

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz

Bakalářská práce

Autor práce: Romana Pešková

Obor studia: Chovatelství

Vedoucí práce: Ing. Martin Ptáček, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Podpis autorky _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martinovi Ptáčkovi, Ph.D. za pomoc při vedení mé bakalářské práce a také za trpělivost a obětavost. Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za velkou podporu a motivaci během studia.

Současný stav umělé inseminace v chovu ovcí a koz

Souhrn

Cílem této bakalářské práce je poskytnout soupis aktuálních poznatků zaměřených na problematiku umělé inseminace v chovech ovcí a koz. Umělá inseminace je jedna z nejdůležitějších a nejstarších biotechnologických metod používaná u hospodářských zvířat a v současné době okrajově i u exotických zvířat. Úspěšnost umělé inseminace však ovlivňuje mnoho faktorů jak vnitřních, tak vnějších. Řadíme mezi ně plemeno, pohlavní sezónnost, kondici, věk, frekvenci odběrů, způsob vyvolání a synchronizace říje, dobu inseminace a samotné její provedení. Hlavními a zároveň limitujícími faktory jsou především oplozovací schopnost spermií beranů a kozlů po kryokonzervaci a vysoké náklady na laparoskopickou inseminaci. Stavba pohlavního aparátu u ovcí a koz představuje složitou překážku pro rozmražené semeno i inseminační pipetu. Proto se metoda samotné inseminace odvíjí od způsobu a doby skladování inseminační dávky. Pro dosažení přijatelných výsledků zabřezávání je laparoskopická inseminace mraženým spermatem nejlepším řešením. Lze tak dosáhnout 40–80% úspěšnosti. Její nevýhodou jsou však vysoké náklady a potřeba veterinárního lékaře kvůli celkové anestezii.

Umělá inseminace je velkým přínosem. Přesto je ale její použití v praxi relativně omezeno. Snahy nalézt řešení, jež by vedla ke zjednodušení, a tak i rozšíření umělé inseminace za organizačně i ekonomicky výhodných podmínek, jsou předmětem výzkumů. Ty se soustředí zejména na způsoby, jak poskytnout vyšší ochranu spermiím během kryokonzervace, na zlepšení hodnocení spermií pomocí automatizovaných přístrojů, optimalizaci synchronizace říje hormonálními i nehormonálními metodami, i metody inseminace samotné.

Klíčová slova: laparoskopická inseminace, hodnocení semene, inseminační dávka

Current knowledge about sheep and goat artificial insemination

Summary

The aim of this thesis is a review of present knowledge related to artificial insemination in sheep and goats. Artificial insemination is one of the most important and oldest biotechnological methods used in livestock and currently marginally in exotic animals. However, the success of artificial insemination is influenced by many factors, internal and external. These include the breed, sexual seasonality, condition, age, frequency of semen collection, method of induction and synchronization of oestrus, time of insemination and its implementation. The main and limiting factors are, above all, the fertilizing ability of the sperm of rams and goats after cryopreservation and high costs of laparoscopic insemination. The construction of the genital tract of sheep and goats causes a difficult obstacle to overcome for thawed sperm and insemination pipette. Therefore, the method of insemination itself depends on the method and time of storage of the insemination dose. Laparoscopic insemination with frozen semen is the best solution to achieve acceptable conception results. It is thus possible to achieve 40–80 % pregnancy. However, its disadvantages are the high costs and the need for a veterinarian because of the general anesthesia.

Artificial insemination is a great benefit. Nevertheless, its use in practice is relatively limited. Efforts to find solutions that would lead to simplification and thus the expansion of artificial insemination under organizationally and economically advantageous conditions are the subject of research. These focus mainly on ways to provide greater protection to sperm during cryopreservation, to improve sperm evaluation using automated devices, optimization of oestrus synchronization by hormonal and non-hormonal methods, as well as insemination methods themselves.

Keywords: laparoscopic insemination, evaluation semen, insemination dose

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Historie a význam umělé inseminace v chovu ovcí a koz	10
3.2 Biologické předpoklady reprodukce	11
3.2.1 Ovice a kozy	11
3.2.2 Berani a kozlí.....	11
3.3 Samčí ejakulát, jeho odběr, kvalita a konzervace	12
3.3.1 Metody odběru	12
3.3.2 Metody hodnocení	13
3.3.2.1 Makroskopické hodnocení spermatu.....	13
3.3.2.2 Mikroskopické hodnocení spermatu.....	14
3.3.2.3 Fluorescenční mikroskopie.....	17
3.3.2.4 Průtoková cytometrie.....	18
3.3.2.5 CASA (počítačová analýza spermatu).....	19
3.3.2.6 HOS (hypo-osmotický swelling test).....	20
3.3.2.7 ROS (Reaktivní formy kyslíku).....	21
3.3.2.8 TUNEL	21
3.3.3 Ředění.....	21
3.3.3.1 Kryoprotektory	23
3.3.4 Konzervace.....	24
3.3.4.1 Čerstvé semeno	24
3.3.4.2 Chlazení	24
3.3.4.3 Dlouhodobá konzervace.....	25
3.3.5 Rozmrazování.....	26
3.3.5.1 Kvalita ejakulátu po kryokonzervaci a rozmrazení.....	26
3.4 Kontrola reprodukčního cyklu a synchronizace říje	27
3.4.1 Beraní efekt.....	27
3.4.2 Hormonální synchronizace říje	27
3.4.2.1 Progesteron a syntetické gestageny	27
3.4.2.2 Prostaglandiny.....	28

3.5	Metody inseminace	28
3.5.1	Intravaginální (vnitrovaginální).....	28
3.5.2	Intracervikální (vnitrokrčková).....	29
3.5.3	Intrauterinní (vnitroděložní) laparoskopická	29
3.5.4	Intrauterinní transcervikální	30
3.6	Faktory ovlivňující umělou inseminaci	31
3.6.1	Anatomie samičího pohlavního ústrojí.....	31
3.6.2	Frekvence odběrů	31
3.6.3	Kondice a výživa	31
3.6.4	Věk	32
3.6.5	Roční období a teplota.....	33
4	Závěr	35
5	Literatura	36
6	Seznam použitých zkratk a symbolů	43

1 Úvod

Inseminace je jedna z nejdůležitějších biotechnologických metod používaná u všech hospodářských zvířat. Běžně se uplatňuje v chovatelské praxi pro zefektivnění reprodukce, ale i pro zachování genových rezerv.

Ovce a kozy patří k nejstarším druhům zvířat chovaných ve světě. Lze je chovat téměř ve všech klimatických a výrobních podmínkách. V současné době spočívá význam chovu ovcí v jejich mnohostranné užitkovosti. Umělá inseminace se u nich však používá poměrně málo v porovnání s chovy prasat a skotu. Hlavním důvodem malého využití umělé inseminace v jejich chovu je nízká úspěšnost zabřeznutí, která je spojena se zvláštnostmi jejich reprodukce.

Především nízká úspěšnost kryokonzervace beraního a kozlího ejakulátu je hlavním problémem v umělé inseminaci ovcí a koz. Dalším problémem je stavba reprodukčního traktu samic či sezónní pohlavní aktivita a nevýrazné projevy říje.

Právě pro své výhody je však použití umělé inseminace žádoucí. Zefektivnění a optimalizace nejen metod kryokonzervace semene, synchronizace říje, inseminace samotné, ale i zootecnických opatření a organizace, jsou předmětem výzkumů a snah rozšířit využití umělé inseminace v praxi.

2 Cíl práce

Inseminace u malých přežvýkavců se využívá jen velmi omezeně. Proto všechny informace, které povedou k charakteristice současného stavu a aktuálním trendům, mohou přispět k potenciálnímu rozvoji tohoto odvětví. Cílem je soupis aktuálních poznatků tématicky zaměřených na současný stav inseminace v chovu malých přežvýkavců.

3 Literární rešerše

3.1 Historie a význam umělé inseminace v chovu ovcí a koz

Umělá inseminace (AI) je první velká biotechnologická metoda používáná ke zlepšení reprodukce a genetiky hospodářských zvířat. Má světový význam u mnoha druhů, zejména u mléčného skotu. Využití AI na celém světě poskytlo podnět k vývoji dalších technologií, jako je kryokonzervace, sexování spermatu, regulace estrálního cyklu, odběr embryí, jejich zmrazování, kultivace, přenos a klonování (Foote 2002). Právě AI a přenos embryí hrají důležitou roli ve zlepšení genetického založení ovčích stád (Candappa & Bartlewski 2011). Podle Vaňka (2002) lze semenem jednoho berana inseminovat velký počet ovcí – 16 až 18 tisíc, a tudíž je velmi účinným prostředkem k rychlému využití jejich vynikajících užitkových vlastností. Z pohledu veterinárně-hygienického je vhodná hlavně kvůli snížení přenosu nemocí. Také snižuje riziko stresu, které by vzniklo při přesunu do nového prostředí. Zároveň se v inseminaci používají jen prověřené dávky, které musí být kompletně zhodnoceny.

I když se AI začala postupně rozšiřovat začátkem minulého století, největší rozvoj nastal po druhé světové válce, kdy se začaly intenzivně studovat otázky dlouhodobé konzervace spermií. Využití glycerinu v kryokonzervaci a zavedení biologických kontejnerů pro uchování inseminačních dávek v tekutém dusíku významně ovlivnilo šlechtitelský pokrok, zvláště v chovu skotu (Kulovaná 2002).

První inseminace u ovcí byly provedeny v Rusku. V Evropě byla inseminace využívána u ovcí převážně ve Francii. Ačkoliv zavedení laparoskopie pro nitroděložní inseminaci ovcí na počátku 80. let mělo za následek stálé zvyšování počtu bahnic, jejich počet dle Gordona (2017) i přes to, zůstává stále malý.

V současnosti jsou v chovu ovcí biotechnologie využívány okrajově. Za hlavní důvod lze považovat snížení stavů chovaných zvířat. V České republice (ČR) není realizační tým, který by mohl požadavky chovatelů ovcí a koz v provozních podmínkách uspokojivě zvládnout oproti vyspělým chovatelským zemím, kde je problematika reprodukce se zaměřením na šlechtění intenzivně řešena (Čunát 2013). Právě proto se nedávný vývoj umělé inseminace zaměřil na zachování vitality čerstvých a zmrazených spermií, zlepšením složení ředidel a změnou protokolů chlazení/zmrazování. Druhým hlavním problémem je vývoj minimálně invazivní techniky pro správné ukládání čerstvého nebo zmrazeného spermatu (Cseh et al. 2012).

Ve většině zemí se nevyužívá inseminace v chovu dojených ovcí. Jsou však výjimky, kde existují propracované šlechtitelské programy s využitím inseminace v těchto chovech. Používá se čerstvé semeno. Zmrazené semeno není využíváno. Francie uvádí, že má zavedené genomické plemenné hodnoty u dojených plemen ovcí využívané pro rutinní šlechtitelskou praxi. Nejrozsáhlejší šlechtitelský program s využitím inseminace a testace je právě ve Francii (Bucek et al. 2020).

Jak je popsáno v jedné francouzské zprávě, umělá inseminace u koz se ve značné míře provádí od poloviny 80. let (Gordon 2017) a dle Loudy et al. (2001) je právě inseminace koz v současné době dosti rozšířená, protože ubývá chovatelů, kteří jsou ochotni chovat kozla. Soustředěním kozlů do inseminačních stanic se také vylučuje neplodnost, která je v přirozené plemenitbě značně vysoká a přesahuje až 30 %.

Momentálně je přirozená plemenitba v ČR nejrozšířenějším způsobem zapouštění bahnic a koz, využívaná především v méně početných chovech. Důvodem je jednoduchost, nenáročnost, nízká pořizovací cena plemenného berana a vysoká úspěšnost zabřezávání. Podle Bucka et al. (2014) bylo zařazeno do plemenitby nejvíce beranů s masnou užitkovostí

v roce 2013. Zároveň publikují údaje o zvyšujícím se počtu oplodnění u koz v roce 2013 oproti roku 2012. V roce 2015 pokračoval celkový nárůst početních stavů ovcí a podle Českého statistického ústavu (ČSÚ) se v České republice chovalo 232 tisíc ovcí. Se zvyšujícími se stavy ovcí dochází k nárůstu počtu plemenných beranů k plemenitbě z 898 v roce 2003 na 1 413 v roce 2014.

Podle Filipčnicka & Pešana (2020) se při umělé inseminaci dosahuje v průměru podstatně nižší hodnoty zabřezávání, oproti přirozené plemenitbě, ale díky inseminaci dokážeme urychlit genetický zisk, zlepšit evidenci a kontrolu zdraví zvířat, chovat menší množství samčích jedinců a po synchronizaci říje také situovat porody do žádoucího období. Čunát et al. (2013) uvádějí, že zabřezávání po inseminaci čerstvým nebo zmrazeným spermatem po synchronizované a stimulované říji je řádově o 30–40 % nižší než ve spontánní říji a přirozené plemenitbě.

3.2 Biologické předpoklady reprodukce

3.2.1 Ovce a kozy

U ovcí je plodnost vyjádřena počtem ovulovaných vajíček, počtem narozených jehňat, mateřskými schopnostmi a počtem odchovaných jehňat za časovou jednotku (Vaněk 2002). Toto je ovlivněno různými faktory, jako je prostředí, věk, plemeno, délka denního světla, relativní vlhkost vzduchu a teplota (Mert et al. 2009). Dobson et al. (2012) také uvádějí, že pro účinnou reprodukci by folikuly měly ve vaječnicích růst přiměřenou rychlostí, musí nastat ovulace a je třeba produkovat hormony.

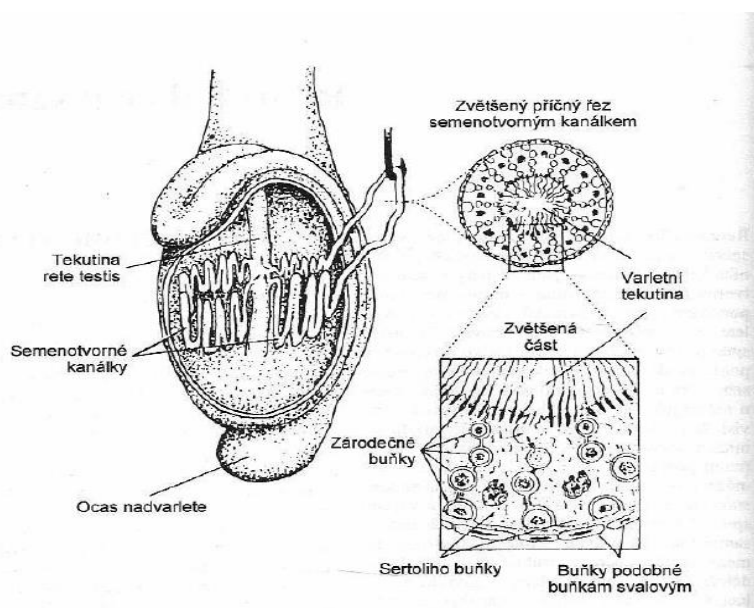
Ovce dosahují puberty ve věku okolo sedmi měsíců, samotný říjový cyklus trvá 16-17 dní a ovulace nastává asi za den a půl po začátku říje. Začátek říjového období je ovlivněn délkou světelného dne a dostavuje se ke konci léta a na podzim (Cibulka et al. 2004), což ve své práci dokládají i Amiridis & Cseh (2012), kteří uvádějí, že ovce jsou sezónní zvířata a tato jejich přirozená vlastnost brání jejich celoroční reprodukci. Délka březosti se pohybuje v rozmezí 143 až 157 dní.

Kozy mají stejně jako ovce sezónní pohlavní aktivitu. Říje se dostavuje v období srpen (září) až prosinec. Délka říjového cyklu je průměrně 21 dní (18–24 dní) (Kulovaná 2002) a je velmi variabilní. Samotná říje trvá 24 až 48 hodin v závislosti na věku, plemeni, ročním období a přítomnosti kozla (Fatet et al. 2011). Dávila et al. (2018) ve svém článku publikují, že pokud jsou kozy chovány v zeměpisných šířkách vzdálenějších od rovníku, je jejich rozmnožovací období kratší.

3.2.2 Berani a kozli

U beranů a kozlů je plodnost vyjádřena pohlavní aktivitou, kvalitativními a kvantitativními ukazateli semene (Vaněk 2002).

Samčí reprodukční systém u malých přežvýkavců zahrnuje dvojici extraabdominálních varlat zavěšených v šourku, který je pokryt jemným ochlupením, dále souběžným trubicovitým systémem, fibroelastickým penisem a doplňkovými pohlavními žlázami (Sathe & Shipley 2014). U beranů varlata dosahují délky 10 cm a hmotnosti 400-600 g. Na ně navazují nadvarlata, ve kterých se spermie shromažďují a funkčně dozrávají. Jejich stavbu můžeme vidět na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1 Schéma varlete a nadvarlete

Zdroj: Reece 1998

Součástí stěny semenotvorných kanálků varlete jsou i Sertoliho buňky. Tyto buňky mají mechanicky podpůrnou funkci pro vyvíjející se spermie a vylučují do středu kanálku sekret, jehož složení podporuje vývoj spermií (Cibulka et al. 2004). Ve vymezeném vazivu se nacházejí buňky – Leydigovy, které syntetizují testosteron. Na tvorbě semene se kromě vlastních spermií podílejí ještě přídavné pohlavní žlázy. Jejich sekrety tvoří přirozené ředidlo spermií, výživu a upravují prostředí během jejich průchodu močovou trubicí a pohlavním ústrojím samice. Patří sem měchýřkovitá žláza, předstojná žláza a bulbouretrální žláza (Marvan 1992).

3.3 Samčí ejakulát, jeho odběr, kvalita a konzervace

Semeno, materiál, který je emitován z penisu při ejakulaci, zahrnuje buněčnou složku, tedy spermie a kapalnou fázi-semennou plazmu (Setchell 2014).

Hodnocení a zpracování odebraného ejakulátu provádí laborant specialista ve specializované laboratoři, která musí být vybavena proti pronikání přímého slunečního světla. Základní vyšetření ejakulátu musí být zahájeno do 10 minut po odběru (Louda et al. 2001).

3.3.1 Metody odběru

Odběr spermatu pro kryokonzervaci je klíčovým krokem pro program ochrany malých přežvýkavců (Jiménez-Rabadán et al. 2016). Provádí se na připouštědla různé konstrukce a jako objekty se používají starší ovce, které nemusí být v říji nebo berani, popřípadě různé fantomy. Samotné sperma se odebírá do umělé pochvy o délce 20 cm, průměr pět centimetrů (Vaněk 2002). Umělá pochva se opatří sběračem a savým papírem (k zachycení povrchových nečistot) a umístí se do termostatu. Před použitím se umělá vagina vymaže vazelinou a dofoukne se mezi stěny vzduch.

Odběr se může provádět i elektroejakulací (EE). První přístroj pro odběr pomocí EE byl sestaven Gunnem (1936) a od té doby byl značně zdokonalen. Základ tvoří bipolární elektroda, která se zavádí do rekta do hloubky asi 150–200 mm a fixuje se nad semennými vāčky. Má tvar duté trubice z izolačního materiálu délky asi 400 mm a na konci vycházejí elektrody v délce 100 mm (Louda a kol. 2001).

Jiménez-Rabadán et al. (2016) ve své studii odebrali vzorky spermatu pomocí umělé pochvy a elektroejakulací. Dále sperma kryokonzervovali podle standardního protokolu, rozmrazili a hodnotili pohyblivost pomocí CASA. Stabilitu membrány, životaschopnost a mitochondriální aktivitu hodnotili průtokovou cytometrií. Výsledkem byl důkaz, že metody odběru ovlivňují negativně kvalitu spermatu po rozmrazení u kozlů, nikoliv však u beranů. Tím pádem byla u kozlů pohyblivost spermií odebraných pomocí umělé vagíny po rozmrazení vyšší ve srovnání se vzorky odebrané elektroejakulací. Tyto výsledky naznačují, že beraní a kozlí spermie jinak reagují na proces kryokonzervace v závislosti na použité metodě odběru. To může být způsobeno rozdílným složením ejakulátu berana a kozla, kdy u berana je vyšší množství proteinů ve spermatu spojeno s imunitními ochrannými a kapacitními aktivitami, zatímco u kozla je větší množství proteinů spojeno s inhibicí kapacitace spermií (Zhu et al. 2020). Podle Leboeuf et al. (2003) je sperma u kozlů odebíráno převážně pomocí umělé pochvy, jelikož odběr pomocí elektroejakulace poskytuje sice větší objem ejakulátu, ale zároveň nižší koncentraci spermií a neovlivňuje pohyblivost. Podle Sathe & Shipley (2014) je v ejakulátu odebraném pomocí elektroejakulace vyšší koncentrace sodíku a draslíku. Lukusa & Kabuba (2020) také zkoumali vliv odběru na kvalitu rozmrazeného ejakulátu u koz plemene Saneen a zjistili, že průměrné hodnoty objemu ejakulátu, pH, koncentrace a životaschopnost spermií byly významně vyšší u vzorku odebraného pomocí umělé vagíny než u EE. I celková pohyblivost byla vyšší u spermatu odebraného pomocí umělé vagíny. Na druhé straně byly průměrné hodnoty rychlosti a neprogresivní motility vyšší u vzorků odebrané pomocí elektroejakulace. Také zmiňují, že sperma vykazovalo lepší hodnoty, když bylo získáno umělou pochvou a následně pomalu zchlazeno a poté kryokonzervováno. Sperma s vyšší hodnotou křivočaré pohyblivosti a lineární rychlosti získané odběrem do umělé vagíny je odolnější vůči kryo-poraněním než spermie získané elektroejakulací.

3.3.2 Metody hodnocení

3.3.2.1 Makroskopické hodnocení spermatu

Hodnocení by mělo být provedené okamžitě po odběru. Barva semene, zápach a vzhled by neměl být ignorován, jelikož mohou poskytnout cenné informace (Sathe & Shipley 2014).

3.3.2.1.1 Barva

Sperma je obvykle krémovější. Zředěné vzorky s nízkou koncentrací mohou vypadat vodnatě a šedě. Občas může být vzorek kontaminován močí, která mu dá charakteristický zápach. Hemospermie může způsobit, že se sperma bude zdát růžové nebo červené, zatímco semenná vaskulitida může vést k vločkovitým shlukům hnisavého materiálu (Sathe & Shipley 2014). Barva se může měnit v závislosti na změně ročního období. Podle Farooq T Juma (2009), který dělal výzkum vlivu sezónních výkyvů na fyzikální a biochemické vlastnosti spermatu od plemene ovcí Hamdni v Erbilské oblasti, je barva v létě a na jaře lepší, zatímco na podzim a v zimě je řidká. Posuzuje se na okraji sběrače v dopadajícím světle nebo ve zkumavce (Gamčík & Kozumplík 1992).

3.3.2.1.2 Objem

Setchell & Brian (2014) uvádějí, že ejakulát berana má objem od 0,5 do 2 ml. Hustota je podstatně vyšší než u býka a pohybuje se od dvou do pěti miliard spermií v jednom mililitru. Objem ejakulátu se významně liší mezi druhy (Lorton 2014). Určuje se v kalibrační nádobce, ale vhodnější je vážení přímo v plastovém sběrači (Gamčík & Kozumplík 1992).

3.3.2.1.3 Pach

Pach je málo výrazný a připomíná pach vlny (Louda et al. 2001). Změna pachu upozorňuje na změnu kvality ejakulátu, což souvisí nejčastěji s větším množstvím cizích příměsí, konkrétně moč, hnis či krev. Hnilobný zápach poukazuje na chronické záněty varlat nebo přídatných pohlavních žláz. Pach ejakulátu může ovlivňovat i krmivo (Gamčík & Kozumplík 1992).

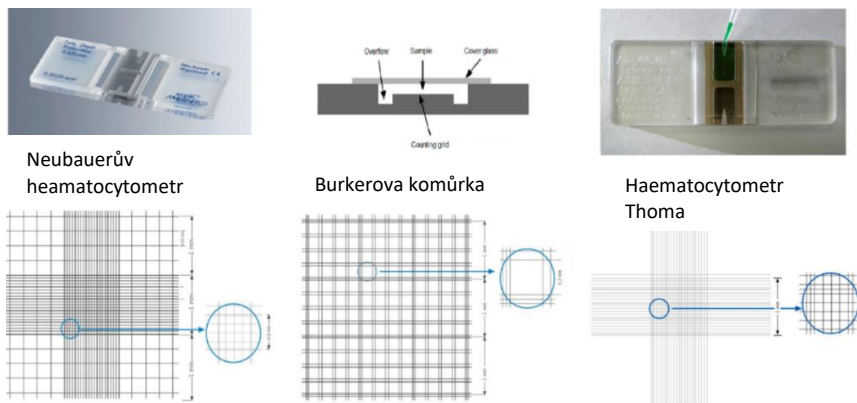
3.3.2.2 Mikroskopické hodnocení spermatu

Mikroskopické hodnocení by mělo být provedeno k posouzení motility spermií, morfologie a ke zjištění přítomnosti bílých krvinek. Bílé krvinky indikují infekci často *Brucella ovis*, která způsobuje epididymitidu u starších beranů. U mladých beranů přítomnost bílých krvinek naznačuje infekci *Actinobacillus* spp. nebo *Histophilus* spp. (Sathe & Shipley 2014). Dále můžeme mikroskopicky hodnotit koncentraci či pH ejakulátu.

3.3.2.2.1 Koncentrace

Koncentrace spermií se může určit odhadem, kdy se na sklíčko kápne kapka spermatu a následně podle prostorového uspořádání spermií a jejich vzájemné vzdálenosti se provede subjektivní hodnocení (Louda et al. 2001). Postup je takový: 0,01 ml neředěného ejakulátu se nanese na podložní sklíčko a přikryje sklíčkem krycím. Semeno se vyšetřuje při 300 až 500násobném zvětšení. Uprostřed jamky hodnotíme tmavost vln a na okraji pozorujeme hustotu uložení jednotlivých spermií (Gamčík & Kozumplík 1992).

Dále se koncentrace spermií určuje haemocytometry. Haemocytometr byl klasický „zlatým standardem“ pro hodnocení koncentrace spermií. Ačkoliv existují variace v závislosti na výrobcí, tato komora se obvykle skládá ze sklíčka se dvěma mřížkami přesných rozměrů. Na podpěru kolejnic se položí krycí sklíčko, čímž se v každé mřížce vytvoří komora konkrétního objemu. Po naplnění každé komory zředěným nebo čistým vzorkem spermatu se pozoruje komora pomocí standardního mikroskopu a ručně se počítají spermie v mřížkách (Lorton 2014). Jha et al. (2018) ve své studii vypočítali koncentraci spermií pomocí haemocytometru (Neubauerova počítací komora), přičemž vzorek naředili pufovaným solným roztokem formolu v poměru 1:200 a sledovali pod mikroskopem (400x). Příklady různých druhů haemocytometrů můžeme vidět na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2 Neubauerův haematocytometr, Burkerova počítací komůrka a haematocytometr Thoma

Zdroj: Brito et al. 2016

Koncentrace spermií se dá stanovit i fotometricky. Ejakulát vytváří v izotonickém roztoku (fyziologický roztok nebo citrát sodný) zákal, kterého stupeň odpovídá hustotě spermií (Gamčík & Kozumplík 1992). Analýza pomocí spektrofotometrů je rychlá a vyžaduje malé množství vzorku. Vybavení a spotřební materiál jsou relativně levné. Z těchto důvodů je spektrofotometrie nejběžnější metodou hodnocení koncentrace ejakulátu (Brito et al. 2016). Obrázek č. 3 nám ukazuje příklad spektrofotometru.



Obrázek č. 3 Spektrofotometr APD UV-Vis SpectBT

Zdroj: Poh et al. 2021

Minimální koncentrace v čerstvém beranním ejakulátu musí být 2 miliardy v 1 ml a čerstvý kozlí ejakulát má mít koncentraci 0,7-5 miliard v 1 ml. Pro inseminaci musí mít však kozlí ejakulát nejméně 0,7 miliard v 1 ml (Louda et al. 2001).

3.3.2.2.2 Motilita

Pohyblivost spermií je ovlivněna mnoha aspekty, například ředidlem, vybavením, prostatickou tekutinou, pH, ionty. Nejdůležitější je však teplota. Nejvhodnější k posouzení pohyblivosti je použití mikroskopie s fázovým kontrastem. Malá kapka čerstvého, neředěného spermatu se umístí na předehřáté sklíčko (37 °C) bez krycího sklíčka a vlnový pohyb je pozorován pomocí objektivu s 10x fázovým kontrastem (zvětšení 10x100) (Sathe et al. 2014), tento postup použil ve své práci i Rodriguez-Martinez (2014). Jha et al. (2018) pozorovali pohyblivost spermií umístěním kapky (5 μ l) čerstvého spermatu na podložní sklíčko a s použitím krycího sklíčka pod mikroskopem (100x).

Progresivní pohyb jednotlivých spermií lze vyhodnotit zředěním čerstvé kapky semene kapkou předehřátého fosfátu pufovaného fyziologickým roztokem. Spermie vystavené chladovému nebo chemickému šoku mohou často vykazovat kruhový nebo zpětný pohyb (Sathe & Shipley 2014). Mezi nefyziologické druhy pohybu patří: nepohyblivost, pohyb okolo hlavičky, zpětný pohyb, trhavý pohyb, kolísavý pohyb (Gamčík & Kozumplík 1992).

3.3.2.2.3 Morfologie

Cílem hodnocení morfologie spermatu není jen identifikovat normální nebo abnormální spermie, ale také zařadit tyto abnormality do různých kategorií. Dříve byly morfologické abnormality klasifikovány do tří skupin podle původu vzniku. Ty můžeme dělit na „primární“ (vznikají při spermatogenezi), sem patří například změny tvaru hlavičky (hruškovitá, vejcovitá, citronovitá), změny v nukleoplazmě, změny na akrozomu, tvarové změny na mitochondriálním oddílu bičíku a vývojové anomálie. „Sekundární“ abnormality (vznikající při delším pobytu v samčím reprodukčním traktu), jsou změny hlavičky, uvolnění či roztrhání akrozomu, dvojité formy spermií, roztrhaný bičík a nezralé formy (Gamčík & Kozumplík 1992). A nakonec „terciální“ abnormality (vyskytující se po ejakulaci). Dnes, podle Kaya et al. (2014) se abnormality klasifikují podle míry dopadu na mužskou plodnost tj. „hlavní vady“, které mají velký nepříznivý vliv nebo „malé vady“, které mají menší účinek na mužskou plodnost. Lorton (2014) ale uvádí, že je často nemožné zařadit konkrétní vadu. Obvykle není znám ani původ vady, jeho význam je nejasný, anebo spermie vykazují více než jednu vadu. Pak může být jednodušší klasifikace tato: abnormální hlava, abnormální akrozom, abnormální ocas, proximální cytoplazmatické kapky, distální cytoplazmatické kapky a samozřejmě „normální“. Bez ohledu na použití klasifikačního systému jsou tolerovány celkové morfologické abnormality v ejakulátu do 15-20 %.

Morfologii můžeme hodnotit fázovým mikroskopem. Optika fázového mikroskopu upravuje světelné vlny dopadající a obklopující sledované objekty, aby se vytvořil další kontrast vzorku bez použití biologických skrvn. Výsledkem je zvýšená schopnost uživatele vidět objekty a rozlišovat detaily. Mikroskopie s různým interferenčním kontrastem (DIC) je další technikou používanou ke zvýšení kontrastu objektů pomocí světelného mikroskopu. DIC poskytuje vzhled 3D struktury prohlížených objektů (Lorton 2014). Novější metodou hodnocení morfologie a morfometrie spermií je pomocí SCA[®] analyzátoru, který umožňuje automatickou analýzu vzorků. Tento analyzátor současně vyhodnocuje rozměry akrozomu, hlavy, střední části, ocasu a přítomnost vakuol. Spermie zaznamenává jako normální či abnormální podle stanovených kritérií. Zároveň je kompatibilní s některými barvením jako je například Diff-Quik, SpermBlue. SCA[®] je efektivní a uživatelský přívětivý nástroj pro výzkum, který umožňuje implementaci nové terminologie a odhadů v morfologii spermií (Microptic S.L. 2021).

Při morfologickém hodnocení se používají mikroskopy se zvětšením 1000-1500x (Gamčík & Kozumplík 1992).

3.3.2.2.4 PH ejakulátu

Koncentrace vodíkových iontů-pH se nejčastěji určuje indikátorovým papírkem s potřebným barevným rozpětím, anebo pH metrem s mikroelektrodami (Gamčík & Kozumplík 1992). PH ejakulátu berana se pohybuje v rozpětí 6,4–7,2, u kozla 6,2–7,5 (Louda et al. 2001) a přímo závisí na hustotě semene.

3.3.2.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie se používá při morfologickém vyšetřování, diferenciálním barvení živých a mrtvých spermií, cytologickém vyšetření a při studiu pohybové aktivity spermií v samičích pohlavních ústrojích (Gamčík & Kozumplík 1992).

Využívá toho, že buňky, které jsou předmětem zájmu, fluoreskují, tj. musí být schopné absorbovat energetické kvantum fotonů a uvolňovat energii emisí světla, respektive fluorescence. Fluorescence je emise světla, ke které dochází v nanosekundách. Dochází k filtraci světla s krátkou vlnovou délkou za účelem vizualizace světla s dlouhou vlnovou délkou. Důležitý faktor ovlivňující funkčnost fluorescenční mikroskopie je tzv. Stokesův posun, což je rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima. Stokesův posun určuje sílu fluorescence pro tzv. fluorofory, dobu fluorescence a intenzitu fluorescenčního signálu, který lze z fluoroforu získat. Na základě této skutečnosti volíme vhodná fluorescenční barviva (Sanderson et al. 2014). Základní fluorescenční mikroskop je běžným nástrojem moderních buněčných biologů. V tomto přístroji rovnoběžný paprsek světla současně osvětluje celý vzorek (nebo široké zorné pole). Tradičně je excitační světlo zajištěno vysokotlakým žářem rtuti nebo xenonu a požadované vlnové délky jsou vybírány pomocí vlastních optických filtrů. Naproti tomu laserové skenovací mikroskopy osvětlují v každém okamžiku pouze malý bod vzorku a laserový paprsek proto musí skenovat přes vzorek, aby vytvořil obraz. Novým přístupem k excitačnímu světlu, který je rychle přijat, je použití jasných jednovlnných diod vyzařujících světlo (LED). LED diody mají výhody dlouhé životnosti, rychlého spínání a přesného ovládání vlnové délky. Pro různé indikátory může být vyžadováno více LED diod. Rtuťové/xenonové žárovky mohou být také nahrazeny dlouhodobějšími systémy halogenidových lamp s vlákny (Sanderson et al. 2014).

Fluorescenční metoda umožňuje dobře rozlišit spermie s morfologickými malformacemi. Znázorňuje i velmi jemné zřasení nebo napučení cytoplazmatických membrán a citlivě diferencuje změny na mitochondriálním oddílu. Nátěr se obarví v roztoku fluorochrómu po dobu 5 minut, opláchne destilovanou vodou a osuší. Nejkontrastnější je fluorescence s promulínem, kdy spermie fluoreskuje bíle na černém pozadí. V preparátu se posuzuje alespoň 100 spermií fluorescenčním mikroskopem s použitím imerzního eleje při zvětšení nejméně 1000x (Gamčík & Kozumplík 1992). Výsledná fluorescence ve vzorku je pozorována okem nebo zachycena elektronicky. Jednoduchost širokoúhlé mikroskopie spočívá v tom, že všechny části vzorku jsou zobrazeny současně a obraz lze snadno zachytit kamerou. Tato jednoduchost ve spojení s omezenou optikou a nevyhnutelnou projekcí zaostřitelného světla na rovinu jediného obrazu kamery, však může mít za následek obrazy s nízkým kontrastem a prostorovým rozlišením. Nicméně, širokoúhlý fluorescenční mikroskop se běžně používá. Klíč k jeho úspěšnému použití spočívá ve výběru vzorku (Sanderson et al. 2014).

3.3.2.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní metoda analýzy různých typů buněk, včetně spermií. Jedná se o metodu založenou na měření kvalitativních vlastností (Korkmaz 2020). Jejím principem je hodnocení spermatu pomocí rozptylu světla a fluorescence a následné hodnocení výsledků v analytickém softwaru, která dělá objektivní posouzení. Při hodnocení kvality ejakulátu se hodnotí pouze jeden nebo dva ukazatele a nelze objektivně určit, zda jsou spermie schopné oplodnit vajíčko, jelikož poškození může být v jiné části spermií. Z tohoto důvodu multiparametrická analýza hraje velmi důležitou roli (Dolník et al. 2019). Hlavní výhodou odhalení fluorescence pomocí průtokové cytometrie spočívá v možnosti provést velké množství měření v testovaném vzorku objektivním, rychlým a reprodukovatelným způsobem. Současný názor je také ten, že průtoková cytometrie je citlivější než fluorescenční mikroskopie, přinejmenším když se při detekci fluorescence spoléhá na lidské oko. Kromě toho je doba pozorování při fluorescenční mikroskopii nutně delší než při průtokové cytometrii, což může vést k zanedbání části pozitivních buněk. Na druhou stranu velkou nevýhodou průtokové cytometrie je skutečnost, že nemůže přímo rozpoznat emitující struktury fluorescence narozdíl od fluorescenční mikroskopie (Muratori et al. 2008). Rutinní použití průtokové cytometrie je omezeno relativně vysokými náklady na vybavení, potřebou kvalifikovaného pracovníka a složitostí metod, kterými se připravují vzorky a hodnotí data. Dnes je tato metoda používána spíše pro výzkumné účely či ověření správnosti jiných metod. I přes to se použití této metody pro hodnocení spermatu v posledních letech zvýšilo (Brito et al. 2016).

Průtokové cytometry lze obecně kvalifikovat jako analytické, které se používají výhradně pro analýzu buněk nebo jiných částic. Dále potom třídící, které mají navíc na základě výsledku analýzy izolovat sledované buňky nebo částice a potom ostatní s různými funkcemi (Hossain et al. 2011).

3.3.2.4.1 Hodnocení spermií pomocí průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie umožňuje v krátkém čase testovat tisíce spermií. Umožňuje také hodnotit několik indikátorů současně v jedné populaci spermií nebo pro každou spermii zvlášť. Hodnotí například integritu membrány, DNA, mitochondrie, akrozom, oxidační stres, koncentraci spermií, a další. Stala se důležitou metodou hodnocení funkčních a morfologických vlastností spermií a používá se pro výzkum ve veterinární vědě i pro běžné hodnocení kvality spermií (Dolník et al. 2019). V rámci hodnocení koncentrace individuální buňky procházejí proudem kapalné tekutiny skrz laser a jsou elektronicky počítány (Lorton 2014).

3.3.2.4.1.1 Hodnocení životnosti

K posouzení životaschopnosti buněk je k dispozici několik barvení a lze je použít samostatně nebo v kombinaci s jinými barvami pro hodnocení různých funkčních vlastností (Cordelli et al. 2005).

V rámci této analýzy jsou spermie definované jako spermie s nepoškozenou cytoplazmatickou membránou. Lze tedy vzít integritu membrány jako nepřímý indikátor životaschopnosti spermií. Analýzu můžeme provést pomocí fluorescenčních barviv, která barví buď živé nebo mrtvé spermie, nebo kombinaci obou barviv. Nejčastěji používaným barvivem pro barvení mrtvých spermií je propidium jodid, který může procházet poškozenými membránami a zbarvit DNA na červenou. Často se kombinuje s některými důležitými barvami,

jako je diacetát karboxyfluoresceinu (CFDA) nebo SYBR-14 (Dolník et al. 2019). CFDA pronikají pouze do životaschopných, metabolicky aktivních buněk a mohou být štěpeny pomocí enzymů na fluoreskující karboxyfluorescein. Fluorofory se používají k hodnocení integrity membrány již více než dvě desetiletí, přičemž testy se pohybují od použití barviv / sond, které reagují s cytoplazmatickými enzymy, až po ty, které se vážou s DNA (Rodriguez-Martinez 2014).

3.3.2.4.1.2 Hodnocení mitochondriální funkce

Potenciál mitochondriální membrány je dobrým indikátorem pohyblivosti spermií, jak dokazuje rozmanitost průtokové cytometrie (FCM) používající rhodamin 123, nonyldilakridinový pomeranč a JC-1. Funkce spermií byla hodnocena také intracelulárním vychytáváním vápníku pomocí specifického Ca^{2+} barviva (Cordelli et al. 2005). Nejpoužívanější barvivo rhodamin 123, je kationtová sloučenina, která se hromadí v mitochondriích a fluoreskuje zeleně. Intenzita fluorescence závisí na celkovém množství fungujících mitochondrií (Hossain et al. 2011). Hlavní jeho slabinou je to, že má nízkou citlivost.

MitoTracker představují skupinu nedávno vyvinutých barviv, která akumulují a barví aktivní mitochondrie. Výhodou je, že jsou vysoce specifická, dostupná v širokém rozsahu emisní fluorescence a několik z nich je fixovatelných, což umožňuje oddálení analýzy (Martínez-Pastor et al. 2010).

3.3.2.4.1.3 Hodnocení akrozomu spermií

Akrozom je struktura uzavřená v membráně pokrývající přední část jádra spermie. Akrozomální integrita je předpokladem oplodnění. Je vyšetřována in vitro pomocí fázové kontrastní mikroskopie nebo diferenciální mikroskopie s interferenčním kontrastem na nepoškozených nebo obarvených vzorcích pro světelnou mikroskopii. Průtoková cytometrie může být použita místo epifluorescenční mikroskopie (Hossain et al. 2011).

Byly vyvinuty metody FCM pro detekci zlomku spermií schopných podstoupit akrozomovou reakci pomocí různých fluorescenčních lektinů, které se specificky vážou na své receptory nebo použitím specifických fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti CD46 (Cordelli et al. 2005). Akrozomální stav se hodnotí pomocí sond, které rozpoznávají vady uvnitř akrozomu, a proto tyto spermie označují jako poškozené. Lektiny, které se vážou na glukosidní rezidua v různých částech akrozomální membrány, byly použity u široké škály druhů. *Pisum sativum* (hrachový) aglutinin (PSA) a *Arachis hypogaea* (arašídový) aglutinin (PNA) byly k tomu nejžádanějšími lektiny, a to z důvodu jejich specifčnosti. Sperma značené lektinem nebo protilátkami může být fixováno, což v případě potřeby umožňuje pozdější analýzu. Akrozomální sondy jsou obecně konjugovány se zeleným fluorochromovým izothiokyanátem (FITC) a kombinovány s barvivy životaschopnosti. V současné době jsou k dispozici konjugovaná barviva s fluorochromy emitujícími na různých vlnových délkách (Martínez-Pastor et al. 2010).

3.3.2.5 CASA (počítačová analýza spermatu)

Použití počítačové analýzy spermatu má přinést dvě hlavní výhody oproti manuálnímu počítání: vysokou přesnost a kvantitativní data kinetiky spermií. Kromě celkové motility a progresivní motility používají systémy CASA algoritmy pro výpočet koncentrace spermií a různých parametrů rychlosti (Lorton 2014). Mezi parametry rychlosti, které CASA hodnotí patří křivočará rychlost (m/s), která je měřena jako průměrná rychlost hlavy spermií podél její skutečné křivočaré dráhy, přímá rychlost ($\mu\text{m/s}$) měřená jako průměrná rychlost hlavy spermií

podél přímky mezi její první detekovanou pozicí a její poslední pozicí. Průměrná rychlost dráhy ($\mu\text{m/s}$) je měřená jako průměrná rychlost hlavičky spermie podél její průměrné dráhy. Další jsou například amplituda bočního posunutí hlavy (μm), linearita, kolísání, přímota a zkřížená frekvence (Hz) (Microptic S.L. 2021). Při použití správných postupů je možné získávat spolehlivé a opakovatelné výsledky. Výsledky postupů CASA jsou ovlivňovány řadou faktorů: přípravou vzorků, koncentrací spermií a jejich uspořádáním (Kubíček 2010).

Použití CASA umožňuje rychlý, relativně levný a poměrně přesný odhad koncentrace spermií, i když přesnost je zmařena několika technickými problémy a odchylkami. Ačkoli využití této techniky pro hodnocení pohyblivosti spermií získalo obrovskou popularitu ve výzkumných a klinických laboratořích, její použití pro hodnocení koncentrace spermií pro klinické nebo komerční účely v současné době nedoporučuje WHO ani Národní asociace chovatelů zvířat (Brito et al. 2016).

Existuje více než tucet systémů CASA uváděných na trh pro analýzu spermií zvířat, a přestože jsou tyto systémy založeny na podobných principech, existuje několik rozdílů v hardwaru a softwaru mezi nimi. Některé systémy používají „samostatný“ mikroskop. Ruční nebo automatizovaný mechanický stupeň se používá k umístění vzorku na požadovanou souřadnici X/Y a k nastavení zaostření v ose Z. Většina systémů používá širokopásmové osvětlení ve viditelném spektru s 10x nebo 20x negativními (nebo pozitivními) cíli fázového kontrastu v kombinaci s odpovídajícími kondenzátory, zatímco jiné systémy jsou vybaveny jinými typy osvětlení (ultrafialové světlo je častější) a speciálními filtry pro detekci fluorescence. Snímky jsou zachyceny digitálním fotoaparátem, obvykle po dobu 0,5 sekundy pomocí předem stanovené rychlosti pořízení snímku (např. 60 MHz) řízené pomocí kamery nebo pulzního osvětlení (Brito et al. 2016).

3.3.2.6 HOS (hypo-osmotický swelling test)

Každý druh spermatu má jiné membránové složení. Když se spermie setkají s hypo-osmotickým prostředím, reaguje na hypoosmolalitu pomocí ohnutých nebo zvlhčených ocasů v důsledku přílivu vody během obnovy osmotické rovnováhy. V klasickém HOS testu se tato vlastnost používá k charakterizaci integrity membrány (Nalley & Arifiantini 2014).

Jednoduchý test je založen na semipermeabilitě intaktní buněčné membrány, která způsobuje pronikání vody do buňky a expanzi objemu buňky při vystavení buňky hypoosmotickým podmínkám. Jednoduše se odečítá a podává informaci o integritě buněčné membrány bičíku spermií (Kubíček 2010). Také Rodriguez-Martinez (2014) uvádí tuto metodu jako jednoduchou a v dnešní době velice používanou.

Postup hodnocení popisují například Alcay et al. (2016) a to následovně: hodnocení bylo provedeno inkubací 10 μl spermatu se 100 μl 100 mOsM hypoosmotického roztoku (9 g fruktózy + 4,9 g citrátu sodného na litr destilované vody), při teplotě 37 °C po dobu 60 minut. Po inkubaci se 20 μl směsi rozetřelo krycím sklíčkem na teplé podložní sklíčko a 200 buněk spermií bylo hodnoceno pod zvětšením 1000x s mikroskopem s fázovým kontrastem.

Nalley & Arifiantini (2014) dělali pokus, ve kterém zjišťovali rozdíly při provedení HOS po 60 minutách inkubace vzorku spermatu berana a po 30 minutách inkubace. Výsledkem bylo, že na začátku inkubační doby (0 minut) bylo pozorováno navíjení ocasu pouze u 15,29 ± 0,88 %. Střední procento spermií s intaktní membránou určeno metodou HOS bylo po 15 minutách inkubace, HOS 30 minut, HOS 45 minut a HOS 60 minut bylo 38,16 ± 3,89; 69,47 ± 2,78; 42,85 ± 4,30 a 29,95 ± 3,80. Zdá se, že sperma berana trpí zvýšeným navíjením ocasu po 15 minutách a do 30 minut inkubace, kdy maximálních hodnot dosahuje 30 minut po inkubaci a klesá po 45 minutách.

3.3.2.7 ROS (Reaktivní formy kyslíku)

ROS jsou metabolity kyslíku, zahrnující superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, hydroxyperoxylový radikál a oxid dusný (Kubíček 2010). Jejich nadměrná tvorba a vysoká koncentrace v cytoplazmatických enzymech (např. kreatinfosfokináza) může odrážet výskyt abnormálních spermatozoí nebo nezralých spermatozoí s nadměrným množstvím cytoplazmy ve střední části spermie. Zároveň je určitá úroveň ROS nezbytná pro funkci spermií, včetně schopnosti oplodnění. Pokud je v ejakulátu přítomno nadměrné množství leukocytů nebo je sperma vystaveno oxidačnímu stresu, zvyšuje se tvorba reaktivní formy kyslíku (Rodriguez-Martinez, 2014).

Vysoké míry ROS mají nepříznivý vliv na funkce spermií, což vede k vysoké míře (20-40 %) neplodnosti. Chemiluminizační test je jedním z nejrozšířenějších testů hodnocení oxidačního stresu. Jsou zde dvě hlavní barviva a to: luminol a lucigenin. Luminol sleduje intracelulární deoxygenační reakce, které jsou zprostředkovány heterogenní skupinou peroxidáz spermií, zatímco lucigenin je oxidován při extracelulární úrovni superoxidovým aniontem (Hossain et al. 2011).

3.3.2.8 TUNEL

Test TUNEL kvantifikuje začlenění značeného deoxyuridin trifosfát (dUTP) v místech poškozené DNA v reakci katalyzované enzymem deoxynukleotidyltransferáza. Začleněný dUTP pak může být kvantifikován FCM, fluorescenční mikroskopií nebo světelným mikroskopem (Cordelli et al. 2005).

Tato metoda určuje množství poškozené DNA ve spermatu (Rodriguez-Martinez 2014). Původně byla navržena k detekci degradace DNA v apoptotických somatických buňkách za použití terminální deoxynukleotidyl transferázy a přidání deoxyuridinových fosfátových nukleotidů k 3'-hydroxylovým koncím vyplývajícím z přerušení DNA. Konce 3'-hydroxyly jsou označeny buď fluorescenčním označením dUTP, nebo použitím 5-bromo-dUTP a inkubační označeného vzorku protilátkou proti BrdUTP konjugované fluorochromem (Martínez-Pastor et al. 2010).

Nur et al. (2010) ve svém výzkumu použili techniku TUNEL na hodnocení různých účinků kryoprotektivních látek na morfologii spermií berana tak, že propustná sklíčka inkubovali ve tmě při teplotě 37 °C po dobu 1 h reakční směsí TUNEL, která obsahovala terminální deoxynukleotidyl transferázu (TdT). Po označení dUTP vzorky omyli fosfátovým pufrům (PBS) a okamžitě analyzovali fluorescenční mikroskopií. Do každé studie byly zahrnuty negativní (vynechání TdT z reakční směsi) a pozitivní (pomocí DNase I, 1 mg/ml po dobu 10 minut při pokojové teplotě) spermie. Každé mikroskopické pole bylo nejprve vyhodnoceno pod fluorescenční mikroskopií (40x zvětšení), aby se určil počet reaktivních spermií, a poté pod mikroskopií s fázovým kontrastem, aby se určil celkový počet spermií na pole. Výhodné je, že test TUNEL lze provést na skleněném sklíčku a je zvláště užitečný, když je počet spermií velmi nízký (Evenson et al. 2016).

3.3.3 Ředění

Ředění spermatu je prováděno z technických a biologických důvodů: zvýšení objemu ejakulátu pro oplodnění více samic a pro poskytnutí živin a ochrany spermiím (Gibbons et al. 2019).

Správné ředidlo má mít tyto vlastnosti: musí být zdrojem energie pro spermie, mít dobrou pufovací schopnost, musí obsahovat malé množství elektrolytu, zajistit požadovaný osmotický tlak, udržovat stálou hladinu pH odpovídající požadavkům ejakulátu, nesmí být toxické pro spermie, musí být sterilní a ekonomicky dostupné (Louda et al. 2001), jejich kompletní příprava se provádí v laboratoři AI (Gordon 2017).

Kryokonzervační přísady při ředění spermií obsahují kryoochrannou složku (glycerol, ethylen nebo propylenglykol, dimethylsulfoxid), pufr (Tris nebo TES titrovaný s Tris), jeden nebo více sacharidů (glukóza, laktóza, rafinóza, sacharóza, trehalóza), soli (citrát sodný, kyseliny citrónová) a antibiotika (penicilin, streptomycin) (Ntemka et al. 2018). Gordon (2017) ve své práci zmiňuje použití neobvyklého ředidla jako je kokosové mléko, které se používalo v tropických zemích a bylo překvapivě efektivní.

Složení citrátového ředidla, jak se dnes používá: 2,37 g citrátu sodného, 0,50 g glukózy, 15 ml vaječného žloutku, 100 000 penicilinů, 100 mg streptomycinu, sklenici destilované vody na 100 ml (Salamon & Maxwell 2000).

Ředění ejakulátu vybraným ředidlem se provádí podle koncentrace a motility spermií v poměru 1:4–1:8 (Čunát et al. 2013).

Stupeň ředění (Louda et al. 2001)

Přidává se tolik ředidla, aby inseminační dávka 0,1-0,2 ml obsahovala po naředění 100-360 miliard spermií s progresivním pohybem. Celkové množství ředidla určeného k ředění se vypočte následovně:

$$\text{množství ředidla} = \frac{a \times h \times O \times 0,1}{10} - 0$$

a = aktivita spermií

h = koncentrace v milionech v mm³

O = objem v cm³

Ředidla pro krátkodobé uchování (8-12 hodin) jsou žloutko-citrátové, žloutko-citrátové upravené a mléčné ředidlo (Alvarez et al. 2019).

Purdy et al. (2020) použili ve své studii ředidlo Tris-vaječný žloutek-glycerol, kyselinu citrónovou a glukózu, což je jedno z nejčastěji používaných ředidel pro dlouhodobou konzervaci a Salamon & Maxwell (2000) uvádějí, že jeho složení je následující: 3,63 g TRIS, 0,50 g fruktózy, 1,99 g kyseliny citronové, 14 ml vaječného žloutku, 100 000 penicilinů, 100 mg streptomycinu, destilovaná voda na 100 ml.

Vedle výše uvedených běžných složek ředidel se dají použít i další látky, které mají zajistit požadovanou kvalitu budoucí inseminační dávky. Podle Zadeh Hashem et al. (2017), kteří dělali experiment s přidáním kyseliny olejové ke spermatu, může kyselina olejová se správnou koncentrací podpořit celkovou motilitu spermií a jejich životaschopnost. Nebo také zvýšit procento spermií se zdravou plazmatickou membránou.

Allai et al. (2018) ve své práci zjistili, že přidání antioxidantů, i v malém množství, během konzervace může zlepšit funkce spermií. Dále zjišťovali kvalitu spermatu po přidání semenné plazmy (SP) z téhož druhu nebo z druhu jiného. Přidáním SP se zlepšují charakteristiky tekutých a zmrazených-rozmrazených spermií berana, jako je pohyblivost, životaschopnost, integrita akrozomu, kapacitace a mitochondriální aktivita. V Austrálii bylo zjištěno, že obohacení zmrazených-rozmrazených spermií berana semennou plazmou významně zlepšilo zabřezávání po umělé inseminaci (Gordon 2017).

Žádoucí může být i odstranění některých látek běžně obsažených v ejakulátu. Výsledky studie Premrov Bajuky et al. (2018) naznačují, že odstranění lipázy má pozitivní vliv na kvalitu kryokonzervovaných spermií.

Nejčastěji používané komerční ředidlo bez komponentů živočišného původu je: Andromed a nejčastěji používaná ředidla s komponenty živočišného původu jsou: Triladyl, Ovipro. Bylo zjištěno, že komerčně dostupné ředidlo na bázi sóji (Bioxcell®) je lepší než ředidlo na bázi vaječného žloutku (Irvine TYB), a to především z hlediska zachování motility mražených spermií při použití dvoustupňové metody (Roof et al. 2012).

3.3.3.1 Kryoprotektory

Při dlouhodobé konzervaci je nezbytné použít kryoprotektory, které se přidávají do ředícího média k ochraně buňky před různými poraněními (Allai et al. 2018). Specifický problém při kryokonzervaci kozího spermatu je zjištění škodlivého účinku semenné plazmy na životaschopnost spermií v ředidlech obsahující vaječný žloutek nebo v médiích na bázi mléka. Problém týkající se ředidel vaječného žloutku byl přičítán původu enzymu ze sekrece bulbouretrální žlázy v semenné plazmě, pojmenované vaječný žloutek koagulační enzym EYCE Roy. Nízké přežití spermií během skladování v mléčných ředidlech je způsobeno proteinovou frakcí také z kozí bulbouretrální žlázy (BUS) zvaný SBUIII, který při interakci s mléčnými složkami v ředidle silně inhibuje motilitu spermií (Leboeuf et al. 2000).

Kryoprotektory můžeme rozdělit na prostupující, což je například glycerol, dimethylsulfoxid nebo neprostupující jako je například vaječný žloutek nebo odstředěné mléko. Prostupující kryoprotektory způsobují přeskupení lipidů a proteinů což způsobuje zvýšenou tekutost membrány, větší dehydrataci při snížení teploty, sníženou tvorbu intracelulárního ledu. Na druhé straně působí neprostupující kryoprotektant, který snižuje tvorbu extracelulárního ledu (Ntemka et al. 2018).

3.3.3.1.1 Glycerol

Mezi hlavní kryoprotektory patří glycerol, jehož množství přidané do ředidel je pro kryokonzervaci spermatu berana omezeno kvůli své potenciální cytotoxicitě. Koncentrace glycerolu poskytující nejvyšší míru přežití spermií po rozmrazení je mezi 4 % a 7 % (Allai et al. 2018).

Glycerol může být přidán do spermatu ve dvoufázovém ředění jako samostatná ředící frakce nebo přidáním ředidla obsahujícího glycerol v jednom kroku. Zpočátku bylo zjištěno, že je lepší přidat glycerolovou ředící část při 29 ° C než při 5 ° C. Přidání glycerolového ředidla většina pracovníků preferovala při 4–5 ° C, ale někteří nezjistili žádný rozdíl mezi přidáváním při 32°C nebo 3°C nebo při 22°C nebo 5°C (Salamon & Maxwell 2000).

Zatímco glycerol nabízí kryoochranu spermií, může také způsobit strukturální poškození během zpracování před zmrazením. V důsledku toho bylo navrženo, aby glycerol byl přidán ne více než 20–30 minut před zmrazením (Salamon & Maxwell 1995).

3.3.3.1.2 Vaječný žloutek

Vaječný žloutek chrání spermie před škodlivými účinky chladového šoku, zachovává pohyblivost, snižuje ztrátu akrozomálních enzymů a udržuje mitochondriální membránu spermií. Jeho začlenění umožňuje snížení koncentrace glycerolu v médiu. Přestože vaječný žloutek prospívá kryokonzervovaným spermiím, může být potenciálním zdrojem mikrobiologické kontaminace, která může ohrozit kvalitu spermií. Z tohoto důvodu může být

práškový vaječný žloutek bezpečnější alternativa, protože prochází procesem pasterizace, aby se zničili bakterie (Allai et al. 2018).

Ptáček et al. (2018) dělali studii, kde zjišťovali vliv kryokonzervantu BullXcell® na bázi vaječného žloutku a AndroMed® (bez vaječných žloutků). Spermia bylo odebráno od Suffolku a Charollais, kryokonzervováno a zmrazeno. Charakteristiky rozmrazeného spermatu byly hodnoceny pomocí CASA ihned po rozmrazení a po 2 hodinách inkubace v teple ($\pm 38^\circ\text{C}$). Byla pozorována výrazně vyšší celková pohyblivost (+ 12,3%), přímá rychlost ($+5,6 \mu\text{m s}^{-1}$) a průměrná rychlost dráhy ($+ 6,9 \mu\text{m s}^{-1}$) u spermatu kryokonzervovaného BullXcell® na bázi vaječného žloutku.

Pro zmrazení byla zkoumána široká škála koncentrací vaječného žloutku v beraním spermatu. Dříve pracovníci používali 30–50 %. Pro zmrazení spermatu berana v ampulích, byl vaječný žloutek o koncentraci 3–6 % dostatečný, ale pro zmrazení pelet bylo optimální 15 %. Vaječný žloutek, i když někdy částečně nahrazený látkami s podobnou aktivitou, bude stále pravděpodobně důležitou složkou ředidel pro zmrazení spermatu berana, zejména kvůli jeho ochrannému účinku na plazmatickou membránu (Salamon & Maxwell 2000).

3.3.4 Konzervace

Cílem konzervace je zachovat životaschopnost spermatu a dobrou oplozovací schopnost. Dále je cílem odpovídajícím ředěním vyrobit maximální počet inseminačních dávek s takovým počtem aktivních spermií, který odpovídá biologickým požadavkům pro zajištění úspěšného oplození–koncepce (Louda et al. 2001). Při skladování je nutné zpomalení metabolismů spermií, což vede k prodloužení jejich životaschopnosti (Salamon & Maxwell 1995).

Během zpracování spermatu jsou spermie vystaveny mnoha nefyziologickým změnám: hodnotám pH, teplotám, světla i záření, parciálnímu tlaku kyslíku a oxidu uhličitého, a i absenci samčích genitálních sekretů. Beranní spermie jsou extrémně náchylné na nízké teploty během procesu chlazení nebo zmrazování. To je přičítáno vysokým koncentracím polynenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně spermií berana (Allai et al. 2018).

Podle způsobu konzervace se odvíjí i následná metoda umělé inseminace (Ari et al. 2017).

3.3.4.1 Čerstvé semeno

Při použití čerstvého ejakulátu se procento zabřeznutých ovcí uvádí až 75 %. Každým dnem skladování klesá oplozovací schopnost o 10–35 %. Pravděpodobnost zabřeznutí je možné zvýšit dobře načasovanou laparoskopickou inseminací. Za použití této metody je možné zabřeznutí i s ejakulátem starým 8 dní (Salamon et al. 1995).

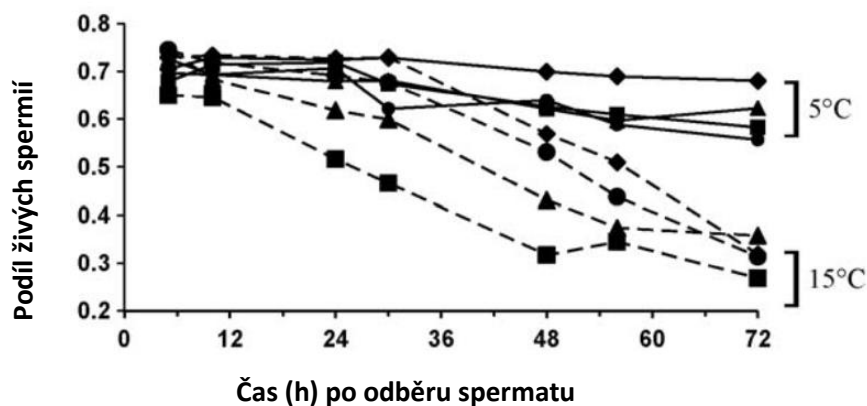
Podle Evans (1988) je nejvhodnější k cervikální inseminaci, ale i tak neposkytuje dostatečný účinek pro jeho častější použití. Tuto metodu využívají například v Argentině a míra zabřezávání je 60 % (Gibbons et al. 2019).

3.3.4.2 Chlazení

AI s chlazeným spermatem (kryokonzervováno při teplotě $5\text{--}15^\circ\text{C}$) je prováděna obvykle intracervikálně, uložením spermatu do děložního krčku. Procento zabřezávání při použití této metody je dle Gibbonse et al. (2019) 40–55 %.

Anel et al. (2005) ve svém výzkumu použili chlazené sperma zředěné ředidlem Tes-Tris-Fruktóza-vaječný žloutek, ve francouzských mini pejetách (0,25 ml), zchlazené na 15 °C a uskladněné v přenosné ledničce. Výsledek byl takový, že zabřezávání po inseminaci zchlazeným spermatem vaginálně byla nižší o 13 bodů než zabřezávání po inseminaci zmrazeným spermatem laparoskopicky. Nevýhodou uchování spermatu v tekutém stavu je jeho omezená životnost a nemožnost transportu na velké vzdálenosti. K inseminaci je však možné využít relativně malé množství spermií, lze oplodnit velké množství samic a metodu lze jednoduše využít v terénu (Faigl et al. 2012).

O'Hara et al. (2010) publikovali studii zaměřenou na efekt podmínek skladování na životaschopnost čerstvého spermatu berana a jeho schopnost oplodnění až 72 hodin po odběru. Experiment byl navržen k vyhodnocení účinku skladovací teploty (5 °C a 15 °C) na čerstvé sperma. Výsledkem bylo zjištění, že skladovací teplota, bez ohledu na ředidlo, měla významný vliv na pohyblivost i na životaschopnost spermií. Sperma si při 5 °C udržovalo přijatelnou pohyblivost a životaschopnost až 72 hodin ve srovnání s uskladněním při 15 °C, kdy životaschopnost lineárně klesala, což můžeme vidět na obrázku č. 4



Obrázek č. 4 Pohyblivost a životaschopnost spermatu 72 hodin po odběru u skladování při 5 °C a 15 °C

OviPro (■), AndroMed (▲), or INRA 96 (●)

Zdroj: O'Hara et al. 2010

3.3.4.3 Dlouhodobá konzervace

Kryokonzervace spermií berana může velmi prodloužit dobu skladování, ale mrazení, rozmrazování, chladový šok, chemická toxicita, kryoprotektory, osmotické poranění, oxidační poškození a apoptóza mohou vážně poškodit spermie (Rather et al. 2016). Celý proces zmrazování spermatu berana zahrnuje odběr, dvě fáze ředění, první s vaječným žloutkem a glycerolem v druhé fázi a ochlazení na teplotu 5 °C (Ntemka et al. 2018).

Zmrazování pelet se obvykle provádí tak, že kapičky spermatu umístíme do prohlubní na suchém ledu ochlazené na -80 °C až -95 °C. Zvýšená rychlost chlazení získaná peletováním na desce ze suchého ledu ochlazené na -100 °C až -160 °C neměla žádný vliv na motilitu spermií (Salamon & Maxwell 2000).

Další metodou zmrazování, je zmrazování spermatu v pejetách, tedy v tenkých plastových brčách či slámkách. Vlastní mrazení pejet se provádí při jejich uložení v horizontální poloze 30-40 mm nad hladinou tekutého dusíku při teplotě -80 až -100 °C po dobu sedm až osm minut. Potom se zmražené pejety ponoří do kontejneru s tekutým dusíkem (Louda et al. 2001). Pereira et al. (2019) ve své studii nejprve pejety ochladili z 32 °C na 5 °C rychlostí

0,25 °C/min., následně udržovali tuto teplotu po dobu 120 minut a poté pejety ponořili do kapalného dusíku a skladovali pro budoucí hodnocení při teplotě -196 °C.

Francouzští pracovníci popsali postup zmrazování kozího spermatu, kde je třeba odstranit plazmu promýváním spermii a následně zředit a zmrazit. Studie ukazují, že enzym produkovaný bulbouretrálními (Cowperovy) žlázami katalyzoval hydrolýzu lecitinů ve vaječném žloutku na mastné kyseliny a lysolecithin, které jsou toxické pro spermie (Rodriguez-Martinez 2014). Rozhodující pro konzervaci kozího spermatu je i rychlost zmrazování, a to právě ve své studii zkoumal Igbokwe et al. (2019). Výsledky ukázaly, že při pomalejším zmrazování byla vyšší pohyblivost spermii, lepší integrita membrány a akrozomu, ve srovnání se zmrazováním rychlejším. Zároveň mělo nižší procento abnormalit.

Salamon & Maxwell (2000) zjistili, že skladování spermatu až 27 let nemělo žádný vliv na zabřezávání, což ukazuje, že dlouhodobé skladování semene berana je možné a umožňuje tvoření genetických zdrojů v chovu ovcí.

3.3.5 Rozmrazování

3.3.5.1 Kvalita ejakulátu po kryokonzervaci a rozmrazení

Rodriguez-Martinez (2014) uvádí, že proces zmrazení destabilizuje membrány spermii a transformuje je do pokročilejšího stavu podobnému kapacitnímu, a to může být problémem pro správné načasování AI.

Úspěšnost kryokonzervace závisí na typu ředidla, rychlosti zmrazení (Ashrafi et al. 2011) a rozmrazení, balení a na samotném dárci. Podle Nordstoga et al. (2009) by rozmrazování spermatu berana mělo být provedeno rychle (8 s) a při relativně vysoké teplotě (70 °C). Rychlé rozmrazování při vysoké teplotě (70 °C) je však postup, který se jeví jako jeden kritický krok v AI. Rychlý postup rozmrazování vyžaduje vysokou přesnost týkající se přesné teploty uvnitř pejety. Snížení teploty rozmrazování (35 °C) a prodloužení doby (20 s) rozmrazování by mohlo usnadnit praktickou manipulaci se zmrazeným a rozmrazeným spermatem berana, s touto metodou souhlasí také Salamon et al. (1995). Řízená rychlost zmrazení významně zlepšuje celkový stav spermii před zmrazením a po rozmrazení a progresivní pohyb ve srovnání s nekontrolovanou rychlostí (Ashrafi et al. 2011).

Podle Salamona & Maxwella (2000) může být základní kryogenní poškození spermii ultrastrukturální fyzikální, biochemické nebo funkční. Ultrastrukturní poškození vzniká na akrozomových membránách, mitochondriálním plášti a axonému. Při procesu kryokonzervace dochází také ale k proteolytickým změnám, což následně ovlivňuje výsledné zabřezávání (Lv Chunrong et al. 2020). Hlavní příčina poškození buněk spermii je způsobená intracelulární krystalizací během zmrazování. Navíc náhlé změny teploty, jako je chladový šok, tvorba a rozpuštění ledu během procesu zmrazování a rozmrazování může ovlivnit integritu a funkčnost akrozomu, jádra, mitochondrií a plazmatické membrány (Alcay et al. 2016).

3.4 Kontrola reprodukčního cyklu a synchronizace říje

3.4.1 Beraní efekt

Tři reprodukční období u samic je možno identifikovat přítomností samce – pubertu, anestrus a estrus. Puberta se u jehniček může dostavit dříve. U ovcí, které jsou před koncem sezónního anestrus, se náhlé setkání s beranem projevuje dřívějším započítáním a synchronizací estrálního cyklu. Téměř u všech ovcí lze příchod ovulace urychlit až o šest týdnů právě pomocí „beraního efektu“. Dvě hodiny po setkání s beranem se u ovcí zjišťuje hladina luteinizačního hormonu (LH) v plazmě. Ovce ovulují v průměru asi 41 hodin po příchodu berana do stáda a předovulační vrchol LH je patrný asi 27 hodin po příchodu berana (Nakafero et al. 2020).

Nedávno bylo zjištěno, že samčího efektu je možno u ovcí využít k indukci říje mimo připouštěcí období. Úspěšné využití beraního efektu v uměle indukované říji závisí na mnoha podmínkách.

Plemena středomořského původu jako jsou Merino nebo Rambouillet nejvíce reagují na „beraní efekt“, protože poskytují flexibilitu při chovu bahnic tohoto typu v různých ročních obdobích (Notter 2012).

3.4.2 Hormonální synchronizace říje

Umělá inseminace představuje praktický nástroj v genetických programech, umožňující synchronizovanou inseminaci a efektivnější využívání vynikajících samců ale vyžaduje hormonální stimulaci, která zajišťuje synchronizovanou ovulaci (Fierro et al. 2017).

Synchronizace říje znamená vyvolání plodné říje najednou u většího počtu plemenic ve stádě, aby mohly být v plánovaném časovém období zapuštěny nebo inseminovány a dosáhlo se turnusového porodu (Vaněk 2002). To usnadňuje organizaci práce v ovčíně, umožňuje skupinový odstav a vytvořit větší skupiny jatečných jehňat.

Synchronizace říje se obvykle kombinuje s umělou inseminací ke zvýšení efektivity v chovu. Mezi běžné metody patří: použití intravaginální houby napuštěné progestageny nebo CIDR (Controlled internal drug release) (Nakafero et al. 2020). Purdy et al. (2020) ve svém experimentu zjistili, že při inseminaci 53 hodin po odstranění CIDRu bylo mnohem vyšší zabřezávání. Nejvyššího zabřezávání bylo však dosaženo při inseminaci 53 i 57 hodin po CIDRu. Nejnižší úspěšnost byla pozorována při inseminaci 51 a 55 hodin po vyndání CIDRu.

Ve Francii se u koz používá napuštěný vaginální tampon po dobu 11 dnů, intramuskulární aplikace prostaglandinu (PGF 2α) a eCG (koňský choriový gonadotropin) 48 hodin před odstraněním tamponu. Umělá inseminace se provádí 43-45 hodin po vyndání vaginálního tamponu (Fatet et al. 2011).

3.4.2.1 Progesteron a syntetické gestageny

Jsou založeny na jeho účincích v luteální fázi cyklu a simulují působení přírodního progesteronu produkovaného žlutým tělískem po ovulaci (Abecia et al. 2012). Nejvhodnější jsou syntetické gestageny (látky funkčně shodné s hormonem žlutého tělíska). Jejich podstatou je blokáda vylučování hypofyzárních hormonů řídících funkci vaječnicků. Když se udržuje hladina gestagenu v organismu, stav odpovídá sekreční fázi žlutého tělíska. Po jejich vysazení dochází k hromadné říji. Důležitý je dostatečně dlouhý aplikační interval, jehož délka nesmí být kratší než jeden pohlavní cyklus (12 dnů aplikace, dva dny na vyloučení zbytků

podávané látky, dva dny na dozrání folikulů, celkem tedy 16 dnů) (Vaněk 2002). Je několik způsobů, jak je ovcím podávat a to: denně v krmivu, jednorázově porézním tamponem do vagíny, jednorázově v podkožním implantátu.

3.4.2.2 Prostaglandiny

Prostaglandin je neúčinnější luteolytické činidlo pro malé přežvýkavce a lze jej použít během sezónního chovu pro estrální synchronizace (Amiridis & Cseh 2012). Podle Nakafeero et al. (2020) je užívání prostaglandinu nebo jeho analogů také populární během období rozmnožování a někdy se kombinuje s progesteronem, aby se dosáhlo lepší reprodukce.

Použití prostaglandinů je alternativou při kontrole reprodukce. Prostaglandiny eliminují žluté tělíčko a indukují následnou folikulární fázi s ovulací (Abecia et al. 2012).

3.5 Metody inseminace

Ovce určené k inseminaci se fixují v připouštědle. Při inseminaci se dodržují stejná hygienická opatření jako při inseminaci skotu. Provádí se většinou jednorázovou pipetou pomocí poševního zrcadla se světelným zdrojem.

Podle Candappa & Bartlewski (2011) je pro umělou inseminaci u ovcí intrauterinní ukládání spermatu důležité pro dosažení vysoké míry zabřezávání. Úspěšnost zabřezávání po vaginální nebo intracervikální AI, i když jsou nespolehlivé, je přijatelná pouze s čerstvě odebraným spermatem, které bylo podrobeno minimální manipulaci. Míra zabřezávání z této metody se pohybuje v rozmezí 20-40 % při dávce 400 miliard spermií na dávku inseminátu a bylo prokázáno, že tato hodnota roste s rostoucí hloubkou ukládání spermatu (to je mezi vaginální a intracervikální umělou inseminací).

3.5.1 Intravaginální (vnitrovaginální)

Tato metoda je velmi rychlá, nenáročná, ale nepřináší dobré výsledky (30-50% úspěšnost). Inseminační dávka se deponuje pomocí mírně zvednuté inseminační pipety do horní části poševní klenby. Při zavádění inseminační pipety je špička mírně zvednutá směrem ke kosti křížové, aby nebyla zavedena do uretry. Do inseminační pipety se nasává nejprve malé množství vzduchu, potom vlastní inseminační dávka (Louda et al. 2001). Provádí se s čerstvým nebo s chlazeným spermatem, což ve své práci uvádí i Cseh et al. (2012) a zároveň tvrdí, že při použití chlazeného nebo mraženého a rozmraženého spermatu při této metodě umělé inseminace, jsou výsledky špatné. Podle Evans (1988) je intravaginální inseminace při použití zmrazené a rozmražené spermie neúčinná.

Richardson et al. (2012) ve své studii zjišťovali, zda ukládání zmrazeného a rozmraženého spermatu intravaginálně vede ke stejnému procentu zabřezávání jako při cervikální inseminaci. Výsledkem byla míra zabřezávání 70,4 % po cervikální inseminaci čerstvým spermatem, míra zabřezávání zmrazeným a rozmrazeným spermatem intracervikálně byla 36,2 % a byla významně větší než AI se zmrazeným spermatem intravaginálně 27,6 %.

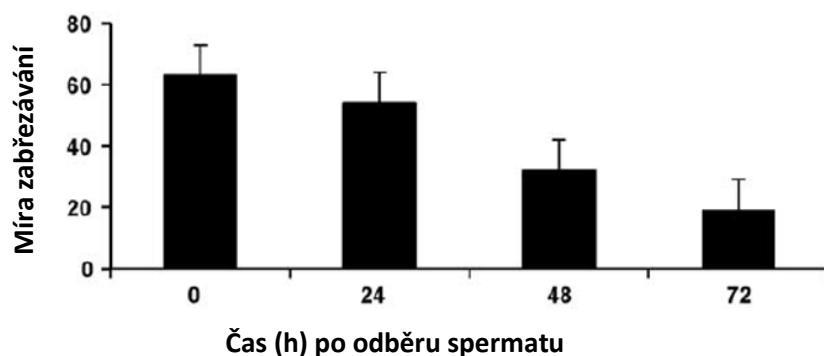
3.5.2 Intracervikální (vnitrokrčková)

Cervikální umělá inseminace u ovcí s čerstvým spermatem přináší mnohem vyšší míru březosti než při inseminaci zmrazeným a rozmrazeným spermatem (O'Hara et al. 2010).

Dávka se deponuje do děložního krčku v hloubce jeden až dva centimetry. Při této metodě je nutno použít poševní zrcadlo (spekulum). Inseminační dávky obsahují standardně 150–200 miliard aktivních spermií s motilitou 60–80 %. Lze ji aplikovat s použitím chlazeného, čerstvého či zmrazeného spermatu (Cseh et al. 2012) a ideální doba inseminace je 55 hodin po odstranění vaginálního progesteronového tamponu nebo 15-17 hodin po nástupu detekované říje.

Dle Čunáta et al. (2013) a jeho projektu v rámci ČR, kde bylo provedeno 531 intracervikálních inseminací u ovcí plemene: suffolk, texel, merinolandschaf, valašská ovce, šumavská ovce, romanovská ovce a lacaune ve věkovém rozmezí 2-6 let s provedenou synchronizací říje pomocí vaginálních tamponů (CHRONOGEST, CIDR) a hormonální stimulace (SERGON, FOLIKOTROPIN) byla nejvhodnější doba pro úspěšnou inseminaci v období 56–59 hodin po ukončení synchronizačního postupu. Výsledkem byl nejvyšší počet zabřezlých (72,22 %) u plemene merinolandschaf. Inseminace byla provedena 59 hodin po synchronizaci s inseminační dávkou 0,8 ml.

O'Hara et al. (2010) dělali výzkum, ve kterém zjišťovali vliv délky uskladnění čerstvého spermatu na úspěšnost intracervikální inseminace u bahnic. Výsledek můžeme vidět na obrázku č. 5, který ukazuje, že při inseminaci čerstvým spermatem ihned (0 h) bylo procento zabřezávání 60,2 % a pro intracervikální inseminaci za 72 hodin 18,3% úspěšnost.



Obrázek č. 5 Míra zabřezávání u bahnic po cervikální umělé inseminaci s použitím čerstvého spermatu uloženého 0, 24, 48 nebo 72 hodin

Zdroj: O'Hara et al. 2012

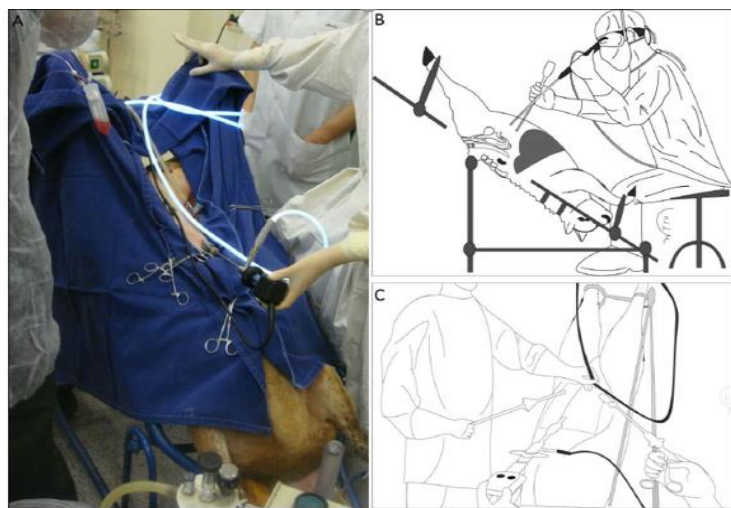
3.5.3 Intrauterinní (vnitroděložní) laparoskopická

Nitroděložní inseminace s pomocí laparoskopie je efektivní technika přizpůsobena ovcím. Je to preferovaná technika zejména pokud se používá zmrazené sperma (Casali et al. 2017), avšak vyžaduje veterinární odbornost a je náročnější než cervikální inseminace. Jednou z jejích výhod je to, že umožňuje použití mnohem nižších dávek spermií, než jaké jsou nutné při přirozeném páření nebo při jiných metodách inseminace (Evans 1988).

Srovnání laparoskopické a cervikální inseminace u mléčných koz prokázaly významné rozdíly v míře zabřezávání ve prospěch laparoskopické inseminace. Laparoskopická

inseminace byla také lepší v porovnání s cervikální v Austrálii při inseminaci zmrazeným a rozmrazeným spermatem (Leboeuf et al. 2000).

Podle Vrisman et al. (2014) jsou zvířata podrobena celkové anestezii a položena na hřbet s hlavou nakloněnou v 45°, což je známé jako Trendelenburg pozice. Tuto pozici nám zobrazuje následující obrázek č. 6.



Obrázek č. 6 Trendelenburg pozice

Zdroj: Vrisman et al. 2014

A následně se provedou dva řezy; jeden řez je pro zavedení endoskopu, zatímco inseminující pipeta je zavedena do lumen dělohy druhým řezem (Candappa & Bartlewski 2011).

Feranti et al. (2013) hodnotili dvě techniky intrauterinní laparoskopické inseminace u ovcí. V experimentu byly použity dvě polohy, a to hřbetní a čtyřnohá (stojící). Výsledkem bylo, že obě metody používající spinální jehlu jsou proveditelné, ale čtyřnohá metoda inseminace je technicky obtížnější ve srovnání s laparoskopickým přístupem v hřbetní poloze. S technickým vylepšením by se tato metoda mohla stát alternativou pro inseminaci ovcí.

3.5.4 Intrauterinní transcervikální

Transcervikální metoda vpravení spermatu intrauterinně přes děložní čípek není obvyklá (Casali et al. 2017). Minimální potřebný počet pohyblivých spermií je 60 miliard v jedné inseminační dávce a optimální doba inseminace je mezi 49. a 65. hodinou po odstranění progesteronového tamponu (Cseh et al. 2012). Při vložení spermatu hlouběji než 4 cm do děložního čípku, se zdá být tato metoda účinnější (60% zabřezávání). Zvýšená hloubka cervikální inseminace může zlepšit zabřezávání, ale doposud bylo problematické dosáhnout dostatečné penetrace (Salamon & Maxwell 2000).

V posledních letech se pokusy o zlepšení transcervikální AI a embryotransféru u bahnic primárně zaměřily na použití různých modelů inseminačních katetrů a farmakologických cervikálních dilatátorů k usnadnění nitroděložního ukládání spermií nebo embryí (Candappa & Bartlewski 2011).

Casali et al. (2017) vytvořili vyhodnocení míry březosti dosažené pomocí transcervikální metody inseminace u ovcí ve srovnání s konvenčními metodami, jako je cervikální

a laparoskopická intrauterinní inseminace. Výsledkem pokusu bylo, že míra plodnosti po transcervikální metodě inseminace byla střední (42,3 %). Nejnižší procento oplodnění bylo po použití metody cervikální (36 %). U metody intrauterinní bylo procento oplodnění nejvyšší (50,2 %). Zároveň byla metoda transcervikální inseminace časově náročnější než cervikální nebo laparoskopická ($11,4 \pm 1,6$ proti $85,5 \pm 7,5$ a $56,8 \pm 5,6$ bahnic počítáno za hodinu).

S touto technikou jsou také spojená častá poranění děložního čípku, abscesy, infekce a špatná míra oplodnění.

3.6 Faktory ovlivňující umělou inseminaci

3.6.1 Anatomie samičího pohlavního ústrojí

Ovčí děložní krček je dlouhý, vláknitý a trubkovitý. Vyznačuje se silnou stěnou a pevnými výstupky známými jako prstencové kroužky. Měří čtyři až sedm centimetrů na délku, a právě tato anatomie brání průchodu inseminační pipety skrz děložní krček, což zhoršuje oplodňování pomocí umělé inseminace (Feranti et al. 2013). Výsledkem je, že postup pipety přes děložní čípek je problematický vzhledem k obtížnosti lokalizace otvoru každého následujícího, excentricky umístěného prstence. Navíc existuje velká variabilita v morfologických charakteristikách krčku mezi plemeny a jednotlivými bahnicemi, včetně délky (5-10 cm), počtu kroužků (3-7), průměru kroužku (1-3 mm) a vzdálenosti mezi kroužky (3-5 cm) (Candappa & Bartlewski 2011; Alvarez et al. 2019).

Kvůli zvláštní anatomii ovčího děložního krčku je omezený i objem ejakulátu (<0,25 ml) s relativně velkým počtem spermií (Cseh et al. 2012).

3.6.2 Frekvence odběrů

I když je to často přehlíženo, odběr spermatu je prvním důležitým krokem v procesu kryokonzervace (Jiménez-Rabadán et al. 2016). Počet spermií klesá v po sobě jdoucích ejakulacích odebraných tentýž den (Sathe & Shipley 2014).

Kaya et al. (2002) zjistili ve svém výzkumu, že procento mrtvých spermií kolísalo bez ohledu na frekvenci ejakulace. Morfologicky abnormální spermie byly zvýšené při zvýšené intenzitě odběru. Při zvýšení frekvence odběru až na 8krát denně se výrazně snížila produkce spermií. Také Leboeuf et al. (2000) zkoumali kvalitu spermií při zvýšených odběrech u koz ze 2 na 7 odběrů za týden pomocí umělé pochvy. Toto zvýšení vedlo k trojnásobnému zvýšení počtu spermií získaných za týden, avšak doba sexuálního odpočinku mezi odběry má pozitivní vliv na zmrazování spermií a doporučuje se prodloužit jeho trvání od 2 dnů v první polovině rozmnožovacího období na 3 dny ve druhé polovině.

3.6.3 Kondice a výživa

Šest až osm týdnů před zahájením připouštěcího období se u stáda ovcí posoudí jejich tělesná kondice. V době připouštění má být stupeň kondice dva a půl až tři stupně z pěti stupňů možného hodnocení. Špatná kondice těla je spojena se sníženou plodností charakterizovanou zpožděním (7–19 dní) nebo potlačením říje. Míra ovulace u bahnic se skóre tělesné kondice (BCS) '1,5', '2,5' nebo '3' (na měřítku '1' až '5') v očekávané době páření byla odlišná (1,09; 1,60; respektive 1,93). Nejnižší míra úmrtnosti embryí se navíc vyskytla u bahnic ve středně dobrém stavu, která byla před krytím dobře krmena (bahnice s BCS „2,5“ při páření

ztratily 34 % embryí, ale bahnice ve špatném stavu při páření ztratily 63 % (Dobson et al. 2012). Systém posuzování tělesné kondice byl vypracován v Austrálii a zdokonalen v Anglii. Spočívá v tom, že se pohmatem posuzuje osvalení, velikost a síla tukového krytu a barva kůže v krajině bederní. Zjišťuje se, zda lze nahmatat trnové a postranní výčněly obratlů. Zařazení (stanovení) tělesné kondice se provádí hmatem v krajině bederní na stojící ovci.

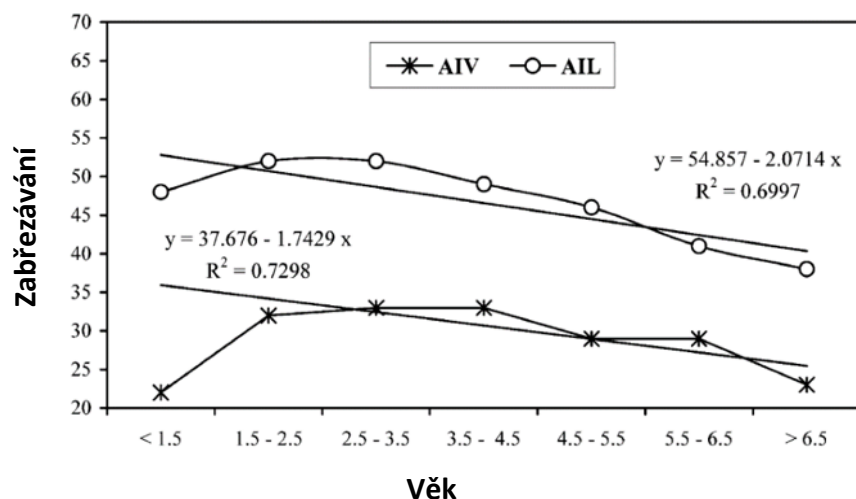
Většina charakteristik reprodukčního cyklu může být modulována prostřednictvím přizpůsobené výživy (Fatet et al. 2011). V posledních letech byly metody stimulace plodnosti výživou zdokonaleny použitím krmného šoku neboli „flushingu“. Krátkodobé zvýšení krmné dávky v době před zapuštěním má značný význam jen u ovcí se špatnou kondicí. Princip je v tom, že ovce šest až osm týdnů před zapuštěním dostávají omezenou krmnou dávku a dojde ke snížení živé hmotnosti. Čtyři týdny před začátkem zapouštěcího období se ovce začínou intenzivně krmit, aby zvýšily svou hmotnost o 15–20 % (Vaněk 2002). Samozřejmostí je také trvalý přístup k čisté vodě. Při nedostatku napájení je i nižší příjem krmiva a nejsou tak pokryty potřeby březí matky a plodu (Axmann & Sedlák 2008).

Špatná výživa může mít ještě dlouhodobější důsledky: potomci březích bahnic krmených 50 % požadavků od 28 do 78 dnů po páření měli nižší stresové reakce ve věku jednoho roku, nižší koncentrace progesteronu během luteální fáze a výrazně sníženou plodnost (Dobson et al. 2012).

Casali et al. (2017) ve své studii použili bahnice s BCS $3,0 \pm 0,1$ a provedli cervikální, transcervikální a intrauterinní laparoskopickou inseminaci. V této kombinaci se ukázala laparoskopická inseminace nejlepší (50,2 %) oproti metodám cervikální (36,0 %) a transcervikální (42,3 %).

3.6.4 Věk

Věk bahnice významně ovlivňuje plodnost. Podle výzkumu Anel et al. (2005) po jednom a půl roce věku klesá natalita o 2,07 % ročně. Nejlepší míra plodnosti byla zaznamenána u bahnic ve věku jednoho a půl až čtyř a půl roku. Tyto výsledky můžeme pro porovnání vidět na obrázku č. 7, který znázorňuje vývoj zabřezávání po AI v závislosti na věku bahnice.



Obrázek č. 7 Výsledek vývoje zabřezávání po umělé inseminaci podle věku bahnice
Zdroj: Anel et al. 2005

Malý rozdíl zabřezávání byl pozorován mezi 18měsíčními kozami a dospělými kozami po laparoskopické umělé inseminaci (Leboeuf et al. 2000). I u beranů či u kozlů hraje věk důležitou roli. Ovšem Bartlewski & Candappa (2015) ve své studii nezjistili žádnou významnou korelaci s věkem ovcí a cervikální propustností.

3.6.5 Roční období a teplota

Sezónní chov se vyvinul, aby synchronizoval narození mláďat s obdobím příznivých teplot a výživy, ale dnes významně omezuje flexibilitu výroby (Notter 2012). Hlavní faktor prostředí ovlivňující sezónní chov malých přežvýkavců je každoroční změna délky dne (Fatet 2011). Snižování délky dne u malých přežvýkavců stimuluje nástup reprodukční činnosti zvýšením melatoninu z epifýzy. Podle Čunáta et al. (2013) je třeba, v případě použití inseminace mimo sezónní období, mít stále na zřeteli, že u většiny plemen ovcí je dominantní sezónní výskyt říje a tento fenomén do značné míry ovlivňuje kvalitu spermatu i embryí a tím i % březosti. A proto se například u ovcí používá usměrňování světelného režimu.

Anel et al. (2005) zkoumali rozdíly v zabřezávání po umělé inseminaci v závislosti na ročním období. Jejich výsledky můžeme vidět v následující tabulce č. 1, která ukazuje, že v období září-leden bylo % zabřezávání nejlepší jak při vaginální umělé inseminaci, tak při laparoskopické umělé inseminaci. Zároveň nejnižší hodnoty zabřezávání byly pozorovány v období červenec-srpen u obou metod inseminací.

Tabulka č. 1 Zabřezávání podle techniky umělé inseminace a sezóny

Období	% zabřezávání/celková AI	
	AIV	AIL
Září-leden	35.53 (1821/5125)	46.88 (5334/11379)
Únor-červen	29.79 (3566/11969)	43.96 (6077/13823)
Červenec-srpen	22.72 (122/537)	38.95 (629/1615)

Zdroj: Anel et al. 2005

Nejnižší zabřezávání bylo zaznamenáno v roce 1996 v důsledku silného období sucha. Při podrobení bahnic teplotám 40 °C po superovulaci projevovaly o 10-20 % méně sexuální aktivity ve srovnání s bahnicemi podrobenými teplotě 19 °C. Teplotně stresované bahnice měly říji o 5 hodin později a byla o 6 hodin kratší (Dobson et al. 2012). Tejedor et al. (2016) ve své studii uvádí, že při teplotě od 5 °C do 25 °C při umělé inseminaci došlo k nejvyšší hodnotě zabřezávání.

Abecia et al. (2016) dělali výzkum ohledně vlivu meteorologických podmínek na zabřezávání koz. Střední, maximální a minimální okolní teploty (°C), střední relativní vlhkost (RH) (%), střední sluneční záření (SR) (MJ/m²), a celkové srážky (mm) v každý inseminační den byly získány z meteorologické stanice výzkumného střediska IFAPA pro kozí farmy a z nejbližší meteorologické stanice pro ovčí farmy. Ve všech případech byla nejbližší stanice ≤ 40 km od farmy. Porodnost byla 58 % (kozy) a 45 % (ovce). Všechny meteorologické proměnné s výjimkou srážek v den AI se významně lišily mezi kozami a ovci, které zabřezly, a těmi, které ne. U koz byly střední, maximální, minimální a efektivní teploty a SR výrazně vyšší a RH a THI (index teploty a vlhkosti) výrazně nižší u úspěšných inseminací než u neúspěšných inseminací. Kozy, které byly inseminovány v rámci THI ≤ 72 "bez tepelného stresu", měly výrazně vyšší porodnost (65 %) než kozy vystavené "mírnému tepelnému stresu" (THI = 73-77,

61% zabřezávání). Vztahy mezi meteorologickými proměnnými a úspěchem zabřezávání u ovcí byly podobné jako u koz. Stupeň tepelného stresu a zabřezávání po AI byly negativně korelovány. Bahnice, které byly inseminovány při "těžkém tepelném stresu" (THI \geq 90), měly nejmenší podíl zabřezávání (37 %). Pokud byly bahnice inseminovány „bez tepelného stresu“, byla míra zabřezávání 45%. Tyto výsledky nám zobrazuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2 Zabřezávání koz Payoya a ovcí Rasa Aragonesa a stupeň klimatického stresu v den umělé inseminace (THI \leq 72 = žádný tepelný stres; 73–77 = mírný; 78–89 = střední; \geq 90 = silný tepelný stres; Fuquay 1981 ve Španělsku

	Tepelný stres			
	Bez tepelného stresu	Mírný	Střední	Těžký
Kozy	65 %	61 %	58 %	-
Ovce	45 %	42 %	47 %	37 %

Zdroj: Abecia et al. 2016

4 Závěr

Umělá inseminace u malých přežvýkavců je neustále se zlepšující biotechnologickou metodou. Stále je však poměrně málo rozšířená, i když v porovnání s předchozími roky se její využití v praxi rozšířilo, hlavně kvůli zlepšení kryokonzervace spermatu.

Je limitována mnoha faktory, z nichž hlavní je anatomie reprodukčního aparátu ovcí a koz, dalšími jsou například věk, frekvence odběru ejakulátu či roční období a teplota. Dalším limitujícím faktorem je nedostatek zkušených a proškolených techniků., Zároveň je ovlivněna i snižující se kvalitou spermií během kryokonzervace a skladování.

U malých přežvýkavců se používají různé metody inseminace v závislosti na druhu konzervace použitého semene. Laparoskopická intrauterinní metoda se používá při inseminaci zmrazeným a rozmrazeným spermatem, ale je zde mnoho vlivů, které mohou pozměnit či zhoršit procento zabřezávání jak během zmrazování, tak rozmrazování. Nejvyšší míra zabřezávání je při intracervikální inseminaci čerstvým spermatem ihned po odběru. To je ale znemožněno provádět většinou vzdáleností mezi místem odběru a bahníci. Variantou je tedy inseminace chlazeným spermatem, kde je ale třeba prozkoumat další možné varianty skladování a ředění tak, aby kvalita chlazeného ejakulátu byla i po 72 hodinách skladování efektivní.

Většina výzkumů se zaměřuje na přizpůsobení inseminačních pipet anatomické stavbě pohlavního aparátu ovcí a koz, což se ale zatím ukazuje jako nevhodné, v rámci meziplenné variability. Současně se mnohé výzkumy soustředí na zlepšení hodnocení spermatu pomocí různých metod a přístrojů (CASA, HOS, fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie). Jako nadějně se jeví kombinace CASA a průtokové cytometrie. Zejména speciální metody hodnocení (HOS, ROS, CASA) se jeví jako velmi rychlé a užitečné.

V neposlední řadě se vědci soustředí i na hormonální ovlivňování říje. Zatím není možnost jejich plného nahrazení jinými, pomocnými metodami (beranní efekt, ovlivňování světelného dne), jelikož jsou tyto pomocné metody nedostačující a je stále potřeba využívat hormonální ošetření ovcí i koz.

Většina výše zmíněných výzkumů byla vyzkoušena v laboratorních podmínkách se slibnými výsledky, ale i přes to je třeba se ještě zaměřit na zlepšení kryokonzervace spermatu berana a kozla, vzhledem k jejich odlišnému složení a vyzkoušet další možnosti kryokonzervačních prostředků. Dále je důležité optimalizovat laparoskopickou inseminaci u ovcí a koz tak, aby se zvýšilo procento zabřezávání a dala se použít i v polních podmínkách bez potřeby veterinárního lékaře a tím snížit potřebné náklady a časovou náročnost.

5 Literatura

Abecia, J. A., Forcada, F., González-Bulnes, A. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 130 (3-4), 173-179.

Abecia, J. A., Arrébola, F., Macías, A., Lavina, A., González-Casquet, O., Benítez, F., Palacios, C. 2016. Temperature and rainfall are related to fertility rate after spring artificial insemination in small ruminants. *International Journal of Biometeorology*. 60(10), 1603-1609.

Alcay, S., Ustuner, B., Nur, Z. 2016. Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. *Small Ruminant Research*. 136, 59-64.

Allai, L., Benmoula, A., da Maia, M. S., Nasser, B., Amiri, B. E. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*. 192, 6-17.

Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., Anel, L. 2019. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 54 Suppl 4, 32-40.

Amiridis, G. S., Cseh, S. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 130(3-4), 152-161.

Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., de la Fuente, L. F., de Paz, P. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology*. 63(4), 1235-1247.

Ari, U., Yildiz, S., Öztürkler, Y. 2017. Intrauterine artificial insemination techniques in small ruminants: transcervical and laparoscopic artificial insemination.

Ashrafi, I., Kohram, H., Bahreini, M., Mirzakhani, H. 2011. Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes* [online]. 4(1), 547-552. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-4-547.

Axmann, R., Sedlák, J., 2008. *Základy veterinární péče o ovce a kozy pro chovatele. Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR*. Brno. 52 s. ISBN 978-80-904140-5-1.

Bartlewski, P. M., Candappa, I. B. R. 2015. Assessing the usefulness of prostaglandin E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. *Theriogenology*. 84(9), 1594-1602.

Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., Waberski, D. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* 85(9), 1507-1527.

Bucek, P., Kvapilík, J., Kölbl, M., Milerski, M., Pindák, A., Mareš, V., Konrád, R., Roubalová, M., Škaryd, V. *Ročenka chovu ovcí a koz v České republice za rok 2013*. Praha, 2014

Bucek, P., Syrůček, J., Milerski, M., Mareš, V., Konrád, R., Škaryd, V., Rucki, J., Hakl, P. Ročenka chovu ovcí a koz v České republice za rok 2019. Praha, 2020.

Candappa, I. B. R., Bartlewski P. M. 2011. A Review of Advances in Artificial Insemination (AI) and Embryo Transfer (ET) in Sheep, with the Special Reference to Hormonal Induction of Cervical Dilation and its Implications for Controlled Animal Reproduction and Surgical Techniques. *The Open Reproductive Science Journal*. 3(1), 162-175

Casali, R., Pinczak, A., Cuadro, F., Guillen-Muñoz, J. M., Mezzalana, A., Menchaca, A., 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*. 103, 30-35.

Cibulka, J., a kol, 2004. *Základy fyziologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-1247-0.

Cordelli, E., Patrizia, E., Leter, G., Rescia, M., Spanó, M. 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*. 72(4), 273-279

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

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

Dávila F. S., de González, A. S. B., Barragán, H. B. 2018. *Reproduction in Goats*. Goat Science. InTech, 2018-06-20.

Dobson H., Fergani C., Routly, J. E., Smith R. F. 2012. Effects of stress on reproduction in ewes. *Animal Reproduction Science*. 130(3-4), 135-140.

Dolník, M., Mudroňová, D., Pošivák, J., Lazar, G., Mudroň, P. 2019. Flow cytometry in assessment of sperm integrity and functionality – a review. *Acta Veterinaria Brno*. Brno, 88, 169-175.

Evans, G., 1988. Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. *Australian Journal of Biological Sciences*. 41, 103-116.

Evenson, D. P., 2016. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*. 169, 56-75.

Faigl, V., Vass, N., Jávora, A., Kulcsár-Huszenicza, M., Solti, L., Amiridis, G. S., Cseh, S. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta veterinaria Hungarica* 60:115– 29.

Farooq, T. J., 2009. Effect of seasonal variation on physical and biochemical properties of local hamdni rams semen in erbil region. *Mesopotamia Journal of Agriculture*. 37(1), 12-18.

Fatet, A., Pellicer-Rubio, M., Leboeuf, B. 2011. Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*. 124(3), 211-219.

Feranti, J. P. S., Brun, M. V., Zanella, E., Messina, S. A., Schuh, R., Santos, F. R., Brambatti G., 2013. Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação intrauterina laparoscópica em ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65(3), 687-693.

Fierro, S., Olivera-Muzate, J. 2017. Long interval prostaglandin as an alternative topogesterone-eCG based protocols for timed AI in sheep. *Animal Reproduction Science*. 180, 78-84.

Filipčnick, R., Pešan, V. 2020. Přirozená plemenitba a inseminace u ovcí. Výzkum. Mendelova univerzita v Brně.

Foote, R. H., 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 80, 1-10.

Gamčík, P., Kozumplík, J., a et al., 1992. *Andrológia a umela inseminácia hospodárskych zvierat*. Bratislava: Príroda. ISBN 80-07-00540-4.

Gibbons, A. E., Fernandez J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., Cueto, M. I. 2019. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*. 16(4), 803-809

Gordon, I., 2017. *Reproductive technologies in farm animals*. Dublin, s. 57-86. ISBN 9781780646022.

Hossain, M. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., Rodriguez-Martinez, H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian journal of andrology* 13(3), 406-19.

Igbokwe, A. A., Iyasere, O. S., Sobayo, R. A., Iyasere, S., Animashaun, R. I., Balogun, F. A., Aganran, Z. O., Fasola, M. O., Adedokun, A. D., et al. 2019. Comparative effect of slow and rapid freezing on sperm functional attributes and oxidative stress parameters of goat spermatozoa cryopreserved with tiger nut milk extender. *Reproduction in Domestic Animals*. 54(3), 551-559.

Jha, P. K., Md Alam, G. S., Md Mansur, A. A., Md Islam, T., Bari, F. Y. 2018. Selection of breeding rams by evaluating semen quality. *Journal of Applied Animal Science*. 11(1), 9-20.

Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., Garde, J. J. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 167, 103-108

- Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*. 44(2), 153-158.
- Kaya, A., Birle, S., Enwall, L., Memili, E. 2014. Determinants of Sperm Morphology. Sathe, S a C.F. Shipley. *Animal andrology: theories and applications*. USA, s. 34-56. ISBN 9781780643168.
- Korkmaz, F., ÇİL, B. 2020. Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 15(1), 76-83.
- Kubíček, V. 2010. Spermatologické vyšetření. *Urologie pro Praxi*. 11(4), 204-210.
- Kulovaná, E. 2002. Biotechnické metody v reprodukci ovcí a koz. *Náš chov*. Dostupné z: <https://www.naschov.cz/biotechnicke-metody-v-reprodukcii-ovci-a-koz/>
- Kulovaná, E. 2002. Inseminace – nositelka šlechtitelského pokroku v chovu hospodářských zvířat. *Náš chov*. Dostupné z: <https://www.naschov.cz/inseminace-nositelka-slechtitelskeho-pokroku-v-chovu-hospodarskych-zvirat/>
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62(1), 113-141.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2003. Production and storage of goat semen for artificial insemination / Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. *Productions Animales (France)*. 16(2), 91-99.
- Lorton, S. P. 2014. Evaluation of Semen in the Andrology Laboratory. Pages 100-143 in Sathe, S., C.F. Shipley. *Animal andrology: theories and applications*.
- Louda, F., Čerovský J., Ježková A., Stádník L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Praha: ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE. ISBN 80-213-0702-1.
- Louda, F., Hegediišová, Z. 2009. Inseminace ovcí-Intenzifikační faktor šlechtitelské práce. *Rapotín: Agrovýzkum Rapotín*. ISBN 978-80-871 44-09.
- Lukusa, K., Kabuba, J. 2020. Semen collection methods and cooling rates affect post-thaw sperm motility and kinematic parameters of Saanen goat. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 9(5), 239-246.
- 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(s2), 67-78.
- Marvan, F., 1992. *Morfologie hospodářských zvířat*. 4621. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0226-0.

Mert, H., Karakus, K., Yilmaz, A., Aygun, T., Mert, N., Apaydin, B., Seyhan, E. 2009. Effects of Genotype on Testis, Semen Quality, and Mineral Composition of Semen in Various Ram Breeds. *Biological Trace Element Research*. 132(1-3), 93-102.

Microptic S.L. 2021. SCA® Morphology. Dostupné z: <https://www.micropticsl.com/products/sperm-class-analyzer-casa-system/main-modules/sca-morphology/>

Microptic S.L. 2021. SCA® Motility and concentration. Dostupné z: <https://www.micropticsl.com/products/sperm-class-analyzer-casa-system/analysis-modules-vet/sca-motility-and-concentration-for-veterinary/>

Muratori, M., Forti, G., Baldi, E. 2008. Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytometry. Part A*. 73(9), 785-787.

Nakafeero, A., Hassen, A., Lehloenya, K. C. 2020. Investigation of ram effect and eCG usage in progesterone based oestrous synchronization protocols on fertility of ewes following fixed time artificial insemination. *Small Ruminant Research*. 183.

Nallea, W. M. M., ARIFANTINI, R. I. 2014. THE HYPO-OSMOTIC SWELLING TEST IN FRESH GARUT RAM SPERMATOZOA. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 38(4), 212-216.

Nordstoga, A., Söderquist, L., Ådnoy, T., Paulenz, H. 2009. Effect of Different Packages and Freezing/Thawing Protocols on Fertility of Ram Semen. *Reproduction in domestic animals*. 44(3), 527-531.

Notter, D. R., 2012. Genetic improvement of reproductive efficiency of sheep and goats. *Animal Reproduction Science*. 130(3-4), 147-151.

Ntemka, A., Tsakmakidis, I., Kioussis, E., Milovanovič, A., Boscós, C. 2018. Current status and advances in ram semen cryopreservation. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(2), 911-924.

O'hara, L., Hanrahan J. P., Richardson L., Donovan A., Fair S., Evans A. C. O. a Lonergan P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*. 2010, 73(4), 541-549

Pereira, D., Geraldo, A., David, C., Quirino, C., Campos, F., Viana, C., Nichi, M., Parren, G., Bozzi, A., Beltrame, R., Costa, R. 2019. Effect of sheep diets with macadamia by-product and protected fat on the quality of fresh and frozen semen. *Boletim de Indústria Animal*. 76, 1-12.

Bajuka, B. P., Pihlar T., Pogačnik N., Klinc P. 2018. Dialysis of the goat semen and its effect on the quality of frozen/ thawed spermatozoa processed in the presence of egg yolk. *Animal Reproduction Science*. 198, 65-73.

- Poh, J., Wu, W., Goh, N. W., Tan, S. M., Gan, S. K. 2021. Spectrophotometer on-the-go: The development of a 2-in-1 UV-Vis portable Arduino-based spectrophotometer. *Sensors and Actuators: A. Physical* 325.
- Purdy, P. H., Spiller, S. F., Mcguire, E., Mcguire, K., Koepke, K., Lake, S., Blackburn, H. D. 2020. Critical factors for non-surgical artificial insemination in sheep. *Small Ruminant Research*. 191.
- Rather, H. A., Islam, R., Malik, A. A., Lone, F. A. 2016. Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4 °C. *Small Ruminant Research*. 141, 24-28.
- Richardson, L., Hanrahan, J. P., Donovan, A., Martí, J. I., Fair, S., Evans, A. C. O., Lonergan, P. 2012. Effect of site of deposition on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science*. 131(3-4), 160-164.
- Rodriguez-Martinez, H. 2014. Semen Evaluation and Handling: Emerging Techniques and Future Development. Pages 509 – 549 in Sathe, S., Shipley, C. F. *Animal andrology: theories and applications USA*. ISBN 9781780643168.
- Roof, D. J., Bowley, S., Price, L. L., Matsas, D. J. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*. 77(2), 412-420.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Scienc. Sydney*, (37), 185-249.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62. Sydney, s. 77-111.
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D. 2014. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*. (10). ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top071795
- Sathe, S., Shipley, C. F. 2014. *Animal andrology: theories and applications*. USA. ISBN 9781780643168.
- Setchell, B. P. 2014. Semen and its Constituents. Pages 3-10 in Sathe, S., Shipley, C. F. *Animal andrology: theories and applications*. USA. ISBN 9781780643168.
- Tejedor, M. T., Monteagudo, L. V., Laviña, A., Macías, A. 2016. Factores ambientales que influyen en el éxito de la inseminación artificial en la raza ovina Rasa Aragonesa. *Archivos de Zootecnia*. 65(251), 321-325.
- Vaněk D., 2002. *Chov skotu a ovcí: (přednášky pro Bc)*. Praha: Česká zemědělská univerzita. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-866-4211-9.

Vrisman, D. P., Choaire, E., Strucher, F., Oliveira, M. S., Ribas, T. M. B., Coutinho, L. N., Mariano, R. S. G., Oliveira, M. G., Vicente, W. R. R. et al. 2014. Laparoscopy of the genitourinary tract of small ruminants. *Animal Reproduction*. 11(4), 511-516.

Hashem, E. Z., Haddad, R., Eslami, M. 2017. Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Ruminant Research*. 150, 30-39.

Zhu, W., Cheng, X., Ren, Ch., CHen, J., Zhang, Y., Chen, Y., Jia, X., Wang, S., Sun, Z., et al. 2020. Proteomic characterization and comparison of ram (*Ovis aries*) and buck (*Capra hircus*) spermatozoa proteome using a data independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) approach. *PLOS ONE*. 15(2).

6 Seznam použitých zkratek a symbolů

AI	umělá inseminace
ČR	Česká republika
cca	přibližně, v latině se píše jako circa
PMSG	koňský sériový gonadotropin
ČSÚ	Český statistický úřad
CASA	Computer Aided Sperm Analysis
EE	Elektroejakulace
DIC	Differential interference contrast microscopy
tj.	to je
tzv.	takzvaný
LED	Light-Emitting Diode
CFDA	Karboxyfluorescein diacetát
FCM	flow cytometry
PSA	Pisum sativum aglotinin
PNA	Arachis hypogaea aglotinin
WHO	World Health Organization
HOS	Hypoosmotic swelling test
ROS	Reactive oxygen species
dUTP	deoxyuridin trifosfát
TUNEL	Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labelling
PBS	Phosphate Buffered Saline
Tris	trisaminomethanu
BUS	Bulbouretrální žláza
CIDR	Controlled internal drug release
BCS	Body Condition Score
AIV	Umělá inseminace vaginální
AIL	Umělá inseminace laparoskopická
THI	temperature humidity index
3D	trojdimenzionální