností nebo tam kde neroste hojně tráva. Všeobecně jsou kozy velmi přizpůsobivá zvířata, ať už se jedná o lokální podnebí nebo špatnou dostupnost vegetace. Dokážou přežívat i v nepříznivých podmínkách s minimem potravy.

Je to menší přežvýkavec, který se řadí mezi jedny z nejstarších domestikovaných užitkových zvířat. Jejich několikastranná užitkovost (mléko, maso, kůže, kožešina) s nízkými investicemi z nich dělá velmi oblíbené domácí zvíře. V Česku se chovají převážně na menších kozích farmách, velkochovy jsou ojedinělé. Přesto, díky jejich oblíbenosti v dřívějších letech, se v České republice vyšlechtila dvě plemena koz. Jedná se o kozu bílou krátkosrstou a kozu hnědou krátkosrstou. Jsou označena jako národní plemena a zařazena do národního programu ochrany genových zdrojů.

Přestože se v chovech koz ve většině případech využívá metoda přirozené plemenitby. Se zvyšujícím se tlakem na užitkovost zvířat dochází k upřednostňování výkonnějších plemen koz a jsou polačována ta původní. Je ale důležité udržet genetickou variabilitu. Když to není možné v podobě zvířat na farmách, přichází na řadu konzervace genetického materiálu ve formě spermií a vajíček. Faktory ovlivňující kryorezistenci spermií neboli odolnost spermií během hlubokého zmrazování, je podstatné znát pro získání kvalitních inseminačních dávek po rozmrazení. Možné způsoby zlepšení těchto faktorů u kozlů začínají již na farmě. Mezi tyto faktory patří například krmení kozlů, jejich věk, kondice a zdraví. Dále se zohledňuje způsob odběru spermatu, po kterém následuje zpracování a ředění pro uchování v tekutém dusíku. Výběrem správného ředidla s obsahem vhodného kryoprotektantu či jejich kombinací lze zvýšit kryorezistenci spermií a jejich oplozovací schopnost po rozmrazení. Vliv má i způsob ochlazování, zmrazení a následně rozmrazení.

Zapojením národních plemen koz do národního genofondu jsou zvýšeny nároky na konzervaci spermií kozlů, které jsou po rozmrazení schopné oplození. Proto je důležité se ve směru kryokonzervace spermatu kozlů dále vzdělávat a studovat odolnost spermatu při dlouhodobém uchovávání pod bodem mrazu.

2 Cíl práce

Důležitým bodem záchranného programu původních českých plemen koz je vytvoření dostatečného reservoáru kvalitních inseminačních dávek dlouhodobě uchovávaných v tekutém dusíku. Obecně je známo, že sperma u malých přežvýkavců má nízkou toleranci vůči konzervaci tímto způsobem. Proto všechny informace, které by vedly ke zlepšení dílčích postupů, jsou důležité s ohledem na záchranu původního českého genofondu koz. Cílem bakalářské práce je soupis aktuálních poznatků zaměřených na definování zásadních faktorů ovlivňujících kryorezistenci spermatu u kozlů. A na základě dostupných informací navrhnout možné postupy pro optimalizaci výroby inseminačních dávek a jejich dlouhodobém uchování.

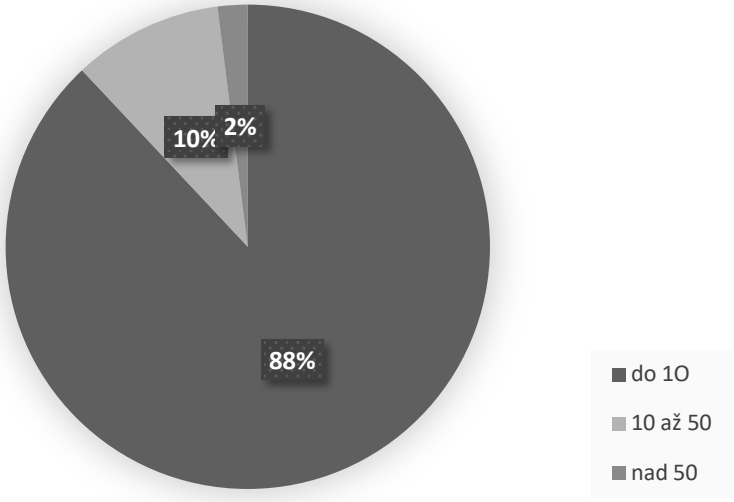
3 Literární rešerše

3.1 Chov národních plemen koz

Chov koz má v České republice bohatou historii a tradici. Již od roku 1929 se začala provádět státní kontrola mléčné užitkovosti koz. Proč kontrola mléčné užitkovost? Chov koz v České republice byl zaměřen především na produkci mléka a jeho další zpracování, a proto dvě hlavní plemena koz, chovaná v naší zemi jsou mléčného typu. Jedná se o kozu bílou krátkosrstou a o kozu hnědou krátkosrstou. Jsou to plemena, přizpůsobená lokálnímu podnebí a patří do programu na zachování genetických zdrojů. Chov koz v České republice měl v posledních desetiletích maloplošný charakter. Znamená to, že kozy chovali soukromníci po malých počtech jen pro svůj užitek a případnou soběstačnost. Po roce 1960 nastal prudký pokles v počtu chovaných koz, ale kolem roku 2000 se stav ustálil a postupně dochází k mírnému nárůstu početních stavů koz (Sztankoova & Rychtarova 2017). V roce 2015 početní stav koz v České republice stoupl na 26 765 kusů, tento stav měl v následujících letch stoupající trend až do roku 2019. V tomto roce klesl stav o 1106 kusů koz a současný stav koz k 1.4.2022 je 24 607 kusů ("ČSÚ" 2022).

V současnosti je chov koz v České republice zaměřen na produkci mléka a jeho následující zpracování na mléčné výrobky, kvalitní sýry, tvarohy a další produkty. Konzumace kozího či skopového masa není u Čechů příliš oblíbená. Průměrná spotřeba masa těchto malých přežvýkavců se pohybuje jen něco kolem 1 % z celkové spotřeby, z čehož kozí maso představuje jen 10 % tohoto množství (Sztankoova & Rychtarova 2017). Počty poražených koz včetně domácích porážek byly v roce 2021 podle Českého statistického úřadu 29 460 ks ("ČSÚ" 2022).

Dnešnímu stavu chovu koz v ČR dominují dvě plemena koz, koza hnědá krátkosrstá, která zaujímá 28 % celkové populace a koza bílá krátkosrstá a ta tvoří 62 % populace. Obě plemena se chovají jak v malochovech, tak i ve velkochovech a jsou zařazeny do Národního programu genetických zdrojů ČR (Horák & Treznerová 2010; Fantová 2012; Sztankoova & Rychtarova 2017). V následujícím grafu (Obrázek 1) je zobrazeno procentuální zastoupení zemědělských podniků s chovem koz v roce 2019 podle počtu koz v podniku (Bucek et al. 2022).



Obrázek 1 Zemědělské podniky s chovem koz k 31. 12. 2019 podle počtu koz v podniku

3.1.1 Národní plemena koz

3.1.1.1 Koza bílá krátkosrstá

Koza bílá krátkosrstá je mléčné plemeno, vyšlechtěné v první polovině 20. století na českém území, a to křížením původních rustikálních koz, lokálně chovaných, se saanenskými kozly, dovezenými z Německa a Švýcarska. Dříve proto bylo plemeno klasifikováno jako saanenské-odvozené, avšak v letech 1954-1955 bylo uznáno jako samostatné plemeno a dnes už se vyskytuje po celém území České republiky (Sztankoova & Rychtarova 2017). Dále během let 1950 až 1990 byla snaha plemeno zušlechťovat opakovaným posíláním inseminačních dávek bílé německé kozy z Německa. Od roku 1996 je snaha o revitalizaci plemene metodou čistokrevné plemenitby, podpořenou zařazením plemen do národních genetických rezerv (Jedlička 2017).

Plemeno je pevné konstituce se středním až velkým tělesným rámcem, klidného temperamentu. U kozlů dosahuje živá hmotnost rozmezí 70-90 kg a u koz 50-60 kg. Kohoutková výška se pohybuje u kozlů v rozmezí 70 až 90 cm a u koz 70 až 80 cm. Tělo pokrývá charakteristicky krátká a hladká srst s možnými kožními přívěsky. Barva srsti je čistě bílá bez dalších povolených barevných příměsí. Dříve byla prováděna přísná selekce na bezrohost u obou pohlaví, dnes už tomu tak není a do chovu se zařazují i rohatí jedinci (“SCHOK”; Jedlička 2017).

Kozy jsou rané a vysoce plodné s dobrou schopností konverze krmiv. Plemenná kniha vznikla v roce 1928 a spolu s ní se zavedla kontrola užitkovosti. Plodnost se pohybuje okolo 200 %, mléčná užitkovost je v průměru 700-1100 kg mléka za laktaci 280 dní. Tučnost mléka by měla být 3,4-3,7 % při obsahu bílkovin 2,8-3,1 % (“SCHOK”).

Koza bílá krátkosrstá je velmi odolné plemeno a setkáme se s ní v intenzivních velkochovech i v malochovech (Mátlová & Konrád 2015b).

3.1.1.2 Koza hnědá krátkosrstá

Koza hnědá krátkosrstá je plemeno mléčného typu vyšlechtěné v první polovině dvacátých let v ČR. Plemeno vzniklo převodným křížením původních selských hnědých koz s tehdy dovezenými kozly harzského plemene z Německa do pohraničních oblastí ("SCHOK"). Tyto hnědé kozy byly nejdříve rozšířené hlavně v severní a západní horské oblasti České republiky, která byla v té době osídlena německými přistěhovalci. Později se plemeno díky své oblíbenosti rozšířilo po celém území Česka (Sztankoova & Rychtarova 2017). V dalším období let 1950 až 1990 bylo plemeno zušlechťováno pravidelným importem inseminačních dávek hnědé německé kozy (Mátlová & Konrád 2015a).

Tyto kozy jsou středního tělesného rámce obdélníkovitého tvaru a pevné konstituce. Oproti koze bílé je vzhledově jemnější a menší. Kohoutková výška se v dospělosti pohybuje u kozy okolo 70 cm a u kozla 80 cm. Živá hmotnost je u kozlů 65-80 kg a u koz 45-60 kg. Zbarvení je celoplášťově hnědé s černým pruhem, táhnoucím se od čela k ocasu, černým břichem a černými končetinami. Srst je krátká a hladká s možným výskytem kožních přívěsků a rohů ("SCHOK").

Koza hnědá krátkosrstá je rané a odolné plemeno s vysokou plodností. Kontrola užitkovosti začala v roce 1963 spolu se zavedením plemenné knihy (Mátlová & Konrád 2015a).

Během několikaleté šlechtitelské práce se u kozy hnědé stabilizovala vysoká mléčná užitkovost, která činí v průměru 600-1000 kg mléka za laktaci 280 dní, a to při tučnosti 3,4-3,7 % a 2,9-3,2 % obsahu bílkovin. Plodnost je uváděna okolo 200 %. Populace hnědých krátkosrstých koz je šlechtěna především na mléčnou užitkovost, dále na plodnost, mateřské vlastnosti, ranost, zdraví a dlouhověkost ("SCHOK"). Průměrná živá hmotnost kůzlat ve věku 70 dní je 15 kg a denní přírůstek u kůzlat v odchovu a výkrmu je 170-180 g (Sztankoova & Rychtarova 2017).

3.1.2 Program uchování genových rezerv

Rychlý rozvoj novodobého intenzivního zemědělství obecně potlačuje genetickou diverzitu původních plemen hospodářských zvířat v mnoha regionech. Již přibližně devadesátdevět druhů hospodářských zvířat navždy zmizelo z planety. Malí přežvýkavci, hlavně ovce a kozy poskytují několik komodit jako maso, vlnu, kůži nebo mléko. Toto je důležitá součást moderního živočišného průmyslu. Přesto některé druhy malých přežvýkavců jsou na pokraji vyhynutí kvůli vysokému rozšíření vysoce produktivních plemen, vznikajících z intenzivního šlechtění. Proto je nutné zachovat genetickou diverzitu malých přežvýkavců (Lv et al. 2019).

V národním programu najdeme plemena skotu, koní, ovcí, koz, prasat, králíků, ryb, drůbeže, nutrie a včely. Mezi plemena koz se řadí koza bílá krátkosrstá a koza hnědá krátkosrstá (NRSGZZ 2022). Důvodem zařazení do genofondu obou plemen těchto koz je jejich dlouhodobá adaptace na lokální podmínky i v klimaticky nepříznivých oblastech, rovněž i možnost jejich chovu v režii šetrného zemědělství v oblastech, kde není reálný chov skotu. Plemenná kniha a centrální databáze kontroly užitkovosti je vedena Svazem chovatelů ovcí a koz. Do genového zdroje jsou zařazeni jen jedinci zapsaní v plemenné knize se 100% podílem genů. U kozlů jsou upřednostňováni jedinci s co nejnižší příbuzností v populaci. Cílový stav

uchování genetického materiálu kryokonzervací u obou plemen, je stanoven na přibližně 1500-2000 inseminačních dávek a 100-150 zárodků ze záměrného připařování. Tyto počty by měly pravděpodobně mít schopnost obnovit chov těchto plemen koz v případě poklesu počtů pod kritickou hranici. U bílé kozy je doposud zakonzervováno 30 plemeníků v množství cca 500 dávek a u hnědé kozy je to prozatím 15 plemeníků v množství cca 300 dávek (Mátlová & Konrád 2015a; Mátlová & Konrád 2015b).

Pro vznik banky genetických zdrojů je v současné době nejdůležitější způsob kryokonzervace samčích či samičích gamet. Kryokonzervace v kapalném dusíku při teplotě −196 °C, dokáže životaschopnost spermií udržet na neomezeně dlouhou dobu. Takto nízká teplota značně prodlužuje dobu skladování savčích spermií hlavně díky úplné inhibici metabolických procesů, způsobené zmrazením (Lv et al. 2019). Dokonce dle zprávy od Salamona et al. (2000) jsou spermie berana schopné po krykonzervaci dlouhé 35 let stále oplodnit samici po intrauterinní inseminaci.

V České republice se program ochrany genofondu původních plemen datuje od roku 1994, kdy se tento program stal základem výzkumného projektu s názvem „*Národní program uchování a využití genových zdrojů hospodářských zvířat"*. Národním referenčním střediskem pro genetické zdroje, které tento projekt koordinuje, se nachází ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Uhřívněsi. Využívání ,,Národního programu" a činnosti s ním spojené jsou prioritou Ministerstva zemědělství a jsou plně dotovány státem. Díky němu se také ČR připojila ke světovému programu „Dohody o biologické rozmanitosti" a FAO (NRSGZZ 2022).

Schopnost reagovat na nepředvídané budoucí události a obtíže, včetně zavlečení nových nemocí nebo změny klimatu, se zvyšuje zachováním genetických zdrojů. Otevřený tok genetických zdrojů a spolupráce při jejich ochraně jsou jádrem globální potravinové bezpečnosti v moderním světě, protože všechny národy jsou závislé na genetické rozmanitosti. Tudíž všechny genetické zdroje, podporované „Národním programem" v ČR, přispívají k celosvětové ochraně biologické rozmanitosti (Zedek et al. 2017).

3.2 Ejakulát kozla

3.2.1 Sperma

Semeno, sperma neboli ejakulát je tekutá suspenze skládající se ze spermií, samčích gamet a ze sekretů přídatných pohlavních žláz. Tekutá část této suspenze se nazývá semenná plazma. Spermie neboli samčí pohlavní buňka vzniká v semenotvorných tubulech varlat. V těchto tubulech je řada zárodečných buněk, ve kterých se vytváří samčí gamety. Plně vyvinuté spermie jsou podlouhlé buňky skládající se ze zploštělé hlavy s jádrem pro oplození a ocasu, aparátem důležitým pro pohyb (Hafez & Hafez 2000).

3.2.2 Semenná plazma

Semennou plazmu tvoří sekrety nadvarlete a hlavně výměšky přídatných pohlavních žláz. U kozla to jsou ampule chámovodu, předstojná žláza (prostata), bulbouretrální žláza a semenné váčky (Kos et al. 2019). Semenná plazma představuje svým objemem hlavní podíl ejakulátu, u přežvýkavců jde o 70-75 % z celkového objemu. Svým bohatým složením zajišťuje spermiím přirozené prostředí, ochranu, umožňuje pohyb a je zdrojem jejich výživy (Marvan 2003).

U přežvýkavců dochází nejdříve k vylučování sekretů bulbouretrálních žláz. Tento sekret upravuje pH močové trubice pro další výměšky, které jsou už poté většinou vylučovány současně. Sperma přežvýkavců je bohaté zejména na fruktózu (Kozumplík & Gamčík 1984).

Je prokázáno, že složky semenné plazmy se účastní klíčových dějů souvisejících s funkcí spermií, fertilizací a vývojem embrya v samičím reprodukčním traktu. Semenná plazma je složená z energetických substrátů (fruktóza, sorbitol, glycerylfosfocholin), iontů ($Na+$, $K+$, $Zn+$, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl_2), organických sloučenin (kyselina citronová, aminokyseliny, peptidy, proteiny, lipidy, hormony, cytokiny) a z dalších látek. Chemické složení a funkce semenné plazmy se může lišit mezi druhy i mezi samci jednoho druhu, dokonce i mezi ejakuláty stejného samce. Další možné změny ve složení semenné plazmy, specifické především pro kozla, jsou způsobeny teplotou, výživou, stresem a obdobím odběru spermatu. Rozdíly v profilech proteinů semenné plazmy nastávají při odběru ejakulátu během rozmnožovacího období nebo mimo něj a způsobené jsou sezónními variacemi hladin gonadotropinů a jejich receptorů na varlatech (Juyena & Stelletta 2012). V Tabulce 1 je uvedeno složení semenné plazmy kozla (Juyena & Stelletta 2012).

Tabulka 1 Složení semenné plazmy u kozla (Juyena & Stelletta 2012)

fruktóza (mg/dl)	875
glukóza (mg/dl)	4,8-8,8
kyselina citrónová (mg/dl)	/
bílkoviny celkem (g/dl)	0,77-1,48
fosfolipidy (mg/dl)	57
cholesterol (mg/dl)	/
sodík (mg/dl)	60-183
draslík (mg/dl)	76-255
vápník (mg/dl)	5-15
chlór (mg/dl)	82-215
hořčík (mg/dl)	1-4

Na rozdíl od berana a všech ostatních hospodářských zvířat složky semenné plazmy kozla můžou představovat problém při procesu ředění a následné kryokonzervace. Kozlí sperma totiž obsahuje specifické složky, které zhoršují kryorezistenci spermií za určitých podmínek. Jedná se o enzym fosfolipáza A2 která interaguje s vaječným žloutkem (základní prodlužovač spermatu) za vzniku látek, toxických pro spermie (Sharma & Sood 2020). Tento enzym je bulbouretrálního původu, a nazýván jako enzym koagulující vaječný žloutek (EYCE), popsaný Royem (1957). Rovněž Nunes et al. (1982) objevil další takový enzym z bulbouretrální žlázy kozla, který ale interaguje s odstředěným mlékem (druhý základní prodlužovač spermatu) také za vzniku nevhodných podmínek pro spermie.

3.3 Faktory ovlivňující parametry spermatu a kryotoleranci

3.3.1 Sezónnost

Kozy, žijící v mírném podnebí jsou sezóně polyestrální zvířata. To znamená, že jejich reprodukční období odpovídá sezónnímu vzoru tak, aby byly pro narozená kůzlata zajištěny ideální podmínky s ohledem na teplotu a možnost pastvy. Toto období je obvykle na jaře (Abecia et al. 2011). Délka rozmnožovacího období se u koz mění nepřímo v závislosti na zeměpisné šířce. Ke zkracování dochází se zvětšováním zeměpisné šířky a naopak. Kozy chované ve středních a vysokých zeměpisných šířkách vykazují výraznou sezónnost a naopak kozy v tropech nebo subtropech se mohou pářit kdykoliv během roku (Leboeuf et al. 2000; Choe et al. 2006). Nejdůležitějším environmentálním faktorem, který řídí období rozmnožování v mírných pásmech, je délka dne (Choe et al. 2006). Fotoperioda je hlavním signálem pro načasování reprodukčního cyklu prostřednictvím uvolňování melatoninu a pohlavních hormonů, u samců testosteronu. V této souvislosti jsou pozorovány sezónní změny v charakteristikách libida a spermatu, hmotnosti a velikosti varlat (Ritar & Salamon 1991; Sias et al. 2005).

Kozlové mají silnou sezónnost v kvalitě a kvantitě produkce ejakulátu, a tudíž je omezená i doba, kdy je vhodné odebírat sperma určené pro skladování nebo umělou inseminaci (Ritar 1993). V českých podmínkách mírného pásma je nejlepší období od poloviny podzimu až do poloviny zimy, kdy se zkracuje světelná délka dne (Ritar & Salamon 1991).

Karagiannidis et al. (2000) provedl studii, ve které byly sledovány charakteristiky spermatu Alpských, Saanských a Damašských kozlů, narozených a chovaných ve středomoří. Studie pozorovala vliv fotoperiody a sezónní výkyvy reprodukce na kvalitu a kvantitu spermatu u kozlů těchto plemen. Přes rozdíly v téměř všech charakteristikách spermatu mezi studovanými třemi plemeny, byly nalezeny významné sezónní rozdíly. Sezónní rozdíly se týkaly jak množství spermatu (objem, koncentrace a celkový počet spermií) tak i kvality (pohyblivé spermie, abnormální spermie a rychlost progresivní motility). Ve výsledku bylo lepší sperma v období s klesající délkou světelného dne (období rozmnožování) oproti období s rostoucí délkou dne. Zlepšení charakteristik spermatu v období kratšího dne lze částečně vysvětlit změnou sekrečního vzorce epifýzového melatoninu, který zvyšuje hladiny testosteronu a luteinizačního hormonu. Luteinizační hormon dále stimuluje růst varlat a další uvolňování testosteronu. Ovšem důležitost těchto sezónních rozdílů v charakteristikách spermatu není tak velká, aby kozel nemohl být využíván k reprodukci celý rok.

Dle Kumar et al. (2016) roční období a intenzita chovu významně ovlivňuje schopnost spermií kozla odolávat procesu zmrazování a rozmrazování. Sperma bylo odebíráno pomocí umělé vaginy během dvou sezón (podzimní a zimní) a kryokonzervováno. Období odběrů mělo významný vliv na všechny parametry spermatu, kromě životaschopnosti a zkoušky propustnosti membrány spermií. Akrozomální neporušenost spermií byla významně vyšší a abnormalita spermií nižší v zimním období, oproti podzimu. Kozlí sperma, odebrané v zimním období v polointenzivním systému, vykazovalo lepší kryotoleranci.

3.3.2 Věk

Nástup pohlavní dospělosti u kozlů souvisí s věkem a tělesnou hmotností. Sperma může být odebíráno až po dosažení pohlavní dospělosti kozla. Tento věk je vhodný pro zařazení samce do chovu (Ridler et al. 2012). Pohlavní dospělosti středně velká plemena dosahují přibližně ve věku 4-5 měsíců. V tomto věku už se u většiny plemen koz, chovaných v mírném prostředí severní polokoule, objevují oplození schopné spermie v ejakulátu. Přesto tomto věkovém období není dostatečná kvalita spermatu a není doporučováno kozly zařazovat do chovu. Zařazení do chovu u kozlů je doporučováno až ve věku 8 měsíců (Pugh & Baird 2012). Při odhadu věku, ve kterém je možné zařadit kozla do reprodukce, nám může pomoci měření varlat samce (obvod šourku, délka varlat atd.), jelikož je dokázáno, že velikost varlat úzce souvisí s velikostí těla. Výrazné zvětšení velikosti varlat předpovídá začátek aktivní spermatogeneze (Kerketta et al. 2015).

Analýza kvality spermatu ve studii od Tabarez et al. (2017) ukázala, že věk samce měl vliv na objemovou a hmotnostní motilitu a na funkční celistvost spermií u čerstvého ejakulátu, s vyššími hodnotami ve prospěch starších samců. Jednou z příčin zlepšení hodnot může být zvětšení velikosti a hmotnosti varlat, což souvisí s účinností spermatogeneze. Další hodnocení od Tabareze et al. (2017) po kryokonzervaci ukázalo, že kvalita spermií po zmrazení a rozmrazení byla lepší u dvouletých samců než u ročních kozlů. Výsledky u starších samců ukázaly lepší kryotoleranci spermií. Z tohoto důvodu by se měl zvažovat eventuální věk kozlů, kteří budou zařazeni do plemenitby nebo jejich sperma má být zařazeno do ochrany genových rezerv.

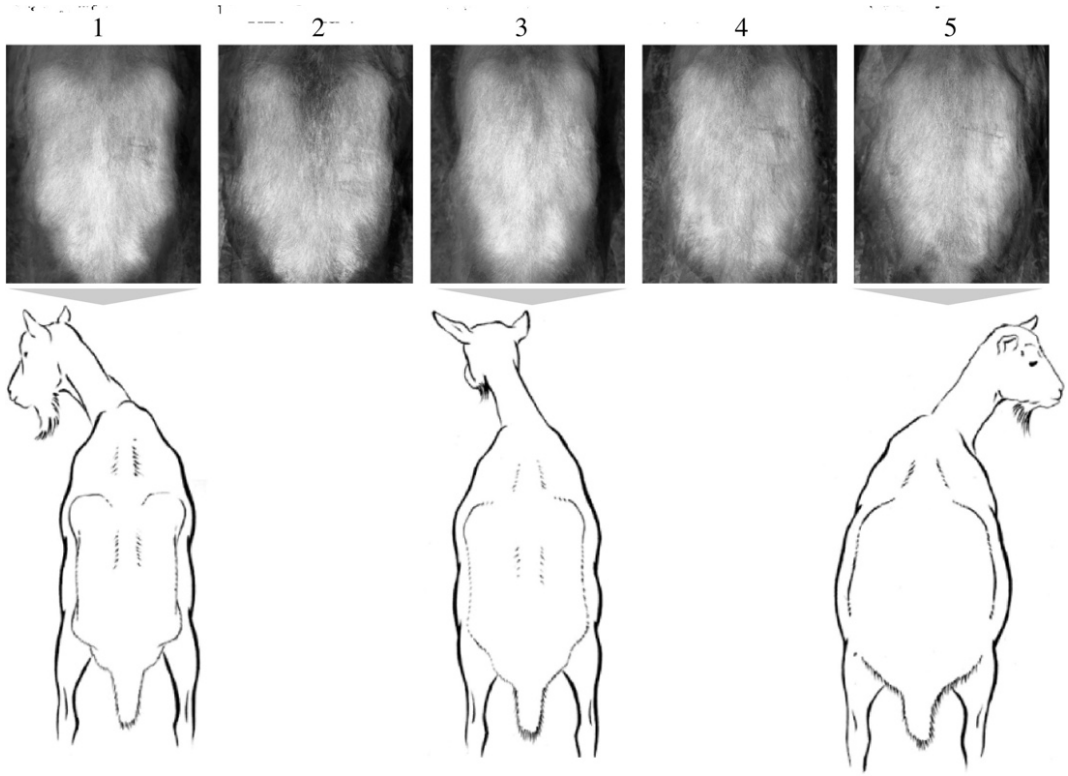
3.3.3 Zdraví

Zdravotní stav je u kozlů často přehlížen. Správná zdravotní péče u kozla umožňuje, aby jeho genetický potenciál byl plně využit. Nedostatečná pozornost ve vztahu ke zdraví může mít za následek sníženou reprodukci, zavlečení nemoci do stáda nebo snížení délky života plemeníka (Rowe 2010). Vznik reprodukčních problémů je způsoben hlavně výživovými nedostatky spojenými s vlivem stresu a patogenů, včetně bakterií, virů a parazitů. Nejčastější reprodukční choroby, které postihují reprodukční systém malých přežvýkavců jsou brucelóza, leptospiróza, toxoplazmóza, listerióza a kampylobakterióza. Ekonomické ztráty v chovu, způsobené těmito problémy, mohou být zmírněny zlepšením kontrolního managementu zdraví a očkováním (Ali et al. 2020).

3.3.4 Tělesná kondice

Pro hodnocení tělesné kondice se ukázal být nejpraktičtějším nástrojem systém Body condition score (BCS-skóre tělesné kondice), zavedený pro hospodářská zvířata. BCS je praktický a jednoduchý ukazatel dostupných tukových zásob, které zvíře má a může je využít v případě potřeby. Bodování tělesné kondice u koz a kozlů se v systému BCS udává na stupnici v rozsahu od 1,0 do 5,0 (viz Obrázek 2). Přičemž BCS 1,0 znamená extrémně hubená koza a BCS 5,0 velmi obézní (přetučnělá) koza (Villaquiran et al. 2007). Kozlové by měli na začátku období rozmnožování být ve špičkové tělesné kondici, protože v reprodukčním období

vykazují zvýšenou fyzickou aktivitu se sníženým příjmem krmiva (Rowe 2010). Ideální tělesná kondice kozlů udávaná na stupnici BCS je větší než 3,0 (Ghosh et al. 2019).



Obrázek 2 Bodování tělesné kondice dle BCS na stupnici od 1 do 5 (Vieira et al. 2015)

3.3.5 Výživa

Výživa hospodářských zvířat hraje důležitou roli v růstu a vývoji reprodukčních orgánů (Widiyono et al. 2017). Množství a kvalita krmení ovlivňuje vývoj a hmotnost varlat samce a s tím spojenou spermatogenní kapacitu a reprodukční výkonnost. Proto by měli být samci malých přežvýkavců správně krmeni již dva měsíce před připouštěcím obdobím (Martin et al. 2010). Různé úrovně omezeného krmení a dokrmování u kozlů nemělo žádný zásadní vliv na parametry spermatu. Hodnoty spermatu byly dodrženy ve fyziologických hodnotách ať už při omezeném nebo neomezeném krmení (Widiyono et al. 2017).

Větší vliv na kvalitu spermatu kozlů mají různé doplňky přidané do krmiva. Například Souza et al. (2019) hodnotil vliv lněného semínka na kvalitu spermatu zařazeného do krmné dávky kozlích samců. Lněné semínko je bohatým zdrojem tuků a vitamínů. Senzorické vlastnosti spermatu nebyly po přidání lněného semínka změněny. Při doplnění lněného semínka nad 12 % se zvýšil objem ejakulátu u skupiny kozlů až na 1,13 ml. Ke zlepšení fyziologických a morfologických aspektů spermatu kozlů došlo při dodání lněného semínka nad 4 %.

Důležitá součást výživy zvířat jsou minerální složky. Všeobecně organické minerální látky zlepšují produkci spermatu, motilitu spermií a samčí plodnost díky účinnému vstřebávání a využití v těle. Ze stopových minerálních látek mají s ohledem na reprodukční soustavu největší vliv měď (Cu) a zinek (Zn). Zinek je důležitý pro růst varlat a spermatogenezi a jeho přídavek do krmení u zvířat zvyšuje procento spermií s neporušenými membránami

a antioxidačními vlastnostmi (Underwood & Somers 1969; Arangasamy et al. 2018a). Měď je odpovědná za udržení libida a její nedostatek způsobuje neplodnost. Protože při nedostatku mědi nefungují správně Sertoliho buňky odpovědné za vývoj spermií (Van Niekerk & Van Niekerk 1989). Dodatečné zařazení organického zinku a mědi do krmné dávky rostoucím kozlíkům urychlilo nástup pohlavní dospělosti o několik dní a zlepšilo kvalitativní a kvantitativní charakteristiky spermatu. Koncentrace samčího pohlavního hormonu testosteronu v krvi byla vyšší u kozlíků, kterým byla doplňkově krmena měď. Testosteron ovlivňuje spermatogenezi a vývoj pohlavních orgánů s nimiž je spojen nástup pohlavní dospělosti (Arangasamy et al. 2018b). Doplňování minerálních složek do krmné dávky v brzkém stadiu puberty zlepšuje kvalitu a kvantitu odebraného spermatu a antioxidačního obranného systému semenné plazmy. Zlepšením těchto hodnot u odebraného spermatu dochází ke zvýšení kryorezistence a krytolerance spermií, které by měli být zmrazeny (Narasimhaiah et al. 2018).

Studie Arangasamy et al. (2018a) zaměřená na doplňování dvou stopových prvků Cu a Zn do krmné dávky kozlů, zkoumala vliv ochrany spermií v procesu zmrazování a rozmrazování. Skupinám kozlů byly podávány různé dávky organického Zn a Cu nebo jejich kombinace do krmení po dobu 180 dní. Odebrané sperma od takto suplemetovaných kozlů bylo hluboko zmrazeno při -196°C. Pohyblivost spermií, životaschopnost, neporušenost plazmatické membrány a akrozomu, stejně jako množství oxidačního stresu, byly všechny zlepšeny ve vzorcích spermatu od kozlů, kteří dostávali minerální doplňky. Takto zlepšené hodnoty předpovídají vysokou oplozovací schopnost rozmrazených spermií. Suplementace organického zinku a mědi u kozlů se ukázala jako kryoprotektivní pro spermie i během ochlazování, kdy spermie měli lepší kryorezistenci proti nízkým teplotám. Kryoprotektivní účinky stopovových minerálů zinku a mědi na spermie kozla byly prokázány na fertilizačním potenciálu. Semeno kozlů po zmrazení bylo podrobeno vazebnému testu spermií na obal vajíčka a rychlost štěpení. Vyšší počet navázaných spermií na obal vajíčka měly spermie od kozlů, kterým byla měď a zinek doplňovány do krmné dávky. Rychlost štěpení vajíčka byla taktéž výrazně vyšší u spermií suplementovaných kozlů oproti kontrolní skupině bez doplnění Zn a Cu (Hemalatha et al. 2018).

3.4 Odběr ejakulátu

Pro odběr ejakulátu se má aplikovat taková metoda, která plní tato základní kritéria: získání čistého ejakulátu, zachycení celého objemu ejakulátu, nepoškození vitality spermií, zamezení rozšiřování pohlavních chorob a zároveň nesmí při odběru dojít ke škodlivému vlivu na zdraví a plodnost plemeníka. (Kozumplík & Gamčík 1984; Jiménez-Rabadán et al. 2016) uvádí, že odběr ejakulátu je prvním důležitým krokem v procesu kryokonzervace spermatu, avšak je často přehlížen.

Odběr spermatu u kozlů se provádí dvěma způsoby. Pomocí umělé vaginy nebo elektroejakulací (Leboeuf et al. 2000). Vhodnější a preferovanější metoda odběru ejakulátu u kozlů je pomocí umělé vagíny, ale tato metoda vyžaduje předchozí trénink samců. Elektroejakulace může fungovat jako alternativa, kdy samci z nějakého důvodu nemohou být trénováni na odběr umělou vaginou, ale je potřeba jim odebrat sperma (Jiménez-Rabadán et al. 2012).

3.4.1 Umělá vagina

U kozla je nejčastěji využívanou metodou odběru spermatu pomocí umělé vagíny. Umělá vagína by měla co nejpřesněji napodobovat pohlavní ústrojí samice (Kos et al. 2019). Umělá vagína se skládá z venkovního pevného válce o délce 200-210 mm a průměru 50-55 mm do kterého se vkládá vnitřní gumová vložka (délka 320-360 mm a průměr 30-35 mm). Na jeden konec se pomocí pryžových manžet přidělá jednorázový sběrač spermatu (plastový pytlík). Pro hygieničtější odběr spermatu je doporučován model umělé vaginy pro býky, zkrácený o 190 mm, s použitím jednorázového sběrače (Kozumplík & Gamčík 1984). Na povrchu sliznice pyje se nachází několik tělísek s nervovým zakončením, která dopomáhají samci v ejakulaci. Proto je důležité dbát na správnou přípravu umělé vaginy, především na správný tlak, teplotu a lubrikaci. Prostor mezi válcem a vnitřní gumovou vložkou se naplní vodou. Ideální teplota vody pro malé přežvýkavce je v rozmezí 40-41 °C. Tlak uvnitř umělé vaginy zajistí vzduchový ventil, který se nachází zvenku válce a díky němu se upraví obsah vzduchu v meziprostoru a také tlak, vyvíjený na penis uvnitř. Poslední aspekt je lubrikace, která se zajistí pomocí sterilní nespermicidní látky jako je vazelína nebo sonografický gel. Tato látka se aplikuje na druhý konec umělé vaginy, kde se nenachází sběrač (Kos et al. 2019). Na Obrázku 3 můžeme vidět model umělé vaginy pro odběr spermatu kozlů (Kos et al. 2019).

Obrázek 3 Model umělé vaginy pro kozly (Kos et al. 2019)

Samotný odběr ejakulátu kozla probíhá buď na volno nebo je plemeník fixován v připouštědle. Odběr spermatu probíhá nejlépe na říjící koze, může se však použít jako atrapa i neříjící koza nebo jiný kozel (viz Obrázek 4), ale i neživý fantóm (Kozumplík & Gamčík 1984).

Metoda odběru pomocí umělé vaginy je preferovaná u trénovaných samců. U nich je tato metoda rychlá, nestresující, bezbolestná a poskytuje fyziologicky normálnější vzorek. Ovšem je nutné samce na tento způsob odběru nejdříve navyknout, což vyžaduje čas (Pugh & Baird 2012).

Obrázek 4 Odběr spermatu u kozlů pomocí umělé vaginy (Gordon 2017)

3.4.2 Elektroejakulace

Další možný způsob získání spermatu od kozla je elektroejakulace, která funguje na principu dráždění elektrickým proudem přes sondy zavedené do rekta samce. Jako sonda se nejčastěji používá bipolární elektroda ve tvaru duté paličky o délce 320-400 mm a šířce 10-15 mm (Kozumplík & Gamčík 1984). Tato metoda, pomocí nízkonapěťových a nízkoproudých elektrických impulsů, stimulující pánevní nervy, vyvolává peristaltické kontrakce vývodných pohlavních cest, hlavně chámovodů a jejich ampul (Abril-Sánchez et al. 2019; Kos et al. 2019).

Elektroejakulátory vysílající elektrické podněty do konečníku uměle stimulují přidatné pohlavní žlázy, které díky tomu produkují více tekutiny což má za následek zvětšení objemu semenné plazmy ve spermatu. Také jsou prokázány rozdíly ve složení semené plazmy mezi spermatem získaným umělou vaginou nebo elektroejakulací. Tyto rozdíly by mohly mít za následek změnu kryotolerance spermií ke kryokonzervaci (Jiménez-Rabadán et al. 2013). Sperma získané pomocí elektroejakulace bývá nesoudržné s vysokým obsahem semenné plazmy a nižší koncentrací spermií než u odběru metodou umělé vaginy. (Pugh & Baird 2012)

Elektroejakulace je praktická metoda odběru spermatu, jelikož není potřeba na ni přivykat samce jako na techniku odběru pomocí umělé vaginy. Je snadno použitelná pro odběr spermatu velkého počtu zvířat najednou nebo pro odběr mimo reprodukční sezónu u malých přežvýkavců. Protože malí přežvýkavci mají sezónní reprodukční vzorce a bylo by těžké je přirozeně odebrat s umělou vaginou mimo připouštěcí období (Abril-Sánchez et al. 2019). Při procesu odběru spermatu elektroejakulací mohou být samci zklidněni pomocí sedace, avšak záleží na dispozicích samce a dovednosti personálu. Kozel by měl být fixován v poloze na boku (Shipley, et al. 2007). Před zavedením sondy se oblast rekta a rektum očistí od nečistot vlažným fyziologickým roztokem. Poté se do rekta zavede namazaná sonda do hloubky cca 150-200 mm a fixuje se. Impulsy elektrického proudu do sondy se pouští na 4-6 sekund a poté se sonda vypne na 3-4 sekundy. Toto schéma se dodržuje, dokud nedojde k ejakulaci. Obvykle se dostaví po 4-5 cyklech (Kozumplík & Gamčík 1984; Pugh & Baird 2012) Jednou z nevýhod elektroejakulace může být pořízení nákladného vybavení a provedení sedace u většiny zvířat (Kos et al. 2019).

Jiménez-Rabadán et al. (2013) ve své studii porovnává standartní způsob kryokonzervace kozího spermatu, odebraným umělou vaginou, se stejnou metodou a jejími modifikacemi pro vzorky odebrané způsobem elektroejakulace. Studii zakončil testem fertilizace ve zkumavce, aby porovnal fertilitu kontrolních vzorků s fertilitou vzorků odebraných elektroejakulací, které vykazovaly nejlepší kvalitu spermií. Po odebrání spermatu nebyly zjištěny velké rozdíly ve sledovaných parametrech spermií mezi metodami odběru. Ovšem po kryokonzervaci spermie odebrané pomocí umělé vaginy vykazovaly vyšší hodnoty parametrů motility oproti těm, odebraným pomocí elektroejakulace. Ale tyto rozdíly zmizely, pokud se porovnaly vzorky z umělé vaginy se vzorky z elektroejakulace, které byly zmrazeny pomocí vylepšeného protokolu kryokonzervace. Spermie odebrané elektroejakulací a kryokonzervované v podmínkách tohoto protokolu vykazovaly po rozmražení stejné kvality jako spermie odebrané umělou vaginou se standartním protokolem mražení (Jiménez-Rabadán et al. 2013). Další studie od Jiménez-Rabadán et al. (2012) zjistil, že úspěšnost kryokonzervace spermatu kozla závisí také na způsobu odběru spermatu, na období reprodukce, ve kterém jsou odebírány a použití extenderů. Nejlepší kvality spermatu po kryokonzervaci byli zjištěny při odběru ejakulátu pomocí umělé vaginy v období rozmnožování. Vliv způsobu odběru spermatu na následnou kryorezistenci spermií byla zkoumána mezi malými přežvýkavci. Konkrétně byly porovnávány dvě metody odběru, elektroejakulace a umělá vagina, mezi berany plemene Manchega a kozli plemene Blanca-Celtibérica. Sperma bylo od obou rodů, kozlů a beranů, odebíráno ve stejný den a zmrazeno totožným způsobem. Po rozmrazení byly zkoumány parametry pohybu spermií pomocí CASA a stabilita membrány, životaschopnost spermií a mitochondriální aktivita prostřednictvím průtokové cytometrie. U beranů nebyl zaznamenaný žádný vliv na spermie při různých metodách odběru. Ovšem u kozlů to bylo naopak. Negativní vliv elektroejakulace měla na motilitu kozlích spermií a další parametry měřené průtokovou cytometrií. Hodnoty kozlího spermatu odebrané pomocí umělé vagíny měli podobné parametry jako beraní spermie, které neovlivnily rozdílné metody odběru (Jiménez-Rabadán et al. 2016).

Ve starší studii od Memon et al. (1986) je upozorňováno, že použití elektroejakulace vedlo u kozlů ke zvýšené vokalizaci, tachypnoe a nadbytečným svalovým křečím v oblasti zadních končetin. Tudíž nebyl doporučen z hlediska welfare pro sběr spermatu u kozlů. Použití elektroejakulace spouští obvyklé stresové reakce související s fyziologickými, biochemickými, endokrinními a hematologickými změnami. Navzdory skutečnosti, že elektroejakulace je účinný postup pro odběr spermatu, byly v některých zemích vzneseny obavy ohledně jeho použití kvůli stresu a bolesti, kterou způsobuje. Při snaze o dobré životní podmínky zvířat aplikace elektroejakulace bez anestezie vyvolává obavy. Použití elektroejakulace pro odběr spermatu je v řadě evropských zemí zakázáno, protože je považováno za nehumánní metodu (Abril-Sánchez et al. 2019).

3.5 Hodnocení spermatu po odběru

Ejakulát po odběru je podroben kvalitativnímu a kvantitativnímu hodnocení. Kvalita a kvantita spermatu se hodnotí bezprostředně po odběru. Parametry, které se obecně hodnotí v kvalitativním posouzení jsou koncentrace spermií, jejich motilita a morfologie spermií (Lv et

al. 2019). Po odběru se ejakulát umístí do vodní lázně o teplotě 37 °C a co nejdříve vyhodnotí následovně. Makroskopické hodnocení posuzuje objem, konzistenci, barvu, cizí příměsi a při mikroskopickém hodnocení je sledována aktivita, morfologie a koncentrace spermií. Poté následují další potřebná hodnocení a testy (Pugh & Baird 2012).

Hahn et al. (2019) se ve své studii zaměřil na vliv teploty a času na kvalitu čerstvě odebraného spermatu do doby, než je zpracováno. Udává, že časový bod vyšetření spermatu po odběru je faktor silně ovlivňující čerstvé semeno kozla a následnou kryorezistenci. Kozlí čerstvé sperma je schopné snášet pokojovou teplotu po dobu nejméně 10 minut, aniž by se zhoršila celková kvalita semene. Proto se doporučuje, aby základní vyšetření proběhlo do 10 minut po odběru spermatu. Se spermatem po odebrání je potřeba zacházet opatrně, aby nedošlo k tepelnému šoku, kontaminaci dezinfekčními prostředky, vodou, vzduchem a slunečním zářením nebo k dalším procesům a faktorům, které mohou snížit životaschopnost spermií (Faigl et al. 2012). Po potřebném posouzení kvality spermatu se může přímo ředit pomocí zmrazovacích ředidel (Lv et al. 2019).

Dorado et al. (2009) uvádí, že procento morfologických abnormalit a procento pohyblivých spermií v čerstvém spermatu jsou nejlepšími předpoklady pro zjištění hodnot celkové přežitelnosti spermatu po rozmrazení. K předpovědi plodnosti spermií se využívá test hypoosmotického otoku (HOST). HOST je přímočará a účinná metoda se silnou spolehlivostí a reprodukovatelností (Lv et al. 2019). Proběhlo četně pokusů o závislosti výsledků výše uvedených testů s plodností samic, které byly inseminovány hodnoceným semenem. Bohužel schopnost oplodnění nezáleží jen na jediném parametru spermatu, ale také na dalších faktorech jako například plodnosti samice, způsobu vyvolání říje (přirozeně×hormonálně), ročním období a místě uložení spermatu (Faigl et al. 2012).

3.5.1 Makroskopické hodnocení

Makroskopické hodnoty odebraného sperma se posuzují smyslově, a to ihned po procesu odběru. Hodnotí se objem, barva, pach, konzistence a čistota nebo obsah cizích příměsí (Kozumplík & Gamčík 1984).

Objem spermatu reflektuje celkový funkční stav přídatných pohlavních žláz a varlat. Je doporučováno, aby byl vzorek vážen ve stejné nádobě, do které byl odebrán, aby se předešlo případným ztrátám (Baskaran et al. 2021). Hodnota objemu je proměnlivá a může kolísat. Závisí na plemeni, věku, hmotnosti samce, intenzity odběru, způsobu odběru, krmení a zdravotním stavu (Kozumplík & Gamčík 1984; Hafez & Hafez 2000; Louda 2001). U kozla se objem pohybuje od 0,5 ml do 1,2 ml, v průměru činí 1 ml. Barva se posuzuje proti světlu a měla by být bílá nebo šedobílá. Jiné zbarvení představuje znečištění cizími příměsemi a takové sperma je nepoužitelné a zlikviduje se (Hafez & Hafez 2000). Pach se posuzuje čichem a měl by být neutrální až specifický pro kozla (Louda 2001). Konzistence spermatu se hodnotí vizuálně, ejakulát by měl být neprůhledný a představovat hustou tekutinu smetanové konzistence s vysokou viskozitou (Kozumplík & Gamčík 1984). V Tabulce 2 můžeme vidět parametry mikroskopického vyšetření ejakulátu kozlů (Kos et al. 2019).

Tabulka 2 Paramatry makroskopického vyšetření spermatu kozla (Kos et al. 2019)

objem (ml)	viskozita	barva	pach	cizí příměsy	pH
0,5-7	smetanovitá	mléčná	typicky kozlí	ne	6,3-7,5

3.5.2 Mikroskopické hodnocení

Do skupiny tradičního mikroskopického hodnocení patří metody určující aktivitu spermií, koncentraci spermií, morfologii spermií, přežívatelnost a rezistenci spermií (Kozumplík & Gamčík 1984). Standardní hodnoty kvalitativního posouzení jsou koncentrace, motilita a morfologie. Dále se mohou zařadit další, propracovanější testy, mezi které patří test tepelné odolnosti, test akrozomální integrity, schopnosti spermií cestovat v různých médiích, testy hypoosmotického otoku (HOST), počítačově založené hodnocení motility (Computer Assisted Semen Analyses, CASA) (Faigl et al. 2012).

Aktivitu neboli motilitu spermií charakterizuje progresivní pohyb směrem vpřed za hlavičkou a tento pohyb je také jedním z nejvýznamnějších ukazatelů oplozovací schopnosti ejakulátu. Aktivita spermií je vyjadřovaná v procentech a u kozla je stanovena na 85 % pro spermie, které mají být zmrazovány (Louda 2001). Počet spermií na jednotku objemu spermatu neboli koncentrace spermií je přímo úměrná počtu spermií a množství semenné plazmy. Tudíž je koncentrace spermií ovlivněna funkčností reprodukčních orgánů (Baskaran et al. 2021). U kozla se pohybuje koncentrace spermií v rozmezí od $2{,}5\times10^9$ do $5{,}0\times10^9$ v 1 mm^3 v průměru $3{,}0\times10^9$ (Hafez & Hafez 2000). Hodnocení morfologie spermií je jednou z nejnáročnějších parametrů z hlediska jejího rozboru a výkladu, kvůli morfologické proměnlivosti u různých druhů. Toto hodnocení je jednou z kritických složek při určování kvality spermatu. Při tomto hodnocení se vzorek spermatu natře na mikroskopické sklíčko, obarví se jedním z několika různých postupů a pod mikroskopem se hodnotí stavba jednotlivých spermií a jejich patologie (Baskaran et al. 2021). Procento patologických spermií by u kozla nemělo překročit hranici 15 % (Louda 2001). Kos et al. (2019) uvádí parametry mikroskopického vyšetření v následující Tabulce 3.

Tabulka 3 Paramatry mikroskopického vyšetření u kozla (Kos et al. 2019)

koncentrace (spermie/mm^3)	motilita	morfologie	patologie
500 000-5 000 000	70-90 %	70-80 %	do 20 %

Další komplexnější laboratorní metody vyšetřování spermatu jsou uvedeny níže v kapitole 3.9. z důvodu jejich kapacity ověřit potencionální oplozovací schopnost kryokonzervovaných spermií.

3.6 Konzervace spermatu

Konzervace je prodloužení skladování spermií, při zachování jejich životaschopnosti (Louda 2001; Lv et al. 2019). Konzervace vyvolává působením některých fyzikálněchemických činitelů anabiózu spermií neboli reverzibilní stav. Při anabióze spermií se její metabolické procesy sníží nebo úplně přeruší, ale při vytvoření vhodných podmínek se metabolismus spermie opět dokáže obnovit (Kozumplík & Gamčík 1984; Louda 2001).

Při krátkodobém konzervování (v tekutém stavu) semena se využívají teploty něco málo nad 0 °C a na dlouhodobé skladování (v mrazeném stavu) se používá hluboké zmrazování v tekutém dusíku o teplotě −196 °C (Kozumplík & Gamčík 1984). V průběhu kryokonzervace jsou spermie vystaveny tepelnému, biochemickému, osmotickému a mechanickému namáhání, které je přítomné ve fázích zpracování spermatu, a to ředění, chlazení, ekvilibrace, zmrazování a rozmrazování (Gangwar et al. 2016). Kryokonzervace spermií je složitý proces, který vyžaduje nejen správné ředidlo, rychlost chlazení a rozmrazování ale i komplexní znalosti fyziologie spermií pro daný druh, které vedou k úspěšné regeneraci a oplození schopné spermii po rozmrazení (Sharma & Sood 2020).

Způsoby kryokonzervace se u různých druhů zvířat liší. Přestože všechny buňky musí vydržet podobný fyzický stres v procesu kryokonzervace, spermie různých druhů se od sebe odlišují velikostí, tvarem a složením, které ovlivňují kryorezistenci. Proto nemusí jedna kryokonzervační metoda vyhovovat jinému druhu, přestože pro ten původní druh byla ideální. Právě sperma kozla je toho názorným příkladem a vyžaduje speciální pozornost, protože u kozla byla pozorována škodlivá interakce mezi seminální plazmou spermatu a ředidly, obsahujícími vaječný žloutek nebo mléko. Tyto interakce produkují látky, toxické pro spermie (Purdy 2006). Škodlivé působení vyvolávají dva enzymy v semenné plazmě kozla, které produkuje bulbouretrální žláza. Jedná se o enzym koagulující vaječný žloutek (EYCE), který při kontaktu zkoaguluje vaječný žloutek a hydrolyzuje lecitin na mastné kyseliny a spermicidní lysolecitiny. Druhý enzym má toxickou reakci se složkami mléka a tato bílkovina byla popsána jako 55-60 kDa glykoproteinová lipáza (BUSgp60). Tento enzym při kontaktu s mlékem hydrolyzuje triolein a mléčné triglyceridy na volné mastné kyseliny, které inhibují motilitu a poškozují membrány spermií (Pellicer-Rubio et al. 1997; Cseh et al. 2012). Pro překonání tohoto problému se používá několik metod. Jednou z nich je zředění vzorku semene v pufrovaném ředidle a následné oddělení semenné plazmy od spermatu centrifugací (Sharma & Sood 2020). U kozlího spermatu to znamená, že se čerstvě odebraný ejakulát naředí promývacím roztokem 1 : 5 až 1 : 10 a následuje centrifugace přibližně 10-15 minut (Leboeuf et al. 2000). Promývání spermií a následné odstranění semenné plazmy je ale časově náročný proces, který může poškodit spermie, pokud se realizuje nesprávně. Ovšem jestliže se provede správně, může být prospěšný pro kryokonzervaci spermií kozla. Různí se i vědecké názory, zda je prospěšné vzorky promývat či ne (Sharma & Sood 2020). V jedné ze studií od Memon et al. (1985) byl zkoumán vliv promytí spermatu před zmrazením na kvalitu spermií. Čerstvé ejakuláty byly naředěny roztokem a tekutina byla odstraněna centrifugací. Odstředěné vzorky se dále ředily různými extendery pro kryokonzervaci. Bez ohledu na druh použitého extenderu mělo odstranění semenné plazmy pozitivní vliv na zachování integrity spermií po zmrazení. Sharma et al. (2018) také uvádí pozitivní vliv odstranění semenné plazmy na kvalitu spermií po rozmrazení. V parametrech progresivní motility, morfologické abnormality a HOST měly

promyté spermie lepší hodnoty oproti spermiím nepromytým, přestože u čerstvého ejakulátu nebyly rozdíly mezi vzorky významné.

Semenná plazma přirozeně obsahuje složky, které jsou při centrifugaci také odstraněny. Jenže tyto složky jsou nezbytné pro metabolismus, funkci, pohyb a přežití spermií v samičím reprodukčním traktu. Například obsažené proteiny se podílejí na stabilitě membrány, motilitě i oplození vajíčka (Lv et al. 2019). Ve studii od Azerêdo et al. (2001) měly vzorky rozmraženého spermatu vyšší motilitu a vitalitu ty, které obsahovaly semennou plazmu než ty, které byly promyté před kryokonzervací. Starší studie také jen potvrzuje údaje o vyšší progresivní motilitě a vyšším procentu živých spermií, pokud byl vzorek zmražen celý oproti promytému vzorku bez semenné plazmy. Došlo se k závěru, že odstranění semenné plazmy před zmrazením v prodlužovači obsahujícím vaječný žloutek má nepříznivý účinek na motilitu a integritu spermií po rozmrazení (Tuli & Holtz 1994). V novějším zjištění nebyl nalezen žádný rozdíl v kvalitě spermií po rozmrazení, pokud byly spermie před zmrazením oddělené od semenné plazmy nebo ne (Jiménez-Rabadán et al. 2012).

Dalšími alternativami k překonání škodlivé interakce mezi složkami semenné plazmy a ředidly obsahující mléko nebo vaječný žloutek bylo navržení alternativních ředidel, která minimalizují interakci lipázy a spermií. K těmto ředidlům by se mohl přidat ještě inhibitor těchto lipáz (Purdy 2006).

3.7 Ředidla

Hlavním úkolem kryokonzervačního extenderu je udržovat příznivé prostředí pro spermie v procesu zmrazování a rozmrazování i během něj (Sharma & Sood 2020). Kromě ochrany spermií před tepelným šokem, kryokonzervační extendery spermií také udržují pohyblivost a plodnost tím, že pomáhají při stabilitě plazmatické membrány a dodávají spermiím energii. Tyto vlastnosti snižují negativní účinky změn pH a osmolarity, zastavují růst bakterií a chrání spermie před poškozením způsobené snižováním teploty. Ředidlo by mělo mít tyto vlastnosti: zajistit energetický zdroj pro spermie, mít dobrou pufrovací schopnost, obsahovat málo elektrolytů, udržovat žádoucí osmotický tlak, mít odpovídající pH nesmí být toxické pro spermie, musí být sterilní a mělo by být ekonomicky dostupné (Hafez & Hafez 2000; Vidal et al. 2013).

Po odběru by měl proces ředění spermatu začít do 15 minut. Předchází mu makroskopické a mikroskopické vyšetření. Teplota ředěného ejakulátu a ředidla musí být s maximálním rozdílem ± 1 °C. Používané pomůcky musí být také předehřáté a sterilní. Ředidlo se přidává do ejakulátu postupně za neustálého míchání (Louda 2001).

Ředění ejakulátu probíhá také pro zajištění optimální koncentrace spermií ve zmrazeném vzorku. Proto je důležité, aby došlo k řádnému naředění s dostatečným počtem spermií a objemem ředidla, aby byla správně naplněna inseminační pipeta a aby se po rozmrazení dosáhlo vysoké míry plodnosti s co nejmenším počtem inseminací a nízkým počtem spermií na inseminaci (Purdy 2006). Přijatelné plodnosti u kozlích kryokonzervovaných spermií lze dosáhnout při koncentraci spermií v jedné dávce v rozmezí od 80 do 500 $\times 10^6$ spermií/ml (Lv et al. 2019).

Do běžného složení ředidla pro kozlí spermie se řadí nepenetrující kryoprotektivní činidlo (mléko nebo vaječný žloutek), penetrační kryoprotektivní činidlo (glycerol, propylenglykol),

pufr, jeden či více cukrů (glukóza, fruktóza, laktóza, trehalóza), sůl (citrát sodný), organická kyselina (kyselina citronová) a antibiotika (penicilin, streptomycin) (Purdy 2006).

3.8 Extracelulární a intracelulární kryoprotektiva

Důležitým faktorem ovlivňujícím kryokonzervaci spermií jsou komponenty obsažené nebo přidané do ředidla. Tyto látky zlepšují kryorezistenci spermií během procesů zchlazování, mrazení a rozmrazování. Zvyšují spermiím kryotoleranci proti fyzikálním a chemickým stresům vzniklých při těchto procesech. Kryoprotektiva se dělí na extracelulární, působí na spermie jen z vně buňky, a na intracelulární, ty prochází dovnitř buňky a účinkují zevnitř i zvenku (Gangwar et al. 2016).

3.8.1 Vaječný žloutek

Vaječný žloutek je běžnou součástí většiny ředidel savčího spermatu (Swelum et al. 2018). Jako nepenetrující kryoprotektant nedokáže projít přes plazmatickou membránu, působí tedy pouze extracelulárně (Sharma & Sood 2020). Mechanismus, kterým vaječný žloutek chrání sperma při kryokonzervaci není dosud známý. Předpokládá se, že hlavní roli hrají lipoproteiny s nízkou hustotou obsažené ve žloutku, které zajišťují stabilitu lipidů v membráně spermií během mražení a tím poskytují kryorezistenci membrány při nízkých teplotách (Bergeron & Manjunath 2006).

Ritar & Salamon (1982) zkoumal účinky semenné plazmy a jejího odstranění v ředidle s vaječným žloutkem na přežití kryokonzervovaných spermií. Zjistil, že intenzivně promyté spermie byly schopny tolerovat široký rozptyl koncentrace obsahu vaječného žloutku. Tyto vysoké hladiny žloutku zlepšily okamžitou regeneraci spermií po rozmražení. U nepromytého vzorku tomu bylo naopak. S vyšší koncentrací žloutku se projevoval toxický účinek látek z interakce na spermie. Ale hladina koncentrace vaječného žloutku v ředidle pod 1,5 % by mohla představovat bezpečnou hranici pro sperma, kde není odstraněná semenná plazma, jelikož tato hodnota vaječného žloutku v ředidle neměla žádný toxický účinek na životaschopnost spermií. Tudíž je možné použít pro zmrazení nepromytého spermatu ředidlo s obsahem vaječného žloutku v koncetraci 1,5 %, aniž by došlo ke snížení vitality rozmrazeného spermatu. Ve studii od Swelum et al. (2018) byly porovnávány účinky vaječných žloutků od různých druhů ptáků, které se přidaly do extenderu spermatu a byly zmrazeny. Odebrané ejakuláty byly zředěny s ředidlem obsahujícím vaječné žloutky různých druhů ptáků-slepice, holub, husa, japonská křepelka, kachna, krůta. Vzorky po naředění byly ekvilibrovány při 5°C po dobu 2 hodin a poté zmrazeny v parách kapalného dusíku po dobu 8 minut a následně uloženy do kapalného dusíku při -196°C. Po rozmrazení při 37 °C po dobu 30 s byly vzorky hodnoceny na pohyblivost spermií, vitalitu, abnormalitu, integritu plazmatické membrány a fragmentaci DNA. Ve výsledcích nejlepší kryoprotektivní účinek ukázal vaječný žloutek slepice ve všech hodnocených parametrech. Vaječné žloutky ostatních druhů ptáků neposkytovaly dostatečnou kryorezistenci a spermie vykazovaly horší kvalitu po rozmrazení. Složení drůbežího vaječného žloutku, hlavně jeho typ mastných kyselin a koncentrace stopových prvků, významně ovlivnilo kvalitu spermatu po rozmrazení. Zlepšení nebo pokles

kvality spermatu po rozmrazení lze připsat rozdílům v biochemickém složení žloutků u různých druhů ptáků, jelikož jejich vaječné žloutky mají různé obsahy mastných kyselin, cholesterolu a fosfolipidů.

Vaječný žloutek, jako živočišný produkt, může představovat potenciální biologické riziko. Může totiž obsahovat kontaminanty, které by mohly narušit kryorezistenci spermií. Proto je potřebné nalézt alternativu za čerstvý vaječný žloutek s menším rizikem škodlivosti, ale se stejnou schopností ochrany spermií před poškozením ze zmrazení. Použití práškového vaječného žloutku eliminuje možnou bakteriální kontaminaci díky pasteračním procesům během jeho výroby a mohlo by být alternativou za čerstvý vaječný žloutek. Porovnání těchto dvou typů vaječných žloutků nepřineslo žádné velké rozdíly v ochraně spermií při kryokonzervaci. Tudíž s přihlédnutím k bezpečnostním opatřením a stejným účinkem ochrany spermií je doporučováno použití práškového vaječného žloutku jako náhrady za čerstvý vaječný žloutek (Tabarez et al. 2017). Další variantou náhrady za vaječný žloutek je složka neživočišného původu-sójový lecitin. Sójový lecitin byl již úspěšně použit jako doplněk kryokonzervačních médií u několika druhů, například u skotu, ovcí, buvolů, koní (Chelucci et al. 2015).

Sójový lecitin se získává ze sójových bobů a jako jeden ze skupiny fosfolipidů se podílí na důležité regulaci membrány živočišných buněk. Stejně tak obsahuje fosfolipidy i vaječný žloutek, a proto byl navržen sójový lecitin jako jeho náhrada v ochraně spermií při procesu kryokonzervace. Sójový lecitin však představuje vhodnější variantu z hlediska biologické bezpečnosti, jelikož snižuje riziko zavlečení bakterií a mykoplazmat do zmrazovacích ředidel (Shu Shan et al. 2009). Kryorezistetní mechanismus lecitinu spočívá v náhradě fosfolipidů v membráně spermií a tím dochází ke snížení potřebného bodu mrazu u spermií. Také může kolem spermií vytvořit ochranný film, který zabrání tvorbě intracelulárních ledových krystalů a tím zamezí mechanickému poškození membrán spermií (Chelucci et al. 2015). Při porovnávání vaječného žloutku a sójového lecitinu ve zmrazovacím ředidle, nebyly pozorovány žádné významné rozdíly. Vzorky doplněné 2 % sójového lecitinu byly ve výsledcích rovnocenné výsledkům vzorků naředěných ve 20 % vaječného žloutku (Sun et al. 2020). Chelucci et al. (2015) ve své studii zkoumal ideální koncentraci sójového lecitinu, která by měla být přidána do extenderu pro spermie kozla. Ve studii se hodnotily účinky sójového lecitinu na akrozom, mitochondrie spermií, na funkce plazmatické membrány a celistvost DNA. Ukázalo se, že při koncentraci 1 % sójového lecitinu v extederu bylo nejúčinnější pro zachování životaschopnosti a motility kozlích spermií. Vyšší neporušenost DNA a akrozomu ve výsledcích předpovídá že, sójový lecitin zajišťuje lepší ochranu před poškozením membrány spermií chladovým šokem. Nejnižší pokles motility a životaschopnosti byl, oproti čerstvému spermatu, pozorován u vzorku s koncentrací sójového lecitinu 1 % (Chelucci et al. 2015). Vidal et al. (2013) potvrzuje, že extendery obsahující sójový lecitin jako zdroj lipoproteinů mohou být použity pro zmrazení kozího spermatu, aniž by se zhoršila kvalita spermií více než v jiném běžném ředidle. Výsledky těchto studií podporují použití sójového lecitinu jako náhradu za prodlužovače živočišného původu, které s sebou přinášejí potencionální hygienické riziko přenosu nemocí a biologickou nebezpečnost (Chelucci et al. 2015).

3.8.2 Mléko

Druhým nejpoužívanějším nepentrujícím kryoprotektivem je odtučněné odstředěné mléko (Sharma & Sood 2020). Mléko je biologické a komplexní médium pro kryokonzervaci spermatu, obsahuje složky užitečné pro spermie, ale může zahrnovat i složky škodlivé (Batellier et al. 2001). Jako například spermicidní protein laktenin, který se ale díky tepelnému ošetření mléka odstraní. Proto je doporučováno při použití mléka jako ředidla ho technologicky upravit (Cseh et al. 2012). Extendery na bázi mléka zajišťují kryoprotektivní roli spermiím při ochlazování. Ovšem byla zjištěna negativní korelace mezi mlékem a semennou plazmou kozla (Pellicer-Rubio & Combarnous 1998). Pellicer-Rubio et al. (1997) ve svém zkoumání izoloval a charakterizoval BUSgp60 lipázu produkovanou bulbouretrální žlázou kozla. Tato lipáza se nachází v semenné plazmě kozla a je odpovědná za zhoršování účinků semenné plazmy na spermie při ředění v mléčných nástavcích. Pravděpodobně lipáza BUSgp60 v mléce hydrolyzuje mléčné triglyceridy na volné mastné kyseliny, při čemž jedna z nich, kyselina olejová, vykazuje nežádoucí účinek na spermie. Možnými řešeními tohoto problému je zředění spermatu a následné odstředění semenné plazmy před přidáním mléčného plnidla anebo přidáním inhibitoru do extenderu a vyblokování účinku lipázy BUSgp60.

Většinou se ředidla na bázi mléka používají ke krátkodobé konzervaci. Schopnost oplodnění kozlích spermií uložených v mléce je přibližně 12-24 hodin (Leboeuf et al. 2003).

U koňských spermií bylo zjištěno, že nativní fosfokaseinát je nejúčinnější složkou pro udržení motility a zachování plodnosti. Fosfokaseinát je jednou ze složek mléka (Batellier et al. 1997). Proto se zkoumaly tyto účinky i u kozlů, mezi ředidlem odstředěného mléka a chemicky definovaného ředidla doplněného fosfokaseinátem. Výsledky ukázaly že ředidla na bázi fosfokaseinátu zvýšily přežití spermií při delší době chlazeného skladování. Dokonce nebyly zaznamenány žádné škodlivé účinky semenné plazmy na spermie, skladované při 4 °C. Chemicky definovaný extender s obsahem fosfokaseinátu by mohl být zajímavou náhradou za mléčný extender, a to i díky jeho hygienické bezpečnosti (Leboeuf et al. 2003).

3.8.3 Glycerol

Druhou skupinou kryoprotektantů, které tvoří hlavní část mrazících ředidel, jsou penetrační kryoprotektanty. Ty jsou schopné přecházet přes membránu spermií, a tudíž působí jak intracelulárně, tak i extracelulárně. Zlepšují kryorezistenci spermatu tím, že dokážou přeuspořádat membránové lipidy a proteiny. Tím také zvětší fluiditu membrány a zvětší dehydrataci při nízkých teplotách (Sharma & Sood 2020). Dehydratace spermie vzniká v důsledku osmoticky řízeného toku vody, který se mění podle chemického charakteru kryoprotektiva. Díky tomu má spermie méně vnitřní vody, což je výhodné, protože se uvnitř ní vytvoří méně intracelulárního ledu při snížení teploty pod bod mrazu. Intracelulární led, vznikající při mrazení spermatu, je odpovědný za kryopoškození spermie a s tím spojené snížení plodnosti spermatu (Gangwar et al. 2016). Penetrační kryoprotektiva fungují navíc jako rozpouštědla a dokážou rozpouštět cukry a soli v ředidle pro jejich správnou funkci (Purdy 2006).

Zástupci pronikajících kryoprotektantů jsou glycerol, ethylenglykol, propylenglykol, z nichž se nejčastěji u kozlích spermií používá glycerol (Sharma & Sood 2020). Při používání

glycerolu jako ředidla, je důležité zvolit jeho vhodnou koncentraci pro očekávanou správnou funkci. Nižší koncentrace není schopna poskytnout dostatečnou kryorezistenci spermií, a naopak příliš vysoká koncentrace může být pro spermie škodlivá. Takže hladina obsahu glycerolu přidávaná do ředidla je závislá na jeho toxických vlastnostech pro spermie, závisí také na složení ředidla, stupni mrazení, způsobu přidávání a typu spermií (Rizal et al. 2002). Bylo provedeno několik studií pro vyhodnocení optimální koncentrace glycerolu, přidávaného do ředidla pro zmrazení kozlího spermatu. Výsledky ukázaly, že nejideálnější koncentrace samotného glycerolu přidaného do ředidla je 6 % (Kundu et al. 2000). Kulaksiz et al. (2013) zjistil, že tato obecně ideální koncentrace glycerolu pro kozlí spermie se může měnit mezi plemeny. V jeho studii porovnával účinky hladin glycerolu na zmrazení spermatu u angorských, kiliských a saanských koz. Nejlepší motilita spermií po rozmrazení byla u angorských a kilis koz při koncentraci glycerolu 5 %, zatímco u saanských koz to bylo při zastoupení glycerolu v 7 %. Výsledky z dalších zkoumaných parametrů jen potvrdily, že ideální koncentrace glycerolu v ředidle se může lišit v závislosti na plemeni. Konečné stanovení vhodných procent glycerolu bylo následující: angorská koza 5 %, koza kilis 5-9 % a saanenská koza 7 %. Dalším plemenem, u něhož byla zjišťována ideální koncentrace glycerolu ve zmrazovacím ředidle bylo plemeno kozy Gaddi. U tohoto plemene koz neměla hladina glycerolu žádný vliv na progresivní motilitu spermií a odpověď HOST. Ale hodnoty životaschopnosti a abnormality spermií byly nejlepší při 6 % glycerolu v ředidle. Tato procentuální koncentrace glycerolu byla dále potvrzena dobrou odezvou na plodnost samic (Sharma et al. 2020).

3.8.4 Cukry

Semenná plazma přirozeně obsahuje cukry, protože spermie je potřebují pro dýchání. Z běžných monosacharidů má největší zastoupení v čerstvé kozlí semenné plazmě fruktóza. Fruktóza je hlavním substrátem pro glykolýzu, díky níž vzniká energie, potřebná pro spermie. Dalším monosacharidem, poskytujícím substrát pro tvorbu, energie je glukóza. Díky těmto monosacharidům mohou spermie fungovat fyziologickým způsobem, takže je logické jejich zahrnutí do ředidla pro zmrazení inseminačních dávek (Purdy 2006). Do ředidla se mohou přidat ještě další složitější cukry, například laktóza, rafinóza, trehalóza, dextrany a další. Tyto vícemolekulové sacharidy už nejsou schopné projít přes plazmatickou membránu spermie, a tudíž se z nich stávají nepenetrující kryoprotektivní cukry, které působí jen extracelulárně. Jejich přítomnost vně buněk zvyšuje osmotický tlak a způsobuje dehydrataci spermií, díky níž dochází k menší tvorbě intracelulárního ledu při mrazení. Také interagují s plazmatickou membránou, ve které mění rozložení fosfolipidů ve prospěch kryorezistence spermií (Gangwar et al. 2016). Mimo jiné přítomnost cukrů udržuje nižší koncentraci solí v ředidle a tím snižuje jejich negativní působení na spermie během ekvilibrace (Aboagla & Terada 2003).

Při zkoumání různých kombinací sacharidů, přidaných do ředidla pro zajištění kryoprotekce spermií, měla optimální výsledky kombinace glukózy a trehalózy. Glukóza sama o sobě zvýšila dopřednou motilitu spermií a při doplnění trehalózou se navíc zlepšila celková motilita, integrita akrozomu a membrány u zmrazených vzorků. Suplementace glukózového extenderu trehalózou v koncentraci 198,24 mM zlepšila kvalitu kryokonzervovaného spermatu búrských koz (Naing et al. 2010). Trehalóza jako kryoprotektant, přidaná do zmrazovacího

ředidla byla dále zkoumána. Aboagla & Terada (2003) ve své studii uvádí, že trehalóza významně zlepšila kryorezistenci kozlích spermií. Po romrazení totiž zlepšila motilitu spermií a celistvost akrozómu. Společně s těmito výsledky bylo zjištěno, že trehalóza pravděpodobně zvyšuje fluiditu membrány spermií a tím zvyšuje kryorezistenci spermatu během zmrazování. Nejlepších výsledků motility hodnocených pomocí CASA po rozmrazení spermií se dosáhlo po přidání 50 mM anebo 75 mN trehalózy do ředidla. Vyšší koncentrace trehalózy už zanechávaly negativní účinky na integritu plazmatické membrány i na celkovou morfologii spermie (Tuncer et al. 2013). V kombinaci s trehalózou v ředidle byl zkoumán ještě antioxidant mitochinon (Rezaei et al. 2023). Mitochinon je antioxidant zaměřený na ochranu mitochondrií v buňkách, které jsou citlivé na proces kryokonzervace. Mitochondrie jsou pro buňku hlavními nosiči energie, a jejich poškození by znamenalo sníženou pohyblivost spermií po rozmrazení. Nehledě na to, že poničená mitochondrie produkuje ROS, které jsou v nadměrném množství pro spermie škodlivé. Mitochinon se skládá z uměle vytvořeného koenzymu Q10 a lipofilní látky. Dokáže procházet mitochondriální membránou a snižovat oxidační stres, vyvíjený na spermii během zmrazování (Arjun et al. 2022). Při zkoumání vhodné koncentrace antioxidantu mitochinon, přidaného do ředidla kozího spermatu společně s trehalózou, bylo nejlepších výsledků dosaženo při 200 nM. Mitochinon v koncentraci 200 nM buď samostatně nebo v kombinaci se 150 mM trehalózy zlepšily kvalitu kryokonzervovaných kozlích spermií po rozmrazení (Rezaei et al. 2023).

Cyklodextriny jsou cyklické sacharidy, složené z šesti až osmi glukózových zbytků spojených do kruhu. Jejich nejpozoruhodnější vlastností je schopnost přijmout do jejich celku široké spektrum pevných, kapalných a plynných sloučenin. Přijatá molekula je držena v dutině molekuly cyklodextrinu (Del Valle 2004). Cyklodextriny, přidané samostatně do ředidla spermatu před kryokonzervací, stimulují odstraňování cholesterolu z membrán spermií. To ale není žádoucí, protože cholesterol je součástí membrány spermií a reguluje spolu s fosfolipidy její strukturu. Proto se do ředidel pro kryokonzervaci spermatu přidávají cyklodextriny, již naplněné cholesterolem. Naopak cyklodextriny s navázaným cholesterolem přidané do ředidla, cholesterol vkládají do membrán spermií díky přítomnosti vnitřního hydrofobního jádra (Lone 2018). Savčí buňky potřebují cholesterol pro svou správnou funkci (Yeagle 1985). Cholesterol, obsažený v membráně spermií snižuje přechodnou teplotu membrány, udržuje ji v tekutém stavu, a tím zmenšuje kryopoškození membrány spermií při snižování teploty. Čím více cholesterolu membrána spermie obsahuje před snižováním teploty při kryokonzervaci tím, se zlepšuje kryorezistence membrány spermií. Proto byly cyklodextriny naplněné cholesterolem přidávané do ředidel. Právě díky koncentračnímu gradientu se cholesterol předává do membrán spermií (Moore et al. 2005). Salmon et al. (2016) zjistil že cholesterol přidaný do ředidla přes cyklodextriny, zvyšuje obsah cholesterolu v membránách i kozlích spermií a tím se zlepšuje jejich kryorezistence. Po přidání 1 mg cyklodextrinů naplněných cholesterolem do ředidla před kryokonzervací se u rozmrazených spermií zlepšila procenta celkové pohyblivosti a životaschopnosti, avšak zvýšení nebylo tak významné oproti kontrolnímu vzorku. V případě odstranění semenné plazmy bylo lepších výsledků prokázáno při přidání cyklodextrinů s cholesterolem až po centrifugaci spermatu. Doplnění cyklodextrinů, naplněných cholesterolem do všech zkoumaných ředidel, přineslo zlepšení kryopřežití spermií, což činí tohle doplnění jako praktickou metodu. (Konyali et al. 2013)

3.8.5 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou jednou ze složek semenné plazmy. Obsah aminokyselin v semenné plazmě u kozlů se pohybuje okolo 0,77-1,48 g/dl (Juyena & Stelletta 2012). Přestože není přesně pochopený mechanismus kryoprotekce spermií způsobený aminokyselinami, jejich zařazení do mrazících ředidel u několika hospodářských zvířat přineslo pozitivní výsledky (Sangeeta et al. 2015). Každá aminokyselina působí na spermie při procesu kryokonzervace jiným způsobem, při jejich správné kombinaci dochází k celkové ochraně spermatu proti kryopoškození. Jejich pozitivní účinky na spermie jsou popisovány jako kryoprotektivní, antioxidační, metabolické a osmoregulační. Ovšem všechny tyto pozitivní účinky mohou být vyrušeny při přidání nevhodně vysoké koncentrace aminokyselin do ředidla. Příliš vysoká koncentrace aminokyselin způsobuje vysoký osmotický tlak, který může mít škodlivé účinky na spermie (Martins-Bessa et al. 2007).

Pozitivní vliv aminokyselin na přežití spermií po zmrazení byl zaznamenám u berana. Konkrétně se jednalo o aminokyseliny glutamin a prolin. Po jejich přidání do zmrazovacího ředidla se po rozmrazení významně zlepšila motilita spermií, celistvost akrozomů a procento živých spermií (Sangeeta et al. 2015). Proto se Zhang et al. (2022) ve své studii zaměřil na doplnění prolinu do ředidla i u kozlího spermatu. Kozí sperma bylo zmrazeno v ředidlech s různými koncentracemi prolinu, od 0,5 mM do 4 mM. Nejlepších výsledků po rozmrazení bylo dosaženo u spermií doplněných 2 mM prolinu do ředidla. Tato koncentrace významně zvýšila po rozmrazení celkovou pohyblivost spermií, integritu membrány a akrozomu, přímočarou rychlost. Celková pohyblivost byla zvýšena z 38 % u kontrolního vzorku na 53 % u vzorku doplněného 2 mM prolinu. Prolin zlepšil kvalitu kozlích spermií po rozmrazení snížením oxidačního stresu během kryokonzervace. Kryoprotektivní vliv prolinu a glutaminu na kozlí spermie byl dále zkoumán spolu v kombinaci s kreatinem (Farshad & Hosseini 2013). Kreatin v mrazícím ředidle vychytává volné radikály tím zajišťuje funkci antioxidantu a dále funguje jako zásobárna a transportér energie mezi mitochondriemi a pohyblivými částmi spermií (Wallimann et al. 2011). Kombinace těchto aminokyselin spolu s kreatinem přidanými do zmrazovacího ředidla pro kozlí spermie přinesla velmi výrazné zlepšení parametrů rozmrazených spermií a snížení celkových abnormalit. Ovšem doplnění ředidla samotným kreatinem v koncentraci 2,5 mM nebo 5 mM ukázala mnohem lepší hodnoty rozmražených spermií než v kombinaci s aminokyselinami. Po přidání kreatinu v koncentraci 2,5 mM do ředidla se zvýšila motilita na 61 %, životaschopnost na 74 %, akrozomální integrita na 92 % a membránová integrita na 50 % (Farshad & Hosseini 2013). Glutamin působí v extracelulárním prostředí spermie jako antioxidant. Po přidání do zmrazovacího ředidla spolu s polysacharidem hyaluronanem měl kryoprotektivní účinky na spermie. Tato kombinace výrazně zlepšila funkční integritu mebrány hodnocenou HOST testem, který prokázal kryoprotektivní účinek (Bucak et al. 2009).

Kundu et al. (2001) provedl studii s cílem stanovit kryoprotektivní účinky několika aminokyselin na kozí spermie ve zmrazovacím ředidle. Nejpříznivější výsledky v ochraně spermií během kryokonzervace měl alanin, který zlepšil dopřednou a celkovou motilitu. Následovali ho aminokyseliny glutamin, prolin a glycin. Tyto aminokyseliny vykazovali příznivé účinky na spermie v určitých koncentracích, při zvýšení nad tuto optimální hladinu v ředidle prudce klesla motilita spermií. V jiné studii byly také porovnávány kryoprotektivní

účinky aminokyselin doplněné vitamínem E. Porovnávali se mezi sebou glutamin, glycin, taurin a prolin, přičemž ke každé byl do ředidla doplněn 1 mM/ml vitamín E. Nejvyšší míra životaschopnosti byla vyhodnocena u všech aminokyselin doplněných vitamínem E. S ohledem na výsledky lze konstatovat že vitamín E přidaný do zmrazovacího ředidla má zesilující účinek kryoprotektivních vlastností aminokyselin na kozlí spermie (Merati & Farshad 2021).

3.8.6 Antioxidanty

Jakákoliv látka, která při nízké koncentraci zabraňuje oxidaci bílkovin, lipidů, sacharidů a DNA se nazývá antioxidant. Reaktivní formy kyslíku (ROS) vznikají v těle živočichů v důsledku působení různorodých abiotických stresů a jsou vysoce reaktivní a toxické. Zvýšený obsah způsobuje poškození lipidů, proteinů, sacharidů a DNA. Nerovnováhou mezi vzniklými reaktivními formami kyslíku a přirozenou antioxidační obranou vzniká oxidační stres (Sindhi et al. 2013). Reaktivní formy kyslíku jako je peroxid vodíku, superoxidové anionty a hydroxylové radikály jsou produkovány spermiemi a imunitními buňkami ve spermatu během kryokonzervace (Gangwar et al. 2015). Semenná plazma a spermie mají za normálních podmínek řadu vlastních antioxidačních mechanismů na vychytávání ROS a neutralizaci jejich škodlivých účinků. Ovšem proces kryokonzervace tuto rovnováhu narušuje a vzniká nadmíra reaktivních forem kyslíku. Ty pak způsobují poškození spermií v podobě narušení mitochondriálních a plazmatických membrán, rozpad chromozomů a DNA což vede ke snížení motility a životaschopnosti spermií (Amidi et al. 2016). Pro překonání tohoto problému bylo navrženo přidání různých antioxidantů do zmrazovacích ředidel aby inhibovaly nadměrnou tvorbu ROS a poskytovaly potřebnou kryoochranu (Memon et al. 2012).

Existují dva typy antioxidantů, enzymatické a neenzymatické antioxidanty. Enzymatické antioxidanty jsou přírodní a účastní se přirozeného antioxidačního obranného systému spermatu. Jsou to například glutathionperoxidáza, glutathionreduktáza, superoxidismutáza a kataláza. Neenzymatické antioxidanty neboli syntetické antioxidanty jsou už uměle přidané buď do ředidla nebo do stravy. Mohou to být glutathion, uráty, vitamín E, karotenoidy, selen, zinek a další (Amidi et al. 2016). Spermie savců tedy i kozla obsahují vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin, a proto jsou velmi náchylné k poškození reaktivními formami kyslíku (Asadpour et al. 2011).

Bylo provedeno několik studií o vlivu přidání antioxidantu nebo jejich kombinací do zmrazovacích extenderů u různých druhů zvířat (Memon et al. 2012; Amidi et al. 2016). Gangwar et al. (2015) zkoumal vliv suplementace vitamínem C ve zmrazovacím extenderu u koz plemene Barbari. Vitamín C (kyselina askorbová) je přirozený, ve vodě rozpustný antioxidant semenné a krevní plazmy. V těle je využíván jako kofaktor enzymů a může fungovat jako antioxidant reakcí s volnými radikály. V prodlužovači by mohl zlepšit kryorezistenci spermií po zmrazení svou nepřetržitou schopností vychytávat volné radikály a omezit kryopoškození způsobené ROS. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že vitamín C v koncentraci 45,42 μM a 56,78 μM má pozitivní vliv na motilitu a životaschopnost spermií po rozmrazení. Kryoprotektivní účinky vitamínu C na kozlí spermie by ho mohli zařadit mezi antioxidanty do rutinního procesu zmrazování pro lepší regeneraci spermatu po rozmrazování. V dalších studiích s kozlím spermatem byly zkoumány různé kombinace různorodých antioxidantů. Při suplementaci prodlužovače pyridoxinem v kombinaci s vitamínem E,

vitamínem C a melatoninem byla po kryokonzervaci hodnocena pohyblivost spermií, kapacitace a akrozomová reakce. Nejstabilnější zlepšení ve všech sledovaných parametrech přineslo doplnění extenderu samostatným pyridoxinem v koncentraci 6mM (Daramola et al. 2015). Jinou kombinaci antioxidantů vyzkoušel ve své studii Bucak et al. (2010), který zjišťoval účinky antioxidantů kurkuminu, inositolu a karnitinu. Nejlepšího výsledku motility, hodnocenou pomocí CASA dosáhl zmrazovací extender doplněný kurkuminem v dávce 2,5mM. Přítomnost všech tří antioxidantů ve všech dávkováních pomohla k lepší ochraně morfologií spermií ve srovnání s kontrolními vzorky.

Jako silný antioxidant se ukazuje neurohormon melatonin. Používá se ve spousta oblastech. Schopnost vychytávat volné radikály a zabránit peroxidaci lipidů a tím snížit oxidační stres, ho řadí mezi široce používané suplementy při kryokonzervaci spermií. Melatonin je v těle produkován mnoha buňkami, hlavně buňkami epifýzy, ve které je produkce ovlivňována střídáním světla a tmy. Seminální plazma obsahuje melatonin a spermie mají receptory pro molekuly melatoninu. Melatonin se dokáže navázat na spermie a změní specifické regulační mechanismy spermií a tím je chrání před oxidačním poškozením. Přidání melatoninu do extenderu u zvířat vedlo buď k přímému vychytávání volných radikálů transferem přes elektrony a vodík nebo k navození nepřímých účinků prostřednictvím vlastních antioxidantů spermií. Díky těmto vlastnostem melatonin zlepšuje motilitu, rychlost, integritu membrány, schopnost oplodnění a životaschopnost kryokonzervovaných spermií (Ofosu et al. 2021). Bylo provedeno několik málo studií vlivu melatoninu přímo na kozlí kryokonzervované spermie. Jejich výsledky jsou protichůdné. Nejnovější studie od Monteiro et al. (2022) neukázala žádné zlepšení kozích spermií krykonzervovaných v mrazícím ředidle doplněného melatoninem. Daramola & Adekunle (2015) zkoumaly účinky různé hladiny melatoninu, přidaného do dvou odlišných extenderů. Po rozmrazení byly hodnoceny kinetické parametry spermií a parametry životaschopnosti. Výsledky nepřinesly žádné významné příznivé účinky na vybrané parametry kryokonzervovaných spermií ani v jednom z těchto dvou různých extenderů. Naproti tomuto zjištění stojí starší studie, která ukazuje zlepšení motility spermií, integrity akrozomu a integritu membrány po přidání melatoninu domrazícího ředidla. Přidání melatoninu v koncentraci 8mM do prodlužovače konzistentně zlepšilo životaschopnost kryokonzervovaných kozlích spermií. V souvislosti s touto studií byl v dalším zkoumání k melatoninu přidán navíc myo-inositol. Vyšetřovány byly možné pozitivní synergické účinky těchto dvou látek na kryorezistenci kozlích spermií (Tanhaei Vash et al. 2022). Myo-inositol je cyklický alkoholový derivát glukózy, nacházející se v rostlinných tkáních, ve kterých mají metabolickou funkci při ukládání a získávání fosforu (Raboy 2003). Společná suplemetnace melatoninu a myo-inositolu v ředidle, zlepšila po procesu kryokonzervace motilitu spermií, životaschopnost a morfologii plazmatické membrány a akrozomu. Kombinace 5μM myo-inositolu a 1mM melatoninu v extenderu zajistila snížení produkce ROS, peroxidaci lipidu a poškození DNA spermií (Tanhaei Vash et al. 2022).

Do extenderu na bázi sójového lecitinu byl přidán antioxidant v podobě mateří kašičky. Mateří kašička byla přidána do extenderu v různých koncentracích 0,25 %, 0,5 % a 0,75 % (Alcay et al. 2017). Mateří kašička je produkována včelími dělnicemi, které ji používají ke krmení včelích larev a včelí královny. Složení sušiny mateří kašičky je následující, obsahuje značné množství bílkovin, lipidů, cukrů a aminokyselin, dále se sem řadí vitamíny A, B (kyselina pantotenová – antioxidační účinek), C, D, E, minerální soli, enzymy a antibiotické

složky (Abd-Allah 2012). Přidání mateří kašičky (v koncentraci 0,5 % a 0,75 %) do extenderu se sójovým lecitinem mělo pozitivní vliv na motilitu spermií a zvýšila se u vzorků i funkční integrita plazmatické membrány. Míra HOST testu na konci inkubace po rozmrazení byla vyšší u těchto dvou koncentrací mateří kašičky. Tyto výsledky prokazují, že přidání mateří kašičky v koncentraci 0,5 % a 0,75 % má příznivý vliv na rychlost motility kozích spermií po rozmrazení. A po inkubaci i pozitivní vliv na akrozom a plazmatickou membránu. Tento antioxidant může prodloužit přežití a dlouhověkost spermií (Alcay et al. 2017).

3.9 Laboratorní metody k ověření fertilizační schopnosti spermií po kryokozervaci

3.9.1 CASA

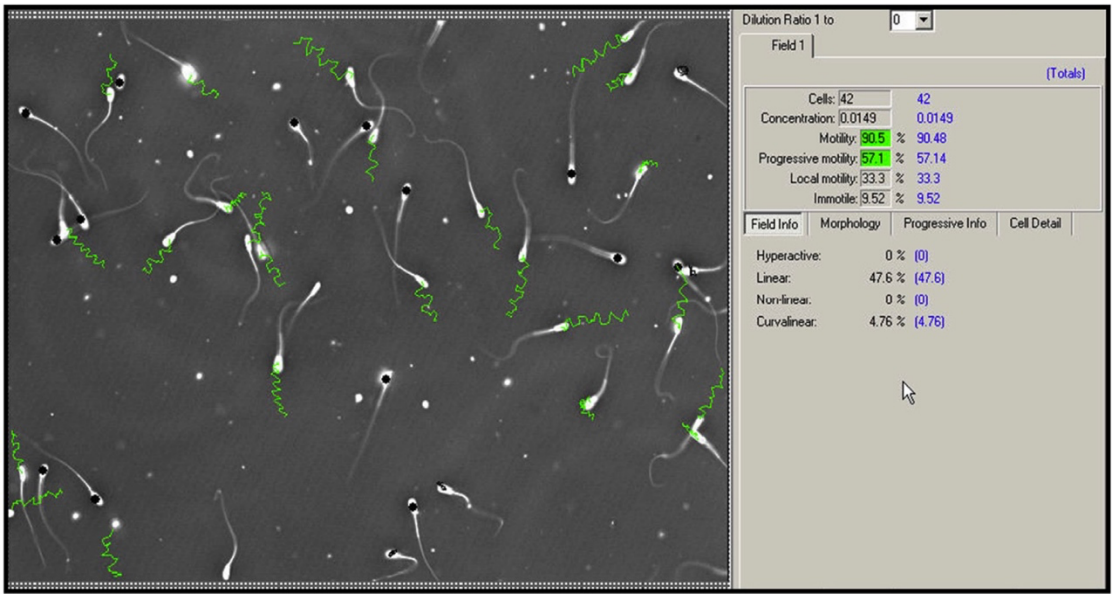
U mikroskopického hodnocení spermatu, prováděného člověkem pod mikroskopem, je velká míra subjektivity, která snižuje prediktivní hodnoty zkoumaného spermatu. Hodnotu snižují následné variability, pozorované mezi jednotlivci a laboratořemi. Přesnějšího a objektivnějšího hodnocení spermií můžeme dosáhnout prostřednictvím Počítačově asistované analýzy spermií (CASA) (Dorado et al. 2010). CASA umožňuje objektivní hodnocení různých charakteristik spermií, jedná se o pohyb spermií, rychlost, koncentrace a některé morfologie spermií, zvláště tvar hlavičky. Tyto charakteristiky jsou hlavním parametrem při vyšetřování kvality spermatu a stanovení korelací mezi kvalitou spermií a fertilitou (Verstegen et al. 2002).

CASA funguje na principu vizualizace a digitalizace obrazů spermií pomocí mikroskopu (technické vybavení), po kterém následuje zhodnocení obrazu a rozbor vedoucí k identifikaci a počtu spermií (programové vybavení). Plocha snímků obrazu je známá, tudíž lze vyhodnotit i objem a koncentraci spermií. Existuje více systémů CASA pro analýzu spermií zvířat, všechny však fungují na stejném principu. Může ale existovat několik rozdílů mezi technickou a programovou vybaveností (Brito et al. 2016).

Vzorek se vyšetřuje v jednorázových nebo v opakovaně použitelných měřících komůrkách o hloubce 10 nebo 20 mm, hloubka nesmí omezovat volný pohyb spermií. V po sobě jdoucích snímcích (rozsah cca 0,5 sekund) je hodnocen pohyb každé spermie, zaznamenaný jako změna v umístění hlavičky spermie. Software systému CASA na snímcích detekuje hlavičku spermie a vytvoří na ní centroid (centrální bod na hlavičce), který slouží ke sledování trajektorie spermie (viz Obrázek 5). Tyto výpočty umožňují konečné měření popisující pohyb spermií jako například, křivočará rychlost, průměrná rychlost dráhy, přímková rychlost, amplituda laterálního posunu hlavy, linearita křivočaré dráhy, přímost průměrné dráhy (Amann & Waberski 2014; Brito et al. 2016).

Nevýhody CASA mohou souviset s vyšší pořizovací cenou, kontrolou kvality, zvýšenou potřebou validace (Amann & Waberski 2014). V měření pomocí CASA se totiž musí nastavit hodnoty standardizované pro každý druh, protože jinak by to ovlivnilo výsledky měření, jelikož jednotlivé druhy zvířat disponují rozdíly ať už ve tvaru a velikosti hlavičky spermií nebo v charakteristice motility (Verstegen et al. 2002).

Vyšetření motility, koncentrace a částečné morfologie, které poskytuje systém CASA, umožňují srovnání s jinými podobně hodnocenými vzorky, díky přesným standardizovaným podmínkám (Amann & Waberski 2014).



Obrázek 5 Zobrazení pohybu spermií v systému CASA (Brito et al. 2016)

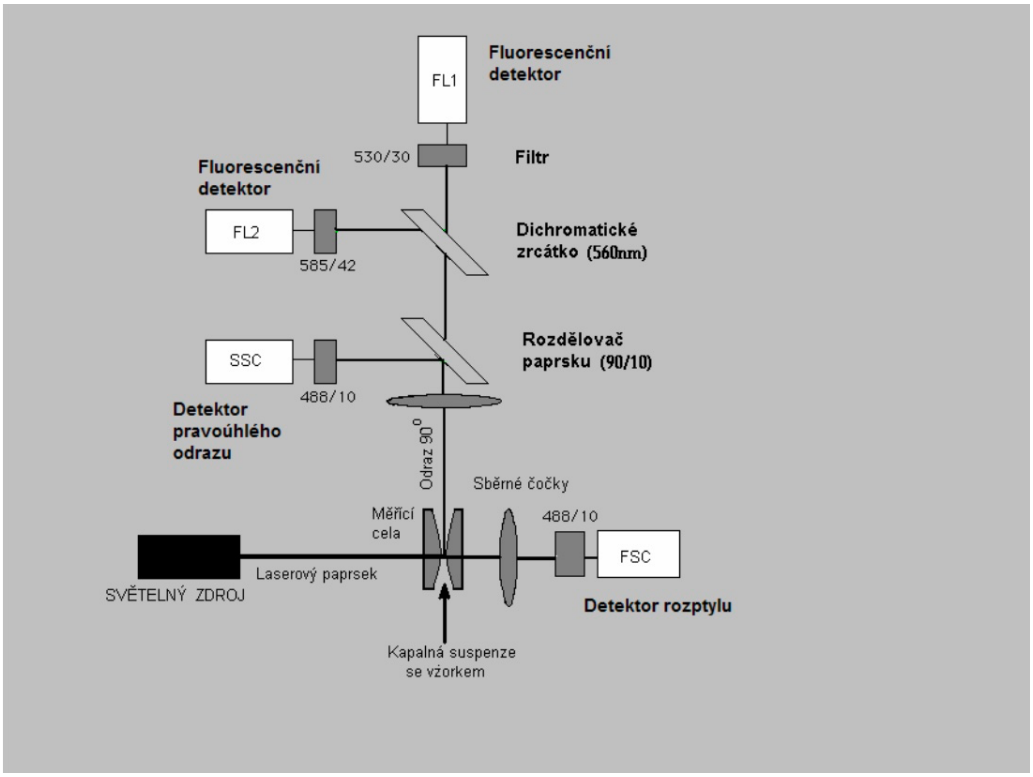
3.9.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technologie, která se používá hlavně k měření biochemických a fyzikálních profilů biologických částic. Obrovskou výhodou je její schopnost zpracovat měření na tisících jednotlivých buněk/částic za několik sekund (Jaroszeski & Radcliff 1999). Zachycuje fyziologii každé spermie a dále dokáže analyzovat životaschopnost spermií, akrozomální stav, kapacitaci, mitochondriální stav, apoptické markery, poškození DNA, počet a velikost spermií (Tanga et al. 2021).

Tato technologie vyšetřování spermatu je založená na laseru, který měří charakteristiky biologických částic, například spermií. Dopad laserového paprsku na jednotlivé buňky způsobuje rozptyl světla, jenž přímo souvisí se strukturními a morfologickými rysy buněk. Jedná se o čtyři vzájemně spojené systémy. Prvním je fluidní systém, který přemísťuje spermie z připravené suspenze druhému systému k analýze. Druhý je osvětlovací systém, u kterého dochází k prosvětlování částic pomocí zaostřeného laserového paprsku. Prosvětlování částic probíhá po jednotlivé buňce (spermii) v průtokové komoře. Třetí systém je optický a elektronický, ten zodpovídá za sběr a překlad vzniklých rozptýlených a fluorescenčních světelných signálů vzniklých při prosvitu částic. Soubory informací z těchto tří systémů se posílají do posledního, čtvrtého systému, kterým je úložiště dat a počítačový program. Program interpretuje tyto přeložené světelné signály do smysluplných dat pro následnou grafickou analýzu výsledků (Jaroszeski & Radcliff 1999). Data se následně ukládají ve standardních souborech FCS (Flow Cytometry Standard) (Martínez-Pastor et al. 2010).

Nevýhody pravidelného používání průtokové cytometrie jsou vysoké náklady na přístrojové vybavení, potřebu vyškoleného operátora a složité metody přípravy vzorků a vyhodnocení dat. Tato metoda vyšetření se používá zejména pro výzkumné účely, kalibraci různých přístrojů a validaci jiných metod. V dnešní době se však její využití zvýšilo hlavně

ve větších centrech pro zpracování spermatu (Brito et al. 2016). Na Obrázku 6 je zobrazeno základní schéma uspořádání typického průtokového cytometru (Novák et al. 2008).



Obrázek 6 Základní schéma uspořádání typického průtokového cytometru (Novák et al. 2008)

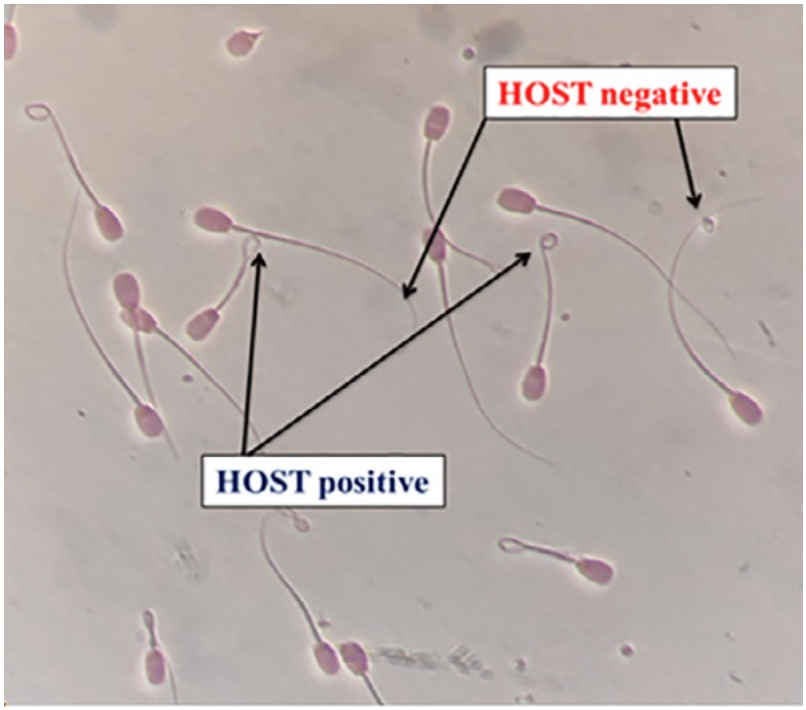
3.9.3 HOST

Hypoosmotický test otoku (HOST) se používá k hodnocení membránové neporušenosti neboli integrity spermií, a tím se stanovuje jejich kvalita (Zubair et al. 2015). Díky polopropustné buněčné membráně spermií lze tento jednoduchý a levný HOST test provést a zjistit, zda je membrána spermie porušena, či není. Schopnost polopropustnosti membrány pomáhá spermiím bobtnat v hypoosmotickém prostředí. Pokud se tedy spermie dostane do hypoosmotického prostředí je nucena přijmout vodu ze svého okolí dovnitř, aby se dosáhlo rovnováhy, a to se projeví tak zvaným nabobtnáním ocasu spermie (viz Obrázek 7). Jestliže spermie nenabobtná, celistvost membrány je již poškozená. Procento oteklých spermií je mírou neporušenosti membrány (Zubair et al. 2013).

Neporušená a funkční membrána je potřebná pro oplozovací schopnost spermií, jelikož hraje důležitou roli v kapacitaci spermií, akrozomové reakci a vazbě spermií na povrch vajíčka. Pokud je membrána spermie biochemicky poškozena nemůže dojít k plnohodnotnému oplodnění vajíčka. Proto tento HOST test lze použít jako indikátor fertilizační kapacity spermií (Zubair et al. 2015).

Nejlepší tlak hypoosmotického bobtnání se liší podle druhu zvířete, protože spermie jednotlivých druhů mají jiný tvar a složení (Leboeuf et al. 2006). První studie HOST testu u kozla byla zaznamenána od Fonseca et al. (2005), ve které se snaží najít ideální tlak hypoosmotického roztoku potřebného pro test. Byly použity roztoky na bázi citrátu sodného

a fruktózy s různými hodnotami osmolarit od 50 do 300 mOsm/l. Spermie byly následně hodnoceny jako nesvinuté, stočené a silně stočené (nabobtnaný ocas). Nejsilnější bobtnání a následné stočení spermie přinesl roztok s koncentrací 125 mOsm/l. HOST se tak zdá být cenným, praktickým, jednoduchým a levným prostředkem pro analýzu kozího spermatu.



Obrázek 7 Vyhodnocení testu HOST (Arjun et al. 2022)

3.10 Ekvilibrace

Kryorezistence spermií a jejich následná kvalita po rozmrazení závisí na několika faktorech. Jedním z nich je i rychlost ochlazování (ekvilibrace) a mrazení semene (Vozaf et al. 2021). Choe et al. (2006) uvádí, že způsob a rychlost zmrazování je jedním z hlavních vlivů působící na kryotoleranci kozího spermatu. Membrány spermií malých přežvýkavců zvládnou velmi rychle, v porovnání s ostatními živočichy, propouštět vodu a kryoprotektanty z ředidla, především glycerol, do svého vnitřního prostředí. U malých přežvýkavců se udává rychlost propustnosti membrány 2,79 μm/min/atm. To může mít za následek jejich extrémní citlivost na kryokonzervaci a klást tak nároky na správně zvolenou dobu ekvilibrace (Vozaf et al. 2021). Jelikož ekvilibraci lze definovat jako celkovou dobu, po kterou zůstávají spermie v kontaktu s ředidlem a jeho složkami před zmrazením (Choe et al. 2006).

Pomalé ochlazování poskytuje buňkám dostatek času pro vyrovnání osmotických koncentrací mezi intra a extra celulárním prostorem po přidání ředidla, dokud není buňka dostatečně dehydratovaná. Současně to ale spermie vystavuje dlouhodobému působení vysoké koncentrace solí též přítomných v extenderu, a ty mohou poškodit membránu buněk. Proto je nejoptimálnější rychlost ochlazování taková, která umožní dostatečnou dehydrataci buňky, pro zabránění tvorby intracelulárního ledu. Ale zároveň musí být co nejrychlejší, aby se zabránilo nežádoucím účinkům ředidla (Benson et al. 2012).

Při ekvilibraci se musí naředěné semeno kozla zchladit z teploty ředění cca 37 °C na předzmrazovací teplotu 4-5 °C za určitý čas (Ahmad et al. 2015). U kozlích spermií byl stanoven tento časový úsek většinou v rozmezí od 1 do 8 hodin (Sharma & Sood 2020). Baruah et al. (2004) zjistil, že sperma kozlů, ekvilibrované po dobu 0,5 hodiny nebo 1 hodinu či 2 hodiny, nevykazují mezi sebou po rozmrazení žádné významné rozdíly. Průměrné hodnoty motility spermií a intaktní akrozom spermií se podstatně nelišili mezi různými studovanými dobami ekvilibrace. Naopak (Ahmad et al. 2015) dospěl k závěru, že mírné ochlazování v kombinaci s 2-8 hodinovou ekvilibrací je schopno udržet lepší kvalitu spermií po rozmrazení. Mírné ochlazování znamená postupné ochlazování spermatu se snižováním teploty o 0,3 ° C za minutu, a dále ekvilibrace při 4 °C. Delší doba ekvilibrace může zachovat životaschopnost a integritu plazmatické membrány. U kozlů plemene Jamunapari studie ukázaly, že nejlepší ekvilibrační období je 4 hodiny pro následné zmrazení spermatu (Ranjan et al. 2015). Kratší doba ekvilibrace v podobě 2 hodin při 5 °C s glycerolem, byla přínosná pro spermie búrských kozlů (Sundararam & Edwin 2007).

Po vytvoření rovnováhy v metabolismu spermií vlivem snižování teploty může následovat zmrazení spermatu. To se provádí ve formě pelet nebo pejet (Lv et al. 2019). Při zmrazování ve formě pejet se naředěné a zchlazené sperma naplní do brčka o objemu 0,25 nebo 0,5 ml a umístí se na stojan nad páry kapalného dusíku. Po několika minutách se vzorky potopí přímo do kapalného dusíku (-196 °C) pro uskladnění. Ve formě pelet se naředěné a zchlazené sperma o objemu 0,1 až 0,5 ml rozdělí do prohlubní bloku pevného oxidu uhličitého (-79 °C) také na několik minut. Tam dojde k jejich předmražení a poté se také potopí do kapalného dusíku pro uskladnění (Gangwar et al. 2016).

3.11 Rozmrazování

Při rozmrazování spermatu dochází k opačnému procesu než se děje při chlazení. Tedy následný přítok vody do intracelulárního prostoru spermie může způsobit porušení membrány (Aboagla & Terada 2004). Tak jak je důležitá rychlost zchlazování, tak i rychlost rozmrazování má vliv na kryorezistenci spermií (Salamon & Maxwell 2000). Sperma různých druhů zvířat byla úspěšně rozmrazena při teplotách v rozmezí od teploty ledové vody až po 65 °C i vyšší. Doba rozmrazování musí být pečlivě hlídaná. Hlavně při vyšších teplotách, může totiž dojít k přehřátí a usmrcení spermií (Hafez & Hafez 2000). Sperma kozla se běžně rozmrazuje při 37-42 °C po dobu 30 sekund (Barbas & Mascarenhas 2009). Před rozmrazením zmrzlých spermií je potřeba dobře rozmyslet, kolik semena je možné co nejrychleji spotřebovat, protože rozmrazené spermie přežívají mnohem kratší dobu než ty nezmrazené (Hafez & Hafez 2000). Pugh & Baird (2012) uvádí že by se mělo najednou rozmrazit jen tolik inseminačních dávek kolik lze použít do 10 až 15 minut.

4 Závěr

Kryokonzervace spermatu kozlů a odolnost spermií během ní je prozatím méně prozkoumanou oblastí oproti jiným hospodářským zvířatům. Na rozdíl od většiny zvířat, u nichž se provádí kryokonzervace spermatu, jsou v kozlí semenné plazmě enzymy, které mohou reagovat se složkami běžně používaných ředidel za vzniku nepříznivých podmínek pro spermie. Z tohoto důvodu by mohlo být složitější nalézt u kozlů optimální způsob kryokonzervace spermií. Těmto negativním vlivům lze předejít odstraněním semenné plazmy před přidáním ředidel. Tento způsob ochrany spermií je efektivní a je běžně zařazován do procesu kryokonzervace kozlího spermatu.

Kryorezistence spermií je ovlivňována už při odchovu kozlů. Významný vliv má doplnění krmné dávky minerálními složkami ovlivňující vývoj spermií. Zlepšení kvality spermií kozlů po zmrazení se dosáhlo při doplnění mědi a zinku. Vliv metody odběru spermatu na parametry spermií nebyl významný u berana, ale u kozla se ukázala jako vhodnější metoda odběru pomocí umělé vaginy. Nejlepší výsledky byly prokázány při odběru spermatu na podzim, v období rozmnožování.

Při zpracování spermatu pro účely kryokonzervace, s co nejnižším poškozením spermií, je důležité správně zacházet se spermatem a vhodně zvolit ředidlo s kryoprotektivními složkami. Zahraniční studie, ze kterých se čerpalo nejvíce, se zaměřují na přidávání nejrůznějších druhů antioxidantů do ředidel spolu s kozlím spermatem. Z výsledků těchto studií je zřejmé že antioxidanty zlepšují přežití a funkčnost spermií po rozmrazení. Snižují oxidační stres způsobený reaktivními formami kyslíku vzniklých při mrazení a zabraňují tvorbě intracelulárního ledu. Významný vliv na regeneraci spermií po kryokonzervaci měl vitamín C.

Přestože umělá inseminace a s tím spojená kryokonzervace spermatu není u koz příliš rozšířená, je v zájmu udržování genetických rezerv se stále v tomto směru vzdělávat. Zásadní složkou uchovávání genových rezerv původních plemen je produkce kvalitního spermatu, které po hlubokém zmrazení po delší dobu bude stále schopné vysoké míry plodnosti. V tomto směru jsou dosavadní studie kozlího spermatu nedostatečné a je potřebné se této problematice věnovat i nadále. Oblast, která by mohla mít potenciál a přinést dobré výsledky je kombinace různých typů kryoprotektiv. Mohlo by se zde využívat synergického efektu kryoprotektiv a zvýšit tím kryorezistenci spermií. S ohledem na dosavadní výsledky v kryokonzervaci, které přinesly výrazné variace mezi plemeny koz, by bylo také přínosné zaměřit se na zkvalitnění ředidla a jeho složek pro konkrétní plemeno. V ČR by se právě mělo jednat o kozy bílé a hnědé krátkosrsté a tím podpořit kvalitu inseminačních dávek genové rezervy.

5 Literatura

Abd-Allah. 2012. Effect of Royal Jelly on the Fertilizing Ability of Buffalo Spermatozoa In Vitro. Journal of Buffalo Science 1:1-4. Available at http://www.lifescienceglobal.com/journals/journal-of-buffalo-science/volume-1-number-1 (accessed March 14, 2023).

Abecia JA, Forcada F, González-Bulnes A. 2011. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 27:67-79. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072010000782 (accessed March 30, 2023).

Aboagla EM-E, Terada T. 2003. Trehalose-Enhanced Fluidity of the Goat Sperm Membrane and Its Protection During Freezing. Biology of Reproduction 69:1245-1250. Available at https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.103.017889 (accessed April 11, 2023).

Aboagla EM-E, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology 62:1160-1172. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X04000834 (accessed April 5, 2023).

Abril-Sánchez S, 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. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432019300648 (accessed March 14, 2023).

Ahmad M, Nasrullah R, Ahmad N. 2015. Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. Cryobiology 70:233-238. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224015000371 (accessed April 5, 2023).

Alcay S, Toker MB, Onder NT, Gokce E. 2017. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. Cryobiology 74:81-85. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224016301808 (accessed March 14, 2023).

Ali S, Zhao Z, Zhen G, Kang J zi, Yi PZ. 2020. Reproductive problems in small ruminants (Sheep and goats): a substantial economic loss in the world. Large Animal Review 25:215-223. Available at https://www.largeanimalreview.com/index.php/lar/article/view/63 (accessed April 13, 2023).

Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology 81:5-17.e3. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X13003555 (accessed March 13, 2023).

Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell and Tissue Banking 17:745-756. Available at http://link.springer.com/10.1007/s10561-016-9566-5 (accessed March 30, 2023).

Arangasamy A, Krishnaiah MV, Manohar N, Selvaraju S, Rani GP, Soren NM, Reddy IJ, Ravindra JP. 2018a. Cryoprotective role of organic Zn and Cu supplementation in goats (Capra hircus) diet. Cryobiology 81:117-124. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224017305850 (accessed March 30, 2023).

Arangasamy A, Venkata Krishnaiah M, Manohar N, Selvaraju S, Guvvala PR, Soren NM, Reddy IJ, Roy KS, Ravindra JP. 2018b. Advancement of puberty and enhancement of seminal characteristics by supplementation of trace minerals to bucks. Theriogenology 110:182-191. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X18300207 (accessed April 18, 2023).

Arjun V et al. 2022. Effect of mitochondria-targeted antioxidant on the regulation of the mitochondrial function of sperm during cryopreservation. Andrologia 54. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14431 (accessed April 11, 2023).

Asadpour R, Jafari R, Tayefi-Nasrabadi H. 2011. Influence of Added Vitamin C and Vitamin E on Frozen-Thawed Bovine Sperm Cryopreserved in Citrate and Tris-Based Extenders. Veterinary Research Forum 2:37-44. Available at http://vrf.iranjournals.ir/article_1524_73609848c4258342799bbadc86ec65b6.pdf (accessed April 13, 2023).

Azerêdo GA, Esper CR, Resende KT. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen–thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. Small Ruminant Research 41:257-263. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448801001894 (accessed March 14, 2023).

Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and Tissue Banking 10:49-62. Available at http://link.springer.com/10.1007/s10561-008-9081-4 (accessed April 5, 2023).

Baruah CK, Biswas RK, Deka BC, Borgohain BN. 2004. Effect of glycerol equilibration periods on quality of frozen semen in Beetal x Assam local crossbred goats. Indian Veterinary Journal 8O:763-765.

Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. 2021. Diagnostic value of routine semen analysis in clinical andrology. Andrologia 53. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.13614 (accessed March 13, 2023).

Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E. 1997. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. Theriogenology 48:391-410. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X97002501 (accessed March 30, 2023).

Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. Animal Reproduction Science 68:181-190. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432001001555 (accessed March 30, 2023).

Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. 2012. The cryobiology of spermatozoa. Theriogenology 78:1682-1699. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X12003366 (accessed April 3, 2023).

Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. Molecular Reproduction and Development 73:1338-1344. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20565 (accessed April 3, 2023).

Brito LFC et al. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. Theriogenology 85:1507-1527. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16000030 (accessed March 13, 2023).

Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, Çevik M. 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. Small Ruminant Research 89:24-30. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448809002600 (accessed March 30, 2023).

Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, Akçadağ Hİ. 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Ruminant Research 81:90-95. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448808002423 (accessed March 30, 2023).

Bucek P, Syrůček J, Milerski M, Mareš V, Konrád R, Škared V, Rucki J, Hakl P. 2022. Ročenka chovu ovcí a koz v České republice za rok 2019. Praha.

Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. Animal Reproduction Science 130:187-192. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432012000401 (accessed March 14, 2023).

Daramola JO, Adekunle D. 2015. Supervivencia de espermatozoides de cabra crioconservados en diluyente a base de yema de huevo-tris suplementado con vitamina C. Archivos de Zootecnia 64:261-268. Available at http://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/402 (accessed March 30, 2023).

Daramola JO, Adekunle EO, Oke OE, Onagbesan OM, Iyasere OS, Williams TJ, James IJ, Oyewusi IK, Oyewusi JA. 2015. Effects of pyridoxine supplementation or in combination with other antioxidants on motility, in vitro capacitation and acrosome reaction of goat buck spermatozoa during cryopreservation. Small Ruminant Research 131:113-117. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448815300444 (accessed March 30, 2023).

Del Valle EMM. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry 39:1033-1046. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203002589 (accessed April 11, 2023).

Dorado J, Hidalgo M, Muñoz A, Rodríguez I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. Animal Reproduction Science 112:150-157. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432008001206 (accessed March 13, 2023).

Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. Animal Reproduction Science 121:115-123. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432010002617 (accessed March 13, 2023).

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 60:115-129. Available at https://akjournals.com/doi/10.1556/avet.2012.010 (accessed March 13, 2023).

Fantová M. 2012. Chov koz. Vyd. 3. Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda, Praha.

Farshad A, Hosseini Y. 2013. The cryoprotective effects of amino acids supplementation on cooled and post-thaw Markhoz bucks semen quality. Small Ruminant Research 114:258-263. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448813002320 (accessed April 18, 2023).

Fonseca JF, Torres CAA, Maffili VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT, Oliveira RFM. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. Animal Reproduction (AR) 2:139-144. Available at http://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6086f7783717068b47f3 (accessed April 16, 2023).

Gangwar C, Kharche SD, Kumar S, Jindal SK. 2016. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. Indian Journal of Small Ruminants (The) 22. Available at http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijsr&volume=22&issue=1&article=001 (accessed March 14, 2023).

Gangwar C, Kharche SD, Ranjan R, Kumar S, Goel AK, Jindal SK, Agarwal SK. 2015. Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. Small Ruminant

Research 129:104-107. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448815002552 (accessed March 30, 2023).

Ghosh CP, Datta S, Mandal D, Das AK, Roy DC, Roy A, Tudu NK. 2019. Body condition scoring in goat: Impact and significance. Journal of Entomology and Zoology Studies 7:554-560. Available at https://www.entomoljournal.com (accessed April 13, 2023).

Hafez B, Hafez ESE. 2000. Reproduction in farm animals. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Hahn K, Failing K, Wehrend A. 2019. Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. BMC Veterinary Research 15. Available at https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-2135-y (accessed March 13, 2023).

Hemalatha K, Arangasamy A, Selvaraju S, Krishnaiah MV, Rani GP, Mishra A, Soren NM, Reddy IJ, Ravindra JP. 2018. Effect of dietary supplementation of organic zinc and copper on in vitro semen fertility in goat. Small Ruminant Research 161:68-72. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092144881830066X (accessed April 18, 2023).

Horák F, Treznerová K. 2010. Světový genofond ovcí a koz. Svaz chovatelů ovcí a koz, Brno.

Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG, Manca ME, Naitana S, Berlinguer F. 2015. Soybean lecithin–based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. Theriogenology 83:1064-1074. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X14006876 (accessed March 14, 2023).

Choe C-Y, Kim J-G, Cho S-R, Son D-S, Kim Y-K, Balasubramanian S, Choe S-Y, Rho G-J. 2006. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. Reproduction in Domestic Animals 41:55-60. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00652.x (accessed March 30, 2023).

Jaroszeski MJ, Radcliff G. 1999. Fundamentals of flow cytometry. Molecular Biotechnology 11:37-53. Available at http://link.springer.com/10.1007/BF02789175 (accessed March 13, 2023).

Jedlička M. 2017. Koza Bílá krátkosrstá. Náš chov. ProfiPress. Available at https://naschov.cz/koza-bila-kratkosrsta/ (accessed April 5, 2023).

Jiménez-Rabadán P et al. 2012. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen. Animal Reproduction Science 136:47-54.

Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432012003028 (accessed March 14, 2023).

Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Álvaro-García PJ, Del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Fernández-Santos MR, Julián Garde J, Soler AJ. 2013. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. Cryobiology 67:251-257. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224013001983 (accessed March 14, 2023).

Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Bisbal A, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler AJ. 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. Animal Reproduction Science 132:88-95. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432012001121 (accessed March 14, 2023).

Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Fernández-Santos MR, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. Animal Reproduction Science 167:103-108. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432016300537 (accessed March 14, 2023).

Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. Journal of Andrology 33:536-551. Available at http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.110.012583 (accessed March 13, 2023).

Karagiannidis A, Varsakeli S, Karatzas G. 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. Theriogenology 53:1285-1293. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X00002727 (accessed March 30, 2023).

Kerketta S, Singh M, Patel BHM, Dutt T, Upadhyay D, Bharti PK, Sahu S, Kamal R. 2015. Relationships between age, body measurements, testicular measurements and total ejaculation of semen in local goat of Rohilkhand region. Small Ruminant Research 130:193-196. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448815300110 (accessed March 30, 2023).

Konyali C, Tomás C, Blanch E, Gómez EA, Graham JK, Mocé E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. Cryobiology 67:124-131. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224013001648 (accessed April 11, 2023).

Kos V, Andrlíková M, Ledabylová A, Marková B, Koudelová A, Novotná R, Vránová L, Čech S. 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie. Brno.

Kozumplík J, Gamčík P. 1984. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat: celoštátna vysokošolská učebnica pre vysoké školy veterinárske. Príroda, Bratislava.

Kulaksiz R, Ari UÇ, Üner AG. 2013. The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. Slovak Journal of Animal Science 46:39-44. Available at https://office.sjas-journal.org/index.php/sjas/article/view/244 (accessed April 13, 2023).

Kumar N, Rai B, Bhat SA, Kharche SD, Gangwar C, Jindal SK, Chandra S. 2016. Effect of management system and season on semen freezability in Jakhrana bucks. Veterinary World 9:199-202. Available at http://www.veterinaryworld.org/Vol.9/February-2016/15.html (accessed March 30, 2023).

Kundu CN, Das K, Majumder GC. 2001. Effect of Amino Acids on Goat Cauda Epididymal Sperm Cryopreservation Using a Chemically Defined Model System. Cryobiology 42:21-27. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224001922965 (accessed April 18, 2023).

Kundu CN, Chakraborty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC. 2000. Development of a Simple Sperm Cryopreservation Model Using a Chemically Defined Medium and Goat Cauda Epididymal Spermatozoa. Cryobiology 40:117-125. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224000922302 (accessed April 3, 2023).

Leboeuf B, Guillouet P, Batellier F, Bernelas D, Bonné JL, Forgerit Y, Renaud G, Magistrini M. 2003. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. Theriogenology 60:867-877. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X03000955 (accessed March 30, 2023).

Leboeuf B, Le Vern Y, Furstoss V, Kerboeuf D, Guillouet P, Magistrini M. 2006. Response of goat sperm to hypoosmotic steps modelled probit analysis. Animal Reproduction Science 91:265-274. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432005001065 (accessed March 13, 2023).

Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science 62:113-141. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432000001561 (accessed March 14, 2023).

Lone SA. 2018. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. Animal Reproduction Science 192:1-5. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432018301003 (accessed April 11, 2023).

Louda F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita, Praha.

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. Available at https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/bio.2018.0113 (accessed March 9, 2023).

Martin GB, Blache D, Miller DW, Vercoe PE. 2010. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. Animal 4:1214-1226. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751731109991674 (accessed March 30, 2023).

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, De Paz P. 2010. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. Reproduction in Domestic Animals 45:67-78. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x (accessed March 13, 2023).

Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A. 2007. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. Theriogenology 68:1088-1096. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07003858 (accessed April 18, 2023).

Marvan F. 2003. Morfologie hospodářských zvířat. Vyd. 3. Česká zemědělská univerzita v Praze v nakl. Brázda, Praha.

Mátlová IV, Konrád IR. 2015a. Metodika uchování genetického zdroje zvířat: Plemeno: Koza bílá krátkosrstá. Available at http://genetickezdroje.cz/narodni-program-uvod/kozy/narodni-program-kozy-bila-kratkosrsta-koza/ (accessed April 5, 2023).

Mátlová IV, Konrád IR. 2015b. Metodika uchování genetického zdroje zvířat: Plemeno: Koza hnědá krátkosrstá. Available at http://genetickezdroje.cz/narodni-program-uvod/kozy/narodni-program-kozy-hneda-kratkosrsta-koza/ (accessed April 5, 2023).

Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM. 2012. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. Animal Reproduction Science 136:55-60. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432012003351 (accessed March 30, 2023).

Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. 1985. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. American Journal of Veterinary Research 46:473-475. Available at https://europepmc.org/article/med/3888011 (accessed April 13, 2023).

Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. 1986. Comparison of semen collection techniques in goats. Theriogenology 26:823-827. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0093691X86900117 (accessed March 14, 2023).

Merati Z, Farshad A. 2021. Supplementary role of vitamin E and amino acids added to diluent on goat sperm freezability. Cryobiology 100:151-157. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224021000328 (accessed April 18, 2023).

Monteiro MM, Araújo Silva RAJ, Arruda LCP, Oliveira AS de, Mergulhão FC da C, Monteiro Júnior PLJ, Seal DC de M, Trevisan M, Batista AM, Guerra MMP. 2022. Effect of melatonin in different extenders on the quality of frozen semen of goats. Emerging Animal Species 5. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2772813722000154 (accessed March 30, 2023).

Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. Cryobiology 51:241-249. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224005001069 (accessed April 11, 2023).

Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. Animal Reproduction Science 122:23-28. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432010003520 (accessed April 11, 2023).

Narasimhaiah M, Arunachalam A, Sellappan S, Mayasula VK, Guvvala PR, Ghosh SK, Chandra V, Ghosh J, Kumar H. 2018. Organic zinc and copper supplementation on antioxidant protective mechanism and their correlation with sperm functional characteristics in goats. Reproduction in Domestic Animals 53:644-654. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.13154 (accessed April 18, 2023).

NRSGZZ: Národní program. 2022. Available at http://genetickezdroje.cz/narodni-program-uvod/# (accessed April 5, 2023).

NUNES JF, CORTEEL J-M, COMBARNOUS Y, BARIL G, LEBOEUF B. 1982. Rôle du plasma séminal dans la survie in vitro des spermatozoïdes de bouc. Reproduction Nutrition Développement 22:611-620. Available at http://www.edpsciences.org/10.1051/rnd:19820503 (accessed April 5, 2023).

Ofosu J, Qazi IH, Fang Y, Zhou G. 2021. Use of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals: A brief review. Animal Reproduction Science 233. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432021001652 (accessed March 30, 2023).

Pellicer-Rubio M-T, Combarnous 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. Available at https://rep.bioscientifica.com/doi/10.1530/jrf.0.1120095 (accessed March 30, 2023).

Pellicer-Rubio M-T, Magallon T, Combarnous Y. 1997. Deterioration of Goat Sperm Viability in Milk Extenders is due to a Bulbourethral 60-Kilodalton Glycoprotein with Triglyceride Lipase Activity1. Biology of Reproduction 57:1023-1031. Available at

https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod57.5.1023 (accessed March 14, 2023).

Pugh DG, Baird AN. c2012. Sheep and goat medicine. 2nd ed. Elsevier, Maryland Heights, Mo.

Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research 63:215-225. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448805000763 (accessed March 14, 2023).

Raboy V. 2003. Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. Phytochemistry 64:1033-1043. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942203004461 (accessed March 30, 2023).

Ranjan R, Goel AK, Ramachandran N, Kharche SD, Jindal SK. 2015. Effect of egg yolk levels and equilibration periods on freezability of Jamunapari buck semen. Indian Journal of Small Ruminants (The) 21:32-36. Available at http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijsr&volume=21&issue=1&article=007 (accessed April 5, 2023).

Rezaei A, Bahmani HR, Mafakheri S, Farshad A, Nazari P, Masoudi R. 2023. Protective effects of different doses of MitoQ separately and combined with trehalose on oxidative stress and sperm function of cryopreserved Markhoz goat semen. Cryobiology 110:36-43. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001122402200390X (accessed April 11, 2023).

Ridler AL, Smith SL, West DM. 2012. Ram and buck management. Animal Reproduction Science 130:180-183. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432012000383 (accessed March 30, 2023).

Ritar AJ, Salamon S. 1982. Effects of Seminal Plasma and of Its Removal and of Egg Yolk in the Diluent on the Survival of Fresh and Frozen-Thawed Spermatozoa of the Angora Goat. Australian Journal of Biological Sciences 35. Available at http://www.publish.csiro.au/?paper=BI9820305 (accessed March 14, 2023).

Ritar AJ, Salamon S. 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. Small Ruminant Research 4:29-37. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/092144889190050Z (accessed March 30, 2023).

Ritar AJ. 1993. Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture 33:807-820. Available at http://www.publish.csiro.au/?paper=EA9930807 (accessed March 30, 2023).

Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2002. Quality of Garut ram frozen semen in various glycerol concentrations. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner 7:194-199. Available at http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/jitv/article/view/294 (accessed April 13, 2023).

Rowe JD. 2010. Buck Health Management. American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings:145-148. Available at https://bovine-ojs-tamu.tdl.org/AABP/article/view/4098 (accessed April 13, 2023).

Roy A. 1957. Egg Yolk-Coagulating Enzyme in the Semen and Cowper's Gland of the Goat. Nature 179:318-319. Available at https://www.nature.com/articles/179318b0 (accessed April 5, 2023).

Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science 62:77-111. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037843200000155X (accessed April 5, 2023).

Salmon VM, Leclerc P, Bailey JL. 2016. Cholesterol-Loaded Cyclodextrin Increases the Cholesterol Content of Goat Sperm to Improve Cold and Osmotic Resistance and Maintain Sperm Function after Cryopreservation1. Biology of Reproduction 94:1-12. Available at https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.115.128553 (accessed April 11, 2023).

Sangeeta S, Arangasamy A, Kulkarni S, Selvaraju S. 2015. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. Animal Reproduction Science 161:82-88. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432015300038 (accessed April 18, 2023).

Sharma A, Sood P, Dogra PK. 2018. Seminal plasma removal improves cryopreserved semen quality in gaddi bucks. The Indian Journal of Animal Reproduction 39:25-28. Available athttps://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijar3&volume=39&issue=2&article=006 (accessed April 13, 2023).

Sharma A, Sood P, Chaudhary JK. 2020. Effect of different concentrations of glycerol in cryopreservation of Gaddi goat semen. Journal of Veterinary Andrology 5:1-6. Available at http://cesica.org/publicaciones/index.php/journal_veterinary_andrology/article/view/85 (accessed April 13, 2023).

Sharma A, Sood P. 2020. Caprine Semen Cryopreservation and the Factors Affecting it: An Overview. Veterinary Sciences: Research and Reviews 6:46-57. Available at http://researcherslinks.com/current-issues/Caprine-Semen-Cryopreservation-and-the-Factors-Affecting-it-An-Overview/18/8/2836/html (accessed March 13, 2023).

SHIPLEY, CFB, BUCKRELL, BRIANC, MYLNE, MJA, POLLARD, JOHN, HUNTON JR. 2007. Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep. 629-641in Current

Therapy in Large Animal Theriogenology. Elsevier. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780721693231500891 (accessed March 14, 2023).

Shu Shan Z, Jian Hong H, Qing Wang L, Zhong Liang J, Xiao Ying Z. 2009. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. African Journal of Biotechnology 8:6476-6480. Available at http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/38426FB29474 (accessed March 14, 2023).

SCHOK. Available at https://www.schok.cz/kozy/plemena/ (accessed April 5, 2023).

SIAS B, FERRATO F, PELLICERRUBIO M, FORGERIT Y, GUILLOUET P, LEBOEUF B, CARRIERE F. 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1686:169-180. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198104001635 (accessed March 30, 2023).

Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. 2013. Potential applications of antioxidants – A review. Journal of Pharmacy Research 7:828-835. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0974694313003733 (accessed March 30, 2023).

Souza RS, Barbosa LP, Pinheiro AM, Machado WM, Mendes CS, Araujo ML, Souza DO, Santana ALA. 2019. Qualidade seminal e perfil metabólico de caprinos alimentados com semente de linhaça na dieta. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 71:899-908. Available at http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352019000300899&tlng=pt (accessed March 30, 2023).

Sun L, Fan W, Wu C, Zhang S, Dai J, Zhang D. 2020. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. Cryobiology 92:146-150. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011224019302494 (accessed April 3, 2023).

Sundararam MN, Edwin MJ. 2007. Changes in Motility Characteristics of Goat Spermatozoa During Glycerol-Equilibration and the Relevance to Cryopreservation. Asian Journal of Cell Biology 3:22-33. Available at https://www.scialert.net/abstract/?doi=ajcb.2008.22.33 (accessed April 5, 2023).

Swelum AA-A, Saadeldin IM, Alanazi MB, Ba-Awadh H, Afifi M, Alowaimer AN. 2018. Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris glycerol extender on the post-thawing quality of buck semen. Animal Reproduction Science 195:345-354. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432018303890 (accessed March 14, 2023).

Sztankoova Z, Rychtarova J. 2017. Current Status of Goat Farming in the Czech Republic. 245-257in Sustainable Goat Production in Adverse Environments: Volume II.

Springer International Publishing, Cham. Available at http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-71294-9_18 (accessed March 9, 2023).

Tabarez A, García W, Palomo MJ. 2017. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. Small Ruminant Research 149:91-98. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448817300159 (accessed March 14, 2023).

Tanga BM, Qamar AY, Raza S, Bang S, Fang X, Yoon K, Cho J. 2021. Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment — A review. Animal Bioscience 34:1253-1270. Available at http://animbiosci.org/journal/view.php?doi=10.5713/ab.21.0072 (accessed March 13, 2023).

Tanhaei Vash N, Nadri P, Karimi A. 2022. Synergistic effects of myo-inositol and melatonin on cryopreservation of goat spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals 57:876-885. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.14131 (accessed March 30, 2023).

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. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0093691X9490692C (accessed March 14, 2023).

Tuncer PB, Taşdemir U, Büyükleblebici S, Özgürtaş T, Coşkun E, Erol H, Aydın FN, Gürcan İS. 2013. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen–thawed Angora buck semen. Small Ruminant Research 113:383-389. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448813001405 (accessed April 11, 2023).

Underwood EJ, Somers M. 1969. Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams. Australian Journal of Agricultural Research 20. Available at http://www.publish.csiro.au/?paper=AR9690889 (accessed March 30, 2023).

Van Niekerk FE, Van Niekerk CH. 1989. The influence of experimentally induced copper deficiency on the fertility of rams. I. Semen parameters and peripheral plasma androgen concentration. Journal of the South African Veterinary Association 60:28-31. Available at https://europepmc.org/article/med/2724283 (accessed April 13, 2023).

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology 57:149-179. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X01006641 (accessed March 13, 2023).

Vidal AH, Batista AM, da Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV, Guerra MMP. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. Small

Ruminant Research 109:47-51. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448812003422 (accessed March 14, 2023).

Villaquiran M, Gipson T, Merkel RC, Goetsch A, Sahlu T. 2007. Body Condition Scores in Goats. Goat Field Day 22nd:125-131. Langston University.

Vozaf J, Makarevich AV, Balazi A, Vasicek J, Svoradova A, Olexikova L, Chrenek P. 2021. Cryopreservation of ram semen: Manual versus programmable freezing and different lengths of equilibration. Animal Science Journal 92. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/asj.13670 (accessed April 3, 2023).

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. 2011. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. Amino Acids 40:1271-1296. Available at http://link.springer.com/10.1007/s00726-011-0877-3 (accessed April 18, 2023).

Widiyono I, . S, Putro PP, Astuti P. 2017. Effects of Nutritional Status on Semen Characteristics of Kacang Goats. Pakistan Journal of Nutrition 16:678-683. Available at https://www.scialert.net/abstract/?doi=pjn.2017.678.683 (accessed March 30, 2023).

Yeagle PL. 1985. Cholesterol and the cell membrane. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes 822:267-287. Available at https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304415785900115 (accessed April 11, 2023).

Zedek V, Kudlíková I, Kosová M, Holubec V, Mátlová V, Komínek P, Papoušková L, Novotný D, Janovská D. 2017. Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství: strategický a programový dokument na období 2018-2022. Ministerstvo zemědělství, Praha.

Zhang W, Min L, Li Y, Lang Y, Hoque SAM, Adetunji AO, Zhu Z. 2022. Beneficial Effect of Proline Supplementation on Goat Spermatozoa Quality during Cryopreservation. Animals 12:2626. Available at https://www.mdpi.com/2076-2615/12/19/2626 (accessed April 18, 2023).

Zubair M, Ahmad M, Jamil H. 2015. Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test. Andrologia 47:744-750. Available at https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.12335 (accessed March 13, 2023).

Zubair M, Lodi LA, Ahmad E, Muhammad G. 2013. Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of semen of bull. Journal of Entomology and Zoology Studies 1:124-128. Available at https://www.entomoljournal.com (accessed April 13, 2023).

6 Seznam použitých zkratek a symbolů

ČR – Česká republika
BCS – skóre tělesné kondice
HOST – test hypoosmotického otoku
ROS – reaktivní formy kyslíku
CASA – počítačem asistovaná analýza spermií
DNA – deoxyribonukleová kyselina
FAO – organizace pro výživu a zemědělství