

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

**K a t e d r a c h o v u h o s p o d á ř s k ý c h
z v í ř a t**

**Kryokonzervace ejakulátu býků v různých objemech a oplozovací
schopnost spermií po rozmrazení**

Doktorská dizertační práce

Doktorand: Ing. Zuzana Biniová
Školitel: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

Praha 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou dizertační práci na téma „**Kryokonzervace ejakulátu býků v různých objemech a oplozovací schopnost spermií po rozmrazení**“ vypracovala samostatně a použila jsem pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 7. srpna 2019

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří přispěli k tomu, že tato práce vznikla. Především bych ráda poděkovala svému vedoucímu disertační práce doc. Ing. Ludku Stádníkovi, Ph.D. za cenné rady, metodické vedení a věcné i metodické připomínky. Velký dík samozřejmě patří vedení firmy Natural s.r.o., konkrétně ing. Janu Štráfeldovi CSc. a ing. Haně Štráfeldové, za umožnění realizace experimentů. Rovněž bych ráda poděkovala své kolegyni z firmy Natural Heleně Přeučilové, a kolegům z Katery chovu hospodářských zvířat ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph.D. a ing. Martině Stádníkové, Ph.D. za pomoc při jejich realizaci.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD..... | 1 |
| 2 | HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE..... | 2 |
| 3 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 3 |
| 3.1 | EJAKULÁT BÝKŮ..... | 3 |
| 3.1.1 | Semenná plasma..... | 3 |
| 3.1.2 | Stavba spermie | 4 |
| 3.2 | METODY HODNOCENÍ EJAKULÁTU..... | 6 |
| 3.2.1 | Organoleptické hodnocení..... | 6 |
| 3.2.2 | Stanovení objemu spermatu | 6 |
| 3.2.3 | Stanovení hustoty spermatu (koncentrace)..... | 6 |
| 3.2.4 | Hodnocení aktivity ejakulátu..... | 8 |
| 3.2.5 | Víceúrovňové metody analýzy spermatu..... | 9 |
| 3.2.6 | Funkční testy spermií | 11 |
| 3.2.7 | Morfologická stavba spermií a jejich hodnocení..... | 12 |
| 3.2.8 | Hodnocení životaschopnosti ejakulátu – biologické testy | 13 |
| 3.3 | FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KVALITU A MNOŽSTVÍ EJAKULÁTU BÝKŮ | 15 |
| 3.3.1 | Faktory vnitřní | 15 |
| 3.3.2 | Faktory vnější | 16 |
| 3.4 | VLIV ZPRACOVÁNÍ SPERMATU NA ÚSPĚŠNOST KRYOKONZERVACE | 17 |
| 3.4.1 | Ředění spermatu | 18 |
| 3.4.2 | Chlazení spermatu | 22 |
| 3.4.3 | Ekvibrace spermatu | 23 |
| 3.4.4 | Mrazení spermatu | 24 |
| 3.4.5 | Rozmrazování..... | 29 |
| 4 | MATERIÁL A METODIKA..... | 31 |
| 4.1 | METODICKÝ OKRUH 1 – ROZMRAZOVÁNÍ VELKÝCH OBJEMŮ | 31 |
| 4.1.1 | Hodnocení kvality čerstvého ejakulátu..... | 31 |
| 4.1.2 | Zpracování spermatu a výroba vzorků | 32 |
| 4.1.3 | Metody rozmrazování..... | 33 |
| 4.1.4 | Hodnocení vzorků | 33 |
| 4.1.5 | Statistická analýza | 34 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.2 | METODICKÝ OKRUH 2 – POROVNÁNÍ MRAZITELNOSTI V RŮZNĚ VELKÝCH OBJEMECH | 35 |
| 4.2.1 | Hodnocení kvality čerstvého ejakulátu..... | 35 |
| 4.2.2 | Zpracování spermatu a výroba vzorků | 36 |
| 4.2.3 | Hodnocení vzorků | 36 |
| 4.2.4 | Statistická analýza | 37 |
| 5 | VÝSLEDKY | 41 |
| 5.1 | METODICKÝ OKRUH 1 - ROZMRAZOVÁNÍ VELKÝCH OBJEMŮ | 41 |
| 5.1.1 | Rozmrazování vzorků o objemu 4 ml..... | 41 |
| 5.1.2 | Rozmrazování vzorků o objemu 8 ml..... | 43 |
| 5.1.3 | Rozmrazování vzorků o objemu 12 ml..... | 45 |
| 5.2 | METODICKÝ OKRUH 2 - POROVNÁNÍ MRAZITELNOSTI V RŮZNĚ VELKÝCH OBJEMECH | 48 |
| 5.2.1 | Fáze 1 - Hodnocení velkých objemů | 48 |
| 5.2.2 | Fáze 2 – Hodnocení kvality inseminačních dávek vyrobených metodou DF | 58 |
| 6 | DISKUZE | 75 |
| 6.1 | METODICKÝ OKRUH 1 – ROZMRAZOVÁNÍ VELKÝCH OBJEMŮ | 75 |
| 6.2 | METODICKÝ OKRUH 2 | 78 |
| 6.2.1 | Hodnocení mrazitelnosti spermatu býků ve velkých objemech | 78 |
| 6.2.2 | Hodnocení kvality inseminačních dávek vyrobených metodou DF | 80 |
| 7 | ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI..... | 85 |
| 8 | POUŽITÉ LITERÁRNÍ ZDROJE:..... | 87 |
| 9 | PŘÍLOHY | 105 |
| 9.1 | Příloha č. 1: Parametry kinetiky spermií..... | 105 |
| 9.2 | Příloha č.2: Klasifikace spermií dle závažnosti jejich výskytu | 106 |
| 9.3 | Příloha 3: Výsledky mrazitelnosti dle býků a objemů po prvním rozmrazení | 107 |

1 ÚVOD

Umělá inseminace a kryokonzervace spermatu se staly prvními významnými biotechnologickými metodami v oblasti reprodukce. V zemědělství jsou významné zejména pro zvyšování kvality genetického založení hospodářských zvířat a pro konzervaci genetických zdrojů.

Je nezbytné si uvědomit, že umělá inseminace mrazeným spermatem se používá zejména ve stádech dojeného skotu. Zde je žádoucím produktem jalovička narozená po kvalitním býkovi, která bude sloužit buď pro obnovu stáda nebo k prodeji za účelem dalšího chovu. Proto byla v návaznosti na kroykonzervaci a umělou inseminaci vyvinuta metoda sexace spermatu. Vzhledem k tomu, že úroveň zabřezávání zejména dojených krav je obecně nízká a vyprodukované jalovice často nepokryjí ani potřebu obnovy stáda, využívají chovatelé sexované inseminační dávky zejména k zajištění vyššího počtu jalovic.

V praxi se setkáváme s řadou kvalitních býků prověřených na potomstvu, u kterých sexované inseminační dávky nebudou nikdy dostupné. Převoz býků na jinou stanici je totiž sám o sobě nákladnou záležitostí s rizikem ztráty býka v důsledku jeho poranění. Na sexaci navíc reagují spermie býků různým způsobem, kdy sperma některých býků je pro tuto metodu nevhodné. Podstoupení takového rizika je pro většinu inseminačních stanic nepřijatelné i při vidině dosažení vyšších zisků z prodeje sexovaných dávek a možnosti vstupu na nové trhy.

Eliminace těchto rizik by byla možná v případě rozvoje metody dvojího mrazení (Double Freezing; DF). Metoda představuje zmrazení spermatu býků ve velkém objemu, rozmrazení, sexaci a následně opětovné zmrazení v pejetách. Zavedení DF do praxe inseminačních stanic by snížilo náklady na sexaci spermatu, rozšířilo nabídku sexovaných inseminačních dávek a eliminovalo rizika spojená s přepravou býků.

V oblasti DF i v mrazení spermatu ve velkých objemech již byly ve světě provedeny první pokusy. Jejich výsledky naznačují, že propracování a rozvoj této metody jsou možné.

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

HYPOTÉZY

Lze předpokládat, že

- o rozdílné postupy rozmrazení ejakulátů býků mrazených v různě velkých objemech (4, 8 a 12 ml) ovlivní kvalitativní parametry ejakulátu po rozmrazení,*
- o odlišný objem konzervovaného spermatu (4, 8 a 12 ml) různým způsobem ovlivní kvalitativní ukazatele inseminační dávky po prvním rozmrazení i po opakovaném zmrazení metodou DF a opětovném rozmrazení.*

CÍLEM PRÁCE JE VYHODNOTIT VLIV:

- o Různých metod rozmrazení na kvalitativní parametry spermatu mrazeného ve velkých objemech (4, 8 a 12 ml).*
- o Objemu ejakulátu při prvním mrazení (4, 8 a 12 ml) na kvalitativní ukazatele spermatu po rozmrazení a na kvalitativní ukazatele inseminačních dávek vyprodukovaných metodou DF, tedy dvojitým mrazením.*

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 EJAKULÁT BÝKŮ

Ejakulát býků je tvořen spermii vznikajícími v semenotvorných kanálcích varlat a semennou plazmu, tvořenou směsí sekretů z varlat, nadvarlat a přídatných pohlavních žláz. Proces vývoje spermií se nazývá spermatogeneze a u býků trvá 65 dnů.

3.1.1 Semenná plazma

Semenná plazma vzniká v přídatných pohlavních žlázách a tvoří více než polovinu celkového objemu ejakulátu (Senger, 2003). V samičím pohlavním ústrojí vytváří vhodné prostředí pro přežití spermií (Reece, 2009, Rego et al., 2014). Dále hraje aktivní roli při transportu spermií v reprodukčním ústrojí samic (Troedsson et al., 2005; Rego, 2014), chrání je proti nepříznivým vlivům, zajišťuje jejich výživu a v neposlední řadě tvoří objemovou složku ejakulátu (Rego, 2014). Je bohatá na elektrolyty, fruktózu, glukózu, kyselinu citrónovou, proteiny, lipidy, fosfolipidy, cholesterol, Na, K, Ca, P, Cl, Mg, Zn, testosteron, estrogeny ALP (alkalické fosfatázy), ALT (alanin aminotransferázy), AST (asparát aminotransferázy) a LDH (laktát dehydrogenasa) a vitamíny (Juyena et Stelletta, 2012).

Komponenty semenné plasmy jsou nezbytné pro správné funkce spermií, jako jsou oplození a vývoj embrya (Juyena et Stelletta, 2012). Jedním z prvotních poznatků o funkcích semenné plasmy bylo zjištění, že snížený obsah fruktózy v semenné plasmě negativně ovlivňuje aktivitu spermií při prodloužené inkubaci (Poulos et White, 1973). Semenná plazma býků obsahuje protein, který zabraňuje nebo opoždí akumulaci extracelulárního vápníku ejakulovanými spermii a tím i zabraňuje předčasné kapacitaci spermií (Rufo et al., 1982). Dále byl prokázán vliv obsahu alfa glukosidázy a kyseliny citrónové na pH spermatu, které je významné z hlediska úpravy pH v reprodukčním traktu plemence (Said et al., 2009). Spermie býků, které byly vystaveny vlivu semenné plasmy obsahují více vazných míst pro heparin než spermie získané z nadvarlete. To je významné z hlediska aktivace akrozómové reakce při setkání se zonou pellucidou vajíčka (Miller et al., 1990). U jednotlivých živočišných druhů se složení semenné plasmy liší (Reece, 2009).

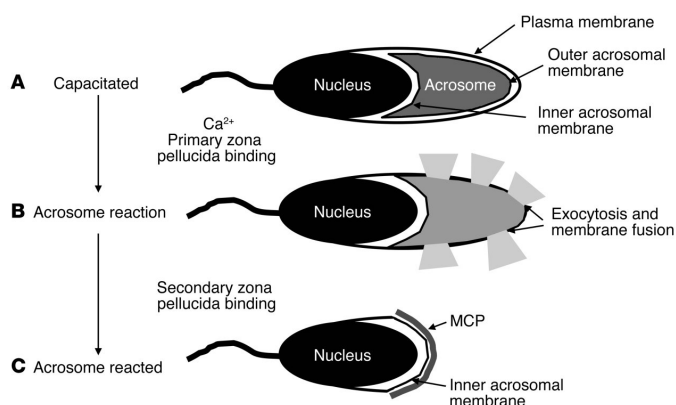
Odstranění semenné plasmy, ke kterému dochází zejména při sexaci spermatu, může být příčinou změny elektrických nábojů spermií. Důsledkem je nežádoucí jev nazývaný aglutinace spermií, při kterém můžeme v ejakulátu pozorovat shluky spermií, jejichž hlavičky se vzájemně dotýkají (Maxwell et Johnson, 1999).

3.1.2 Stavba spermie

Spermie jsou vysoce diferenciované haploidní buňky, které obsahují kondenzovaný chromatin a mají velmi limitované schopnosti biosyntézy a buněčných oprav. Skládají se z hlavičky, spojovací (střední) části a bičíku. Každá z těchto částí hraje důležitou roli při oplození vajíčka.

V hlavičce jsou uloženy dvě zásadní struktury a to jádro a akrozóm (Toshimori et Ito, 2003). V jádru jsou uloženy chromozómy (DNA), které se v průběhu spermiogeneze kondenzují směrem do zadní části hlavičky (Dooher et Bennett, 2005). DNA spermie je zabalena kolem většiny protaminů a některých histonů uvnitř hlavičky spermie. Tato struktura je nezbytná pro funkci spermie během průchodu skrz samičí pohlavní trakt a pro následné oplodnění (Parisi et al., 2014). Samotné jádro je kryto jadernými obaly. Mezi nimi a plasmatickou membránou byly nalezeny různé molekuly, které mají pravděpodobně funkce důležité pro oplozovací schopnost spermií. Akrozóm uložený na přední části hlavičky je kryt vnější a vnitřní akrozomální membránou a pokrývá přední část hlavičky. Jeho velikost v poměru k velikosti hlavičky se různí mezi jednotlivými druhy savců (Toshimori et Ito, 2003). Akrozóm vzniká v průběhu spermatogeneze z Golgiho aparátu, kde je rovněž syntetizován jeho obsah. Obsahuje proteolytické enzymy důležité pro oplození vajíčka (Amann et Graham, 1993). Nejvýznamnějšími z nich jsou akrosin a hyaluronidáza, mezi jejichž hlavní funkce patří rozptýlení *cumulus oophorus* a narušení *zona pellucida* vajíčka (Arthur et al., 1998). V akrozómu se rovněž nachází indofenoxidáza – enzym dýchání důležitý pro látkovou výměnu a dýchání spermií (Gamčík et al., 1984). Proces uvolnění obsahu akrozómu a ztráty plasmatické membrány vnějšího akrozómu se nazývá akrozómová reakce. Dochází k ní po kapacitaci spermií (Cross et Meizel, 1989; Riley-Vargas et al., 2005). Následně spermie získává schopnost penetrovat *zonu pellucidu* a spojit se s vajíčkem (Riley-Vargas et al., 2005).

Obrázek 1: Postup aktivace akrozómové reakce (Riley-Vargas et al., 2005).



Krček spojuje hlavičku s bičíkem a někteří autoři ho řadí mezi části bičíku (Jelínek et Koudela, 2003). Hlavička je s krčkem spojená proximální centriolou, která je pevně spojená s distální centriolou. Ta tvoří střed krčku a připojuje dvě vlákna (mikrotubuly), která probíhají bičíkem. Kolem mikrotubulů se nachází prstenec devíti vláken, které jsou nezbytné pro pohyb spermii. Celý komplex je obklopen mitochondriemi (Etches, 1996), které zásobují spermie energií ve formě ATP (Etches, 1996; Fang et al., 2014). Hlavní funkcí bičíku je zajištění pohybu spermie

Celá spermie je kryta cytoplasmatickou membránou zajišťující její ochranu. Integrita cytoplasmatické membrány je podmínkou pro optimální funkce spermii (Khan et Ijaz, 2007) a znalosti o její stavbě a termodynamických procesech v ní jsou nezbytné pro vysvětlení poruch chladového šoku spermii a poruch vznikajících v důsledku mrazení. Oproti jiným buňkám obsahuje nezvykle vysoké množství lipidů (Holt, 2000), přičemž převažují fosfolipidy a cholesterol (Hofírek et al., 2009).

Cholesterol ovlivňuje buněčné membrány několika mechanismy včetně její stabilizace a snížení propustnosti (Crockett, 1998). Fosfolipidy představují 65 – 70 % všech lipidů (Holt, 2000). V cytoplasmatické membráně vytvářejí dvojvrstvu rozdělenou nepolárním prostorem působícím jako bariéra, která zabraňuje průchodu ve vodě rozpustných molekul (Amann et Graham, 1993). Velké množství fosfolipidů obsahuje postranní řetězce docosahexaenové kyseliny, která pravděpodobně propůjčuje membráně její tekutost a labilitu. Proti těmto destabilizujícím efektům naopak působí steroly, které jsou v membráně obsaženy v různých množstvích (Holt, 2000).

Cytoplasmatická membrána je uspořádána do různých oblastí, ve kterých se při fyziologické teplotě vyskytují tekuté a gelové fáze lipidů. Lipidy plasmatické membrány však reagují na změny teploty změnou jejich fyzikálního skupenství. Při snížení teploty se tekuté skupenství lipidů mění na gelové a předpokládá se, že přítomnost sterolů inhibuje tyto fázové změny (Holt, 2000), kdy významnou roli hraje rovněž poměr cholesterolu a fosfolipidů v cytoplasmatické membráně (Watson, 1981).

Různé oblasti cytoplasmatické membrány navíc mají typická složení proteinů a lipidů, která jsou nezbytná během různých fází oplodnění (Hammerstedt et al., 1990).

3.2 METODY HODNOCENÍ EJAKULÁTU

Laboratorní kontrola je důležitým předpokladem pro používání plnohodnotných ejakulátů pro další zpracování. Hlavním cílem je posoudit kvalitu ejakulátu ve vztahu k vhodnosti pro inseminaci (Kocks et Broekhuijse, 2014), respektive vyhodnotit potenciální plodnost samce (Věžník et al., 2004). Jednotlivé metody hodnocení ejakulátu jsou v různých korelacích k oplozovací schopnosti spermií, respektive k plodnosti pleménika (Linford et al, 1976; Baltisen, 2007), přičemž nejvyšší korelace k plodnosti býka vyjádřené počtem nepřeběhlých plemenic (NRR - Non Return Rate) byly zjištěny pro porušení celistvosti akrozómu (-0,59), defekty v koncové části bičíku (-0,59) a pro podíl spermií s přímočarým pohybem (0,53) (Baltisen, 2007).

Je všeobecně známo, že během procesu výroby inseminačních dávek klesá aktivita spermií. Kvalita nativního ejakulátu je proto významná z hlediska výsledné kvality ejakulátu po rozmrazení (Fitzpatrick et al, 2002; Beran et al., 2011).

3.2.1 Organoleptické hodnocení

Prvním krokem při posouzení odebraného spermatu z hlediska vhodnosti ke zpracování je organoleptické posouzení, při kterém je hodnocena barva, přítomnost cizích příměsí a pach ejakulátu ve sběrači. Hodnocení je prováděno bezprostředně po odběru. Barva ejakulátu má vliv na aktivitu spermií po odběru, přičemž lépe byly hodnoceny ejakuláty barvy krémové, světle krémové, žluté, světle žluté a mléčné oproti ejakulátům barvy špinavě krémové, špinavě bílé a bílé (Kanchan, 2015).

Na přítomnost přímísenin v ejakulátu má vliv příprava býka na odběr, zejména pak jeho očištění, zastřížení chvostku a omytí předkožky (Gordon, 2004).

3.2.2 Stanovení objemu spermatu

Stanovení objemu spermatu je nezbytné pro výpočet objemu ředidla, kterým bude ejakulát naředěn. Objem je možno stanovit přímo odečtením hodnoty z kalibrovaného sběrače semene nebo zvážením na laboratorních vahách.

3.2.3 Stanovení hustoty spermatu (koncentrace)

Přesné stanovení hustoty spermatu je při výrobě inseminačních dávek nezbytné nejen pro kontrolu kvality ejakulátu, ale i pro přesné stanovení poměru ředění tak, aby vyrobené inseminační dávky obsahovaly požadované množství spermií (Donoghue et al., 1996). V

nativním ejakulátu býků se obvykle vyskytuje 300 – 2000 x10⁶/ml spermií (Siddique et al., 2011). Ke stanovení hustoty ejakulátu lze využít řadu metod.

3.2.3.1 Hemocytometrická metoda

Principem této metody je zjištění počtu spermií v přesně definovaných polích v Bürker-Türkově komůrce. Na základě poměru ředění vzorku, velikosti komůrky a množství vzorku napipetovaného do komůrky se po stanovení počtu spermií v přesně definovaných polích vypočte hustota spermatu. Hemocytometrická metoda je pro běžný provoz nevhodná z důvodu časové náročnosti a nezbytnosti několikerého opakování pro získání přesných výsledků. Variabilitu výsledků zjištěných touto metodou potvrdili Camus et al. (2011).

3.2.3.2 Spektrofotometrická analýza

Spektrofotometrická analýza byla první rutinně používanou metodou stanovení hustoty ejakulátu u většiny živočišných druhů. Takto získané výsledky však mohou být snadno zkresleny, například přítomností cytoplasmatických kapek, somatických buněk, tukových kapek v ejakulátu (Evenson et al., 1993). Jednou z nevýhod spektrofotometrického měření koncentrace spermií je i nutnost pravidelné recalibrace, která vyžaduje několikeré ověření pomocí časově náročné hemocytometrie. Spektrofotometry mají navíc limitované spektrum detekce a neumožňují přesné stanovení u velmi řídkých nebo naopak velmi hustých vzorků (Fenton et al., 1990).

V dnešní době jsou dostupné fotometry přímo kalibrované na měření hustoty spermatu různých druhů hospodářských zvířat. Při porovnání těchto zařízení určených k měření hustoty spermatu kanců nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly ve zjištěných výsledcích a byla zjištěna vysoká opakovatelnost měření (Camus et al., 2011).

3.2.3.3 Elektronická počítadla

Výsledky měření hustoty spermatu pomocí elektronických počítadel (Cell counter systems) mohou být zkresleny stejným způsobem jako výsledky získané spektrofotometricky (Evenson et al., 1993). Tyto systémy pracují na bázi analýzy snímků získaných pomocí integrovaného fluorescenčního mikroskopu (Hansen et al., 2002).

3.2.3.4 Další možnosti stanovení hustoty spermatu

K stanovení hustoty spermatu je dále možno využít počítačově asistovanou analýzu spermatu (CASA) a průtokovou cytometrii. Těmto systémům je věnována pozornost níže.

3.2.4 Hodnocení aktivity ejakulátu

Posouzení podílu normálních spermií s progresivním pohybem (aktivity) je nejčastěji používanou metodou hodnocení kvality ejakulátu od zavedení umělé inseminace až do dnes (Foote, 2002). Aktivita je považována za jeden z nejvýznamnějších ukazatelů kvality ejakulátu (Awad et al, 2011; Gloria, 2013) a to zejména pro její vliv na plodnost pleménika (Linford et al., 1976, Januskauskas et al., 2001; Januskauskas et al., 2003; Baltisen, 2007; Puglisi et al, 2012; Gloria et al., 2013).

Nicméně samotná aktivita a parametry kinetiky popsané Mortimerem (2000) nemohou být považovány samy o sobě za důvěryhodné znaky pro predikci oplozovací schopnosti ejakulátu. Nezbytným předpokladem pro zachování oplozovací schopnosti spermií po rozmrazení je zachování integrity a funkcí cytoplasmatické membrány (James et al., 1999). Dále je nutné, aby nedošlo k porušení funkcí enzymů zodpovědných za narušení *zona pellucida* vajíčka a fúzi s vajíčkem, a aby celkově správně fungoval chemismus cytoplasmatické membrány (Holt, 2000).

Přesnost korelací mezi sledovanými parametry ejakulátu a plodností býka je závislá na počtu pozorování a přesnosti použitých analýz (Rodriguez-Martinez, 2006). Korelace mezi motilitou a plodností se pohybují v rozmezí mezi 0,15 až 0,83 (Linford et al., 1976; Januskauskas et al., 2003; Baltisen, 2007). Nejvyšší korelace $r^2=0,83$ byla zjištěna mezi motilitou a funkčními vlastnostmi spermií (aktivita, integrita DNA a životaschopnost spermií) (Januskauskas et al., 2001). Střední korelace byly vypočteny pro vliv podílu spermií s přímočarým pohybem (0,40) a podílu spermií s celkovým pohybem (0,39) stanovené pomocí systému CASA na zabřezávání krav hodnocené pomocí testu nepřeběhlých plemenic (NRR – *Non-Return Rate*) (Baltisen, 2007).

3.2.4.1 Mikroskopické posouzení aktivity školeným technikem

Mikroskopické posouzení aktivity spermií vyškoleným technikem je nejběžněji používanou metodou hodnocení kvality ejakulátu. Výsledky hodnocení podílu aktivních spermií i podílu morfologicky normálních spermií se však mohou lišit v závislosti na subjektivní interpretaci jednotlivých techniků, které jsou dány kvalitou jejich proškolení a praxe (Auger et al., 2000; Toft et al., 2005; Walczak-Jedrzejowska et al., 2013), kdy při porovnání výsledků byla nově proškolenými techniky aktivita průkazně nadhodnocována

(Auger et al., 2000). Odhady se dále liší zejména v podílu spermií s rychlým přímočarým pohybem (dle WHO klasifikováno jako stupeň A) a s pomalým přímočarým pohybem (stupeň B) (Cooper et al., 2002). Při subjektivním hodnocení je velmi důležité provádět hodnocení ve středu krycího sklíčka, neboť na okraji sklíčka dochází k poškození spermií způsobené pravděpodobně tlakem krycího sklíčka na podklad (Lenz et al., 2010).

3.2.5 Víceúrovňové metody analýzy spermatu

Moderní zařízení pro analýzu kvality ejakulátu jsou schopna provést různé kombinace analýz z jednoho vzorku. Možnosti kombinace analýz vyplývají z technologického vybavení laboratoře.

3.2.5.1 Počítačově asistovaná analýza spermatu (CASA)

Zpřesnění metody posouzení aktivity spermií bylo dosaženo s vývojem počítačově asistované analýzy spermií (CASA, Computer-Assisted Sperm Analysis), při které jsou zjišťovány přesné informace o parametrech kinetiky spermií (Farrell et al., 1996, Mortimer, 2000, Šimoník, 2014). Přehled hodnocených parametrů kinetiky je uveden v příloze 1. Parametry kinetiky mají vztah k fyziologickému stavu spermií a jejich možné oplozovací schopnosti (Farrell et al., 1998; Kathiravan et al., 2011). Metoda umožňuje rovněž porovnání drobných rozdílů mezi samci a rozdílnými způsoby ošetření spermatu (Farrell et al., 1996, Versteegen et al., 2002).

Přesnost získaných výsledků je ovlivněna mnoha faktory (Farrell, 1998, Contri et al., 2010; Šimoník et al., 2014). Prvním z nich je poměr ředění, kdy u příliš hustých vzorků nelze zjistit přesné parametry kinetiky. Koncentrace spermií by neměla přesáhnout $30 - 50 \times 10^6/\text{ml}$ (Versteegen et al., 2002). Dle Contriho et al. (2010) by však koncentrace spermií neměla přesáhnout $20 \times 10^6/\text{ml}$. Tito autoři rovněž uvádí, že při koncentraci spermií $50 \times 10^6/\text{ml}$ se překrývají dráhy spermií a nemusí být detekovány všechny spermie přítomné ve vzorku, což zkresluje i analýzu koncentrace spermií.

Dalším faktorem ovlivňujícím věrohodnost údajů získaných pomocí CASA je délka analýzy, která by neměla překročit 5 minut. Při delším trvání klesá jak celkový počet aktivních spermií, tak i podíl spermií s přímočarým pohybem (Contri et al., 2010).

Analýzu vzorku rozmrazeného ejakulátu pak může ovlivnit složení ředidla. Obzvláště u žlutkových ředidel dochází ke zkreslení analýz koncentrace i aktivity v důsledku detekce

žloutkových granul (Moussa et al. 2002; Amirat et al., 2005). Parametry kinetiky bývají často ovlivněny i viskozitou ředidla (Rijsselaere et al. 2003).

Výsledky mohou být rovněž ovlivněny hloubkou komůrky, do které se umisťuje vzorek (Broekhuijse et al., 2011) a typem použité komůrky (Lenz et al, 2010; Gloria et al., 2013). Zásadní vliv na kvalitu provedení analýzy pak má lidský faktor, který ji může ovlivnit mnoha způsoby.

I přes řadu vlivů působících na přesnost hodnocení pomocí CASA potvrzují Farrell et al. (1998), že tato metoda nabízí vyšší opakovatelnost výsledků ve srovnání se subjektivním hodnocením. Stejný tým našel významné rozdíly mezi hodnotami získanými pomocí CASA a subjektivního hodnocení.

Systém CASA se rovněž rutinně používá i ke stanovení hustoty spermatu. Nezbytným předpokladem pro získání přesných výsledků je precizní příprava a promísení vzorku spermatu s ředícím médiem a použití kalibrované komůrky. Následně software CASA propočítá i počet spermií v zorném poli a dle velikosti komůrky a poměru ředění vypočítá koncentraci spermií v ml. U některých systémů je možná korekce záznamů, např. odznačení nečistot a označení počítačem neoznačených spermií (systém SCA, Mikrooptic, Španělsko), u jiných tato korekce možná není (AndroVision, Mintüb, Německo). Ve srovnání s fotometrickou metodou stanovení hustoty ejakulátu se zjištěné hodnoty výrazně liší, přičemž nabízí CASA vyšší opakovatelnost výsledků (Farrell et al., 1998).

CASA může být dále, v kombinaci s fluorescenčním mikroskopem a při vybavení patřičným softwarem, využita i ke stanovení funkčních vlastností spermií (např. celistvost buněčných membrán, celistvost akrozómu, mitochondriální aktivita, celistvost DNA a dalších). Ve srovnání s průtokovou cytometrií je její využití výhodnější z hlediska možné vizuální kontroly hodnocených polí/spermií (např. kvalita obarvení spermií).

Systémy CASA dnes tvoří neodmyslitelnou část většiny vědeckých reprodukčních laboratoří a začínají se rutinně využívat i na inseminačních stanicích a v dalších andrologických laboratořích.

3.2.5.2 Průtoková cytometrie (Flow-cytometry)

Další metodou využívanou při hodnocení koncentrace spermií a funkčních vlastností spermií je průtoková cytometrie. Principem metody je průchod jednotlivých spermií přes světelný paprsek, při kterém je zaznamenán počet jeho přerušení a fluorescence související se spermiemi (Anzar et al., 2009).

Díky barvení živých, oslabených a mrtvých spermií je možné i přesné stanovení koncentrace spermií a jejich odlišení od nečistot (Hansen et al., 2002; Petrunkina et al., 2010). Výhodou je i vyšší porovnatelnost výsledků ve srovnání s hemocytometrickým (Hansen, et al., 2002; Anzar et al., 2009; Christensen et al., 2013); respektive spektrofotometrickým měřením (Christensen et al., 2013). V práci Anzara et al. (2009) se naopak výsledky zjištěné flow-cytometricky nelišily od výsledků získaných pomocí elektronického počítadla.

Pomocí průtokové cytometrie je možno analyzovat tisíce spermií za méně než 1 minutu (Evenson et al., 1982, Anzar et al., 2009). Nevýhodou flow-cytometrie je nemožnost stanovení motility a parametrů pohybu spermií.

3.2.6 Funkční testy spermií

Funkční testy spermií se provádí pomocí fluorescenčních barviv, která mají různou afinitu k různým strukturám spermií. Hodnocení se mohou provádět analýzou obrazu za použití mikroskopu vybaveného příslušnými filtry, pomocí systémů CASA v kombinaci s mikroskopem vybaveného příslušnými filtry a samozřejmě i pomocí průtokové cytometrie.

3.2.6.1 Celistvost cytoplasmatické membrány

Celistvost cytoplasmatické membrány je podmínkou pro optimální funkce spermií (Khan et Ijaz, 2007). K barvení vzorku pro stanovení celistvosti spermatických membrán se obvykle používá kombinace látek SYBR-14 (nebo H33342) a propidium jodid, což umožňuje rozlišení živých spermií s neporušenými membránami, živých spermií s porušenými membránami a mrtvých spermií. Propidium jodid se váže na DNA spermií, do kterých vstupuje s poškozenou cytoplasmatickou membránou (Johnson et al, 1994; Underwood et al., 2009). Barvivo SYBR-14 se rovněž váže na DNA nejen poškozených a mrtvých spermií, ale i živých spermií a to díky svému lipofilnímu charakteru, který mu pomáhá překonat membrány (Garner et Johnson, 1995).

3.2.6.2 Celistvost akrozómů

Akrozómy ztrácí většina mrtvých spermií (Cross et Meizel, 1989). Graham et al. (1990) pozorovali v populaci mrtvých spermií ztrátu akrozómu v 50 – 80% případů.

K fluorescenčnímu barvení se používá barvivo PSA (*pisum sativum agglutinin*), které má schopnost vazby na obsah akrozómu po narušení cytoplasmatické membrány (Graham et al., 1990). Označuje tedy spermie, u kterých proběhla akrozómová reakce. Barvivo H33342 pak

díky schopnosti prostoupit nenarušenými plasmatickými membránami označuje i spermie, u kterých reakce neproběhla.

3.2.6.3 Mitochondriální aktivita

Fluorescenční barvení rovněž umožňuje posouzení mitochondriálních funkcí spermie (Evenson et al., 1982). Moderní metody pro posouzení funkčnosti mitochondrií a celistvosti akrozómu zahrnují barvení různými fluorescenčními barvivy a inkubaci vzorků v různých médiích, která indukují kapacitaci spermií (Petrunkina et al., 2007). Například fluorescenční barvivo rhodamine 123 se specificky akumuluje pouze v mitochondriích (Graham et al., 1990). Rodamin 123 je nejintenzivněji akumulován a zadržován v plně funkčních mitochondriích, naopak mrtvé buňky ho nezadrží vůbec (Graham et al., 1990).

Mitochondriální aktivita spermií může být redukována v důsledku mechanického, osmotického a biochemického stresu. Poruchy funkce mitochondrií mají za následek tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), což způsobuje oxidativní stres a indukuje další poruchy mitochondrií (Pena et al., 2015) a následně i oplozovací schopnost mrazeného spermatu a jejichž výskyt se zvyšuje během mrazení (Wang et al., 1997).

3.2.6.4 Celistvost DNA

Integrita DNA spermie je rozhodující pro reprodukci. Při barvení akridinovou oranží, která se váže na šroubovici DNA, je možno analyzovat její stavbu. Při vazbě na nepoškozenou šroubovici vyzařuje modré záření, které je viditelné pod modrým světlem. Při vazbě na RNA nebo poškozenou DNA (jeden řetězec) vyzařuje za stejných podmínek červené záření (Fatehi et al., 2006).

Dogan et al. (2015) udávají korelaci fragmentace DNA k k plodnosti *in-vivo* $r^2 = -0,681$. Garcia-Macias et al. (2007) pak uvádí korelaci k plodnosti *in-vitro* $r^2 = -0,47$.

3.2.7 Morfologická stavba spermií a jejich hodnocení

Abnormality v morfologické stavbě spermií jsou spojovány se sníženou plodností až neplodností plemeníků. Výskyt abnormálních spermií je způsoben negenetickými faktory, jako například abnormalitami varlat, rozšířením cév v šourku, vysokými teplotami, užitím medikamentů, chemických prostředků (např. pesticidy) anebo infekcemi. Může však být podmíněn i geneticky (Chenoweth, 2005). Abnormality v morfologické stavbě spermií vzniklé v průběhu spermatogeneze jsou označovány jako primární, vady které vznikly po ukončení spermatogeneze, jsou označovány jako sekundární (Chenoweth, 2005; Barszcz, 2012).

Sekundární vady vznikají při dlouhodobém pobytu spermií v ocasu nadvarlete, dále v průběhu ejakulace a v neposlední řadě při nesprávné manipulaci se vzorky (Barszcz, 2012). Vzhledem k tomu, že primární abnormality nemusí mít větší vliv na plodnost pleménika než vady sekundární, byla vypracována nová klasifikace hodnocení. Podle té jsou abnormality ve stavbě spermií tříděny dle jejich vlivu na plodnost dárce. Zatímco závažné abnormality jsou ve významné korelaci k zhoršené plodnosti, výskyt méně závažných abnormalit nemusí nezbytně indikovat poruchu spermiogeneze. Avšak jejich výskyt ve větším množství může být příčinou snížené plodnosti pleménika (Chenoweth, 2005; Enciso et al., 2011). Klasifikace spermií dle závažnosti je uvedena v příloze č. 2. Některé závažné abnormality, jako například dvojité formy, zúžené báze hlaviček, malé hlavičky, zkrácené bičíky a proximální cytoplasmatické kapky jsou spojovány se spermiemi nesoucími defragmentovanou DNA (Saacke, 2008; Enciso et al., 2011). Abnormální spermie mohou redukovat oplozovací schopnost dvěma způsoby:

I. nedostanou se k vajíčku – obvykle souvisejí s poruchami v transportu spermie a je možné je kompenzovat zvýšením počtu spermií v inseminační dávce (tzv. kompenzovatelné vady);

II. k vajíčku se dostanou, ale nejsou schopny ho oplodnit anebo neudrží ranný vývoj embrya (tzv. nekompenzovatelné vady) (Chenoweth, 2005; Saacke, 2008).

Celá řada abnormalit v morfologické stavbě spermií může být detekována mikroskopicky, k detekci jiných však byly vyvinuty speciální testy. Přesnost posouzení morfologické stavby spermií je ovlivněna kvalitou proškolení techniků (Franken et al., 2008).

Posouzení může být provedeno kvalifikovaným odhadem (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013) nebo pomocí roztěrů barvených různými typy barviv.

Ve stanovení hranice pro výskyt abnormálních spermií se autoři liší. Například Barszcz (2012) doporučuje nezpracovávat sperma býku při výskytu 15 % abnormálních spermií. Vilakazi a Webb (2004) uvádí možnost snížené plodnosti při 30 %. Menon et al. (2011) hodnotí výsledky býků s výskytem abnormálních spermií >30 % jako neuspokojivé.

3.2.8 Hodnocení životaschopnosti ejakulátu – biologické testy

Při biologických testech je sledována odolnost spermií vůči různým vnějším vlivům. Jedná se o testy přežitelnosti, zkoušku rezistence, zkoušku živých spermií na odolnost vůči chladovému šoku, stanovení procenta živých a mrtvých spermií barvením a stanovení koncentrace vodíkových iontů (Dhurvey et al., 2012) a řada dalších. Jejich detailní rozbor není předmětem předkládané práce, proto budou v následujících řádcích popsány pouze testy použité při vlastním výzkumu.

3.2.8.1 Krátkodobý test přežitelnosti spermatu – termodynamický test, TDT

Termodynamický test přežitelnosti spermií se využívá k posouzení doby, po kterou si spermie udrží schopnost pohybu mimo organismus. Jde o jeden z nejstarších, přesto však i v současnosti rutinně využívaných testů a to jak při výzkumu, tak i v praxi inseminačních stanic. Jeho výhodou jsou nenáročnost a zanedbatelné náklady na jeho provedení.

Aktivita spermií je hodnocena obvykle v třicetiminutových intervalech po dobu dvou hodin. Po celou dobu je vzorek spermatu inkubován ve vodní lázni temperované na 38 °C. Tato teplota simuluje teplotu prostředí pohlavního ústrojí plemence (Beran et al., 2011). Již v roce 1976 zjistili Linford et al. korelace výsledků TDT k plodnosti býků u čerstvého spermatu 0,377. U mrazeného spermatu pak korelace závisela na podílu žloutku v ředidle. U vzorků vyrobených pomocí ředidla s 15 % žloutku šlo o 0,158, u vzorků se 7 % ředidla o 0,350.

3.2.8.2 Stanovení procenta živých a mrtvých spermií barvením

Zkouška je založena na různé afinitě živých a mrtvých spermií k barvivům. Mrtvé a v menší míře i oslabené spermie přijímají barvivo eosin. Oproti tomu živé spermie zůstávají nezbarvené (Graham et al., 1990; Hofírek a kol., 2009). Slabě zbarvené, tedy oslabené, spermie jsou obvykle hodnoceny jako mrtvé, jelikož se předpokládá, že jde o spermie umírající, které neplní žádné funkce z hlediska oplození vajíčka (Graham et al., 1990). Jako kontrastní barvivo se používá nigrosin. V práci Grahama et al. (1990) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi vzorky hodnocenými pomocí barvení eosinem-nigrosinem a průtokové cytometrie. Stejný autor uvádí, že metoda má spolehlivou regresi ke stanovení podílu spermií s celistvými membránami.

3.2.8.3 HOS test (Hypoosmotic swelling test)

Test, pomocí kterého se hodnotí celistvost cytoplasmatické membrány v oblasti bičíku, je založen na principu vystavení spermií hypoosmotickému prostředí. Byl vyvinut Jeyendranem a kol. (1984) na základě pokusů o nalezení snadné a levné metody laboratorního testování kvality spermatu. Od té doby prošel několika modifikacemi a ve výsledku lze dle Padrika et al. (2012) použít tři verze tohoto testu:

HOS – 1: jako hypoosmotické prostředí se využívá roztok 7.35 g citrátu sodného a 13.51 g fruktózy v 1 l destilované vody,

HOS – 2: jako hypoosmotické prostředí se využívá 0,2 % roztok NaCl,

HOS – 3: jako hypoosmotické prostředí se využívá 2,9% roztok citrátu sodného.

U spermií s nenarušenou cytoplasmatickou membránou vystavených hypoosmotickému prostředí dochází k nabobtnání a stočení bičíků. Correa et al. (1997) reportoval, že po rozmrazení inseminační dávky bylo u býků s dobrou plodností zjištěno 10,2

$\pm 2,3$ % a u býků s nízkou plodností $7,7 \pm 2,8$ % spermií reagujících na HOS, při korelačním koeficientu 0,56.

Padrik et al. (2012) zjistili u HOS-1 testu korelační koeficient podílu spermií s celistvými membránami k aktivitě spermií 0,63 na úrovni skoku a 0,77 na úrovni býka, přičemž podíl reagujících spermií nebyl ovlivněn věkem býka.

3.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KVALITU A MNOŽSTVÍ EJAKULÁTU BÝKŮ

3.3.1 Faktory vnitřní

Vliv plemene na různé parametry kvality spermatu býků byl průkazně potvrzen v několika studiích (Beran et al., 2011; Boujenane et Boussaq, 2014, Ducháček et al., 2015). Fiaz et al. (2009) podobně jako Snoj (2013) udávají rozdílné kvalitativní a kvantitativní parametry spermatu v různých ročních obdobích u býků různých plemen. Tyto odchylky vysvětlují rozdílnou tolerancí plemene k daným podmínkám prostředí.

Jedním z významných faktorů ovlivňujících některé parametry kvality ejakulátu je věk býka. Produkce spermatu a jeho kvalita rostou s věkem býka (Snoj et al., 2013; Boujenane et Boussaq, 2014). Po dosažení určitého věku však klesá objem ejakulátu, přičemž tento věk je ovlivněn plemennou příslušností býka. Byl prokázán vliv věku plemeníka na pokles celkové motility spermií zejména po 60 a 90 minutách termodynamického testu (Farrell et al., 1996; Farrell et al., 1998; Štolc et al., 2009). V pokusu Padrika et al. (2009) neměl věk býka vliv na podíl spermií s narušenou cytoplasmatickou membránou.

Užitkový směr (Holt et al., 2015) a plemeno býka (Nagendrakumar et Kathiseran, 2011) mají vliv i na mrazitelnost spermatu, respektive některé parametry kvality inseminační dávky po rozmrazení. Je rovněž známo, že u některých býků existuje horší mrazitelnost spermatu. Ta se projevuje sníženou aktivitou mrazeného spermatu i přesto, že jde o zdravé býky, ochotné k páření a jejich sperma je po odběru normální (Takahashi, 2012).

Kvalita ejakulátu je ovlivněna i kondicí býka. Vyšší motilita ihned po odběru byla zaznamenána u býků s tělesnou kondicí nad 2,75 bodu (Beran et al., 2011).

Plodnost býků samozřejmě může být redukována i geneticky. Jde zejména o výskyt abnormálních spermií označovaný jako DAG-efekt u plemene jersey, syndrom zbobtnalého akrozómu vyskytující se u holštýnského plemene, abnormální kondenzaci DNA nalezenou u simentálského plemene nebo chronickou dekapitaci hlaviček (80-100 %) popsanou u různých

plemen skotu (Chenneweth, 2005). Další příčiny geneticky determinované redukce plodnosti byly nalezeny s rozvojem genomické testace, díky níž je možno určit letální faktory označované jako haplotypy, které nikdy nebyly pozorovány u živých zvířat. Jejich výskyt byl zaznamenán u plemen holštýn, jersey a brown-swiss (VanRaden et al., 2011). U plemene ayrshire byl dále identifikován haplotyp vyskytující se na chromosomu 17, který redukuje plodnost býků o $4,3 \pm 2,5$ % (Cooper et al., 2014). U holštýnského plemene se vyskytují haplotypy 1, 2 a 3, jejichž stanovení ze vzorku DNA je komerčně dostupné. Do hry vstupují samozřejmě i semiletální faktory jako jsou CVM (komplex vertebrálních malformací), BLAD (bovinní leukocytární adhezní deficiencie), brachyspina, mulefoot a další, které rovněž ve větší či menší míře redukuje plodnost plemníka (VanRaden et al., 2011)

Paternální plodnost ovlivňují i poruchy ve vývoji varlat, jako jsou oboustranný i jednostranný kryptorchismus. V jeho důsledku dochází k hypoplasii Leydigových buněk a následné nedostatečné hormonální stimulaci dozrávání spermií testosteronem (Goel et al., 2015).

3.3.2 Faktory vnější

Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu patří roční období. Mnoho zdrojů označuje zimní období jako dobu, kdy je produkován ejakulát nejvyšší kvality (Argov-Argaman et al., 2013; Boujenane a Boussaq, 2014; Bhakat et al., 2014; Alragubi, 2015). Pileckas et al. (2013) potom uvádí nejvyšší aktivitu u ejakulátů odebraných v březnu. Horší výsledky dosahované v letním období lze vysvětlit poruchami termoregulačních mechanismů v důsledku zvýšení tělesné teploty nad fyziologické hranice, ke kterým dochází při vysoké teplotě a relativní vlhkosti prostředí (Nardone et al., 2010; Alragubi, 2015). Tyto poruchy, známé jako tepelný stres, mají vliv na kvalitu spermatu býků (Mathevon et al., 1998; Nichi et al. 2006), zabřezávání krav a embryonální mortalitu (Hansen et al., 2002). Dle Argov-Argmana et al. (2013) se tepelný stres odráží ve složení a poměrech lipidů v cytoplasmatické membráně spermií. Parks et Lynch (1992) udávají, že poměr lipidů v cytoplasmatické membráně spermií je významný z hlediska její tekutosti. Při vysokém poměru cholesterolu ku fosfolipidům dochází k menšímu stupni poškození buněk při mrazení. Poměr lipidů je druhově závislý (pozn. *radí se tedy mezi vnitřní faktory ovlivňující mrazitelnost spermatu různých druhů zvířat*). Ve své práci uvádějí hodnoty pro býky 0,45, kance 0,26, kohouty 0,30 a hřebce 0,36. Snoj et al. (2013) potom dále předpokládají, že postupné prodlužování délky dne má vliv na zvyšování objemu a počtu spermií v odebraných ejakulátech, přičemž vrcholu je dosahováno v letním období. Sarder (2007) ve své studii provedené v Bangladéši uvádí letní

období jako nejvýhodnější pro produkci kvalitního ejakulátu, což je možné vysvětlit rozdílnými podmínkami prostředí (klimatické pásmo) i délkou dne.

Z hlediska sezónnosti je pak možno posuzovat dílčí sezónní faktory, jako je okolní teplota, vlhkost a délka dne. Okolní teplota ovlivňuje kvalitu spermatu nejen v den odběru, ale i po celou dobu spermatogeneze a zrání spermií v nadvarleti (Ball et Peters, 2004).

Významnými vnějšími faktory jsou mimo podmínek prostředí i výživa a management chovu, které mají průkazný vliv na fyziologii býka odrážející se i v jeho plodnosti. Mezi tyto faktory patří například dlouhá doba přepravy nebo nevybalancovaná krmná dávka. Vyvážená krmná dávka během odchovu býků má vliv na testikulární biosyntézu steroidních hormonů, které podporují funkce Leydigových buněk (Parisi et al., 2014).

Vliv byl zaznamenán rovněž u frekvence odběrů. Delší interval mezi odběry pozitivně ovlivňuje kvalitativní parametry spermatu, přičemž lepší kvalitativní parametry a vyšší objem odebraného ejakulátu byly pozorovány u prvního odebraného ejakulátu (Boujenane et Boussaq, 2014).

Jako výhodnější metoda odberu z hlediska aktivity spermií po rozmrazení byl vyhodnocen odběr pomocí umělé vagíny ve srovnání s elektroejakulací. Předpokládá se, že elektroejakulace má vliv na odlišné složení ejakulátu (Jiménez-Rabadán et al., 2016). Délka umělé vagíny však nemá vliv na kvalitu ejakulátu (Seidel et Foote, 1969).

Inseminace u krav se obvykle provádí 6 – 16 hodin po začátku říje. Saacke et al. (2008) prokázali vliv interakce mezi časem inseminace v rozmezí těchto hodin a individualitou býků na úspěšnost oplození embryí. Rozdíly vysvětlují počtem spermií, které se dostanou k vajíčku a narušují *zonu pellucidu*, přičemž při větším počtu těchto spermií lze předpokládat i lepší kvalitu embryí.

3.4 VLV ZPRACOVÁNÍ SPERMATU NA ÚSPĚŠNOST KRYOKONZERVACE

Úspěšnost kryokonzervace, která je metodou široce používanou za účelem dlouhodobého skladování spermatu, závisí na udržení oplozovací schopnosti spermií. Ty si musí zachovat celistvost a funkčnost mnoha buněčných struktur. V průběhu zpracování spermatu jsou spermie vystaveny mnoha nefyziologickým změnám: v teplotě, hodnotách pH, parciálním tlaku kyslíku a oxidu uhličitého, světla a pravděpodobně i záření v neviditelném spektru, a samozřejmě i absenci samičích genitálních sekretů, se kterými se sperma mísí po ejakulaci (Mann et Lutwak-Mann, 1981). Úspěšnost kryokonzervace spermatu závisí na mnoha

faktorech, včetně interakcí mezi kryoprotektivy, typu ředidla, rychlosti mrazení, rychlosti rozmrazení, balení a individualitě dárce (Clulow et al., 2008; Cooter et al., 2005).

Během zpracování spermatu může nastat několik škodlivých momentů: změny teploty, osmotický a toxický stres vyvolaný kryoprotektanty, tvorba a rozpouštění ledových krystalů. Těmto momentům bude věnována pozornost při popisu příslušné problematiky.

3.4.1 Ředění spermatu

Při zpracování spermatu předchází samotnému procesu kryokonzervace ředění ejakulátu v médiích obsahujících různé biochemické látky s kryoprotektivními účinky. Jejich složení ovlivňuje odolnost spermií k negativním vlivům mrazení, motilitu spermií po rozmrazení (Tatham, 2000) a mění schopnost spermií kontrolovat pohyb iontů vápníku (Ca^{2+}), který hraje významnou roli při kapacitaci, hyperaktivaci a akrozómové reakci (Zhao et Buhr, 1995).

Odpadním produktem metabolismu spermií je kyselina mléčná, která se uvolňuje do prostředí a postupně ho okyseluje, zpomaluje pohyb spermií, navozuje anabiózu, až postupně spermie odumírají (Mutalík et al., 2014). Proto je zapotřebí zahájit proces ředění nejpozději do 15 - 20 minut po odběru ejakulátu (Ball et Peters, 2004).

3.4.1.1 Ředidla

Mezi hlavní funkce ředidel se řadí zajištění ochrany a výživy spermií, zvýšení objemu ejakulátu a usnadnění průchodu spermií v pohlavním traktu plemenic.

Základními komponenty ředidel jsou bi-destilovaná voda sloužící jako nosič ostatních látek, kryoprotektiva, pufry, cukry, antibiotika, aminokyseliny a mastné kyseliny (Beran et al., 2014). V současnosti jsou na inseminačních stanicích používána zejména komerčně vyráběná ředidla. Mezi ně patří ředidla s přídavkem čerstvého žloutku jako jsou Triladyl, Biladyl (Minitüb Germany, Tiefenbach), BullXcell (IMV France, L'Eigle) a BoviPRO (Minitube of America). Nevýhodou žloutkových ředidel je proměnlivé složení vaječného žloutku, které ovlivňuje jeho efekt při ochraně spermií v procesu kryokonzervace (Akhter et al., 2010). Z hlediska stability složení a prevence chorob jsou proto výhodnější ředidla s obsahem komerčně přidaného (ionizovaného) žloutku jako je Steridyl (Minitüb Germany, Tiefenbach), Optidyl (IMV France, L'Eigle). Žloutková granula vyskytující se v obou typech žloutkových ředidel znesnadňují analýzu aktivity spermatu pomocí systému CASA (Moussa et al. 2002; Amirat et al., 2005). Dostupná jsou i bezžloutková ředidla, která neobsahují živočišné proteiny. Jejich použitím se snižuje riziko přenosu patogenů a virů při udržení stejné oplozovací

schopnosti spermií (Bosseau et al., 1998). Ta mohou být vyráběna na bázi kombinace glycerolu a sojového lecitinu, jejichž zástupci jsou AndroMed (Minitube Germany, Tiefenbach) a BioXcell (IMV France, L'Eigle) nebo nejnověji na bázi liposomu, která reprezentuje OptiXcell (IMV France, L'Eigle).

3.4.1.2 Kryoprotektivní látky

Kryoprotektivní látky lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou látky penetrující do spermií skrz cytoplasmatickou membránu, tedy působící intracelulárně i extracelulárně. Penetrující látky mohou mít toxický vliv na spermiie, a to destabilizací membrán a denaturací proteinů a enzymů. Tyto negativní vlivy přímo souvisí s jejich koncentrací a dobou expozice (Swain et Smith, 2010; Rosato et Iaffaldano, 2013). Druhou skupinou jsou látky nepenetrující do spermií, které působí pouze extracelulárně. Jde zejména o bílkoviny, aminokyseliny a cukry, které se chovají jako osmoprotektanty a které mohou mírnit poškození způsobená penetrujícími kryoprotektanty. Tyto substance jsou méně toxické než penetrující kryoprotektanty, inhibují růst ledu a pomáhají spermiím stabilizovat vnitřní prostředí při osmotickém stresu, čímž redukuje množství potřebných penetrujících kryoprotektantů (Swain et Smith, 2010).

a) Penetrující kryoprotektanty

Penetrující kryoprotektanty zvyšují tekutost membrán pomocí přeuspořádání membránových lipidů a bílkovin. To se projevuje větší dehydratací spermií při nižších teplotách a sníženou formací ledu uvnitř buněk (Holt, 2000).

Nejpoužívanějším penetrujícím kryoprotektantem při konzervaci spermatu býků je glycerol. Glycerol chrání spermiie před mechanickým poškozením během mrazení (De Leeuw et al., 1993) a snižuje bod mrznutí intracelulární i extracelulární tekutiny na hodnoty pod bodem mrazu vody a omezuje tak vliv nízké teploty na koncentraci roztoků a rozdíly osmotických tlaků (Amann et Picket, 1987). Optimální koncentrace glycerolu je ovlivněna ostatními komponenty ředidla (Woelders et al., 1997). Pokud je použit ve vysokých koncentracích, tak může způsobovat závažná osmotická poškození, protože překonává membrány spermií mnohem pomaleji než jiné kryoprotektanty (Guthrie, 2002).

Dimethyl sulfoxid má podobné kryoprotektivní účinky jako glycerol (Lovelock et Bishop, 1959). Při kryokonzervaci spermatu králíků bylo při použití dimethyl sulfoxidu dosaženo lepších aktivit po rozmrazení ve srovnání s glycerolem (Rosato et Iaffaldano, 2013).

U kryoprotektantů s nízkou molekulární hmotností, jako je ethylenglykol, se pak předpokládá nižší rozsah poškození spermií, neboť díky své nízké molekulové hmotnosti překonávají snadněji membrány spermií (Moore et al., 2006). Ethylenglykol byl s úspěchem použit jako substituent glycerolu při mrazení spermatu hřebců (Henry et al., 2002) a kozlů (Molinia et al., 1994). Působení ethylen glykolu může být u jednotlivých druhů zvířat specifické (Martins-Bessa et al., 2006).

Guthrie et al. (2002), srovnávali působení glycerolu, dimethyl sulfoxidu a ethylenglykolu a výsledkem byla nejvyšší aktivita u vzorků vyrobených pomocí ethylenglykolu a to pravděpodobně díky redukci osmotického stresu. Tento předpoklad však nebyl potvrzen Taşdemirem et al., (2013), kteří určili jako nejvhodnější zastoupení glycerolu v ředidle 6 % ani Awadem, (2011), který srovnával působení glycerolu (3 %), ethylen glykolu (1; 2 a 3%) a methanolu (1 %) při mrazení spermatu býků.

b) Nepenetrující kryoprotektanty

Nepenetrující kryoprotektanty se vyznačují vyšší molekulární hmotností, hydrofilií a netoxicitou. Pomáhají buňkám stabilizovat koncentraci vnitřních roztoků při osmotickém stresu (Cleland et al., 2004). Díky své neschopnosti překonat plasmatickou membránu vytvářejí osmotický tlak, který snižuje bod mrazu média a tím i tvorbu extracelulárního ledu (Aisen et al., 2002), čímž poskytují buňkám ochranu.

Nejznámějším a nejčastěji používaným nepenetrujícím kryoprotektantem je vaječný žloutek, který zlepšuje funkce spermií a udržuje jejich oplozovací schopnost. Literatura uvádí, že pro kryokonzervaci býčího ejakulátu se doporučuje koncentrace vaječného žloutku do 20 % (Sansone et al., 2000), ve větších koncentracích se potom stává pro spermie toxickým (Shannon, 1972). Aktivními frakcemi vaječného žloutku, které poskytují spermii ochranu při chlazení a mrazení jsou fosfolipidy a low-density lipoprotein (LDL) (Medeiros, 2002). Příklad LDL do ředidla má pozitivní vliv na kvalitu spermií po rozmrazení, na jejich oplozovací schopnost a motilitu ve srovnání s komerčně používanými ředidly na bázi vaječného žloutku jako například Optidyl (Amirat et al., 2004), či Triladyl (Amirat et al., 2005). U ředidla z vaječného žloutku, byl identifikován jako vhodný přídavek 6% LDL (Low Density Lipoprotein) (Bencharif et al., 2012). Podle Moussa et al. (2002) se potom jako optimální koncentrace jeví 8% přídavek LDL do ředidla, přičemž je možný přídavek do 10 % LDL. Přídavek LDL může být také využit při mrazení sexovaných dávek (Vera-Munoz et al., 2009). Obecně vzato ředidla obsahující LDL mohou být využita jako ředidla s lepšími účinky na spermie během mrazení než ředidla komerčně využívaná (Moussa et al., 2002). Nicméně při

porovnání ejakulátů mrazených pomocí LDL a ředidla Tris s 20% přídavkem žloutku nebyl zjištěn průkazný rozdíl v zabřezávání plemenic (Amirat et al., 2010). Přesný způsob, jakým LDL poskytuje ochranu spermií a jeho vliv na aktivitu spermií je však zatím nebyl objasněn (Amirat et al. 2004; Bathgate et al., 2006). První hypotéza o působení LDL předpokládá záchyt škodlivých proteinů přítomných v semenné plazmě a zlepšení schopnosti mrazení spermií (Bergeron et Manjunath, 2006). Druhá hypotéza předpokládá, že fosfolipidy obsažené v LDL chrání povrch spermie ochranným filmem anebo nahrazují spermatické membráně fosfolipidy, které byly ztraceny nebo poškozeny během kryokonzervace (Graham et Foote, 1987). Lecitin, který patří do skupiny LDL, může být extrahován z vaječného žloutku nebo ze sóji. Výhodou použití sójového lecitinu je snížení hygienických rizik (Amirat et al., 2004).

Naopak high-density-lipoprotein (HDL) obsažený ve žloutku způsobuje vyloučení cholesterolu z plazmatických membrán spermie, což má za následek změnu tekutosti membrán a následné zvýšení citlivosti k chladovému šoku (Amirat et al., 2005) a rovněž urychluje kapacitaci spermií a zároveň spouští akrozómovou reakci (Anton et al., 2003). Má tedy opačné účinky než LDL.

Další nepenetrující kryoprotektant, bovinní sérový albumin (BSA), neposkytuje spermiím ochranu, pokud je jediným kryoprotektantem v mrazícím médiu. Dobrých výsledků mrazení (aktivita, celistvost membrán) a zabřezávání bylo dosaženo v kombinaci BSA s trehalózou a sacharózou. V kombinaci BSA/sacharóza bylo u králíků dosaženo podobných výsledků v zabřezávání jako při inseminaci čerstvým semenem (Rossato et Iaffaldano, 2013).

Cukry obsažené v ředidlech vytváří osmotický tlak. Díky tomu snižují výskyt intracelulárních ledových krystalů. Reagují s fosfolipidy v cytoplasmatické membráně a zvyšují přežitelnost spermií v průběhu kryokonzervace (Aisen et al., 2002). Různé sacharidy však vykazují rozdílnou efektivitu v ochraně spermií, která se odvíjí od jejich molekulární hmotnosti a stavby (Gómez-Fernández et al., 2012), přičemž nejlepší ochranu poskytuje glukóza a disacharidy obsahující glukózu, jako například sacharóza a laktóza (De Leeuw et al., 1993; Gómez-Fernández et al., 2012).

Antibiotika přidávaná do ředidel za účelem redukce rizik přenosu patogenů nemají vliv na aktivitu spermií po rozmrazení (Ennen et al., 1976).

3.4.1.3 Stupeň ředění

Byl prokázán vliv stupně ředění na parametry kinetiky spermií v průběhu TDT testu (Farrell et al., 1996). Vysoký stupeň ředění býčího ejakulátu může způsobit individuálně

podmíněné zvýšení podílu spermií s narušenou cytoplasmatickou membránou po rozmrazení. Příčinou může být nedostatek esenciálních komponentů semenné plasmy (Garner et al., 2001). Velmi vysoký stupeň naředění ejakulátu býků pak může vyústit v tzv. „dilution effect“, fenomén charakterizovaný ztrátou motility spermií, metabolické aktivity a oplozovací schopnosti spermií (Gordon, 2003). Jedna z prvních prací zaměřených na tuto problematiku uvádí, že k poškození dochází už při naředění na koncentraci 250×10^6 mil./sp (Benson et al., 1968). Od té doby však došlo k vývoji nových ředidel a postupů dlouhodobé konzervace ejakulátů býků. Nicméně efekt stupně ředění byl potvrzen i v novější práci Garnera et al. (2001). Z té plyne, že vyšší stupeň ředění (na koncentraci 5×10^6 mil./sp.) negativně ovlivňuje funkce mitochondrií a že negativní efekt může být minimalizován přidavkem semenné plasmy do ejakulátu.

3.4.2 Chlazení spermatu

Chlazení je fáze adaptace spermií na zpomalení metabolismu, který se zpomaluje o polovinu s každým poklesem o 10°C (Amann, 1989). V této fázi se mohou u spermií objevovat chladové změny (tzv. chladový šok), které jsou definovány jako permanentní poškození objevující se již při chlazení z 30 na 0°C a nikoliv při mrazení (Ghetler et al., 2005). Chladový šok nejčastěji nastává při zchlazování v rozmezí teplot $15 - 5^\circ\text{C}$. Sperma různých druhů zvířat je rozdílně citlivé k těmto změnám (Parks et Lynch, 1992; Watson, 2000), což může být ovlivněno různým poměrem cholesterolu a fosfolipidů obsažených v membránách spermií (Parks et Lynch, 1992). Chladový šok způsobený rychlým chlazením způsobuje ztrátu selektivní propustnosti permeabilních membrán a tekutosti membrán (Buhr et al., 1989), ztrátu buněčných komponentů jako jsou fosfolipidy a bílkoviny, poruchy metabolismu spermií (Watson, 1981), redukci zásobení spermií energií (Blackshaw et Salisbury, 1957) a nevratnou ztrátu aktivity (Blackshaw a Salisbury, 1957; Watson, 1981). V důsledku ztráty proteinů obsažených v membráně dochází k poruše iontového metabolismu spermií (Robertson et al., 1988; Watson, 2000). Chladový šok dále může způsobit poškození akrozómů (Hancock, 1952; Simpson et al., 1986), mitochondrií (Jones et Martin, 1973) a zvýšený příjem vápenatých iontů (Simpson et al., 1986). Je známo, že membrány spermií vykazují po mrazení vyšší propustnost, což může být způsobeno poškozením bílkovin ve struktuře membrán (Robertson et al., 1988). Dalším negativním důsledkem rychlého chlazení je nedostatečná dehydratace spermií a následné zvýšené riziko výskytu intracelulárního ledu. Doporučováno je proto pomalé zchlazování, při kterém dochází k maximální dehydrataci spermií a postupnému nastolení osmotické rovnováhy mezi vnitřním a vnějším prostředím spermií (Woelders, 1997).

Januskauskas et al. (1999) doporučují chlazení ejakulátu býků rychlostí $-4,2$ °C/min až $-0,1$ °C/min. U spermatu chlazeného v tomto rozmezí nenalezli významné rozdíly v zabřezávání krav a to i přesto, že se některé parametry kvality spermatu zjišťované *in-vitro* průkazně lišily.

Januskauskas et al. (1999) nezjistili rozdíly v zabřezávání krav po inseminaci spermatem chlazeným rychlostí $-4,2$ °C/min a $-0,1$ °C/min a to i přesto, že se některé parametry kvality spermatu zjišťované *in-vitro* průkazně lišily. Požadovaná délka chlazení se liší i dle různých druhů zvířat a v závislosti na použitém druhu ředidla. Např. pro sperma psů doporučují du Bois et al. (2012) délku chlazení 30 min při použití ředidla určeného pro psy a 60 min při použití ředidla používaného v humánní medicíně. Předpokládají rovněž, že je možné, že nezbytná délka chlazení může být ovlivněna počtem spermií s neporušenými membránami.

3.4.3 Ekvilibrace spermatu

Samotné naředení ejakulátu představuje pro spermie osmotický stres, jelikož v důsledku přidavku kryoprotektantů dochází ke zvýšení osmotického tlaku v okolí spermií (hyperosmóza). Následně difunduje intracelulární voda do prostředí a spermie se smršťují (Hammerstadt et al., 1990). Proto je důležité zajistit spermiím dostatek času na ekvilibraci kryoprotektantů, které neprostupují cytoplasmatickou membránou stejně rychle jako voda (Amann et Pickett, 1987; Salamon a Maxwell, 2000). Kryoprotektanty s nižší molekulární hmotností prostupují cytoplasmatickou membránou rychleji než glycerol, proto nezpůsobují tak vysoký osmotický stres a nevyrovnanost prostředí a redukují negativní dopady tohoto jevu (Squires, et al., 2004).

Názory na nejvhodnější délku ekvilibrace spermatu býků se liší. Jsou uváděny hodnoty od 1 do 24 hodin (Ennen et al., 1976; Talevi et al.; 1994; Dhami et al. 1996; Moussa et al.; 2002; Foote et Kaprotht, 2002; Doležalová, 2015). Velmi často je doporučována ekvilibrace v délce 2-4 hodiny (Ennen et al., 1976; Foote et Kaprotht, 2002; Doležalová, 2015), která je rovněž nejvýhodnější i z provozního hlediska na inseminačních stanicích s každodenní produkcí inseminačních dávek. V některých studiích bylo popsáno zvýšení oplozovací schopnosti spermií při prodloužené ekvilibraci (Muino et al., 2007).

Pro volbu vhodné délky ekvilibrace je spolurozhodující i rychlost chlazení a následného mrazení inseminačních dávek (Arav et al., 2000). Byly popsány i interakce mezi délkou ekvilibrace a použitým typem ředidla (Leite et al., 2010, Shahverdi et al., 2014).

Při ekvilibraci v délce 18 hodin doporučuje Muino et al. (2007) upřednostnit ředění Biladylem před bezžloutkovými ředidly. Dle výsledků by ekvilibrace při použití AndroMedu

neměla přesáhnout 6 hodin a při použití Biosiphosu Plus 6 hodin. Vhodnost Biladylu pro dlouhodobou ekvilibrace může být dána faktem, že se glycerol do směsi přilévá těsně před plněním spermatu do pejet nebo lepší ochrannou funkcí vaječného žloutku ve srovnání se sójovým lecitinem, přičemž autoři studie se kloní spíše k druhé hypotéze.

Požadavky na délku ekvilibrace se pro různé druhy hospodářských zvířat liší, například: králík – 45 min (Iaffaldano et al., 2012), buvol – 60 min (Lammey et Valdez, 2011), pes 0 – 4 hodiny (Okano et al., 2004) .

3.4.4 Mrazení spermatu

Je všeobecně známo, že mrazení spermatu je kritickým krokem při výrobě inseminačních dávek. Dochází při něm k poškození a zhoršení funkcí spermií v důsledku interakcí fyzikálních a biologických procesů. To vede ke snížení jejich oplozovací schopnosti.

3.4.4.1 Příčiny poškození spermií v důsledku mrazení

Mrazením se rozumí snížení teploty vzorků na úroveň teploty skladování (v tekutém dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Ghetler et al., 2005). Při mrazení jsou spermie ohroženy interakcemi mezi vodou a pevnými částicemi (cukry, bílkovinami a solemi). Při tuhnutí vody dochází ke zvýšení koncentrace těchto částic v tekuté fázi (Mazur et al., 1970; Watson, 2000). To má za následek nárůst osmotického tlaku a vystavení spermií hyperosmotickému prostředí. Čím více klesá teplota, tím méně zůstává nezmrazené frakce a tím více stoupá osmotický tlak. To naznačuje, že rychlost mrazení by měla být co nejvyšší. Rychlé mrazení ale způsobuje tvorbu ledových krystalů uvnitř spermie, jelikož voda obsažená v buňkách mrzne pomaleji než voda v okolním prostředí (Watson, 2000). Rychlost mrazení ovlivňuje tvar mezibuněčných i vnitrobuněčných ledových krystalů, přičemž jehlovitý tvar krystalů poškozuje buňky mechanickým poškozením (Gaciuta et Arav, 2005). Mrazení proto musí být dostatečně pomalé, aby došlo k dostatečné dehydrataci spermií (Watson, 2000). Škodlivé vlivy mohou být minimalizovány využitím střední rychlosti mrazení (Watson, 1990) a tvorbě vnitrobuněčných ledových krystalů může být předcházeno dehydratací spermií pomocí vhodného kryoprotektantu.

V procesu mrazení dochází k uvolnění latentního tepla ze vzorků, které způsobuje rychlý vzestup teplot v mrazicím zařízení a způsobuje prodlevu v mrazicím procesu. Bylo potvrzeno, že tato prodleva je jedním z limitujících faktorů pro přežitelnost spermií v mrazeném spermatu v důsledku růstu ledových krystalů (Pursel et Park, 1985; Parkinson et. Whitfield, 1987; Bwanga et al., 1991). Kumar et al. (2003) označili za kritické teploty v rozsahu -5°C až -50°C , které rozhodují o tom, zda spermie zůstanou v rovnováze s

extracelulárním prostředím nebo se postupně prochladí a zvýší se možnost tvorby intracelulárních ledových krystalů. Změna teploty ve vzorku je mimo jiné závislá i na biologickém materiálu, tepelné vodivosti a geometrickém tvaru nádoby (Diller, 1992).

3.4.4.2 *Techniky mrazení*

Konvenční mrazení

Jedna z prvních technik konvenčního mrazení spočívala v umístění inseminačních dávek nad parami tekutého dusíku po dobu 10 minut ve výšce 2 cm nad hladinou tekutého dusíku za působení teploty -80°C , poté byly dávky umístěny přímo do tekutého dusíku (Reid et al., 2009). Nevýhodou tohoto způsobu mrazení byla nemožnost kontrolovat tvorbu ledových krystalů (Saragusty et al., 2007).

Systémy s programovatelným mrazením

Vývoji systémů s precizní kontrolou mrazícího procesu je v současnosti věnována značná pozornost. Metoda pomalého programovatelného mrazení zahrnuje postupné snížení teploty v komoře mrazícího boxu. Tato metoda je založena na řízení teplotního gradientu a přesné kontrole tvorby ledových krystalů. Využívá se při mrazení inseminačních dávek různých druhů zvířat.

Doležalová et al. (2015) porovnávali efektivitu mrazení ejakulátu býků v programovatelném boxu dle čtyř mrazících křivek. Srovnávány byly křivka trojfázová ($-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ od $+4^{\circ}\text{C}$ do -10°C ; $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ z -10°C do -100°C a $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ od -100°C do -140°C) (Muiño et al., 2007), dvoufázová ($-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ od $+4^{\circ}\text{C}$ do -10°C a $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ od -10 do -150°C) (Januskauskas et al., 1999, Gil et al., 2000), pomalá ($-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ z 5°C na -5°C , $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ z -5°C na -42°C a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ z -42°C na -140°C) (Stradioli et al., 2007) a rychlá ($-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ z 4 to -10°C , $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ z -10 do -100°C a $-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ z -100 na -140°C) (Saragusty, 2007). Jako nejvýhodnější byla hodnocena křivka dvoufázová, přičemž byl potvrzen i individuální vliv býka na mrazitelnost dle křivek.

Vitrifikace

Vitrifikace je proces, při kterém se kapalina přemění na pevnou látku bez tvorby ledových krystalů. Pro docílení vitrifikace je nezbytné využít velmi rychlého mrazení a vysokých koncentrací kryoprotektantů (Lawson et al., 2011). Vzhledem k toxicitě vysokých koncentrací kryoprotektantů na samčí pohlavní buňky, jde o metodu obecně považovanou za nevhodnou pro mrazení ejakulátů. Toto bylo potvrzeno i při vitrifikaci spermatu králíků za

použití různých kryoprotektantů (Rosato et Iaffaldano, 2013). Přenos tepla v buňkách s většími objemy (více než 0,1 ml) je příliš pomalý pro použití metody vitrifikace z důvodu nebezpečí tvorby ledových krystalů (Arav et al., 2002).

Bylo prokázáno, že re-vitrifikace embryí (*obdoba DF*) myši měla minimální vliv na vývoj embrya před implantací a na potenciální schopnost implantace embryí (Sheehan et al., 2006).

Unikátní mrazicí technologie - UFT

K mrazení spermatu lze využít i poněkud odlišnou metodu nazývanou „unikátní mrazicí technologie“ (Unique Freezing Technology – UFT), která byla původně vyvinuta k mrazení potravin. Při této metodě se ředěné sperma vloží do lázně naplněné organickým roztokem, jehož tepelná kapacita je podobná jako u vody a mrazí se rychlostí $-6,1$ °C/min. U vzorků mrazených metodou UFT byla zjištěna podobná aktivita po rozmrazení, jako u vzorků mrazených v párách dusíku (Goolsby et al., 2004).

Lyofilizace spermatu

Kaneko et al. (2014) konzervovali sperma jaguárů, žiraf a šimpanzů za použití lyofilizace pomocí roztoku obsahujícího 10mM Tris a 1mM EDTA. Takto konzervované sperma je možno skladovat v lednici při 4°C a v uváděné práci bylo takto uchovávalo po dobu 1 měsíce.

Metoda Multi-thermal gradient - MTG

K mrazení větších objemů ejakulátů a větších tkání byla vyvinuta metoda mrazení zvaná „Multi-thermal gradient“ (MTG) založená na principu přímého tuhnutí. Tuba se vzorkem se při tomto způsobu mrazení pohybuje konstantní rychlostí 1 mm/s v teplotním gradientu 5,5 °C/min. Takto je zajištěna precizní regulace tvorby ledových krystalů. Řízení tvorby ledových krystalů, optimalizace tvaru krystalů a homogenní rychlost mrazení minimalizují poškození buněk i při mrazení spermatu ve větších objemech (Arav, 1999; Arav et al. 2002).

Metoda dvojího mrazení - DF

Několik studií z posledních let prokázalo, že si některé spermie mohou udržet své funkční vlastnosti (Maxwell et al., 2007; Saragusty et al., 2009; Underwood et al., 2009) a jsou schopny oplodnit oocyty i po několika cyklech mrazení – rozmrazení a to jak v podmínkách *in vitro* (Bandularante et Bongso, 2002; Hollinshead et al., 2004; Choi et al., 2006; Underwood et

al., 2009), tak i v podmínkách *in vivo* (Si et al., 2006; de Graaf et al., 2007; Saragusty et al., 2009; Underwood et al., 2010).

Nejnovější metodou kryokonzervace se tak stala metoda dvojího mrazení (Double Freezing; DF). Bylo publikováno několik prací zabývajících se problematikou dvojího mrazení ejakulátů různých druhů hospodářských zvířat i mužů. V těchto pracích jsou uváděny různé postupy a technologie mrazení ejakulátu, včetně různých metod odstranění poškozených spermií, lymfocytů, epiteliálních buněk apod. Ve všech pracích byly rovněž použity různé stupně ředění ejakulátů pro první i druhé mrazení.

Underwood et al. (2009) použili ve své práci zaměřené na *in vitro* charakteristiky spermatu konvenční mrazicí box řízený počítačem. Sperma býků bylo naředěno na koncentraci 250×10^6 mil. spermií/ml a naplněno do 0,25 ml pejet. Dále prošlo mrazením, následnou sexací a naředěním na 5×10^6 mil. spermií/ml a opětovným zmrazením. Z výsledků jejich práce plyne, že po druhém rozmrazení vykazovaly vzorky nižší celkovou aktivitu, přežitelnost a rychlost spermií oproti kontrole vyrobené konvenčním způsobem.

Velmi zajímavé výsledky přináší studie Saragustyho et al. (2009), ve které byly výsledky inseminace dávkami vyrobenými metodou DF u jalovic a prvotetek srovnatelné s výsledky inseminace dávkami vyrobenými konvenční cestou. Po inseminaci dávkami vyrobenými metodou DF byly zjištěny horší výsledky v zabřezávání krav na druhé a další laktaci. Nicméně v této práci dávky vyrobené metodou DF obsahovaly dvojnásobný počet spermií oproti dávkám vyrobeným konvenční metodou. Zároveň byly prokázány individuální rozdíly mezi býky při posuzování aktivity spermií pro rozmrazení spermatu zmrazeného konvenční metodou (rozsah středních hodnot: 50-80%, $P = 0.001$), ve velkých objemech (rozsah středních hodnot: 50–75%, $P = 0.042$) a metodou DF (rozsah středních hodnot: 20–40%, $P = 0.015$).

Většina prací zabývajících se metodou DF rovněž věnuje pozornost možnostem odstranění mrtvých a poškozených spermií ze spermatu. První z možností je využití průtokové cytometrie, využívané při sexaci spermatu. Tato metoda, díky zdokonalování v posledních letech, dnes umožňuje rozlišit mrtvé a poškozené spermie. Ty, na rozdíl od živých spermií, vstřebávají propidium jodid poškozenými membránami (Johnson et al, 1994; Underwood et al., 2009).

Další možností odstranění nefunkčních spermií je využití PureSperm© Density Gradient Centrifugation. Tato technika byla vyvinuta v humánní medicíně k oddělení živých a

morfologicky intaktních spermií od těch narušených a dále od lymfocytů, epiteliálních buněk, bakterií, úlomků buněk, abnormálních a nezralých spermií a semenné plasmy. PureSperm© je sterilní koloidní křemičitá suspenze, u které není znám přesný mechanismus fungování. Předpokládá se, že stejně jako jiné filtrační metody, je založena buď na bázi shlukování mrtvých a poškozených spermií a jiných částic v důsledku fyzické bariéry vytvořené křemičitym koloidem, nebo na bázi přímé interakce mezi membránovými proteiny a částicemi koloidu (Rodriguez-Martinez et al., 1997; Januskauskas, 2005). Technika byla využita v několika pracích před sexací spermatu pomocí průtokové cytometrie s cílem optimalizovat vlastní proces sexace (Hollinshead et al., 2004). Maxwell et al. (2007) nezjistili, statisticky významné rozdíly v aktivitě spermií po prvním a druhém rozmrazení. Dále udávají, že u filtrovaných vzorků byl významně vyšší podíl spermií s nenarušeným akrozomem zjišťovaný mikroskopicky s fázovým kontrastem i pomocí průtokové cytometrie. Studie však neuvádí podíl odstraněných spermií a vzorků, neboť jejich cílem nebylo zhodnotit podíl spermií, které přežijí dvojí mrazení. Potvrzena byla i oplozovací schopnost spermií filtrovaných touto metodou *in-vitro* (Thys et al., 2009).

3.4.4.3 Objem mrazeného spermatu

Byla ověřena možnost mrazit sperma různých druhů hospodářských zvířat ve velkoobjemových tubách o objemu 1,2 ml, 5 ml, 8 ml a 12 ml. Všechny práce potvrzují možnost mrazení spermatu ve velkém objemu, i když většina z nich uvádí horší kvalitativní parametry spermatu mrazeného ve velkoobjemových tubách ve srovnání s čerstvým ejakulátem (Gaciuta a Arav, 2005) i ve srovnání s ejakuláty mrazenými v malých objemech (Horváth et al., 2007; Saragusty et al. 2007; Saragusty et al., 2009). Objem mrazeného ejakulátu má vliv i na oplozovací schopnost ejakulátů mrazených ve velkoobjemových tubách (Horváth et al., 2007).

Na úspěšnost mrazitelnosti spermatu ve velkoobjemových tubách má dle dostupných zdrojů vliv velikost tuby, přičemž menší tuby se jeví jako výhodnější (Horváth et al., 2007) a metoda mrazení, přičemž metoda MTG je průkazně vhodnější oproti konvenční metodě. Sperma mrazené v 8 ml tubách metodou MTG vykazuje statisticky významně vyšší přímočarý pohyb ($50,2 \pm 1,5 \%$ vs. $37,4 \pm 1,5 \%$), přežitelnost ($53,6 \pm 1,5 \%$ vs. $39,5 \pm 1,4 \%$) a integritu membrán ($36,2 \pm 1,3 \%$ vs. $26,5 \pm 1,1 \%$) ve srovnání s konvenční metodou mrazení (Saragusty et al., 2007).

Otázkou ale zůstává, zda mrazení spermatu býků v objemu 8 ml je nejvýhodnější metodou kryokonzervace ve velkém objemu. V současných zdrojích není dostupná práce, která by se zabývala vlivem objemu ejakulátu na jeho mrazitelnost ve velkých objemech, či vlivu individuality býka/plemene na mrazitelnost v různých objemech. Jde přitom o důležité poznatky ve vztahu k dalšímu rozvoji DF.

3.4.4.4 Interakce rychlosti mrazení a mrazícího média

Je rovněž známa silná interakce mezi mrazícím médiem a rychlostí mrazení. Isotonická cukernatá média poskytují lepší ochranu při využití střední rychlosti mrazení a při vysoké rychlosti mrazení. Nicméně vyšší stupeň ochrany při vysoké rychlosti mrazení poskytují vysoce osmotická cukernatá média. Přítomnost cukrů pravděpodobně zvyšuje odolnost membrán k rychlým fyzikálním a morfologickým změnám, které nastávají při rychlém vyloučení vody ze spermií. Má se za to, že je to dáno vznikem vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami cukrů a polárními konci fosfolipidů, takže nahrazují molekuly vody při dehydrataci spermií. Cukry rovněž mohou pomáhat při prevenci poškození spermií zachytáváním solí do viskózních a až téměř sklovitých fází (Woelders et al, 1997).

V hypertonických médiích jsou spermie poškozovány ve vyšší míře, než při samotném mrazení. To je způsobeno patrně skutečností, že v hypertonickém médiu musí spermie přetrvat v dehydrovaném stavu po delší dobu (cca 1 h) při teplotách nad 5 – 7°C (Woelders et al., 1997)

3.4.5 Rozmrazování

Rozmrazování představuje inverzní jev procesu mrazení. Rychlost rozmrazování inseminační dávky významně ovlivňuje přežitelnost spermií a z tohoto úhlu pohledu je stejně významná jako rychlost mrazení. Během tohoto procesu jsou spermie opět vystavovány několika negativním jevům. Mohou být poškozeny rekrystalizací ledu při velmi rychlém rozmrazování (Salamon a Maxwell, 2000), která má za následek disrupce cytoplasmatické membrány (Watson, 1990). Naopak příjem vody spermiemi při pomalém rozmrazování může způsobit popraskání membrán (Mazur et al., 1970). Ze závěrů studií, jejichž autoři se zabývali rychlostí rozmrazování inseminačních dávek pak plyne, že nejvhodnějším je z hlediska minimalizace rekrystalizace rychlé rozmrazení (Ennen et al., 1976; Pursel et Park, 1985; Salamon et Maxwell, 1995). Nicméně doporučená rychlost rozmrazování je ovlivněna několika faktory jako například typem ředidla a koncentrací glycerolu (Rodriguez et al., 1975).

Tyto studie se však týkají pouze spermatu mrazeného v pejetách o objemu 0,25 nebo 0,5 ml. Rozmrazování spermatu mrazeného ve velkých objemech provedli Saragusty et al.

(2009) umístěním vzorku po dobu 90 s v pokojové teplotě a jeho následným ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C na dobu 60 s. Horváth et al. (2007) pak vzorek drželi 45 s při pokojové teplotě a následně ho umístili do vodní lázně o teplotě 40°C na dobu 60 s. Nicméně v současných zdrojích nejsou dostupné žádné informace o porovnání efektivity postupů rozmrazování spermatu býků mrazeného ve velkých objemech ani dopadech postupů rozmrazování na sperma mrazené v různých objemech. Identifikace vhodného postupu rozmrazování tak patří mezi priority pro další rozvoj metody DF.

4 MATERIÁL A METODIKA

V průběhu let 2014 – 2016 byly opakovaně odebírány ejakuláty předem vybraných plemenných býků na inseminační stanici v Hradištku pod Medníkem (Natural, s. r. o.). Všichni býci byli podobného věku (4-5 let), zdraví, pohlavně dospělí a vykazující patričné libido. Býci byli odebíráni se stejnou frekvencí, chováni ve stejných podmínkách ustájení, napájení i výživy. Býkům byla podávána stejná krmná dávka: seno (10 kg), sláma (5 kg), sójový šrot (0,5 kg), směs obilných šrotů: 1/3 ovesného, 1/3 pšeničného a 1/3 ječného šrotu, v celkové dávce 3 kg a směs minerálií Premin 22 Natural od firmy VVS Verměřovice s. r. o.

Odběr spermatu byl prováděn standardním způsobem (Louda et al., 2007) za použití zkrácené umělé vagíny předeřtáté na 38 °C. Odběry prováděl vždy stejný technik. Sběrač s odebraným spermatem byl předán do laboratoře bezprostředně po odběru.

Ke stanovení podílu spermií s neporušenou membránou byl použit HOS-1 test dle metodiky uváděné Jeyendranem et al. (1984) a Padrikem et al. (2012).

4.1 METODICKÝ OKRUH 1 – ROZMRAZOVÁNÍ VELKÝCH OBJEMŮ

Cílem prvního okruhu bylo porovnat vliv různých postupů rozmrazení na kvalitativní parametry spermatu mrazeného v různých objemech (4 ml, 8 ml a 12 ml) a potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, že rozdílné metody rozmrazení ovlivní kvalitu ejakulátu mrazeného v různě velkých objemech. Tato fáze probíhala v letech 2014 – 2015.

4.1.1 Hodnocení kvality čerstvého ejakulátu

Čerstvě odebraný ejakulát 4 býků holštýnského plemene a 4 býků českého strakatého plemene byl hodnocen proškoleným personálem laboratoře dle standardní metodiky (Věžník et al., 2004). Hodnocení bylo prováděno po celou dobu trvání pokusu stejným technikem, aby se předešlo subjektivní interpretaci výsledků (Auger et al., 2000, Toft et al., 2005, Walczak-Jedrzejowska et al., 2013). Ejakulát byl nejdříve zhodnocen senzoricky na přítomnost nežádoucích přímísenin, zbarvení a zápachů. Následně byl objem ejakulátu stanoven vážením na digitální automatické váze KERN 440-47N (Kern&Sohn GmbH Ziegel, Balingen, Německo). Hustota (HUS) byla stanovena pomocí kalibrovaného fotometru (Carl-Zeiss Jena, Oberkochen, Německo). Aktivita (AKT) byla hodnocena subjektivní metodou za použití mikroskopu s fázovým kontrastem (Meopta, Praha, Československo) vybaveného výhřevnou deskou (38 °C). Vzorek čerstvého ejakulátu byl napipetován do 0,5 ml fyziologického roztoku

(0,9 % NaCl) předeřátého na 38 °C a promísen. Následně byl odpipetován vzorek určený k hodnocení na předeřáté podložní sklíčko. Sledováno bylo vždy minimálně 10 polí v každém vzorku. Stanovení podílu spermií s přímočarým pohybem (AP) bylo prováděno po celou dobu trvání pokusu stejným technikem, aby se předešlo rozdílné interpretaci výsledků (Auger et al., 2000, Toft et al., 2005, Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

K dalšímu zpracování bylo použito pouze sperma o hustotě minimálně $0,6 \times 10^6$ v mm^3 , s minimální aktivitou 70 % (přimočarý pohyb za hlavičkou, odpovídající rychlosti).

K detekci celistvosti membrán u čerstvě odebraného ejakulátu byl proveden HOS test. Roztok 7,35 g citrátu sodného a 13,51 g fruktózy v 1 l destilované vody byl připraven v laboratoři ČZU. Do eppendorfových zkumavek byl odpipetován 1 ml roztoku. Zkumavky s roztokem byly pečlivě uzavřeny, umístěny do uzavíratelného igelitového sáčku a zmrazeny na teplotu -16°C. Před výrobou vzorku byly zkumavky s roztokem umístěny do vodní lázně o teplotě 38 °C po dobu 30 minut, tak aby došlo k jejich rozmrazení a zahřátí na požadovanou teplotu. Z čerstvého ejakulátu a ejakulátů mrazených ve velkých objemech bylo do zkumavek s předeřátým roztokem odpipetováno 100 μl ředěného spermatu. Při hodnocení inseminačních dávek byl do zkumavky vyprázdněn obsah jedné pejety. Vzorek byl promísen a inkubován ve vodní lázni po dobu 30 minut. Z takto připravené emulze bylo odpipetováno 20 μl na předeřáté hodinové sklo (37 ± 1 °C), krouživými pohyby smíseno s 20 μl eosinu (Minitüb, Tiefenbach, Německo) a po 30 sekundách bylo do směsi přidáno 40 μl nigrosinu (Minitüb, Tiefenbach, Německo). Následně byl proveden roztěr 20 μl směsi na předeřáté podložní sklíčko. K hodnocení vzorků HOS byl použit mikroskop s fázovým kontrastem a zvětšení 1000x. Celkem bylo hodnoceno minimálně 200 spermií v každém vzorku. Následně byl vypočten procentický podíl spermií, jejichž membrány reagovaly na hypoosmotické prostředí (stočený bičík). Hodnocení bylo prováděno vždy stejným technikem, aby se předešlo subjektivně podmíněným rozdílům v hodnocení.

4.1.2 Zpracování spermatu a výroba vzorků

Ejakuláty vhodné pro další zpracování byly naředěny v poměru 1:3 ředidlem Andromed (Minitüb, Tiefenbach, Německo) připraveného dle návodu výrobce. Ředěné ejakuláty byly promíseny na oscilačním stolku po dobu tří minut. Z naředěného ejakulátu byl proveden HOS test.

Poté byly pomocí automatické pipety odebrány 3 vzorky od každého sledovaného objemu do předem připravených a označených sáčků o rozměrech 3,5 x 11 cm vyrobených z nespermicidního plastu. Z každého ejakulátu byla vyrobena jedna sada tří vzorků o objemu 4

ml nebo 8 ml nebo 12 ml. Výroba více sad o rozdílných objemech byla realizována v případech, kdy bylo získáno dostatečné množství ředěného ejakulátu. Vzorky byly uloženy do horizontální polohy na papírové podložky umístěné na standardním nosiči pejet a chlazeny a ekvilibrovány po dobu 2 hodin při 5°C. Následně byly zmrazeny v automatickém mrazícím boxu DigitCool (IMV, L'Aigle, Francie). Při mrazení byla použita třífázová křivka (-5°C/min od +4°C do -10°C; -40°C/min z -10°C do -100°C a -20°C/min od -100°C do -140°C), kterou ve své fázi použil Muiño et al. (2007) a která je na dané inseminační stanici standardně používána. Zmrazené vzorky byly uloženy do tekutého dusíku (-196 °C) a skladovány po dobu jednoho týdne. Celkem bylo vyrobeno n=72 vzorků o objemu 4 ml, n=72 vzorků o objemu 8 ml a n=72 vzorků o objemu 12 ml.

4.1.3 Metody rozmrazování

Po vyjmutí z tekutého dusíku byl odstraněn obal a zmrazený vzorek byl přemístěn do nového plastického sáčku. Vodní lázeň použitá k rozmrazování vzorků obsahovala 5 litrů vody, aby nedošlo k jejímu ochlazení při rozmrazování vzorku.

Jeden vzorek z každé sady byl rozmrazen vždy pomocí jedné z následujících metod:

Metoda 1 (M1; pomalá): Umístění vzorku po dobu 90s v pokojové teplotě a jeho následné ponoření do vodní lázně o teplotě 37 °C na dobu 60 s. (Saragusty et al., 2009).

Metoda 2 (M2; středně rychlá): Umístění vzorku po dobu 45s v pokojové teplotě a jeho následné ponoření do vodní lázně o teplotě 40°C na dobu 60s. (Horváth et al., 2007).

Metoda 3 (M3; rychlá): Umístění vzorku po dobu 15s v pokojové teplotě a jeho následné ponoření do vodní lázně o teplotě 40°C na dobu 90s.

4.1.4 Hodnocení vzorků

Stanovení podílu spermií s přímočarým pohybem (aktivita) a stanovení podílu spermií s narušenou cytoplasmatickou membránou byla provedena výše uvedenými způsoby bezprostředně po rozmrazení vzorku (T0) a 30 minut po rozmrazení ejakulátu (T30). Vzhledem k tomu, že doba zpracování spermatu nemá překročit 15 – 20 minut (Ball et Peters, 2004), měla by tato doba být dostatečná pro naředění ejakulátu na konečnou hodnotu, naplnění do pejet a uložení na zchlazení a ekvilibraci při výrobě inseminačních dávek metodou DF. HOS test byl proveden v T0 za použití výše uvedeného postupu.

Ze získaných údajů byly vypočteny rozdíly mezi charakteristikami pohybu a celistvosti membrán u čerstvého, ředěného a rozmrazeného ejakulátu s cílem vyhodnotit změny v důsledku mrazení.

Rozdíly v podílu spermií s přímočarým pohybem po rozmrazení v časech T0 a T30 byly vypočteny s cílem vyhodnotit změny, které pravděpodobně nastanou při zpracování spermatu v rámci DF.

4.1.5 Statistická analýza

Data byla hodnocena pomocí statistických analýz za použití software SAS 9.3 (SAS/STAT® 9.3, 2011). K výpočtu základních charakteristik souboru byly použity procedury MEANS a UNIVARIATE. Procedura REG, metoda STEPWISE byla použita k výběru vhodného modelu. Rozdíly mezi sledovanými býky a jednotlivými skupinami byly hodnoceny pomocí metody GLM následovanou Tukey-Kramerovým testem k prokázání statistické významnosti rozdílů. U ejakulátů mrazených v objemech 4; 8 a 12 ml byly hodnoceny následující charakteristiky:

Modelová rovnice:

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + b^*(\text{BULL}) + e_{ijkl}$$

Kde:

y_{ijkl} - závislá proměnná (procento spermií s přímočarým pohybem bezprostředně po rozmrazení (T0), procento spermií s přímočarou aktivitou 30 minut po rozmrazení T30, procento spermií s nenarušenou membránou v oblasti bičíku po rozmrazení a jejich rozdíly ve srovnání s charakteristikami zjištěnými těsně po odběru),

μ - střední hodnota závisle proměnné;

a_i - fixní efekt plemene (pro 4 ml objem i = české strakaté plemeno, $n=36$; i = holštýnské plemeno, $n=36$; pro 8 ml objem i = české strakaté plemeno, $n=36$; i = holštýnské plemeno, $n=36$; pro 12 ml objem i = české strakaté plemeno, $n=36$; i = holštýnské plemeno, $n=36$);

b_j - fixní efekt spermií s aktivním pohybem v čerstvém ejakulátu (pro 4 ml objem j 70 – 79%, $n= 39$; $j=80 – 90\%$, $n= 33$; pro 8 ml objem j 70 – 79%, $n= 48$; $j=80 – 90\%$, $n= 24$; pro 12 ml objem j 70 – 79%, $n= 48$; $j=80 – 90\%$, $n= 24$);

c_k - fixní efekt metody rozmrazování (pro 4 ml objem $k= 1$ – první metoda, $n= 24$; $k= 2$ - druhá metoda, $n= 24$; $k=3$ – třetí metoda, $n= 24$; pro 8 ml objem $k= 1$ – první metoda, $n= 24$; $k= 2$ - druhá metoda, $n= 24$; $k=3$ – třetí metoda, $n= 24$; pro 12 ml objem $k= 1$ – první metoda, $n= 24$; $k= 2$ - druhá metoda, $n= 24$; $k=3$ – třetí metoda, $n= 24$);

$b^*(\text{BULL})$ - regrese mezi býky (celkem 8 býků)

e_{ijkl} - náhodná chyba.

Ke stanovení rozdílů mezi skupinami byly použity hladiny významnosti $P < 0,05$ a $P < 0,01$.

4.2 METODICKÝ OKRUH 2 – POROVNÁNÍ MRAZITELNOSTI V RŮZNĚ VELKÝCH OBJEMECH

Metoda dvojího mrazení zahrnuje, jak už napovídá její název, dva cykly mrazení a rozmrazení vzorků. Ředěné sperma je v prvním cyklu mrazení baleno buď v pejetách (de Graaf et al., 2007; Underwood et al., 2010) nebo ve velkých objemech. Saragusty et al. (2009) využili pro první mrazení spermatu býků objem 8 ml, zatímco Arav et al. (2002) objem 12 ml. Horváth et al. (2007) potom srovnávali úspěšnost mrazení spermatu kaprů v objemech 1,2 a 5 ml. Cílem druhého okruhu bylo porovnat vliv různých objemů (4 ml, 8 ml a 12 ml) na mrazitelnost spermatu býků ve velkých objemech. Horší mrazitelnost spermatu je definována sníženou aktivitou rozmrazeného spermatu u býků vykazujících normální parametry aktivity po odběru (Takahashi, 2012). Tato fáze probíhala v letech 2015 - 2016.

4.2.1 Hodnocení kvality čerstvého ejakulátu

Čerstvě odebraný ejakulát 7 býků holštýnského plemene a 6 býků českého strakatého plemene byl nejdříve zhodnocen senzoricke na přítomnost nežádoucích přímisenin, zbarvení a zápachu. Aktivita byla hodnocena pomocí systému CASA - Androvision (Minitübe, Tiefenbach, Německo) následujícím způsobem: vzorek čerstvého ejakulátu o objemu 25 μ l, byl promísen se 725 μ l fyziologického roztoku (poměr ředění 1:29) za pomoci elektronické pipety (Rainin E4 XLS, Mettler Toledo, USA). Poměr ředění byl zvolen na základě doporučení pro přípravu vzorků k hodnocení pomocí Androvision vydaného společností Minitüb. Vysoká hustota hodnocených vzorků zkresluje analýzu parametrů kinetiky. (Verstegen et al., 2002; Contri et al., 2010). Promísený vzorek byl umístěn do zkumavky předeřáté na 38 °C ze které byly odpipetovány 3 μ l roztoku do počítačící komůrky Leja 20 mikronů (Leja, Holandsko) rovněž předeřátého na 38 °C. Takto připravený vzorek byl hodnocen pomocí systému CASA - Androvision (Mintüb, Tiefenbach, Německo) propojeného s fázovým mikroskopem Zeiss Axiolab A1 (Carl Zeiss, Německo). Pro standardizaci analýzy byl mikroskop vybaven vyhřívající deskou (38 °C) s kalibrovaným automatickým posuvem (Mintüb, Tiefenbach, Německo). Hodnocen byl podíl aktivních spermií, podíl spermií s přímočarou aktivitou a hustota ejakulátu a to vždy ve čtyřech polích při zvětšení 200x. Objem ejakulátu byl stanoven vážením na digitální automatické váze KERN 440-47N (Kern&Sohn GmbH Ziegel, Německo)

K dalšímu zpracování byly použity pouze ejakuláty s minimální přímočarou aktivitou 60 % a hustotou $0,4 \times 10^6$ v mm^3 .

4.2.2 Zpracování spermatu a výroba vzorků

Od každého býka bylo v průběhu pokusu odebráno 5 ejakulátů vhodných pro další zpracování (n=65). Ejakuláty byly naředěny v poměru 1:3 ředidlem Andromed (Minitüb, Tiefenbach, Německo) připraveného dle návodu výrobce a obohaceného o přídavek LDL. Přídavek LDL tvořil 6 % celkového objemu ředidla, tedy koncentrace doporučené Bencharifem et al. (2012). LDL o 97 % čistotě bylo připraveno dle návodu Moussy et al. (2002) v laboratoři BIOPHARM (Výzkumný ústav biofarmacie a veterinárních léčiv, Jílové u Prahy, Česká republika). Ředěné ejakuláty byly promíseny na oscilačním stolku po dobu tří minut. Poté byly pomocí automatické pipety odebrány z každého ejakulátu vzorky o objemu 4 ml, 8 ml a 12 ml a umístěny do předem připravených a označených sáčků z nespermicidního materiálu o rozměrech 3,5 x 11 cm. Vzorky byly uloženy do horizontální polohy na perforované papírové podložky umístěné na standardním nosiči pejet a chlazeny a ekvilibrovány po dobu 2 hodin při 5°C. Následně byly zmrazeny v automatickém mrazícím boxu DigitCool (IMV, L'Aigle, Francie). Při mrazení byla použita dvoufázová křivka (-4°C/min od +4°C do -10°C a 40°C/min od -10 do -150°C), kterou označili za nejvýhodnější pro mrazení spermatu býků Doležalová et al., (2015). Zmrazené vzorky byly uloženy do tekutého dusíku (-196 °C) a skladovány po dobu jednoho týdne. Vzorky byly rozmrazeny pomocí metody 1, která byla v první fázi výzkumu identifikována jako nejvýhodnější bez ohledu na objem vzorku.

Rozmrazený ejakulát byl doředěn na počet 20×10^6 spermií v dávce, naplněn a uzavřen do pejet o objemu 0,25 ml pomocí systému MPP Quatro (Minitüb, Tiefenbach, Německo), zchlazen a ekvilibrován po dobu jedné hodiny (5 °C) a zmrazen za použití dvojfázové mrazicí křivky DigitCool (IMV, L'Aigle, Francie). Zmrazené pejety vyrobené metodou DF byly uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem, ve kterém byly skladovány po dobu minimálně jednoho týdne.

4.2.3 Hodnocení vzorků

4.2.3.1 Velké objemy

Aktivita vzorků byla hodnocena bezprostředně po rozmrazení a dále v třicetiminutových intervalech po dobu jedné hodiny (T0, T30 a T60) pomocí systému Androvision. Z rozmrazeného ejakulátu byl pomocí automatické pipety odpipetován 1 ml do prázdné zkumavky předehřáté na 38 °C umístěné v termobloku. Lenz et al. (2010) našli statisticky významně nižší aktivitu u rozmrazených vzorků hodnocených pomocí komůrek

Leja. Proto byla k dalším analýzám využita standardní podložní skla předehřátá na 38 °C. Sledována byla celková aktivita, přímočará aktivita, přímočará aktivita rychlá (dle WHO klasifikováno A) a přímočará aktivita pomalá (dle WHO klasifikováno B).

HOS test byl proveden v T0 za použití výše uvedeného postupu.

Ke stanovení procenta živých a mrtvých spermií bylo použito barvení eosinem a nigrosinem po 30 minutách inkubace vzorku v roztoku HOS, kdy 20 µl vzorku bylo krouživými pohyby promíseno s 20 µl eosinu po dobu 30 s na předehřátém hodinovém skle (37±1 °C) umístěném na vyhřevné desce. Následně bylo přidáno 40 µl nigrosinu. Z takto připravené suspence bylo odebráno 20 µl a napipetováno na předehřáté podložní sklíčko a byl proveden roztěr. Roztěry byly vyhodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem Zeiss Axiolab A1 (Carl Zeiss, Germany) při zvětšení 1000x. V každém vzorku bylo vyhodnoceno minimálně 200 spermií. Dle doporučení Grahama et al. (1990) byly spermie s červenými a růžovými hlavičkami hodnoceny jako mrtvé a spermie s bílými hlavičkami jako živé. Vyjádřen byl procentuální podíl živých spermií.

4.2.3.2 Inseminační dávky

Inseminační dávky byly rozmrazeny standardním postupem používaným na inseminační stanici býků Hradištka, tj. ve vodní lázni o teplotě 40 °C po dobu 40 sekund. Obsah dvou inseminačních dávek z každé varianty byl vyprázdněn do předehřáté zkumavky s 1 ml fyziologického roztoku (0,9 % NaCl). Aktivita byla hodnocena stejným způsobem a za pomoci stejného vybavení použitými při hodnocení rozmrazených ejakulátů mrazených ve velkých objemech. Sledovány byly stejné parametry pohybu bezprostředně po rozmrazení a následně v šedesátiminutových intervalech (T0, T60, T120) po dobu dvou hodin (termodynamický test přežitelnosti spermií; TDT). Zkumavka se vzorkem byla po celou dobu trvání TDT umístěna v termobloku a udržována při teplotě 38 °C.

Obsah jedné inseminační dávky byl použit ke stanovení podílu spermií s celistvými cytoplasmatickými membránami (HOS) a ke stanovení podílu živých spermií pomocí barvení eosinem a nigrosinem. Byly použity výše popsané postupy přípravy a hodnocení vzorků.

4.2.4 Statistická analýza

4.2.4.1 Regresní a korelační analýza

Z databáze shromážděných údajů byly vypočteny v programu SAS 9.2 (SAS Institute Inc. 2002 – 2005) regresní analýza a koeficienty korelace pomocí procedury REG a CORR.

Získané údaje byly hodnoceny pomocí statistických analýz za použití software SAS 9.3 (SAS/STAT® 9.3, 2011).

4.2.4.2 Asociační analýza

K výpočtu základních charakteristik souboru byly použity procedury MEANS a UNIVARIATE. Vliv velikosti objemu na sledované parametry aktivity, podíl živých spermií a podíl spermií s nenarušenou membránou byl hodnocen analýzou rozptylu s jednou proměnnou (ANOVA) s opakovatelností použitím GLM procedury v programu SAS 9.2. Průkaznost vlivu jednotlivých objemů byla určena pomocí F-testu.

Poté byly nalezené signifikantní rozdíly mezi skupinami dle plemene, hustoty čerstvého ejakulátu a individualitou býka stanoveny pomocí mnohonásobného porovnávání. následovanou Tukey-Kramerovým testem k prokázání statistické významnosti rozdílů.

Pro hodnocení mrazitelnosti spermatu býků ve velkých objemech byly použity následující modelové rovnice:

- a) Pro vyhodnocení interakce mezi objemem při prvním mrazení a plemenem byl použit následující model:

Modelová rovnice

$$y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = procento spermií s celkovým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s přímočarým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s rychlým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s pomalým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s nenarušenou membránou po rozmrazení a procento živých spermií po rozmrazení, pejeta - procento spermií s celkovým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s přímočarým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s rychlým pohybem bezprostředně v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s pomalým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s nenarušenou membránou po rozmrazení a pejeta - procento živých spermií po rozmrazení

μ = průměrná hodnota závisle proměnné

a_i = fixní efekt plemene (i = holštýnské plemeno, $n = 105$; i = ČESTR $n = 90$)

b_j = fixní efekt varianty ($j=4$, $n = 65$; $j=8$, $n = 65$; $j=12$, $n = 65$)

ab_{ij} = efekt interakce plemeno x varianta (ij = holštýnské plemeno x varianta 4, $n = 35$; ij = holštýnské plemeno x 8, $n = 35$; ij = holštýnské plemeno x 12, $n = 35$; ij = ČESTR x 4, $n = 30$; ij = ČESTR x 8, $n = 30$; ij = ČESTR x 12, $n = 30$)

e_{ijk} = náhodná chyba

- b) Pro vyhodnocení interakce mezi objemem při prvním mrazení a hustotou čerstvého ejakulátu byl použit následující model:

Modelová rovnice

$$y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = procento spermií s celkovým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s přímočarým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s rychlým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s pomalým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s nenarušenou membránou po rozmrazení a procento živých spermií po rozmrazení, pejeta - procento spermií s celkovým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s přímočarým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s rychlým pohybem bezprostředně v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s pomalým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s nenarušenou membránou po rozmrazení a pejeta - procento živých spermií po rozmrazení

μ = průměrná hodnota závisle proměnné

a_i = fixní efekt skupiny hustoty ($i = < 0,70$, $n = 75$; $i = 0,70 - 1,08$, $n = 66$; $i = > 1,08$, $n = 54$)

b_j = fixní efekt varianty ($j = 4$, $n = 65$; $j = 8$, $n = 65$; $j = 12$, $n = 65$)

ab_{ij} = efekt interakce skupina hustoty x varianta ($ij =$ hustota $< 0,70$ x varianta 4, $n = 25$; $ij = < 0,70$ x 8, $n = 25$; $ij = < 0,70$ x 12, $n = 25$; $ij = 0,70 - 1,08$ x 4, $n = 22$; $ij = 0,70 - 1,08$ x 8, $n = 22$; $ij = 0,70 - 1,08$ x 12, $n = 22$; $ij = > 1,08$ x 4, $n = 18$; $ij = > 1,08$ x 8, $n = 18$; $ij = > 1,08$ x 12, $n = 18$)

e_{ijk} = náhodná chyba

- c) Pro vyhodnocení interakce mezi objemem při prvním mrazení a býkem byl použit následující model:

Modelová rovnice

$$y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = procento spermií s celkovým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s přímočarým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s rychlým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s pomalým pohybem v T0, T30, T60, procento spermií s nenarušenou membránou po rozmrazení a procento živých spermií po rozmrazení, pejeta - procento spermií s celkovým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s přímočarým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s rychlým pohybem bezprostředně v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s pomalým pohybem v T0, T60, T120, pejeta - procento spermií s nenarušenou membránou po rozmrazení a pejeta - procento živých spermií po rozmrazení

μ = průměrná hodnota závisle proměnné

a_i = fixní efekt býka (i = COLMAN, $n = 15$; i = KORN, $n = 15$, i = LATEX, $n = 15$, i = LEWIS, $n = 15$, i = LYON, $n = 15$, i = MARTIN, $n = 15$, i = MONTEKO, $n = 15$, i = PIKANT, $n = 15$, i = POLLEDSTAR, $n = 15$, i = REBEL, $n = 15$, i = SUNSHINE, $n = 15$, i = SUNWAY, $n = 15$, i = SUREBOY, $n = 15$)

b_j = fixní efekt varianty ($j=4$, $n = 65$; $j=8$, $n = 65$; $j=12$, $n = 65$)

ab_{ij} = efekt interakce býk x varianta (ij = COLMAN x varianta 4 ml, $n = 5$; ij = COLMAN x 8 ml, $n = 5$; ij = COLMAN x 12 ml, $n = 5$; ij = KORN x 4 ml, $n = 5$, ij = KORN x 8 ml, $n = 5$, ij = KORN x 12 ml, $n = 5$, ij = LATEX x 4 ml, $n = 5$, ij = LATEX x 8 ml, $n = 5$, ij = LATEX x 12 ml, $n = 5$, ij = LEWIS x 4 ml, $n = 5$, ij = LEWIS x 8 ml, $n = 5$, ij = LEWIS x 12 ml, $n = 5$, ij = LYON x 4 ml, $n = 5$, ij = LYON x 8 ml, $n = 5$, ij = LYON x 12 ml, $n = 5$, ij = MARTIN x 4 ml, $n = 5$, ij = MARTIN x 8 ml, $n = 5$, ij = MARTIN x 12 ml, $n = 5$, ij = MONTEKO x 4 ml, $n = 5$, ij = MONTEKO x 8 ml, $n = 5$, ij = MONTEKO x 12 ml, $n = 5$, ij = PIKANT x 4 ml, $n = 5$, ij = PIKANT x 8 ml, $n = 5$, ij = PIKANT x 12 ml, $n = 5$, ij = POLLEDSTAR x 4 ml, $n = 5$, ij = POLLEDSTAR x 8 ml, $n = 5$, ij = POLLEDSTAR x 12 ml, $n = 5$, ij = REBEL x 4 ml, $n = 5$, ij = REBEL x 8 ml, $n = 5$, ij = REBEL x 12 ml, $n = 5$, ij = SUNSHINE x 4 ml, $n = 5$, ij = SUNSHINE x 8 ml, $n = 5$, ij = SUNSHINE x 12 ml, $n = 5$, ij = SUNWAY x 4 ml, $n = 5$, ij = SUNWAY x 8 ml, $n = 5$, ij = SUNWAY x 12 ml, $n = 5$, ij = SUREBOY x 4 ml, $n = 5$, ij = SUREBOY x 8 ml, $n = 5$, ij = SUREBOY x 12 ml, $n = 5$)

e_{ijk} = náhodná chyba

Ke stanovení rozdílů mezi skupinami byly použity hladiny významnosti $P < 0.05$ a $P < 0.01$.

5 VÝSLEDKY

5.1 METODICKÝ OKRUH 1 - ROZMRAZOVÁNÍ VELKÝCH OBJEMŮ

V této části práce byly srovnávány tři metody rozmrazení (M1; M2 a M3) u různých velkých vzorků spermatu mrazeného ve velkých objemech (4; 8 a 12 ml). Hodnocen byl podíl spermií s přímočarým pohybem (AP; aktivita přímočará) bezprostředně po rozmrazení (T0) a 30 minut po rozmrazení (T30) a podíl spermií s neporušenou cytoplasmatickou membránou (NM; neporušená membrána) u čerstvých a rozmrazených ejakulátů.

5.1.1 Rozmrazování vzorků o objemu 4 ml

V této části pokusu bylo hodnoceno $n=72$ vzorků. Z charakteristik získaných statistickou analýzou byla v čase T0 zjištěna průměrná AP $23,7 \pm 13,59$ % a v čase T30 potom $16,3 \pm 12,12$ %. Dále byl vypočten průměrný pokles AP v T0 ve srovnání s čerstvým ejakulátem, jehož hodnota dosáhla $-51,5 \pm 13,8$ % a pokles AP v časech T0 a T30 $-7,4 \pm 8,29$ %. Průměrný podíl NM po rozmrazení byl $18,6 \pm 10,76$ %. Průměrné charakteristiky spermatu mrazeného v objemu 4 ml jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Průměrné charakteristiky spermatu mrazeného v objemu 4 ml ($n=72$)

| | průměr | S | min. | max. | s.e. |
|--|--------|-------|--------|-------|------|
| Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) po rozmrazení (T0) – AP v T0 | 23,7 | 13,59 | 1 | 60 | 1,51 |
| Rozdíl mezi AP čerstvého ejakulátu a v T0 | -51,5 | 13,77 | -78 | 20 | 1,53 |
| Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) 30 minut po rozmrazení (T30) – AP v T30 | 16,3 | 12,12 | 0 | 47 | 1,35 |
| Rozdíl mezi AP v T0 a v T30 | -7,4 | 8,29 | -30 | 10 | 0,92 |
| Podíl spermií s neporušenými membránami (NM (SIM) po rozmrazení (T0) – NM v T0 | 18,6 | 10,76 | 0 | 64,35 | 1,20 |
| Rozdíl mezi NM u čerstvého ejakulátu a v T0 | -32,0 | 19,41 | -75,5 | 9,30 | 2,16 |
| Rozdíl mezi NM u ředěného ejakulátu a v T0 | -37,7 | 19,87 | -72,03 | 18,74 | 2,21 |

Dle výsledků statistické analýzy byl potvrzen signifikantní ($P < 0,05$) vliv plemene na mrazitelnost spermatu býků ve velkých objemech. U spermatu odebraného býkům holštýnského plemene byla AP sice neprůkazně vyšší v T0 (26,7 %) ve srovnání s českým strakatým plemenem (20,7 %), nicméně její hodnoty byly statisticky průkazně vyšší v T30 u holštýnského plemene (19,00 % vs. 13,5 %; $P < 0,05$). Je rovněž zajímavé, že pokles NM při srovnání hodnot zjištěných u čerstvého ejakulátu a v T0 byl statisticky průkazně nižší u býků holštýnského plemene (-26,9 %) oproti býkům českého stakatého plemene (-37,8 %; $P < 0,05$) a stejný trend byl pozorován u rozdílu v NM mezi ředěným ejakulátem a v T0. Tyto výsledky naznačují, že cytoplasmatické membrány spermií býků holštýnského plemene jsou odolnější vůči negativním vlivům vznikajícím v důsledku mrazení ve velkých objemech.

Byl rovněž vypočten statisticky významný ($P < 0,05$) vliv AP v čerstvém ejakulátu na pokles podílu spermií s AP u rozmrazeného ejakulátu v T0. Pokles aktivity byl vyšší u čerstvého ejakulátu vykazujícího AP 80 – 90 % a dosahoval -54,7 % ve srovnání s čerstvým ejakulátem o AP 70-79 %, kde byl zaznamenán pokles -48,7 %. To je pravděpodobně dáno faktem, že hodnoty v AP v T0 mezi hodnocenými skupinami se statisticky nelišily.

Mezi porovnávanými metodami rozmrazení nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P > 0,05$) v AP v T0, NM v T0 a v rozdílech charakteristik NM hodnocených v průběhu výrobního procesu. Nicméně AP v T30 byla statisticky průkazně vyšší ($P < 0,05$) u vzorků rozmrazených pomocí M1 (19,2 %) ve srovnání s M2 (11,5 %). Dále byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v poklesu AP, coby nežádoucího jevu, v rozmezí 30 minut po rozmrazení (mezi T0 a T30). Zjištěn byl nižší pokles AP při srovnání M1 (-4,9 %) a M2 (-11,3 %) na hladině významnosti $P < 0,01$ a při srovnání M3 (-6,1 %) a M2 (-11,3 %) na hladině významnosti $P < 0,05$.

Detailní výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2: Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) ve vzorcích vyrobených v objemu 4 ml dle plemene, AP v čerstvém ejakulátu a metody rozmrazení

| Vliv | Skupina | n | AP v T0 | Pokles AP mezi ČE a T0 | AP v T30 | Pokles AP mezi T0 a T30 |
|-------------------------|---------------------|----|-------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Plemeno | Český strakatý skot | 36 | 20,7 ± 2,20 | -54,7 ± 2,17 | 13,5 ± 1,86 ^a | -7,2 ± 1,27 |
| | Holštýnský skot | 36 | 26,7 ± 2,1, | -48,7 ± 2,10 | 19,0 ± 1,80 ^b | -7,7 ± 1,23 |
| AP v čerstvém ejakulátu | Nižší (70-79 %) | 39 | 22,1 ± 2,11 | -48,7 ± 2,09 ^a | 15,2 ± 1,78 | -6,9 ± 1,22 |
| | Vyšší (80-90 %) | 33 | 25,3 ± 2,18 | -54,7 ± 2,16 ^b | 17,3 ± 1,84 | -8,0 ± 1,26 |
| Metoda rozmrazení | M1 | 24 | 24,0 ± 2,26 | -51,3 ± 2,59 | 19,2 ± 2,21 ^a | -4,9 ± 1,51 ^A |
| | M2 | 24 | 22,8 ± 2,62 | -52,6 ± 2,59 | 11,5 ± 2,21 ^b | -11,3 ± 1,51 ^{B,a} |
| | M3 | 24 | 24,2 ± 2,62 | -51,2 ± 2,59 | 18,1 ± 2,21 | -6,12 ± 1,51 ^b |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T30- 30 minut po rozmrazení, ČE – čerstvý ejakulát, M1, M2, M3 – metoda rozmrazení 1, 2, 3.

Tabulka 3: Podíl spermií s nenarušenými membránami ve vzorcích vyrobených v objemu 4 ml dle plemene, AP v čerstvém ejakulátu a metody rozmrazení

| Vliv | Skupina | n | NM v T0 | Pokles NM mezi ČE a T0 | Pokles NM mezi ředěným ejakulátem a T0 |
|-------------------------|---------------------|----|-------------|---------------------------|--|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Plemeno | Český strakatý skot | 36 | 17,6 ± 1,77 | -37,8 ± 3,05 ^a | -44,4 ± 2,98 ^A |
| | Holštýnský skot | 36 | 19,6 ± 1,71 | -26,9 ± 2,95 ^b | -31,4 ± 2,88 ^B |
| AP v čerstvém ejakulátu | Nižší (70-79 %) | 39 | 17,5 ± 1,70 | -29,8 ± 2,93 | -39,7 ± 2,85 |
| | Vyšší (80-90 %) | 33 | 19,7 ± 1,75 | -34,9 ± 3,03 | -36,1 ± 2,95 |
| Metoda rozmrazení | M1 | 24 | 17,5 ± 2,10 | -33,5 ± 3,63 | -39,0 ± 3,54 |
| | M2 | 24 | 18,1 ± 2,10 | -32,8 ± 3,63 | -38,4 ± 3,54 |
| | M3 | 24 | 20,2 ± 2,10 | -30,7 ± 3,63 | -36,3 ± 3,54 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T30- 30 minut po rozmrazení, ČE – čerstvý ejakulát, M1, M2, M3 – metoda rozmrazení 1, 2, 3.

5.1.2 Rozmrazování vzorků o objemu 8 ml

Pro porovnání vlivu metody rozmrazení na mrazitelnost spermatu býků v objemu 8 ml bylo zhodnoceno celkem $n=72$ vzorků. Z charakteristik získaných statistickou analýzou byla zjištěna průměrná AP $25,1 \pm 12,58$ % v čase T0 a v čase T30 potom $17,9 \pm 11,54$ %. Dále byl vypočten průměrný pokles AP v T0 ve srovnání s čerstvým spermatem, jehož hodnota dosáhla

-49,3 ± 12,14 % a pokles AP v časech T0 a T30 -7,3 ± 6,34 %. Zjištěn byl průměrný podíl NM po rozmrazení 20,9 ± 11,20 % a pokles NM mezi čerstvým ejakulátem a rozmrazeným ejakulátem (T0) -32,9 ± 16,65 % Průměrné charakteristiky spermatu mrazeného v objemu 8 ml jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 4: Průměrné charakteristiky spermatu mrazeného v objemu 8 ml

| | n | průměr | S | min. | max. | s.e. |
|--|----|--------|-------|--------|------|------|
| Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) po rozmrazení (T0) – AP v T0 | 72 | 25,1 | 12,58 | 2 | 65 | 1,40 |
| Rozdíl mezi AP čerstvého ejakulátu a v T0 | 72 | -49,3 | 12,14 | -70 | -5 | 1,35 |
| Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) 30 minut po rozmrazení (T30) – AP v T30 | 72 | 17,9 | 11,54 | 0 | 45 | 1,28 |
| Podíl spermií s neporušenými membránami (NM (SIM) po rozmrazení (T0) – NM v T0 | 72 | 20,9 | 11,20 | 5 | 49,5 | 1,24 |
| Rozdíl mezi AP v T0 a v T30 | 72 | -7,3 | 6,34 | -30 | 0 | 0,70 |
| Rozdíl mezi NM u čerstvého ejakulátu a v T0 | 72 | -32,9 | 16,65 | -73,63 | 5 | 1,85 |
| Rozdíl mezi NM u ředěného ejakulátu a v T0 | 72 | -32,9 | 24,47 | -75,9 | 35 | 2,72 |

Rovněž u vzorků mrazených v objemu 8 ml byl statisticky ($P < 0,05$) potvrzen vliv plemene na AP a NM. Sperma holštýnských býků vykazovala oproti spermatu býků českého strakatého plemene statisticky průkazně ($P < 0,05$) vyšší AP v T0 (29,0 % vs. 23,5 %) i v T30 (22,1 % vs 15,9 %), nižší pokles AP mezi čerstvým ejakulátem a T0 (-46,3 % vs. 52,4 %) i nižší rozdíl v NM mezi čerstvým ejakulátem a T0 (28,5 % vs. 37,1 %).

Potvrzen byl i vliv AP v čerstvém ejakulátu na AP v T0. U vzorků s vyšší hodnotou AP (80 – 90 %) byly zjištěny statisticky průkazně ($P < 0,01$) vyšší hodnoty AP v T0 (30,1 % vs. 22,3 %) a i v T30 (22,9 % vs. 15,1 %; $P < 0,01$) oproti vzorkům s AP 70 – 79 %. Na sledované parametry NM nebyl vliv AP v čerstvém ejakulátu pozorován.

Metoda rozmrazení potom ovlivnila všechny sledované parametry AP vyjma poklesu AP mezi T0 a T30. Byla zjištěna statisticky průkazně ($P < 0,01$) vyšší AP v T0 (31,1 %) u vzorků rozmrazených M1 ve srovnání se vzorky rozmrazenými M2 (22,4 %). U vzorků rozmrazených M2 došlo rovněž k statisticky průkazně ($P < 0,05$) vyššímu poklesu AP mezi čerstvým ejakulátem a T0 (M2: -53,2 % a M1: -44,4 %). Vzorky rozmrazené M1 dosáhly v T30 hodnoty AP 23,3 %, což bylo opět statisticky průkazně více v srovnání se vzorky rozmrazenými M2. Ani metoda rozmrazení neměla průkazný vliv na sledované parametry NM.

Taulka 5: Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) ve vzorcích vyrobených v objemu 8 ml dle plemene, AP v čerstvém ejakulátu a metody rozmrazení

| Vliv | Skupina | n | AP v T0 | Pokles AP mezi ČE a T0 | AP v T30 | Pokles AP mezi T0 a T30 |
|-------------------------|---------------------|----|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Plemeno | Český strakatý skot | 36 | 23,5 ± 1,76 ^b | -52,4 ± 1,79 ^a | 15,9 ± 1,57 ^b | -7,6 ± 1,02 |
| | Holštýnský skot | 36 | 29,0 ± 1,88 ^a | -46,3 ± 1,91 ^b | 22,1 ± 1,67 ^a | -6,9 ± 1,09 |
| AP v čerstvém ejakulátu | Nižší (70-79 %) | 48 | 22,3 ± 1,58 ^B | -48,9 ± 1,60 | 15,1 ± 1,41 ^B | -7,3 ± 0,92 |
| | Vyšší (80-90 %) | 24 | 30,1 ± 2,07 ^A | -49,7 ± 2,10 | 22,9 ± 1,85 ^A | -7,2 ± 1,20 |
| Metoda rozmrazení | M1 | 24 | 31,1 ± 2,19 ^A | -44,4 ± 2,22 ^b | 23,3 ± 1,95 ^a | -7,8 ± 1,27 |
| | M2 | 24 | 22,4 ± 2,19 ^B | -53,2 ± 2,22 ^a | 15,6 ± 1,95 ^b | -6,8 ± 1,27 |
| | M3 | 24 | 25,2 ± 2,19 | -50,4 ± 2,22 | 18,1 ± 1,95 | -7,2 ± 1,27 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T30- 30 minut po rozmrazení, ČE – čerstvý ejakulát, M1, M2, M3 – metoda rozmrazení 1, 2, 3.

Tabulka 6: Podíl spermií s nenarušenými membránami ve vzorcích vyrobených v objemu 8 ml dle plemene, AP v čerstvém ejakulátu a metody rozmrazení

| Vliv | Skupina | n | NM v T0 | Pokles NM mezi ČE a T0 | Pokles NM mezi ředěným ejakulátem a T0 |
|-------------------------|-------------------|----|-------------|---------------------------|--|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Plemeno | Český strak. Skot | 36 | 22,1 ± 1,67 | -37,1 ± 2,48 ^a | -34,4 ± 3,86 |
| | Holštýnský skot | 36 | 20,8 ± 1,81 | -28,5 ± 2,65 ^b | -32,4 ± 4,12 |
| AP v čerstvém ejakulátu | Nižší (70-79 %) | 48 | 19,2 ± 1,52 | -32,6 ± 2,23 | -31,0 ± 3,46 |
| | Vyšší (80-90 %) | 24 | 23,7 ± 2,00 | -32,9 ± 2,93 | -35,9 ± 4,54 |
| Metoda rozmrazení | M1 | 24 | 22,3 ± 2,12 | -32,0 ± 3,09 | -32,7 ± 4,80 |
| | M2 | 24 | 17,6 ± 2,12 | -36,6 ± 3,09 | -37,3 ± 4,80 |
| | M3 | 24 | 24,5 ± 2,12 | -29,7 ± 3,09 | -30,4 ± 4,80 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami T0 - bezprostředně po rozmrazení, T30- 30 minut po rozmrazení, M1, M2, M3 – metoda rozmrazení 1, 2, 3.

5.1.3 Rozmrazování vzorků o objemu 12 ml

Celkem bylo hodnoceno n=72 vzorků. Z charakteristik získaných statistickou analýzou byla v čase T0 zjištěna průměrná AP 15,9 ± 12,54 %, v čase T30 potom 11,3 ± 12,48 % Dále

byl vypočten průměrný pokles AP v T0 ve srovnání s čerstvým spermatem, jehož hodnota dosáhla $-58,9 \pm 12,77$ % a pokles AP v čase T30 $-4,56 \pm 6,62$ % oproti T0. Průměrný podíl NM po rozmrazení byl $18,1 \pm 10,09$ % a pokles NM mezi čerstvým ejakulátem a rozmrazeným ejakulátem (T0) $34,6 \pm 20,53$ % Průměrné charakteristiky spermatu mrazeného v objemu 8 ml jsou uvedeny v tabulce 7.

Při pohledu na tyto výsledky je patrné, že sperma mrazené v objemu 12 ml vykazovalo horší parametry mrazitelnosti ve srovnání s objemy 4 ml a 8 ml. Nicméně vzorky byly vyrobeny z rozdílných skoků a ze statistického hlediska jsou v této fázi práce neporovnatelné.

Tabulka 7: Průměrné charakteristiky spermatu mrazeného v objemu 12 ml

| | n | průměr | s | min. | max. | s.e. |
|--|----|--------|-------|--------|-------|------|
| Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) po rozmrazení (T0) – AP v T0 | 72 | 15,9 | 12,54 | 2 | 55,0 | 1,48 |
| Rozdíl mezi AP čerstvého ejakulátu a v T0 | 72 | -58,9 | 12,77 | -85 | -25,0 | 1,50 |
| Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) 30 minut po rozmrazení (T30) – AP v T30 | 72 | 11,3 | 12,48 | 0 | 55,0 | 1,47 |
| Podíl spermií s neporušenými membránami (NM (SIM) po rozmrazení (T0) – NM v T0 | 72 | 18,1 | 10,09 | 2,88 | 60,9 | 1,19 |
| Rozdíl mezi AP v T0 a v T30 | 72 | -4,56 | 6,62 | -25 | -18,0 | 0,78 |
| Rozdíl mezi NM u čerstvého ejakulátu a v T0 | 72 | -34,6 | 20,53 | -72,74 | -15,9 | 2,42 |
| Rozdíl mezi NM u ředěného ejakulátu a v T0 | 72 | -38,6 | 27,54 | -84,98 | 34,28 | 3,25 |

I v tomto objemu byl potvrzen vliv plemene na mrazitelnost spermatu. Na rozdíl od výše uvedených objemů byl zjištěn průkazně ($P < 0,05$) nižší pokles v AP v časech T0 a T30 býků českého strakatého skotu (-1,9 %) ve srovnání s býky holštýnského plemene (-6,6 %). Odolnost spermatické membrány k procesu kryokonzervace, vyjádřená změnou dynamiky podílu spermií s nenarušenou membránou, však již opět kopírovala trend zjištěný u 4 ml a 8 ml objemu, tedy statisticky průkazně ($P < 0,01$) nižší rozdíl mezi NM v čerstvém ejakulátu a v T0 u holštýnského plemene (-26,8 % vs. 44,3 %), respektive v NM mezi ředěným ejakulátem a T0 (28,0 % vs. 50,6 %).

Ejakuláty s vyšší AP v čerstvém ejakulátu (80 - 90 %) opět dosáhly statisticky průkazně vyšších hodnot AP v T0 (20,0 % vs. 13,5 %) a v T30 (16,9 % vs. 8,0 %) oproti ejakulátům s nižší AP (70-79 %) v čerstvém ejakulátu. Ani v tomto objemu nebyl u těchto sledovaných skupin zjištěn statisticky průkazný rozdíl v NM a v dynamice jejich změn.

U spermatu mrazeného v objemu 12 ml nebyl potvrzen vliv metody rozmrazení u žádného ze sledovaných parametrů. U vzorků rozmrazených pomocí M1 a M3 byly zjištěny statisticky neprůkazně vyšší hodnoty AP v T0 a T30 oproti vzorkům rozmrazených M2.

Taulka 8: Podíl spermií s přímočarým pohybem (AP) ve vzorcích vyrobených v objemu 12 ml dle plemene, AP v čerstvém ejakulátu a metody rozmrazení

| Vliv | Skupina | n | AP v T0 | Pokles AP mezi ČE a T0 | AP v T30 | Pokles AP mezi T0 a T30 |
|-------------------------|-------------------|----|--------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Plemeno | Český strak. Skot | 36 | 15,2 ± 2,07 | -61,1 ± 2,12 | 13,3 ± 1,98 | -1,9 ± 0,99 ^A |
| | Holštýnský skot | 36 | 18,2 ± 2,20 | -57,9 ± 2,26 | 11,6 ± 2,11 | -6,6 ± 1,06 ^B |
| AP v čerstvém ejakulátu | Nižší (70-79 %) | 48 | 13,5 ± 1,87 ^a | -57,2 ± 1,91 | 8,0 ± 1,79 ^A | -5,4 ± 0,90 |
| | Vyšší (80-90 %) | 24 | 20,0 ± 2,43 ^b | -61,7 ± 2,49 | 16,9 ± 2,33 ^B | -3,1 ± 1,17 |
| Metoda rozmrazení | M1 | 24 | 18,3 ± 2,55 | -57,9 ± 2,61 | 14,2 ± 2,45 | -4,1 ± 1,23 |
| | M2 | 24 | 13,5 ± 2,55 | -62,6 ± 2,61 | 10,8 ± 2,45 | -2,7 ± 1,23 |
| | M3 | 24 | 18,3 ± 2,55 | -57,9 ± 2,61 | 12,3 ± 2,45 | -6,0 ± 1,23 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T30- 30 minut po rozmrazení, ČE – čerstvý ejakulát, M1, M2, M3 – metoda rozmrazení 1, 2, 3.

Tabulka 9: Podíl spermií s nenarušenými membránami ve vzorcích vyrobených v objemu 12 ml dle plemene, AP v čerstvém ejakulátu a metody rozmrazení

| Vliv | Skupina | n | NM v T0 | Pokles NM mezi ČE a T0 | Pokles NM mezi řaděným ejakulátem a T0 |
|-------------------------|-------------------|----|-------------|---------------------------|--|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Plemeno | Český strak. Skot | 36 | 17,9 ± 1,63 | -44,3 ± 2,96 ^A | -50,6 ± 3,63 ^A |
| | Holštýnský skot | 36 | 18,5 ± 1,73 | -26,8 ± 3,16 ^B | -28,0 ± 3,88 ^B |
| AP v čerstvém ejakulátu | Nižší (70-79 %) | 48 | 17,7 ± 1,47 | -31,8 ± 2,68 | -36,5 ± 3,29 |
| | Vyšší (80-90 %) | 24 | 18,6 ± 1,92 | -39,3 ± 3,49 | -42,1 ± 4,28 |
| Metoda rozmrazení | M1 | 24 | 20,6 ± 2,01 | -33,2 ± 3,66 | -36,9 ± 4,49 |
| | M2 | 24 | 14,8 ± 2,01 | -39,0 ± 3,66 | -42,7 ± 4,49 |
| | M3 | 24 | 19,2 ± 2,01 | -34,5 ± 3,66 | -38,2 ± 4,49 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami T0 - bezprostředně po rozmrazení, T30- 30 minut po rozmrazení, M1, M2, M3 – metoda rozmrazení 1, 2, 3.

5.2 METODICKÝ OKRUH 2 - POROVNÁNÍ MRAZITELNOSTI V RŮZNĚ VELKÝCH OBJEMECH

Cílem druhé poloviny pokusu bylo porovnat mrazitelnost spermatu býků v různých objemech (4 ml, 8 ml a 12 ml). Jako ukazatele mrazitelnosti byly vybrány podíl spermií s celkovým pohybem (AC), podíl spermií s přímočarým pohybem (AP; aktivita přímočará), podíl spermií s rychlým pohybem (AR), podíl spermií s pomalým pohybem (APO), podíl spermií s neporušnou cytoplasmatickou membránou (NM; neporušená membrána) a podíl živých spermií (ŽIV). Tato část pokusu byla rozdělena na dvě fáze:

- I. hodnocení mrazitelnosti ve velkých objemech
- II. hodnocení kvality inseminačních dávek vyrobených metodou DF

Mrazitelnost v jednotlivých objemech byla následně posuzována z hlediska interakcí mezi objemem při mrazení a plemenem, hustotou čerstvého ejakulátu a býky. Dále byly stanoveny korelace k parametrům kvality čerstvého ejakulátu, i k parametrům mrazitelnosti ve velkých objemech.

5.2.1 Fáze 1 - Hodnocení velkých objemů

V první fázi bylo hodnocení provedeno u vzorků ($n=195$) přímo mrazených v různých velkých objemech (4 ml, 8 ml a 12 ml). Zde byly analyzovány parametry aktivity/pohyblivosti spermií ve třech časových úsecích: bezprostředně po rozmrazení (T0), dále 30 minut po rozmrazení (T30) a nakonec 60 minut po rozmrazení (T60). Podíl NM byl hodnocen bezprostředně po rozmrazení a podíl ŽIV 30 minut po rozmrazení. Průměrné charakteristiky hodnoceného souboru jsou uvedeny v tabulce 10.

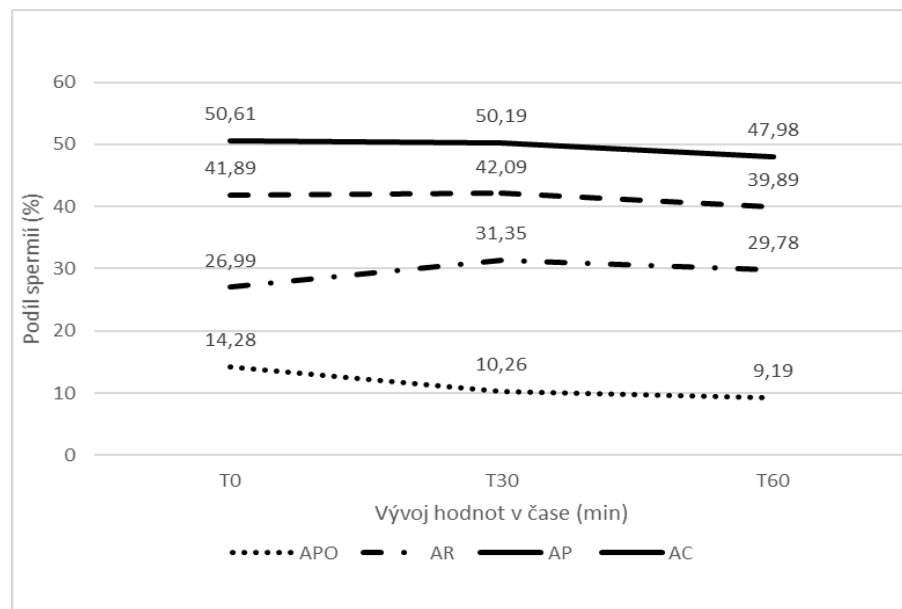
5.2.1.1 Výsledky sledovaných paramterů v základním souboru

Nejvyšší hodnoty AC bylo dosaženo v T0 ($50,6 \pm 16,75$ %). Hodnota AC v průběhu hodinového termodynamického testu klesla pouze o necelá 3 % (AC v T60: $48,0 \pm 17,35$ %).

Rovněž u AP jsme v průběhu sledování nezaznamenali větší změny, přičemž maxima bylo dosaženo v T30 (v T0 $41,9 \pm 16,36$ %, v T30 $42,1 \pm 17,17$ %, v T60 $40,0 \pm 16,78$ %). Je zajímavé, že nejnižší hodnoty AR bylo dosaženo v T0 ($27,0 \pm 13,40$ %). AR rovněž dosáhla svého maxima v T30 a to $31,4 \pm 14,81$ %. Poslední parametr aktivity, APO, pak vykazala relativně nejvyšší pokles v průběhu hodinového sledování. Maximum ($14,3 \pm 6,48$ %) bylo

zaznamenáno v T0, minimum ($9,2 \pm 4,90$ %) potom v T60. Vývoj hodnot podílu spermií u sledovaného parametru v čase je znázorňuje graf 1.

Graf 1: Vývoj hodnot podílu spermií u sledovaného parametru v čase



Kde: AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem,

Ve sledovaném souboru byl dále zjištěn průměrný podíl NM $18,0 \pm 8,75$ % a ŽIV $19,7 \pm 10,38$ %.

Tabulka 10: Průměrné charakteristiky spermatu mrazeného v objemech 4 ml, 8 ml a 12 ml

| Proměnná | n | x | s | min. | max. | s.e. | V (%) |
|-----------|-----|------|-------|------|------|------|-------|
| AC v T0 | 195 | 50,6 | 16,74 | 8,4 | 88,1 | 1,19 | 33,07 |
| AP v T0 | 195 | 41,9 | 16,36 | 4,7 | 83,8 | 1,16 | 39,06 |
| AR v T0 | 195 | 27,0 | 13,40 | 2,4 | 69,9 | 0,95 | 49,64 |
| APO v T0 | 195 | 14,3 | 6,48 | 0 | 33,6 | 0,46 | 45,40 |
| AC v T30 | 195 | 50,2 | 17,43 | 10,6 | 91,6 | 1,24 | 34,74 |
| AP v T30 | 195 | 42,1 | 17,17 | 8,4 | 85,6 | 1,22 | 40,79 |
| AR v T30 | 195 | 31,4 | 14,81 | 5,0 | 71,3 | 1,05 | 47,24 |
| APO v T30 | 195 | 10,3 | 4,97 | 0,3 | 31,5 | 0,35 | 48,43 |
| AC v T60 | 195 | 48,0 | 17,35 | 10,6 | 90,2 | 1,23 | 36,17 |
| AP v T60 | 195 | 40,0 | 16,78 | 5,8 | 80,9 | 1,19 | 42,06 |
| AR v T60 | 195 | 29,8 | 14,54 | 0,8 | 65,1 | 1,03 | 48,83 |
| APO v T60 | 195 | 9,2 | 4,90 | 1,6 | 29,9 | 0,35 | 53,33 |
| NM | 195 | 18,0 | 8,75 | 3,0 | 44,5 | 0,62 | 48,57 |
| ŽIV | 195 | 19,7 | 10,38 | 1,0 | 60,0 | 0,74 | 52,84 |

Kde: AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T30 – 30 minut po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, ŽIV – podíl živých spermií

V souboru byly dále stanoveny korelace sledovaných ukazatelů mrazitelnosti ve vztahu k AC, AP, hustotě a objemu odebraného ejakulátu.

Parametry aktivity AC, AP, AR u rozmrazených vzorků byly ve všech třech sledovaných časech ve velmi slabých a nadto statisticky neprůkazných ($P > 0,05$) korelacích k AC a AP v čerstvém ejakulátu. O něco vyšší, přesto však obecně slabé, korelace byly zjištěny u APO. Nejvyšší hodnoty dosáhly statisticky průkazné pozitivní korelace APO k AC v čerstvém ejakulátu $r = 0,19$ ($P < 0,01$), a APO k AP v čerstvém ejakulátu $r = 0,18$ ($P < 0,05$), obě v T0.

Zjištěné korelace parametrů aktivity k hustotě čerstvého ejakulátu měly slabě negativní trend, statisticky průkazný ($P < 0,05$) však byl pouze u AP v T0 ($r = -0,15$) a u AR v T0 ($r = -0,17$). Statisticky neprůkazné byly velmi slabé korelace mezi APO a hustotou ($r = 0,01$ až $0,05$).

Korelace parametrů aktivity k objemu čerstvého ejakulátu byly opět statisticky neprůkazné a pohybovaly se na úrovni $r = -0,09$ až $0,02$.

Tabulka 11: Korelace ($r=$) parametrů aktivity rozmrazených vzorků ($n=195$) k AC, AP, hustotě a objemu čerstvého ejakulátu.

| | AC | | | AP | | |
|----------|---------------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| | T0 | T30 | T60 | T0 | T30 | T60 |
| AC v ČE | 0,05 | 0,12 | 0,08 | 0,03 | 0,09 | 0,09 |
| AP v ČE | 0,05 | 0,13 | 0,09 | 0,04 | 0,11 | 0,10 |
| HUS v ČE | -0,12 | -0,06 | -0,08 | -0,15* | -0,11 | -0,09 |
| OBJ ČE | -0,08 | 0,01 | 0,01 | -0,09 | -0,01 | -0,03 |
| | AR | | | APO | | |
| | T0 | T30 | T60 | T0 | T30 | T60 |
| AC v ČE | -0,04 | 0,07 | 0,08 | 0,19** | 0,14 | 0,11 |
| AP v ČE | -0,03 | 0,09 | 0,09 | 0,18* | 0,13 | 0,12 |
| HUS v ČE | -0,17* | -0,13 | -0,12 | 0,01 | 0,04 | 0,05 |
| OBJ ČE | -0,06 | 0,02 | -0,02 | -0,08 | -0,09 | 0,00 |

Kde: ** - statistická významnost $P < 0,01$, * - statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T30 – 30 minut po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, HUS – hustota, OBJ – objem, ČE – čerstvý ejakulát

Středně silné pozitivní korelace byly zjištěny mezi NM a AC a AP v čerstvém ejakulátu, obě $r = 0,41$; $P < 0,01$ a mezi ŽIV a AC v čerstvém ejakulátu $r = 0,34$, $P < 0,01$ a mezi ŽIV a AP v čerstvém ejakulátu $r = 0,35$, $P < 0,01$. Korelace NM a ŽIV k hustotě a objemu byly opět velmi slabé a statisticky neprůkazné.

Tabulka 12: Korelace (r) podílu spermií s nenarušenou membránou a podílu živých spermií u rozmrazených vzorků ($n=195$) k AC, AP, hustotě a objemu čerstvého ejakulátu.

| | NM | ŽIV |
|----------|---------------|---------------|
| AC v ČE | 0,41** | 0,34** |
| AP v ČE | 0,41** | 0,35** |
| HUS v ČE | 0,13 | -0,04 |
| OBJ ČE | 0,08 | 0,00 |

Kde: ** - statistická významnost $P < 0,01$, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, ŽIV – podíl živých spermií

5.2.1.2 Vliv objemu vzorku na mrazitelnost spermatu býků

Z výsledků termodynamického testu je zřetelně patrné, že u vzorků mrazených v objemech 4 ml a 8 ml byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty AC, AP a AR v T0, T30 i T60 oproti vzorkům mrazeným v objemu 12 ml a to na hladinách statistické významnosti $P < 0,01$ a $P < 0,05$. U žádného ze sledovaných parametrů aktivity nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi vzorky vyrobenými v objemech 4 ml a 8 ml.

Nejvyšší hodnoty AC byly zaznamenány v T0 u objemu 8 ml a to $53,6 \pm 2,03$ % a v T30 rovněž u objemu 8 ml $53,6 \pm 2,11$ %. Tyto hodnoty se statisticky průkazně lišily od hodnot AC zjištěných u objemu 12 ml ($46,0 \pm 2,03$ % v T0, respektive $45,3 \pm 2,11$ % v T30). AC v T60 byla u vzorků o objemu 4 ml a 8 ml téměř shodná ($50,3 \pm 2,11$ %, respektive $50,4 \pm 2,11$ %) a statisticky průkazně vyšší oproti AC v T60 u 12 ml vzorků ($43,3 \pm 2,11$ %).

Nejvyšší hodnoty AP bylo dosaženo u vzorků o objemu 8 ml v T30 ($45,3 \pm 2,08$ %). Nejnižší hodnota potom byly zaznamenána u vzorků o objemu 12 ml v T60 ($35,2 \pm 2,03$ %). K nejnižšímu poklesu hodnot AP mezi T0 a T30 došlo u vzorků mrazených v objemu 4 ml a to pouze o 1 % (AP v T0: $43,7 \pm 1,98$ %, AP v T60: $42,7 \pm 2,03$ %). Nejvyšší pokles (o 3,4 %) byl zaznamenán u vzorků mrazených v objemu 8 ml mezi T30 a T60 (AP v T30: $45,3 \pm 2,08$ %, AP v T60: $41,9 \pm 2,03$ %).

Zajímavý je i vývoj podílu AR, kdy u všech sledovaných objemů v průběhu TDT testu dosáhly hodnoty maxima v T30 (4 ml: $32,5 \pm 1,80$ %, 8 ml $33,9 \pm 1,80$ % a 12 ml: $27,6 \pm 1,80$ %) a udržely si vyšší hladinu i v T60 oproti T0 (4 ml: T60 $31,5 \pm 1,76$ % vs. T0 $27,9 \pm$

1,63 %; 8 ml: T60 31,7 ± 1,76 % vs. T0 29,3 ± 1,63 %, 12 ml: T60 26,1 ± 1,76 % vs T0 23,7 ± 1,63 %).

Hodnoty APO se statisticky významně ($P < 0,05$) lišily pouze v T30 a to mezi objemy 8 ml ($10,9 \pm 0,61$ %) a 12 ml ($9,1 \pm 0,61$ %). Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Hodnoty AC, AP, AR a APO u vzorků ($n=195$) mrazených v objemech 4 ml, 8 ml a 12 ml v průběhu termodynamického testu.

| Objem | n | AC (%) | AP (%) | AR (%) | APO (%) |
|------------|----|----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| T0 | | | | | |
| 4 ml | 65 | 52,1 ± 2,03 ^a | 43,7 ± 1,98 ^a | 27,9 ± 1,63 | 15,0 ± 0,79 |
| 8 ml | 65 | 53,6 ± 2,03 ^A | 44,8 ± 1,98 ^A | 29,3 ± 1,63 ^a | 14,9 ± 0,79 |
| 12 ml | 65 | 46,0 ± 2,03 ^{B,b} | 37,2 ± 1,98 ^{B,b} | 23,7 ± 1,63 ^b | 12,9 ± 0,79 |
| T30 | | | | | |
| 4 ml | 65 | 51,6 ± 2,11 ^a | 43,9 ± 2,08 ^a | 32,5 ± 1,80 | 10,7 ± 0,61 |
| 8 ml | 65 | 53,6 ± 2,11 ^a | 45,3 ± 2,08 ^A | 33,9 ± 1,80 ^a | 10,9 ± 0,61 ^a |
| 12 ml | 65 | 45,3 ± 2,11 ^b | 37,1 ± 2,08 ^{B,b} | 27,6 ± 1,80 ^b | 9,1 ± 0,61 ^b |
| T60 | | | | | |
| 4 ml | 65 | 50,3 ± 2,11 ^a | 42,7 ± 2,03 ^A | 31,5 ± 1,76 ^a | 9,7 ± 0,60 |
| 8 ml | 65 | 50,4 ± 2,11 ^a | 41,9 ± 2,03 ^a | 31,7 ± 1,76 ^a | 9,2 ± 0,60 |
| 12 ml | 65 | 43,3 ± 2,11 ^b | 35,2 ± 2,03 ^{B,b} | 26,1 ± 1,76 ^b | 8,3 ± 0,60 |

Kde: A,B – statistická významnost $P < 0,01$, a,b statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 – bezprostředně po rozmrazení, T30 – 30 minut po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení

5.2.1.3 Vliv plemene na mrazitelnost ve velkých objemech

V prvním metodickém okruhu byl sledován vliv plemene ve vztahu k rozmrazení velkoobjemového vzorku, kdy byla zjištěna vyšší rezistence k negativním vlivům kryokonzervace u býků holštýnského plemene. V druhém metodickém okruhu byl sledován vliv velikosti vzorku na mrazitelnost obou plemen (holštýn: 4 ml; 8 ml; 12 ml, české strakaté: 4 ml, 8 ml; 12 ml) a dále vliv plemene na mrazitelnost v daném objemu (4 ml: holštýn x české strakaté; 8 ml: holštýn x české strakaté, 12 ml: holštýn x české strakaté).

Bezprostředně po rozmrazení (v T0) nebyl statisticky průkazně potvrzen vliv velikosti vzorku na mrazitelnost spermatu býků daného plemene ani v jednom ze sledovaných parametrů aktivity. Nejvyšší průměrné AC bylo dosaženo u českého strakatého plemene ($54,2 \pm 2,96$ %). U holštýnského plemene byla AR v T0 srovnatelná u 4 ml ($53,5 \pm 2,78$ %) a u 8 ml ($53,1 \pm 2,78$ %) vzorků. Nejvyšší průměrná AP a AR byla zjištěna u holštýnského plemene

mrazeného ve 4 ml ($46,0 \pm 2,71$ %, respektive $32,6 \pm 2,13$ %). Naopak nejvyšší APO byla zaznamenána u českého strakatého plemene mrazeného v 8 ml ($18,0 \pm 1,08$ %).

Na druhou stranu byl potvrzen vliv plemene na mrazitelnost ve sledovaném objemu v T0. U vzorků o objemu 4 ml dosáhlo holštýnské plemeno statisticky průkazně ($P < 0,05$) vyšší AR oproti českému strakatému plemeni ($32,6 \pm 2,13$ % vs. $22,6 \pm 2,67$ %). Naopak statisticky průkazně ($P < 0,01$) vyšší APO byla zjištěna u českého strakatého plemene ($17,9 \pm 1,08$ %) ve srovnání s holštýnským plemenem ($12,5 \pm 1,02$ %). U objemu 8 ml se výsledky plemen statisticky průkazně ($P < 0,01$) lišily pouze u parametru APO, kdy vyšší hodnoty bylo opět dosaženo u českého strakatého plemene ($18,0 \pm 1,08$ %). Obdobně jako u vzorků o objemu 4 ml dosáhlo i u vzorků o objemu 12 ml holštýnské plemeno vyšší AR v T0 ($28,3 \pm 2,13$ % vs. $18,7 \pm 2,67$ %), nicméně rozdíly v APO nebyly statisticky průkazné.

Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Výsledky ukazatelů aktivity dle plemen a objemů bezprostředně po rozmrazení (n=195)

| Plemeno | Objem | n | AC v T0 | AP v T0 | AR v T0 (%) | APO v T0 |
|-----------------|-------|----|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| | | | (%) | (%) | | (%) |
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot | 4 ml | 35 | $53,5 \pm 2,78$ | $46,0 \pm 2,71$ | $32,6 \pm 2,13^a$ | $12,5 \pm 1,02^B$ |
| | 8 ml | 35 | $53,1 \pm 2,78$ | $44,8 \pm 2,71$ | $32,0 \pm 2,13$ | $12,2 \pm 1,02^D$ |
| | 12 ml | 35 | $49,0 \pm 2,78$ | $40,6 \pm 2,71$ | $28,3 \pm 2,13^c$ | $11,7 \pm 1,02$ |
| České strakaté | 4 ml | 30 | $50,6 \pm 2,96$ | $41,0 \pm 2,88$ | $22,6 \pm 2,67^b$ | $17,9 \pm 1,08^A$ |
| | 8 ml | 30 | $54,2 \pm 2,96$ | $44,8 \pm 2,88$ | $26,4 \pm 2,67$ | $18,0 \pm 1,08^C$ |
| | 12 ml | 30 | $42,7 \pm 2,96$ | $33,3 \pm 2,88$ | $18,7 \pm 2,67^d$ | $14,3 \pm 1,08$ |

Kde: A-B, C-D – statistická významnost $P < 0,01$, a-b, c-d statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení

Vliv velikosti vzorku na mrazitelnost spermatu v čase 30 minut po rozmrazení (T30) nebyl potvrzen u holštýnského plemene. Naopak u českého strakatého plemene měl velikost vzorku vliv na všechny sledované parametry. Statisticky průkazně vyšších hodnot bylo dosaženo u vzorků mrazených v objemu 8 ml oproti vzorkům mrazeným ve 12 ml a to u všech sledovaných parametrů. Na hladině statistické významnosti $P < 0,05$ se lišily AC ($55,5 \pm 3,07$ % vs. $41,0 \pm 3,07$ %) a AR ($33,2 \pm 2,59$ % vs. $22,7 \pm 2,59$ %). Na hladině statistické významnosti

$P < 0,01$ se potom lišily AP ($47,4 \pm 3,01$ % vs. $32,5 \pm 3,01$ %) a APO ($14,0 \pm 0,82$ % vs. $9,5 \pm 0,82$ %). Hodnoty zjištěné u vzorků o objemu 4 ml nebyly statisticky průkazně rozdílné proti hodnotám detekovaným v dalších objemech, nicméně byly u všech parametrů vyšší než hodnoty ve 12 ml.

Vliv plemene na mrazitelnost ve sledovaném objemu byl minimální. Statisticky průkazně se lišily pouze hodnoty APO u objemu 4 ml, kde české strakaté plemeno dosáhlo $12,5 \pm 0,82$ %, zatímco holštýnské plemeno pouze $9,2 \pm 0,82$ % ($P < 0,01$). Obdobný trend byl zaznamenán u objemu 8 ml (české strakaté plemeno $14,0 \pm 0,82$ %, holštýnské plemeno $8,3 \pm 0,77$ %, $P < 0,01$). Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Výsledky ukazatelů aktivity dle plemen a objemů 30 minut po rozmrazení (n=195)

| Plemeno | Objem | n | AC v T30 (%) | AP v T30 (%) | AR v T30 (%) | APO v T30 (%) |
|-----------------|-------|----|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot | 4 ml | 35 | $52,1 \pm 2,89$ | $44,5 \pm 2,83$ | $34,5 \pm 2,44$ | $9,2 \pm 0,77^f$ |
| | 8 ml | 35 | $51,9 \pm 2,89$ | $43,4 \pm 2,83$ | $34,6 \pm 2,44$ | $8,3 \pm 0,77^F$ |
| | 12 ml | 35 | $49,2 \pm 2,89$ | $41,3 \pm 2,83$ | $32,0 \pm 2,44$ | $8,6 \pm 0,77$ |
| České strakaté | 4 ml | 30 | $51,0 \pm 3,07$ | $43,2 \pm 3,01$ | $30,3 \pm 2,59$ | $12,5 \pm 0,82^e$ |
| | 8 ml | 30 | $55,5 \pm 3,07^a$ | $47,4 \pm 3,01^A$ | $33,2 \pm 2,59^c$ | $14,0 \pm 0,82^{C,E}$ |
| | 12 ml | 30 | $41,0 \pm 3,07^b$ | $32,5 \pm 3,01^B$ | $22,7 \pm 2,59^d$ | $9,5 \pm 0,82^D$ |

Kde: A-B, C-D, E-F – statistická významnost $P < 0,01$, a-b, c-d, e-f statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T30- 30 minut po rozmrazení

Vliv velikosti vzorku na mrazitelnost obou plemen ani vliv plemene na mrazitelnost v daném objemu nebyl potvrzen u žádného ze sledovaných paramterů aktivity v čase 60 minut po rozmrazení (T60).

Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Výsledky ukazatelů aktivity dle plemen a objemů 60 minut po rozmrazení (n=195)

| Plemeno | Objem | n | AC v T60 (%) | AP v T60 (%) | AR v T60 (%) | APO v T60 (%) |
|-----------------|-------|----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot | 4 ml | 35 | $51,6 \pm 2,91$ | $43,9 \pm 2,81$ | $33,4 \pm 2,42$ | $8,3 \pm 0,80$ |
| | 8 ml | 35 | $51,7 \pm 2,91$ | $42,4 \pm 2,81$ | $33,1 \pm 2,42$ | $8,4 \pm 0,80$ |
| | 12 ml | 35 | $44,3 \pm 2,91$ | $36,5 \pm 2,81$ | $28,3 \pm 2,42$ | $7,4 \pm 0,80$ |
| České strakaté | 4 ml | 30 | $48,8 \pm 3,09$ | $41,3 \pm 2,98$ | $29,4 \pm 2,58$ | $11,4 \pm 0,85$ |
| | 8 ml | 30 | $48,9 \pm 3,09$ | $41,3 \pm 2,98$ | $30,1 \pm 2,58$ | $10,9 \pm 0,85$ |
| | 12 ml | 30 | $42,2 \pm 3,09$ | $33,7 \pm 2,98$ | $23,7 \pm 2,58$ | $9,4 \pm 0,85$ |

Kde: AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T60 – 60 minut po rozmrazení

Ve vztahu k objemu vzorku a plemeni nebyl zjištěn statistický významný rozdíl ani u podílu spermií s nenarušenými membránami, respektive podílu živých spermií. V obou parametrech dosáhlo nejlepších výsledků plemeno české strakaté mrazené v objemu 8 ml (NM: $20,6 \pm 1,55$ %, ŽIV: $21,9 \pm 1,86$ %) a rovněž u holštýnských býků mrazených v 8 ml objemu byly zaznamenány nejvyšší hodnoty NM ($19,0 \pm 1,46$ %) a ŽIV ($21,4 \pm 1,75$). Detailní výsledky udává tabulka 17.

Tabulka 17: Podíly spermií s nenarušenými membránami a podíly živých spermií dle plemen a objemů bezprostředně po rozmrazení rozmrazení (n=195)

| Plemeno | Objem | n | NM v T0 (%) | ŽIV v T0 (%) |
|-----------------|-------|----|-----------------|-----------------|
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot | 4 ml | 35 | $15,0 \pm 1,46$ | $17,2 \pm 1,75$ |
| | 8 ml | 35 | $19,0 \pm 1,46$ | $21,4 \pm 1,75$ |
| | 12 ml | 35 | $15,7 \pm 1,46$ | $17,7 \pm 1,75$ |
| České strakaté | 4 ml | 30 | $18,4 \pm 1,55$ | $20,6 \pm 1,86$ |
| | 8 ml | 30 | $20,6 \pm 1,55$ | $21,9 \pm 1,86$ |
| | 12 ml | 30 | $19,9 \pm 1,55$ | $19,4 \pm 1,86$ |

Kde: NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, ŽIV – podíl živých spermií, T0 - bezprostředně po rozmrazení

5.2.1.4 Vliv hustoty odebraného ejakulátu na mrazitelnost ve velkých objemech

Z námi získaných výsledků se nepodařilo prokázat vliv hustoty na mrazitelnost v různých objemech. V průběhu TDT testu byly zjištěny obecně nejvyšší hodnoty AC a AP u středně hustého spermatu mrazeného v objemu 8 ml, statisticky se však nelišily od ostatních hodnot zjištěných u středně hustého spermatu, ani od hodnot získaných u řídkého a velmi hustého spermatu mrazeného v objemu 8 ml. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 18.

Tabulka 18 Výsledky parametrů aktivity dle hustoty odebraného ejakulátu v průběhu TDT testu (n=195)

| Hustota ejakulátu | Objem | n | AC v T0 (%) | AP v T0 (%) | AR v T0 (%) | APO v T0 (%) |
|--|-------|----|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Řídký (0,40-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 25 | 51,8 ± 3,19 | 44,4 ± 3,12 | 29,7 ± 2,57 | 13,7 ± 1,27 |
| | 8 ml | 25 | 50,7 ± 3,19 | 42,4 ± 3,12 | 28,6 ± 2,57 | 13,0 ± 1,27 |
| | 12 ml | 25 | 44,8 ± 3,19 | 36,5 ± 3,12 | 24,3 ± 2,57 | 11,5 ± 1,27 |
| Střední (0,70 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 22 | 57,5 ± 3,33 | 47,7 ± 3,25 | 30,3 ± 2,68 | 16,8 ± 1,33 |
| | 8 ml | 22 | 60,1 ± 3,33 | 51,0 ± 3,25 | 33,3 ± 2,68 | 17,3 ± 1,33 |
| | 12 ml | 22 | 52,7 ± 3,33 | 43,8 ± 3,25 | 28,7 ± 2,68 | 14,5 ± 1,33 |
| Velmi hustý (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 18 | 45,8 ± 3,77 | 37,5 ± 3,68 | 22,4 ± 3,03 | 14,6 ± 1,50 |
| | 8 ml | 18 | 49,5 ± 3,77 | 40,2 ± 3,68 | 25,3 ± 3,03 | 14,6 ± 1,50 |
| | 12 ml | 18 | 39,2 ± 3,77 | 29,7 ± 3,68 | 16,6 ± 3,03 | 13,0 ± 1,50 |
| Hustota ejakulátu | Objem | n | AC v T30 (%) | AP v T30 (%) | AR v T30 (%) | APO v T30 (%) |
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Řídký (0,4-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 25 | 50,1 ± 3,44 | 44,2 ± 3,72 | 33,5 ± 2,91 | 10,0 ± 0,99 |
| | 8 ml | 25 | 53,6 ± 3,44 | 45,2 ± 3,72 | 33,8 ± 2,91 | 10,8 ± 0,99 |
| | 12 ml | 25 | 42,9 ± 3,44 | 35,3 ± 3,72 | 27,2 ± 2,91 | 7,9 ± 0,99 |
| Střední (0,71 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 22 | 55,0 ± 3,59 | 46,4 ± 3,52 | 34,7 ± 3,04 | 11,1 ± 1,03 |
| | 8 ml | 22 | 56,2 ± 3,59 | 48,3 ± 3,52 | 36,6 ± 3,04 | 11,2 ± 1,03 |
| | 12 ml | 22 | 49,9 ± 3,59 | 42,2 ± 3,52 | 31,8 ± 3,04 | 9,9 ± 1,03 |
| Velmi hustý (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 18 | 49,5 ± 4,05 | 40,2 ± 3,98 | 28,4 ± 3,44 | 11,4 ± 1,17 |
| | 8 ml | 18 | 50,2 ± 4,05 | 41,6 ± 3,98 | 30,7 ± 3,44 | 10,8 ± 1,17 |
| | 12 ml | 18 | 42,9 ± 4,05 | 33,1 ± 3,98 | 22,8 ± 3,44 | 9,9 ± 1,17 |
| Hustota ejakulátu | Objem | n | AC v T60 (%) | AP v T60 (%) | AR v T60 (%) | APO v T60 (%) |
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Řídký (0,4-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 25 | 49,0 ± 3,45 | 41,4 ± 3,33 | 31,3 ± 2,88 | 8,8 ± 0,99 |
| | 8 ml | 25 | 50,8 ± 3,45 | 41,9 ± 3,33 | 31,8 ± 2,88 | 9,3 ± 0,99 |
| | 12 ml | 25 | 42,5 ± 3,45 | 34,7 ± 3,33 | 25,5 ± 2,88 | 8,0 ± 0,99 |
| Střední (0,71 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 22 | 52,3 ± 3,60 | 44,5 ± 3,47 | 33,9 ± 3,00 | 9,7 ± 1,03 |
| | 8 ml | 22 | 53,4 ± 3,60 | 45,3 ± 3,47 | 35,3 ± 3,00 | 9,1 ± 1,03 |
| | 12 ml | 22 | 45,0 ± 3,60 | 37,4 ± 3,47 | 28,3 ± 3,00 | 8,5 ± 1,03 |
| Velmi hustý (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 18 | 49,4 ± 4,07 | 42,1 ± 3,91 | 29,0 ± 3,30 | 11,0 ± 1,62 |
| | 8 ml | 18 | 46,2 ± 4,07 | 37,6 ± 3,91 | 27,0 ± 3,30 | 10,3 ± 1,62 |
| | 12 ml | 18 | 42,1 ± 4,07 | 33,0 ± 3,91 | 24,3 ± 3,30 | 8,5 ± 1,62 |

Kde: AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 – bezprostředně po rozmrazení T30 – 30 minut po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení

Rovněž nebyl potvrzen vliv hustoty odebraného ejakulátu na NM a ŽIV. Neprůkazně nejvyššího NM bylo opět dosaženo u středně hustého ejakulátu mrazeného v objemu 8 ml

($21,2 \pm 1,81$ %), nevyššího podílu ŽIV potom u řídkého ejakulátu, rovněž mrazeného v 8 ml ($21,8 \pm 2,09$ %) a velmi podobné hodnoty ($21,6 \pm 2,47$ %) bylo dosaženo i u velmi hustých ejakulátů mrazených rovněž v 8 ml.

Tabulka 19: Podíly spermií s nenarušenými membránami a podíly živých spermií dle plemen a objemů bezprostředně po rozmrazení rozmrazení (n=195)

| Hustota ejakulátu | Objem | n | NM v T0 (%) | ŽIV v T0 (%) |
|---|-------|----|-----------------|-----------------|
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Řídký (0,4-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 25 | 15,3 \pm 1,74 | 19,1 \pm 2,09 |
| | 8 ml | 25 | 18,1 \pm 1,74 | 21,8 \pm 2,09 |
| | 12 ml | 25 | 16,7 \pm 1,74 | 19,3 \pm 2,09 |
| Střední (0,71 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 22 | 15,4 \pm 1,81 | 17,8 \pm 2,18 |
| | 8 ml | 22 | 21,2 \pm 1,81 | 21,3 \pm 2,18 |
| | 12 ml | 22 | 18,3 \pm 1,81 | 19,2 \pm 2,18 |
| Velmi hustý (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 18 | 20,0 \pm 2,05 | 19,6 \pm 2,47 |
| | 8 ml | 18 | 20,1 \pm 2,05 | 21,6 \pm 2,47 |
| | 12 ml | 18 | 18,2 \pm 2,05 | 16,4 \pm 2,47 |

Kde: NM – podíl spermií s nenarušenými membránami T0 -bezprostředně po rozmrazení, ŽIV – podíl živých spermií, T0- bezprostředně po rozmrazení

5.2.1.5 Vliv býka na mrazitelnost ve velkých objemech

V předkládané práci byl hodnocen vliv plemeníka na mrazitelnost spermatu v objemech 4 ml, 8 ml a 12 ml, včetně hodnocení jednotlivých parametrů aktivity, podílu spermií s nenarušenou membránou a podílu živých spermií. S výjimkou hodnot pomalého pohybu spermií zjištěných v T30 však nebyly mezi zjištěnými hodnotami nalezeny statistické rozdíly. Celkový přehled výsledků mrazitelnosti dle býků je uveden v příloze č. 2.

Vůbec nejvyšší podíl spermií s pomalým pohybem v T30 byl zjištěn u býka plemene české starkaté MONTEKO v objemu 8 ml ($20,1 \pm 1,92$ %). Tato hodnota se ve sledovaném objemu statisticky ($P < 0,05$) lišila oproti pouze jedinému býkovi téhož plemene (LEWIS; $8,8 \pm 1,92$ %) a oproti všem býkům holštýnského plemene (COLMAN, PIKANT, POLLEDSTAR, REBEL, SUNSHINE, SUNWAY a SUREBOY). V objemu 4 ml byl zjištěn statisticky významný ($P < 0,05$) rozdíl této hodnoty mezi býky MARTIN ($17,2 \pm 1,92$ %) a SUNSHINE ($6,5 \pm 1,92$ %). V objemu 12 ml nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 20.

Tabulka 20 Podíl spermií s pomalým pohybem v T30 dle býků a objemů (n=195)

| Býk | n | 4 ml | 8 ml | 12 ml |
|------------|---|--------------------------|--------------------------|---------------|
| | | APO v T30 (%) | APO v T30 (%) | APO v T30 (%) |
| | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| COLMAN | 5 | 11,5 ± 1,92 | 8,5 ± 1,92 ^b | 7,5 ± 1,92 |
| KORN | 5 | 8,0 ± 1,92 | 11,8 ± 1,92 | 9,5 ± 1,92 |
| LATEX | 5 | 9,5 ± 1,92 | 14,0 ± 1,92 | 7,5 ± 1,92 |
| LEWIS | 5 | 9,9 ± 1,92 | 8,8 ± 1,92 ^b | 8,5 ± 1,92 |
| LYON | 5 | 14,5 ± 1,92 | 15,0 ± 1,92 | 11,6 ± 1,92 |
| MARTIN | 5 | 17,2 ± 1,92 ^c | 15,1 ± 1,92 | 9,6 ± 1,92 |
| MONTEKO | 5 | 16,4 ± 1,92 | 20,1 ± 1,92 ^a | 10,6 ± 1,92 |
| PIKANT | 5 | 9,8 ± 1,92 | 9,3 ± 1,92 ^b | 9,8 ± 1,92 |
| POLLEDSTAR | 5 | 9,3 ± 1,92 | 8,4 ± 1,92 ^b | 12,9 ± 1,92 |
| REBEL | 5 | 8,0 ± 1,92 | 7,5 ± 1,92 ^b | 6,7 ± 1,92 |
| SUNSHINE | 5 | 6,5 ± 1,92 ^d | 7,0 ± 1,92 ^b | 7,9 ± 1,92 |
| SUNWAY | 5 | 8,0 ± 1,92 | 7,9 ± 1,92 ^b | 9,2 ± 1,92 |
| SUREBOY | 5 | 11,1 ± 1,92 | 9,2 ± 1,92 ^b | 7,3 ± 1,92 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 – bezprostředně po rozmrazení T30 – 30 minut po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení

5.2.2 Fáze 2 – Hodnocení kvality inseminačních dávek vyrobených metodou DF

V druhé fázi byly hodnoceny pejety vyrobené metodou DF (n=195). Hodnoceny byly stejné ukazatele kvality inseminačních dávek, přičemž parametry aktivity byly hodnoceny bezprostředně po rozmrazení (T0), 60 minut po rozmrazení (T60) a 120 minut po rozmrazení (T120). Z hodnocení byly vyřazeny vzorky s AC < 5 % a to z důvodu velmi obtížné detekce takto nízkých aktivit ve vzorku. Podíl NM byl opět hodnocen bezprostředně po rozmrazení a podíl ŽIV 30 minut po rozmrazení. Průměrné charakteristiky hodnoceného souboru jsou uvedeny v tabulce 21.

5.2.2.1 Výsledky sledovaných paramerů v základním souboru

Z celkového počtu pejet/vzorků n=195 bylo 13 kusů, tj. 11,8 % vyřazeno již při prvním hodnocení z důvodu neměřitelné aktivity. Po 60 minutách od rozmrazení si udrželo aktivitu minimálně 5 % celkem 132 vzorků, tj. 32,3 % vzorků bylo vyřazeno. Po 120 minutách dosáhlo požadované aktivity pouze 106 vzorků. Na konci TDT testu tedy bylo vyřazeno celkem 45,6 % vzorků. Nejvyšších hodnot AC, AP a AR bylo dosaženo v T60 ($20,0 \pm 9,67$ %, respektive 16,3

$\pm 8,34 \%$ a $12,4 \pm 6,69 \%$). Hodnoty podílu NM a ŽIV byly velice podobné (NM $10,7 \pm 6,27 \%$ a ŽIV $10,8 \pm 6,68 \%$).

Tabulka 21 Základní charakteristiky souboru

| Proměnná | n | x | s | min. | max. | s.e. | V (%) |
|----------|-----|------|------|------|------|------|-------|
| AC T0 | 172 | 17,3 | 9,79 | 4,5 | 51,9 | 0,75 | 56,50 |
| AP T0 | 172 | 12,9 | 8,44 | 1,2 | 44,6 | 0,64 | 65,18 |
| AR T0 | 172 | 7,8 | 5,60 | 0,9 | 30,2 | 0,43 | 72,17 |
| APO T0 | 172 | 4,9 | 3,85 | 0,2 | 32,3 | 0,29 | 78,44 |
| AC T60 | 132 | 20,0 | 9,48 | 5 | 43 | 0,83 | 47,34 |
| AP T60 | 132 | 16,3 | 8,34 | 3,3 | 38,9 | 0,73 | 51,11 |
| AR T60 | 132 | 12,4 | 6,69 | 2,1 | 33,4 | 0,58 | 54,03 |
| APO T60 | 132 | 3,6 | 2,30 | 0,8 | 13,4 | 0,20 | 63,06 |
| AC T120 | 106 | 16,5 | 8,00 | 5 | 44,5 | 0,78 | 48,57 |
| AP T120 | 106 | 13,3 | 7,41 | 2,5 | 41,6 | 0,72 | 55,66 |
| AR T120 | 106 | 9,9 | 6,17 | 1,6 | 37,1 | 0,60 | 62,67 |
| APO T120 | 106 | 3,2 | 1,97 | 0,6 | 11 | 0,19 | 61,59 |
| NM | 195 | 10,7 | 6,27 | 1 | 35 | 0,50 | 58,50 |
| ŽIV | 195 | 10,8 | 6,68 | 0,5 | 45 | 0,53 | 62,10 |

Kde: AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 - bezprostředně po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, T120 – 120 minut po rozmrazení, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, ŽIV – podíl živých spermií

V souboru byly dále stanoveny korelace sledovaných ukazatelů mrazitelnosti v pejetách vyrobených metodou DF ve vztahu k parametrům čerstvého ejakulátu (AC, AP, hustotě a objemu odebraného ejakulátu) a ve vztahu k parametrům aktivity spermatu po rozmrazení velkého vzorku (AC, AP, AR a APO).

Parametry aktivity AC, AP, AR u rozmrazených pejet k AC a AP v čerstvém ejakulátu byly v časech T0 a T60 velmi slabé a nadto statisticky neprůkazné. V čase T120 byly zjištěny slabé ($r=0,28$ až $0,29$), statisticky průkazné ($P<0,01$) korelace mezi těmito parametry.

Korelace všech parametrů aktivity spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF k hustotě měly negativní trend a v průběhu TDT testu sílily. Nejsilnější korelace byla zaznamenána mezi hustotou čerstvého ejakulátu a AP v T120 $r= -0,39$ ($P<0,01$).

Korelace parametrů aktivity k objemu čerstvého ejakulátu byly v časech T0 a T60 velmi slabé a statisticky neprůkazné. V čase T120 byly zjištěny rovněž slabé, ale statisticky

průkazné ($P < 0,01$; $P < 0,05$) negativní korelace těchto proměnných. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 22: Korelace (r) parametrů aktivity rozmrazených vzorků ($n=195$) k AC, AP, hustotě a objemu čerstvého ejakulátu.

| | | AC | | | AP | | |
|----------|---|---------|---------|---------|-------|---------|---------|
| | | T0 | T60 | T120 | T0 | T60 | T120 |
| AC v ČE | r | 0,08 | -0,06 | -0,28** | 0,06 | -0,06 | -0,29** |
| AP v ČE | r | 0,08 | -0,01 | -0,31** | 0,06 | -0,09 | -0,30** |
| HUS v ČE | r | -0,11* | -0,28** | -0,38** | -0,14 | -0,29** | -0,39** |
| OBJ ČE | r | 0,06 | -0,04 | -0,21* | 0,03 | -0,06 | -0,24** |
| | | | | | | | |
| | | AR | | | APO | | |
| | | T0 | T60 | T120 | T0 | T60 | T120 |
| AC v ČE | r | 0,03 | -0,11 | -0,28** | 0,10 | 0,01 | -0,17 |
| AP v ČE | r | 0,04 | -0,12 | -0,29** | 0,08 | -0,01 | -0,21* |
| HUS v ČE | r | -0,14** | -0,30** | -0,36** | -0,09 | -0,21* | -0,32** |
| OBJ ČE | r | 0,04 | -0,03 | -0,23** | 0,02 | -0,12 | -0,25** |

Kde: ** - statistická významnost $P < 0,01$, * - statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 - bezprostředně po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, T120 – 120 minut po rozmrazení, HUS – hustota, OBJ – objem, ČE – čerstvý ejakulát

Statisticky průkazné ($P < 0,01$) byly všechny korelace parametrů aktivity spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF k parametrům aktivity spermií mrazených ve velkém objemu, s výjimkou hodnoty APO v T60 v inseminačních dávkách k AR v T0 v rozmrazeném ejakulátu. Veškeré korelace byly pozitivní a dosahovaly až středně silných hodnot. Parametry aktivity spermií ve vzorcích mrazených ve velkém objemu tak mohou být považovány za důležitý indikátor pro rozhodování o dalším zpracování spermatu metodou DF. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 23.

Tabulka 23 Korelace parametrů aktivity v pejetých vyrobených metodou DF parametrům aktivity vzorků mrazených ve velkém objemu.

| | | AC | | | AP | | |
|---------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | T0 | T60 | T120 | T0 | T60 | T120 |
| AC v T0 v RE | r | 0,45** | 0,36** | 0,50** | 0,46** | 0,34** | 0,48** |
| AP v T0 v RE | r | 0,45** | 0,37** | 0,52** | 0,46** | 0,36** | 0,50** |
| AR v T0 v RE | r | 0,38** | 0,27** | 0,40** | 0,40** | 0,25** | 0,40** |
| APO v T0 v RE | r | 0,32** | 0,32** | 0,39** | 0,31** | 0,31** | 0,35** |
| | | AR | | | APO | | |
| | | T0 | T60 | T120 | T0 | T60 | T120 |
| AC v T0 v RE | r | 0,41** | 0,33** | 0,46** | 0,42** | 0,28** | 0,40** |
| AP v T0 v RE | r | 0,43** | 0,34** | 0,49** | 0,40** | 0,28** | 0,40** |
| AR v T0 v RE | r | 0,41** | 0,26** | 0,41** | 0,28** | 0,12 | 0,25** |
| APO v T0 v RE | r | 0,21** | 0,27** | 0,31** | 0,41** | 0,41** | 0,39** |

Kde: ** - statistická významnost $P < 0,01$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 - bezprostředně po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, T120 – 120 minut po rozmrazení, HUS – hustota, OBJ – objem, RE – rozmrazený čerstvý ejakulát

Stejným způsobem byly hodnoceny korelace podílu spermií s nenarušenou membránou a podílu živých spermií. Zde byly, podobně jako u vzorků mrazených ve velkém objemu, zjištěny pozitivní, statisticky průkazné ($P < 0,01$) korelace k AC a AP v čerstvém ejakulátu. Pozitivní slabé až středně silné korelace byly potvrzeny rovněž ve vztahu ke všem parametrům aktivity spermií u vzorků mrazených ve velkém objemu. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 24.

Tabulka 24: Korelace ($r=$) podílu spermií s nenarušenou membránou a podílu živých spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF k AC, AP, hustotě a objemu čerstvého ejakulátu a k parametrům aktivity spermií ze vzorků mrazených ve velkých objemech

| | NM | ŽIV |
|---------------|--------|--------|
| AC v ČE | 0,25** | 0,20** |
| AP v ČE | 0,25** | 0,19** |
| HUS v ČE | 0,06 | 0,03 |
| OBJ ČE | 0,03 | 0,03 |
| AC v T0 v RE | 0,29** | 0,30** |
| AP v T0 v RE | 0,29** | 0,29** |
| AR v T0 v RE | 0,18* | 0,20** |
| APO v T0 v RE | 0,36** | 0,31** |

Kde: ** - statistická významnost $P < 0,01$, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, ŽIV – podíl živých spermií, ČE – čerstvý ejakulát, RE -rozmrazený ejakulát.

5.2.2.2 Vliv objemu vzorku při prvním mrazení na kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF

V průběhu termodynamického testu bylo v T0 a T60 nejvyšších hodnot AC dosaženo u inseminačních dávek vyrobených ze vzorků mrazených v objemu 8 ml. Statisticky průkazně rozdílné hodnoty ($P < 0,05$) však byly zjištěny pouze mezi inseminačními dávkami vyrobených z 8 ml ($19,5 \pm 1,25$ %) a z 12 ml ($14,5 \pm 1,30$ %) v T0. V T120 byla zjištěna nejvyšší hodnota AC u inseminačních dávek vyrobených z objemu 4 ml ($18,2 \pm 1,29$ %), ta se však od ostatních hodnot statisticky průkazně nelišila. Vůbec nejvyšší hodnoty AC bylo dosaženo u inseminačních dávek vyrobených z objemu 8 ml v T60 ($21,1 \pm 1,42$ %).

Obdobný trend byl potvrzen u AP. Zde však byla v T0 zjištěna statisticky průkazně nižší hodnota u inseminačních dávek vyrobených z objemu 12 ml ($10,3 \pm 1,12$ %) oproti inseminačním dávkám vyrobeným z objemu 4 ml ($13,7 \pm 1,09$; $P < 0,05$) a dávkám vyrobeným z objemu 8 ml ($14,7 \pm 1,08$; $P < 0,01$). Nejvyšší hodnoty bylo opět dosaženo v T60 u inseminačních dávek vyrobených z objemu 8 ml ($17,0 \pm 1,25$ %).

Rovněž hodnoty AR se v T0 statisticky průkazně ($P < 0,05$) lišily mezi inseminačními dávkami vyrobených z objemu 8 ml ($9,1 \pm 0,71$ %) a z objemu 12 ml ($6,0 \pm 0,74$ %).

Mezi ostatními hodnotami naměřenými v průběhu TDT testu nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 25.

Tabulka 25 Vliv objemu vzorku při prvním mrazení na parametry aktivity spermií v průběhu TDT testu u dávek vyrobených metodou DF

| Objem vzorku při I. mrazení | n | AC (%) | AP (%) | AR (%) | APO (%) |
|-----------------------------|----|-------------------|-----------------------|------------------|----------------|
| | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| T0 | | | | | |
| 4 ml | 58 | $17,8 \pm 1,26$ | $13,7 \pm 1,09^a$ | $8,0 \pm 0,72$ | $5,4 \pm 0,50$ |
| 8 ml | 59 | $19,5 \pm 1,25^A$ | $14,7 \pm 1,08^A$ | $9,1 \pm 0,71^A$ | $5,2 \pm 0,50$ |
| 12 ml | 55 | $14,5 \pm 1,30^B$ | $10,3 \pm 1,12^{B,b}$ | $6,0 \pm 0,74^B$ | $4,1 \pm 0,51$ |
| T60 | | | | | |
| 4 ml | 46 | $20,4 \pm 1,40$ | $16,2 \pm 1,23$ | $13,0 \pm 0,99$ | $3,5 \pm 0,34$ |
| 8 ml | 45 | $21,1 \pm 1,42$ | $17,0 \pm 1,25$ | $12,8 \pm 1,00$ | $4,0 \pm 0,34$ |
| 12 ml | 41 | $18,5 \pm 1,48$ | $15,0 \pm 1,30$ | $11,3 \pm 1,05$ | $3,5 \pm 0,36$ |
| T120 | | | | | |
| 4 ml | 38 | $18,2 \pm 1,29$ | $14,9 \pm 1,19$ | $10,8 \pm 1,00$ | $3,6 \pm 0,32$ |
| 8 ml | 38 | $16,3 \pm 1,29$ | $13,1 \pm 1,19$ | $9,9 \pm 1,00$ | $3,0 \pm 0,32$ |
| 12 ml | 29 | $14,6 \pm 1,45$ | $11,6 \pm 1,34$ | $8,5 \pm 1,15$ | $3,0 \pm 0,37$ |

Kde: A-B; C-D, E-F – statistická významnost $P < 0,01$, a-b – statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T60- 60 minut po rozmrazení, T120 – 120 minut po rozmrazení

Z pohledu na četnost vzorků je patrné, že nejvyšší podíl vzorků vyřazených ze sledování z důvodu neměřitelnosti hodnot byl zaznamenán u objemu 12 ml, a to 55,4 %. Je rovněž zřejmé, že inseminační dávky vyrobené metodou DF v průměru nedosahují aktivity požadované při komerčním využití (přímočará aktivita v T0 40 %, přímočará aktivita v T120 30 %; standard ISB Hradištko, Natural).

Objem vzorku při mrazení měl statisticky průkazný ($P < 0,05$) vliv na podíl spermií s nenarušenými membránami a na podíl živých spermií, a to při srovnání inseminačních dávek vyrobených z objemů 8 ml a 12 ml. U inseminačních dávek vyrobených z objemu 8 ml bylo dosaženo vyšších hodnot obou sledovaných parametrů (NM: $12,6 \pm 0,86$ %, ŽIV: $12,7 \pm 0,92$ %) oproti těm vyrobeným z objemu 12 ml (NM: $9,4 \pm 0,86$ %, ŽIV: $9,3 \pm 0,91$ %). Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 26.

Tabulka 26: Vliv objemu vzorku na podíl spermií s nenarušenou a na podíl živých spermií v inseminačních dávkách ($n=194$) vyrobených metodou DF

| Objem vzorku při I. mrazení | n | NM (%) | ŽIV (%) |
|-----------------------------|----|-------------------|-------------------|
| | | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| 4 ml | 65 | $11,2 \pm 0,87$ | $11,4 \pm 0,93$ |
| 8 ml | 65 | $12,6 \pm 0,86^a$ | $12,7 \pm 0,92^c$ |
| 12 ml | 65 | $9,4 \pm 0,86^b$ | $9,3 \pm 0,91^d$ |

Kde: *a-b, c-d* - statistická významnost $P < 0,05$, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, ŽIV – podíl živých spermií, ČE – čerstvý ejakulát

5.2.2.3 Vliv plemene a objemu při prvním mrazení na kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF

Z tabulky 27 je patrné, že interakce plemene a objemu vzorku při prvním mrazení neměla v průběhu TDT testu zásadní vliv na kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF.

Vůbec nejvyšší AC i AP dosáhlo české strakaté plemeno v T60, a to $22,4 \pm 2,19$ %, respektive $18,3 \pm 1,88$ %, ve vzorcích vyrobených z objemu 8 ml. Tyto vzorky si udržely v rámci plemene nejvyšší AC i AP i na konci TDT testu ($15,2 \pm 1,93$ % a $11,8 \pm 1,72$ %).

U holštýnského plemene byla nejvyšší AC i AP zaznamenána rovněž v T60, a to $17,7 \pm 1,90$ %, respektive $14,4 \pm 1,63$ %, a to v objemu 4 ml.

Jediné statisticky významné ($P < 0,05$) rozdíly byly zaznamenány v podílu APO mezi sledovanými plemeny mrazenými v objemu 8 ml a 12 ml v T60. V obou případech byl zaznamenán vyšší podíl APO u českého strakatého plemene, a to $4,7 \pm 0,46$ % u vzorků z objemu 8 ml a $4,8 \pm 0,53$ % u vzorků vyrobených z objemu 12 ml.

Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 27.

Tabulka 27 Parametry aktivity spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF v průběhu TDT testu, interakce plemene a objemu při prvním mrazení

| Plemeno | Objem při I. mrazení | n (=172) | AC v T0 (%) | AP v T0 (%) | AR v T0 (%) | APO v T0 (%) |
|-------------------------|----------------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot (n= 92) | 4 ml | 31 | 17,6 \pm 1,23 | 13,6 \pm 1,01 | 8,7 \pm 0,69 | 4,5 \pm 0,42 |
| | 8 ml | 32 | 14,6 \pm 1,23 | 10,8 \pm 1,01 | 7,0 \pm 0,69 | 3,6 \pm 0,42 |
| | 12 ml | 29 | 14,1 \pm 1,24 | 10,0 \pm 1,02 | 6,4 \pm 0,70 | 3,4 \pm 0,42 |
| České strakaté (n=80) | 4 ml | 28 | 14,9 \pm 1,31 | 10,9 \pm 1,09 | 6,7 \pm 0,74 | 4,1 \pm 0,45 |
| | 8 ml | 28 | 16,8 \pm 1,31 | 12,6 \pm 1,08 | 7,4 \pm 0,74 | 5,0 \pm 0,45 |
| | 12 ml | 24 | 13,8 \pm 1,32 | 10,0 \pm 1,09 | 5,4 \pm 0,74 | 4,4 \pm 0,45 |
| Plemeno | Objem při I mrazení | n (=132) | AC v T60 (%) | AP v T60 (%) | AR v T60 (%) | APO v T60 (%) |
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot (n= 71) | 4 ml | 25 | 17,7 \pm 1,90 | 14,4 \pm 1,63 | 11,3 \pm 1,30 | 2,9 \pm 0,40 |
| | 8 ml | 23 | 14,8 \pm 2,02 | 11,8 \pm 1,74 | 9,5 \pm 1,42 | 2,5 \pm 0,43 ^D |
| | 12 ml | 23 | 13,2 \pm 2,02 | 10,7 \pm 1,74 | 8,4 \pm 1,39 | 2,0 \pm 0,43 ^B |
| České strakaté (n=59) | 4 ml | 21 | 15,7 \pm 2,10 | 12,9 \pm 1,80 | 9,9 \pm 1,45 | 2,9 \pm 0,44 |
| | 8 ml | 22 | 22,4 \pm 2,19 | 18,3 \pm 1,88 | 13,3 \pm 1,51 | 4,7 \pm 0,46 ^C |
| | 12 ml | 16 | 21,6 \pm 2,53 | 17,5 \pm 2,17 | 12,5 \pm 1,74 | 4,8 \pm 0,53 ^A |
| Plemeno | Objem při I. mrazení | n (=106) | AC v T120 (%) | AP v T120 (%) | AR v T120 (%) | APO v T120 (%) |
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot (n=54) | 4 ml | 20 | 17,0 \pm 1,82 | 14,1 \pm 1,62 | 10,4 \pm 1,30 | 3,1 \pm 0,42 |
| | 8 ml | 16 | 12,6 \pm 1,98 | 10,5 \pm 1,75 | 8,1 \pm 1,41 | 2,3 \pm 0,45 |
| | 12 ml | 18 | 11,3 \pm 2,03 | 9,2 \pm 1,80 | 6,7 \pm 1,45 | 2,0 \pm 0,46 |
| České Strakaté (n=52) | 4 ml | 18 | 13,3 \pm 2,08 | 10,7 \pm 1,84 | 7,5 \pm 1,48 | 3,1 \pm 0,48 |
| | 8 ml | 22 | 15,2 \pm 1,93 | 11,8 \pm 1,72 | 8,8 \pm 1,38 | 2,8 \pm 0,44 |
| | 12 ml | 12 | 13,5 \pm 2,40 | 10,5 \pm 2,12 | 7,2 \pm 1,71 | 3,2 \pm 0,55 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 -bezprostředně po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, T120 – 120 minut po rozmrazení

Podíl spermií s nenarušenou plasmatickou membránou (NM) byl ve vzorcích ze všech sledovaných objemů vyšší u českého strakatého plemene, nicméně výsledky nebyly statisticky průkazné. Zde byl zaznamenán obdobný trend jako u parametrů aktivity, tedy nejvyšší hodnota NM u holštýnského plemene u vzorků vyrobených z objemu 4 ml ($10,4 \pm 1,06$ %) a nejvyšší hodnota u českého strakatého plemene v objemu 8 ml ($12,6 \pm 1,16$ %).

Podíl živých spermií byl rovněž nejvyšší ve vzorcích vyrobených z objemu 8 ml u českého strakatého plemene ($12,5 \pm 1,20$ %). Holštýnské plemeno dosáhlo nejlepších výsledků opět v objemu 4 ml ($10,3 \pm 1,12$ %). Výsledky byly statisticky neprůkazné, podrobně jsou shrnuty v tabulce 28.

Tabulka 28: Podíl spermií s nenarušenou membránou a podíl živých spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF (n=195), interakce plemene a objemu při prvním mrazení

| Plemeno | Objem při I. mrazení | n | NM v T0 (%) | ŽIV v T0 (%) |
|-----------------|----------------------|----|-----------------|-----------------|
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Holštýnský skot | 4 ml | 33 | $10,4 \pm 1,06$ | $10,3 \pm 1,12$ |
| | 8 ml | 33 | $8,7 \pm 1,06$ | $8,9 \pm 1,12$ |
| | 12 ml | 33 | $8,2 \pm 1,06$ | $8,1 \pm 1,12$ |
| České strakaté | 4 ml | 29 | $11,6 \pm 1,13$ | $12,0 \pm 1,20$ |
| | 8 ml | 29 | $12,6 \pm 1,13$ | $12,5 \pm 1,20$ |
| | 12 ml | 29 | $10,4 \pm 1,13$ | $9,5 \pm 1,20$ |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami, ŽIV – podíl živých spermií, T0- bezprostředně po rozmrazení

5.2.2.4 Vliv hustoty a objemu při prvním mrazení na kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF

Při detekci parametrů aktivity u dávek vyrobených metodou DF byly zaznamenány nejnižší hodnoty u vzorků vyrobených z hustých ejakulátů. V T0 a T60 nebyly mezi naměřenými hodnotami zaznamenány statisticky významné rozdíly.

Na konci TDT testu, v T120, byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v jednotlivých parametrech aktivity u vzorků vyrobených v objemu 4 ml z různě hustých ejakulátů po odběru. Naměřené hodnoty AC byly statisticky průkazně vyšší ve vzorcích vyrobených z řídkých ejakulátů ($20,6 \pm 2,45$ %, $P < 0,01$) a ze středně hustých ejakulátů ($18,1 \pm 2,14$ %; $P < 0,05$) oproti vzorkům vyrobeným z hustých ejakulátů ($8,3 \pm 2,21$ %). Rovněž podíly AP ($17,8 \pm 2,15$ %) a AR ($12,6 \pm 1,76$ %) z řídkých ejakulátů dosáhly statisticky průkazně ($P < 0,01$) vyšších hodnot oproti vzorkům vyrobených z hustých ejakulátů (AP: $6,3 \pm 1,94$ %,

AR: $4,7 \pm 1,58$ %). Hodnoty APO se u těchto vzorků lišily na hladině statistické významnosti $P < 0,05$, jejich vyšší hodnoty byly zaznamenány opět u vzorků vyrobených z řídkých ejakulátů ($4,2 \pm 0,56$ %). Z uvedených výsledků je patrné, že pro výrobu inseminačních dávek metodou DF z řídkých ejakulátů je nejvýhodnější zpracování v objemu 4 ml. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 29.

Tabulka 29 Parametry aktivity spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF v průběhu TDT testu, interakce hustoty čerstvého ejakulátu a objemu při prvním mrazení.

| Hustota | Objem při I. mrazení | n (=172) | AC v T0 (%) | AP v T0 (%) | AR v T0 (%) | APO v T0 (%) |
|---|----------------------|----------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Nízká (0,4-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 24 | 17,6 \pm 1,45 | 13,8 \pm 1,21 | 8,7 \pm 0,81 | 4,7 \pm 0,50 |
| | 8 ml | 24 | 15,2 \pm 1,45 | 11,5 \pm 1,19 | 7,2 \pm 0,81 | 4,0 \pm 0,50 |
| | 12 ml | 21 | 14,1 \pm 1,48 | 10,2 \pm 1,22 | 6,2 \pm 0,83 | 3,8 \pm 0,51 |
| Střední (0,71 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 22 | 16,7 \pm 1,55 | 12,7 \pm 1,28 | 8,1 \pm 0,87 | 4,4 \pm 0,53 |
| | 8 ml | 22 | 16,3 \pm 1,55 | 12,4 \pm 1,28 | 7,6 \pm 0,87 | 4,6 \pm 0,53 |
| | 12 ml | 19 | 14,1 \pm 1,55 | 9,9 \pm 1,28 | 5,8 \pm 0,87 | 3,8 \pm 0,53 |
| Vysoká (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 14 | 14,2 \pm 1,72 | 9,9 \pm 1,42 | 6,0 \pm 0,96 | 3,7 \pm 0,59 |
| | 8 ml | 14 | 15,4 \pm 1,72 | 11,1 \pm 1,42 | 6,8 \pm 0,96 | 4,1 \pm 0,59 |
| | 12 ml | 13 | 13,7 \pm 1,72 | 9,72 \pm 1,42 | 5,6 \pm 0,96 | 4,0 \pm 0,59 |
| Hustota | Objem při I. mrazení | n (=132) | AC v T60 (%) | AP v T60 (%) | AR v T60 (%) | APO v T60 (%) |
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Nízká (0,4-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 17 | 19,1 \pm 2,56 | 15,9 \pm 2,18 | 12,6 \pm 1,70 | 3,2 \pm 0,58 |
| | 8 ml | 17 | 16,0 \pm 2,56 | 12,5 \pm 2,18 | 9,7 \pm 1,75 | 3,2 \pm 0,60 |
| | 12 ml | 13 | 17,0 \pm 2,71 | 13,8 \pm 2,31 | 10,5 \pm 1,81 | 3,1 \pm 0,61 |
| Střední (0,71 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 20 | 18,8 \pm 2,37 | 15,6 \pm 2,01 | 12,0 \pm 1,58 | 3,2 \pm 0,54 |
| | 8 ml | 18 | 23,8 \pm 2,63 | 20,0 \pm 2,24 | 15,6 \pm 1,75 | 4,0 \pm 0,60 |
| | 12 ml | 16 | 18,5 \pm 2,80 | 15,4 \pm 2,38 | 11,4 \pm 1,87 | 3,7 \pm 0,63 |
| Vysoká (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 12 | 12,4 \pm 2,49 | 9,7 \pm 2,12 | 7,3 \pm 1,66 | 2,2 \pm 0,56 |
| | 8 ml | 11 | 15,3 \pm 2,63 | 12,0 \pm 2,24 | 8,5 \pm 1,75 | 3,4 \pm 0,60 |
| | 12 ml | 8 | 13,9 \pm 2,80 | 10,8 \pm 2,38 | 8,1 \pm 1,87 | 2,6 \pm 0,63 |
| Hustota | Objem při I. mrazení | n (=106) | AC v T120 (%) | AP v T120 (%) | AR v T120 (%) | APO v T120 (%) |
| | | | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE | LSM \pm SE |
| Nízká (0,4-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 13 | 20,6 \pm 2,45 ^A | 17,8 \pm 2,15 ^A | 12,6 \pm 1,76 ^A | 4,2 \pm 0,56 ^a |
| | 8 ml | 13 | 13,3 \pm 2,36 | 10,6 \pm 2,07 | 8,1 \pm 1,69 | 2,4 \pm 0,54 |
| | 12 ml | 10 | 14,7 \pm 2,79 | 12,0 \pm 2,45 | 8,6 \pm 2,00 | 3,3 \pm 0,64 |
| Střední (0,71 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 16 | 18,1 \pm 2,14 ^a | 14,6 \pm 1,88 | 10,8 \pm 1,53 | 3,6 \pm 0,49 |
| | 8 ml | 17 | 16,0 \pm 2,21 | 13,3 \pm 1,93 | 10,2 \pm 1,58 | 2,8 \pm 0,51 |
| | 12 ml | 14 | 12,6 \pm 2,36 | 10,2 \pm 2,07 | 7,6 \pm 1,69 | 2,4 \pm 0,54 |
| Vysoká (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 9 | 8,3 \pm 2,21 ^{B,b} | 6,3 \pm 1,94 ^B | 4,7 \pm 1,58 ^B | 1,5 \pm 0,51 ^b |
| | 8 ml | 8 | 12,3 \pm 2,28 | 9,4 \pm 2,00 | 6,9 \pm 1,63 | 2,5 \pm 0,53 |
| | 12 ml | 6 | 9,8 \pm 2,55 | 7,2 \pm 2,24 | 5,2 \pm 1,8 | 1,9 \pm 0,59 |

Kde: A-B, C-D, E-F – statistická významnost $P < 0,01$, a-b, c-d statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR

– podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 – 0 minut po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, T120 – 120 minut po rozmrazení

Rozdíly v podílu spermií s nenarušenými membránami a podílu živých spermií nebyly u dávek vyrobených metodou DF ve sledované interakci hustoty čerstvého ejakulátu a objemu při prvním mrazení statisticky průkazné. Podrobné výsledky jsou uvedeny v tabulce 30.

Tabulka 30: Podíl spermií s nenarušenou membránou a podíl živých spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF (n=195), interakce hustoty čerstvého ejakulátu a objemu při prvním mrazení

| Hustota | Objem při I. mrazení | n | NM v T0 (%) | ŽIV v T0 (%) |
|---|----------------------|----|-------------|--------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE |
| Nízká (0,4-0,70 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 25 | 10,3 ± 1,27 | 10,0 ± 1,34 |
| | 8 ml | 25 | 9,6 ± 1,27 | 9,9 ± 1,34 |
| | 12 ml | 25 | 9,0 ± 1,27 | 8,8 ± 1,34 |
| Střední (0,71 – 1,08 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 22 | 11,4 ± 1,36 | 11,9 ± 1,43 |
| | 8 ml | 22 | 10,0 ± 1,36 | 9,9 ± 1,43 |
| | 12 ml | 22 | 10,0 ± 1,36 | 9,4 ± 1,43 |
| Vysoká (1,09 – 1,77 mil. sp/mm ³) | 4 ml | 18 | 11,5 ± 1,51 | 11,6 ± 1,59 |
| | 8 ml | 18 | 12,4 ± 1,51 | 12,3 ± 1,59 |
| | 12 ml | 18 | 8,6 ± 1,51 | 7,9 ± 1,59 |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, NM – podíl spermií s nenarušenými membránami T0 -bezprostředně po rozmrazení, ŽIV – podíl živých spermií, T0- bezprostředně po rozmrazení

5.2.2.5 Vliv býka a objemu při prvním mrazení na kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF

Bezprostředně po rozmrazení, v T0, bylo k hodnocení použito n=172 vzorků. Nejvíce vzorků bylo vyřazeno od býků COLMAN a LATEX, od kterých bylo z celkového počtu 15 vzorků hodnoceno pouze 10 kusů. Naopak u býků KORN, MONTEKO, SUNSHINE a SUNWAY bylo hodnoceno všech 15 vyrobených vzorků.

Mezi hodnotami AC, AP a AR byly u několika býků nalezeny statisticky významné rozdíly na hladinách významnosti $P < 0,01$ a $P < 0,05$.

Nejvyšších hodnot AC bylo dosaženo u býků MARTIN ($25,0 \pm 3,19$ %) a KORN ($24,8 \pm 2,85$ %), a to u vzorků vyrobených z objemu 8 ml. Oba býci jsou plemene české strakaté.

Tyto hodnoty byly statisticky průkazně vyšší než u vzorků vyrobených ze shodného objemu od býků LATEX ($6,0 \pm 2,85$ %) a POLLEDSTAR ($7,3 \pm 3,19$ %). Holštýnský býk SUREBOY dosáhl u vzorků vyrobených z objemu 4 ml statisticky průkazně ($P < 0,05$) vyšších hodnot než býci COLMAN, LATEX, LEWIS, LYON, PIKANT, SUNSHINE a SUNNYWAY. Vzorky SUREBOYE vyrobené z objemu 4 ml zároveň dosáhly statisticky průkazně ($P < 0,05$) než vzorky téhož býka vyrobené z objemu 12 ml.

Další statisticky průkazné rozdíly mezi býky byly detekovány u indikátoru AP. Zde dosáhl vůbec nejvyšší hodnoty býk SUREBOY ($26,3 \pm 2,35$ %) a to u vzorků vyrobených z objemu 4 ml. Tato hodnota se statisticky průkazně ($P < 0,01$, $P < 0,05$) od hodnot zjištěných ve vzorcích vyrobených ze shodného objemu od býků COLMAN, KORN, LATEX, LEWIS, LYON, PIKANT, SUNSHINE, SUNWAY a POLLEDSTAR. Dále byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi vzorky vyrobenými z objemu 8 ml u býků MARTIN a LATEX ($P < 0,01$) a mezi býky KORN a LATEX ($P < 0,05$). Obdobně jako při hodnocení AC byl nalezen statisticky průkazný ($P < 0,05$) rozdíl mezi vzorky vyrobenými z objemu 4 ml a 12 ml u býka SUREBOY.

Statisticky průkazné rozdíly byly zjištěny i u AR, kdy opět dominovali býci KORN a MARTIN se vzorky vyrobenými z objemu 8 ml a býk SUREBOY se vzorky vyrobenými z objemu 4 ml. Mezi hodnotami APO nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly. Podrobné výsledky jsou shrnuty v tabulce 31.

Tabulka 31: Parametry aktivity spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF (n=172) v T0, interakce býka a objemu při prvním mrazení

| Býk | Objem při I. mrazení | n | AC v T0 (%) | AP v T0 (%) | AR v T0 (%) | APO v T0 (%) |
|------------|----------------------|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| COLMAN | 4 ml | 3 | 11,7 ± 3,19 ^D | 8,1 ± 2,63 ^D | 4,9 ± 1,79 ^D | 3,1 ± 1,14 |
| | 8 ml | 4 | 10,0 ± 3,19 | 6,9 ± 2,63 | 4,2 ± 1,79 | 2,6 ± 1,14 |
| | 12 ml | 3 | 10,8 ± 3,19 | 7,2 ± 2,63 | 3,9 ± 1,79 | 3,1 ± 1,14 |
| KORN | 4 ml | 5 | 16,7 ± 2,85 | 11,1 ± 2,35 ^D | 7,2 ± 1,60 ^D | 3,9 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 24,8 ± 2,85 ^A | 18,4 ± 2,35 ^a | 11,3 ± 1,60 ^A | 6,7 ± 1,02 |
| | 12 ml | 5 | 19,4 ± 2,85 | 14,5 ± 2,35 | 9,5 ± 1,60 | 4,8 ± 1,02 |
| LATEX | 4 ml | 4 | 10,1 ± 2,85 ^D | 7,4 ± 2,35 ^D | 4,5 ± 1,60 | 2,8 ± 1,02 |
| | 8 ml | 4 | 6,0 ± 2,85 ^B | 4,1 ± 2,35 ^{b,B} | 2,3 ± 1,60 ^B | 1,8 ± 1,02 |
| | 12 ml | 2 | 5,7 ± 2,85 | 3,6 ± 2,35 | 1,7 ± 1,60 | 1,9 ± 1,02 |
| LEWIS | 4 ml | 4 | 12,8 ± 2,85 ^D | 9,0 ± 2,35 ^D | 5,6 ± 1,60 ^D | 3,2 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 16,0 ± 2,85 | 11,0 ± 2,35 | 6,6 ± 1,60 | 4,3 ± 1,02 |
| | 12 ml | 5 | 11,1 ± 2,85 | 7,4 ± 2,35 | 4,3 ± 1,60 | 3,1 ± 1,02 |
| LYON | 4 ml | 5 | 11,8 ± 2,85 ^D | 8,9 ± 2,35 ^D | 6,4 ± 1,60 ^D | 2,4 ± 1,02 |
| | 8 ml | 4 | 14,6 ± 2,85 | 11,6 ± 2,35 | 7,0 ± 1,60 | 4,3 ± 1,02 |
| | 12 ml | 5 | 15,8 ± 2,85 | 11,9 ± 2,35 | 5,9 ± 1,60 | 5,9 ± 1,02 |
| MARTIN | 4 ml | 4 | 19,2 ± 3,19 | 14,7 ± 2,63 | 8,2 ± 1,79 ^b | 6,2 ± 1,14 |
| | 8 ml | 4 | 25,0 ± 3,19 ^A | 20,0 ± 2,63 ^A | 12,3 ± 1,79 ^A | 7,4 ± 1,14 |
| | 12 ml | 3 | 16,2 ± 3,19 | 12,2 ± 2,63 | 6,9 ± 1,79 | 4,5 ± 1,14 |
| MONTEKO | 4 ml | 5 | 19,9 ± 2,85 | 14,6 ± 2,35 | 8,6 ± 1,60 ^b | 6,7 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 16,0 ± 2,85 | 12,2 ± 2,35 | 5,9 ± 1,60 | 6,1 ± 1,02 |
| | 12 ml | 5 | 15,4 ± 3,01 | 10,7 ± 2,48 | 4,2 ± 1,60 | 6,3 ± 1,08 |
| PIKANT | 4 ml | 5 | 14,1 ± 2,85 ^D | 9,8 ± 2,35 ^D | 5,8 ± 1,60 ^D | 3,9 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 16,2 ± 2,85 | 11,6 ± 2,35 | 6,7 ± 1,60 | 4,7 ± 1,01 |
| | 12 ml | 4 | 16,3 ± 3,01 | 11,0 ± 2,48 | 6,1 ± 1,69 | 4,7 ± 1,08 |
| POLLEDSTAR | 4 ml | 4 | 16,4 ± 3,19 | 11,8 ± 2,63 ^d | 7,3 ± 1,79 ^b | 4,4 ± 1,14 |
| | 8 ml | 4 | 7,3 ± 3,19 ^B | 5,0 ± 2,63 ^B | 3,2 ± 1,79 | 1,7 ± 1,14 |
| | 12 ml | 3 | 16,2 ± 3,19 | 12,2 ± 2,63 | 7,9 ± 1,79 | 4,3 ± 1,14 |
| REBEL | 4 ml | 5 | 24,1 ± 2,85 | 18,8 ± 2,35 | 12,6 ± 1,60 | 5,3 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 16,9 ± 2,85 | 13,6 ± 2,35 | 9,0 ± 1,60 | 3,8 ± 1,02 |
| | 12 ml | 4 | 9,8 ± 2,85 | 7,3 ± 2,35 | 5,0 ± 1,60 | 2,2 ± 1,02 |
| SUNSHINE | 4 ml | 5 | 11,6 ± 2,85 ^D | 8,6 ± 2,35 ^D | 5,4 ± 1,60 ^D | 3,2 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 13,2 ± 2,85 | 9,4 ± 2,35 | 6,2 ± 1,60 | 3,1 ± 1,02 |
| | 12 ml | 5 | 11,8 ± 2,85 | 8,0 ± 2,35 | 4,9 ± 1,60 | 3,0 ± 1,02 |
| SUNWAY | 4 ml | 5 | 12,7 ± 2,85 ^D | 10,0 ± 2,35 ^D | 6,3 ± 1,60 ^D | 3,3 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 17,1 ± 2,85 | 13,5 ± 2,35 | 8,8 ± 1,60 | 4,3 ± 1,02 |
| | 12 ml | 5 | 18,5 ± 2,85 | 12,9 ± 2,35 | 8,9 ± 1,60 | 3,6 ± 1,02 |
| SUREBOY | 4 ml | 5 | 31,2 ± 2,85 ^{C,a} | 26,3 ± 2,35 ^{C,c} | 17,6 ± 1,60 ^{C,a} | 8,0 ± 1,02 |
| | 8 ml | 5 | 18,9 ± 2,85 | 13,9 ± 2,35 | 9,7 ± 1,60 | 4,1 ± 1,02 |
| | 12 ml | 4 | 15,2 ± 2,85 ^b | 11,3 ± 2,35 ^d | 7,6 ± 1,60 ^b | 3,3 ± 1,02 |

Kde: A-B, C-D – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl

spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T0 – 0 minut po rozmrazení,

Hodinu po rozmrazení bylo hodnoceno n=132 vzorků. Nejvíce vzorků bylo opět vyřazeno od býků COLMAN (hodnoceno 6 vzorků) a LATEX (hodnoceno 5 vzorků), přičemž u tohoto býka nebyl hodnocen žádný vzorek vyrobený z objemu 12 ml. U býka POLLEDSTAR byly vyřazeny 3 vzorky o objemu 8 ml a do tohoto hodnocení tedy vstupoval s pouze jedním vzorkem o tomto objemu. Nejvíce vzorků n=12 bylo hodnoceno od býka SUNWAY.

I u vzorků analyzovaných hodinu po rozmrazení (T60) byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami zjištěných z inseminačních dávek některých býků. Nejvyšší AC $34,6 \pm 4,7$ % dosáhl býk REBEL ve vzorcích vyrobených z objemu 4 ml. Tato hodnota byla statisticky průkazně ($P < 0,05$) vyšší než hodnota zjištěná u býka LEWIS ($7,0 \pm 4,20$ %). Velmi podobná byla hodnota AC u inseminačních dávek vyrobených z objemu 12 ml u býka KORN $34,5 \pm 5,42$. Ta byla statisticky průkazně ($P < 0,01$) vyšší oproti hodnotě zjištěné u býka POLLEDSTAR v daném objemu. U KORNA byla zjištěna i vyšší hodnota AC u inseminačních dávek vyrobených z objemu 8 ml $29,7 \pm 4,20$ %. Ta byla statisticky průkazně vyšší oproti hodnotě zjištěné u POLLEDSTARA ($P < 0,01$) a u COLMANA ($P < 0,05$).

Nejvyšší hodnoty AP dosáhl býk REBEL v inseminačních dávkách vyrobených z objemu 4 ml ($29,5 \pm 4,11$ %). Hodnota byla statisticky průkazně ($P < 0,05$) vyšší oproti hodnotám detekovaným u býků COLMAN, LEWIS a POLLEDSTAR ve sledovaném objemu.

Obdobně tomu bylo i u AR, kdy nejvyšší hodnota byla naměřena u býka REBEL a statisticky průkazně ($P < 0,05$) se lišila od hodnot naměřených u býků LEWIS a POLLEDSTAR.

Mezi hodnotami AR nebyl, obdobně jako v T0, zjištěn žádný statisticky významný rozdíl. Podrobnosti udává tabulka 32.

Tabulka 32: Parametry aktivity spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF (n=132) v T60, interakce býka a objemu při prvním mrazení

| Býk | Objem při I. mrazení | n | AC v T60 (%) | AP v T60 (%) | AR v T60 (%) | APO v T60 (%) |
|------------|----------------------|---|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| COLMAN | 4 ml | 2 | 8,5 ± 4,70 | 6,4 ± 4,11 ^b | 4,8 ± 3,36 | 1,6 ± 1,05 |
| | 8 ml | 2 | 5,4 ± 4,70 ^b | 3,3 ± 4,11 | 2,4 ± 3,36 | 0,9 ± 1,05 |
| | 12 ml | 2 | 10,6 ± 4,70 | 9,0 ± 4,11 | 7,0 ± 3,36 | 1,7 ± 1,05 |
| KORN | 4 ml | 3 | 12,4 ± 4,70 | 9,1 ± 4,11 | 7,1 ± 3,36 | 1,7 ± 1,05 |
| | 8 ml | 5 | 29,7 ± 4,20 ^{a,A} | 22,9 ± 3,67 | 16,4 ± 3,00 | 6,1 ± 0,94 |
| | 12 ml | 3 | 34,5 ± 5,42 ^C | 27,5 ± 4,74 | 20,5 ± 3,88 | 6,7 ± 1,21 |
| LATEX | 4 ml | 3 | 21,7 ± 5,42 | 18,2 ± 4,74 | 13,6 ± 3,88 | 4,2 ± 1,21 |
| | 8 ml | 2 | 18,5 ± 6,64 | 16,0 ± 5,81 | 12,5 ± 4,75 | 3,1 ± 1,48 |
| | 12 ml | 0 | -- | -- | -- | -- |
| LEWIS | 4 ml | 3 | 7,0 ± 4,20 ^d | 5,9 ± 3,67 ^b | 4,7 ± 3,00 ^b | 1,2 ± 0,94 |
| | 8 ml | 4 | 16,8 ± 4,20 | 14,0 ± 3,67 | 10,6 ± 3,00 | 3,2 ± 0,94 |
| | 12 ml | 3 | 12,3 ± 4,20 | 9,9 ± 4,11 | 7,3 ± 3,36 | 2,5 ± 1,05 |
| LYON | 4 ml | 4 | 16,1 ± 4,70 | 13,2 ± 3,67 | 10,3 ± 3,00 | 2,9 ± 0,94 |
| | 8 ml | 4 | 26,1 ± 4,20 | 22,4 ± 4,11 | 16,9 ± 3,36 | 5,4 ± 1,05 |
| | 12 ml | 4 | 19,0 ± 4,70 | 14,0 ± 4,11 | 10,3 ± 3,36 | 3,6 ± 1,05 |
| MARTIN | 4 ml | 4 | 17,7 ± 4,70 | 15,4 ± 4,11 | 11,8 ± 3,36 | 3,5 ± 1,05 |
| | 8 ml | 4 | 25,7 ± 4,70 | 21,1 ± 4,11 | 14,3 ± 3,36 | 6,6 ± 1,05 |
| | 12 ml | 3 | 24,4 ± 4,70 | 20,8 ± 4,74 | 14,3 ± 3,88 | 6,4 ± 1,21 |
| MONTEKO | 4 ml | 4 | 21,5 ± 5,42 | 17,7 ± 3,67 | 13,2 ± 3,00 | 4,3 ± 0,94 |
| | 8 ml | 3 | 15,3 ± 4,70 | 11,9 ± 4,11 | 8,8 ± 3,36 | 3,0 ± 1,05 |
| | 12 ml | 4 | 21,6 ± 4,70 | 18,8 ± 4,11 | 12,6 ± 3,36 | 5,8 ± 1,05 |
| PIKANT | 4 ml | 4 | 21,9 ± 4,70 | 17,2 ± 4,11 | 12,5 ± 3,36 | 4,1 ± 1,05 |
| | 8 ml | 4 | 21,1 ± 4,70 | 17,6 ± 4,11 | 13,2 ± 3,36 | 4,2 ± 1,05 |
| | 12 ml | 4 | 16,6 ± 4,70 | 14,0 ± 4,11 | 10,5 ± 3,36 | 3,2 ± 1,05 |
| POLLEDSTAR | 4 ml | 3 | 10,0 ± 4,20 | 7,4 ± 3,67 ^b | 5,4 ± 3,00 ^b | 2,0 ± 0,94 |
| | 8 ml | 1 | 5,0 ± 4,70 ^B | 1,5 ± 4,11 | 1,1 ± 3,88 | 0,4 ± 1,21 |
| | 12 ml | 3 | 6,1 ± 4,20 ^D | 4,4 ± 3,67 | 3,5 ± 3,00 | 0,9 ± 0,94 |
| REBEL | 4 ml | 4 | 34,6 ± 4,70 ^c | 29,5 ± 4,11 ^a | 23,6 ± 3,36 ^a | 5,4 ± 1,05 |
| | 8 ml | 4 | 22,2 ± 4,70 | 16,6 ± 4,11 | 13,0 ± 3,36 | 3,0 ± 1,05 |
| | 12 ml | 4 | 14,1 ± 4,70 | 11,4 ± 4,11 | 9,1 ± 3,36 | 1,9 ± 1,05 |
| SUNSHINE | 4 ml | 4 | 14,0 ± 4,70 | 11,2 ± 4,11 | 8,8 ± 3,36 | 2,4 ± 1,05 |
| | 8 ml | 4 | 12,5 ± 4,70 | 10,1 ± 4,11 | 8,1 ± 3,36 | 1,9 ± 1,05 |
| | 12 ml | 3 | 10,9 ± 5,42 | 9,2 ± 4,74 | 7,2 ± 3,88 | 1,8 ± 1,21 |
| SUNWAY | 4 ml | 4 | 13,0 ± 4,20 | 11,0 ± 3,67 | 8,6 ± 3,00 | 2,1 ± 0,94 |
| | 8 ml | 4 | 18,2 ± 4,70 | 15,0 ± 4,11 | 11,0 ± 3,36 | 3,4 ± 1,05 |
| | 12 ml | 5 | 17,6 ± 4,20 | 14,2 ± 3,67 | 11,9 ± 3,00 | 2,1 ± 0,94 |
| SUREBOY | 4 ml | 4 | 22,3 ± 3,84 | 18,7 ± 3,35 | 15,3 ± 2,74 | 2,9 ± 0,86 |
| | 8 ml | 4 | 23,6 ± 4,70 | 18,7 ± 4,11 | 15,4 ± 3,36 | 2,9 ± 1,05 |
| | 12 ml | 3 | 17,6 ± 5,42 | 13,4 ± 4,74 | 10,5 ± 3,88 | 2,8 ± 1,21 |

Kde: A-B, C-D – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T60 – 60 minut po rozmrazení.

Po 120 minutách TDT testu byly u býků COLMAN a POLLEDSTAR hodnoceny pouze 3 vzorky, u býka LATEX pouze 4 vzorky. Naopak nejvíce vzorků $n=11$ bylo hodnoceno u býků KORN, LYON.

Mezi hodnotami AC nebyly v T120 nalezeny statisticky významné rozdíly.

Nejvyšší AP dosáhl býk REBEL ($26,0 \pm 3,57 \%$) u vzorků vyrobených z objemu 4 ml, a tato hodnota byla statisticky průkazně ($P<0,01$) vyšší oproti hodnotám zjištěným u býků LEWIS a POLLEDSTAR. Stejně tomu bylo i u parametru AR, zatímco mezi hodnotami APO opět nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Podrobnosti udává tabulka 33.

Tabulka 33: Parametry aktivity spermií v inseminačních dávkách vyrobených metodou DF (n=106) v T120, interakce býka a objemu při prvním mrazení

| Býk | Objem při I. mrazení | n | AC v T120 (%) | | AP v T120 (%) | | AR v T120 (%) | | APO v T120 (%) | |
|------------|----------------------|---|---------------|----|--------------------------|----|--------------------------|----|----------------|----|
| | | | LSM | SE | LSM ± SE | SE | LSM ± SE | SE | LSM ± SE | SE |
| COLMAN | 4 ml | 2 | 9,3 ± 4,00 | | 7,6 ± 3,57 | | 6,1 ± 2,91 | | 1,4 ± 1 | |
| | 8 ml | 0 | | | | | | | | |
| | 12 ml | 1 | 7,8 ± 4,62 | | 6,7 ± 4,13 | | 5,6 ± 3,37 | | 1,0 ± 1,15 | |
| KORN | 4 ml | 3 | 8,4 ± 4,62 | | 6,4 ± 4,13 | | 4,3 ± 3,37 | | 2,0 ± 1,15 | |
| | 8 ml | 5 | 16,1 ± 3,57 | | 10,8 ± 3,20 | | 7,1 ± 2,61 | | 3,6 ± 0,89 | |
| | 12 ml | 3 | 14,0 ± 4,62 | | 9,2 ± 4,13 | | 5,8 ± 3,37 | | 3,4 ± 1,15 | |
| LATEX | 4 ml | 2 | 23,1 ± 5,65 | | 19,0 ± 5,05 | | 14,9 ± 4,12 | | 3,6 ± 1,41 | |
| | 8 ml | 2 | 8,4 ± 5,65 | | 5,9 ± 5,05 | | 4,8 ± 4,12 | | 1,1 ± 1,41 | |
| | 12 ml | 0 | | | | | | | | |
| LEWIS | 4 ml | 3 | 5,0 ± 3,57 | | 3,5 ± 3,20 ^B | | 2,2 ± 2,61 ^B | | 1,2 ± 0,89 | |
| | 8 ml | 4 | 9,0 ± 3,57 | | 7,0 ± 3,20 | | 5,4 ± 2,61 | | 1,5 ± 0,89 | |
| | 12 ml | 2 | 10,8 ± 4,62 | | 8,8 ± 4,13 | | 6,7 ± 3,37 | | 2,2 ± 1,15 | |
| LYON | 4 ml | 3 | 10,8 ± 4,62 | | 8,7 ± 4,13 | | 6,3 ± 3,37 | | 2,4 ± 1,15 | |
| | 8 ml | 4 | 25,4 ± 4,00 | | 21,4 ± 3,57 | | 16,2 ± 2,91 | | 4,9 ± 1,00 | |
| | 12 ml | 4 | 13,2 ± 4,00 | | 9,6 ± 3,57 | | 6,9 ± 2,91 | | 2,6 ± 1,00 | |
| MARTIN | 4 ml | 3 | 20,6 ± 4,62 | | 16,3 ± 4,13 | | 11,5 ± 3,37 | | 4,8 ± 1,15 | |
| | 8 ml | 4 | 16,5 ± 4,00 | | 13,5 ± 3,57 | | 10,5 ± 2,91 | | 2,7 ± 1,00 | |
| | 12 ml | 2 | 16,8 ± 5,65 | | 14,1 ± 5,05 | | 10,1 ± 4,12 | | 3,7 ± 1,41 | |
| MONTEKO | 4 ml | 4 | 18,9 ± 4,00 | | 16,1 ± 3,57 | | 11,0 ± 2,91 | | 5,1 ± 1,00 | |
| | 8 ml | 3 | 13,1 ± 4,62 | | 10,1 ± 4,13 | | 7,7 ± 3,37 | | 2,4 ± 1,15 | |
| | 12 ml | 2 | 14,1 ± 4,62 | | 12,1 ± 4,13 | | 7,7 ± 3,37 | | 4,2 ± 1,15 | |
| PIKANT | 4 ml | 3 | 15,7 ± 4,00 | | 12,1 ± 3,57 | | 9,3 ± 2,91 | | 2,5 ± 1,00 | |
| | 8 ml | 3 | 15,4 ± 4,00 | | 12,6 ± 3,57 | | 9,3 ± 2,91 | | 3,0 ± 1,00 | |
| | 12 ml | 3 | 16,5 ± 4,62 | | 11,9 ± 4,13 | | 8,5 ± 3,37 | | 3,2 ± 1,15 | |
| POLLEDSTAR | 4 ml | 2 | 6,0 ± 4,00 | | 4,9 ± 3,57 ^B | | 3,4 ± 2,91 ^B | | 1,5 ± 1,00 | |
| | 8 ml | 0 | | | | | | | | |
| | 12 ml | 1 | 3,7 ± 4,62 | | 2,8 ± 4,13 | | 2,0 ± 3,37 | | 0,8 ± 1,15 | |
| REBEL | 4 ml | 4 | 28,7 ± 4,00 | | 26,0 ± 3,57 ^A | | 20,9 ± 2,91 ^A | | 4,7 ± 1,00 | |
| | 8 ml | 3 | 25,8 ± 4,62 | | 22,5 ± 4,13 | | 17,5 ± 3,37 | | 4,3 ± 1,15 | |
| | 12 ml | 3 | 14,0 ± 4,62 | | 12,2 ± 4,13 | | 9,7 ± 3,37 | | 2,2 ± 1,15 | |
| SUNSHINE | 4 ml | 3 | 19,7 ± 4,62 | | 16,3 ± 4,13 | | 7,5 ± 3,37 | | 5,0 ± 1,15 | |
| | 8 ml | 3 | 14,4 ± 4,00 | | 12,2 ± 4,13 | | 9,7 ± 2,91 | | 2,6 ± 1,00 | |
| | 12 ml | 3 | 12,7 ± 4,62 | | 10,3 ± 4,13 | | 7,7 ± 3,37 | | 2,5 ± 1,15 | |
| SUNWAY | 4 ml | 2 | 14,8 ± 5,65 | | 12,5 ± 5,05 | | 8,7 ± 4,12 | | 3,4 ± 1,41 | |
| | 8 ml | 4 | 8,9 ± 4,00 | | 6,7 ± 3,57 | | 4,9 ± 2,91 | | 1,7 ± 1,00 | |
| | 12 ml | 4 | 12,5 ± 4,00 | | 10,2 ± 3,57 | | 7,8 ± 2,91 | | 2,2 ± 1,00 | |
| SUREBOY | 4 ml | 4 | 23,1 ± 3,57 | | 18,2 ± 3,20 | | 14,4 ± 2,61 | | 3,7 ± 0,89 | |
| | 8 ml | 3 | 15,4 ± 4,62 | | 12,7 ± 4,13 | | 10,0 ± 3,37 | | 2,6 ± 1,15 | |
| | 12 ml | 2 | 11,9 ± 5,65 | | 10,4 ± 5,05 | | 7,7 ± 4,12 | | 2,5 ± 1,41 | |

Kde: A-B – statistická významnost $P < 0,01$, a-b statistická významnost $P < 0,05$, AC – podíl spermií s celkovým pohybem, AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, AR – podíl spermií s rychlým pohybem, APO – podíl spermií s pomalým pohybem, T120 – 120 minut po rozmrazení,

Při interakci býka a objemu při prvním mrazení nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hodnotách podílu spermií s nenarušenými mebránami a podílu živých spermií. Podrobné výsledky jsou uvedeny v příloze č.3.

Na ISB Hradištke (Natural) je standardem pro komerční využití inseminačních dávek AP v T0 – 40 % anebo AP v T120 – 30 %. Ani jeden ze sledovaných býků nedosáhl svými průměry u dávek vyrobených metodou DF těchto hodnot. Nicméně u několika býků byly během jednotlivých měření zaznamenány hodnoty přesahující, nebo blízké se těmto normám. Podrobnosti jsou uvedeny v tabulce 34.

Tabulka 34 Přehled býků, u nichž hodnota AP na začátku nebo na konci TDT testu překonala nebo se blížila normám ISB Hradištke

| Býk | Objem při I. mrazení | AP v T0 (%) | AP v T60 (%) | AP v T120 (%) |
|---------|----------------------|-------------|--------------|---------------|
| | | Norma 40 % | | Norma 30 % |
| SUREBOY | 4 ml | 44,6 | 24,6 | 20,5 |
| SUREBOY | 4 ml | 38,6 | 26,8 | 18,9 |
| KORN | 8 ml | 37,7 | 31,1 | 8,1 |
| REBEL | 4 ml | 39 | 38,9 | 41,6 |
| REBEL | 8 ml | 22,6 | 25,7 | 30,1 |
| REBEL | 4 ml | 25,0 | 38,5 | 26,5 |
| LYON | 8 ml | 23,6 | 20,6 | 38,7 |
| LATEX | 4 ml | 27,0 | 30,4 | 30,8 |

AP – podíl spermií s přímočarým pohybem, T0 – bezprostředně minut po rozmrazení, T60 – 60 minut po rozmrazení, T120 – 120 minut po rozmrazení,

Není bez zajímavosti, že mezi těmito býky figuruje i býk LATEX, u něhož byly v průběhu TDT testu vyřazeny veškeré vzorky o objemu 12 ml. To, společně se statisticky významnými rozdíly AP, AC a AR ve vzorcích vyrobených z objemů 4 a 12 od býka SUREBOY v T0 poukazuje na fakt, že individualita býka má zásadní vliv na zvolení vhodného objemu pro první mrazení a následnou kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF.

Na základě výsledků býků COLMAN a POLLEDSTAR na konci TDT testu můžeme usuzovat, že někteří býci jsou nevhodní pro produkci inseminačních dávek metodou DF.

Do pokusu byli rovněž zařazeni dva plní bratři stejného věku, býci holštýnského plemene, SUNWAY a SUNSHINE (oba embryotransfer), a to kvůli možnosti detekovat rozdíly v mrazitelnosti spermatu u plných sourozenců. Mezi těmito býky však nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v mrazitelnosti spermatu.

6 DISKUZE

Dle výsledků obou částí předkládané práce můžeme potvrdit možnost mrazení spermatu býků ve velkých objemech. V druhé části práce byla navíc potvrzena možnost dvojího mrazení spermatu býků. U několika z nich bylo dosaženo kvality inseminačních dávek vyrobených metodou DF odpovídající standardům požadovaným na komerční bázi.

6.1 METODICKÝ OKRUH 1 – ROZMRAZOVÁNÍ VELKÝCH OBJEMŮ

V předkládané práci byl prokázán vliv plemene, zjištěné hodnoty přímočarého pohybu v čerstvém ejakulátu a metody rozmrazení na podíl spermií s přímočarým pohybem a podíl spermií s nenarušenou membránou u spermatu mrazeného ve velkých objemech (4 ml, 8 ml a 12 ml) a na dynamiku jejich změn v průběhu kryokonzervace.

Kvalita spermatu je ovlivněna mnoha faktory, např. vnitřními, jako je plemeno, individualita a věk býka. Znám je vliv plemene na kvalitu inseminačních dávek mrazených v pejetách o objemu 0,25 ml (Beran et al. 2011). Dále byly popsány různé požadavky na zpracování spermatu býků různých plemen (Holt et al. 2015). Nicméně dle našeho nejlepšího vědomí doposud nebyl popsán vliv plemene na mrazitelnost spermatu ve velkých objemech.

V naší práci jsme našli signifikantní vliv ($P < 0,05$; $P < 0,01$) plemene na několik indikátorů mrazitelnosti spermatu býků ve sledovaných objemech. Porovnáním výsledků býků holštýnského a českého strakatého plemene bylo zjištěno, že spermie holštýnských býků se zdají být odolnější k negativním vlivům vznikajícím v průběhu kryokonzervace ve velkých objemech. To je vyjádřeno především schopností udržet si vyšší parametry aktivity po rozmrazení vzorku (u vzorků mrazených ve 4 ml a v 8 ml), nižším rozdílem v podílu spermií s přímočarým pohybem mezi čerstvými a rozmrazenými vzorky (u vzorků mrazených v 8 ml) a poklesem podílu spermií s nenarušenou membránou u objemů ve všech sledovaných objemech. Tyto výsledky nejsou v souladu se závěry Berana et al. (2011), kteří pozorovali vyšší přežitelnost u spermií býků českého strakatého plemene v porovnání s holštýnským plemenem. Nicméně to bylo rovněž ovlivněno rozdílným věkem býků, kdy u mladých holštýnských býků byla přežitelnost vyšší v porovnání se staršími býky. U býků plemene české strakaté byl vliv věku opačný. V našem pokusu byli sledováni pouze mladí býci obou plemen, tudíž zjištěné výsledky mohly být rovněž ovlivněny věkem býků. Beran et al. (2011) předpokládají, že rozdíly v mrazitelnosti mohou být také podmíněny rozdílnou úrovní metabolismu. Z našich

výsledků byl jediným indikátorem vyšší odolnosti spermií býků českého strakatého plemene rozdíl v podílu spermií s přímočarou aktivitou mezi časy T0 a T30 u vzorků mrazených v 12 ml objemu. To však může být dáno i celkově velmi nízkými hodnotami AP v T0 a T30 v porovnání s ostatními objemy, které indikují vyšší stres kladený na spermie býků při kryokonzervaci v objemu 12 ml. Tento předpoklad měl být potvrzen v druhé části pokusu. Dalším možným vysvětlením rozdílné mrazitelnosti jsou genetické faktory ovlivňující vnímavost spermií k negativním vlivům mrazení u různých druhů, plemen a jedinců (Thurston et al., 2002).

Dále bylo zjištěno, že podíl spermií s přímočarým pohybem v čerstvém ejakulátu neměl statisticky průkazný vliv na AP vzorků mrazených ve 4 ml objemech. Nicméně v těchto vzorcích byl potvrzen její vliv na pokles aktivity v průběhu kryokonzervace na statistické hladině významnosti ($P < 0,05$). Přímočará aktivita potom byla neprůkazně vyšší u vzorků s vyšší aktivitou v čerstvém ejakulátu. Brinsko et al. (2000) zveřejnili korelace mezi aktivitou v čerstvém ejakulátu a aktivitou v rozmrazených inseminačních dávkách. Tento trend však nebyl v části studie zaměřené na mrazení ve 4 ml objemu potvrzen. Na druhou stranu, statisticky průkazný vliv ($P < 0,05$; $P < 0,01$) podílu spermií s přímočarou aktivitou v čerstvém ejakulátu na podíl spermií s přímočarou aktivitou v T0 a T30 minut po rozmrazení byl potvrzen u vzorků mrazených v 8 ml a 12 ml objemu.

Padrik et al. (2012) zjistili u mrazených inseminačních dávek vysokou korelaci mezi podílem spermií s nenarušenými membránami zjištěným pomocí HOS testu a aktivitou spermatu. Ke stejnému závěru došli i Ramu a Jeyendran (2013). V naší práci jsme sledovali vliv aktivity v čerstvém ejakulátu na podíl spermií s intaktními membránami po rozmrazení a na dynamiku jejich změn v průběhu kryokonzervace, přičemž nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl mezi sledovanými skupinami aktivit. To může být dáno vysokým stresem působícím na membrány spermií v průběhu mrazení ve velkých objemech. Ani u jednoho ze sledovaných objemů nebyly pozorovány průměrné hodnoty pro přímočarou aktivitu po rozmrazení blížíící se hranici 40 %, které je dnes běžným minimálním standardem většiny inseminčních stanic v Evropě pro uvolnění konvenčních inseminačních dávek do oběhu.

Metoda rozmrazení vzorku statisticky průkazně ($P < 0,05$) ovlivnila parametry aktivity u vzorků mrazených v 4 ml a 8 ml objemech, ve kterých byly zjištěny nejpříznivější hodnoty u vzorků rozmrazených pomocí M1. U objemu 12 ml byly tyto výsledky neprůkazné. Rozmrazení vzorků pomocí M2 a M3 v sobě zahrnovalo využití vyšší teploty vodní lázně (40°C) a byly rychlejší ve srovnání s M1, ve které byla používána teplota vodní lázně $t = 37^\circ\text{C}$.

Rychlejší metody rozmrazení pejet o objemu 0,25 a 0,5 ml byly detekovány jako efektivnější ve vztahu k přežitelnosti spermií ve studiích Bartha et al. (1988) a Rastegarnii et al. (2013). V těchto pokusech však byly inseminační dávky vystaveny vyšším teplotám pouze po dobu několika sekund. U spermatu mrazeného ve velkých objemech byl zjištěn opačný trend. To by mohlo být vysvětleno denaturací enzymů, ke které dochází při vyšších teplotách. Podle Lepcocka et al. (1993) dochází k denaturaci enzymů u všech organel při teplotách blízcích se 40 °C. Organely rovněž obsahují termolabilní proteiny, k jejichž denaturaci dochází při určitých teplotách. Tyto proteiny jsou pravděpodobně přítomny ve všech buňkách, včetně spermií savců a svou roli pravděpodobně hrají i v bioenergetickém systému buňky (Koshaka et al. 1992). Dle Verstegen et al (2002) je potom pohyblivost spermií jedním z nejdůležitějších faktorů při posouzení zdrojů energie spermií. Vystavení spermií teplotám blízcím se 40 °C v při procesu rozmrazení proto mohlo ovlivnit energetický systém buněk a vyústit v nižší podíl spermií s přímočarým pohybem a v horší dynamiku těchto změn.

Ve vztahu k podílu spermií s nenarušenými membránami a dynamice jejich změn nebyl zjištěn průkazný vliv metody rozmrazení ani u jednoho ze sledovaných objemů. Membrány spermií bývají poškozeny rekrystalizací ledu při velmi rychlém rozmrazování (Salamon a Maxwell, 2000) nebo příjmem vody spermiemi při velmi pomalém rozmrazování (Mazur et al., 1970). V naší práci nebyly využity metody rozmrazení založené na extrémních teplotách, což mohlo ovlivnit neprůkaznost výsledků týkajících se celistvosti membrán. Porovnány byly metody rozmrazení v současnosti využívané ve studiích zaměřených na problematiku mrazitelnosti spermatu ve velkých objemech a v praxi inseminační stanice Hradištko (Natural).

Padrik et al (2012) u rozmrazených inseminačních dávek mladých býků detekovali pomocí HOS testu průměrně 36,4 % spermií s nenarušenými membránami. Correa et al. (1997) získali obdobný výsledek u spermatu býků s nižší plodností (31,7 %). V našem pokusu byly zjištěny výrazně nižší hodnoty reakce na HOS u všech sledovaných objemů i vlivů (nejnižší hodnota 14,8 %, nejvyšší hodnota 24,5 %). To bude pravděpodobně důsledkem negativních fyzikálních vlivů nastávajících v průběhu kryokonzervace vzorků ve velkých objemech. K rozdílu by mohlo dojít rovněž rozdílnou úrovní proškolení techniků posuzujících reakci spermií na HOS test, která může být u řady spermií nevýrazná a to obdobně jako při subjektivním hodnocení aktivity spermií (Auger et al., 2000; Toft et al., 2005; Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

Přestože absolutní průměrné hodnoty ve vztahu k podílu spermií s přímočarým pohybem byly nižší ve srovnání se standardy běžně využívanými na inseminačních stanicích,

můžeme potvrdit přežití spermií býků vyjádřené pomocí přímočarého pohybu a udržení celistvosti spermatických membrán po rozmrazení vzorků mrazených ve velkých objemech. To bylo již dříve zjištěno Aravem (2002) a Saragustym (2009).

Vliv objemu spermatu při mrazení na oplozovací schopnost spermatu byl popsán například Horvathem et al. (2007) a Saragustym et al. (2009). Tyto výzkumy se však zaměřují výhradně na ryby. Práce zaměřené na porovnání vlivu objemu mrazeného spermatu na parametry kvality a oplozovací schopnost spermatu savců zatím dle našeho vědomí publikovány nebyly. V této části práce nebyla uvedená problematika řešena z důvodu vysokých nároků na množství odebraného ejakulátu a z toho plynoucí nemožnosti vyrobit dostatečné množství vzorků o požadovaných objemech. Je na ni proto zaměřena metodická část 2 naší práce.

Ze získaných výsledků plyne, že sperma holštýnských býků se zdá být vhodnější pro kryokonzervaci ve velkých objemech ve srovnání se spermatem býků českého strakatého plemene. Pro zmrazení ve velkém objemu by dále měly být využity čerstvé ejakuláty s co nejvyšším podílem spermií s přímočarým pohybem. Jako nejvýhodnější postup pro rozmrazení byla detekována M1, která byla použita v navazující části pokusu.

6.2 METODICKÝ OKRUH 2

6.2.1 Hodnocení mrazitelnosti spermatu býků ve velkých objemech

V druhé části práce byly zjištěny slabé, avšak statisticky průkazné, negativní korelace hustoty čerstvého ejakulátu ku podílu spermií s přímočarou aktivitou a k podílu spermií s rychlým pohybem bezprostředně po rozmrazení. Nebyly však zjištěny průkazné korelace mezi parametry aktivity sledovanými v čerstvém ejakulátu a parametry aktivity po rozmrazení. Ty ve svém review uvádějí Šimoník et al. (2015). Byly však potvrzeny statisticky průkazné korelace mezi celkovou aktivitou spermií v čerstvém ejakulátu a podíly spermií s nenarušenou membránou ($r=0,41$) a mezi přímočarou aktivitou spermií v čerstvém ejakulátu a podíly spermií s nenarušenou membránou ($r=0,41$). Padrik et al. (2012) ve své práci udává průkazné korelace mezi těmito parametry v mrazeném spermatu na úrovni $r=0,66$, respektive $r=0,55$. Nižší hodnoty korelačních koeficientů zjištěné v naší práci mohou být způsobeny procesem mrazení.

Dále byl potvrzen vliv velikosti vzorku při prvním mrazení na parametry aktivity spermií, o čemž již dříve informovali Horváth et al. (2007) a Saragusty (2007). Tyto dvě práce se však ve svých závěrech liší. Dle Horvátha et al. (2007), kteří porovnávali mrazitelnost spermatu kaprů v objemech 1,2 ml a 5 ml, je pro mrazení výhodnější menší objem. Naopak Saragusty et al. (2007), kteří porovnávali mrazitelnost spermatu hřebců v objemech 0,5 ml a 12 ml, zjistili vyšší hodnoty aktivity u vzorků mrazených ve velkém objemu. Horváth et al. (2007) navíc potvrdili i vliv na oplozovací schopnost ejakulátů *in-vivo*.

V předkládané práci bylo nejlepších výsledků v průběhu celého TDT testu dosaženo u vzorků mrazených v objemu 8 ml, což je objem, který ve své práci použili Saragusty et al. (2009). Rovněž u vzorků mrazených v objemu 4 ml bylo dosaženo vyšších parametrů aktivity oproti vzorkům mrazeným v objemu 12 ml. Rozdílnost našich výsledků oproti výše uvedeným pracím bude pravděpodobně způsobena rozdílností druhů sledovaných hospodářských zvířat (Thurston et al., 2002.). Konkrétnější vysvětlení bychom mohli hledat v rozdílných poměrech fosfolipidů ku cholesterolu v cytoplasmatické membráně u různých druhů hospodářských zvířat (Parks et Lynch, 1992). Svou roli mohl sehrát i tvar obalu (Diller, 1992), neboť autoři obou porovnávaných studií pracovali s cylindrickými tvary, zatímco my s obdélníkovými.

V druhé části pokusu byla k rozmrazení vzorků použita metoda 1. Porovnáme-li výsledky první a druhé části pokusu, můžeme si v druhé části povšimnout u jednotlivých objemů dvojnásobné hodnoty pro podíly spermií s přímočarým pohybem v T0 a v T30 ve srovnání s první částí. Tyto výsledky nebylo možno statisticky porovnat, neboť šlo o rozdílné biologické jednotky. Nicméně rozdíl je natolik zřetelný, že si můžeme položit otázku, zda by mohlo jít o pozitivní vliv LDL přidaného do ředidla při výrobě vzorků pro druhou část pokusu.

Potvrzen byl rovněž vliv plemene na některé parametry aktivity spermatu býků v jednotlivých objemech bezprostředně po rozmrazení a 30 minut po rozmrazení, kdy, stejně jako v první části pokusu, dosáhlo sperma býků holštýnského plemene ve sledovaných objemech statisticky průkazně vyšších hodnot podílu spermií s rychlým pohybem. V případě podílu spermií s pomalým pohybem byl zaznamenán opačný trend, vyšší podíly byly zaznamenány u českého strakatého plemene. Šimoník et al (2015) ve svém review uvádějí, že, podíl spermií s rychlým pohybem může být považován za významný indikátor plodnosti a naopak, podíl spermií s pomalým pohybem byl zaznamenán u býků s nižší plodností.

Zjištěná vyšší resistence spermií holštýnských býků k negativním vlivům mrazení je v souladu se závěry prvního metodického okruhu. V něm ovšem vyvstala otázka, zda je české strakaté plemeno odolnější k negativním vlivům mrazení v objemu v 12 ml, neboť pouze v

tomto objemu byl mezi plemeny zjištěn statisticky průkazně nižší statistický rozdíl mezi AP v T0 a v T30 ve prospěch českého strakatého plemene. Nicméně při hodnocení výsledků aktivity dle plemen v druhé části pokusu byly u vzorků mrazených v objemu 12 ml detekovány pouze minimální rozdíly a to ve prospěch holštýnského plemene. Můžeme tak potvrdit předpoklad, že nižší pokles AP mezi T0 a T30 u českého strakatého plemene byl v první části pokusu podmíněn celkově nižšími hodnotami aktivit.

V rámci sledovaných plemen byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi AP v T30, AR v T30 a APO v T30 u býků českého strakatého plemene mrazených v objemech 8 ml a 12 ml, kdy lepších výsledků bylo dosaženo u vzorků mrazených v 8 ml. U býků holštýnského plemene nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi parametry kinetiky ve sledovaných objemech.

V tomto metodickém okruhu byl rovněž sledován vliv hustoty čerstvého ejakulátu na mrazitelnost v jednotlivých objemech. Cílem bylo určit nejvhodnější objem pro mrazení dle hustoty čerstvého ejakulátu. Haugan et al. (2017) zjistili, že rozdílné koncentrace spermií v čerstvém ejakulátu, které dosahují fyziologických hodnot, neměly vliv na zabřezávání plemenic. To bylo naznačeno i ve vztahu k mrazitelnosti spermatu býků ve velkých objemech, kdy mezi různě hustými ejakuláty nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v rámci sledovaného objemu ani v rámci sledované hustoty.

Z hlediska vlivu individuality býka na mrazitelnost spermatu ve velkých objemech, byly stanoveny statisticky významné rozdíly mezi býky pouze u podílu spermií s pomalým pohybem a to pouze u skupin vzorků mrazených buď v objemu 4 ml nebo 8 ml. Vliv individuality býka na mrazitelnost jeho spermatu je všeobecně znám a byl popsán v mnoha studiích, a to dokonce i ve vztahu k mrazitelnosti v objemu 8 ml (Saragusty et al., 2009). Cílem této části pokusu však bylo určit, zda existuje individuální citlivost k negativním vlivům mrazení v různých velkých objemech. Tento předpoklad nebyl potvrzen, neboť u jednotlivých býků nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami objemů.

U žádného ze sledovaných vlivů nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v podílech spermií s nenarušenými membránami.

6.2.2 Hodnocení kvality inseminačních dávek vyrobených metodou DF

Druhá část druhého metodického okruhu se zabývala možností výroby inseminačních dávek metodou dvojího mrazení. Na základě získaných výsledků můžeme potvrdit, že některé spermie jsou schopny si udržet schopnost aktivního pohybu a celistvost plasmatické membrány

i po dvojnásobném cyklu mrazení. To bylo již dříve potvrzeno v několika studiích (Maxwell et al., 2007; Saragusty et al., 2009; Underwood et al., 2009). Další práce zabývající se DF potvrdily schopnost oplození oocytů *in vitro* (Bandularante et Bongso, 2002; Hollinshead et al., 2004; Choi et al., 2006; Underwood et al., 2009) a v podmínkách *in vivo* (Si et al., 2006; de Graaf et al., 2007; Saragusty et al., 2009; Underwood et al., 2010).

Kryokonzervace spermatu představuje proces, při kterém jsou na spermie vystaveny osmotickému, mechanickému a oxidativnímu stresu (Pena et al., 2015). V případě DF musí spermie tento proces podstoupit dvakrát, čímž dochází u mnoha z nich ke zvýšeným ztrátám jejich biologických funkcí a odúmrti (Saragusty, 2009). Nebylo proto překvapením, že inseminační dávky vyrobené v našem pokusu metodou DF dosáhly výrazně nižších aktivit v průběhu celého TDT testu (AC 16,5 – 20 %, AP 12,9 – 16,3 %). Jednou z možností, jak zvýšit podíl aktivních spermií je oddělení živých, aktivních a morfologicky nenarušených spermií pomocí PureSperm© filtrace (Januskauskas, 2005; Maxwell et al. 2007; Thys et al., 2009).

Posouzení podílu normálních spermií s přímočarým pohybem (AP) je nejčastěji používanou metodou hodnocení kvality ejakulátu (Foote, 2002). Baltisen (2007) zjistil korelaci mezi AP zjištěnou pomocí CASA a zabřezáváním krav hodnoceným pomocí testu nepřeběhlých plemenic na střední úrovni ($r=0,40$). AP je tedy ze sledovaných parametrů aktivity asi tím nejvýznamnějším ukazatelem.

Dle našeho vědomí nebyla doposud publikována žádná práce zabývající se vztahem inseminačních dávek vyrobených metodou DF k vlastnostem čerstvého ejakulátu, respektive k funkčním vlastnostem spermií po prvním mrazení ani vlivem objemu ejakulátu při prvním mrazení na kvalitu těchto dávek.

Pro výrobu inseminačních dávek za účelem jejich komerčního využití jsou stanoveny minimální standardy kvality čerstvého ejakulátu tak, aby bylo dosaženo minimální požadované kvality inseminačních dávek. Můžeme předpokládat, že kvalita čerstvého ejakulátu ovlivní i kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF. Tento předpoklad potvrdily výsledky korelační analýzy ke sledovaným vlastnostem čerstvého ejakulátu (aktivita celková, aktivita přímá, hustota a objem) vyplynulo, že bezprostředně po rozmrazení a hodinu po rozmrazení, byla pouze hustota čerstvého ejakulátu ve slabé až středně slabé negativní statisticky průkazné korelaci ke sledovaným parametrům aktivity. Na konci TDT testu, tedy dvě hodiny po rozmrazení vzorku dosáhly tyto korelace středně slabé až střední úrovně. V této době byly dále zjištěny statisticky průkazné, rovněž středně slabé až střední negativní korelace sledovaných

parametrů aktivity k vlastnostem čerstvého ejakulátu. Dále byly nalezeny středně slabé pozitivní korelace mezi celkovou aktivitou v čerstvém ejakulátu a podílem spermií s nenarušenou membránou ($r=0,25$) a podílem živých spermií ($r=0,20$). Zjištěny byly i středně slabé pozitivní korelace mezi přímočarou aktivitou v čerstvém ejakulátu a podílem spermií s nenarušenou membránou ($r=0,25$) a podílem živých spermií ($r=0,19$). Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že pro výrobu inseminačních dávek metodou DF budou ke zpracování výhodnější ejakuláty o nižší hustotě se spíše průměrnými hodnotami celkové a přímočaré aktivity.

Korelační koeficienty byly stanoveny rovněž pro vztah parametrů aktivity mezi vzorky mrazenými ve velkém objemu a DF dávkami a i pro podíl spermií s nenarušenými membránami a podíl živých spermií. Zde byla statisticky neprůkazná pouze korelace podílu spermií s pomalým pohybem 120 minut po rozmrazení DF dávky k podílu spermií s rychlým pohybem u vzorků mrazených ve velkém objemu. Ostatní hodnoty dosáhly statisticky průkazných slabých až středních hodnot. Nejsilnější korelace byly stanoveny mezi celkovou aktivitou 120 minut po rozmrazení DF dávek a celkovou ($r=0,50$), respektive přímočarou ($r=0,52$) aktivitou velkoobjemového vzorku. Obdobně i přímočará aktivita 120 minut po rozmrazení DF dávek byla v korelaci k celkové ($r=0,48$) a přímočaré ($r=0,50$) aktivitě velkoobjemového vzorku. Na základě těchto výsledků můžeme konstatovat, že parametry aktivity zjištěné po rozmrazení velkoobjemového vzorku budou mít výrazný vliv na kvalitu inseminačních dávek vyrobených metodou DF.

Možnost výroby inseminačních dávek býků metodou DF v kombinaci s prvním mrazením spermatu ve velkoobjemových tubách zkoumali Saragusty et al. (2009) a Arav et al. (2003). Zatímco prvně jmenovaný tým použil při prvním mrazení objem 8 ml a zjistil u inseminačních dávek vyrobených metodou DF aktivitu po rozmrazení $33,2 \pm 2,22$ %. Druhý tým pracoval s objemem 12 ml a dosáhl u vyrobených dávek aktivity 50 ± 5 %. Horváth et al. (2007) přitom uvádějí lepší výsledky při mrazení v menším objemu. Statistické vyhodnocení parametrů aktivity u inseminačních dávek vyrobených metodou DF z objemů 4 ml, 8 ml a 12 ml ukázalo, že bezprostředně po rozmrazení bylo statisticky průkazně vyšší AC, AP a AR u DF dávek vyrobených z objemu 8 ml oproti dávkám vyrobeným z 12 ml. V tomto čase se rovněž statisticky průkazně lišila i AP mezi DF dávkami vyrobenými z 4 ml a 12 ml vzorků. V dalších časových úsecích TDT testu nebyly mezi DF dávkami nalezeny statisticky průkazné rozdíly. Byly rovněž nalezeny statisticky průkazné rozdíly mezi podílem spermií s nenarušenými membránami a podílem živých spermií mezi DF dávkami vyrobenými z objemu 8 ml a 12 ml,

opět ve prospěch menšího objemu. Vzhledem k výše uvedenému, i k závěrům zjištěným v první části tohoto metodického okruhu, můžeme považovat objem 8 ml jako nejvýhodnější pro první cyklus mrazení.

Sledované interakce mezi objemem při prvním mrazení a plemenem nepřinesly statisticky průkazné rozdíly s výjimkou podílu spermií s pomalým pohybem 60 minut po rozmrazení vzorku. Zde byly lepší výsledky (nižší hodnoty) zjištěny u spermatu býků holštýnského plemene (8 ml: $2,0 \pm 0,43$ % a 12 ml: $2,9 \pm 0,44$ %) mrazeného v objemu 8 ml a 12 ml, oproti výsledkům českých strakatých býků (8 ml $4,7 \pm 0,46$ % a 12 ml: $4,8 \pm 0,53$ %). Není bez zajímavosti, že u DF dávek z těchto objemů byly u býků českého strakatého plemene zjištěny 60 minut po rozmrazení vůbec nejvyšší hodnoty AC (8 ml: $22,4 \pm 2,19$ % a 12 ml: $21,6 \pm 2,53$ %) a AP (8ml: $18,3 \pm 1,88$ % a 12 ml: $21,6 \pm 2,53$ %). Tyto hodnoty se však od ostatních statisticky průkazně nelišily. Stejně tak statisticky neprůkazně bylo dosaženo vyšších hodnot NM a ŽIV u býků českého strakatého plemene. Můžeme předpokládat, že stresové faktory působící na spermie při dvou cyklech mrazení jsou tak intenzivní, že téměř stírají meziplemenné rozdíly v mrazitelnosti spermatu.

Ačkoliv nebyl prokázán vliv koncentrace spermií v odebraném ejakulátu na zabřezávání plemenic (Haugan et al., 2007), je znám vliv stupně ředění na parametry kinetiky spermií (Farrell et al., 1996). Vyšší stupeň ředění, tedy nižší poměr semenné plasmy ku ředidlu, negativně ovlivňuje funkce mitochondrií (Garner et al. 2001), které zásobují buňku ATP. V předkládané práci byl ejakulát ředěn v poměru 1:3, nicméně ke zpracování byly použity různě husté ejakuláty, od řídkých až po velmi husté. Vzhledem k tomu, že byly zjištěny statisticky průkazné korelace mezi hustotou čerstvého ejakulátu a parametry aktivity u dávek vyrobených metodou DF, byly dále sledovány i interakce objemu při prvním mrazení a hustoty čerstvého ejakulátu.

Ty byly bezprostředně po rozmrazení a 60 minut po rozmrazení statisticky neprůkazné. Zajímavé statisticky průkazné rozdíly však byly zjištěny 120 minut po rozmrazení. Zde dosáhly nejlepších hodnot AC, AP, AR a APO inseminační dávky vyrobené z čerstvého ejakulátu nízké hustoty mrazeného v objemu 4 ml při prvním cyklu, jejichž hodnoty se statisticky průkazně lišily od hodnot zjištěných u inseminačních dávek vyrobených z hustého ejakulátu a mrazených v objemu 4 ml při prvním cyklu. Pro druhý cyklus mrazení bylo rozmrazené sperma naředěno na celkový počet 20×10^6 spermií v inseminační dávce. U ejakulátů o nižší hustotě bylo přidáváno pouze minimální množství ředidla, zatímco husté ejakuláty byly naředěny s vyšším poměrem ředidla.

Vliv hustoty ejakulátu na parametry kinetiky spermií byl popsán ve vztahu k stupni ředění Farrellem et al. (1996). Vyšší stupeň ředění, tedy nižší poměr semenné plasmy ku ředidlu, negativně ovlivňuje funkce mitochondrií (Garner et al. 2001). Můžeme tedy předpokládat, že doředění spermatu na požadovaný počet spermií v inseminační dávce představuje další negativní vliv při výrobě dávek metodou DF. Z hlediska jeho minimalizace pak bude vhodné volit pro zpracování ejakuláty o nižší hustotě, což plyne i ze závěrů korelační analýzy.

Byl potvrzen i vliv individuality býka na kvalitu dávek vyrobených metodou DF zjištěnou Saragustym et al. (2009). Prokázána byla jak individuální citlivost býka k různým objemům při prvním mrazení (u býka SUREBOY bezprostředně po rozmrazení mezi objemy 4 ml a 12 ml), tak i individuální rozdíly mezi býky při mrazení v jednotlivých objemech. U DF inseminačních dávek několika býků bylo dosaženo aktivity požadované po rozmrazení či na konci TDT testu komerčními standardy. Můžeme proto konstatovat, že individualita býka hraje zásadní roli při výrobě DF inseminačních dávek a že dosažení komerční kvality DF dávek je možné.

7 ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

Potvrdili jsme hypotézu, že rozdílné postupy rozmrazení ejakulátů býků mrazených v různě velkých objemech ovlivní kvalitativní parametry ejakulátu po rozmrazení. Metoda rozmrazení má vliv na aktivitu spermií po prvním rozmrazení v ejakulátech mrazených ve velkém objemu. Pro rozmrazení velkoobjemových vzorků byla jako nejvýhodnější identifikována metoda 1 (90 s při pokojové teplotě, ponoření do vodní lázně o teplotě 37 °C na 60 s).

Byla potvrzena i druhá hypotéza, že objem mrazeného ejakulátu bude mít vliv na parametry spermatu po prvním rozmrazení i po opakovaném zmrazení metodou DF. Nejvyšší kvality inseminačních dávek vyrobených metodou DF bylo dosaženo u vzorků vyrobených z objemu 8 ml. Při zohlednění interakcí mezi hustotou čerstvého ejakulátu a kvalitou DF dávek, se však jako nejvýhodnější jeví zpracování v kombinaci ejakulátu o nízké hustotě mrazeného v objemu 4 ml.

Dále bylo zjištěno, že kvalita čerstvého ejakulátu i kvalita vzorku po prvním rozmrazení mají vliv na kvalitu dávek vyrobených metodou DF.

V obou částech pokusu byl hodnocen i vliv plemene na sledované parametry kvality v jednotlivých fázích výroby inseminačních dávek metodou DF. Bylo potvrzeno, že sperma býků holštýnského plemene je odolnější k stresovým faktorům působícím na spermie v průběhu zpracování touto metodou.

Z našich výsledků vyplynulo, že svou významnou roli pro vhodnost výroby inseminačních dávek metodou DF při využití velkého objemu pro první mrazení hrají i individuální rozdíly mezi býky.

Inseminační dávky vyrobené metodou dvojího mrazení nedosáhly ve svých průměrech stanovených standardů pro komerční využití. Nicméně na individuální úrovni je někteří býci překonali nebo se jim značně přiblížili. Můžeme tak předpokládat, že při další optimalizaci výrobního postupu DF dosáhne těchto standardů vyšší počet býků. Do budoucna by tak metoda DF mohla být využívána i na komerční úrovni.

PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA

Vědecké publikace s IF:

Šimoník O., Šichtář J., Krejčárková A., Rajmon R., Stádník L., Beran J., Doležalová M., **Biniová Z.** (2014). Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85, (1): 3-11

Doležalová M., Stádník L., **Biniová Z.**, Ducháček J., Beran J. (2015). The effect of the freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*, 84: 383 – 391.

Doležalová M., Stádník L., **Biniová Z.**, Ducháček J., Stupka J. (2016). Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*, 61, (11): 515-525.

Biniová Z., Stádník L., Doležalová M., Ducháček J. (2018). Effect of Thawing Method on Bull Sperm Survival in Ejaculates Frozen in 4 ml and 8 ml Volumes. *Czech Journal of Animal Science*, 63, 399-407

Vědecké recenzované publikace:

Biniová Z., Ducháček J., Stádník L., Doležalová M., Hájek R., 2017: Effects of Clomatic Conditions on Bovine Semen Characteristics. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.*, 66, 17-23

Odborné publikace:

Ducháček, J., Toušová, R., Stádník L., **Biniová Z.**, Ptáček M., Touš, J., Doležalová, M, Maran., B. (2015). Influence of farming systems on indicators of beef calves growth. *Journal of Animal Science of Bosnia and Herzegovina – Special Issue*, 2: 2-7.

Příspěvky z konferencí publikované ve sbornících:

Ducháček, J., **Biniová Z.**, Stádník, L., Ptáček, M., Doležalová, M, Beran, J. 2015. Effect of breed on basic characteristics of bull semen immediately after ollection. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, Special Issue: SI, 3: 51-51.

8 POUŽITÉ LITERÁRNÍ ZDROJE:

- Aisen, E. G., Medina, V. H., Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57: 1801–1808.
- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H, Iqbal, S., Ullah, N. 2010. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology*, 74: 951–955.
- Alragubi, S. M. 2015. Factors affecting on semen production in Fresian bulls in Libya. *International Journal of Biopharmaceutics*, 6: 32-36.
- Amann, R. P., Pickett, B. W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7: 145 – 173.
- Amann, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*, 10: 89 –98.
- Amann, R. P., Graham, J. K.. 1993. Spermatozoal Function. In: McKinnon VO, Voss JL (eds). *Equine Reproduction*. Lea and Febiger. Philadelphia, London: 715-745.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, Ch., Gérard, O., Courtens, J. L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61: 895 – 907.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., Courtens, J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129: 535 – 543.
- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., Destrumelle, S., Tainturier, D. 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal reproduction science*, 122: 282-287.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrodo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Rabesona, H., 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83, 175–18
- Anzar, M., Kroetsch, T., Bhr, M. M. 2009. Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen. *Journal of Andrology*, 30: 661-668.

- Arav, A., 1999. Device and methods for multigradient directional cooling and warming of biological samples. US Patent.
- Arav, A., Zeron, Y., Ocheretny, A. 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 53: 248 – 249.
- Arav, A., Zeron, Y., Shutrman H., Gacitua, H. 2002a. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume semen. *Reproduction and Nutrition Development*, 42: 583-586
- Arav, A., Zeron, Y., Shutrman H., Gacitua, H. 2002b. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume semen. *Reproduction and Nutrition Development*, 42: 583-586
- Argov-Argaman, N., Mahgrefthe, K., Zeron, Y., Roth, Z. 2013. Season-induced variation of lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. *Reproduction*, 145: 479-489.
- Arthur, G. H., Noakes, D. E., Pearson, H., Parkinson, T. J. 1998. Veterinary Reproduction and Obstetrics, 7: 562 – 563. The Bath Press, ISBN: 0-7020-17-85-X
- Auger, J., Eustache, F., Ducot, B., Blandin, T., Daudin, M., Diaz, I., El Matribi, S., Cony, B., Keskes, L., Kolbezen, M., Lamarte, A., Lornage, J., Nomal, N., Pitaval, G., Simon, O., Virant-Klun, I., Spira, A., Jouannet, P. 2000. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Human Reproduction*, 15: 2360-2368.
- Awad, M. M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123, 157 – 162.
- Ball, P. J. H., Peters, A. R. 2004. Reproduction in cattle. 3rd ed. UK: Blackwell Publishing.
- Baltisen, J. 2007. Correlations between CASA analyzed spermatological parameters and fertility of bulls. Dr. vet. med. Thesis, In: Minitube technical report.
- Bandularatne, E., Bongso, A. 2002. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing, *Journal of Andrology*, 23: 242 – 249.
- Barszcz, K., Wiesetek, D., Wąsowicz, M., Kupczyńska, M., 2012. Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science*, 4: 1 – 10.
- Barth A.D., Bowman B., Bowman P.A. (1988): Determination of the best Practical Method of Thawing Bovine Semen. *Canadian Veterinary Journal*, 29, 366 – 369.

- Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 68–73.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M-L., Barriere, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2012. The advantages of using combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Veterinary Science*, 93: 440 – 7.
- Benson, R. W., Sexton, T. J., Pickett, B. W., Lucas, J. J., Gebauer, M. R. 1968. Influence of processing techniques and dilution rates on survival of bovine spermatozoa. *Agriculture Experiment Station Research Report*. Storrs, 1968: 28.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Toušová, R., Louda, F., Štolc, L. 2011. Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, 59(6): 37-44.
- Beran, J., Stádník, L., Doležalová, M., Toušová, R. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. *Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-7, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 30 stran. ISBN 978-80-213-2537-1.*
- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 1338–1344.
- Bosseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guérin, B., Camus, A., Lechat, M., 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50: 699 – 706.
- Boujenane, I., Boussaq, K., 2014. Breedeffects on semen traits of dairy and beef artificial insemination bulls. *Livestock research for Rural Development*, 26 (6). Retrieved June 5, 2016, from <http://www.lrrd.org/lrrd26/6/Bouje26114.html>.
- Brinsko S.P., Van Wagner G.S., Graham J.K., Squires E.L. (2000): Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 56, 111-120.

- Broekhuijse, M. L. W. J., Šoštarić, E., Feitsma, H., Gadella, B. M. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*, 76: 1473 – 1486.
- Buhr, M. M., Canvin, A. T., Bailey, J. L. 1989. Effects of semen preservation on boar spermatozoa plasma membranes. *Gamete Research*, 23: 441 – 449.
- Bwanga, C. O., Einarsson, S., Rodriguez-Martinez, H. 1991. Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 32: 455 – 461.
- Camus, A., Camugli, S., Lèvêque, Schmitt, E., Staub, C. 2011. Is photometry an accurate and reliable method to assess boar semen concentration? *Theriogenology*, 75: 577-583.
- Cleland, D., Krader, P., McCree, C., Tang, J., Emerson, D. 2004. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods*, 58(1): 31-38.
- Clulow, J. R., Mansfield, L. J., Morris, L. H. A., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 108: 298-308.
- Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., Carluccio, A., 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74: 424–435.
- Cooper, T. G., Björndahl, J., Vreeburg, J., Nieschlag, E. 2002. Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *International Journal of Andrology*, 25: 306-311.
- Cooper, T. A., Wiggans, G. R., Null, D. J., Hutchison, J. L., Cole, J. B., 2014. Genomic evaluation, breed identification, and discovery of a haplotype affecting fertility for Ayrshire dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97: 3878-3882.
- Correa J. R., Pace, M. M., Zavos, P. M. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. *Theriogenology*, 48: 721 – 731.
- Crockett, E. L. 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *American Zoologist*, 38: 291–304.
- De Graaf, S. P., Evans, G., Maxwell, W. M. C., Cran, D. G., O'Brien, J. K. 2007. Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 67: 391 - 398.

- De Leeuw, F. E., De Leeuw, M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., Verkleij, A. J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30: 32-44.
- Dhurvey, M., Gupta, V. K., Nema, S. P., Patidar, A., Shivhare, M., Singh, N., Shakya, V. 2012. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *DHR International Journal of Biomedical and Life Sciences*, 3: 62 – 83.
- Diller, K. R. 1992. Modeling of bioheat transfer processes at high and low temperatures. In: Cho, Y.I. (Ed.), *Bioengineering Heat Transfer*, vol. 22. Academic Press, San Diego, CA, 157–357.
- Dogan, S., Vargovic, P., Oliveira, R., Belser, L. E., Kaya, A., Moura, A., Šutovský, P., Parrish, J., Topper, E., Memili, E. 2015. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biology of Reproduction*, 92 (4), doi: 10.1095/biolreprod.114.124255. Epub 2015 Feb 11.
- Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. *The effect of the freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing*. *Acta Veterinaria Brno*, 84: 383 – 391.
- Donoghue, A. M., ThistleThwaite, D., Donoghue, D. J., Kirby, J. D. 1996. A new method for rapid determination of sperm concentration in turkey semen. *Poultry Science*, 76: 785-789.
- Du Bois, S., Len, J. A., Parlevliet, J. M., Eilts, B. E. 2012. Effects of cooling time on membrane integrity and motility of frozen-thawed canine spermatozoa using two different commercial egg yolk based extenders at two different cooldown equilibration times. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 278 – 280.
- Ducháček, J., Biniová, Z., Stádník, L., Ptáček, M., Doležalová, M, Beran, J. 2015. Effect of breed on basic characteristics of bull semen immediately after collection. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, Special Issue: SI, 3: 51-51.
- Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S. D., Sarasa, J., Fernández, J. L., Gosálvez, J. 2011. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology*, 76: 23-32.
- Ennen, B. D., Berndtson, R. G., Mortimer, R. G., Pickett, B. W. 1976. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in .25-ml straws. *Journal of Animal Science*, 43: 651-656.

- Etches, R. J. Reproduction in poultry. Centre for Agriculture and Biosciences International 1996; Wallingford, UK.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M. R. 1982. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30: 279–280.
- Evenson, D. P., Parks, J. E., Kaproth, M. T., Jost, L. K. 1993. Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *Journal of Dairy Science*, 76: 86-94.
- Farrel, P. B., Foote, R. H., McArdle, M. M., Trouer-Trend, V. L., Tardif, A. L. 1996. Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). *Journal of Andrology*, 17: 293–300.
- Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., Foote, R. H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49: 871–79.
- Fatehi, A. N., Bevers, M. M., Schoevers, E., Roelen, B. A. J., Colenbrander, B., Gadella B. M. 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology*, 27: 176 – 188.
- Fenton, S. E., Cowan, C. M., Coyle, T., Gilbert. G. R., Lenz, R. W. 1990. Validation and application of an assay for deoxyribonucleic acid to estimate concentrations of bull semen. *Journal of Dairy Science*, 73: 3118 – 3125.
- Fiaz, M., Usmani, R. H., Abdullah, M., Ahmad, T. 2009. Evaluation of semen quality of Holstein Fresian and Jersey bulls under subtropical environment. *Pakistan Veterinary Journal*, ISSN 2074-7764, p. 75-78.
- Foote, R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80: 1-10.
- Franken, D. R., Avari, K., Palshetkar, N. 2008. Morphology training is compulsory to ensure relevant clinical results, *Andrologia*, 40: 377-380.
- Gaciuta, H., Arav, A. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, 63: 931 - 938.

- Gamčík, P., Kozuplík, J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Bratislava: Príroda. s. 344.
- Garcia-Macias, V., de Paz, P., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Gomes-Alves, S., Bernardo, J., Anel, E., Anel, L. 2007. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *International Journal of Andrology*, 30: 88-98.
- Garner, D. L., Johnson, L. A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53: 276–284.
- Garner, D. L., Thomas, C. A., Gravance, C. G., Marshall, C. E., DeJarnette, J. M., Allen, C. H. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, 56: 31-40.
- Ghetler, Y., Yavin, S., Shalgi, R., Arav, A. 2005. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Human Reproduction*, 20, 3385 - 3389.
- Gil, J., Januskauskas, A., Haard, M., Johannisson, A., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. 2000. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reproduction in Domestic Animals*, 35: 69-77.
- Gloria, A., Carluccio, A., Contri, A., Wegher, L., Valorz, C., Robbe, D. 2013. The effect of chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Andrology*, 1: 879-885.
- Goel, P., Rawat, J. D., Wakhlu, A., Kureel, S. N. 2015. Undescended testicle: An update on fertility in cryptorchid men. *The Indian Journal of Medical Research*, 141: 163–171.
- Gómez-Fernández, J., Gómez-Izquierdo, E., Tomás, C., Mocé, E., de Mercado, E. 2012. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 133: 109-16.
- Goolsby, H. A., Elanton, J. A., Prien, S. D. 2004. Preliminary comparisons of a unique freezing technology to traditional cryopreservation methodology of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 24: 314 – 318.
- Gordon, I. 2003. *Laboratory production of cattle embryos*. CABI publishing. Cambridge, p. 183, ISBN 0-85199-666-3.
- Gordon, I. 2004. *Reproductive Technologies in Farm Animal*. CABI publishing. Cambridge, p. 352, ISBN 0-85199-862-3.

- Graham, J. K., Foote, R. H. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24: 42–52.
- Graham, J., Kunze, E., Hammerstedt, R. H. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43: 55-64.
- Guthrie, H. D., Liu, J., Critser, J. K. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67: 1811–1816.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11:73-88.
- Hansen, C., Christensen, P., Stryhn, H., Hedeboe, A. M., Rode, M., Boe-Hansen, G. 2002. Validation of the FACS Count AF System for determination of sperm concentration in boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 37: 330 – 334.
- Haugan T., Gröhn Y. T., Kommisrude E., Ropstad E., Reksen O. 2007, Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science*, 97(1-2):1-11
- Henry, M., Snoeck, P. P. N., Cottorello, A. C. P. 2002. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*, 58: 245–248.
- Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z., a kol. 2009. Nemoci skotu. *Noviko a.s., Česká buiatrická společnost*, Brno, ISBN: 978-80-86542-19-5, 1149.
- Hollinshead, F. K., O' Brien, J. K., Maxwell, W. M. C., Evans, G. 2004. Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 958 – 968.
- Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47–58.
- Holt, W.V., Del Valle, I., Fazeli, A., 2015. Heat shock protein A8 stabilizes the bull sperm plasma membrane during cryopreservation: Effects of breed, protein concentration, and mode of use. *Theriogenology*, 84, 693 – 701.

- Horváth, A., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Ösz, K., Szabó, K., Urbányi, B. 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 a 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 54: 251 - 257.
- Chennoweth, P. J. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64: 457 – 468.
- Choi, Y. H., Love, C. C., Varner, D. D., Hinrichs, K. 2006. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*, 65: 808 - 818.
- Christensen, P., Stenvag, J. P., Godfrey, W. L. 2013. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *Journal of Andrology*, 25: 255 – 264.
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Pina Rossato, M. 2012. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology*, 78: 1381 – 1389.
- James, P. S., Wolfe, C. A., Mackie, A., Ladha, S., Prentice A., Jones, R. 1999. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Human Reproduction*, 14: 1827 - 1832.
- Januskauskas, A., Gil, J., Soderquist, L., Haard, M. G. M., Haard, M. C., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52: 641-658.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*, 55: 947-961.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60: 743-758.
- Januskauskas, A., Lukoseviciute, K., Nagy, S., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2005. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology*, 63, 160 – 178.
- Jelínek, P., Koudela, K. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. 1. vyd. Brno Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s. 414. ISBN 80–7157–644–1.

- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L. J. D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219–225.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. B., Ramón, M., García-Álvarez, B., 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.
- Johnson, L. A., Welch, G. R., Garner, D. L. 1994. Improved flow sorting resolution of X- and Y-bearing viable sperm using dual staining and dead cell gating. *Cytometry*, 17: 83 - 87.
- Jones, R. C., Martin, I. C. A., 1973. The effect of dilution, egg yolk and cooling to 5 C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35: 320 – 331.
- Juyena, N. S., Stelletta, C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Review Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33 (4): 536-551.
- Kaneko, T., Hideyuki, I., Sakamoto, H., Onuma, M., Inoue-Murayama, M. 2014. Sperm preservation by Freeze-Drying for the Conservation of Wild Animals. PLoS ONE 9(11): e113381. doi:10.1371/journal.pone.0113381.
- Kanchan, M. J. S. 2015. Effect of semen colour on seminal characteristics in cattle bulls. *Indian Journal of Animal Research*, 49: 146 – 147.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K. Kadirvel, G. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 165-72.
- Khan, M., I, R., Ijaz, A. 2007. Effects of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. *The Animal Consortium*. s. 548 – 553.
- Kocks, J. E. M.; Broekhuijse, M. L. W. J. 2014. The practical use of density of whole bull semen to determine the volume of an ejaculate at AI laboratories. *Animal Reproduction Science*, 146: 98 – 102.
- Kohsaka T., Takahara H., Tagami S., Sasada H., Masaki J., (1992): A new technique for the precise location of lactate and malate dehydrogenases in goat, boar and water buffalo

- spermatozoa using gel incubation film. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95, 201–209.
- Kumar, S., Millar, J. D., Watson, P. F. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46: 246–253.
- Lamney, M. L., Valdez, C. A., 2011. Cryopreservation of Water Buffalo, *Bubalus bubalis* (L.) Spermatozoa Using Ethylene Glycol: Effects of Equilibration Time, Thawing Temperature and Time on Post-thaw Motility Rate. *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, 48, 101 – 105.
- Lawson, A., Ahmad, H., Sambanis, A. 2011. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology*, 62: 115-122.
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M., de Andrade, V. J. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120: 31–38.
- Lenz, R. W., Kjelland, M. E., VonderHaar, K., Swannack, T. M., Moreno, J. F. 2010. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *Journal of Animal Science*, 89: 383 – 388.
- Lepcock J.R., Frey H.E., Ritchie K.P. (1993): Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock. *Journal of Cell Biology*, 122, 1267-1276.
- Linford, E., Glover F. A., Bishiop, C., Stewart, D. L. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47: 283-291.
- Lovelock, J. E., Bishop, M. W. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183: 1394–1395.
- Mann, T., Lutwak-Mann, C. 1981. Male reproductive function and semen. In: *Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. Berlin, Germany: *Springer-Verlag*, 495.
- Martins-Bessa, A., Rocha, A., Mayenco-Aguirre A. 2006. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*, 66: 2047–2055.

- Mathevon, M., Buhr, M. M., Dekkers, J. C. M. 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 81: 3321-3330.
- Maxwell, W. M. C., Johnson, L. A. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52: 1353 – 1362.
- Maxwell, W. M. C., Parrilla, I., Caballero, I., Garcia, E., Roca, J., Martinez, E. A., Vazquez, J. M., Rath, D. 2007. Retained Functional Integrity of Bull Spermatozoa after Double Freezing and Thawing using PureSperm® Density Gradient Centrifugation. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 489-494.
- Mazur, P., Leibo, S. P., Farrant, J., Chu E. H. Y., Hanna, M. G. Jr., Smith, L. H. 1970. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: *Wolstenholme, O'Connor, M., The frozen Cell*. Churchill, London, 69 – 88.
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., Rodrigues, J. L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57, 327 – 344.
- Menon, A. G., Barkema, H. W., Wilde, R., Kastelic, J. P., Thundathil, J. C. 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75: 241–247.
- Miller, D. J., Winer, M. A., Ax, R. L. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, 42: 899 -915.
- Molinia, F. C., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 1994. Incorporating of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa, *Theriogenology*, 42, 849–858.
- Moore, A. I., Squires, E. L., Bruemmer, J. E., Graham, J. K., 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26, 215 – 218.
- Mortimer, S. T. 2000. CASA - Practical aspects. *Journal of Andrology* 21: 515-24.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57: 1695 – 1706.

- Muiño, R., Fernández, M., Peña, A.I. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 305-311
- Mutalík, S., Salian, S. R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A. R., Kumar, P., Kalthur, G., Adiga, S. K. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60 (3): 183-188.
- Nagendrakumar, S.B; Kathiseran, D., 2011. Effect of breed on functional characteristics of frozen bull spermatozoa. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 32 (1): 35 - 38.
- Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N., Ranieri, M. S., Bernabucci, U. 2010. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science*, 130: 57-69.
- Nichi, M., Bols, P. E. J., Zuge, R. M., Barnabe, V.H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., Cortada, C. N. M. 2006. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, 66: 822-828.
- Okano, T., Murase, T., Asano, M., Tsubota, T. 2004. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 66: 1359-64.
- Padrik, P., Hallap, T., Kaart, T., Bulitko, T., Jaakma, U. 2012. Relationships between the results of hypo-osmotic swelling tests, sperm motility, and fertility in Estonian Holstein dairy bulls. *Czech Journal of Animal Science*, 57 (10): 490–497.
- Parisi, A. M., Thompson, S. K., Kaya, A., Memili, E. 2014. Molecular, cellular, and physiological determinants of bull fertility. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 637-642.
- Parks, J. E., Lynch, D. V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29: 255-266.
- Pena, F. J., Plaza Davila, M., Ball, B. A., Squires, E. L., Martin Munoz, P., Ortega Ferrusola, C., Balao da Silva, C. 2015. The impact of reproductive technologies on stallion mitochondrial function. *Reproduction in Domestic Animals*, 50: 529-537.
- Petrunkina, A. M., Waberski, D., Günzel-Apel, A. R., Töpfer-Petersen, E. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic animals. *Reproduction*, 134: 3 – 17.

- Petrunkina, A. M., Waberski, D., Bollwein, H., Sieme, H. 2010. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology*, 73: 995-1000.
- Pileckas, V., Šiukščius, A., Razmaitė, V. 2013. Survival effect of year period on bull semen properties. *Veterinarija ir Zootechnika*, 64: 76-81.
- Poulos, A., White, I. G. 1973. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35: 265 – 272.
- Pursel, V. G., Park, C. S. 1985. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: Johnson, L. A., Larsson, K., Deep Freezing of Boar Semen. *Swedish University of Agricultural Sciences*, Uppsala, 147 - 166.
- Rastegarnia A., Shahverdi A., Rezaei T.T., Ebrahimi B., Shafipour V. (2013): Effect of Different Thawing Rates on Post-Thaw Viability, Kinematic Parameters and Chromatin Structure of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa. *Cell Journal*, 14, 306-3013.
- Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat, 2. rozšířené vydání, 374. *Grada publishing*, ISBN: 978-80-247-3282-4.
- Rego, J., P., A., Crisp, J., M., Moura, A., A., Nouwens, A., S., Li, Y., Venus, B., Corbet, N., J., Corbet, D., H., Burns, B., M., Boe-Hansen, G., B., McGowan, M., R. 2014. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Animal Reproduction Science*, 148: 1 - 17.
- Reid, C. E., Hermes, R., Blottner, S., Goeritz, F., Wibbelt, G., Walzer, C., Bryant, B. R., Portas, T. J., Streich, W. J., Hildebrandt, T. B. 2009. Split-sample comparison of directional and liquid nitrogen vapour freezing method on post-thaw semen quality in white rhinoceroses. *Theriogenology*, 71: 275 – 291.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A. 2003. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60: 1553-68.
- Riley-Vargas, R. C., Lanzendorf, S., Atkinson, J. P. 2005. Targeted and restricted complement activation on acrosome-reacted spermatozoa. *The Journal of Clinical Investigation*, 115: 1241-1249.
- Robertson, L., Wolf, D.P., Tash, J.S. 1988. Temporal Changes in Motility Parameters Related to Acrosomal Status: Identification and Characterization of Populations of Hyperactivated Human Sperm. *Biology of Reproduction*, 39 (4): 797–805,

- Rodriguez, O. L., Berndtson, W. E., Ennen, B. D., Pickett, B. W. 1975. Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *Journal of Animal Science*, 41: 129–135.
- Rodriguez-Martinez, H. 2006. Can we increase the estimated value of semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 2–10.
- Rosato, M. P., Iaffaldano, N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79: 508-516.
- Rufo, A. G. Jr., Singg, J. P., Babcock, D., F., Lardy, H. A. 1982. Purification and characterization of a Calcium Transport Inhibitor Protein from bovine seminal plasma. *The Journal of Biological Chemistry*, 257: 4627 – 4632.
- Saacke, R. G. 2008 Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology*, 70: 479 – 484.
- Said, L., Galeraud-Denis, I., Carreau, S. and Saâd, A. 2009. Relationship between semen quality and seminal plasma components: alpha-glucosidase, fructose and citrate in infertile men compared with a normospermic population of Tunisian men. *Andrologia*, 41: 150–156.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77–111.
- Sansone, G., Nastri, M. J. F., Fabbrocini, A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 55–76.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Pettit, M. T., Araw, A. 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 610 – 615.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Zeron, Y., Rozenboim, I., Arav, A. 2009. Double freezing of bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 115: 10 – 17.
- Sarder, J. U. 2007. Environment related variations in the semen characteristics of bulls used for Artificial Insemination (AI) programme in Bangladesh. *University Journal of Zoology, Rajshahi University*, 26: 81-88.
- Seidel, G. E. Jr., Foote, R. H. 1969. Influence of Semen Collection Techniques on composition of Bull Seminal Plasma. *Journal of Dairy Science*, 52: 1080-1084.

- Senger, P. L. 2003. Organization of function and the male reproductive systems. In: Senger PL, editor. Pathways to Pregnancy and Parturition. Pullman, WA, USA: *Current Conceptions*, 44–79.
- Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Topraggaleh, T. R. (2014). Effect of Extender and Equilibration Time on Post Thaw Motility and Chromatin Structure of Buffalo Bull (*Bubalus Bubalis*) Spermatozoa. *Cell Journal*, 16 (3): 279 – 287.
- Shannon, P. 1972. The effect of egg yolk level and dose rate of semen diluted in caprogen. Proceedings of 7th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I. Munich, Germany. *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Inseminat.*, Milan, Italy, 1440–1442.
- Sheehan, C. B., Lane, M., Gardner, D. K. 2006. The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Human reproduction*, 21: 2978 - 2984.
- Si, W., Hildebrandt, T. B., Reid, C., Krieg, R., Ji, W., Fassbender, M., Hermes, R. 2006. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology*, 65: 788 – 798.
- Siddique, R. A., Gali, J. G., Kumar, R., Kumar, A., Malik, P. K., Atreja, S. K. 2011. Sperm abnormalities and DNA fragmentation vis-à-vis mammalian male fertility – a review. *Wayamba Journal of Animal Science*. ISSN: 2012-578X; 2011.
- Simpson, A. M., Swan, M. A., White, I. G. 1986. Action of phosphatidylcholine in protecting ram sperm from cold shock. *Gamete research*, 15: 43-56.
- Snoj, T., Kobal, S., Majdic, G. 2013. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. *Theriogen.*, 79: 847-852.
- Squires, E. L., Keith, S. L., Graham, J.K. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 1056-1065.
- Stradioli, G., Noro, T., Sylla, L., Monaci, M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67, 1249 – 1255.
- Swain, J. E., Smith, G. D. 2010. Cryoprotectants. In: Chian RC, Quinn P (ed.). Fertility cryopreservation. New York: *Cambridge University Press*; 24–38.
- Šimoník, O., Šichtář, J., Krejčířková, A., Rajmon, R., Stádník, L., Beran, J., Doležalová, M., Biniová, Z. 2015. Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field

- fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85: 3 – 11.
- Štolc, L., Stádnik, L., Ježková, A., Louda, F. 2009. Relationships among herd, ram breeds, age of rams, sperm density before diluting and sperm motility during thermal survival test. *Acta Universitatis Agricult. et Silvicol. Mendeleianae Brunensis*, 57 (4): 109–116.
- Takahashi, T., Itoh, R., Nishinomiya, H., Katoh, M., Manabe N. 2012. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (1): 92-97.
- Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, A. N., Büyükleblebici, O., Gürcan, I. S. 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*, 66: 38 - 42.
- Thurston L.M., Watson P.F., Holt W.V. (2002): Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters*, 23, 255–262.
- Tatham, B. 2000. Increasing Buffalo Production; Using Reproduction Technology. *Report Rur. Indust. Res Corp. Dev.*, Kingston, ACT, Australia.
- Thurston L.M., Watson P.F., Holt W.V. (2002): Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters*, 23, 255–262.
- Thys, M., Vandaele, L., Morrell, J., Mestach, J., Van Soom, A., Hoogewijs, M., Rodriguez, H. 2009. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (Glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. *Reproduction in Domestic Animals*, 44: 390 - 394.
- Toft, G, Rignell-Hydbom, A., Tyrkiel, E., Shvets, M, Giwercman, A. 2005. Quality control workshops in standardization of sperm concentration and motility assesment in multicentre studies. *International Journal of Andrology*, 28: 144-149.
- Toshimori, K., Ito, Ch. 2003. Formation and organization of the mamalian sperm head. *Archives of Histology and Cytology*, 66: 383 – 396.
- Underwood, S. L., Bathgate R., Maxwell, W. M. C., Evans, G. 2009. In vitro characteristics of frozen-thawed, sex sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37 °C. *Theriogenology*, 72: 1001 – 1008.
- Underwood, S. L., Bathgate R., Maxwell, W. M. C., Evans, G. 2010. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 118: 171 - 175.

- VanRaden, P. M., Olson, K. M., Null, D. J., & Hutchison, J. L. 2011. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science*, 94: 6153-6161.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vasquez, L., Schmidt, E. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: comparison to Triladyl and Bioxcel. *Theriogenology*, 71: 895–900.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer-assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149–79.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy. ČR: *Výzkumný ústav veterinárního lékařství*, Brno.
- Vilakazi, D. M., Webb, E. C. 2004. Effect of age and season on sperm morphology of Freisland bulls at artificial insemination centre in South Africa. *South African Journal of Animal Science*, 34: 62 – 69.
- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J., Loughlin, K. R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49: 921–925.
- Walczak-Jedrzejowska, R., Marchlewska K., Oszukowska, E., Filipiak, E., Bergier, L., Slowikowska-Hilczer, J. 2013. Semen analysis standardization: is there any problem in Polish laboratories?. *Asian Journal of Andrology*, 15: 616-621.
- Watson, P. F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A (eds), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London, 189–218.
- Watson, P. F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming, G., Marshall's Physiology of reproduction, 2, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, 747 - 869.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61: 481–492.
- Woelders, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19: 135– 138.
- Zhao, Y., Buhr, M. M. 1995. Cryopreservation extenders affect calcium flux in bovine spermatozoa during a temperature challenge. *Journal of Andrology*, 16: 278-285.

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha č. 1: Parametry kinetiky spermií

VCL (curvilinear velocity) – rychlost hlavičky na skutečné dráze, průměrná rychlost mezi body měření, $\mu\text{m/s}$

VSL (straight-line velocity) – rychlost hlavičky na přímé dráze, mezi výchozím a konečným bodem měření, $\mu\text{m/s}$

VAP (average-path velocity) – rychlost hlavičky na napřímené dráze (odvozena matematickou úpravou VCL), slouží k plynulejšímu vyjádření pohybu, $\mu\text{m/s}$

LIN (linearity) – linearita skutečné dráhy ($\text{VSL}/\text{VCL} \times 100$) [%]

STR (straightness) – přímost napřímené dráhy ($\text{VSL}/\text{VAP} \times 100$) [%]

WOB (wobble) – stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřímené dráhy ($\text{VAP}/\text{VCL} \times 100$) [%]

9.2 Příloha č.2: Klasifikace spermií dle závažnosti jejich výskytu

(Saacke, 1982; Chenoweth, 2005)

Méně závažné abnormality

Úzké hlavičky

Obrovské a krátké široké hlavičky

Uvolněné membrány akrozomu

Malé hlavičky

Normální hlavičky bez bičíku

Abaxiální implantace

Distální kapky

Jednoduše stočený bičík

Na konci stočený bičík

Epitelové buňky

Erytrocyty,

Medusovité formace, buňky hlenu, atd.

Ostatní defekty spojovací části

Pseudokapky

Silně stočený nebo ohnutý bičík

Závažné abnormality

Nevyvinuté spermie

Nabobtnalé akrozómy

Dvojitě formy

Dekapitované (aktivní bičík)

Diadémový efekt

Hruškovitý tvar

Zúžené báze hlaviček

Abnormální obrysy

Malé abnormální hlavičky

Volné patologické hlavičky

Proximální kapky

Šroubovicovitý efekt (Corkscrew effect)

9.3 Příloha 3: Výsledky mrazitelnosti dle býků a objemů po prvním rozmrazení

Tabulka 1 Výsledky parametrů aktivity dle býků a objemů po prvním rozmrazení v T0 (n=195)

| Býk | Objem při I. mrazení | n | AC v T0 (%) | AP v T0 (%) | AR v T0 (%) | APO v T0 (%) |
|------------|----------------------|---|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| COLMAN | 4 ml | 5 | 49,7 ± 7,56 | 42,9 ± 7,31 | 28,1 ± 5,70 | 14,3 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 47,1 ± 7,56 | 38,0 ± 7,31 | 24,0 ± 5,70 | 13,6 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 39,8 ± 7,56 | 31,6 ± 7,31 | 18,3 ± 5,70 | 13,1 ± 2,62 |
| KORN | 4 ml | 5 | 39,8 ± 7,56 | 30,5 ± 7,31 | 19,3 ± 5,70 | 10,7 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 53,2 ± 7,56 | 42,9 ± 7,31 | 29,2 ± 5,70 | 13,1 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 43,8 ± 7,56 | 33,1 ± 7,31 | 19,1 ± 5,70 | 13,9 ± 2,62 |
| LATEX | 4 ml | 5 | 48,1 ± 7,56 | 39,0 ± 7,31 | 21,2 ± 5,70 | 17,1 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 44,1 ± 7,56 | 35,3 ± 7,31 | 18,2 ± 5,70 | 16,9 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 38,2 ± 7,56 | 29,6 ± 7,31 | 15,9 ± 5,70 | 13,1 ± 2,62 |
| LEWIS | 4 ml | 5 | 46,8 ± 7,56 | 36,2 ± 7,31 | 20,0 ± 5,70 | 16,0 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 48,0 ± 7,56 | 38,4 ± 7,31 | 23,8 ± 5,70 | 14,1 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 34,2 ± 7,56 | 26,3 ± 7,31 | 13,7 ± 5,70 | 12,3 ± 2,62 |
| LYON | 4 ml | 5 | 54,6 ± 7,56 | 45,1 ± 7,31 | 21,6 ± 5,70 | 23,2 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 58,4 ± 7,56 | 49,5 ± 7,31 | 26,0 ± 5,70 | 23,2 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 44,2 ± 7,56 | 32,8 ± 7,31 | 13,9 ± 5,70 | 18,6 ± 2,62 |
| MARTIN | 4 ml | 5 | 60,2 ± 7,56 | 50,6 ± 7,31 | 28,5 ± 5,70 | 21,8 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 61,1 ± 7,56 | 54,1 ± 7,31 | 33,6 ± 5,70 | 20,3 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 51,7 ± 7,56 | 41,7 ± 7,31 | 24,5 ± 5,70 | 16,9 ± 2,62 |
| MONTEKO | 4 ml | 5 | 55,6 ± 7,56 | 45,6 ± 7,31 | 25,6 ± 5,70 | 19,2 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 61,8 ± 7,56 | 50,2 ± 7,31 | 28,1 ± 5,70 | 21,2 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 45,5 ± 7,56 | 37,6 ± 7,31 | 25,8 ± 5,70 | 11,1 ± 2,62 |
| PIKANT | 4 ml | 5 | 53,4 ± 7,56 | 45,3 ± 7,31 | 31,5 ± 5,70 | 12,9 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 54,9 ± 7,56 | 46,6 ± 7,31 | 32,4 ± 5,70 | 13,7 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 44,2 ± 7,56 | 34,6 ± 7,31 | 22,8 ± 5,70 | 11,3 ± 2,62 |
| POLLEDSTAR | 4 ml | 5 | 54,9 ± 7,56 | 47,0 ± 7,31 | 31,5 ± 5,70 | 15,0 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 48,0 ± 7,56 | 37,4 ± 7,31 | 24,5 ± 5,70 | 12,6 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 47,7 ± 7,56 | 39,8 ± 7,31 | 25,0 ± 5,70 | 14,7 ± 2,62 |
| REBEL | 4 ml | 5 | 57,6 ± 7,56 | 50,5 ± 7,31 | 35,8 ± 5,70 | 12,9 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 58,0 ± 7,56 | 51,0 ± 7,31 | 38,8 ± 5,70 | 10,9 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 42,5 ± 7,56 | 34,9 ± 7,31 | 24,8 ± 5,70 | 8,5 ± 2,62 |
| SUNSHINE | 4 ml | 5 | 46,7 ± 7,56 | 39,0 ± 7,31 | 29,3 ± 5,70 | 9,1 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 52,3 ± 7,56 | 45,9 ± 7,31 | 35,7 ± 5,70 | 9,4 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 52,3 ± 7,56 | 43,6 ± 7,31 | 33,6 ± 5,70 | 9,5 ± 2,62 |
| SUNWAY | 4 ml | 5 | 55,0 ± 7,56 | 48,1 ± 7,31 | 34,9 ± 5,70 | 11,5 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 59,1 ± 7,56 | 50,3 ± 7,31 | 37,5 ± 5,70 | 11,9 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 62,8 ± 7,56 | 53,2 ± 7,31 | 38,2 ± 5,70 | 14,1 ± 2,62 |
| SUREBOY | 4 ml | 5 | 57,3 ± 7,56 | 49,4 ± 7,31 | 37,0 ± 5,70 | 11,4 ± 2,62 |
| | 8 ml | 5 | 52,6 ± 7,56 | 44,4 ± 7,31 | 30,8 ± 5,70 | 13,1 ± 2,62 |
| | 12 ml | 5 | 54,0 ± 7,56 | 46,7 ± 7,31 | 35,0 ± 5,70 | 11,0 ± 2,62 |

Tabulka 2 Výsledky parametrů aktivity dle býků a objemů po prvním rozmrazení v T30

(n=195)

| Býk | Objem při I. mrazení | n | AC v T30 (%) | AP v T30 (%) | AR v T30 (%) | APO v T30 (%) |
|------------|----------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| COLMAN | 4 ml | 5 | 54,8 ± 7,75 | 45,7 ± 7,65 | 34,1 ± 6,63 | 11,5 ± 1,92 |
| | 8 ml | 5 | 48,6 ± 7,75 | 38,9 ± 7,65 | 30,4 ± 6,63 | 8,5 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 36,3 ± 7,75 | 28,2 ± 7,65 | 20,3 ± 6,63 | 7,5 ± 1,92 ^b |
| KORN | 4 ml | 5 | 42,6 ± 7,75 | 35,1 ± 7,65 | 26,4 ± 6,63 | 8,0 ± 1,92 ^b |
| | 8 ml | 5 | 61,2 ± 7,75 | 52,9 ± 7,65 | 41,2 ± 6,63 | 11,8 ± 1,92 |
| | 12 ml | 5 | 44,7 ± 7,75 | 34,2 ± 7,65 | 24,3 ± 6,63 | 9,5 ± 1,92 |
| LATEX | 4 ml | 5 | 40,0 ± 7,75 | 33,9 ± 7,65 | 24,1 ± 6,63 | 9,5 ± 1,92 ^b |
| | 8 ml | 5 | 52,3 ± 7,75 | 44,3 ± 7,65 | 29,9 ± 6,63 | 14,0 ± 1,92 |
| | 12 ml | 5 | 33,6 ± 7,75 | 25,7 ± 7,65 | 18,1 ± 6,63 | 7,5 ± 1,92 ^b |
| LEWIS | 4 ml | 5 | 57,7 ± 7,75 | 47,3 ± 7,65 | 36,9 ± 6,63 | 9,9 ± 1,92 ^b |
| | 8 ml | 5 | 46,7 ± 7,75 | 38,0 ± 7,65 | 29,0 ± 6,63 | 8,8 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 35,1 ± 7,75 | 27,4 ± 7,65 | 18,6 ± 6,63 | 8,5 ± 1,92 ^b |
| LYON | 4 ml | 5 | 51,9 ± 7,75 | 42,3 ± 7,65 | 27,7 ± 6,63 | 14,5 ± 1,92 |
| | 8 ml | 5 | 51,2 ± 7,75 | 43,5 ± 7,65 | 28,4 ± 6,63 | 15,0 ± 1,92 |
| | 12 ml | 5 | 47,5 ± 7,75 | 38,6 ± 7,65 | 26,6 ± 6,63 | 11,6 ± 1,92 |
| MARTIN | 4 ml | 5 | 58,9 ± 7,75 | 52,9 ± 7,65 | 35,4 ± 6,63 | 17,2 ± 1,92 ^c |
| | 8 ml | 5 | 60,3 ± 7,75 | 53,5 ± 7,65 | 38,1 ± 6,63 | 15,1 ± 1,92 |
| | 12 ml | 5 | 48,3 ± 7,75 | 39,9 ± 7,65 | 30,3 ± 6,63 | 9,6 ± 1,92 |
| MONTEKO | 4 ml | 5 | 53,6 ± 7,75 | 46,7 ± 7,65 | 29,9 ± 6,63 | 16,4 ± 1,92 |
| | 8 ml | 5 | 63,3 ± 7,75 | 54,1 ± 7,65 | 33,6 ± 6,63 | 20,1 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 38,2 ± 7,75 | 30,0 ± 7,65 | 19,3 ± 6,63 | 10,6 ± 1,92 |
| PIKANT | 4 ml | 5 | 52,4 ± 7,75 | 42,0 ± 7,65 | 31,2 ± 6,63 | 9,8 ± 1,92 |
| | 8 ml | 5 | 52,8 ± 7,75 | 44,6 ± 7,65 | 34,3 ± 6,63 | 9,3 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 46,0 ± 7,75 | 39,7 ± 7,65 | 29,0 ± 6,63 | 9,8 ± 1,92 |
| POLLEDSTAR | 4 ml | 5 | 44,1 ± 7,75 | 37,4 ± 7,65 | 27,4 ± 6,63 | 9,3 ± 1,92 ^b |
| | 8 ml | 5 | 52,5 ± 7,75 | 43,2 ± 7,65 | 34,5 ± 6,63 | 8,4 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 61,6 ± 7,75 | 51,1 ± 7,65 | 37,9 ± 6,63 | 12,9 ± 1,92 |
| REBEL | 4 ml | 5 | 56,7 ± 7,75 | 48,8 ± 7,65 | 39,7 ± 6,63 | 8,0 ± 1,92 ^b |
| | 8 ml | 5 | 55,3 ± 7,75 | 45,5 ± 7,65 | 36,9 ± 6,63 | 7,5 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 42,7 ± 7,75 | 37,0 ± 7,65 | 29,7 ± 6,63 | 6,7 ± 1,92 ^b |
| SUNSHINE | 4 ml | 5 | 47,7 ± 7,75 | 42,1 ± 7,65 | 34,0 ± 6,63 | 6,5 ± 1,92 ^{bd} |
| | 8 ml | 5 | 43,1 ± 7,75 | 36,1 ± 7,65 | 28,6 ± 6,63 | 7,0 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 50,3 ± 7,75 | 42,2 ± 7,65 | 33,9 ± 6,63 | 7,9 ± 1,92 ^b |
| SUNWAY | 4 ml | 5 | 47,1 ± 7,75 | 40,2 ± 7,65 | 31,4 ± 6,63 | 8,0 ± 1,92 ^b |
| | 8 ml | 5 | 52,4 ± 7,75 | 44,6 ± 7,65 | 36,0 ± 6,63 | 7,9 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 60,5 ± 7,75 | 52,8 ± 7,65 | 43,0 ± 6,63 | 9,2 ± 1,92 ^b |
| SUREBOY | 4 ml | 5 | 62,4 ± 7,75 | 54,9 ± 7,65 | 43,5 ± 6,63 | 11,1 ± 1,92 |
| | 8 ml | 5 | 58,6 ± 7,75 | 51,0 ± 7,65 | 41,2 ± 6,63 | 9,2 ± 1,92 ^b |
| | 12 ml | 5 | 46,6 ± 7,75 | 37,7 ± 7,65 | 30,0 ± 6,63 | 7,3 ± 1,92 ^b |

Tabulka 3 Výsledky parametrů aktivity dle býků a objemů po prvním rozmrazení v T60
(n=195)

| Býk | Objem při I. mrazení | n | AC v T30 (%) | AP v T30 (%) | AR v T30 (%) | APO v T30 (%) |
|------------|----------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| COLMAN | 4 ml | 5 | 48,9 ± 7,74 | 42,2 ± 7,42 | 26,5 ± 5,81 | 10,5 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 42,5 ± 7,74 | 31,6 ± 7,42 | 22,0 ± 5,81 | 9,5 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 34,3 ± 7,74 | 25,4 ± 7,42 | 18,5 ± 5,81 | 6,8 ± 2,10 |
| KORN | 4 ml | 5 | 36,9 ± 7,74 | 31,0 ± 7,42 | 22,9 ± 5,81 | 7,7 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 54,1 ± 7,74 | 44,1 ± 7,42 | 31,2 ± 5,81 | 12,6 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 55,3 ± 7,74 | 44,7 ± 7,42 | 34,1 ± 5,81 | 10,2 ± 2,10 |
| LATEX | 4 ml | 5 | 47,8 ± 7,74 | 39,0 ± 7,42 | 27,8 ± 5,81 | 10,4 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 52,9 ± 7,74 | 45,9 ± 7,42 | 34,6 ± 5,81 | 10,6 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 32,6 ± 7,74 | 25,7 ± 7,42 | 17,4 ± 5,81 | 7,5 ± 2,10 |
| LEWIS | 4 ml | 5 | 46,8 ± 7,74 | 39,7 ± 7,42 | 27,8 ± 5,81 | 11,7 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 40,4 ± 7,74 | 33,0 ± 7,42 | 24,7 ± 5,81 | 7,8 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 28,3 ± 7,74 | 20,3 ± 7,42 | 10,7 ± 5,81 | 8,6 ± 2,10 |
| LYON | 4 ml | 5 | 51,9 ± 7,74 | 45,3 ± 7,42 | 31,6 ± 5,81 | 13,5 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 43,0 ± 7,74 | 35,9 ± 7,42 | 27,7 ± 5,81 | 7,8 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 43,2 ± 7,74 | 34,6 ± 7,42 | 26,8 ± 5,81 | 7,5 ± 2,10 |
| MARTIN | 4 ml | 5 | 58,0 ± 7,74 | 49,5 ± 7,42 | 37,9 ± 5,81 | 11,3 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 51,2 ± 7,74 | 43,9 ± 7,42 | 34,6 ± 5,81 | 9,2 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 52,7 ± 7,74 | 44,4 ± 7,42 | 31,7 ± 5,81 | 12,3 ± 2,10 |
| MONTEKO | 4 ml | 5 | 51,9 ± 7,74 | 43,5 ± 7,42 | 28,6 ± 5,81 | 13,4 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 53,6 ± 7,74 | 46,7 ± 7,42 | 28,6 ± 5,81 | 17,7 ± 2,10 ^A |
| | 12 ml | 5 | 43,7 ± 7,74 | 37,7 ± 7,42 | 26,7 ± 5,81 | 10,7 ± 2,10 |
| PIKANT | 4 ml | 5 | 61,9 ± 7,74 | 53,6 ± 7,42 | 40,7 ± 5,81 | 11,2 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 60,6 ± 7,74 | 52,3 ± 7,42 | 40,0 ± 5,81 | 11,2 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 40,5 ± 7,74 | 34,0 ± 7,42 | 23,9 ± 5,81 | 9,3 ± 2,10 |
| POLLEDSTAR | 4 ml | 5 | 48,4 ± 7,74 | 38,3 ± 7,42 | 27,6 ± 5,81 | 9,3 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 52,6 ± 7,74 | 39,7 ± 7,42 | 30,6 ± 5,81 | 8,2 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 49,2 ± 7,74 | 40,6 ± 7,42 | 31,5 ± 5,81 | 8,7 ± 2,10 |
| REBEL | 4 ml | 5 | 48,4 ± 7,74 | 43,1 ± 7,42 | 35,2 ± 5,81 | 6,0 ± 2,10 ^a |
| | 8 ml | 5 | 59,8 ± 7,74 | 50,1 ± 7,42 | 40,2 ± 5,81 | 8,0 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 51,3 ± 7,74 | 44,4 ± 7,42 | 36,1 ± 5,81 | 5,6 ± 2,10 ^a |
| SUNSHINE | 4 ml | 5 | 50,6 ± 7,74 | 43,1 ± 7,42 | 34,9 ± 5,81 | 6,8 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 44,4 ± 7,74 | 36,1 ± 7,42 | 28,0 ± 5,81 | 7,6 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 39,2 ± 7,74 | 30,9 ± 7,42 | 24,5 ± 5,81 | 5,8 ± 2,10 ^a |
| SUNWAY | 4 ml | 5 | 45,0 ± 7,74 | 35,7 ± 7,42 | 27,4 ± 5,81 | 6,7 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 46,7 ± 7,74 | 40,1 ± 7,42 | 32,4 ± 5,81 | 6,5 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 47,4 ± 7,74 | 39,5 ± 7,42 | 30,6 ± 5,81 | 8,3 ± 2,10 |
| SUREBOY | 4 ml | 5 | 57,6 ± 7,74 | 51,5 ± 7,42 | 42,8 ± 5,81 | 7,5 ± 2,10 |
| | 8 ml | 5 | 55,6 ± 7,74 | 47,3 ± 7,42 | 39,0 ± 5,81 | 7,4 ± 2,10 |
| | 12 ml | 5 | 47,9 ± 7,74 | 40,9 ± 7,42 | 33,2 ± 5,81 | 7,0 ± 2,10 |

Tabulka 4 Podíly spermií s nenarušenými membránami a podíly živých spermií dle býků a objemů bezprostředně po prvním rozmrazení (n=195)

| Býk | Objem při I. mrazení | n | NM v T0 (%) | ŽIV v T0 (%) |
|------------|----------------------|---|-------------|--------------|
| | | | LSM ± SE | LSM ± SE |
| COLMAN | 4 ml | 5 | 14,9 ± 3,71 | 23,8 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 14,5 ± 3,71 | 18,1 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 12,1 ± 3,71 | 14,7 ± 4,52 |
| KORN | 4 ml | 5 | 24,0 ± 3,71 | 22,7 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 21,3 ± 3,71 | 24,2 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 22,8 ± 3,71 | 24,2 ± 4,52 |
| LATEX | 4 ml | 5 | 10,7 ± 3,71 | 14,0 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 10,9 ± 3,71 | 10,0 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 15,3 ± 3,71 | 13,2 ± 4,52 |
| LEWIS | 4 ml | 5 | 25,8 ± 3,71 | 22,4 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 28,5 ± 3,71 | 23,9 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 23,2 ± 3,71 | 18,4 ± 4,52 |
| LYON | 4 ml | 5 | 16,7 ± 3,71 | 17,4 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 18,0 ± 3,71 | 23,5 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 14,0 ± 3,71 | 14,4 ± 4,52 |
| MARTIN | 4 ml | 5 | 18,1 ± 3,71 | 31,3 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 25,3 ± 3,71 | 30,1 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 24,2 ± 3,71 | 25,1 ± 4,52 |
| MONTEKO | 4 ml | 5 | 13,5 ± 3,71 | 15,5 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 17,7 ± 3,71 | 19,6 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 19,5 ± 3,71 | 21,1 ± 4,52 |
| PIKANT | 4 ml | 5 | 15,3 ± 3,71 | 14,6 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 19,3 ± 3,71 | 24,6 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 17,4 ± 3,71 | 20,1 ± 4,52 |
| POLLEDSTAR | 4 ml | 5 | 16,6 ± 3,71 | 14,0 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 18,5 ± 3,71 | 18,6 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 14,2 ± 3,71 | 11,7 ± 4,52 |
| REBEL | 4 ml | 5 | 16,5 ± 3,71 | 17,6 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 17,7 ± 3,71 | 19,1 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 12,7 ± 3,71 | 17,1 ± 4,52 |
| SUNSHINE | 4 ml | 5 | 10,3 ± 3,71 | 12,0 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 24,3 ± 3,71 | 24,8 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 17,2 ± 3,71 | 16,8 ± 4,52 |
| SUNWAY | 4 ml | 5 | 12,3 ± 3,71 | 14,6 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 18,1 ± 3,71 | 20,6 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 15,3 ± 3,71 | 17,2 ± 4,52 |
| SUREBOY | 4 ml | 5 | 19,4 ± 3,71 | 24,0 ± 4,52 |
| | 8 ml | 5 | 20,8 ± 3,71 | 24,2 ± 4,52 |
| | 12 ml | 5 | 21,0 ± 3,71 | 26,0 ± 4,52 |