

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Analýza kvality ejakulátu beranů šumavské ovce v
různých fázích kryokonzervace**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michal Jadrný

Studijní program: Chov hospodářských zvířat

**Vedoucí práce: Ing. Martin Ptáček, Ph.D.
Konzultant: Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.**

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Analýza kvality ejakulátu beranů šumavské ovce v různých fázích kryokonzervace" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu práce Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, cenné rady, věcné připomínky a informace, které mi poskytnul při psaní mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval konzultantovi práce Ing. Filippu Georgijeviči Savvulidi, Ph.D. za jeho čas, odborné rady a pomoc při výzkumu. Další poděkování patří paní Ivaně Novákové za poskytnutí svého chovu pro účely mé diplomové práce a za poskytnutí informací o jejím chovu. V neposlední řadě bych rád poděkoval mé rodině za podporu během celého studia.

Analýza kvality ejakulátu beranů šumavské ovce v různých fázích kryokonzervace

Souhrn

Cílem práce bylo zhodnotit vliv vnitřních faktorů, v našem případě vliv věku a četnosti vrhu plemeníka, na kvalitu spermatu během procesu kryokonzervace a po něm. Navazujícím cílem bylo zhodnotit změny kvality spermatu během postupu kryokonzervace. Pro experiment byli použiti berani plemene šumavská ovce. Toto plemeno patří mezi geneticky ohrožené druhy hospodářských zvířat a bylo proto zařazeno mezi genetické zdroje České republiky. Pro zachování genetické rozmanitosti tohoto plemene je důležitý správný výběr plemeníků pro proces kryokonzervace.

Plemeníci byli rozděleni do čtyř skupin podle věku (1,5, 2,5, 3,5 a 4,5 let). Dále byli rozděleni podle četnosti vrhu, ve kterém se narodili, na jedináčky a dvojčata. Pro hodnocení parametrů kvality spermatu byly použity metody CASA a průtoková cytometrie. Hodnocení spermatu probíhalo před ekvilibrací, po ekvilibraci a po kryokonzervaci.

Kvalita spermatu během kryokonzervace postupně významně klesala. Od vyšetření spermatu před ekvilibrací došlo během procesu kryokonzervace k poklesu celkové motility spermatu o 53,5 %, k poklesu progresivní motility o 38 % a k poklesu buněk s intaktní plazmatickou membránou a akrozomem o 47 %.

Vliv věku a četnosti vrhu se na kvalitě spermatu odráží následujícím způsobem. Před ekvilibrací dosahovali lepší kvality spermatu plemeníci staří 2,5, 3,5 a 4,5 roku a plemeníci, kteří pocházeli z dvojčat. Po ekvilibraci nebyl prokázán nijak významný rozdíl kvality spermatu mezi věkovými kategoriemi a četnost vrhu neměla na kvalitu spermatu prokazatelný vliv. Po kryokonzervaci byla zjištěna lepší kvalita spermatu u plemeníků starých 3,5 a 4,5 roku. Prokazatelně lepších výsledků pak dosahovali plemeníci z vícečetných vrhů.

Výsledky experimentu potvrdily, že pro proces kryokonzervace spermatu je lepší využít starší plemeníky ve věku 3,5 – 4,5 let a plemeníky, kteří pocházejí z dvojčat (vícečetnost vrhu). Právě tyto jedinci měli nejlepší kvalitu inseminačních dávek po kryokonzervaci.

Získané výsledky mohou do budoucna sloužit jako vodítko pro výběr plemeníků vhodných pro proces kryokonzervace, a to zejména u šumavských beranů. Výběr plemeníků s tendencí odolávat kryopoškození spermatu, může přispět ke zlepšení kvality konzervovaných inseminačních dávek a k uchování cenného genetického materiálu po delší časové období.

Klíčová slova: Průtoková cytometrie, CASA, genové rezervy, inseminační dávka, sperma

Analysis of Šumava ram ejaculate quality in different stages of cryoconservation

Summary

The aim of the work was to evaluate the influence of internal factors, in our case the influence of age and litter frequency of the sire, on sperm quality during and after the cryopreservation process. A subsequent aim was to evaluate changes in sperm quality during the cryopreservation procedure. For the experiment, rams of the Šumava sheep breed were used. This breed belongs to the genetically endangered species of farm animals and was therefore included among the genetic resources of the Czech Republic. To preserve the genetic diversity of this breed, the correct selection of breeders for the cryopreservation process is important.

The offspring were divided into four groups according to age (1.5, 2.5, 3.5 and 4.5 years). They were further divided according to the frequency of the litter in which they were born into an only lambs and twins. CASA and flow cytometry methods were used to evaluate sperm quality parameters. Semen were evaluated before equilibration, after equilibration and after cryopreservation.

Semen quality gradually decreased significantly during cryopreservation. From examination of sperm before equilibration, there was a 53.5% decrease in total sperm motility, a 38% decrease in progressive motility, and a 47% decrease in cells with an intact plasma membrane and acrosome during the cryopreservation process.

The effect of age and litter frequency on sperm quality is reflected in the following way. Before equilibration, 2.5, 3.5 and 4.5-year-old sires and sires that came from twins achieved better sperm quality. After equilibration, no significant difference in sperm quality between age categories was demonstrated, and litter frequency had no demonstrable effect on sperm quality. After cryopreservation, better sperm quality was found in 3.5 and 4.5-year-old studs. Proven better results were achieved by sires from multiple litters.

The results of the experiment confirmed that it is better to use older sires aged 3.5-4.5 years and sires that come from twins (multiple litters) for the sperm cryopreservation process. These individuals had the best quality of insemination doses after cryopreservation.

In the future, the obtained results can serve as a guide for the selection of studs suitable for the cryopreservation process, especially for Šumava rams. The selection of studs with tendencies resistant to sperm cryodamage can contribute to the improvement of the quality of preserved insemination doses and to the preservation of valuable genetic material for a longer period of time.

Keywords: Flow cytometry, CASA, gene reserves, insemination dose, sperm

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Plemeno Šumavská ovce.....	3
3.2	Sexuální aktivita beranů.....	4
3.3	Odběr spermatu.....	5
3.3.1	Odběr do umělé vagíny.....	5
3.3.2	Elektroejakulace.....	6
3.3.3	TUMASG.....	6
3.4	Vyšetření spermatu.....	7
3.4.1	Makroskopické vyšetření.....	7
3.4.2	Mikroskopické metody.....	7
3.4.3	Hypoosmotický test (HOST).....	7
3.4.4	Tepelný test přežitelnosti.....	7
3.4.5	Spektrofotometrie.....	8
3.4.6	Hemocytometrie.....	8
3.4.7	FAST (Flagellar and Sperm Tracking).....	8
3.5	Zpracování spermatu.....	9
3.5.1	Ředění.....	9
3.5.2	Ekvilibrace.....	10
3.5.3	Sexace spermií.....	10
3.5.4	Výroba inseminačních dávek.....	11
3.5.5	Způsoby konzervace.....	11
3.5.5.1	Chlazení.....	11
3.5.5.2	Kryokonzervace.....	12
3.5.5.3	Lyofilizace.....	13
3.5.5.4	Vitrifikace.....	13
3.5.5.5	Reverzibilní inaktivace spermií.....	14
3.5.6	Rozmrazení.....	14
3.6	Ověření kvality inseminačních dávek In vivo.....	15
3.6.1	Umělá inseminace.....	15
3.6.2	Způsoby umělé inseminace.....	15
3.6.2.1	Intravaginální inseminace.....	15
3.6.2.2	Intracervikální inseminace.....	16
3.6.2.3	Transcervikální nitroděložní inseminace.....	16

3.6.2.4	Intrauterinní laparoskopická inseminace.....	16
3.7	Ověření kvality inseminačních dávek pomocí přístrojových metod.....	17
3.7.1	CASA (computer assisted sperm analysis).....	17
3.7.1.1	Princip fungování.....	17
3.7.1.2	Hodnocené parametry	18
3.7.2	Průtoková cytometrie	18
4	Metodika	20
4.1	Výběr hodnocených faktorů majících vliv na kvalitu spermatu	20
4.2	Odebírání plemenící	20
4.3	Odběr ejakulátu a zpracování	20
4.4	Vyšetření spermatu před ekvilibrací	21
4.5	Příprava vzorků pro kryokonzervaci a ekvilibrace	21
4.6	Vyšetření spermatu po ekvilibraci.....	21
4.7	Mrazení vzorků.....	22
4.8	Vyšetření spermatu po rozmrazení	22
5	Statistická analýza dat.....	23
6	Výsledky	24
6.1	Výsledky CASA.....	24
6.1.1	Základní statistické údaje – CASA	24
6.1.2	CASA před ekvilibrací	25
6.1.2.1	Popis modelu.....	25
6.1.2.2	Vliv věku plemeníka na parametry spermatu před ekvilibrací	25
6.1.2.3	Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu před ekvilibrací.....	26
6.1.3	CASA po ekvilibraci	27
6.1.3.1	Popis modelu.....	27
6.1.3.2	Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po ekvilibraci.....	27
6.1.3.3	Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po ekvilibraci	28
6.1.4	CASA po kryokonzervaci	29
6.1.4.1	Popis modelu.....	29
6.1.4.2	Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci.....	29
6.1.4.3	Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po kryokonzervaci.....	30
6.2	Výsledky průtokové cytometrie	31
6.2.1	Základní statistické údaje – průtoková cytometrie	31
6.2.2	Průtoková cytometrie po ekvilibraci.....	32
6.2.2.1	Popis modelu.....	32
6.2.2.2	Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po ekvilibraci.....	32

6.2.2.3	Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po ekvilibraci.....	33
6.2.3	Průtoková cytometrie po kryokonzervaci	34
6.2.3.1	Popis modelu	34
6.2.3.2	Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci	34
6.2.3.3	Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po kryokonzervaci	35
7	Diskuze.....	36
7.1	Změna kvality spermatu během procesu kryokonzervace	36
7.2	Vliv věku na kvalitu spermatu před ekvilibrací.....	37
7.3	Vliv věku na kvalitu spermatu po ekvilibraci	38
7.4	Vliv věku na kvalitu spermatu po kryokonzervaci	38
7.5	Vliv četnosti vrhu na kvalitu spermatu	39
7.6	Doporučení pro další výzkum	40
8	Závěr	41
9	Literatura.....	42
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	50

1 Úvod

Ovce patří mezi nejstarší chovaná hospodářská zvířata na našem území. V současné době je však mnoho původních plemen ovcí ohroženo ztrátou genetické rozmanitosti. Hlavními důvody jsou tlak moderního zemědělství a vytlačování původních plemen moderními plemeny. Pro genetickou diverzitu plemen ovcí je důležitá dostatečná základna zvířat. To je hlavním problémem původních plemen ovcí, jelikož jejich počty jsou nízké a praktikám imbreedingu při šlechtění se lze vyhnout jen s těží. Zachování původních plemen ovcí je důležité z hlediska jejich houževnatosti a přizpůsobivosti, což je cenná vlastnost při dnešní změně podnebí (Machová et al. 2021, Machová et al. 2023).

Jedním z nástrojů pro zachování původních plemen může být využití umělé inseminace. Ta není v dnešní době příliš praktikována, jelikož je lepšími výsledky reprodukce dosahováno přirozenou plemenitbou. Hlavním problémem je špatná kvalita inseminačních dávek beranů. Sperma beranů má špatné kryokonzervační vlastnosti kvůli náchylnosti na změnu teplot při mrazení. Dalším problémem je umělá inseminace ovcí, která je komplikována fyziologickou stavbou reprodukčního ústrojí samice. V současné době však dochází k rozvoji v tomto odvětví, a tak by do budoucna mohlo dojít k běžnému využívání umělé inseminace v chovech.

Pro zlepšení výsledků inseminace je důležité použití kvalitních inseminačních dávek, které mají dostačující oplozovací schopnosti. V tomto ohledu má smysl zkoumat vlivy, které ovlivňují kvalitu spermatu zejména po kryokonzervaci. Pokud známe vlivy působící na kvalitu spermatu, jsme schopni ovlivnit výběr plemenů a postup konzervace spermatu tak, abychom dosáhli lepších reprodukčních výsledků.

Umělá inseminace má řadu benefitů (např. maximální využití genetického potenciálu), které je potřeba využít. Proto má každý výzkum v této oblasti potenciál přispět ke zlepšení umělé inseminace v chovu malých přežvýkavců.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Kvalita ejakulátu v průběhu jeho zpracování ve formě dlouhodobě konzervovaných inseminačních dávek je ovlivněna nejen podmínkami prostředí působících na jedince a plemennou příslušností, ale i dalšími vnitřními faktory.

Šumavská ovce patří mezi původní plemena řazena mezi genové rezervy v ČR. Důležitou součástí záchranného programu ohrožených populací hospodářských zvířat, tedy i šumavské ovce, představují inseminační dávky získané od významných plemeníků. Tyto dávky jsou dlouhodobě konzervovány v tekutém dusíku. Obecným problémem kryokonzervace u beranů je výrazné poškození spermatických buněk v průběhu procesu mrazení a následné snížené fertilizační schopnosti po rozmrazení. Cílem diplomové práce je definování a posouzení faktorů které ovlivňují poškození spermatických buněk v průběhu konzervace a po jejich rozmrazení. Navazujícími cíli jsou zjištění kvalitativních ukazatelů spermatických buněk v průběhu kryokonzervace a po rozmrazení a následně navržení schématu pro výběr plemeníků pro účel produkce inseminačních dávek.

3 Literární rešerše

3.1 Plemeno Šumavská ovce

Šumavská ovce patří společně s valašskou ovčí mezi dvě česká národní plemena, která jsou zařazena do programu zachrany genových zdrojů (Machová et al. 2021). Šumavská ovce byla zařazena do tohoto programu v roce 1992. Jako genetický zdroj jsou evidována reprodukčně aktivní zvířata, která jsou evidována v hlavním oddílu plemenné knihy, zařazena do kontroly užítkovosti a mají minimálně dvě generace předků, které jsou zapsány v plemenné knize (Milerski 2016).

Jako plemeno byla šumavská ovce uznána v roce 1987. Patří mezi polojemnovlnná až polohrubovlnná plemena se smíšenou splývavou bílou vlnou. Rouno je polouzavřené. Plemeno je charakteristické středním tělesným rámcem a lehkou kostrou. Živá hmotnost bahnic je 55-65 kg, u beranů 80-100 kg (Svaz chovatelů ovčí a koz 2023). Ovce mají dobré pastevní schopnosti a chůzi. Výhodou plemene je schopnost využívat i méně kvalitní porosty, při delším období pastvy. To je hlavní důvod pro využití tohoto plemene v environmentálním systému Národního parku Šumava (Jandurova et al. 2005). Machová et al. (2021) uvádí, že se jedná o odolné plemeno, které se hodí pro údržbu krajiny, agroturistiku a hybridizační programy, a proto má své místo v moderním zemědělství. Užítkovost plemene je trojitá (maso, mléko, vlna) (Machová et al. 2023).

Šumavská ovce má genetický základ v českých selských plemenech ovčí. Přesný původ selských ovčí není znám. Populace byla v minulosti překřížena merinovými plemeny ovčí, avšak v některých horských a podhorských oblastech došlo k zachování původního typu plemene. Od druhé poloviny minulého století probíhá regenerační křížení s fylogeneticky příbuznými plemeny. K těmto účelům byly použity plemena württemberská ovce, texel, sovětská cigája, lincoln, kent, leicester, zušlechtěná valaška, cheviot a východofříská ovce (Svaz chovatelů ovčí a koz 2023).

Pro budoucnost tohoto plemene je důležitá znalost historického vývoje a příbuzenství v populaci tak, aby bylo možné zachovat genetickou rozmanitost plemene. Největší překážkou genetické rozmanitosti málo početných plemen je ohrožení imbreedingovou depresí (Machová et al. 2023). Současnou tendencí je pokles početních stavů ovčí v genetických zdrojích.

Tabulka 1 Vývoj početních stavů populace genetického zdroje

Rok	2001	2003	2005	2007	2009	2011	2013	2015	2017	2019	2020	2021	2022
Počet zvířat	1992	2734	2325	2438	2409	1942	2142	2169	2213	2224	1928	1773	1352
Počet chovů	26	27	31	29	24	23	22	22	26	26	28	26	23

(Národní referenční středisko pro genetické zdroje zvířat)

Tabulka 2 Chovný cíl plemene dle SCHOK

Plodnost na obahněnou v %	Odchov do 14 dnů v %	Produkce mléka za dojnou periodu kg	Živá hmotnost v kg jehňat ve 100 dnech		Věk v měsících pro zařazení do plemenitby		Živá hmotnost v kg při zařazení do plemenitby	
			Beránci	Jehničky	Berani	Jehnice	Berani	Jehnice
150	140	120*	32	28	10-12	10-12	55	45

* u dojných ovcí za dojnou periodu 150 dnů



Obrázek 1 Šumavská ovce – beran (ČZU v Praze 2019)

3.2 Sexuální aktivita beranů

K plnohodnotnému dosažení pohlavní dospělosti dochází u beranů od 4–8 měsíce, do 1–4 let stáří. K prvním projevům říje dochází už během několika týdnů po narození a nejpozději se známky pohlavního chování dostavují do 1 roku stáří. (Colenbrander et al. 2003)

Berani jsou na rozdíl od ovcí plodní po celý rok, nicméně se u nich objevuje reprodukční sezóna, během které se mění množství a kvalita spermatu a projevuje se výrazněji sexuální aktivita. Velikost varlat, produkce spermií a sexuální chování je ovlivněno zejména fotoperiodicitou. Roční období ovlivňuje kvalitu, objem spermií a jejich koncentraci, která je nižší při vysokých teplotách. Parametry spermií pak také ovlivňuje relativní vlhkost nebo nadprůměrné srážky. Vyšší pohyblivosti spermií je docíleno během připouštěcího období. Colebrander et al. (2003) uvádí, že během reprodukční sezóny 5-8 % spermií vykazovalo anomálie morfologického charakteru. Mimo připouštěcí období pak byly zaznamenány morfologické anomálie u 10-18 % spermií.

Na sexuální aktivitu samců během připouštěcího období má vliv zejména působení samičího efektu. Jedná se o chemický, vizuální nebo sluchový stimul, kterým samice působí na samce. Samci, kteří jsou chováni v přítomnosti samic nacházejících se v říji, mají prokazatelně

vyšší kvalitu spermatu a vyšší obsah testikulární tekutiny během celého roku. Oproti tomu byl u těchto samců zjištěn pokles koncentrace testosteronu (Giriboni et al. 2017).

Berani jsou schopni vyprodukovat během dne $2,76$ až $7,23 \times 10^9$ spermií, v závislosti na sezónnosti a plemenné příslušnosti. Denně jsou pak schopni vyloučit 40 až 80 % celkové denní produkce spermií (Leboeuf et al. 2000).

Proto, abychom získali lepší kvalitu spermatu od beranů mimo připouštěcí období, musíme vystavit plemeníky určitým účinkům. Jedním způsobem je aplikace intramuskulárního glutamátu samostatně, nebo v kombinaci s aplikací testosteronu. Tento zásah vyvolá u plemeníků zvýšení sexuálního apetitu mimo připouštěcí období. Berani, kterým byl aplikován tento přípravek, vyvolávají u ovcí v době anestrů rychlejší nástup první říje lepší ovulaci, tvorbu žlutého tělíska a celkově dochází k lepšímu zabřezávání (Calderón-Leyva et al. 2018). V regionech, kde dochází k připouštění samic pomocí inseminačních dávek, jsou berani vystaveni střídání délek světelného dne. Nejprve dochází k imitaci světelného režimu letních dnů, kdy jsou samci vystaveni delšímu světlu během dne po dobu jednoho měsíce. Následně je aplikováno zkrácení světelného dne, což má za následek napodobení světelného režimu zimních dnů. Tento způsob má za následek konstantně vysokou produkci spermatu, bez sezónních výkyvů (Chemineau et al. 2007). Pokud není zapotřebí produkce inseminačních dávek během celého roku, lze využít u beranů působení delšího světelného intervalu po dobu 2-3 měsíců. K tomu dochází většinou v zimních měsících tak, abychom připravili plemeníky na produkci kvalitního ejakulátu v jarních měsících, kdy dochází k přirozeným říjím u samic. Těsně před plánovaným připouštěním se zkrátí světelný interval, nebo dojde k aplikaci melatoninových implantátů, což má za následek imitaci přirozeného připouštěcího období u samců (Malpoux et al. 1995, Chemineau et al. 2007).

K reprodukci mimo přirozené připouštěcí období může dojít nepřetržitým působením světla v chovech. Tento způsob je však zakázán, kvůli možným poruchám biologických rytmů u hospodářských zvířat (Pellicer-Rubio et al. 2019).

3.3 Odběr spermatu

3.3.1 Odběr do umělé vagíny

Nejčastějším způsobem pro odběr spermatu od beranů je odběr do umělé vagíny. Jedná se o způsob, který je nejméně invazivní. Umělá vagína pro odběr musí splňovat některé zásady a co nejpřesněji tak imitovat přirozené prostředí pochvy ovce. Délka umělé vagíny, přizpůsobená k odběru ejakulátu u malých přežvýkavců, má délku 20 cm. Prostor mezi vnitřní a vnější stěnou umělé vagíny je vyplněn vodou, která by měla být vytemperována na teplotu 40-41 °C. To je důležité pro komfort plemeníka, ale také zejména pro spermie získané během odběru. Tlak, který vyvíjí vnitřní stěna vagíny na penis samce, se dá regulovat přifouknutím přes vzduchový ventil. Dovnitř vagíny je vložen nejčastěji jednorázový latexový sběrač. Ten je vymazán vazelinou nebo sonografickým gelem, který plní účel lubrikační látky. Tento krok je nezbytný pro zamezení poranění penisu berana (Kos et al. 2019).

Pro odběr se využívá fantom nebo atrapa, na kterou během odběru plemeník naskakuje. Jako atrapa slouží samice, která pokud je v říjí, může způsobit rychlejší odběr a zvýšit množství odebíraného materiálu. Intenzita odběrů je zásadní pro kvalitu spermatu. Odběr je možné

provádět 1 až 2krát denně, 5krát do týdne. Oproti tomu jiné zdroje uvádí intenzitu odběrů na 2-3 odběry týdně. Doba odpočinku mezi jednotlivými odběry by měla být 2-3 dny, což má příznivý vliv na mrazitelnost spermií. V připouštěcím období lze získat více inseminačních dávek než mimo něj. Týdně tak lze vyprodukovat od jednoho plemeníka 50 až 200 inseminačních dávek. (Colenbrander et al. 2003; Louda & Hegedušová 2009)

3.3.2 Elektroejakulace

Metoda, která se využívá v případě, pokud nejsou berani navyklí na odběr pomocí umělé vagíny, nebo v období se sníženou sexuální aktivitou (Abril-Sánchez et al. 2017). Elektroejakulace se provádí za pomoci elektroejakulátoru, který se skládá z rektální sondy o průměru 2,5 cm a délce 20,5 cm. Ungerfeld et al. (2021) ve své práci uvádí rozdílné rozměry sondy, a to délku 30 cm a průměr 1,5 cm. Na sondě jsou připevněny tři pásové elektrody s ampérmetrem. Zdrojem celého zařízení je 12-V baterie. Zvířeti ležícímu na levém boku je do konečníku zavedena sonda s ultrazvukovým gelem, kvůli zlepšení elektrického kontaktu. Elektrické pulzy působí v cyklech: 5 pulzů při 0,1 mA, 20 pulzů při 0,2 mA a 5 pulzů při 0,3 mA. Pokud nedojde ke stimulaci a následné ejakulaci, následuje další série pulzů (Santiago-Moreno et al. 2009). Elektrická stimulace není příliš vhodná z důvodu změny semenné plazmy. To má za následek snížení tolerance spermií na poškození při kryokonzervaci (Lv et al. 2019; Youngquist & Threlfall 2006). Uvádí se, že použití této metody je bolestivé a stresující, a proto méně vhodné. Elektroejakulace má za následek zvýšení koncentrace kortizolu v séru, zvýšení rektální teploty a také srdeční a respirační frekvence. To všechno jsou ukazatele stresu. Elektrické pulzy navíc poškozují svaly (Ungerfeld et al. 2021).

3.3.3 TUMASG

Poměrně novou metodou a také alternativou pro odběr semene pomocí elektroejakulace, je technika odběru označovaná jako TUMASG. Jedná se o transrektální ultrazvukem vedenou masáž přídatných pohlavních žláz. Původně se tato metoda využívala u divoce žijících přežvýkavců, jelikož využívá méně elektrických pulzů nebo vůbec žádné. To má za následek nižší hodnoty kortizolu a tím pádem nižší stresové působení na zvířata. Při rektální ultrasonografii jsou v reálném čase pozorovány bulbouretrální žlázy, semenné vaky a také ampule chámovodu. Před samotnou masáží dojde nejprve k vytažení penisu a následně je do konečníku vsunuta sonda s karboxymethylcelulózovým gelem. Při TUMASGu dochází ke střídání masáže mezi bulbouretrálními žlázami a ampulemi chámovodu. Současně při tom se praktikuje masáž oblasti močové trubice, kvůli lepšímu průchodu ejakulátu přes močovou trubici. Díky ultrazvukovému skenování dochází ke kontrole chámovodu, která končí v momentě úplného vyprázdnění žláz. Pokud nedojde k ejakulaci, je použito elektrických podnětů o síle 3 V, po dobu 5 s. Mezi podněty jsou vloženy přestávky, které jsou využity pro TUMASG (Abril-Sánchez et al. 2017). V případě aplikace oxytocinu před TUMASGem, dochází k rychlejší elektroejakulaci a ke snížení použitých elektropulzů (Ungerfeld et al. 2016).

Abril-Sánchez et al. (2017) ve své práci srovnává metody elektroejakulace (EE) a TUMASGu a jejich stresové dopady na samce. Uvádí, že při metodě TUMASG dochází k pozdější ejakulaci a je tedy časově náročnější. U všech aplikací TUMASGu muselo být použito elektrických pulzů, avšak méně, než je tomu u elektroejakulace. Samci se zvukově více

projevovali při použití elektroejakulace z čehož je patrné, že je tato metoda pro samce více bolestivá. Srdeční frekvence byla vyšší u EE, a to až o 10 tepů za minutu. Teplota konečníku byla stejná u obou metod. Hodnota kortizolu, který je označován jako ukazatel stresu, byla obecně vyšší v případě EE. Kvalita odebraného spermatu při obou metodách byla srovnatelná. Tyto výsledky dokazují, že metoda TUMASG je vhodnou alternativou odběru spermatu, při které dochází k získání ejakulátu obdobných hodnot jako při EE, avšak za podmínek více vyhovujících a méně stresujících pro samce.

3.4 Vyšetření spermatu

3.4.1 Makroskopické vyšetření

Ihned po odběru spermatu se provádí hodnocení objemu, konzistence, barvy, pachu, pH a obsahu cizích příměsí. Většinu parametrů lze hodnotit subjektivně, pouhým zrakem. Objem odebraného spermatu se dá nejjednodušeji zjistit vážením nebo měřením. K tomuto účelu se nejčastěji využívá odměrná odběrová zkumavka, na které se přímo odečte hodnota objemu ejakulátu, obvykle v mililitrech (Heidari et al. 2021). Faktory ovlivňující objem ejakulátu jsou věk samce, hmotnost, plemeno, výživa, roční období, způsob a četnost odběru spermatu (Weberová 2017). Konzistence ejakulátu berana by měla být smetanovitá, hustá a neprůhledná. Barva lehce našedlá až mléčná. Pach beraního spermatu může být cítit po vlně. pH se u beraního spermatu pohybuje od 6,3 do 7,5 (Kos et al. 2019).

3.4.2 Mikroskopické metody

Tyto metody zahrnují vyšetření koncentrace, životaschopnosti, motility a morfologie. Pohyblivost spermií se dá hodnotit podle stupnice od 0 do 5, kdy 0 označuje sperma bez jakéhokoli pohybu spermií a naopak 5 představuje spermie se značnou pohyblivostí (Ungerfeld et al. 2021). Motilita spermií je ovlivňována kaskádou proteinů. Navzdory pokroku ve výzkumu proteinů a jejich funkcí na spermie, jsou studie prováděné na beranech spíše vzácné (Zhu et al. 2020). Koncentraci spermatu lze posoudit více způsoby. Počítačovými systémy, spektrofotometrií, nebo třeba hemocytometrií. Van der Horst (2020) uvádí, že koncentrace spermií ve spermatu u berana je $>3 \times 10^9/\text{ml}$.

3.4.3 Hypoosmotický test (HOST)

Dále lze provádět test na hypoosmotický otok spermií (HOST), který určuje procento funkčních membrán (Lv et al. 2019; Ungerfeld et al. 2021; Faigl et al. 2012). U spermií, které mají funkční plazmatickou membránu, dochází při hypoosmotických podmínkách k otoku a zvlnění bičíků (Bajuk et al. 2018). Vzorek spermatu je inkubován společně s hypoosmotickým bobtnavým roztokem (HOS) v poměru 1:15, při teplotě 37 °C a po dobu 15 minut. Následuje hodnocení pod mikroskopem s fázovým kontrastem (Liu et al. 2020).

3.4.4 Tepelný test přežitelnosti

Tento test se provádí za účelem zjištění odolnosti a životaschopnosti spermií. Sperma je po rozmrazení vystaveno na několik hodin teplotě 37 °C, což imituje přirozenou teplotu

v reprodukčním ústrojí samice. Vystavení zmrazeného a rozmrazeného spermatu těmto podmínkám má za následek odhalení poškození buněk, které není patrné ihned po rozmrazení, ale ke kterému dochází v těle samice po určitém čase. Tento test je dobrým indikátorem pro hodnocení fertilizační schopnosti beraního spermatu (Aisen et al. 2000; Joshi et al. 2005).

3.4.5 Spektrofotometrie

Pro měření koncentrace spermií v beraním spermatu se může využívat také spektrofotometr. Metoda je založena na měření intenzity světla. Jedná se o kvantitativní měření přenosu světla skrz požadovaný roztok. U domácích druhů zvířat je pro hodnocení koncentrace spermií využíváno vlnových délek mezi 500 a 650 nm. Požadovaný vzorek spermatu se odpipetuje do kyvety, což je malá, průhledná a kvádrotvá nádobka, vyrobená z plastu, skla nebo křemene. Kyveta se po naplnění vkládá mezi zdroj světla a detektor, který zachycuje světelný paprsek. Před měřením se provádí kalibrace přístroje, vložení čisté kyvety do komory na vzorky, naplněné 2,9% roztokem citrátu sodného (Anzar et al. 2009). Spektrofotometrie nemusí být dostatečně přesná metoda měření koncentrace spermatu, kvůli neschopnosti odlišit spermie od jiných buněk nebo částic zbytků, obsažených ve spermatu (Brito et al. 2016; Moraes et al. 2019).

3.4.6 Hemocytometrie

Hemocytometrie je jedním ze způsobů měření koncentrace spermatu. Jedná se o nejstarší způsob hodnocení koncentrace spermií. Hemocytometr je tlustá skleněná destička, na které jsou odděleny dvě počítací komůrky. Nejprve dochází k přípravě fixačního roztoku, rozpuštěním 1 ml formaldehydu v 99 ml 3,4% citrátu sodného. Následuje ředění spermatu s fixním roztokem. Na hemocytometr se pokládá krycí sklíčko a kápnutím připraveného vzorku na okraje krycího sklíčka, dojde ke vtažení tekutiny pod krycí sklíčko. Pro vyšetření koncentrace spermatu se využívá Neubauerovy, ale také Bürkerovy komůrky. K vyšetření se využívá mikroskop s fázovým kontrastem, při 200 nebo 400násobném zvětšení. Ve čtverečcích hemocytometru se počítají jednotlivé hlavičky spermií (Anzar et al. 2009; Brito et al. 2016).

3.4.7 FAST (Flagellar and Sperm Tracking)

Kvůli velkému počtu buněk, není možné pomocí systému CASA sledovat bičíky spermií. Proto byl objeven tento nový systém, vyvinutý na Univerzitě Birmingham, UK. Jedná se o systém, který kvantitativně hodnotí a analyzuje některé parametry bičíků spermií. Sledování bičíkových křivek umožňuje měření veličin, jako je rozptyl energie, narušení okolního média a viskózní napětí. Tyto veličiny nelze měřit pouhým sledováním hlaviček spermií. Hodnocený vzorek spermatu musí být ředěný, nikoli surový, kvůli křížení cest bičíků. FAST pracuje při 169 sn/s za pomoci modulu pohyblivosti SCA a kontrastní mikroskopie s negativní fází (Gallagher et al. 2019; van der Horst 2020).

3.5 Zpracování spermatu

3.5.1 Ředění

Před konzervací spermií je nutné k odebranému a zpracovávanému spermatu přidat takzvaná ředidla, která upravují koncentraci spermií v inseminační dávce, zvyšují objem inseminační dávky a tím pádem také efektivnější využití genetického materiálu samce (Mocé et al. 2020). Dále jsou dočasným zdrojem energie pro spermie (Dorado et al. 2007). Kryoprotektiva, obsažená v ředidlech, chrání spermie před chladovým šokem. Ten má za následek ztrátu selektivní permeability a integrity plazmatické membrány. Dochází při něm k uvolňování intracelulárních enzymů a lipidů. Dále má za příčinu trvalé změny v membránách akrozomů a v mitochondriích (Bajuk et al. 2018). Nejčastěji používaná ředidla jsou na bázi tris, fruktózy, glukózy, sacharózy, rafinózy, kyseliny citronové, antibiotik, glycerolu nebo vaječného žloutku. Dále lze použít mléčná nebo laktózová ředidla. Mléko, jako ředidlo, se dá použít plnotučné, odstředěné nebo ve formě UHT mléka (Salamon & Maxwell 2000). Inseminační dávky lze uchovávat při teplotách 2 až 15 °C, avšak při ředění odstředěným mlékem se doporučuje hodnota 4 °C (Iannuzzi et al. 2021). Glycerol se jako ochranná látka v ředidlech pro beraní sperma využívá asi nejčastěji. Hladina glycerolu, použitá při mražení dávek, je omezena jeho toxicitou. Ta je závislá na složení ředidla, jeho osmotickém tlaku a na chlazení a mražení dávek. Koncentrace glycerolu závisí také na způsobu, jakým se ke spermatu přidává. Nejlépe se jeví přidávat glycerol při 4–5 °C, a ne déle než 20 až 30 minut před zmrazením. Podle Leboeuf et al. (2000) nemá přidání glycerolu při teplotě 5 °C žádné výhody, oproti přidání při 30 °C. Vaječný žloutek je stejně jako glycerol hojně využíván v ředidlech. Jeho funkcí je ochrana před chladovým šokem a také před účinky mražení a rozmrazování inseminačních dávek. Působí zejména na plazmatickou membránu spermií. Bylo prokázáno, že vaječný žloutek působí lépe na býčí spermie než na spermie berana (Leboeuf et al. 2000; Salamon & Maxwell 2000). Byly však také zjištěny nežádoucí účinky vaječného žloutku na plodnost kryokonzervovaného spermatu. Žloutek může svou produkcí metabolitů a toxinů způsobovat snížení kvality spermatu a svou přítomností v ředidlech může způsobovat snížení motility a dýchání spermií. Lokální infekcí může nepřímo způsobit potrat (Ptáček et al. 2019).

Při ředění spermatu lze využít dvoustupňové nebo jednostupňové metody. V případě dvoustupňové metody se nejprve použije ředidel bez obsahu glycerolu. Následně je již zředěné sperma dále ředěno kryoprotektivy s obsahem glycerolu. U jednostupňové metody dojde přímo k rozředění spermatu ředidly, obsahujícími glycerol. Ředění se provádí před ekvilibrací a za nízké teploty. Koncentrace glycerolu použitého u beraního spermatu je 4–6 %. (Lv et al. 2019). Glycerolovaná ředidla lze také přidávat ve třech krocích, a to v 10minutových intervalech (Leboeuf et al. 2000).

Vzorky spermatu se ředí buď konkrétním objemem ředidla, nebo se ředí na konkrétní koncentraci spermií. Lepším způsobem je ředění na konkrétní koncentraci spermií. Míra ředění je 1:1 – 1:23. Spolehlivých výsledků bylo dosaženo u dávek ředěných na koncentraci 80 až 500×10^6 spermií/ml (Purdy 2006).

3.5.2 Ekvilibrace

Je to doba mezi přidáním kryoprotekční látky ke spermatu a samotným zmražením inseminačních dávek (Cámara et al. 2011). Ekvilibrace by měla probíhat zhruba 2-4 hodiny a měli bychom se během ní dostat na teplotu okolo 5 °C. Účelem ekvilibrace je navyknutí spermií na snižující se teplotu prostředí a na snižující se metabolismus buněk. To má za následek lepší přizpůsobení spermií negativním vlivům během procesu kryokonzervace (Lv et al. 2019). Ahmad et al. (2015) uvádí, že špatná ekvilibrace vyvolává u spermií teplotní šok a způsobuje narušení plazmatické membrány a iontových kanálů, produkci reaktivních forem kyslíku a ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu.

3.5.3 Sexace spermií

Stejně jako u ostatních druhů hospodářských zvířat, je i u malých přežvýkavců tendence získávat od kvalitních zvířat potomky s preferovaným pohlavím. Po inseminaci sexuálně tříděným spermatem byla již získána mláďata od skotu, prasat, ale také ovcí. Zatím co u skotu je inseminace sexovanými inseminačními dávkami běžnou praxí, u ostatních druhů hospodářských zvířat včetně ovcí, se těchto dávek využívá spíše výjimečně (Qin et al. 2018). Nejspolehlivější metodou pro třídění spermií je průtoková cytometrie založená na rozdílech obsahu DNA mezi gametami, které určují pohlaví plodu. Spolehlivost sexovaných inseminačních dávek se pohybuje v rozmezí 85-95 %. Úspěšnost separace spermií je závislá nejen na obsahu DNA, ale také na tvaru hlavičky spermie. Nejpresněji dochází k třídění spermií u býků, jelikož jejich zploštělý tvar hlaviček spermií nejlépe odpovídá požadovanému tvaru při průtokové cytometrii (Garner 2006). Během procesu sexování dochází k poškození spermií, a to ve větší míře, než je tomu u běžných nesexovaných dávek. Dochází k vystavení spermií mnoha stresorům jako jsou fluorescenční barviva, vysoká rychlost ředění, mechanické poškození, průchod elektrickým polem nebo laserové osvětlení (Anel-López et al. 2018). Dochází k častějšímu poškození membrán, k fragmentaci DNA, ke zhoršené motilitě a k předčasné kapacitaci. Výsledkem toho je horší zabřezávání po inseminaci sexovanými inseminačními dávkami (Qin et al. 2018). Na úspěšnost inseminace sexovanými inseminačními dávkami má vliv mnoho faktorů. Nejdůležitější je včasná a přesná detekce říje, spojená s vhodnou dobou pro inseminaci. Jelikož životaschopnost spermií tříděných podle pohlaví, je v samičím reprodukčním traktu daleko kratší, než je tomu u běžných inseminačních dávek, je nejlepší doba pro aplikaci sexovaných dávek přesně ve chvíli ovulace. Dalším důležitým faktorem je místo, kam je aplikována inseminační dávka, a také způsob inseminace (Maxwell et al. 2004, Anel-López et al. 2018). Míra úspěšnosti inseminace se zvyšuje, pokud je sperma vpraveno daleko do děložních rohů samice. Další možností, jak zlepšit proces sexace spermií, je přidání antioxidantů během procesu třídění. Antioxidanty mají ochranný účinek na kvalitu a funkci spermií. Těmito antioxidanty jsou AA-2G (kyselina askorbová-2glukosid), glutathion, melatonin nebo vitamín C. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití antioxidantu AA-2G (Qin et al. 2018).

3.5.4 Výroba inseminačních dávek

Po nařazení a schlazení semene se inseminační dávky plní do pelet nebo pejet. Zmrazení dávek v podobě pelet je rychlé a levné, ale jednotlivé pelety se nedají nijak označit. Dávky o objemu 0,1 – 0,3 ml se dávkuje do prohlubni v suchém ledu. Tato metoda je v dnešní době využívána minimálně. Zmrazení dávek v plastových pejetách je pracnější a nákladnější. Jednotlivé dávky však mohou být označeny přímo na pejetách. Připravené inseminační dávky lze do pejet plnit za pomoci pipetníku, při okolní pokojové teplotě (25 °C). Objem pejet je 0,25 – 0,5 ml (Purdy 2006). Pejety jsou uzavřeny pomocí plastových kuliček nebo těsnícího prášku PVA – polyvinyl alkohol, který při kontaktu s vodou vytváří pevnou zátku (Savvulidi et al. 2021).

3.5.5 Způsoby konzervace

3.5.5.1 Chlazení

Chlazené inseminační dávky mají oproti těm mraženým řadu výhod. Nejpodstatnější výhodou je vyšší plodnost, dále také snadnější práce při umělé inseminaci a v neposlední řadě také snazší přeprava k chovateli. Naopak velkou nevýhodou chlazeného spermatu je jeho krátká použitelnost. Inseminace chlazeným spermatem vykazuje mnohem vyšší plodnost oproti použití zmrazených inseminačních dávek. Sperma se zchladuje na teplotu 10–15 °C (Carneiro et al. 2019), dnes spíše na teplotu 4 až 5 °C. Podle Colenbrander et al. (2003) se skladováním spermatu při teplotě 5 °C docílí vyšší motility spermií než při 17 °C. Při této teplotě se dosahuje relativně vysoké plodnosti (54-65 %). Oproti tomu, zmrazené sperma vykazuje oplozeníschopnost pouhých 35–38 %. V obou případech však nedochází k takovému úspěchu, jakému je dosahováno při přirozené plemenitbě, kde je uváděna plodnost až 74 %. Ve Španělsku je umělá inseminace chlazeným spermatem využita asi v 85 % případů (Mocé et al. 2020).

Při chlazení spermatu se využívá ředících látek, které zabraňují poškození spermií. K těm dochází během chlazení, vlivem poklesu teploty. K těmto účelům se využívá např. žloutek nebo odstředěné mléko, ale také komerčně vyráběná ředidla. Při vysokých dávkách ředidel může být udržena plodnost spermatu po dobu 3-5 dnů, při teplotě 10-21 °C. Následně plodnost klesá o 3-6 % za den. K poklesu plodnosti dochází bez ohledu na to, zda je inseminační dávka skladována při 5 °C nebo při 15 °C. K zásadnímu poklesu dochází až při teplotách nad 25 °C (Yoshida 2000). Pro udržení delší životaschopnosti spermií se k ředidlům přidávají antioxidanty. Při jejich použití dochází ke zlepšení motility a akrozomové integrity spermií. Pro tento účel se využívá kataláza, superoxiddismutáza, cytochrom c a glutathionperoxidáza (Maxwell & Stojanov 1996). Pozvolným chlazením dochází k zamezení poškození spermatu chladovým šokem. To může trvat klidně od 1,5 až do 4 hodin. V dřívějších studiích již bylo prokázáno, že při poklesu teploty rychlejší jak 0,55 °C/min, dochází ke zhoršení kvality kozlího spermatu. Inseminační dávky ve formě pejet lze chladit v programovatelné vodní lázni. Rychlost chlazení je -0,18 °C/min a dochází ke zchlazení spermatu z 20 °C na 4 °C. Při této teplotě, se inseminační dávky skladují až do použití při inseminaci (Mocé et al. 2020).

U chlazených inseminačních dávek je největším problémem doba, po kterou je dávka dostatečně oplození schopná. Zhruba po 12 hodinách dramaticky klesá plodnost u chlazených inseminačních dávek. Proto ve většině případů dochází k umělé inseminaci do 5–8 hodin od zpracování semene. To má však za následek problematickou distribuci inseminačních dávek k chovatelům. Zahraniční obchod s chlazenými inseminačními dávkami je takřka nemožný. Tím pádem dochází k omezení rozvoje šlechtitelských programů v chovu malých přežvýkavců. Možným řešením je chlazení inseminačních dávek až během jejich přepravy ke spotřebiteli. K postupnému chlazení dochází během distribuce. Tím dojde k prodloužení doby pro oplození schopnost, a proto lze dopravit inseminační dávky do vzdálenějších chovů (Iannuzzi et al. 2021). Chlazení během přepravy však může být komplikovanější a také nákladnější.

3.5.5.2 Kryokonzervace

Takzvaná kryokonzervace semene je důležitou součástí pro zlepšení genetického potenciálu jednotlivých plemen malých přežvýkavců. Běžně se však v praxi využívá spíše chlazených nebo čerstvých inseminačních dávek. Hlavním důvodem je nízké zabřezávání samic po aplikaci mraženého spermatu. Úspěšnost zabřeznutí po aplikaci čerstvého spermatu je o 12,1 % vyšší, oproti mraženým a následně rozmraženým inseminačním dávkám (Konyali et al. 2013). Zmrazením spermatu dochází k ultrastrukturálnímu, biochemickému a také funkčnímu poškození spermií. Následkem je snížení motility, životaschopnosti a plodnosti spermií (Colenbrander et al. 2003).

Inseminační dávky se zamrazují buď v peletách nebo v pejetách. Ačkoli byly prokázány lepší výsledky životaschopnosti spermií a také plodnosti po rozmrazení dávek v peletách, je v praxi více využíváno inseminačních dávek v podobě pejet. A to i přes vyšší náročnost při jejich kryokonzervaci (Leboeuf et al. 2000). Dnes se ke skladování dávek využívá ve většině případů tekutého dusíku o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za pomoci takto extrémně nízké teploty lze docílit životaschopnosti spermií po neomezenou dobu. Salamon et al. (2004) uvádí, že i po 35 letech kryokonzervace spermatu berana, lze docílit oplodnění samice metodou intravaginální umělé inseminace. I tak však během zmrazení a rozmrazení dojde ke ztrátě plodnosti až u 50 % spermií (Lv et al. 2019). Nevýhodou tekutého dusíku je jeho relativně vysoká nákladnost a také nedostupnost v některých oblastech. Proto je v současné době snaha zlepšit techniku lyofilizace, při které není potřeba již hotové inseminační dávky dlouhodobě skladovat za pomoci tekutého dusíku. Zatím však nebyla potvrzena účinnost této alternativní metody na pokusech *in vivo*. Dalším způsobem, jak dlouhodobě uchovávat inseminační dávky, je mražení a následné skladování v ultramrazírnách. Teplota se v těchto zařízeních pohybuje okolo $-157\text{ }^{\circ}\text{C}$. Předběžné studie, které zkoumaly účinky toho způsobu kryokonzervace, přinesly poměrně slibné výsledky. Kvalita semene se po 2 měsících skladování v ultramrazírnách nepříliš lišila od kvality inseminačních dávek skladovaných běžným způsobem, za pomoci tekutého dusíku. Plodnost inseminačních dávek byla navíc prokázána i 6 měsíců po skladování v ultramrazírnách. Zatím však nebyly provedeny pokusy, které by prokázaly schopnost oplodnění samic těmito dávkami (Batista et al. 2009).

Mražení v peletách probíhá na suchém ledu, který má teplotu $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doba potřebná k zmrazení pelet je 2-4 minuty. Následně jsou dávky ponořeny do tekutého dusíku, ve kterém jsou dlouhodobě konzervovány. Tato metoda je rychlá a jednoduchá. Rychlost chlazení lze

regulovat objemem pelet (Leboeuf et al. 2000). Chlazené sperma v pejetách lze zmrazit za pomoci programovatelných mrazniček, s rychlostí mrazení $-8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Výhodou těchto zařízení je jednoduché ovlivnění rychlosti mrazení (Purdy 2006). K mrazení inseminačních dávek v pejetách se používá také chladicího stojanu. Pejety jsou nejprve předmrazeny v páře tekutého dusíku o teplotě mezi $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-125\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakonec jsou ponořeny přímo do tekutého dusíku a v něm uchovávány při teplotě $-197\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lv et al. 2019). Rychlost chlazení lze regulovat vzdáleností pejet od hladiny tekutého dusíku nebo objemem pejet. Leboeuf et al. (2000) uvádí následující postup kryokonzervace pejet v tekutém dusíku. Pejety jsou v horizontální poloze zavěšeny nad tekutým dusíkem, kde jsou ve výšce 4–5 cm nad hladinou mrazeny parami dusíku po dobu 4 až 5 minut. Následně jsou pejety ponořeny do tekutého dusíku. Savvulidi et al. (2021) ve své práci uvádí několik mrazících křivek, vhodných pro kryokonzervaci inseminačních dávek berana. K minimálnímu poškození akrozomů došlo při zmrazení spermatu následujícím způsobem. Pejety byly nejprve 15 cm nad povrchem tekutého dusíku po dobu 3 minut. Následně 9,5 cm nad tekutým dusíkem po dobu 2 minut. Poté 1 minutu ve výšce 5 cm nad hladinou tekutého dusíku a nakonec 2 minuty ve výšce 1,5 cm nad hladinou.

3.5.5.3 Lyofilizace

Lyofilizace je proces, při kterém dochází k dehydrataci spermatu, za pomoci mrazu. Takto upravené inseminační dávky by se daly uchovávat při pokojové teplotě, nebo v chladničkách. Oproti kryokonzervaci je však lyofilizace komplikovanější proces. Zahrnuje primární a sekundární vysoušení. Nejprve dochází k přeměně kapalné fáze na ledové krystalky. Poté se zmrzlá voda odpaří v podobě vodní páry ve vakuovém prostředí. V takto vysušeném vzorku stále zbývá 8–10 % vlhkosti. Následuje tedy sekundární sušení, kdy je nezmrážená vázaná voda zahřívána v nejnižším vakuu, což způsobí přeměnu vázané vody na vodní páru (Lv et al. 2019). Prvním úspěchem v lyofilizaci spermatu nastal v roce 1998, kdy byly získány zdravé myši po inseminaci lyofilizovanými spermii. Během lyofilizace a rehydratace spermii dochází ke ztrátě jejich pohyblivosti. Musí být, proto použita technologie ICSI (intracytoplasmic spermatozoa injection), pomocí které dochází k zavedení lyofilizovaných spermii do oocytů (Wakayama & Yanagimachi 1998). Podle Olaciregui et al. (2017) se dají lyofilizovaní ovčí spermie uchovávat při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při pokojové teplotě, po dobu 12 měsíců. Proces lyofilizace poškozuje spermie víc, než je tomu při běžné kryokonzervaci. Dochází k degradaci DNA a ke strukturálním abnormalitám chromozomů. Existují však procesy, které pomáhají zmírnit negativní účinky lyofilizace (Lv et al. 2019). Je ještě hodně prostoru pro zdokonalování metody lyofilizace savčích spermii.

3.5.5.4 Vitrifikace

Během kryokonzervace dochází k tvorbě krystalů ledu, které strukturálně poškozují spermie. Možným řešením je vitrifikace. Ta představuje přímou přeměnu roztoků z kapalného stavu do sklovitého stavu, bez tvorby intracelulárního ledu. V případě vitrifikace se využívá vysokých koncentrací kryoprotektiv a ultrarychlého zmrazení přímým ponořením do tekutého dusíku. Při vitrifikaci není nutné využívat vaječného žloutku ani glycerolu. Nevýhodou vitrifikace je počáteční křehkost vzorku a také cytotoxicita vysokých dávek kryoprotektiv. Během vitrifikace navíc spermie přichází o pohyblivost, v důsledku citlivosti na osmotické a

chemické změny. Řešením je technika ICSI. První vitrifikace byla provedena už v roce 1938 na spermích žáby. V tomto případě však byla prokázána téměř nulová přežitelnost spermií. V roce 2008 se podařilo získat malé množství životaschopných lidských spermií po vitrifikaci, s 65% progresivní motilitou. V oblasti reprodukce malých přežvýkavců zatím neexistuje dostatek zdrojů, týkajících se procesu vitrifikace. Některé experimentální pokusy vitrifikace už se však dají dohledat i v tomto odvětví. Vitřifikace má do budoucna velký potenciál, i když během této metody dochází k většinové nebo úplné ztrátě životaschopnosti spermií. Takto poškozené spermie mohou být nadále injektovány do oocytů za pomoci techniky ICSI (Jiménez-Rabadán et al. 2015; Lv et al. 2019).

3.5.5 Reverzibilní inaktivace spermií

Při této metodě dochází k možnosti uchování inseminačních dávek při pokojové teplotě. První experimenty s inhibičním účinkem oxidu uhličitého na motilitu spermií byly provedeny už v roce 1924. IVT (Illini Variable Temperature) a CUE (Cornell University Extender) jsou ředidla používaná při konzervaci spermií nad bodem mrazu. (Salamon & Maxwell 2000). Smirnov & Postavnaja (1960) uvádějí, že při použití ředidla IVT byla po dobu 6-7 dnů zachována vysoká motilita a rezistence spermií, a to při teplotě 10 °C. K tomuto způsobu uchovávání spermatu chybí dostatek odborné literatury, a to zejména v oblasti chovu ovcí. Nalezené záznamy jsou spíše staršího vydání. Z toho lze usuzovat, že tento způsob konzervace není v praxi příliš využíván.

3.5.6 Rozmrazení

Inseminační dávky ve formě pejet se rozmrazují ve vodní lázni o teplotě 35–40 °C. Pelety s inseminační dávkou, se obvykle rozmrazují suchou formou ve skleněných zkumavkách, při teplotě 37 °C (Lv et al. 2019; Leboeuf et al. 2000). Dorado et al. (2007) uvádí rozmrazování inseminačních dávek v pejetách po dobu 30 sekund těsně před samotnou inseminací, za použití vodní lázně o teplotě 39 °C. Wakayama a Yanagimachi (1998) uvádí teplotu pro rozmrazení dávek v pejetách okolo 37 °C a dobu potřebnou pro rozmrazení v rozmezí 12–30 sekund. Bylo vyzkoušeno i více způsobů rozmrazování inseminačních dávek. Dříve bylo praktikováno také rozmrazování dávek při teplotě 5 °C po dobu 2 minut. To však nemělo takové parametry semene, jako dávky rozmrazené při teplotě 37 °C. Lepších výsledků, než při použití vodní lázně o teplotě 37 °C, bylo dosaženo rozmrazením dávek při teplotě 75 °C po dobu 10 s, respektive 70 °C po dobu 7 s. Dále lze použít teplotu vodní lázně 40 °C a dobu rozmrazení 20 s (Wakayama & Yanagimachi 1998). Avšak v praxi je ve většině případů používána metoda klasického rozmrazování inseminačních dávek ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 30 s. Důvodem je jednodušší a rychlejší práce s inseminační dávkou v terénu a také nemožnost přehřát dávku a zničit tak cenný genetický materiál (Leboeuf et al. 2000).

3.6 Ověření kvality inseminačních dávek In vivo

3.6.1 Umělá inseminace

Umělá inseminace v chovu malých přežvýkavců byla velkým pokrokem v řízení reprodukce. Nyní je hlavním nástrojem, pomocí kterého můžeme řídit programy genetického výběru ovcí. Hlavní předností inseminace je plnohodnotné využití genetického potenciálu žádaných plemenů. Inseminace umožňuje kontrolu reprodukce, rychlejší testování potomků a tím rychlejší genetický pokrok (Colenbrander et al. 2003). Další výhodou je reprodukce mimo přirozené připouštěcí období s následným zvýšením ekonomiky chovu. Díky využití umělé inseminace dochází k mnohonásobnému nárůstu potomků po vynikajícím plemeni, s žádaným genetickým materiálem. Další výhodou je produkce inseminačních dávek do mnoha chovů po celém světě, čímž dochází k rozšíření genetického materiálu bez rizika šíření pohlavních a dalších nákaz, ke kterým dochází při přirozené plemenitbě neproověřených jedinců. Příkladem šlechtitelského využití inseminace je chov ovcí v Austrálii, kde bylo při přirozené plemenitbě získáno 22 jehňat po jednom beranovi za rok. Při použití inseminace čerstvým spermatem se narodilo 500 jehňat po jednom beranovi za rok. Při použití mraženého spermatu, které bylo odebíráno po celý rok, při 9 odběrech týdně, získal chovatel od jednoho berana 12 000 narozených jehňat (Kulovaná 2002). To je tedy hlavní výhodou inseminace prováděné u ovcí, kdy jsme schopni od jednoho plemeni získat několikanásobně větší počet životaschopných potomků, což přirozená plemenitba neumožňuje. Jedním z nejdůležitějších předností umělé inseminace, je pomoc při zachování genetické rozmanitosti původních plemen malých přežvýkavců. U těch došlo v posledních letech ke značnému poklesu, z důvodu chovu komerčních vysoce produktivních plemen, vzniklých za pomoci šlechtitelských technik (Lv et al. 2019).

Díky vyššímu počtu oplodnění schopných samic narůstá i nárok na plodnost samců. To vede k rozvoji reprodukčních programů hlavně v oblasti umělé inseminace, i když se zatím zdaleka nedosáhlo potenciálu tohoto odvětví. Například ve Francii dochází k využití umělé inseminace zhruba u 10 % koz, chovaných na produkci mléka. Ve Španělsku se jedná pouze o 1 % celkové populace. To má za následek pomalou reakci na práci šlechtitelských programů (Iannuzzi et al. 2021).

3.6.2 Způsoby umělé inseminace

3.6.2.1 Intravaginální inseminace

Při této metodě se inseminační dávka vpravuje do horní části poševní klenby. Inseminační pipetu zavádíme mírně zvednutou a dáváme přitom pozor, aby nedošlo k zasunutí pipety do močové trubice nebo perforaci stěny poševní (ZOOTECHNIKA.CZ. 2009; Čunát et al. 2013). Jedná se o nejjednodušší způsob inseminace. Při této metodě není vhodné použití mraženého spermatu a úspěšnost této metody je velmi variabilní (Schoenian 2019). Doporučený objem inseminační dávky pro úspěšnou inseminace je 0,3 – 0,5 ml. Počet pohyblivých spermií pak 300 až 400×10^6 (Macías et al. 2020).

3.6.2.2 Intracervikální inseminace

Inseminační dávka se při této metodě aplikuje do děložního krčku, do hloubky asi 1-2 cm, Čunát et al. (2013) uvádí 1,5 cm. K inseminaci se používá poševní zrcadlo, které se vsunuje 10-13 cm hluboko do pochvy. Čím blíže k děloze je inseminační dávka aplikována, tím je větší šance pro zabřeznutí. Porodnost je při použití čerstvého nebo chlazeného spermatu přijatelná, avšak při použití mraženého spermatu se dosahuje nevyhovujících výsledků (Schoenian 2019). K efektivnějšímu použití cervikální metody inseminace byl vynalezen prostředek k jednoduššímu vpravování inseminační dávky do těla samice a k vyhnutí se retrográdnímu toku. Tento prostředek je označován jako DARIO a při jeho použití dochází k hlubokému ukládání inseminační dávky do děložního krčku ovcí. Za pomoci DARIO dochází k vyšší plodnosti. Potřebné množství inseminační dávky se pohybuje okolo 0,2 ml. Pohyblivých spermií pro zabřeznutí plemence je pak za potřeby 400×10^6 v jedné inseminační dávce (Macías et al. 2020).

3.6.2.3 Transcervikální nitroděložní inseminace

Inseminační dávka se při transcervikální nitroděložní inseminaci, bez použití laparoskopie, aplikuje za děložní krček, tedy až na okraj dělohy. Tento způsob vyžaduje použití poševního zrcadla a šikovnosti technika, který intrauterinní inseminaci provádí (ZOOTEKNIKA.CZ. 2009). Tento způsob je však možné využít zejména u koz. U ovcí je tato metoda komplikovaná, kvůli nemožnosti projít děložním krčkem, který je u ovcí přirozeně klikatější, a tedy hůře proniknutelný (Lv et al. 2019). Velkým rizikem je poranění děložního krčku při samotném úkonu, proto se dnes v praxi využívá spíše jiných způsobů umělé inseminace (Carneiro et al. 2019). Při této metodě je zapotřebí inseminačních dávek o objemu 0,1 až 0,5 ml a počet pohyblivých spermií by měl být alespoň 60×10^6 (Macías et al. 2020).

3.6.2.4 Intrauterinní laparoskopická inseminace

Při laparoskopické inseminaci dochází k řekonání anatomických bariér reprodukčního ústrojí samice a k hlubokému intrauterinnímu uložení inseminační dávky. Úspěšnost laparoskopické inseminace je závislá hlavně na správné synchronizaci říje a na dokonalé znalosti fyziologie reprodukční soustavy samice. Při samotném úkonu může dojít k řadě komplikací, zejména kvůli nedostatečné přípravě samice, špatnému provedení, nebo kvůli nedostatečnému vybavení (Sathe 2018). Laparoskopickou inseminaci je doporučeno provádět pod mírnou sedací. Po dokončení úkonu je žádoucí, aby ošetřená plemence sama odešla a byla schopna okamžitě přijímat potravu. Při zákroku může dojít k ruptuře břišních orgánů, vzniku subkutánního emfyzému, peritonitidy, hematomu, intraabdominální adhezi nebo krvácení dělohy (Sathe 2018).

Při intrauterinní laparoskopické inseminaci dochází k uložení spermatu přes stěnu břišní, přímo do děložních rohů. Tento zákrok je minimálně invazivní a trvá asi jen 2-5 minut. Sathe (2018) odhaduje délku úkonu na 10-15 minut i s přípravou. Míra zabřeznutí se při této metodě pohybuje od 50 do 80 % (Schoenian 2019). Průměrná inseminační dávka o objemu 0,05-0,10 ml, potřebná k oplození jedné samice laparoskopickou metodou, obsahuje 20-25 milionů aktivních spermií. To je nízký počet ve srovnání s intravaginální a transcervikální inseminací

(Cseh et al. 2012, Macías et al. 2020). Z jednoho odebraného a zmrazeného ejakulátu tak může být zapuštěno 50 až 100 plemenic (Sathe 2018). Důležitým faktorem pro úspěšnost této metody je výběr vhodných jedinců. Lepších výsledků se dosahuje u mladých ovcí, optimální tělesné kondice (Kenyon et al. 2004; Kleemann & Walker 2005). U zvířat, která byla inseminována při hodnotách BCS pod 2 a naopak nad 4, bylo pozorováno snížení míry březosti, díky menší životaschopnosti embryí. Doporučená tělesná kondice, ve které by se měli udržovat bahnice během období reprodukce, je 2,5-3 BCS (Abdel-Mageed 2009). Na zabřeznutí má vliv také stres, kterému vystavujeme samice před plánovanou inseminací. Podle McCappin & Murray (2011) klesla míra těhotenství u bahnic, které byly vystaveny 4 až 6 týdnů před inseminací stresu, vyvolanému manipulací se zvířaty a úkony spojenými s ošetřováním ovcí.

Tento způsob inseminace je preferován zejména při použití zmrazeného spermatu, jelikož je plodnost kryokonzervovaných spermií cervikální metodou inseminace extrémně nízká (Salamon & Maxwell 1995). Kromě toho intrauterinní inseminace vykazuje vyšší zabřezávání než inseminace intracervikální také u spermatu čerstvého (Santos-Neto et al. 2015). McCappin a Murray (2011) uvádí, že 70 % bahnic zabřezlo po inseminaci zmrazeným spermatem, zatím co po použití čerstvého spermatu došlo k březosti u 58 % testovaných ovcí.

Z těchto důvodů je intrauterinní inseminace, prováděná pomocí laparoskopie, používána ve velkém množství ve spoustě zemí světa, přestože tato metoda vyžaduje veterinární odbornost a je náročnější co se týče práce a vybavení, které je potřeba k tomuto úkonu. Tato metoda je také oproti ostatním způsobům inseminace cenově náročnější (Batista et al. 2009). I když bylo navrženo několik dalších alternativ, které by nahradily použití laparoskopie, tato technika je stále výchozí metodou pro dosažení vyšší míry zabřezávání u ovcí (Casali et al. 2017).

3.7 Ověření kvality inseminačních dávek pomocí přístrojových metod

3.7.1 CASA (computer assisted sperm analysis)

3.7.1.1 Princip fungování

Jedná se o automatický počítačový systém, který se skládá z kamery s vysokým rozlišením, mikroskopu s fázovým kontrastem, softwaru a hardwaru (Talarczyk-Desole et al. 2017). Základním principem je získávání a analýza pořízených snímků, které zachycují pohyb hlavičky spermií. Snímky jsou následně převedeny do digitální podoby. Hlavním přínosem CASA je pořizování informací souvisejících s kinematickými parametry spermatu. Systém dokáže hodnotit následující parametry: celkovou pohyblivost, progresivní pohyblivost, průměrnou rychlost dráhy, přímou rychlost, křivočarou rychlost, amplitudu laterálního posunu hlavičky, frekvenci křížení a linearitu (Bompart et al. 2018). Systém je také schopný získat přesné informace o koncentraci, životaschopnosti a morfologii spermií.

Souřadnice spermií jsou určeny podle jádra hlavičky, anebo podle nejjasnějšího bodu, který se nachází na hlavičce spermie. Následně začne program vyhledávat souvislý obraz oblasti, ve které se hlavička spermie nachází. Touto oblastí je kruh s určeným poloměrem, což je maximální vzdálenost, kde se může spermie v určitém čase pohybovat. Poté dochází k výpočtu souřadnic trajektorie pohybu každé spermie. Je rekonstruován pohyb těchto spermií a následně jsou vypočteny jejich dynamické hodnoty (Lu et al. 2014).

3.7.1.2 Hodnocené parametry

Parametry, které jsou získávány pomocí CASA, a které jsou zkoumány v této práci jsou následující. Motilita spermií (MOT) je celková pohyblivost spermií. Progresivní pohyblivost (PROG) ukazuje pohyb spermie vpřed za hlavičkou. Křivočará rychlost (VCL) je průměrná rychlost dráhy hlavičky spermie podél její skutečné trajektorie. Přímočará rychlost (VSL) je průměrná rychlost dráhy měřená v přímce od začátku dráhy do jejího konce. Průměrná rychlost dráhy (VAP) je průměrná rychlost vyhlazené dráhy spermie. Rychlost průměrné dráhy (STR) je poměr mezi VSL a VAP. Linearita křivočaré dráhy (LIN) znázorňuje poměr mezi VSL a VCL (Bravo et al. 2011).

Correia et al. (2021) ve své práci uvádí, že je sperma považováno za nepohyblivé, pokud je křivočará rychlost pod 10 $\mu\text{m/s}$; pomalé, pokud je křivočará rychlost mezi 10 a 45 $\mu\text{m/s}$; středně rychlé, pokud je mezi 45 a 75 $\mu\text{m/s}$; a rychlé, pokud je nad 75 $\mu\text{m/s}$. Jako progresivně pohyblivé spermie, jsou uváděny ty, které vykazují přímost pohybu nad 80 %. Inanc et al. (2019) hodnotil motilitu beraního spermatu při teplotě 37 °C a při 10násobném zvětšení. Motilitu hodnotil jako rychlou (> 120 $\mu\text{m/s}$), střední (> 90 $\mu\text{m/s}$), pomalou (> 60 $\mu\text{m/s}$) nebo statickou.

Je důležité zdůraznit, že existuje několik systémů počítačové analýzy CASA, a jejich výsledky mezi sebou obvykle nelze hodnotit. Rychlost a počet snímků získaných za sekundu, mohou významně ovlivnit výsledky měření. Čím početnější je lokalizace hlavy spermií a čím nižší je interval mezi snímky, tím lepší je přesnost rekonstrukce trajektorie pohybu spermií. Použitá koncentrace spermií je dalším faktorem, ovlivňujícím výsledky CASA. Proto je důležité vzorky spermatu ředit, jelikož např. při koncentraci $100 \times 10^6/\text{ml}$, bylo zjištěno, že v některých případech nebyla CASA schopna provést měření, kvůli vysokému překryvu spermií. Vzorky spermatu pro analýzu je dobré ředit na koncentraci $20 \times 10^6/\text{ml}$. K ředění vzorků pro analýzu CASA lze využít různá média, jako je např. izotonický roztok NaCl, fosfátový pufr (PBS), nebo Bioexcell (Contri et al. 2010).

3.7.2 Průtoková cytometrie

Přesnou a objektivní metodou pro hodnocení spermatu je hodnocení pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda umožňuje rychlé a zcela automatizované hodnocení velkého počtu spermií. Výhodou je schopnost oddělit cizorodé složky spermatu, které by mohli ovlivnit výsledek měření (Brito et al. 2016). K účelům průtokové cytometrie jsou používány přístroje jako je CytoFLEX, Epics V, nebo NovoCyte.

Principem vyšetření je proudění spermií kolem zdroje laserového paprsku a jejich elektronická detekce pomocí rozptylu světla nebo fluorescence (Petrunina & Harrison 2010). Pro lepší analýzu bývá koncentrace spermií v hodnoceném vzorku upravena na hodnotu 2 až 5×10^6 spermií/ml. Vzorky jsou pak analyzovány pomocí softwaru průtokového cytometru (Pool et al. 2020). Výstupem ze softwaru je mnohorozměrný graf, do kterého jsou zanesena všechna jednotlivá měření. Buňky jsou podle zjištěné vlastnosti rozděleny do skupin, které vytvářejí jednotlivé populace s podobnými znaky.

Průtoková cytometrie je schopná analyzovat poměrně velké množství spermií za méně než 1 minutu (Christensen et al. 2004). Vlastnosti, které lze hodnotit, jsou celková životaschopnost, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomů, nebo

mitochondriální aktivita. Životaschopné spermie jsou definovány jako buňky s intaktní plazmatickou membránou, intaktním akrozomem a vysokou mitochondriální aktivitou (Savvulidi et al. 2021).

Životaschopnost spermií je hodnocena na základě integrity plazmatické membrány, kdy jsou buňky barveny přímo za pomoci barviva SYBR -14, které obarví pouze metabolicky aktivní látky. SYBR-14 způsobuje, že jádra živých spermií fluoreskují jasně zelenou barvou (Garner et al. 1994; Vašíček et al. 2022) Poškození plazmatické membrány buněk je detekováno pomocí propidium jodidu, nebo 7-AAD (7-amino-aktinomycin-D). Výhodou 7-AAD je, že dokáže zabránit vzájemnému přelínání mezi oranžovou a zelenou fluorescencí (Perticarari et al. 2007). K hodnocení porušení akrozomu spermií se nejčastěji používají lektiny, především pak PNA, PSA nebo LCA. Dalším důležitým ukazatelem kvality spermatu je mitochondriální aktivita. Tu měříme za pomoci mitochondriálního membránového potenciálu, s použitím rhodaminu 123, JC-1 nebo MitoTrackeru (Vašíček et al. 2022). Propidium jodid způsobuje obarvení jader neživotaschopných spermií červenou barvou. Pro hodnocení poškození akrozomů se využívá barvivo PNA lectin a pro hodnocení mitochondriální aktivity MTR DR (MitoTracker Deep Red).

K fluorescenci se využívají filtry jako je 515 nm filtr s dlouhým průchodem, 525 nm pásmový filtr pro detekci FITC-PNA nebo SYBR-14, 630 nm filtr s dlouhým průchodem pro detekci propidium jodidu (Purdy & Graham 2004; Purdy 2006).

4 Metodika

4.1 Výběr hodnocených faktorů majících vliv na kvalitu spermatu

Jelikož všichni plemeníci pocházeli z jednoho chovu, mohlo dojít k opomenutí vnějších faktorů, které by mohly mít vliv na kvalitu spermatu v průběhu procesu kryokonzervace. Stejně tak vliv plemene pro nás není rozhodujícím faktorem, neboť všichni plemeníci jsou jednoho plemene.

Z interní chovatelské evidence byly od každého plemeníka zaznamenány informace o krevní linii, věku, četnosti vrhu, genotypu a živé hmotnosti ve 100 dnech věku.

Byl nezávisle i souběžně sledován vliv faktorů na ukazatele spermatu před ekvilibrací, po ekvilibraci a po kryokonzervaci. Na základě průkaznosti byly vybrány vliv věku a vliv četnosti vrhu jako fixní faktory.

4.2 Odebírání plemeníci

Ejakulát byl odebírán od šumavských beranů, chovaných na farmě Michlova Hut'. Jedná se o malou obec, která je součástí města Vimperk v okrese Prachatice, v Jihočeském kraji. Místo chovu se nachází v nadmořské výšce 945 m n. m.

Chov má uzavřený obrat stáda, což znamená, že jsou plemeníci do chovu vybíráni z vlastních beránků, kteří však podléhají přísné selekci. Berani jsou chováni všichni společně ve skupinovém kotci v ovčíně, s trvalým venkovním výběhem. Výživa je zajištěna kvalitním senem předkládaným ad libitně po celý rok. Ke krmení se dále využívá senáž a jádro (oves). Do krmiva jsou přidávány minerální doplňky. Dále je plemeníkům k dispozici ad libitně solný liz a čerstvá nezávadná voda. Veškeré komponenty pro chov musí pocházet z ekologického zemědělství, jelikož chov funguje v ekologickém režimu.

Jedná se o zdravé jedince bez známek onemocnění, kteří jsou každoročně podrobeni zdravotním testům.

Reprodukce je v chovu obstarávána přirozeným připouštěním tzv z ruky, kdy se ovce v období říje přivede k vybranému plemeníkovi, který následně zajistí její zapuštění.

4.3 Odběr ejakulátu a zpracování

Odběry ejakulátu plemeníků byly uskutečněny 14.6.2022. K odběru ejakulátu byla využita metoda odběru do umělé vagíny (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo). Teplota vody použitá v mezistěně umělé vagíny byla vytemperována na teplotu 38°C. Pro sběr ejakulátu byl využit jednorázový sběrač (latexový prezervativ), jehož vnitřní část byla vymazána vazelínou, která sloužila jako lubrikační látka.

Odebírání plemeníka byl přiveden k samici, která sloužila jako tzv atrapa. Následně došlo k nastimulování samce, za přítomnosti ovce. Po naskočení plemeníka na samici došlo k odklonění penisu samce do předem připravené umělé vagíny. Po ukončení ejakulace, která trvá pár sekund, došlo k optické kontrole odebraného množství ejakulátu a k dezinfekci předkožky berana. Tento postup byl aplikován u všech plemeníků.

Ihned po odběru byl na místě ejakulát naředěn v poměru 1:1 (ejakulát : ředidlo) ředidlem OptiXcell, od společnosti IMV Technologies, L' Aigle, Francie. Ředidlo bylo vytemperováno na teplotu 38°C. Po naředění byly vzorky spermatu zchlazeny na teplotu 7 °C a při této teplotě byly převezeny v přenosném automatickém chladicím boxu do laboratoře.

4.4 Vyšetření spermatu před ekvilibrací

V laboratoři proběhlo vyšetření spermatu před ekvilibrací za pomoci mobilní počítačově asistované analýzy spermií (mCASA – model iSperm, Aidmics Biotechnology Co., LTD, Taipei City, Taiwan). Práce se spermatem a samotné vyšetření probíhalo při pokojové teplotě, na vyhřevné desce, nastavené na teplotu 38 °C.

Jako první byla provedena analýza vzorků na kalibrovaném spektrofotometru (Genesys 10S Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), abychom zjistili koncentraci spermií ve spermatu. V případě potřeby došlo k naředění spermatu na požadovanou finální koncentraci cca 200 mil. spermií/ml spermatu.

Pro správné vyhodnocení mCASA musel být vzorek naředěn příslušným ředidlem na koncentraci 20 mil. spermií/ml. Následně bylo přeneseno množství vzorku o objemu 7 µl na jednorázovou analyzační komůrku, která byla upevněna na čočku přístroje. Nakonec došlo k hodnocení vzorku spermatu za pomoci softwaru mCASA přednastaveného pro analýzu beraního spermatu.

4.5 Příprava vzorků pro kryokonzervaci a ekvilibrace

Naředěný ejakulát v poměru 1:3 (ejakulát : optiXcell) byl plněn do pejet o objemu 0,25 ml, které byly následně uzavřeny polyvinyl alkoholem – PVA (IMV Technologies, L' Aigle, Francie). Následně byly všechny pejety přeneseny na nerezový stojan, se kterým byly vloženy do chladničky nastavené na teplotu 4 °C. Při této teplotě došlo k ekvilibraci, která probíhala přes noc (cca. 12 hodin).

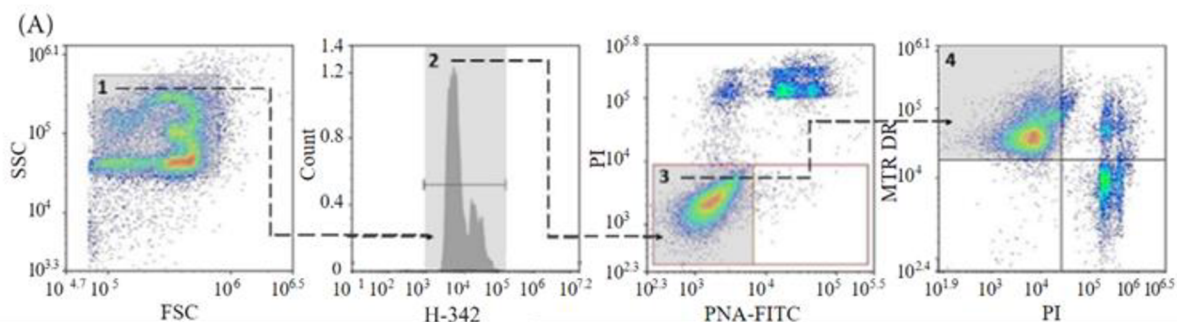
4.6 Vyšetření spermatu po ekvilibraci

Po ekvilibraci bylo sperma hodnoceno za pomoci mCASA (model iSperm, Aidmics Biotechnology Co., LTD, Taipei City, Taiwan) a průtokové cytometrie. Vyšetření spermatu pomocí mCASA probíhalo totožným způsobem, který je popsán v kapitole 4.3.

Hodnocení spermatu za pomoci průtokové cytometrie probíhalo na přístroji NovoCyte 3000, (Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, California, USA), vybaveném lasery emitujícími fialové (405 nm), modré (488 nm) a červené (640 nm) záření. Vzorek spermatu byl obarven pomocí fluorescenčních barviv Hoechst-33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 10 µg/ mL, PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 8 µg/ mL, PNA-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) o finální koncentraci 0,5 µg/ mL a fluorescenčním barvivem MitoTracker Deep Red (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 80 nM. Pro sběr a anlyzu dat byl použit software NovoExpress 1.3.0 (Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA). Pro eliminaci signálu nespermatických částic bylo využito vlastností barviva Hoechst-33342 a parametrů SF (forward scatter) a SSC (side scatter).

Za pomoci průtokového cytometru byly sledovány následující vlastnosti spermatu. Celková životaschopnost buněk za pomoci Hoechst-33342+/PI-/PNA-FITC-/MitoTracker Deep Red+, procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou díky barvivu propidium jodid, buňky s poškozeným akrozomem pomocí barviva PNA-FITC a mitochondriální aktivita buněk za pomoci MitoTracker Deep Red.

Graf 1 Gatovací strategie průtokové cytometrie pro určení životaschopných spermií



Částice obsažené ve vzorku byly nejprve identifikovány pomocí bočního rozptylu SSC a předního rozptylu FSC. Pro určení obsahu DNA byly buňky identifikovány barvením Hoechst-33342 (H-342). Neporušenost plazmatické membrány byla u spermií hodnocena na základě intenzity signálu propidium jodidu (PI). PNA lektin (PNA-FITC) byl využit pro hodnocení celistvosti akrozomu. Spermie pozitivní i na Mito Tracker Deep Red (MTR DR) byly považovány za životaschopné (Savvulidi et al., 2021)

4.7 Mrazení vzorků

Mrazení pejet pro následné dlouhodobé uchování, probíhalo nad parami tekutého dusíku. K mrazení inseminačních dávek byl použit polystyrenový mobilní mrazící box od firmy Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA, USA. Stojan s pejetamy byl do mrazícího zařízení umístěn tak, aby se pejety nacházely 5 cm nad hladinou tekutého dusíku. Doba, kterou pejety strávily v této pozici, byla 10 minut. Následně došlo ke kompletnímu ponoření pejet pod hladinu tekutého dusíku a došlo tak k úplnému zmrazení inseminačních dávek, které se následně přendaly do goblet a uchovávaly v kontejneru s tekutým dusíkem.

4.8 Vyšetření spermatu po rozmrazení

Inseminační dávky byly uchovávány v tekutém dusíku po dobu minimálně 15dnů a následně byly vyndány o rozmrazeny. K rozmrazení byla použita technika vodní lázně, kdy se pejety ponořily do vody o teplotě 38 °C na dobu 1 minuty. Po rozmrazení dávek došlo k následné inkubaci v termostatu při teplotě 38 °C, po dobu 1 hodiny.

Následně došlo k vyšetření spermatu za pomoci mCASA a průtokového cytometru. Postupy vyšetření byly stejné jako u vyšetření před kryokonzervací. Postup vyšetření je popsán v kapitole 4.3 a 4.5.

5 Statistická analýza dat

Veškeré statistické analýzy byly provedeny za pomoci statistického programu SAS 9.4 (SAS/STAT, 2011). Statistické soubory dat z mCASA a průtokové cytometrie byly vyhodnoceny pomocí procedury GLM (generalized linear model).

Za tímto účelem byly berani rozděleni podle dvou kritérií, a to podle věku plemeníků a četnosti vrhu, ze kterých plemeníci pocházejí. Za účelem zjištění souvislosti mezi věkem plemeníka a kvalitou spermatu během fázi kryokonzervace, byly plemeníci rozděleni do čtyř skupin: 1,5 let, 2,5 let, 3,5 let a 4,5 let a více. Pro účel zjištění souvislosti mezi kvalitou spermatu a četností vrhu plemeníka, byly berani rozděleni do dvou skupin: 1 (jedináček) a 2 (2 mlád'ata ve vrhu).

Modelová rovnice pro jednotlivé ukazatele

$$Y_{ijk} = \mu + V\check{e}k_{-i} + \check{C}V_{-j} + b*\text{konc.} + e_{-ijk}$$

- Y_{ijk} = závisle proměnná mCASA a průtokové cytometrie (procento buněk vykazujících celkovou motilitu, procento buněk s progresivním pohybem, průměrná rychlost dráhy buněk, křivočará rychlost buněk, lineární rychlost buněk, procento buněk s lineárním pohybem, procento buněk s přímým pohybem; procento buněk s nepoškozenou plazmatickou membránou a akrozomem (oplozeníšopné buňky, procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou, procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a akrozomem, procento buněk s poškozeným akrozomem, procento buněk s mitochondriálním membránovým potenciálem)
- μ = obecná hodnota závisle proměnné
- $V\check{e}k_i$ = fixní efekt i-tého věku plemeníka ($i = 1,5$ roku, $n = 20$; $i = 2,5$ roku, $n = 36$; $i = 3,5$ roku, $n = 12$; $i = 4,5$ roku, $n = 16$)
- $\check{C}V_j$ = fixní efekt j-té četnosti vrhu ($j =$ plemeníci pocházející z jedináčků, $n = 32$; $j =$ plemeníci pocházející z dvojčat, $n = 52$)
- $b*\text{konc.}$ = lineární regrese na koncentraci spermií v inseminační dávce (rozmezí)
- e_{ijk} = zbytková chyba

Statistické rozdíly mezi jednotlivými hodnotami nejmenších čtverců (LSM) byly hodnoceny za pomoci Tukey – Kramerova testu, a to na hladině významnosti $P < 0,05$.

6 Výsledky

6.1 Výsledky CASA

6.1.1 Základní statistické údaje – CASA

V tabulce č. 3 jsou znázorněny základní statistické údaje z mCASA. Jedná se o hodnoty změřené před ekvilibrací, po ekvilibraci a po rozmrazení inseminačních dávek, tedy po kryokonzervaci. Ukazatelé, které nás zajímali pro vyhodnocení celkové kvality spermií za pomoci mCASA byli: celková motilita, progresivní pohyb, průměrná rychlost dráhy, křivočará rychlost, lineární rychlost, linearita a přímot. Tabulka uvádí pro jednotlivé ukazatele aritmetický průměr, směrodatnou odchylku, minimální hodnotu a maximální hodnotu.

Z výsledků je patrné, že během zpracování spermatu rapidně poklesla jeho kvalita, a tedy i oplozeníschopnost. Od čerstvého spermatu před ekvilibrací, se během procesu kryokonzervace až téměř 5krát snížila celková motilita a až skoro 6krát procento progresivního pohybu spermií.

Tabulka 3 Základní statistické charakteristiky – CASA

Varianta	Ukazatel	Četnost	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum
Před ekvilibrací	MOT	84	67,55	13,60	23,60	92,80
	PROG	84	45,79	13,29	10,11	78,29
	VAP	84	116,40	15,96	73,94	155,29
	VCL	84	147,27	14,85	95,42	177,07
	VSL	84	95,63	19,76	49,34	144,51
	LIN	84	77,84	7,60	51,65	95,42
	STR	84	63,33	10,70	35,54	91,81
Po ekvilibraci	MOT	84	40,43	17,14	2,56	76,56
	PROG	83	20,50	11,71	2,00	48,72
	VAP	84	94,69	13,34	61,46	152,81
	VCL	84	141,07	23,16	73,39	214,76
	VSL	84	64,45	13,21	37,39	125,86
	LIN	84	67,14	9,40	44,37	90,48
	STR	84	49,41	10,34	25,49	79,08
Po kryokonzervaci	MOT	84	14,03	11,08	0,00	41,52
	PROG	83	7,78	6,69	0,00	24,37
	VAP	84	83,03	27,06	0,00	146,48
	VCL	84	111,50	32,13	0,00	222,23
	VSL	84	64,37	27,80	37,39	125,86
	LIN	84	70,99	19,39	44,37	90,48
	STR	84	55,38	18,12	25,49	79,08

Zkratky: MOT (%) – motilita, PROG (%) – progresivní pohyb, VAP (µm/s) – průměrná rychlost dráhy, VCL (µm/s) – křivočará rychlost, VSL (µm/s) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímot

6.1.2 CASA před ekvilibrací

6.1.2.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval následující proměnlivost ukazatelů: MOT z 39,8 %, PROG z 42,1 %, VAP z 23,4 %, VCL z 4,1 %, VSL z 32,8 %, LIN z 38,3 % a STR z 44,9 %. Většina ukazatelů byla různou mírou statisticky průkazná ($P < 0,05$), až na ukazatel VCL ($P > 0,05$). V modelové rovnici nebyl statisticky prokázán vliv věku plemeníka na VCL. Dále nebyl statisticky prokázán vliv četnosti vrhu plemeníka na motilitu, VAP a VCL. Koncentrace spermií ve vzorku mohla mít vliv na zkreslení výsledků u motility ($P < 0,001$) a progresivity pohybu ($P < 0,05$).

Tabulka 4 Popis modelu – CASA před ekvilibrací

	R²	P-model	Věk	Četnost vrhu	b*konc.
MOT	0,398	****	****	n.s.	****
PROG	0,421	****	****	*	*
VAP	0,234	***	***	n.s.	n.s.
VCL	0,041	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VSL	0,328	****	****	*	n.s.
LIN	0,383	****	****	*	n.s.
STR	0,449	****	****	***	n.s.

Zkratky: R² – koeficient determinace, Věk – stáří plemeníka při odběru ejakulátu, Četnost vrhu – počet mládřat ve vrhu, ze kterého plemeník pochází, b*CONC – koncentrace spermií ve vzorku, MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímost

Míra významnosti: n.s. - not significant (nevýznamné) = ($P > 0,05$), * = ($P < 0,05$), ** = ($P < 0,01$), *** = ($P < 0,001$), **** = ($P < 0,0001$)

6.1.2.2 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu před ekvilibrací

Byly shledány statisticky významné rozdíly parametrů spermatu, v závislosti na věku plemeníků před ekvilibrací.

Jak je patrné z tabulky č. 5, nejvyšších hodnot celkové motility spermií před ekvilibrací vykazovali plemeníci ve věku 2,5 a 3,5 let, mezi kterými nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Ten byl prokázán s plemeníky ve věku 1,5 a 4,5 roku, kteří měli horší motilitu spermatu zhruba o 14 %.

Hodnota progresivního pohybu spermií byla přijatelná pro skupiny plemeníků ve věku 2,5, 3,5 a 4,5 let. Hodnoty těchto plemeníků se statisticky významně lišily s plemeníky 1,5 roku starými, u kterých bylo procento pro progresivní pohyb nejhorší.

Průměrná rychlost dráhy (VAP) byla nejlepší u spermií plemeníků starých 4,5 roku, i když se tato hodnota významně nelišila s hodnotou plemeníků starých 2,5 roku.

Statisticky nejlepší lineární rychlost spermií (VSL) byla prokázána u plemeníků ve věku 4,5 let. Tito plemeníci vykazovali nejvyšších hodnot také pro parametry linearity (LIN) a přímosti (STR). Naopak u plemeníků starých 1,5 a 3,5 roku byl patrný nejhorší výsledek pro tyto parametry, i když nebyl v některých případech podložen statistickou významností s jinými skupinami.

Tabulka 5 Vliv věku plemenika na parametry spermatu před ekvilibrací – CASA (LSM ± SEM)

Skupina	Věk (roky)	MOT (%)	PROG (%)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n=20)	1,5	58,48 ± 2,56 ^a	30,94 ± 2,45 ^a	104,82 ± 3,39 ^a	143,57 ± 3,53 ^a	80,28 ± 3,93 ^a	71,28 ± 1,45 ^a	54,32 ± 1,93 ^a
2 (n=36)	2,5	74,07 ± 1,91 ^b	51,71 ± 1,83 ^b	117,63 ± 2,53 ^{bc}	148,08 ± 2,64 ^a	96,99 ± 2,94 ^b	78,34 ± 1,08 ^b	63,80 ± 1,44 ^b
3 (n=12)	3,5	71,52 ± 3,17 ^b	43,10 ± 3,04 ^b	109,77 ± 4,20 ^{ab}	152,20 ± 4,37 ^a	83,66 ± 4,87 ^{ab}	73,54 ± 1,80 ^{ab}	54,52 ± 2,39 ^a
4 (n=16)	4,5	59,28 ± 2,88 ^a	49,22 ± 2,76 ^b	128,91 ± 3,82 ^c	147,61 ± 3,98 ^a	114,80 ± 4,43 ^c	86,00 ± 1,63 ^c	75,63 ± 2,1 ^c

Zkratky: MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímota
a–c = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

6.1.2.3 Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu před ekvilibrací

Na parametr motility, VAP a VCL nebyl prokázán vliv faktoru četnosti vrhu. Progresivní pohyb spermií byl statisticky prokazatelně lepší u plemeníků, kteří pochází z dvojčat, s rozdílem 6,12 %. Plemeníci z vícečetných vrhů vykazovali lepších hodnot také pro parametry VSL s rozdílem 9,52 µm/s, LIN s rozdílem 3,46 % a STR s rozdílem 7,19 %.

Tabulka 6 Vliv četnosti vrhu plemenika na parametry spermatu před ekvilibrací – CASA (LSM ± SEM)

Četnost vrhu (ks)	MOT (%)	PROG (%)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n=32)	64,28 ± 2,05 ^a	40,68 ± 1,96 ^a	111,92 ± 2,71 ^a	148,84 ± 2,82 ^a	89,17 ± 3,14 ^a	75,56 ± 1,16 ^a	58,47 ± 1,54 ^a
2 (n=52)	67,40 ± 1,70 ^a	46,80 ± 1,63 ^b	118,64 ± 2,25 ^a	146,89 ± 2,35 ^a	98,69 ± 2,61 ^b	79,02 ± 0,96 ^b	65,66 ± 1,28 ^b

Zkratky: MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímota
a, b = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

6.1.3 CASA po ekvilibraci

6.1.3.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval následující proměnlivost ukazatelů: MOT z 5,8 %, PROG z 11,1 %, VAP z 14,5 %, VCL z 15,3 %, VSL z 11,2 %, LIN z 13,8 % a STR z 26,2 %. Různá míra průkaznosti modelu byla dosažena u parametrů VAP, VCL, LIN a STR. V případě MOT, PROG a VSL nebyl model průkazný. V modelové rovnici byl statisticky prokázán vliv věku plemeníka na VCL, VSL, LIN a STR. Naopak nebyl prokázán vliv věku plemeníka na MOT, PROG a VAP. Vliv četnosti vrhu nebyl statisticky prokázán pro žádný ukazatel spermatu. Vliv koncentrace spermií ve vzorku byl prokázán pouze pro ukazatel VAP.

Tabulka 7 Popis modelu – CASA po ekvilibraci

	R²	P-model	Věk	Četnost vrhu	b*konc.
MOT	0,058	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PROG	0,111	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VAP	0,145	*	n.s.	n.s.	*
VCL	0,153	*	*	n.s.	n.s.
VSL	0,112	n.s.	*	n.s.	n.s.
LIN	0,138	*	*	n.s.	n.s.
STR	0,262	***	****	n.s.	n.s.

Zkratky: R² – koeficient determinace, Věk – stáří plemeníka při odběru ejakulátu, Četnost vrhu – počet mlád'at ve vrhu, ze kterého plemeník pochází, b*CONC – koncentrace spermií ve vzorku, MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímost

Míra významnosti: n.s. - not significant (nevýznamné) = (P >0,05), * = (P <0,05), ** = (P <0,01), *** = (P <0,001), **** = (P <0,0001)

6.1.3.2 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po ekvilibraci

Hodnocení parametrů za pomoci mCASA, v souvislosti s vlivem věku plemeníka na hodnocené parametry, přineslo následující výsledky, které jsou zaznamenány níže, v tabulce č. 8.

Na motilitu spermatu, PROG a VAP neměl faktor věku plemeníka prokazatelný vliv.

Nejvyšší hodnotu křivočaré rychlosti spermií měli plemeníci staří 3,5 roku, i když se významně nelišili s plemeníky ve věku 4,5 a 1,5 roku.

Procento linearity (LIN) dosáhlo podobných výsledků u všech skupin. Pouze mezi skupinami plemeníků ve věku 1,5 a 2,5 let, byl sledován statistický rozdíl ve prospěch starších plemeníků (rozdíl 7,54 %). Tato věková kategorie plemeníků pak dosahovala nejlepších výsledků také pro ukazatel přímosti (STR).

Tabulka 8 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po ekvilibraci – CASA (LSM ± SEM)

Skupina	Věk (roky)	MOT (%)	PROG (%)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n=20)	1,5	40,09 ± 4,04 ^a	17,05 ± 2,68 ^a	89,57 ± 2,99 ^a	142,75 ± 5,17 ^{ab}	57,46 ± 3,02 ^a	63,35 ± 2,12 ^a	43,70 ± 2,28 ^a
2 (n=36)	2,5	42,76 ± 3,02 ^a	24,52 ± 2,02 ^a	94,66 ± 2,24 ^{ab}	133,74 ± 3,86 ^a	67,84 ± 2,26 ^b	70,89 ± 1,58 ^b	55,53 ± 1,70 ^b
3 (n=12)	3,5	35,40 ± 5,00 ^a	15,89 ± 3,32 ^a	102,21 ± 3,71 ^b	158,93 ± 6,41 ^b	66,35 ± 3,74 ^{ab}	64,47 ± 2,63 ^{ab}	44,77 ± 3,83 ^a
4 (n=16)	4,5	41,38 ± 4,55 ^a	19,95 ± 3,02 ^a	93,49 ± 3,37 ^{ab}	143,71 ± 5,83 ^{ab}	62,55 ± 3,40 ^{ab}	65,04 ± 2,39 ^{ab}	45,04 ± 2,57 ^a

Zkratky: MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímost
a, b = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P <0,05)

6.1.3.3 Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po ekvilibraci

Nebyl prokázán statisticky významný vliv četnosti vrhu plemeníka na parametry spermatu získané za pomoci mCASA po ekvilibraci.

Tabulka 9 Vliv četnosti vrhu plemeníka na parametry spermatu po ekvilibraci – CASA (LSM ± SEM)

Četnost vrhu (ks)	MOT (%)	PROG (%)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n=32)	41,51 ± 3,23 ^a	19,77 ± 2,14 ^a	93,34 ± 2,39 ^a	146,08 ± 4,13 ^a	62,28 ± 2,41 ^a	65,60 ± 1,69 ^a	46,29 ± 1,82 ^a
2 (n=52)	38,30 ± 2,68 ^a	18,94 ± 1,79 ^a	96,62 ± 1,99 ^a	143,49 ± 3,44 ^a	64,82 ± 2,01 ^a	66,27 ± 1,41 ^a	48,23 ± 1,52 ^a

Zkratky: MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímost
a, b = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P <0,05)

6.1.4 CASA po kryokonzervaci

6.1.4.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval následující proměnlivost ukazatelů: MOT z 35,2 %, PROG z 17,7 %, VAP z 18,7 %, VCL z 17,3 %, VSL z 24,5 %, LIN z 14,7 % a STR z 14,9 %. Průkaznost modelu byla různou mírou dosažena u všech ukazatelů. V modelové rovnici byl prokázán vliv věku plemeníka a vliv četnosti vrhu plemeníka pouze na parametry motility a progresivního pohybu. Vliv koncentrace spermatu v inseminační dávce na výsledky měření byl prokázán pro parametry VAP, VCL, VSL, LIN a STR.

Tabulka 10 Popis modelu – CASA po kryokonzervaci

	R ²	P-model	Věk	Četnost vrhu	b*konc.
MOT	0,352	****	****	*	n.s.
PROG	0,177	**	*	*	n.s.
VAP	0,187	**	n.s.	n.s.	***
VCL	0,173	*	n.s.	n.s.	***
VSL	0,245	***	n.s.	n.s.	****
LIN	0,147	*	n.s.	n.s.	**
STR	0,149	*	n.s.	n.s.	**

Zkratky: R² – koeficient determinace, Věk – stáří plemeníka při odběru ejakulátu, Četnost vrhu – počet mládřat ve vrhu, ze kterého plemeník pochází, b*CONC – koncentrace spermií ve vzorku, MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímota

Míra významnosti: n.s. - not significant (nevýznamné) = (P >0,05), * = (P <0,05), ** = (P <0,01), *** = (P <0,001), **** = (P <0,0001)

6.1.4.2 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci

Vliv věku plemeníka, na hodnocené parametry spermatu po kryokonzervaci, byl prokázán pro ukazatele motility a progresivity pohybu.

Z tabulky č. 11 je patrné, že lepších výsledků motility spermatu dosahovali plemeníci staří 3,5 a 4,5 roku s tím, že nejlepší výsledky měli plemeníci ve věku 4,5 let (23,46 ± 2,44 %). Nejhorší motilitu spermatu pak měli plemeníci staří 2,5 let (7,27 ± 1,62 %), i když se hodnota nijak významně nelišila s hodnotou plemeníků ve věku 1,5 roku (12,98 ± 2,17 %).

Progresivita pohybu spermií byla opět nejlepší u plemeníků ve stáří 4,5 roku, tato hodnota se však statisticky významně nelišila s hodnotami plemeníků ve věku 1,5 a 3,5 roku. Nejhorší procento progresivity pohybu spermií měla skupina plemeníků ve věku 2,5 let, avšak tento výsledek se statisticky lišil pouze s plemeníky ve věku 4,5 let, s rozdílem 6,24 %.

Tabulka 11 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci – CASA (LSM ± SEM)

Skupina	Věk (roky)	MOT (%)	PROG (%)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n=20)	1,5	12,98 ± 2,17 ^{ac}	6,45 ± 1,48 ^{ab}	88,05 ± 5,92 ^a	112,05 ± 7,09 ^a	69,25 ± 5,86 ^a	76,28 ± 4,35 ^a	61,61 ± 4,06 ^a
2 (n=36)	2,5	7,27 ± 1,62 ^c	5,01 ± 1,10 ^a	78,26 ± 4,42 ^a	103,79 ± 5,30 ^a	62,52 ± 4,38 ^a	67,99 ± 3,25 ^a	54,02 ± 3,03 ^a
3 (n=12)	3,5	18,90 ± 2,68 ^{ab}	10,64 ± 1,92 ^{ab}	84,92 ± 7,34 ^a	112,31 ± 8,79 ^a	63,36 ± 7,26 ^a	74,70 ± 5,39 ^a	58,44 ± 5,03 ^a
4 (n=16)	4,5	23,46 ± 2,44 ^b	11,25 ± 1,66 ^b	84,57 ± 6,67 ^a	122,98 ± 7,99 ^a	61,51 ± 6,61 ^a	70,06 ± 4,90 ^a	51,12 ± 4,57 ^a

Zkratky: MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímota
a-c = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

6.1.4.3 Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po kryokonzervaci

Při vyšetření vzorku spermatu po kryokonzervaci byl zjištěn vliv četnosti vrhu plemeníka na motilitu (MOT) spermatu a progresivní pohyb (PROG) spermií. Tyto výsledky dokumentuje tabulka č.12.

Pro motilitu a progresivní pohyb byl prokázán statisticky významný rozdíl ve prospěch plemeníků pocházejících z vícečetných vrhů (dvojčata). Rozdíl pak činil u motility 5,5 % a u progresivního pohybu 3,77 %.

U ostatních parametrů nebyl prokázán statisticky významný vliv tohoto faktoru.

Tabulka 12 Vliv četnosti vrhu plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci – CASA (LSM ± SEM)

Četnost vrhu (ks)	MOT (%)	PROG (%)	VAP (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n=32)	12,90 ± 1,73 ^a	6,45 ± 1,21 ^a	82,78 ± 4,73 ^a	109,15 ± 5,67 ^a	62,79 ± 4,68 ^a	73,65 ± 3,47 ^a	58,50 ± 3,24 ^a
2 (n=52)	18,40 ± 1,44 ^b	10,22 ± 0,98 ^b	85,13 ± 3,93 ^a	116,42 ± 4,71 ^a	65,52 ± 3,90 ^a	70,86 ± 2,89 ^a	54,09 ± 2,70 ^a

Zkratky: MOT – motilita, PROG – progresivní pohyb, VAP – průměrná rychlost dráhy, VCL – křivočará rychlost, VSL – lineární rychlost, LIN – linearita, STR – přímota
a, b = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

6.2 Výsledky průtokové cytometrie

6.2.1 Základní statistické údaje – průtoková cytometrie

Tabulka č. 13 obsahuje základní statistické údaje, které se týkají parametrů spermatu, které byly hodnoceny za pomoci průtokové cytometrie. Hodnoceny a zaznamenávány byly parametry před ekvilibrací, po ekvilibraci a po kryokonzervaci spermatu. Z výsledků byla patrná tendence snižování kvality spermatu během procesu kryokonzervace. Průměrné procento životaschopných buněk kleslo během kryokonzervace více než 5krát, a naopak po kryokonzervaci vzrostlo procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a akrozomem.

Tabulka 13 Základní statistické charakteristiky – Průtoková cytometrie

Varianta	Ukazatel	Četnost	Aritmetický průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Po ekvilibrací	NPMA	60	57,81	12,04	34,00	81,62
	PPM	60	26,93	11,71	10,60	54,89
	PPMA	60	14,92	7,25	7,15	38,96
	PA	60	0,34	0,18	0,13	0,90
	MMP	60	91,73	9,46	62,36	99,18
Po kryokonzervaci	NPMA	40	10,82	6,67	0,62	25,55
	PPM	40	63,02	16,30	24,48	86,90
	PPMA	40	25,96	12,66	8,02	61,70
	PA	40	0,20	0,18	0,04	0,91
	MMP	40	90,96	8,34	59,91	98,68

Zkratky: NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom, PPM – poškození plazmatické membrány, PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu, PA – poškození akrozomu, MMP – mitochondriální membránový potenciál (mitochondriální aktivita)

6.2.2 Průtoková cytometrie po ekvilibraci

6.2.2.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval následující proměnlivost ukazatelů: NPMA z 30,4 %, PPM z 40,4 %, PPMA z 32,9 %, PA z 33,6 % a MMP z 41,2 %. Průkaznost modelu byla potvrzena pro všechny ukazatele. V modelové rovnici nebyl statisticky prokázán vliv věku pouze na ukazatel PA. Vliv četnosti vrhu nebyl prokázán pro žádný z uvedených parametrů, hodnocených průtokovou cytometrií po ekvilibraci. Vliv koncentrace spermií v inseminační dávce byl prokázán u ukazatelů PPM, PPMA, PA a MMP.

Tabulka 14 Popis modelu – průtoková cytometrie po ekvilibraci

	R ²	P-model	Věk	Četnost vrhu	b*konc.
NPMA	0,304	**	**	n.s.	n.s.
PPM	0,404	****	*	n.s.	****
PPMA	0,329	***	*	n.s.	***
PA	0,336	***	n.s.	n.s.	***
MMP	0,412	****	*	n.s.	****

Zkratky: R² – koeficient determinace, Věk – stáří pleménika při odběru ejakulátu, Četnost vrhu – počet mládřat ve vrhu, ze kterého pleménik pochází, b*konc. – koncentrace spermií ve vzorku, NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom, PPM – poškození plazmatické membrány, PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu, PA – poškození akrozomu, MMP – mitochondriální membránový potenciál (mitochondriální aktivita)

Míra významnosti: n.s. - not significant (nevýznamné) = (P >0,05), * = (P <0,05), ** = (P <0,01), *** = (P <0,001), **** = (P <0,0001)

6.2.2.2 Vliv věku pleménika na parametry spermatu po ekvilibraci

Vliv věku pleménika na ukazatele kvality spermatu po ekvilibraci, byl za pomoci průtokové cytometrie zjištěn u ukazatele NPMA, PPM, PPMA a MMP. Dále byly shledány významné rozdíly mezi některými věkovými skupinami pleméniků, které jsou zaznamenány v tabulce č. 15.

Buňky s nepoškozenou plazmatickou membránou a akrozomem byly brány jako životaschopné spermie. Procento těchto buněk bylo statisticky významně vyšší u pleméniků ve věku 3,5 a 4,5 let.

Co se týče poškození plazmatické membrány, nebyl zaznamenán významný vliv mezi věkovými kategoriemi.

Procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a akrozomem bylo nejnižší u pleméniků 4,5 roku starých (11,00 ± 1,90 %). Hodnota pro tento ukazatel se významně lišila jen s hodnotou pleméniků ve věku 1,5 roku (18,51 ± 1,69 %), kteří měli nejvyšší procento spermií s PPMA.

U mitochondriálního membránového potenciálu nedošlo k průkaznému rozdílu mezi jednotlivými skupinami, avšak nejvyšší hodnota byla zaznamenána u skupiny pleméniků ve věku 3,5 let (97,85 ± 2,55 %).

Tabulka 15 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po ekvilibraci – Průt. cytometrie (LSM ± SEM)

Skupina	Věk (roky)	NPMA (%)	PPM (%)	PPMA (%)	PA (%)	MMP (%)
1 (n=15)	1,5	48,49 ± 2,87 ^a	32,67 ± 2,58 ^a	18,51 ± 1,69 ^a	0,33 ± 0,04 ^a	90,39 ± 2,07 ^a
2 (n=27)	2,5	56,97 ± 2,21 ^a	28,39 ± 1,99 ^a	14,29 ± 1,30 ^{ab}	0,35 ± 0,03 ^a	90,02 ± 1,59 ^a
3 (n=9)	3,5	61,17 ± 3,54 ^b	22,67 ± 3,18 ^a	15,74 ± 2,09 ^{ab}	0,42 ± 0,05 ^a	97,85 ± 2,55 ^a
4 (n=12)	4,5	66,63 ± 3,21 ^b	22,11 ± 2,89 ^a	11,00 ± 1,90 ^b	0,26 ± 0,05 ^a	94,28 ± 2,32 ^a

Zkratky: NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom, PPM – poškození plazmatické membrány, PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu, PA – poškození akrozomu, MMP – mitochondriální membránový potenciál (mitochondriální aktivita)

a, b = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

6.2.2.3 Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po ekvilibraci

Jak je patrné z tabulky č. 16, vliv četnosti vrhu, ze kterého plemeník pochází, neměl významný vliv na parametry spermatu, získané za pomoci průtokové cytometrie po ekvilibraci.

Tabulka 16 Vliv četnosti vrhu plemeníka na parametry spermatu po ekvilibraci – Průt. cytometrie (LSM ± SEM)

Četnost vrhu (ks)	NPMA (%)	PPM (%)	PPMA (%)	PA (%)	MMP (%)
1 (n=24)	56,35 ± 2,30 ^a	28,53 ± 2,07 ^a	14,82 ± 1,36 ^a	0,30 ± 0,03 ^a	95,20 ± 1,66 ^a
2 (n=39)	60,29 ± 1,94 ^a	24,39 ± 1,75 ^a	14,94 ± 1,15 ^a	0,38 ± 0,03 ^a	91,07 ± 1,40 ^a

Zkratky: NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom, PPM – poškození plazmatické membrány, PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu, PA – poškození akrozomu, MMP – mitochondriální membránový potenciál (mitochondriální aktivita)

a, b = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

6.2.3 Průtoková cytometrie po kryokonzervaci

6.2.3.1 Popis modelu

Použitý model vysvětloval následující proměnlivost ukazatelů: NPMA z 48,6 %, PPM z 62,4 %, PPMA z 58,4 %, PA z 36,3 % a MMP z 54,1 %. Různou mírou byla potvrzena průkaznost modelu pro všechny ukazatele. V modelové rovnici byl prokázán vliv věku plemeníka na všechny ukazatele kvality spermatu získané průtokovou cytometrií po kryokonzervaci. Vliv četnosti vrhu byl prokázán pouze pro ukazatele NPMA a MMP. Koncentrace spermií v inseminační dávce mohla mít určitý vliv na ukazatele PPM a PPMA.

Tabulka 17 Popis modelu – průtoková cytometrie po kryokonzervaci

	R ²	P-model	Věk	Četnost vrhu	b*konc.
NPMA	0,486	***	***	*	n.s.
PPM	0,624	****	***	n.s.	***
PPMA	0,584	****	***	n.s.	***
PA	0,363	**	**	n.s.	n.s.
MMP	0,541	****	****	*	n.s.

Zkratky: R² – koeficient determinace, Věk – stáří plemeníka při odběru ejakulátu, Četnost vrhu – počet mládřat ve vrhu, ze kterého plemeník pochází, b*konc. – koncentrace spermií ve vzorku, NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom, PPM – poškození plazmatické membrány, PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu, PA – poškození akrozomu, MMP – mitochondriální membránový potenciál (mitochondriální aktivita)

Míra významnosti: n.s. - not significant (nevýznamné) = (P > 0,05), * = (P < 0,05), ** = (P < 0,01), *** = (P < 0,001), **** = (P < 0,0001)

6.2.3.2 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci

Došlo k prokázání statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými věkovými skupinami, ve vztahu ke kvalitativním parametrům spermatu.

Jak je vidět v tabulce č. 18, u skupin plemeníků ve věku 3,5 a 4,5 let byl prokázán vyšší výskyt buněk s neporušenou plazmatickou membránou. Nejvyšší hodnoty pak dosahovali plemeníci ve stáří 4,5 let (16,81 ± 1,92 %).

Poškození plazmatické membrány bylo významně nejvyšší u plemeníků ve věku 2,5 let (74,52 ± 2,76 %). Hodnoty ostatních skupin se pro tento ukazatel významně nelišily. Nejnižší hodnota byla bez statistické významnosti zaznamenána u beranů starých 4,5 roku (50,96 ± 4,01 %). Rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou byl 23,56 %.

Procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a akrozomem bylo nejnižší u beranů starých 2,5 roku (17,64 ± 2,25 %), což se významně nelišilo s hodnotou plemeníků starých 3,5 roku. Vyšší hodnotu PPMA měli plemeníci ve věku 1,5 a 4,5 let. Rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou byl 15,99 %.

Nejvyšší poškození akrozomu spermií měli plemeníci staří 3,5 roku (0,34 ± 0,06 %). Významný rozdíl byl prokázán se skupinami beranů ve věku 1,5 a 3,5 let, kteří měli obecně nižší procento buněk s poškozeným akrozomem.

Statisticky prokazatelně nejnižší mitochondriální membránový potenciál, u spermií po rozmrazení, měli plemeníci ve věku 2,5 let. Rozdíl mezi nejnižším a nejvyšším procentem (1,5 roku staří) byl 13,53 %.

Tabulka 18 Vliv věku plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci – Průt. cytometrie (LSM ± SEM)

Skupina	Věk (roky)	NPMA (%)	PPM (%)	PPMA (%)	PA (%)	MMP (%)
1 (n=10)	1,5	6,71 ± 1,71 ^a	59,57 ± 3,58 ^a	33,63 ± 2,92 ^a	0,10 ± 0,05 ^a	98,33 ± 2,02 ^a
2 (n=18)	2,5	7,70 ± 1,32 ^a	74,52 ± 2,76 ^b	17,64 ± 2,25 ^b	0,14 ± 0,04 ^a	84,80 ± 1,56 ^b
3 (n=6)	3,5	14,71 ± 2,11 ^b	58,06 ± 4,42 ^a	26,89 ± 3,61 ^{ab}	0,34 ± 0,06 ^b	93,78 ± 2,50 ^a
4 (n=8)	4,5	16,81 ± 1,92 ^b	50,96 ± 4,01 ^a	31,93 ± 3,28 ^a	0,29 ± 0,06 ^{ab}	94,28 ± 2,27 ^a

Zkratky: NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom, PPM – poškození plazmatické membrány, PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu, PA – poškození akrozomu, MMP – mitochondriální membránový potenciál (mitochondriální aktivita)

a-c = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

6.2.3.3 Vliv četnosti vrhu na parametry spermatu po kryokonzervaci

Vliv četnosti vrhu byl prokázán pouze pro ukazatele NPMA a MMP.

Procento buněk s nepoškozenou plazmatickou membránou a akrozomem bylo prokazatelně vyšší u plemeníků pocházejících z dvojčat (vyšší o 4,98 %).

Procento mitochondriálního membránového potenciálu bylo statisticky významně vyšší u plemeníků, kteří nepocházeli z vícečetných vrhů (jedináčci). Rozdíl mezi skupinami byl 4,69 %.

Tabulka 19 Vliv četnosti vrhu plemeníka na parametry spermatu po kryokonzervaci – Průt. cytometrie (LSM ± SEM)

Četnost vrhu (ks)	NPMA (%)	PPM (%)	PPMA (%)	PA (%)	MMP (%)
1 (n=16)	8,99 ± 1,38 ^a	63,71 ± 2,88 ^a	27,12 ± 2,35 ^a	0,18 ± 0,04 ^a	95,14 ± 1,63 ^a
2 (n=26)	13,97 ± 1,16 ^b	57,85 ± 2,43 ^a	27,93 ± 1,98 ^a	0,25 ± 0,03 ^a	90,45 ± 1,37 ^b

Zkratky: NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom, PPM – poškození plazmatické membrány, PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu, PA – poškození akrozomu, MMP – mitochondriální membránový potenciál (mitochondriální aktivita)

a, b = rozdílná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky významné rozdíly (P < 0,05)

7 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv na kvalitu spermatu beranů během různých fází kryokonzervace mají vnitřní faktory věku plemeníka a četnosti jeho vrhu, ze kterého pochází. Podle těchto faktorů by bylo možné vybírat plemeníky, kteří jsou nejvíce vhodní pro proces kryokonzervace spermatu. Dále byla sledována změna kvalitativních znaků spermatu během fází kryokonzervace (před ekvilibrací, po ekvilibraci a po rozmrazení).

Na kvalitu spermatu má vliv řada vnějších a vnitřních faktorů. Například Palacin-Martinez et al. (2022) uvádí vliv frekvence odběru na kvalitu spermatu. V jejich práci potvrzují vztah mezi vyšší frekvencí odběru spermatu a nižší kvalitou spermatu po kryokonzervaci. Vozaf et al. (2022) zas ve své práci hodnotí vliv plemene na kvalitu spermatu a doporučují brát v úvahu vliv plemene berana při kryokonzervaci, jelikož tento efekt může mít vliv na kvalitu akrozomu spermií. V naší práci jsme mohli vliv plemene na kvalitu spermatu opomenout, jelikož všichni použítí plemeníci byly plemene šumavská ovce. Proto byly pro naši práci vybrány právě vlivy věku a četnosti vrhu na kvalitu spermatu, protože to jsou faktory, které nejsou pro všechny plemeníky totožné a mohou mít zásadní vliv na kvalitu spermatu.

Pro biologickou rozmanitost a udržení místní diverzity hospodářských zvířat je důležité zachování genetických zdrojů zvířat. Je potvrzeno, že původní a čistokrevná plemena jsou obecně vitálnější (Vozaf et al. 2022). Například Kumaresan et al. (2021) uvádí, že samci původních a čistokrevných plemen vykazují obecně lepší plodnost. U nečistokrevných jedinců byly zjištěny reprodukční problémy, kdy sperma od kříženců vykazovalo známky neplodnosti. Proces kryokonzervace spermatu je metodou, jak do budoucna zajistit existenci ohrožených genetických zdrojů zvířat tím, že jsme schopni uchovávat po dlouhou dobu jejich genetický materiál (Vozaf et al. 2022). I přes navrhování nových kryoprotektiv a postupů kryokonzervace, dochází během mrazení spermií ke snížení fertilizační schopnosti. Poškození, ke kterému dochází u spermií, je zapříčiněné teplotním stresem, kterému jsou spermie vystaveny. Dochází k tvorbě ledových krystalů uvnitř buněk a v jejich okolí, čímž dochází k porušení spermií (Yánez-Ortiz et al. 2021). Bylo zjištěno, že spermie po kryokonzervaci mají významně nižší motilitu a mitochondriální aktivitu (Peris-Frau et al. 2019).

7.1 Změna kvality spermatu během procesu kryokonzervace

Obecně lze říct, že kvalita spermatu během procesu kryokonzervace postupně klesá. Naše práce dokumentuje toto zhoršení parametrů kvality spermatu. Například motilita vyšetřovaného spermatu před ekvilibrací byla v průměru 67,55 %, zatímco po ekvilibraci klesla hodnota motility na 40,43 %. Po kryokonzervaci vykazovalo sperma motilitu pouhých 14,03 %. To znamená, že se motilita spermatu během kryokonzervace téměř 5krát snížila a to o 53,52 % oproti motilitě spermatu před ekvilibrací. Progresivní pohyb spermií se během kryokonzervace snížil až 6krát, z průměrných 45,79 % na 7,78 %. To je pokles o 38,01 %. Integrita plazmatické membrány a akrozomu se pak snížila z hodnoty 57,81 % na hodnotu 10,82 %, pokles tedy činil 46,99 %. Vozaf et al. (2022) ve své studii zmiňuje pokles celkové motility v průměru o 16,23 % a pokles progresivní motility o 25,83 %. Pokles celkové a progresivní motility je v našem případě výrazně horší. To může být zapříčiněno odlišným způsobem odběru ejakulátu, zpracováním ejakulátu nebo odlišným způsobem mrazení inseminačních dávek. Dalším

důvodem může být chybné použití kryoprotektantu. de Souza et al. (2019) uvádí, že použití námi zvoleného extenderu optiXcell, způsobilo v jeho práci narušení kinetiky spermií beranů a mělo za příčinu větší oxidační stres. Liu et al. (2020) navrhuje využití bioaktivního peptidu (BAPT) při kryokonzervaci beraního spermatu a uvádí, že jeho použití má za následek zlepšení kvality spermatu během procesu mrazení. Ve studii Su et al. (2022) je znázorněn přijatelný pokles celkové motility na $41 \pm 3,2 \%$ za předpokladu, že bylo přidáno 10 ug/ml LTF do Tris extenderu, což se jeví jako vhodný postup pro zachování co nejlepší kvality beraního spermatu po kryokonzervaci.

Dalším parametrem, který může ovlivnit kvalitu spermatu po rozmrazení je délka inkubace po rozmrazení dávek. Předešlá práce Peris-Frau et al. (2020) potvrzuje, že kryokonzervované spermie berana vyžadují kratší dobu, kdy jsou vystaveny inkubačním (kapacitačním) podmínkám. Kryokonzervované spermie kvůli poškození mrazem dosahují dříve svého fertilizačního potenciálu, oproti čerstvým spermiím. V našem případě jsme inseminační dávku po rozmrazení inkubovali po dobu 1 hodiny při teplotě 38 °C. K dispozici jsou články, které hodnotí přídavky různých komponentů pro prodloužení doby kapacity beraních spermií po rozmrazení. Jak uvádí Alfradique et al. (2019) vystavení spermií vlivu bovinní ovidukální tekutiny, získané v různých fázích estrálního cyklu má za následek snížení kapacity spermií po 4 hodinách inkubace. Po 6 hodinách už však nebyl pozorován pozitivní účinek tohoto extenderu.

Na kvalitu spermatu po rozmrazení může mít dopad různá délka ekvilibrace. V našem případě bylo sperma inkubováno při 5 °C, po dobu cca 12 hodin. Použití této délky ekvilibrace ve své práci zmiňují Câmara et al. (2011). Hodnotili kvalitu beraního spermatu po rozmrazení, za použití délek ekvilibrace 0, 12 a 24 hodin. Udržování beraního spermatu při teplotě 5 °C po dobu 12 hodin před kryokonzervací, snížilo procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou. Paul et al. (2020) uvádí, že ekvilibrace beraního spermatu 22 hodin před kryokonzervací, mělo pozitivní vliv na kvalitu spermatu, v porovnání s délkou ekvilibrace 3 hodiny. Delší doba ekvilibrace vedla k intenzivnější pohyblivosti spermií po rozmrazení a k akrozomální a funkční integritě plazmatické membrány buněk.

Na zhoršení kvality spermatu v našem experimentu mohla mít vliv vzdálenost místa odběru a laboratoře, kde následně došlo ke zpracování ejakulátu, kdy k mrazení inseminačních dávek došlo zhruba 24 hodin od odběru. To ve své práci vyvrací Purdy et al. (2010), kteří potvrdili, že lze kryokonzervovat beraní sperma 24 hodin po odběru, aniž by to ovlivnilo kvalitu spermií nebo jejich oplozovací schopnost. Sperma však musí být uchováváno při teplotě 5 °C.

7.2 Vliv věku na kvalitu spermatu před ekvilibrací

Co se týče vlivu věku na ukazatele kvality spermatu před ekvilibrací, bylo zjištěno následující. Nejlepší motilitu vykazovalo sperma od plemeníků starých 2,5 a 3,5 roků. Takto staří plemeničí dosahovali přijatelných hodnot také v progresivitě pohybu a vůbec nejlepší progresivní pohyb měly spermie plemeníků ve věku 4,5 let. Ti také dosahují nejlepších hodnot pro kinetické parametry VAP, VSL, LIN a STR. Ve všech kvalitativních parametrech hodnocených za pomoci mCASA dosahovali nejhorsích hodnot plemeničí staří 1,5 roku. Obecně lze říct, že kvalitnější sperma před ekvilibrací, tedy v čerstvém stavu, mají spíše starší plemeničí, a to od věku 2,5 let výše. Lymberopoulos et al. (2010) uvádí, že ejakulát beranů

odebraný těsně po dosažení pohlavní dospělosti obsahuje vysoký podíl abnormálních spermií a nízké procento pohyblivých spermií. Dále bylo zjištěno, že berani připouštění ve věku 1,5 roku, měli trvale nižší počet jehňat, než dospělí berani. Chella et al. (2017) ve své práci potvrzuje vliv věku na kvalitu spermatu beranů Zulu. Srovnává plemeníky staré 1-2 roky a plemeníky ve věku 2-3 let. Z výsledků je patrné, že berani staří 2-3 roky mají lepší koncentraci a pohyblivost spermií a také vyšší procento živých spermií. Optimum kvality spermatu pak uvádí u plemeníků ve věku 3 let. Potvrzení toho, že starší plemeníci mají lepší kvalitu spermatu uvádí ve své práci také García et al. (2017), který ve své práci hodnotil nativní sperma od plemeníků starých 1 a 2 roky. Z jeho výsledků vyplývá, že starší plemeníci vykazují lepší kvalitu spermatu, kdy berani staří 2 roky měli prokazatelně lepší výsledky u všech hodnocených parametrů, než plemeníci staří 1 rok. Nejvýznamnější rozdíly pak uvádí v koncentraci spermatu, nebo životaschopnosti spermií.

7.3 Vliv věku na kvalitu spermatu po ekvilibraci

Vliv věku plemeníka, na parametry spermatu získané za pomoci mCASA po ekvilibraci, je následující. U parametrů, na něž má věk plemeníka vliv, nedošlo k prokázání významných rozdílů mezi věkovými kategoriemi, jelikož většina parametrů vykazovala podobných hodnot. Na parametry spermatu, získané za pomoci průtokové cytometrie, má věk plemeníka následující vliv. Plemeníci ve věku 3,5 a 4,5 let měli prokazatelně vyšší procento výskytu spermií s neporušenou plazmatickou membránou a akrozomem. Tito plemeníci dosahovali, i když neprůkazně, také nižšího procenta výskytu spermií s porušenou plazmatickou membránou. Díky tomu lze říct, že po ekvilibraci dosahovali lepší kvality spermatu spíše starší plemeníci (3,5 roku a více). Obecně lze říct, že vliv věku plemeníka neměl zásadní vliv na kvalitu spermatu po ekvilibraci. Důvodem může být, že byly veškeré vzorky vystaveny uniformnímu způsobu ekvilibrace. Dohledatelné články, které zkoumají vliv ekvilibrace na kvalitu spermatu u beranů, se zaměřují spíše na rozdílné způsoby ekvilibrace a na jejich vliv na výslednou kvalitu spermatu po kryokonzervaci. Například Vozaf et al. (2021) hodnotil vliv délky ekvilibrace na motilitu a morfologii spermií po rozmrazení. Uvádí, že nejlepší délka pro ekvilibraci je 6 hodin. Tato doba ekvilibrace zajistí 80% celkovou pohyblivost, 50 % životaschopných spermií a 60 % spermií s oplozovací schopností. Výsledky této studie také ukazují, že zlepšení kvality beraního spermatu lze dosáhnout úpravou postupů před samotným mražením. Januskauskas et al. (1999) se ve své studii zmiňuje o vlivu věku býků na kvalitu spermatu po kryokonzervaci, v závislosti na způsobu předešlé ekvilibrace. Uvádí, že hodnoty plodnosti byly u starších býků (66-79 měsíců) o 1,6 % jednotek vyšší než u skupiny mladších býků (14-16 měsíců).

7.4 Vliv věku na kvalitu spermatu po kryokonzervaci

Vliv věku plemeníka v souvislosti s kvalitou spermatu po kryokonzervaci je následovný. Byl prokázán vliv věku plemeníka na následující parametr spermatu, hodnocené za pomoci mCASA. Celková motilita spermatu a také progresivní pohyb spermií, byly lepší u plemeníků ve věku 3,5 a 4,5 let. Vůbec nejvyšší procento těchto ukazatelů měli plemeníci staří 4,5 roku. Po kryokonzervaci měli starší plemeníci nepatrně horší kinetické parametry spermatu. Vliv

věku plemeníka na kvalitu spermatu po kryokonzervaci potvrzuje García et al. (2017), který zkoumal rozdíly kvality kinetických ukazatelů mezi plemeníky starými 1 a 2 roky. Z jeho výsledků vyplívá, že starší plemeníci měli významně vyšší celkovou motilitu spermatu a také vyšší progresivní pohyb, a to bez ohledu na to, jaký byl použit protokol pro konzervaci spermatu. Dále potvrzuje, že životaschopnost a akrozomální integrita byla lepší u starších beranů. Fakt, že starší berani mají lepší kvalitu spermatu po kryokonzervaci, potvrdil ve své práci také Lymberopoulos et al. (2010), který uvádí, že sperma od starších beranů vykazuje po rozmrazení vyšší procento spermií s intaktní plazmatickou membránou a funkčními mitochondriemi ve srovnání s mladšími plemeníky. Sperma starších beranů navíc obsahuje vyšší procento živých nekapacitovaných spermií. Tabarez et al. (2017) ve své práci hodnotí kvalitu spermatu u kozlů, kteří mají v mnoha ohledech stejné vlastnosti. Pro úspěšnou kvalitu spermatu po kryokonzervaci, doporučuje využívat plemeníky starší 2 let.

Co se týče hodnocení parametrů kvality spermatu pomocí průtokové cytometrie, byl prokázán vliv věku plemeníka na všechny ukazatele. Procento buněk s nepoškozenou plazmatickou membránou a akrozomem bylo nejlepší u plemeníků starých 3,5 a 4,5 roku, kteří ale na druhou stranu vykazovali vyššího procenta buněk s poškozeným akrozomem. Procento buněk s poškozeným akrozomem však nedosahuje takových hodnot, aby to zásadním způsobem ovlivnilo kvalitu spermatu. Plemeníci ve věku 3,5 a 4,5 roku měli nižší procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a s nimi také plemeníci staří 1,5 roku. Tyto tři věkové kategorie naopak měli vyšší procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a akrozomem. Významně nižší hodnoty dosahovali plemeníci ve věku 2,5 let, kteří vykazovali nižší procento také pro mitochondriální membránový potenciál. Lymberopoulos et al. (2010) ve své práci nezjistil významný rozdíl v procentu progresivního pohybu spermií po kryokonzervaci, mezi mladými (1-2 roky) a dospělými (4-5 let) jedinci. Uvádí však, že sperma od beranů ve stáří 4-5 let obsahuje vyšší procento spermií s intaktní plazmatickou membránou a funkčními mitochondriemi, což vzájemně koreluje s výsledky naší práce, kdy plemeníci staří 4,5 roku měli nejvyšší procento výskytu spermií s neporušenou plazmatickou membránou.

7.5 Vliv četnosti vrhu na kvalitu spermatu

Vliv četnosti vrhu na kvalitu spermatu před ekvilibrací, byl prokázán pro parametry PROG, VSL, LIN a STR. Statisticky významně lepších hodnot pro všechny ukazatele dosahovali plemeníci, kteří pocházeli z vícečetných vrhů, tedy z dvojčat. Vliv tohoto faktoru, na kvalitu spermatu po ekvilibraci, nebyl prokázán. Po kryokonzervaci byl prokázán vliv četnosti vrhu plemeníka na parametry MOT, PROG, NPMA a MMP. Hodnoty všech ukazatelů byly statisticky významně lepší u plemeníků, kteří pocházejí z dvojčat.

Dosavadní výzkumy se zabývají spíše vlivem plemeníka na následnou četnost vrhu samice. Například McNamara & Knox (2013) ve své práci potvrzují možný vliv kvality spermatu na výslednou četnost vrhu u prasat. Pang et al. (2022) zas uvádí, že HSPD1 se jeví jako užitečný biomarker pro výběr kvalitních kanců, vhodných pro umělou inseminaci, kteří by zvýšili následnou velikost vrhu prasnice. Palacín et al. (2008) ve své práci hodnotí účinky aplikace melatoninu beranům v období mimo sezónu. Z jejich výsledků vyplívá příznivý vliv melatoninu na početnost vrhu ovcí, kdy se zvýšil počet narozených jehňat ve vrhu.

Z našich výsledků však jasně vyplývá, že na kvalitu spermatu má četnost vrhu, ze kterého plemeník pochází, zásadní vliv, a proto je škoda, že tento efekt není sledován. Může se jednat o jeden z hlavních kritérií pro výběr plemeníka pro proces kryokonzervace. Výsledky naznačují, že kvalita spermatu po kryokonzervaci je lepší u plemeníků, kteří pocházejí z vícečetných vrhů. Do budoucna je za potřebí věnovat se vlivu četnosti vrhu na kvalitu spermatu nejen u beranů, jelikož je to efekt, který by mohl mít značný vliv na kvalitu kryokonzervovaného spermatu, a tedy i na zachování genetických zdrojů.

7.6 Doporučení pro další výzkum

Jelikož jsme se přesvědčili, že na kvalitu spermatu během kryokonzervace má vliv mnoho vnějších činitelů, bylo by možné do budoucna praktikovat tento experiment za použití odlišných postupů zpracování spermatu.

Vzhledem k zajímavým výsledkům naší práce je zapotřebí potvrdit vliv věku a zejména vliv četnosti vrhu na větším počtu zvířat. Vzhledem k uniformitě použitých plemeníků by bylo vhodné praktikovat stejný postup experimentu i u plemeníků různých plemen a z různých podmínek prostředí.

Zejména vliv četnosti vrhu plemeníka na kvalitu jeho spermatu během procesu kryokonzervace je neprobádaná oblast. Přitom vzhledem k výsledkům naší práce se tento efekt jeví jako velice důležitý a směrodatný, a proto si zaslouží větší pozornost. V tomto hledu je tedy k dispozici dostatek prostoru pro možný další výzkum.

V našem experimentu došlo ke srovnání plemeníků, kteří se narodili jako jedináčci anebo jako dvojčata. Rozdílný vliv na kvalitu spermatu by mohli mít plemeníci, kteří pocházejí z ještě více početných vrhů (trojčata, čtyřčata). Vliv četnosti vrhu na mrazivost spermatu by však nemusel být omezen jen na berany. Je možné a žádoucí tento vliv zkoumat také například u kozlů, jelikož se jedná o velice podobný živočišný druh.

8 Závěr

V průběhu naší práce jsme zjišťovali vliv věku plemeníka a vliv četnosti vrhu na kvalitu spermatu u šumavských beranů. Dále byla zjišťována změna kvality spermatu v průběhu procesu kryokonzervace.

Kinetické parametry spermatu byly hodnoceny za pomoci mCASA a parametry životaschopnosti spermií byly hodnoceny pomocí průtokové cytometrie. Tyto metody nám poskytlí informace o celkové motilitě spermatu, progresivním pohybu spermií, průměrné rychlosti dráhy, křivočaré rychlosti, lineární rychlosti, linearitě a přímot. Dále bylo zjišťováno procento spermií s intaktní plazmatickou membránou a akrozomem (životaschopné buňky), procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou, procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a akrozomem, procento spermií s poškozeným akrozomem a procento mitochondriálního membránového potenciálu.

Během procesu kryokonzervace byl zjištěn rapidní pokles kvality spermatu. Hlavními ukazateli kvality spermatu jsou motilita a progresivita pohybu. Celková motilita spermatu klesla během procesu kryokonzervace o 53,5 % a progresivní motilita spermatu poklesla o 38 %.

Dle výsledků může dojít k potvrzení naší hypotézy, kdy byl prokazatelně potvrzen vliv vnitřních faktorů na kvalitu spermatu během kryokonzervace. Mezi tyto faktory patří věk plemeníka a četnost vrhu, ze kterého pochází.

Bylo zjištěno, že prokazatelně lepší kvalitu spermatu během procesu kryokonzervace a po něm mají spíše starší plemeníci ve věku 3,5 – 4,5 let. Dále bylo prokázáno, že lepší kvalitu spermatu po kryokonzervaci mají plemeníci, kteří pocházejí z vícečetných vrhů, v našem případě z dvojčat.

Díky těmto výsledkům jsme schopni říct, že pro proces kryokonzervace je vhodné vybrat plemeníky ve věku od 3,5 let, kteří současně pocházejí z vícečetných vrhů. Tito plemeníci mají lepší předpoklad pro dlouhodobé uchování spermatu (kryokonzervace) a inseminační dávky od těchto plemeníků by měli mít lepší oplozovací schopnost po rozmrazení.

Výsledky naší práce mají potenciál pro zlepšení procesu kryokonzervace a také pro záchranu genetických zdrojů, v našem případě šumavské ovce.

9 Literatura

- Abdel-Mageed I. 2009. Body condition scoring of local Ossimi ewes at mating and its impact on fertility and prolificacy. *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences* **4**: 37-44.
- Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Beracochea F, Damián JP, Giriboni J, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. 2017. Sperm collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation without altering sperm characteristics in conscious goat bucks. *Theriogenology* **98**: 82-87. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.05.006
- Ahmad M, Nasrullah R, Ahmad N. 2015. Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. *Cryobiology* **70(3)**: 233-238. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.03.002
- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* **53(5)**: 1053-1061. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00251-X
- Alfradique VAP, Souza-Fabjan JMG, Batista RITP, Côrtes LR, Bragança GM, de Souza CV, Bartlewski PM, Brandão FZ. (2019). Bovine oviductal fluid (bOF) collected in the follicular or luteal phase of the estrous cycle exerts similar effects on ram sperm kinematics and acrosome reactivity in vitro. *Reproductive Biology* **19(3)**: 279-286. DOI: 10.1016/j.repbio.2019.07.004
- Anel-López L, García-Álvarez O, Tarantini T, Del Olmo D, Ortiz JA, Ledda S, Martinez EA, Soler AJ, Roca J, Fernández Santos MR, Vázquez JM, Parrilla I, Garde JJ. 2018. Influence of insemination time on the fertility of sex sorted frozen-thawed Y-sperm in red deer. *Theriogenology* **113**: 171-175. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.03.005
- Anzar M, Kroetsch T, Buhr MM. 2009. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *Journal of Andrology* **30**: 661-668. DOI: 10.2164 / jandrol.108.007500
- Bajuk BP, Pihlar T, Pogačnik N, Klinc P. 2018. Dialysis of the goat semen and its effect on the quality of frozen/thawed spermatozoa processed in the presence of egg yolk. *Animal reproduction science* **198**: 65-73. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.09.001
- Batista M, Nino T, Alamo D, Castro N, Santana M, Gonzalez F, Cabrera F, Gracia A. 2009. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology* **71**: 1307-1315. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.024
- Bompart D, García-Molina A, Valverde A, Caldeira C, Yániz J, de Murga MN, Soler C. 2018. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development* **30**: 810-819. DOI: 10.1071/RD17551
- Bravo JA, Montanero J, Calero R, Roy TJ. 2011. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Animal reproduction science* **129(1-2)**: 22-29. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2011.10.005
- Brito LF, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love C, Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* **85**: 1507-1527. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.002

- Calderón-Leyva G, Meza-Herrera CA, Rodríguez-Martínez R, Ángel-García O, Rivas-Muñoz R, Delgado-Bermejo JV, Véliz-Deras FG. 2018. Influence of sexual behavior of Dorper rams treated with glutamate and/or testosterone on reproductive performance of anovulatory ewes. *Theriogenology* **106**: 79-86. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.016
- Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology* **76(2)**: 342-350. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.013
- Carneiro RP, Macedo GG, DeRossi R, Costa-e-Silva EV, Souza MIL. 2019. Welfare and pregnancy rate of ewes undergoing transcervical artificial insemination with ketamine subarachnoid anesthesia. *Tropical animal health and production* **51**: 1179-1186. DOI: 10.1007/s11250-019-01805-5
- Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalana A, Menchaca A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology* **103**: 30-35. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.021
- Colenbrander B, Gadella BM, Stout TAE. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Production In Domestic Animals* **38**: 305-311. DOI: 10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x
- 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. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.025
- Correia LFL, Espírito-Santo CG, Braga RF, Carvalho-de-Paula CJ, da Silva AA, Brandão FZ, Freitas VJ, Ungerfernd R, Souza-Fabjan JM. 2021. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. *Cryobiology* **98**: 194-200. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.11.001
- Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal reproduction science* **130**: 187-192. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.014
- Česká zemědělská univerzita (ČZU), Fakulta agrobiologie a přírodních zdrojů. 2019. Plemena ovčí a koz. V Praze. Available from: https://katedry.czu.cz/storage/198/7835_EL-Plemena-ovci-a-koz.pdf (accessed Duben 2023).
- Čunát L, Hegedušová Z, Vejnar J, Štolc L, Louda F, Vejčík A. 2013. Využití inseminace ovčí v chovatelské praxi. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- de Souza C V, Brandão F Z, Santos J D R, Alfradique V A P, Dos Santos V M B, da Cruz Morais M C, Rangel P S C, da Silva A A, Souza-Fabjan J M G. 2019. Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology* **89**: 104-108. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.05.009
- Dorado J, Rodríguez I, Hidalgo M. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* **68**: 168-177. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.048

- Faigl V, Vass N, Jávora A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. 2012. Artificial insemination of small ruminants—A review. *Acta Veterinaria Hungarica* **60**: 115-129. DOI: 10.1556/AVet.2012.010
- Gallagher MT, Cupples G, Ooi EH, Kirkman-Brown JC, Smith DJ. 2019. Rapid sperm capture: high-throughput flagellar waveform analysis. *Human Reproduction* **34**: 1173-1185. DOI: 10.1093/humrep/dez056
- García W, Tabarez A, Palomo MJ. 2017. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction (AR)*, **14(4)**: 1124-1132. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.01.007
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* **65(5)**:943-957. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.009
- Giriboni J, Lacuesta L, Ungerfeld R. 2017. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. *Theriogenology* **87**: 284-289. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.004
- Heidari AH, Zamiri MJ, Nazem MN, Shirazi MRJ, Akhlaghi A, Pirsaraei ZA. 2021. Detrimental effects of long-term exposure to heavy metals on histology, size and trace elements of testes and sperm parameters in Kermani Sheep. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **207**: 111563. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111563
- Chella L, Kunene N, Lehloenya K. 2017. A comparative study on the quality of semen from Zulu rams at various ages and during different seasons in KwaZulu-Natal, South Africa. *Small Ruminant Research* **151**: 104-109. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.04.003
- Chemineau P, Malpoux B, Brillard J, Fostier A. 2007. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. *Animal* **1**: 419-432. DOI: 10.1017/S1751731107691873
- Christensen P, Stenvang JP, Godfrey WL. 2004. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *Journal of andrology* **25(2)**: 255-264. DOI: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb02786.x
- Iannuzzi A, Parma P, Iannuzzi L. 2021. Chromosome Abnormalities and Fertility in Domestic Bovids: A Review. *Animals* **11**: 802 DOI: 10.3390/ani11030802
- Inanc ME, Gungor S, Ozturk C, Korkmaz F, Bastan I, Cil B. 2019. Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinárni medicína* **64**: 118-124.
- Jandurova OM, Kott T, Kottova B, Czernekova V, Milerski M. 2005. Genetic relationships among Šumava, Valachian and improved Valachian sheep. *Small Ruminant Research*. **1;57(2-3)**: 157-65. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.06.021
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Hrd MGM, Hrd MC, 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(4)**: 641-658. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00159-4
- Jiménez-Rabadán P, García-Álvarez O, Vidal A, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Ramón M, del Olmo E, Fernández-Santos R, Garde JJ, Soler AJ. 2015. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology* **71**: 85-90. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.05.004

- Joshi A, Bag S, Naqvi SMK, Sharma RC, Mittal JP. 2005. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. *Small ruminant research* **56(1-3)**: 231-238. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2004.06.013
- Kenyon PR, Morel PCH, Morris ST. 2004. The effect of individual liveweight and condition scores of ewes at mating on reproductive and scanning performance. *New Zealand Veterinary Journal* **52**: 230-235. DOI: 10.1080/00480169.2004.36433
- Kleemann DO, Walker SK. 2005. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: relationships between reproductive traits and environmental cues. *Theriogenology* **63**: 2416-2433. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.052
- Konyali C, Tomás C, Blanch E, Gómez EA, Graham JK, Mocé E. 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology* **67**: 124-131. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2013.06.001
- Kos V, Andrlíková M, Ledabylová A, Marková B, Koudelová A, Novotný R, Vránová L, Čech S. 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Kulovaná E, Louda F, Stádník L, Ježková A. 2002. Inseminace – nositelka šlechtitelského pokroku v chovu hospodářských zvířat. Profí Press, Praha. Available from: <https://www.naschov.cz/inseminace-nositelka-slechtitelskeho-pokroku-v-chovu-hospodarskych-zvirat/> (accessed Duben 2023).
- Kumaresan A, Elango K, Datta TK, Morrell JM. 2021. Cellular and molecular insights into the etiology of subfertility/infertility in crossbred bulls (*Bos taurus* × *Bos indicus*): A review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**: 696637. DOI: 10.3389/fcell.2021.696637
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science* **62**: 113-141. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00156-1
- Liu G, Pan B, Li S, Ren J, Wang B, Wang C, Su X, Dai Y. 2020. Effect of bioactive peptide on ram semen cryopreservation. *Cryobiology* **97**: 153-158. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.08.007
- Louda F, Hegedušová Z. 2009. Inseminace ovcí – intenzifikační faktory šlechtitelské práce. Agrovýzkum Rapotín s.r.o. ISBN 978-80-871 44-12
- Lu JC, Huang YF, Lu NQ. 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia* **46.4**: 329-338. DOI: 10.1111/and.12093
- Lv C, Wu G, Hong Q, Quan G. 2019. Spermatozoa cryopreservation: state of art and future in small ruminants. *Biopreservation and biobanking* **17**: 171-182. DOI: 10.1089/bio.2018.0113
- Lymberopoulos AG, Tsakmakidis IA, Khalifa TAA. 2010. Effect of ram age on structural and functional competence of frozen–thawed spermatozoa in dairy sheep. *Reproduction in domestic animals* **45(4)**: 572-578. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01303.x
- Macías A, Martín E, Laviña A, Ferrer LM, Lidón I, Rebollar R, Tejedor MT. 2020. Cervical artificial insemination in sheep: sperm volume and concentration using an antiretrograde flow device. *Animal Reproduction Science* **221**: 106551. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106551

- Machová K, Milerski M, Rychtářová J, Hofmanová B, Vostrá-Vydrová H, Moravčíková N, Kasarda R, Vostrý L. 2021. Assessment of the genetic diversity of Two Czech autochthonous sheep breeds. *Small Ruminant Research* **195**:106301. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2020.106301
- Machová K, Marina H, Arranz JJ, Pelayo R, Rychtářová J, Milerski M, Vostrý L, Suárez-Vega A. 2023. Genetic diversity of two native sheep breeds by genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms. *animal* **17**(1):100690. DOI: 10.1016/j.animal.2022.100690
- Malpoux B, Maurice-Mandon F, Daveau A, Chemineau, P. 1995. Utilisation de la lumière et de la mélatonine pour la maîtrise de la reproduction des ovins et des caprins. *Renc. Rech. Rum* **2**: 379-386.
- Maxwell WM, Stojanov T. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development* **8**: 1013-1020. DOI: 10.1071/RD9961013
- Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, De Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* **82**: 79-95. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.013
- McCappin N, Murray RD. 2011. Some factors affecting pregnancy rate in ewes following laparoscopic artificial insemination. *Veterinary Record* **168**: 99-99. DOI: 10.1136/vr.c5979
- McNamara KA & Knox RV. 2013. Effect of using frozen-thawed boar sperm differing in post-thaw motility in the first and second inseminations on pregnancy establishment, litter size, and fetal paternity in relation to time of ovulation. *Journal of animal science* **91**(12): 5637-5645. DOI: [10.2527/jas.2013-6867](https://doi.org/10.2527/jas.2013-6867)
- Milerski M. 2016. Metodika uchování genetického zdroje zvířat. Available from: <http://genetickezdroje.cz/wp-content/uploads/2019/11/Methodika-uchov%C3%A1n%C3%AD-GZ-%C5%A0O.pdf> (accessed Duben 2023).
- Mocé E, Lozano-Palazón SA, del Mar Martínez-Granell M, Mocé ML, Gómez EA. 2020. Effect of the Refrigeration System on In Vitro Quality and In Vivo Fertility of Goat Buck Sperm. *Animals* **10**: 2399. DOI: 10.3390/ani10122399
- Moraes CR, Runcan EE, Blawut B, Coutinho da Silva MA. 2019. The use of iSperm technology for on-farm measurement of equine sperm motility and concentration. *Translational Animal Science* **3**: 1513-1520. DOI: [10.1093/tas/txz115](https://doi.org/10.1093/tas/txz115)
- Národní referenční středisko pro genetické zdroje zvířat. 2022. Šumavská ovce. Available from: <https://genetickezdroje.cz/narodni-program-uvod/ovce/narodni-program-ovce-sumavska-ovce/> (accessed Duben 2023).
- Olaciregui M, Luño V, Domingo P, González N, Gil L. 2017. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific reports* **7**: 1096. DOI: 10.1038/s41598-017-00583-0
- Palacin-Martinez C, Alvarez M, Montes-Garrido R, Neila-Montero M, Anel-Lopez L, de Paz P, Anel L, Riesco MF. 2022. Frequency of semen collection affects ram sperm cryoresistance. *Animals* **12**(12): 1492. DOI: 10.3390/ani12121492
- Pang WK, Son JH, Ryu DY, Rahman MS, Park YJ, Pang MG. 2022. Heat shock protein family D member 1 in boar spermatozoa is strongly related to the litter size of inseminated

- sows. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **13(1)**: 42. DOI: 10.1186/s40104-022-00689-0
- Palacín I, Abecia J A, Forcada F, Casao A, Cebrián JÁ, Muiño T, Palacios C, Pontes JM. 2008. Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science* **7(2)**: 199-206. DOI: 10.4081/ijas.2008.199
- Paul RK, Balaganur K, Kumar D, Singh R. 2020. Pre-freezing equilibration for 22 h improves post-thaw sperm functions in cryopreserved ram semen by reducing cholesterol efflux. *Cryobiology* **96**: 76-84. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.07.013
- Pellicer-Rubio MT, Boissard K, Grizelj J, Vince S, Fréret S, Fatet A, López-Sebastián A. 2019. Vers une maîtrise de la reproduction sans hormones chez les petits ruminants. *INRA Productions Animales* **32**: 51-66. DOI: 10.20870/productions-animales.2019.32.1.2436
- Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Ajofrín I, Mateos-Hernández L, Garde JJ, Soler AJ. 2019. Freezing–thawing procedures remodel the proteome of ram sperm before and after in vitro capacitation. *International journal of molecular sciences* **20(18)**: 4596. DOI: 10.3390/ijms20184596
- Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Ajofrín I, Cesari A, Garde JJ, Villar M, Soler AJ. 2020. Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology* **145**: 100-108. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.046
- Perticarari S, Ricci PPE, Granzotto M, Boscolo R, Pozzobon C, Guarnieri S, Sartore A, Presani G. 2007. A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Human Reproduction* **22(2)**: 485-494.
- Petrunkina AM, Harrison RAP. 2010. Systematic misestimation of cell subpopulations by flow cytometry: a mathematical analysis. *Theriogenology* **73(7)**: 839-847. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.09.007
- Pool KR, Rickard JP, de Graaf SP. 2020. Global Methylation and Protamine Deficiency in Ram Spermatozoa Correlate with Sperm Production and Quality but Are Not Influenced by Melatonin or Season. *Animals* **10**: 2302. DOI: 10.3390/ani10122302
- Ptáček M, Stádníková M, Savvulidi F, Stádník L. 2019. Ram semen cryopreservation using egg yolk or egg yolk-free extenders: Preliminary results. *Scientia agriculturae bohémica* **50**: 96-103. DOI: 10.2478/sab-2019-0014
- Purdy PH, Graham JK. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* **48**: 36-45. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2003.12.001
- Purdy PH. 2006. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* **93**: 114-123. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2005.07.002
- Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. 2010. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science* **118(2-4)**: 231-235. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2009.06.014
- Qin Y, Yang S, Xu J, Xia C, Li X, An L, Tian J. 2018. Deep insemination with sex-sorted Cashmere goat sperm processed in the presence of antioxidants. *Reproduction in Domestic Animals* **53**: 11-19. DOI: 10.1111/rda.13045

- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal reproduction science* **38**: 1-36. DOI: 10.1016/0378-4320(94)01328-J
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Animal reproduction science* **62**: 77-111. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X
- Salamon S, Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2004. Fertility of ram semen after 35 years of frozen storage. In *Proceedings of the International Congress of Animal Reproduction*, Porto Seguro, Brazil.
- Santiago-Moreno J, Coloma MA, Dorado J, Pulido-Pastor A, Gómez-Guillamon F, Salas-Vega R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. 2009. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* **71**: 1253-1260. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.019
- Santos-Neto PC, García-Pintos C, Pinczak A, Menchaca A. 2015. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science* **182**: 125-128. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.11.005
- Sathe SR. 2018. Laparoscopic Artificial Insemination Technique in Small Ruminants – A Procedure Review. *Frontiers in veterinary science* **5**:266. DOI: 10.3389/fvets.2018.00266
- Savvulidi FG, Ptacek M, Malkova A, Beranek J, Stadnik L. 2021. Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science* **66**: 55-64. DOI: 10.17221/226/2020-CJAS
- Schoenian S. Sheep 201. 2019. Reproduktion in the ewe. Available from <http://www.sheep101.info/201/ewerepro.html> (accessed Duben 2021).
- Smirnov IV, Postavnaja VI. 1960. The preservation of bull semen at temperatures above zero. *Teaduslike Toode Kogumik Eesti Loomakasvatuse Vet, Teadusliku Uurimise Inst.* **4**: 195-204.
- Svaz chovatelů ovčí a koz (SCHOK). 2023. Plemena. Available from: <https://www.schok.cz/ovce/plemena/> (accessed Duben 2023).
- Su J, Wang C, Song Y, Yang Y, Cao G. 2022. Effect of lactoferrin on ram sperm motility after cryopreservation. *Animal Bioscience* **35(9)**: 1351-1359. DOI: 10.5713/ab.21.0561
- Tabarez A, García W, Palomo MJ. 2017. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* **149**: 91-98. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.01.007
- Talarczyk-Desole J, Berger A, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. 2017. Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? *Ginekologia Polska* **88(2)**: 56-60. DOI: 10.5603/GP.a2017.0012
- Ungerfeld R, Abril-Sánchez S, Toledano-Díaz A, Beracochea F, Castaño C, Giriboni J, Santiago-Moreno J. 2016. Oxytocin administration before sperm collection by transrectal ultrasonic-guided massage of the accessory sex glands in mouflons and bucks. *Animal reproduction science* **173**: 13-17. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.002

- Ungerfeld R, Viera MN, Freitas-de-Melo A, Giriboni J, Casuriaga D, Silveira P. 2021. Seasonality of the stress response in goat bucks when there is use of electroejaculation for semen collection. *Animal Reproduction Science* **226**: 106719. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106719
- van der Horst G. 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal reproduction science* **220**: 106350. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2020.106350
- Vašíček J, Baláži A, Svoradová A, Vozaf J, Dujíčková L, Makarevich AV, Chrenek P. 2022. Comprehensive Flow-Cytometric Quality Assessment of Ram Sperm Intended for Gene Banking Using Standard and Novel Fertility Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* **23(11)**: 5920. DOI: 10.3390/ijms23115920
- Vozaf J, Makarevich AV, Balazi A, Vasicek J, Svoradova A, Olexikova L, Chrenek P. 2021. Cryopreservation of ram semen: Manual versus programmable freezing and different lengths of equilibration. *Animal Science Journal* **92(1)**: e13670. DOI: 10.1111/asj.13670
- Vozaf J, Svoradová A, Baláži A, Vašíček J, Olexiková L, Dujíčková L, Makarevič AV, Jurčík R, Ďuranová H, Chrenek P. 2022. The cryopreserved sperm traits of various ram breeds: towards biodiversity conservation. *Animals* **12(10)**: 1311. DOI: 10.3390/ani12101311
- Wakayama T, Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nature biotechnology* **16**: 639-641. DOI: 10.1038/nbt0798-639
- Weberová G. 2017. Aspekty spermatologického vyšetření čerstvého ejakulátu beranů. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně
- Yánez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil J E, Miró J, Yeste M. 2021. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*: 106904. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106904
- Yoshida M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science* **60**: 349-355. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00125-1
- Youngquist RS, Threlfall WR. 2006. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Zhu W, Cheng X, Ren C, Chen J, Zhang Y, Chen Y, Jia X, Wang S, Sun Z, Zhang R, Zhang Z. 2020. Proteomic characterization and comparison of ram (*Ovis aries*) and buck (*Capra hircus*) spermatozoa proteome using a data independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) approach. *PloS one* **15** (e0228656) DOI: 10.1371/journal.pone.0228656
- ZOOTECHNIKA.CZ. 2009. Inseminace koz a ovcí. Available from <https://www.zootechnika.cz/clanky/chov-koz/reprodukce-koz/inseminace-koz-a-ovci.html> (accessed Duben 2023).

10 Seznam použitých zkratk a symbolů

AA-2G – kyselina askorbová-2glukosid
CASA – počítačem asistovaná analýza spermií
DNA – deoxyribonukleová kyselina
FAST – sledování bičíku spermií
GLM – zobecněný lineární model
HOST – hypoosmotický test
ICSI – intracytoplazmatická injekce spermie
JC-1 – membránově permeabilní barvivo
LCA – lens culinaris aglutinin
LIN – linearita dráhy
mCASA – mobilní počítačově asistovaná analýza spermií
MMP – mitochondriální membránový potenciál
MOT – motilita pohybu
MTR DR – MitoTracker Deep Red
NaCl – chlorid sodný
NPMA – neporušená plazmatická membrána a akrozom
PA – poškození akrozomu
PNA – arašidový aglutin
PPM – poškození plazmatické membrány
PPMA – poškození plazmatické membrány a akrozomu
PROG – progresivní motilita
PSA – pisum sativum aglutinin
PVA – polyvinyl alkohol
STR – přímost dráhy
TUMASG – transrektální ultrazvukem vedená masáž přídatných pohlavních žláz
VAP – průměrná rychlost dráhy
VCL – křivočará rychlost
VSL – lineární rychlost
7-AAD – 7-amino-aktinomycin-D