

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat

**Složení ředidel pro výrobu inseminačních dávek
býků a jejich kryoprotektivní účinek na spermie**

Doktorská disertační práce

Doktorand: Ing. Jan Vodička

Školitel: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

Konzultant: prof. František Louda, CSc.

Praha 2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou disertační práci na téma „Složení ředidel pro výrobu inseminačních dávek býků a jejich kryoprotektivní účinek na spermie“ vypracoval samostatně a použil jsem odborných literárních pramenů, které cituji a zároveň uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 9. 5. 2023

Ing. Jan Vodička

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména doc. Ing. Luďku Stádníkovi Ph.D. za jeho vedení při mém studiu a zpracování této disertační práce, dále prof. Ing. Františkovi Loudovi, DrSc. za jeho odbornou činnost konzultanta při tvorbě výstupů mého studia a dalším kolegům z Katedry chovu hospodářských zvířat FAPPZ ČZU v Praze za jejich pomoc při zpracování výsledků výzkumu.

V neposlední řadě mé poděkování patří i pracovníkům plemenářské firmy NATURAL spol. s r. o., kteří aktivně prováděli vlastní odběry ejakulátů býků, zpracování a výrobu inseminačních dávek dle podmínek a plánu výzkumu.

Obsah

1	ÚVOD	5
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1	Současná situace v reprodukci skotu	7
2.2	Plodnost býka	8
2.3	Anatomie a fyziologie pohlavní soustavy býka	8
2.3.1	Varlata	9
2.3.2	Nadvarlata	10
2.3.3	Chámovody	10
2.3.4	Přídavné pohlavní žlázy	11
2.3.5	Pyj	12
2.3.6	Šourek	14
2.4	Ejakulát	14
2.4.1	Spermie	16
2.4.2	Semenná plazma	17
2.4.3	Hodnocení ejakulátu	17
2.4.3.1	Makroskopické vyšetření	18
2.4.3.2	Mikroskopické vyšetření	18
2.4.3.2.1	Koncentrace	18
2.4.3.2.2	Motilita	19
2.4.3.2.3	Integrita povrchových membrán	19
2.4.3.2.4	Morfologické vlastnosti	20
2.4.4	Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu	20
2.4.4.1	Vliv býka	21
2.4.4.1.1	Činitelé vnitřního prostředí	22
2.4.4.1.2	Činitelé vnějšího prostředí	24
2.4.4.2	Vliv zpracování ejakulátu	27
2.4.4.2.1	Ředění	28
2.4.4.2.2	Chlazení a ekvilibrace	29
2.4.4.2.3	Kryokonzervace	30
2.5	Způsoby konzervace inseminačních dávek	32
2.5.1	Inseminace čerstvým semenem – krátkodobá konzervace	32
2.5.2	Inseminace chlazeným semenem – střednědobá konzervace	32
2.5.3	Inseminace zmrazeným semenem – dlouhodobá konzervace	32
2.6	Ekvilibrace	33
2.7	Kryokonzervace	34

2.7.1	Kryokonzervace - podmínky.....	35
2.8	Ředění ejakulátu	36
2.8.1	Stupeň ředění	36
2.8.2	Složení ředidel	38
2.8.2.1	Kryoprotektiva	38
2.8.2.1.1	Penetrující kryoprotektanty	39
2.8.2.1.2	Nepenetrující kryoprotektanty.....	43
2.8.3	Typy ředidel	45
2.8.3.1	Bezžloutková ředidla.....	45
2.8.3.2	Žloutková ředidla	45
3	HYPOTÉZY A CÍL PRÁCE	47
4	MATERIÁL A METODIKA	48
4.1	Odběr spermatu.....	48
4.2	Hodnocení spermatu po odběru	48
4.3	Zpracování spermatu	49
4.3.1	Zpracování pro hodnocení účinků různých bází ředidel	49
4.3.2	Zpracování pro hodnocení přídavku různých koncentrací LDL	49
4.4	Rozmrazování spermatu a hodnocení vzorků.....	50
4.4.1	Hodnocení vlivu báze ředidla	51
4.4.2	Hodnocení vlivu koncentrace LDL	52
4.5	Statistické vyhodnocení výsledků	53
5	VÝSLEDKY	55
5.1	Vyhodnocení vlivu báze ředidla	55
5.2	Vyhodnocení vlivu koncentrace LDL	60
6	DISKUSE	63
7	ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI	68
8	PUBLIKAČNÍ AKTIVITA.....	70
8.1	Příloha č. 1	71
8.2	Příloha č. 2	79
8.3	Příloha č. 3	82
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	85
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	104

1 ÚVOD

Plodnost dojnic nedosahuje ekonomicky optimálních hodnot. Tento trend je patrný ve všech chovatelsky vyspělých zemích a dokumentují jej také výsledky kontroly mléčné užitkovosti v České republice. V současné době se hledají cesty, kterými by se dal tento ekonomicky nepříznivý trend zvrátit.

Problematika plodnosti skotu v posledních letech byla a kontinuálně je intenzivně studována na straně plemenic a vlivů, které na jejich reprodukční výsledky působí. Výsledek reprodukce dojnic nicméně ovlivňuje i tzv. samčí komponenta, která je reprezentována oplozovací schopností ejakulátu býka.

Nejrozšířenější biotechnologickou metodou u skotu je umělá inseminace, využívaná pro zlepšení parametrů reprodukce a zajištění genetického zisku. Genetického zisku je dosahováno pomocí inseminací, a to zejména prostřednictvím zmrazeného ejakulátu býků. V současné době jsou v inseminační praxi používány různé metodické postupy konzervace býčího spermatu a dlouhodobého uchovávání býčího spermatu v tekutém dusíku včetně jejich zavedení do široké praxe. Soustavné zvyšování intenzity zapouštění a výsledků zabřezávání jak u krav, tak u jalovic, vedlo k trvalému vzestupu počtu narozených telat a k celkovému zintenzivnění efektu reprodukce. Inseminace v tomto směru sehrála nezastupitelnou roli při stupňování produkce a zvyšování rentability chovu skotu.

V průběhu zpracování ejakulátu býků, zejména pak při procesu mrazení a rozmrazování, dochází ke snižování životaschopnosti spermií o 40 – 50 %. Každá etapa zpracování ejakulátu od jeho odběru přes produkci, konzervaci a užití inseminačních dávek (ředění, plnění do pejet, zchlazování, ekvilibrace, mrazení, uložení a manipulace s dávkami, včetně jejich rozmrazení) je velmi důležitá a ovlivňuje výslednou oplozovací schopnost spermií v inseminační dávce. Poškození spermií způsobené kryokonzervací může být minimalizováno a výrazně sníženo optimalizací procesu ředění s přídavkem vhodného kryoprotektantu do ředidel ejakulátu býků, které vzájemně působí s ejakulátem a poskytuje tak ochranu spermií během procesu jejich chlazení, mrazení a rozmrazování.

Udržení oplozovací schopnosti ejakulátu v průběhu dlouhého a náročného procesu jeho zpracování, ředění a mrazení, při výrobě inseminační dávky či po jejím rozmrazení zajišťuje vyšší úroveň zabřezávání dojnic, snižuje spotřebu inseminačních dávek, zkracuje délku mezidobí a celkově zlepšuje ekonomickou efektivitu reprodukce a tím i vyšší rentabilitu chovu hospodářských zvířat. Zachování základních schopností spermií během dlouhého a náročného procesu produkce inseminačních dávek může zajistit vyšší míru zabřezávání

plemenic. Hlavním cílem je dosáhnout míry zabřezávání se zmrazeným spermatem, která je podobná jako u čerstvého spermatu nebo přímo v rámci přirozené plemenitby. Proces kryokonzervace obecně snižuje životaschopnost spermatu a poškozuje všechny struktury spermií, čímž zhoršuje schopnost oplodnění. Během výroby inseminačních dávek je funkční stav spermií ovlivněn mnoha faktory, jako je pH, osmotický tlak a stres spojený se změnami teploty prostředí. Tyto stresové faktory způsobují produkci reaktivních forem kyslíku a peroxidaci lipidů buněčné membrány, což nepříznivě ovlivňuje spermie. Eliminace těchto negativních jevů se dosahuje přidáním vhodných kryoprotektantů do ředidla býčího semene, jeho interakcí s individualitou býků, řízeným procesem chlazení a při použití optimální teplotní mrazicí křivky.

V současné době je k dispozici široká škála dostupných ředidel býčího spermatu různého složení. Nejběžnější jsou ředidla založená na bázi vaječného žloutku, zatímco relativně nově vyvinutá ředidla se skládají výhradně z rostlinných složek. Ředidla na bázi rostlinného původu by měla poskytovat srovnatelnou kvalitu zmrazených inseminačních dávek a zároveň vymýtit možné nevýhody ředidel na bázi vaječného žloutku, jako je přenos chorob, mikrobiální riziko a potíže se standardizací. Existence ředidla s takovými vlastnostmi by poskytla cenný příspěvek oboru umělé inseminace. Přetrvávají však obavy ze snížené oplozovací schopnosti, když se při kryokonzervaci býčího semene používají ředidla na rostlinné bázi. Zatímco některé studie potvrdily srovnatelnou kvalitu nebo míru oplozovací schopnosti inseminačních dávek nařazených v ředidlech bez vaječného žloutku. Jiná pozorování uvádějí vynikající výsledky v zachování aktivních schopností spermií a v oplozovacím potenciálu inseminačních dávek nařazených ředidly na bázi vaječného žloutku.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Současná situace v reprodukci skotu

Plodnost skotu je po mléčné užitkovosti nejvýznamnější užitkovou vlastností. Za ideální se považuje získání jednoho zdravého telete od krávy za rok. Dobré plodnosti odpovídají u krav délka inseminačního intervalu do 75 dnů, březost po první inseminaci nad 50 %, inseminační index do 1,5, délka servis periody do 100 dnů a délka mezidobí do 385 dnů. Při vysoké užitkovosti lze tolerovat prodloužení mezidobí na 400 dnů spolu s adekvátním prodloužením inseminačního intervalu a servis periody.

V posledních letech se dle Syrůčka a kol. (2022) počet inseminovaných plemenic výrazně neměnil. Hodnoty jsou závislé na počtech chovaného skotu a jeho výrobním zaměření. Od r. 2010, kdy se počet provedených prvních inseminací skotu za rok v České republice snížil pod 500 tis. (k poklesu počtu inseminací pod 800, 700 a 600 tis. prvních inseminací došlo v letech 1997, 1999 a 2003), je tento ukazatel poměrně stabilní a pohybuje se okolo úrovně 500 tis. provedených prvních inseminací či v posledních 5 letech těsně pod touto hodnotou. V roce 2021 bylo inseminováno na první inseminaci 490 tis. plemenic (339 tis krav a 151 tis. jalovic) s celkovým počtem 458 tis. zabřezlých plemenic po všech inseminacích (311 tis. krav a 146 tis. jalovic). V rámci výrobního zaměření bylo 93,3 % prvních inseminací provedeno u plemenic s mléčnou a kombinovanou užitkovostí a 6,7 % u plemenic s masnou užitkovostí. V rámci plemenné skladby pak bylo zjištěno % zabřezávání po první inseminaci u plemene holštýnského skotu ve výši 45,3 % (38,6 % u krav a 59,4 % u jalovic), u plemene českého strakatého skotu ve výši 50,2 % (45,3 % u krav a 59,5 % u jalovic) a u masných a ostatních plemen skotu ve výši 68,3 % (58,7 % u krav a 68,3 % u jalovic).

Délka reprodukčních ukazatelů spojených s datem porodu v České republice byla dlouhodobě na ekonomicky neuspokojivých hodnotách. V posledních letech však jejich hodnoty postupně klesaly. Ekonomicky velmi důležitý ukazatel mezidobí by ještě v roce 2017 na úrovni 401 dní a v následujících letech klesl pod tuto hodnotu s výsledkem 394 dní v roce 2021 (Syrůček a kol., 2022). Ekonomickou ztrátu prodloužení mezidobí nad optimální délku o 1 den, resp. o 1 pohlavní cyklus lze v současné době odhadnout u dojníc na 200 až 300 Kč, resp. na 4 000 až 6 000 Kč.

2.2 Plodnost býka

Plodnost je základní biologická a užitková vlastnost skotu. Rozhodujícím způsobem ovlivňuje obě hlavní užitkové vlastnosti skotu. Plodností rozumíme schopnost produkovat životaschopné potomstvo. Realizuje se produkcí pohlavních buněk, oplozením vajíčka a porodem telete (Louda a kol., 2008).

Plodnost je komplexní vlastnost ovlivňována mnoha faktory, jako je genetika, epigenetika, faktory životního prostředí a epistáze; ve výsledku je to ale nízké vlastnost s nízkou dědičností (Blaschek a kol., 2011; Collins a kol., 1962). Ačkoli většinou genetické faktory ovlivňují plodnost, faktory prostředí, jako je klima, výživa a management chovu mají významný vliv na fyziologii býka a tím i na plodnost. Mezi tyto faktory patří například extrémní klimatické výkyvy, dlouhá doba přepravy nebo nevybalancovaná krmná dávka (Parisi a kol., 2014). Překonávání problémů v oblasti životního prostředí (výživa, klima a management chovu) je rozhodující pro maximalizaci reprodukčních parametrů a genetické zlepšení (Barth a kol., 2008). Klima (teplo, chlad, vítr, vlhkost) může mít vliv na počet spermií, morfologii, fyziologii a další. Významné rozdíly v plodnosti existují i mezi býky produkující spermie s normální pohyblivostí, morfologií a koncentrací. Optimální teplota pro produkci spermií je mezi 5 a 15 °C (Fuerst-Waltl a kol., 2006).

Vzhledem k tomu, že se na plodnosti podílejí komplikované, různorodé a citlivé faktory, přetrvává nízká plodnost nebo neplodnost (Parisi a kol., 2014).

Snížení plodnosti může nastat v důsledku změn teploty v průběhu mrazení, působení osmotického a toxického stresu kvůli přidavku kryoprotektantu a formování ledových krystalů (Papa a kol., 2015).

2.3 Anatomie a fyziologie pohlavní soustavy býka

Reprodukce patří mezi znaky, které jsou ovlivněny jak genetickými vlivy, tak také vlivy okolního prostředí (Bezdiček a Louda, 2015).

Reprodukční funkce samců zahrnuje tvorbu spermií a jejich dopravu do samičích pohlavních orgánů. Spermie jsou tvořeny v semenotvorných kanálcích varlat a potom jsou transportovány přes síť kanálků varlete do nadvarlete. Zde jsou uloženy a dozrávají. Produkce spermií se od počátku jejího vzniku po dosažení pohlavní dospělosti stává nepřetržitým procesem. Činnost samčí pohlavní soustavy je řízena hormony a autonomním nervovým systémem (Reece, 2011).

Funkce pohlavních orgánů samců záleží především v tvorbě samčích pohlavních buněk, spermií, a v jejich vpravení do pohlavních cest samice. K samčím pohlavním orgánům patří varlata, nadvarlata, chámovody, přídatné žlázy pohlavní a pyj jako pářící orgán. Párová varlata s nadvarlaty jsou uložena v šourku, pyj v předkožce (Komárek, 1964).

2.3.1 Varlata

Varle (*testis*) je párová samčí pohlavní žláza, která vytváří spermie a samčí pohlavní hormon testosteron. U našich druhů domácích zvířat má varle zhruba vejčitý tvar a je u přežvýkavců postaveno v šourku svou dlouhou osou svisle (Komárek, 1964).

Ačkoliv existují mezidruhové rozdíly ve velikosti, tvaru a umístění varlat, mají varlata všech druhů podobnou strukturu. Spermie se tvoří ve stočených semenotvorných kanálcích, což je hlavní a největší součást parenchymu varlat. Varlata jsou obklopena vazivovým obalem, který se nazývá bělavá blána (*tunica albuginea*). Z ní vycházejí do nitra parenchymu septa neboli vazivové přepážky rozdělující parenchym na menší úseky a zajišťující ochranu a integritu parenchymatózní tkáně (Reece, 2011).

Na svém povrchu je kryto tenkou serózní blankou pobřišnice, pod níž leží tuhá blána z fibrózního vaziva (*tunica albuginea*). Tato blána, tvořící obalové pouzdro křehkého parenchymu varlete, vysílá dovnitř vazivové trámce, které rozdělují parenchym na pyramidovité lalůčky. Každý lalůček je složen ze dvou až tří stočených semenotvorných kanálků. Tyto slepě začínající kanálky jsou velmi jemné trubičky a jsou složeny v četné kličky. Prostory mezi kličkami jsou vyplněny řídkým vmezeřeným vazivem, obsahujícím zvláštní polygonální Leydigovy buňky (Komárek, 1964).

Mimo různá vývojová stádia spermií jsou ve varleti i další dva důležité typy buněk, a to podpůrné Sertoliho buňky a intersticiální Leydigovy buňky (Reece, 2011).

Leydigovy buňky se podílejí na tvorbě samčího pohlavního hormonu (Komárek, 1964).

Sertoliho buňky poskytují „opatrovnickou péči“ (ochranu a výživu) vyvíjejícím se spermiím. Výběžky Sertoliho buněk obklopují spermatidy a spermatocyty a zajišťují intimní kontakt mezi všemi vývojovými stádii spermií. Z tohoto hlediska se označují jako buňky podpůrné. Sertoliho buňky mají základnu na periferii semenotvorných kanálků a dosahují jejich lumen. Těsné bazální spojení se sousedními buňkami vytváří tzv. krevní bariéru, která kontroluje prostředí uvnitř kanálku a zabraňuje spermiím vstupovat do intersticia (Reece, 2011).

Sertoliho buňky rozdělují semenotvorné kanálky na dvě části. Na vnější bazální část umožňující kontakt s intersticiální tekutinou a poskytující prostor pro zárodečné epitelové buňky – tzv. bazální kompartment a na vnitřní část, ve které jsou prostory mezi Sertoliho buňkami, komunikující centrálně s lumen kanálku – tzv. adluminální kompartment.

Dělení zárodečných epitelových buněk (*spermatogonií*) v bazální části kanálku zajišťuje obměnu a produkci dalších buněk, které musí projít přes spoje Sertoliho buněk, aby mohly postoupit k lumen kanálku. Přitom dochází k dalšímu meiotickému dělení a k vývoji konečné podoby spermií. Sertoliho buňky tvoří dále sekret, který zajišťuje výživu vyvíjejících se spermií (Reece, 2011).

2.3.2 Nadvarlata

Nadvarle (*epididymis*) tvoří kyjovitý útvar připojený vazem k varleti (Komárek, 1964). Nadvarle shromažďuje a ukládá do zásoby spermie. Tvoří jej odvodné kanálky z varlete, které vyúsťují do vývodu nadvarlete. Nadvarle začíná na té části varlete, kde do něho vstupují cévy a nervy. Tato část se nazývá hlava nadvarlete. Dalšími částmi jsou tělo a ocas nadvarlete. Do hlavy nadvarlete se dostávají spermie a varletní tekutina vývodními kanálky z varletní sítě (*rete testis*) (Reece, 2011).

Hlavu nadvarlete tvoří 15 až 20 vývodných kanálků varlete, vystupujících z varletní síně a opouštějících varle na jednom jeho pólu. Tyto kanálky se postupně slévají do společného nadvarletního vývodu, který, složen v četné kličky, vytváří tělo a ocas nadvarlete (Komárek, 1964).

Rozvinutý nadvarletní vývod měří u hospodářských zvířat asi 50 m (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Spermie jsou dopravovány do nadvarlete proudem tekutiny ze semenotvorných kanálků. V nadvarletí spermie dozrávají a získávají schopnost pohybu. V hlavě nadvarlete dochází ke značné resorpci tekutiny ze semenotvorných kanálků (Reece, 2011).

Celým nadvarletem projdou spermie minimálně za 8 až 11 dní (Gamčík a Kozumplík, 1984).

2.3.3 Chámovody

Chámovod (*vas deferens* či *ductus deferens*) je pokračováním vývodného systému z ocasu nadvarlete do pánevního úseku močové trubice (Reece, 2011).

Je tlustostěnná párová trubice tvořená sliznicí, svalovinou a serózou (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Sliznice chámovodu je vystlána cylindrickým epitelem a v koncové, ampulovitě rozšířené části obsahuje četné tubulózní žlázy. Podstatnou složkou stěny chámovodu je silná, kruhově a podélně uspořádaná hladká svalovina, jejímiž peristaltickými stahy jsou při ejakulaci vstříkovány spermie do močové roury (Komárek, 1964).

Jakmile chámovod opustí nadvarle a směřuje do dutiny břišní, je spolu s varletní tepnou, žílou, nervem, lymfatickými cévami a svalem vnitřním zdvihačem varlete (*musculus cremaster internus*) obalen útrobním listem poševního obalu (*tunica vaginalis propria*). Tento celý útvar se nazývá semenný provazec. Útrobní list poševního obalu obklopuje rovněž varlata a epididymis. Vzniká vychlípěním pobřišnice při sestupu varlat do šourku. Po průchodu semenného provazce vnitřním a vnějším prstencem tříselného kanálu se od něho oddělí chámovod a vstoupí do pánevní části uretry (Reece, 2011).

U přežvýkavců se chámovod v konečné části poněkud rozšíří v ampuli chámovodu (*ampulla ductus deferens*), jejíž žláznatá část vylučuje sekret působící příznivě na spermie, které se sem posunují v době pohlavního vzrušení plemeníků (Gamčík a Kozumplík, 1984).

2.3.4 Přídavné pohlavní žlázy

Přídavné pohlavní žlázy jsou uloženy v pánevní oblasti u močové trubice. Jejich sekrety tvoří semennou plazmu. Řízení sekrece je vázáno na hormonální aktivitu parenchymu varlat a produkci testosteronu, vyměšování pak na dobu ejakulace (Věžník, 2004).

Na tvorbě chámu čili ejakulátu se kromě spermií podílejí ještě výměšky zvláštních přídavných pohlavních žláz. Sekrety těchto žláz upravují spermiím optimální prostředí během jejich průchodu močovou rourou, a hlavně pak v pochvě (Komárek, 1964).

Přídavné pohlavní žlázy (*glandulae genitales accessoriae*) produkují sekrety, které jsou vylučovány do pánevní části močové trubice v blízkosti uložení těchto žláz. K přídavným pohlavním žlázám patří ampule chámovodu, měchýřkovité žlázy, prostata a bulbouretrální žlázy (Cowperovy žlázy) (Reece, 2011).

Ampule chámovodu vzniká rozšířením koncové části chámovodu. Její sekret je vyprazdňován do lumen chámovodu (Reece, 2011).

Předstojná žláza (*prostata*) leží na krčku močového měchýře, má lalůčkovitou stavbu. Její řídký, mlékovitý výměšek má typický pach po sperminu a svou alkalickou reakcí neutralizuje prostředí v pochvě (Komárek, 1964).

U býka je tato žláza tvořena nepárovým poměrně malým útvarům a diseminovanou žláznatou strukturou podél močové trubice, kam ústí četnými vývody. Na celkovém objemu ejakulátu se sekret prostaty podílí různou velikostí u býka v rozsahu 4 až 6 % (Věžník, 2004).

Měchýřkovité žlázy jsou párové žlázy, které ústí do pánevní části močové trubice spolu s chámovody. Četné vývody této žlázy ústí přímo do uretry (Reece, 2011).

Leží na dorzální ploše močového měchýře, laterálně od ampule chámovodu. U přežvýkavců mají kompaktní, lalůčkovitou strukturu a nepravidelný tvar (Gamčík a Kozumplík, 1984). Bulbouretrální žlázy (Cowperovy) jsou dvě žlázy rozdílné velikosti a tvaru podle druhové

příslušnosti a ústí obvykle dvěma vývody do močové roury. Jejich hlenovitý sekret, odcházející na počátku ejakulace, činí močovou rouru vazkou a neutralizuje její kyselou reakci (Komárek, 1964).

Párové bulbouretrální žlázy jsou uloženy nejkaudálněji ze všech přídatných pohlavních žláz. Při ejakulaci se sekrety přídatných pohlavních žláz, označované jako semenná plazma, smísí se spermii a tekutinou nadvarlete a vytváří se semeno (Reece, 2011).

Semenná plazma vytváří v samičím pohlavním ústrojí vhodné prostředí pro přežití spermií. Je bohatá na elektrolyty, fruktózu, kyselinu askorbovou a další vitamíny. I když může dojít k oplození spermii, které se nesetkaly se semennou plazmou, mají spermie v semenné plazmě větší oplozovací potenciál (Reece, 2011).

V semenné plazmě je přítomno několik prostaglandinů. Má se za to, že pomáhají oplození dvěma způsoby:

1) prostaglandiny reagují s hlenem sliznice děložního krčku a upravují jej pro průchod spermii a

2) některé z přítomných prostaglandinů způsobují zpětné kontrakce hladké svaloviny a existuje názor, že tím v děloze a vejcovodech napomáhají transportu spermii směrem k vaječnům (Reece, 2011).

Dovede vyrovnávat menší výkyvy pH tak, aby chemická reakce vyhovovala požadavkům spermii. Je zároveň prostředím, do něhož spermie vylučují zplodiny přeměny látkové – kysličník uhličitý a kyselinu mléčnou. Tvoří přirozenou ochranu spermii a umožňuje jejich pohyb, udržuje napětí a rozptýlenost. Do určité míry chrání spermie i proti náhlým změnám teploty. Chemické složení semenné plazmy je velmi pestré. Pro inseminaci je důležitý zejména obsah fruktózy a jejích štěpných produktů, jako jsou kyselina mléčná, kysličník uhličitý (Kovář a Sobek, 1965).

2.3.5 Pyj

Pyj (*penis*) je samčí kopulační, tj. pářící orgán. Močovou trubicí, která je v něm uložena, prochází moč a semeno. Kořen penisu odstupuje pomocí dvou ramen od kaudální hrany sedací kosti. Na kořen navazuje tělo penisu, které je zakončeno žaludem. Hlavní vnitřní strukturou je kavernózní tkáň, známější pod pojmem topořivé těleso pyje. Je to soubor krevních sinusů, oddělených listy vazivové tkáně (Reece, 2011). Zvětšení a prodloužení penisu při erekci je založeno buďto na překrvení kavernózních topořivých těles (hřbec, pes), nebo na vyrovnání esovitého zakřivení penisu bez jeho významného zbytnění (přežvýkavci). Rozmanitost tvaru pyje je též dána různým utvářením žaludu pyje. U býka je žalud pyje málo výrazný, přední část se označuje jako přilba žaludu (*galea glandis*) (Věžník, 2004).

Topořivé těleso je houbovitě struktury, obalené tuhou vazivovou blánou. Do štěrbin a dutinek topořivého tělesa vyústíují tepny, které se při ztopoření, tj. erekci pyje silně naplňují krví (Komárek, 1964).

Býk má fibroelastický typ kopulačního orgánu, převažuje fibroelastická tkáň trámců. V době erekce dochází jen k relativně malému zduření pohlavního údu (Gamčík a Kozumplík, 1984).

U býka je menší poměr erektilní a pojivové tkáně. Močová trubice je uložena na ventrální části těla penisu. U býka se penis stáčí v esovitém ohbí, což dává neztopořenému penisu esovitý tvar. Při erekci pyje dochází k natažení, vyrovnání ohybu (Reece, 2011).

U býka je válcovitý a dosahuje při erekci délky přes jeden metr. V klidu vytváří esovitou kličku, která se při ztopoření vyrovnává. Žalud je u býka nevýrazný (Komárek, 1964).

Žalud se označuje jako přilba žaludu (*galea glandis*), která nasedá na zúžený krček pyje (Gamčík a Kozumplík, 1984). Předkožka (*preputium*) je vchlípená kožní duplikatura, která obklopuje a chrání volnou část pyje (Reece, 2011). Uvnitř je předkožka tvořena sliznicí, která obsahuje četné mazové žlázy, produkující ostře zapáchající sekret (*smegma*). Při předkožkovém otvoru přechází sliznice ve vnější kůži břicha (Komárek, 1964).

Sval vnější zdvihač varlete odstupuje z kaudálních částí vnitřního břišního šikmého svalu. Prochází tříselným kanálem a napojuje se na vnější parietální vrstvu vlastního obalu varlete. Tento sval, zvláště za chladného počasí, zatahuje varlata nahoru k vnějšímu tříselnému prstenci (Reece, 2011).

Vnitřní zdvihač varlete je složen z hladko svalových buněk, obklopuje semenný provazec a napomáhá tak udržet jeho integritu (Reece, 2011).

Sval stahovač močové trubice (*musculus urethralis*) obaluje pánevní část uretry a je pánevním pokračováním hladko svalové stěny močového měchýře. Peristaltická činnost tohoto svalu pomáhá transportu moči a semene pánevní částí močové trubice (Reece, 2011).

Sval urogenitálního systému (*musculus bulbospongiosus*) je příčně pruhovaný sval, který je pokračováním *musculus urethralis*. Vybíhá pouze na krátkou vzdálenost podél močové trubice penisu. Tento sval navazuje svou činností na činnost *musculus urethralis* při vyprazdňování močové trubice (Reece, 2011).

Svaly napřimovače pyje (*musculus ischiocavernosus*) jsou párové příčně pruhované svaly, které odstupují od laterální strany sedacího oblouku a upínají se na tělo penisu. Když se tyto svaly smrští, zatahují penis nahoru ke spodině pánevní. U penisu je většina žil uložených na dorzální straně penisu tlakem uzavřena, což napomáhá ztopoření (Reece, 2011).

Zatahovač pyje (*musculus retractor penis*) je párový hladký sval. Jeho dvě části odstupují ze závěsných vazů konečníku, pokračují dopředu a upínají se na tělo penisu. Po jejich spojení

na spodní straně penisu pokračují dopředu k žaludu. Tento sval zatahuje ochablý penis do předkožky (Reece, 2011).

2.3.6 Šourek

Jedná se o kožní vak, ve kterém jsou uložena varlata (Reece, 2011). Šourek (*scrotum*) u býka leží v krajíně stydké. U přežvýkavců je šourek dlouhý, visí hlouběji a je při bázi zaškrčen. Představuje v podstatě vychlípeninu stěny břišní a má tedy podobnou stavbu. Na povrchu šourku je kůže porostlá jemnými chlupy (Komárek, 1964).

Pod kůží šourku je vrstva buněk hladké svaloviny (*tunica dartos*), která se při poklesu teploty kontrahuje a přidrží varlata blíže k břišní stěně (Reece, 2011).

Pro své kontraktilní schopnosti může vrstva buněk hladké svaloviny (*tunica dartos*) reagovat na změny teploty prostředí. V chladném počasí se smršťuje, svažuje kůži šourku a zmenšuje tím jeho odpařovací plochu. Naopak v teplejším prostředí ochabuje, čímž se odpařovací plocha šourku zvětšuje. Je to mechanismus, který udržuje vnitřní teplotu šourku o 3 – 4 °C nižší než v konečniku. Tato teplota je totiž optimální pro správný vývoj spermií ve varleti (Komárek, 1964).

Šourek je vystlán blánou, nazvanou vnitřní povázka varlete, k níž zevnitř přirůstá nástěnný list poševního obalu. Je to serózní blanka vznikající vychlípením útrobní pobřišnice. Tato pobřišnice se vychlípí do šourku při sestupu varlat (Reece, 2011).

2.4 Ejakulát

Hodnoty ejakulátu u býka:

dle Kováře a Sobka, (1965)

Barva	mléčně bílá
Konzistence	smetanově zrnitá
Objem v ml průměrně	4
Koncentrace spermií miliónů / ml	1000
Specifická hmotnost g / ml	1,033
pH	6,8

Ejakulát (*sperma*) neboli semeno je bělavá a viskózní tekutina složená z části buněčné, tj. spermií a z části tekuté, tj. semenné plazmy (Louda, 2001). Sperma je směs výměšků žláz a orgánů, které se účastní tvorby samčích pohlavních buněk a ejakulace. Skládá se v podstatě

ze dvou hlavních součástí, tj. ze semenné plazmy a ze spermií. Obsahuje 90 až 98 % vody (Kovář a Sobek, 1965).

Chemické složení spermatu je charakterizováno tím, že hlavní součástí je bílkovinný dusík a lipoidy. Z dalších látek je ve spermatu poměrně značné množství cukrů, draslíku, sodíku a chlóru. Obsah kyseliny mléčné kolísá se stářím ejakulátu. Koncentrace vodíkových iontů se pohybuje u zdravého spermatu ve fyziologických hranicích 6,2 – 7,8 pH a je do značné míry závislá na druhové příslušnosti. Zejména ji ovlivňuje množství sekretu přídatných žláz, obsažených v ejakulátu. U plemenných býků je chemická reakce spermatu slabě kyselá v rozmezí 6,5 pH – 6,9 pH. Zvýšení i snížení pH mimo tyto hranice je třeba vždy pokládat za patologické (Kovář a Sobek, 1965).

Z formovaných elementů obsahuje ejakulát kromě spermií ještě odloupané epitele, leukocyty aj. Největší podíl ejakulátu tvoří voda (90 až 98 % celkové hmotnosti), z anorganických látek obsahuje sodík, draslík, chlór, fosfor, vápník, síru aj., z organických látek bílkoviny, tuky, cukry a některé fermenty. Chemické složení ejakulátu, jeho množství, koncentrace spermií a jejich životnost jsou závislé na mnoha činitelích, jako je stav výživy, stáří, ustájení, pohyb, pohlavní využívání samce aj. (Komárek, 1964).

Celkový objem ejakulátu je dán především množstvím semenné plazmy. Toto množství kolísá zejména podle druhů hospodářských zvířat. Určité, i když podstatně menší odchylky v množství ejakulátu lze pozorovat u jednotlivého pleménika vlivem prostředí, krmení, stáří a kvality sexuálního podráždění (Kovář a Sobek, 1965).

U býka trvá ejakulace velmi krátkou dobu. Většina ejakulátu jsou sekrety váčků semenných, sekrety prostaty tvoří jen malou část. Po celou dobu pohlavního vzrušení se vylučují sekrety uretrálních žláz. Spermie jsou ejakulovány současně s ostatními sekrety (Kovář a Sobek, 1965).

Dobré býčí sperma je barvy mléčné, bělavé, v některých případech šedobílé, mírně nazelenalé a v suchém období často bíložluté. Žlutě je sperma zbarveno karotenem obsaženým v krmivu. Špatné sperma nehodící se k inseminaci bývá zbarveno silně žlutě, žlutozeleně nebo zeleně, což bývá zpravidla způsobeno příměsí hnisu, moče nebo znečištěním množstvím bakteriální flóry. Nežádoucí je i sperma zbarvené narůžověle nebo červeně. Při tomto zbarvení je podezření na pohlavní nákazy nebo oděrky a poranění pyje, způsobné příliš těsnou, drsnou nebo nečistou vložkou v umělé pochvě. Při zastaralých poraněních vývodních cest pohlavních orgánů bývá sperma barvy hnědočervené. Řídké sperma, tj. oligospermie bývá barvy našedlé nebo s namodralým odstínem (Polák, 1961).

2.4.1 Spermie

Spermie býka se skládají z hlavičky, střední části a bičíku. Délka spermie je 65 μm , délka hlavičky spermie býka je přibližně 10 μm a šířka 5 μm (Hofírek a kol., 2009).

Hlavička je rozdělena do čtyř oblastí: apikální, pre-ekvatoriální, ekvatoriální a post-ekvatoriální části (Guillou a kol., 2013). Základem hlavičky je kondenzovaná nukleoplazma krytá jadernou membránou. Na apikální konec hlavičky nasedá akrozom, který pokrývá téměř polovinu hlavičky spermie. Obsahuje enzymy, které napomáhají průniku spermie přes obaly vajíčka.

Bazální část hlavičky, která se též označuje jako post nukleární čepička, má vykrojení, označované jako implantační jamka. Do ní zapadá rozšířená část bičíku, krček, označovaný jako implantační talíř, tvořený segmentovanými chordami. Tato část vzniká z proximálního centriolu. Další část bičíku tvoří spojovací část, hlavní část a terminální část. Středem bičíku probíhají 2 dutá vlákna – mikrotubuly, kolem nich se nachází prstenec 9 dvojic vláken (dublety). Jedno je plné, druhé duté (mikrotubulózní) a jsou nezbytné pro pohyb spermii (Hofírek a kol., 2009).

Mezi nejdůležitější orgány spermie, nacházející se ve spojovací části bičíku s více buněčnými funkcemi, patří mitochondrie. Jejich hlavní funkcí je produkce ATP, vstupují také do mnoha fyziologických procesů jako je homeostáza kalcia, apoptóza, metabolismus lipidů a aminokyselin a další (Green a Watson, 2001). Mitochondrie jsou považovány za nejdůležitější orgány pro hodnocení kvality spermii, mají výrazný vliv na funkce spermie, změny v mitochondriální struktuře spermii ovlivňují motilitu spermie (Piomboni a kol., 2012) a mohou mít vliv na šanci spermie oplodnit vajíčko (Guillou a kol., 2013).

Celý povrch spermie pokrývá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která se skládá převážně z lipidů a proteinů. Hlavička spermie je obklopena plazmatickou membránou, která je v kontaktu se semennou plazmou. Převažujícími lipidy jsou fosfolipidy a cholesterol (Hofírek a kol., 2009). Poměr cholesterolu a fosfolipidu v cytoplazmatické membráně spermie je důležitým determinantem tekutosti a stability buněčné membrány během působení nízkých teplot (Watson, 1981). Cholesterol je hydrofobní látka ve vodě nerozpustná, má ale multifunkční vliv na buněčnou membránu spermie včetně její stabilizace, snížení propustnosti a další (Crockett, 1998).

Většina spermii v ejakulátu nikdy nedosáhne vejcovodu. Pouze několik desítek spermii se přiblíží k vajíčku a pouze jedna se nakonec účastní oplození. Semeno odebrané pro

umělou inseminaci je ředěno, aby byl získán větší počet inseminačních dávek. Počet spermií požadovaných pro umělou inseminaci druhově kolísá, ale blíží se 10 milionům u skotu (Reece, 2011).

2.4.2 Semenná plazma

Semenná plazma obsahuje dekapacitační faktory, které pravděpodobně částečně zabraňují kryokapacitaci nebo předčasně kapacitaci spermií. Lipidy jsou základní složkou ejakulátu, přispívají k membránové struktuře, metabolismu spermií a jejich schopnosti kapacitace a oplození samičí gamety (Therrien a kol., 2013). Cholesterol je významným volným steroidem v ejakulátu býků (Parks a kol., 1987), vyplavování cholesterolu z membrány spermií býků umožňuje kapacitaci (Ehrenwald a kol., 1988).

Podle Muino-Blanco a kol. (2008) semenná plazma stabilizuje membránu spermií berana během *in vitro* zpracování a částečně zmírňuje poškození vyvolané vysokým stupněm ředění, mrazením a oxidačním stresem. El-Hajj Ghaoui a kol. (2007) zase zjistili, že semenná plazma odvrací poškození beraních spermií mrazených s přidavkem kryoprotektantů a zlepšuje jejich *in vitro* a *in vivo* oplozovací schopnost (Maxwell a Johnson, 1999). Oproti tomuto závěru účinky semenné plazmy na spermie býků prokázány nebyly (Leahy a de Graaf, 2012).

2.4.3 Hodnocení ejakulátu

Po odběru ejakulátu od býka se v běžné laboratorní praxi využívá vizuálního odhadu procenta pohyblivých spermií ve vzorku spermatu, aby se zamezilo určité variabilitě dat (subjektivní chybě), využívá se také hodnocení pohyblivosti spermií buď fotografickou analýzou, nebo počítačem řízenou analýzou spermatu CASA (Graham a Mocé, 2008). Po odběru se také hodnotí životaschopnost spermií pomocí hypoosmotického testu (HOS – hypoosmotic swelling test) a v neposlední řadě také podíl živých spermií a % zastoupení apoptotických spermií (Saragusty a kol., 2009).

Proces výroby ID snižuje motilitu spermií, tudíž počáteční kvalita ejakulátu je rozhodující pro výslednou kvalitu ejakulátu po rozmrazení (Beran a kol., 2011).

Konvenční postup hodnocení ejakulátu, prováděný před a po kryokonzervaci, zahrnuje stanovení koncentrace spermií, pohyblivosti a morfologie. Tyto parametry většinou odhalí

zřejmé případy snížené plodnosti nebo neplodnosti býků (Rodriguez-Martinez, 1998). Z biologického hlediska, pouze plně životaschopná spermie je potenciaálně schopná oplození, proto většina doposud užívaných metod byla založena na posuzování životaschopnosti spermií (Věžník a kol., 2004).

Mezi testy přežitelnosti spermií řadíme zejména dlouhodobý chladový a krátkodobý tepelný test přežitelnosti spermií, test na odolnost vůči chladovému šoku a stanovení procenta živých a mrtvých spermií barvením a HOS (Hypo Osmotic Swelling) test (Věžník a kol., 2004; Hoflack a kol., 2006; Gillan a kol., 2008; Sutkeviciene a kol., 2009).

2.4.3.1 Makroskopické vyšetření

Objem ejakulátu určujeme v kalibrové nádobě či zkumavce u zvířat s malým objemem ejakulátu je vhodnou metodou použití mikropipety. Viskozitu subjektivně posuzujeme nakloněním odběrové nádoby a zhodnocením ulpívání tekutiny na stěně. Barvu ejakulátu hodnotíme subjektivně, případně porovnáváním se standardizovanou škálou. Pach a přítomnost cizích příměsí posuzujeme sensoricky. Hodnotu pH vyšetřujeme pHmetrem, nebo diagnostickými proužky se škálou odpovídající rozmezí hodnot pH semene, tj. přibližně v rozmezí hodnot pH 6 až 8 (Kos a kol., 2019).

2.4.3.2 Mikroskopické vyšetření

Mezi mikroskopická vyšetření ejakulátu řadíme měření koncentrace spermií, hodnocení motility, vyšetření integrity povrchových membrán spermií a morfologické vyšetření.

2.4.3.2.1 Koncentrace

Měření koncentrace spermií je velmi důležitý krok pro hodnocení ejakulátu a jeho následné zpracování při přípravě inseminačních dávek. Stanovuje se počet spermií v mm^3 . Koncentraci spermií je možno stanovit fotometricky, hemocytometricky, nebo počítačově. Fotometricky hodnotíme stupeň zákalu, který vznikne po standardním naředění nativního semene. Tento způsob stanovení koncentrace je objektivní, ale vyžaduje vytvoření kalibrační křivky absorbance přesnější hemocytometrickou metodou. Metoda se běžně používá v inseminačních stanicích.

Hemocytometrické stanovení v počítačích komůrkách je základní vyšetřovací metoda stanovené hodnoty jsou poměrně přesné, nicméně provedení je dosti pracné. Kromě Bürkerovy počítač komůrky se ve spermatologii používají i další typy – Thomova, Neubauerova. Semeno je nutné nejdříve naředit Hayemovým roztokem, nebo hypertonickým roztokem NaCl k devitalizaci spermií a důkladně jej homogenizovat. V závislosti na předpokládané koncentraci semene podle druhu ředíme 100x nebo 200x. Naředěný vzorek nanese do Bürkerovy komůrky a vyhodnocujeme pod zvětšením 200x nebo 400x. Do analýzy zahrnujeme spermie, které se nacházejí ve čtverci o ploše 1/25 nebo 1/16 mm². Počítáme všechny spermie, jejichž hlavičky se nachází zcela uvnitř stanoveného sektoru – komůrky, případně se dotýkají z vnějšku dvou sousedních stran příslušného čtverce (Kos a kol., 2019).

2.4.3.2.2 Motilita

Termínem motilita obecně označujeme jakoukoli schopnost spermií se pohybovat. Motilitou v užším slova smyslu rozumíme pouze tzv. progresivní motilitu, tedy spermie se pohybuje přímočaře dopředu za hlavičkou. Tento typ pohybu se vyjadřuje v procentech. Dále rozlišujeme patologické formy pohybu (např. kruhový, trhavý, přerušovaný, oscilační, retrogradní). Výsledkem je procentuální hodnota určená posouzením pohybu minimálně 100 spermií při zvětšení 200x. Pro správné posouzení motility je nutno v případě koncentrovanějších ejakulátů semeno před vyšetřením naředit tak, aby bylo možno hodnotit pohyb jednotlivých spermií (většinou 5 až 20x).

Pro detailnější analýzu pohybu je možno využít i speciální analyzátor CASA (computer assisted sperm analysis), který je schopen diferencovat různé formy pohybu a jeho rychlost na základě předem definovaných parametrů. U velmi koncentrovaných ejakulátů slouží k orientačnímu zhodnocení pohyblivosti spermií stanovení tzv. vířivého pohybu na hodinovém sklíčku, nebo podložním sklíčku se speciální jamkou. V tomto případě posuzujeme kvalitu pohybu pomocí křížkové škály a označujeme je + až +++. Toto vyšetření se provádí u neředěného ejakulátu. Stanovení objemu ejakulátu, koncentrace a motility spermií jsou základní veličiny zjišťované po každém odběru při výrobě inseminačních dávek (Kos a kol., 2019).

2.4.3.2.3 Integrita povrchových membrán

Toto vyšetření spočívá v mikroskopickém posouzení spermií, u kterých došlo k obarvení pomocí kombinace barviv Eosin, Nigrosin. Nigrosin obarví pozadí preparátu. Eosin proniká u mrtvých spermií přes membránu a obarví je do červena nebo červeno-bíla. Neobarvené, bílé spermie jsou hodnoceny jako živé s intaktní membránou. (Kos a kol., 2019).

2.4.3.2.4 Morfologické vlastnosti

Morfologické vyšetření spermií patří mezi nejobektivnější metody mikroskopického posuzování ejakulátu. Před samotným hodnocením je nutné vytvořit kvalitní nátěr spermatu na sklíčko a obarvit jej. Používá se barvení dle Brandon-Farellyho, nebo dle Karrase, anebo Hemacolor. Posuzujeme primární změny, které vznikají během spermatogeneze – změny na hlavičce, středním mitochondriálním oddílu, proximální kapka, stočený ocásek. Změny sekundární jsou většinou asociovány s ocáskem, vznikají důsledkem nedokončeného zrání, nebo při odběru a zpracování semene – distální kapka, jednoduše zahnutý ocásek, chybějící ocásek (Kos a kol., 2019).

2.4.4 Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu

Kvalita ejakulátu je ovlivněna mnoha faktory: vnitřními, jako je např. plemeno, genotyp, individualita a věk plemeníka (Thara a Nair, 2007; Beran a kol., 2012; Härtlová a kol., 2013; Stádník a kol., 2014), a vnějšími, ke kterým patří zejména klimatické podmínky, podnebí, podmínky prostředí (Mathevon a kol., 1998; Nichi a kol., 2006; Karoui a kol., 2011), četnost odběru ejakulátu (Kommissurd a Berg, 1996), technologie ustájení, management chovu (Stádník a kol., 2014) a výživa plemeníků (Kelso a kol., 1997; Louda a kol., 2007).

Odběr ejakulátu a jeho následné zpracování na ID představují další potenciální rizika. Nesmí dojít k chladovému šoku, musí se postupovat velmi rychle a současně šetrně a přesně, proto je snaha nalézt postup hodnocení spermatu, který by byl rychlý, citlivý ke spermiím a jednoduchý na provedení (Januskauskas a kol., 2000). Konvenční postup hodnocení ejakulátu, prováděný před a po kryokonzervaci, zahrnuje stanovení množství a hustoty ejakulátu, koncentrace spermií a jejich pohyblivosti či morfologie (Bhoite a kol., 2008; Karoui a kol., 2011). Tyto parametry většinou odhalí zřejmé případy snížené plodnosti nebo neplodnosti býků (Rodríguez-Martínez, 1998).

Z biologického hlediska je potencionálně schopná oplodnit vajíčko pouze plně životaschopná spermie, proto většina doposud užívaných metod byla založena na sledování

a hodnocení životaschopnosti spermií (Januskauskas a kol., 2000), jako například: krátkodobý termodynamický test přežitelnosti spermií (Maurya a Tuli, 2003; Beran a kol., 2012), test na odolnost spermií vůči chladovému šoku (Stádník a kol., 2015a), hypo-osmotický test (Přinosilová a kol., 2014) a zjištění podílu živých a mrtvých spermií barvením (Gillan a kol., 2008; Hoflack a kol., 2006; Beran a kol., 2012).

Po makroskopickém a mikroskopickém posouzení kvality ejakulátu následuje jeho ředění, plnění do pejet, zchlazení a zmrazení. Tyto čtyři poslední fáze výroby ID mají zásadní vliv na přežitelnost spermií v dávce, zejména se pak projevuje vliv složení použitého ředidla (Siddique a kol., 2006).

2.4.4.1 Vliv býka

Kvalita ejakulátu, reprodukční schopnost a plodnost jednotlivých býků je velmi rozdílná, vyplývá z individuálních vlastností pleménika, které jsou dány jeho temperamentem. Pro plemenitbu jsou nejvhodnější býci silného vyrovnaného temperamentu (Hofírek a kol., 2009).

Vliv plemene na pohlavní aktivitu a plodnost je méně významný z důvodu nízké heritability znaků pro jednotlivé reprodukční funkce (Louda a kol., 2007). Samci plemen mléčného skotu jsou obecně aktivnější než býci plemen masných. Na druhé straně jsou býci méně prošlechtěných plemen odolnější k vlivům vnějšího prostředí (Stádník a kol., 2014).

Dále je pro vlastnosti ejakulátu důležitý věk plemenných býků. Obecně platí, že produkce a kvalita spermatu se s věkem zvyšuje, a to až do sedmi let věku (Brito a kol., 2002). K poklesu aktivity a množství ejakulátu dochází po 10. roku věku (Mathevon a kol., 1998).

Reprodukční výkonnost je výrazem celkového zdraví zvířete, a proto je možné říci, že veškeré faktory ovlivňující celkový zdravotní stav a pohodu zvířat ovlivňují zároveň jejich pohlavní aktivitu a plodnost. Faktory, které mají vliv na reprodukci a kvalitu ejakulátu u zvířat, jsou klasifikovány jako vnitřní a vnější faktory. Ovlivňující činitelé jsou řazeny na faktory vnitřní – plemeno, genotyp, individualita a věk býka. Klimatické podmínky, podnebí, technologie ustájení, management chovu, výživa zvířat, frekvence odběru spermatu a manipulace s ním, jsou faktory vnější (Bronson, 1989; Hafez a Hafez, 2000; Hofírek a kol., 2009).

2.4.4.1.1 Činitelé vnitřního prostředí

2.4.4.1.1.1 Plemeno

Plemeno chovaného skotu je dáno strategií chovu. Poněvadž plemeno má k užitkovosti úzký vztah, nelze tyto faktory v působení na reprodukci striktně oddělit. Přímý vliv samotného plemene na pohlavní aktivitu a plodnost je méně významný z důvodu nízké heritability pro jednotlivé reprodukční funkce (Hofírek a kol., 2009).

Stejně jako u ostatních druhů hospodářských zvířat, lze plemena skotu dělit dle mnoha hledisek. Zejména podle fylogenetického původu, podle země původu a geografického rozšíření, užitkovosti a stupně prošlechtění (Sambraus, 2006). Často jsou pozorovány rozdíly v sexuální výkonnosti u jednotlivých plemen a linií skotu. Býci mléčných a prošlechtěných plemen pohlavně dospívají rychleji než býci masných plemen (Hofírek a kol., 2009). Samci mléčných plemen skotu jsou obecně aktivnější než samci masných plemen (Hafez a Hafez, 2000). Na druhé straně jsou býci méně prošlechtěných plemen odolnější k působení nepříznivých vlivů vnějšího prostředí (Hofírek a kol., 2009).

Průměrné rozdíly mezi plemeny jsou způsobeny účinkem různých genů přítomných v různé frekvenci u jednotlivých plemen. Plemena, která byla izolována od sebe navzájem, a to buď rodokmenovou překážkou, vlivem lidské šlechtitelské práce nebo geografickou bariérou, se rozcházejí ve frekvenci genů, které ovlivňují expresi mnoha vlastností (Neely a kol., 1982).

2.4.4.1.1.2 Genotyp

Genotypem označujeme soubor všech genetických informací organismu, který velmi závisí na interakcích prostředí. Projevuje se, když genotypy (jednotlivci, odrůdy, plemena atd.) ukazují rozdílné fenotypové odpovědi na jedno nebo více prostředí. Vliv prostředí na genotyp v interakci s velmi odlišnými genotypy a prostředími je dobře známý a zdokumentovaný v oboru rostlin i živočichů. Studie genotypu a environmentálních interakcí jsou stále více důležité, protože genotypy hospodářských zvířat jsou nyní ovlivňovány nejrůznějšími prostředími (Bryant a kol., 2005). Kromě toho, Dominika a kol. (2001) předpokládají, že existují různé genetické vztahy mezi různými vlastnostmi v jednom konkrétním prostředí.

Castillo – Juarez a kol (2002) uvádí, že rozdíly v řízení mezi dvěma prostředími způsobují úpravu genetických expresí sledovaných vlastností. Problémem zůstává,

jak porozumět a předvídat, do jaké míry zdánlivě malé genetické změny životního prostředí můžou vyvolat interakci biologického a ekonomického významu.

2.4.4.1.1.3 Individualita

Pohlavní aktivita a plodnost jednotlivých býků je velmi rozdílná. Vyplývá z individuálních vlastností býka, které jsou dány jeho temperamentem (Hofírek a kol., 2009). Temperament je charakterizován jako stupeň dráždivosti a reaktivnosti nervové soustavy na základě vzruchu a útlumu. Zakládá schopnost zvířete vnímat rozdílné podněty vnějšího prostředí a adaptovat se bez neúměrných reakcí. Z definice temperamentu, společně s vlivem endokrinního systému vyplývá také poměrně úzký vztah ke komplexi (Majzlík, 2000).

Pro plemenitbu jsou nejvhodnější býci silného vyrovnaného živého (sangvinik) a mírného (flegmatik) typu. Méně vhodné jsou plemeničky prudkého typu (cholerik) a zcela nevhodná jsou zvířata slabého nervového typu (melancholik) (Hofírek a kol., 2009).

Temperament je velmi důležitý pro využívání zvířete, spolurozhoduje o charakteru zvířete, schopnosti k učení a výcviku a má jak přímý vztah k využití zvířete (odběr ejakulátu u býka), tak nepřímý (*libido sexualis*, chování býka v odběrové místnosti, ochota k páření). Individualita a temperament jsou jednak výsledkem dědičného založení (vazbou na druh, plemeno a pohlaví zvířete), ale jsou též ovlivněny podmínkami prostředí odchovu a zacházením ze strany zootechnika či ošetřovatele (Majzlík, 2000).

2.4.4.1.1.4 Věk

Pohlavní funkce mohou probíhat až po nástupu pohlavní dospělosti zvířat, když dojde k synchronizaci citlivosti gonád a regulačních mechanismů a trvají jen určité období života zvířat (Hafez a Hafez, 2000).

Většina světových studií uvádí, že věk chovných býků je velmi důležitý pro vlastnosti ejakulátu. Obecně platí, že produkce a kvalita spermatu se zvyšuje s věkem býka, a to až do věku 7 let. Od 7 do 10 let se množství nijak výrazně nemění (Mathevon a kol., 1998; Brito a kol., 2002; Beran a kol., 2011). Zvýšení množství ejakulátu u starších zvířat lze vysvětlit zvětšováním těla a současně rychlým růstem varlat (Fuerst-Waltl a kol., 2006).

Z hlediska kvality ejakulátu, Mathevon a kol., (1998) pozorovali zvýšení koncentrace spermií až do 22 měsíce věku. V jiné studii (Brito a kol., 2002) věk býka nevykazoval žádný

účinek na koncentraci spermií. Ani úroveň pohyblivosti spermií nemá pravděpodobně přímou korelaci s věkem býka, protože výsledky jednotlivých studií se různí. Velmi výrazný pokles aktivity a množství ejakulátu nastává až po desátém roku věku (Mathevon a kol., 1998; Brito a kol., 2002; Balic a kol., 2012).

Mnoho autorů uvádí, že s rostoucím věkem se mohou objevit drobné defekty spermií, ale ve většině případů se vady naopak s věkem snižují (Soderquist a kol., 1996).

2.4.4.1.2 Činitelé vnějšího prostředí

Do podmínek vnějšího prostředí lze zařadit klimatické podmínky, roční období, technologie ustájení, ošetřování, způsob odchovu, sociální hierarchii ve stádě, odběr ejakulátu a manipulaci s ním (Brito a kol., 2002).

Jednotlivé faktory vnějšího prostředí působí na organismus zvířete jako celek a vyvolávají určitou reakci. Reakce zvířete je odvozena od tělesné konstituce, dědičného založení, zdravotního stavu, užitkovosti a stupně fyzické kondice. Účinky vlivů vnějšího prostředí se projevují prostřednictvím exteroceptorů smyslových orgánů, kterými dochází k dráždění kůry velkého mozku a hypotalamo-hypofyzárního systému, který řídí průběh a zajišťuje správný chod pohlavních funkcí (Louda a kol., 2007).

2.4.4.1.2.1 Klimatické podmínky

Z klimatických faktorů má vztah k reprodukci především charakter podnebí a roční období, jmenovitě světlo, teplota, vlhkost a atmosférický tlak (Hofírek a kol., 2009).

Světová populace skotu se nachází v různých klimatických pásmech. Vliv životního prostředí je vázáný na určité klimatické podmínky, které byly intenzivně zkoumány jak u různých plemen, tak v různých zemích. V mnoha studiích roční období významně ovlivnilo produkci spermatu. Například Mathevon a kol. (1998) detekovali vyšší koncentraci spermií, motilitu spermií i celkový počet spermií v ejakulátu býků v zimě a na jaře než v létě. Nichi a kol. (2006) zjistili vyšší podíl patologických spermií u simentálských býků v letních měsících oproti zimním měsícům. Kunavongkrit a kol. (2005) detekovali nižší koncentraci spermií v ejakulátu kanců v létě než v zimě. Naproti tomu Karagiannidis a kol. (2000) publikovali zlepšení charakteristik spermatu kozlů během léta a podzimu.

Nejen teplota v den odběru, ale také v průběhu zrání spermií v nadvarletí nebo v průběhu spermatogeneze (do asi 70 dní před odběrem) má vliv na produkci spermatu (Ball a Peters, 2004).

Reprodukce skotu může být ovlivněna tepelným stresem. Při vysoké teplotě nebo vlhkosti, může dojít k nefunkčnosti termoregulačních mechanismů a následkem toho ke zvýšení vnitřní teploty nad fyziologické meze (Nardone a kol., 2010). Tepelný stres může snížit počet úspěšných zabřeznutí a zvýšení embryonální mortality u krav (Wolfenson a kol., 2000; Chebel a kol., 2004; Hansen a kol., 2007), a snížit kvalitu semene býků (Mathevon a kol., 1998; Nichi a kol., 2006).

Z hlediska vlivu klimatických podmínek na hospodářská zvířata je známo, že vysoké a nízké okolní teploty mohou být zodpovědné za snížení plodnosti. Teplota šourku je regulována nezávisle na tělesné teplotě těla pomocí termoreceptorů v šourku a efektorů ve formě aktivity svalů *tunica dartos*. Nicméně tyto efektorové mechanismy jsou nedostatečné k udržení teploty šourku při extrémních teplotách, nebo extrémních mrazech. Rychle tak může dojít k znehodnocení spermatu (dekapitace spermií) a tím i ke snížení plodnosti teplem nebo chladem (Gordon, 2004). Plemenní býci jsou schopni kompenzovat tepelné kolísání od 2,1 do 21,6 °C bez vážnějších změn v procesu spermiogeneze. Negativní vliv mají extrémní teploty působící dlouhodobě. Teploty nad 22 °C působící dlouhodobě vedou k degenerativním změnám spermatogenního epitelu a současně se vlivem tepelného stresu snižuje celkový metabolismus. Tato zátěž vede ke snížení produkce gonadotropních hormonů v adenohipofýze (Hofírek a kol., 2009).

Velmi důležitým faktorem je světlo, kdy prostřednictvím melatoninu z epifýzy ovlivňuje řízení pohlavních funkcí. Uplatňuje se délka světelného dne (zejména u zvířat s výraznou sezónní aktivitou), ale také jeho intenzita. Intenzivní světelné záření stimuluje celkový metabolismus organismu i činnost autonomní nervové soustavy a tím i celého hormonálního řízení. Dlouhotrvající nedostatek světla snižuje citlivost sexuálních center a tím vede ke snížení plodnosti samce. Při dlouhodobém pobytu v tmavém prostředí bez přístupu slunečního světla a pobytu na čerstvém vzduchu vznikají vážné poruchy spermiogeneze (Hofírek a kol., 2009).

2.4.4.1.2.2 Technologie ustájení

Lze rozlišit několik typů ustájení, volné či vazné, popř. vazné ustájení s pastvou. Záleží také na konstrukci vrchní stavby a střechy, tzn. množství světla v ustájovacím zařízení.

Z hlediska reprodukce dosahuje se lepší úrovně na volném ustájení, popřípadě pastevním chovu. Lze pozorovat intenzivnější příznaky říje, samci mají mnohdy kvalitnější ejakulát s vysokým podílem oplození schopných spermií, avšak identifikace říjících se zvířat může být ztížena (Říha, 2004).

Nepříznivé mikroklimatické podmínky ustájovacích prostor, především relativní vlhkost a teplota prostorů, ale také výskyt vysokého obsahu čpavku a silné proudění vzduchu, mohou též negativně ovlivňovat reprodukční funkce (Hofírek a kol., 2009).

2.4.4.1.2.3 Výživa zvířat

Účinky nutričního omezení na plodnost jsou pozoruhodné a markantní, více však u samic než u samců. Obecně platí, že nejdůležitějším konečným faktorem je dostupnost krmné dávky a její vliv na energetickou bilanci, neboť reprodukce je energeticky vysoce náročná (Bronson, 2009). Výživové nedostatky mohou oddálit nástup puberty a negativně ovlivnit tvorbu a vlastnosti samčího spermatu. Mladé a rostoucí zvíře je mnohem náchylnější na nutriční stres než starší zvíře. Kromě toho, nevyhovující nutriční podmínky ovlivňují více endokrinní funkci varlete než samotnou spermatogenezi. Mezi běžné výživové faktory patří počet přijatých kalorií v krmivu, množství bílkovin a živin. Velkou roli hraje nedostatek vitamínů, minerálních látek, nebo zvýšený příjem toxických látek (Hafez a Hafez, 2000).

Požadovaný průběh pohlavní aktivity a produkce kvalitního semene vyžaduje, aby se plemenným býkům zkrmovaly takové krmné dávky, které zajistí výživu odpovídající úrovně, poměr energie a dusíkatých živin i obsah důležitých vitamínů A, D a minerálních látek. Dietetická hodnota krmiv ovlivňuje objem a kvalitu produkovaného spermatu. V krmných dávkách plemenných býků je používána směs jadrných krmiv v množství 2,0 až 3,5 kg, podle kvality a koncentrace živin v objemných krmivech. Doporučovanou součástí jadrných krmných směsí je z obilovin oves a více komponent s vyšším obsahem bílkovin (Louda a kol., 2007). Délka spermatogeneze u býka je 54 dnů (Saunders, 2002), a proto je doporučení dodávat býkům přiměřenou výživu, bez jakýchkoliv deficitů v dodávkách určitých živin během 2 měsíců před plánovaným zařazením do chovu.

Poruchy reprodukce mají obvykle blízký vztah k pochybení ve výživě. Jako kontrolu výživného stavu slouží zjišťování tělesné kondice (BCS) býků (Beran a kol., 2011) a metabolická vyšetření (Beran a kol., 2013; Říha, 2004)

Kendall a kol. (2000) se zabývali účinky minerálů (zinek, kobalt, selen) na motilitu spermií, procento živých spermií a jejich membránovou integritu. U samců, kterým byl

do krmné dávky přidáván zinek, kobalt a selen, byla detekována zvýšená koncentrace glutationu peroxidázy v semenné plazmě, zvýšená motilita, podíl živých spermií, resp. spermií s intaktní membránou. U samců má největší význam zásobením fosforem a jeho poměr k vápníku. Při jeho nedostatku se objevují poruchy libida a zhoršuje se kvalita ejakulátu, především motilita spermií (Hofírek a kol., 2009).

Zajímavé je, že společně s věkem dochází v semenné plazmě býků k významnému snížení koncentrací polynenasycených mastných kyselin (kyselina arachnidová, kyselina dekosahexanová), společně s úbytkem antioxidantních enzymů (Kelso a kol., 1997), což podnítilo obchodní zájem v používání krmných doplňků na bázi rybího tuku a větší procento začleňování antioxidantů a vitamínu E ke zvýšení plodnosti. Důvodem je skutečnost, že tyto mastné kyseliny jsou důležité pro integritu membrány spermií, jejich pohyblivost a životnost (Rooke a kol., 2001).

2.4.4.1.2.4 Frekvence odběru ejakulátu

Intenzita využívání býka, jinak také nazývaná exploatace, se liší nejenom věkem a kondicí zvířete, ale i jeho zdravotním stavem. Škodlivé je jak nadměrné, tak nedostatečné využívání plemenika. Nadměrným využíváním býka se sníží libido, množství i koncentrace spermií v ejakulátu, zhorší se přežitelnost a rezistence spermií. Oproti tomu nedostatečným využíváním býka, spermie setrvávají příliš dlouhou dobu v nadvarleti. I když jsou spermie v ocasu nadvarlete v anabióze, bazální metabolické procesy probíhají, dochází ke stárnutí spermií a k degradaci povrchové membrány spermie, která vede ke snížení rezistence (Hofírek a kol., 2009).

Bylo zjištěno, že doba sexuální přípravy býka před vlastním odběrem může mít významný vliv na množství ejakulátu, počet vyrobených dávek z odebraného ejakulátu a motilitu spermií po rozmrazení (Kommisurud a Berg, 1996). To může vysvětlit, proč vodící technik býka a technik odebírající semeno mají zásadní vliv na jeho kvalitu a množství, protože jsou zodpovědní za sexuální stimulaci a přípravu (Mathevon a kol., 1998).

2.4.4.2 Vliv zpracování ejakulátu

V rámci výroby dávek je třeba maximalizovat genetický potenciál daného plemenného býka využitím optimálních technologických postupů. Udržení oplozovací schopnosti

ejakulátu v průběhu dlouhého a náročného procesu jeho zpracování, ředění a mrazení, při výrobě inseminační dávky či po jejím rozmrazení může zajistit vyšší úroveň zabřezávání dojnic, snížit spotřebu inseminačních dávek, zkrátit délku mezidobí a zlepšit tak ekonomickou efektivitu jejich chovu (Vera-Munoz a kol., 2009).

Proces samotné kryokonzervace zhoršuje funkci spermií, což může vést ke snížení jejich oplozovací schopnosti (Celeghini a kol., 2008), proto je nutné zpracovávat v rámci výroby inseminačních dávek pouze ejakulát dostatečné kvality, která je hodnocena, pokud možno objektivně (Šimoník a kol., 2015) a zpravidla je dodržována hranice minimální hustoty spermií $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ při 70% motilitě. Nutností procesu mrazení je předcházet letálním intracelulárním ledovým formacím použitím vhodných ředidel a co nejvíce tak omezit riziko vzniku chladového šoku a poškození membrány během mrazení (Amirat a kol., 2004).

Zpočátku bylo býčí sperma před použitím ředěno a konzervováno jen krátkodobě, po dobu maximálně 96 hod. (Verberckmoes a kol., 2005). Byly prokázány negativní změny v buněčných membránách spermií v závislosti na délce uložení ID a na použitém ředidle (Tapia a kol., 2012). K rozhodující kvalitativní změně ve využití inseminace došlo teprve po úspěšném vývoji metod kryokonzervace a dlouhodobého uchovávání ID býků v tekutém dusíku při teplotě $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ a jejím zavedením do široké praxe. Soustavné zvyšování intenzity zapouštění a výsledků březosti jak u krav, tak zejména u jalovic, vedlo k trvalému vzestupu počtu narozených telat a k celkovému zintenzivnění reprodukce skotu. Inseminace v tomto směru sehrála nezastupitelnou roli při stupňování produkce a ekonomiky chovu skotu (Louda a kol., 2008).

Inseminace otevřela cestu k realizaci zásadních změn šlechtitelských postupů a iniciovala rozvoj dalších biotechnologických metod, jako například systémy řízení říjového cyklu (Stádník a kol., 2008; Nowicki a kol., 2017), nové postupy mrazení ejakulátu (Arav a kol., 2002), sexaci spermií (De Jarnette, 2010), odběr, mrazení, kultivaci a přenos embryí (Říha a kol., 1998; Machatý a kol., 2012) nebo klonování (Liu a kol., 2010).

Životaschopnost a oplozovací schopnost spermií v ID býků ovlivňuje zejména složení ředidla (Siddique a kol., 2006), včetně interakcí mezi kryoprotektivy, délkou ekvilibrace a rychlosti mrazení a rozmrazení (Cotter a kol., 2005; Clulow a kol., 2008; Beran a kol., 2014).

2.4.4.2.1 Ředění

Beran a kol. (2012; 2014a; 2014b), Stádník a kol. (2015a) a Doležalová a kol. (2015a) se věnovali vlivu vybraných ředidel na odolnost spermií vůči chladovému šoku, na podíl

živých spermií po rozmrazení dávky, respektive jejich motilitu v průběhu následného termodynamického testu přežitelnosti. Všechny práce potvrzují přímý a významný vliv individuality býka i ředidla na výslednou oplozovací schopnost dávky po rozmrazení. Beran a kol. (2013; 2015) a Stádník a kol. (2015b) se věnovali možnému zařazení vybraných specifických aditiv, konkrétně LDL cholesterolu, do komerčně vyráběných ředidel ejakulátu býků. Definovali, že jeho doplnění neovlivňuje negativně charakteristiky ředidla a působí pozitivně na vybrané ukazatele oplozovací schopnosti spermií a současně že se jeho účinek odvíjí od přidaného množství.

2.4.4.2.2 Chlazení a ekvilibrace

Další nezbytnou součástí technologického procesu výroby inseminačních dávek je jejich chlazení a ekvilibrace, tedy adaptace spermií na zpomalení metabolismu, která musí být provedena za optimálních podmínek, protože savčí spermie jsou citlivé na rychlost zchlazování. Naředěný ejakulát je chlazen pomalu, aby se předešlo chladovému šoku. Ví se, že chladový šok poškozuje funkci proteinů membrány, které jsou nezbytné pro strukturální integritu iontového metabolismu. Tyto změny se dějí za působení teplot od 15 do 5 °C, pod 0 °C ustávají (Watson, 2000). Během pomalého chlazení dochází k dehydrataci spermie, kdy může být dosaženo bodu osmotické rovnováhy mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím, to znamená, že buněčná dehydratace je maximální. Když se zchladí příliš rychle, rychlost dehydratace není dostačující pro předcházení výskytu intracelulárního ledu (Woelders, 1997). Rychlé zchlazení také redukuje rozklad fruktózy, obsah kyslíku a syntézu ATP, což znamená, že spermie ztrácí zásobení energií a následně i motilitu (Blackshaw a Salisbury, 1957). Po naředění jsou dávky postupně zchlazovány z 34 °C na 4 °C, před vlastním zmrazením jsou po určitou dobu uchovány v chladícím boxu za působení konstantní teploty (Moussa a kol., 2002). Optimální doba zchlazování inseminační dávky na teplotu 4 °C je 1,5 hodiny, s tím, že následně je dávka ekvilibrována. Dhama a kol. (1996) zase shledal, že nejvhodnější je pomalé chlazení pejet z 30 °C na 5 °C za 2 hodiny anebo rychlé zchlazení na 10 °C. Ekvilibrace je proces který následuje po zchlazení inseminačních dávek, jeho doba je variabilní, trvá od 30 minut do 24 hodin před samotným mrazením. Objevovaly se snahy zkracovat nebo úplně eliminovat tento krok ve výrobě inseminačních dávek, zrychlil by se tak proces kryokonzervace nehledě na kvalitu rozmrazeného ejakulátu (Dhama a kol., 1992).

Někteří autoři dokonce zpochybňovali nutnost provedení ekvilibrace a její skutečný vliv na následnou životaschopnost spermií. Minimální délka ekvilibrace vhodná pro následnou kryokonzervaci spermatu s uspokojivými výsledky životaschopnosti spermií po rozmrazení je stále sporná. Doležalová a kol. (2015b) testovali 3 délky ekvilibrace (30, 120 a 240 min.) a potvrdili, že delší ekvilibrace zvyšuje motilitu spermií v průběhu termodynamického testu přežitelnosti a její průměrnou hodnotu za celý test.

Ve výsledcích několika dalších studií byly zhodnoceny interakce mezi různými délkami ekvilibrace a použitými ředidly na výslednou životaschopnost spermií. Například Bois a kol. (2012) porovnával vliv dvou délek ekvilibrace (30 a 60 min.) na následnou motilitu a membránovou integritu spermií. Kratší ekvilibrace měla negativní vliv na membránovou integritu spermie, avšak rozdíly v motilitě nebyly statisticky významné.

Interakcí mezi použitými ředidly a délkou ekvilibrace se ve své práci zabíral Leite a kol. (2010), který srovnával působení určité doby ekvilibrace na inseminační dávky ředěné odlišnými ředidly a sledoval jejich vzájemné interakce a vliv na motilitu spermií, integritu plazmatické a akrozomální membrány, za použití objektivních a přesných metod kontroly založených na počítačové diagnostice. Zjistil, že délka ekvilibrace je zásadní pro udržení motility a integrity membrány spermie nezávisle na použitém ředidle.

2.4.4.2.3 Kryokonzervace

Proces samotné kryokonzervace způsobuje poškození všech částí spermie (Bailey a kol., 2000) a tím zhoršuje funkci spermií, což může vést ke snížení jejich oplozovací schopnosti (Celeghini a kol., 2008). Poškození během chladičoho a mrazícího procesu napadá hlavně buněčné membrány (plazmu a mitochondrie) a v nejhorším případě také jádro (Blesbois, 2007). Následně je toto poškození odpovědné za ztrátu motility a životaschopnosti spermií či ztrátu akrozomální integrity a oplozovací schopnosti rozmrazeného ejakulátu (Holt, 2000).

V současné době je možné využít dvě metody mrazení, a to některou z variant pomalého mrazení, kde je výhodou nízká koncentrace kryoprotektiva, nebo vitrifikaci, což je metoda sice velmi rychlého mrazení, avšak se zvýšeným rizikem chladového šoku a poškození buňky mrazem (Arav a kol., 2002). Dříve byla využívána především konvenční metoda pomalého mrazení spočívající v mrazení inseminačních dávek v parách tekutého dusíku po dobu 10 minut ve výšce 2 cm nad hladinou tekutého dusíku (Reid a kol., 2009). Nevýhodou tohoto způsobu mrazení byla nemožnost kontrolovat tvorbu ledových krystalů,

kteře mohou roztrhat a zabít buňku (Saragusty a kol., 2007). Velmi podobná je i metoda mrazení Direct Freezing (DF) (Digitcool; IMV CryoBio-System, L'Aigle, France), založená také na postupném počítačově řízeném poklesu teploty v komoře. Regulace teploty je však zajišťována pomocí par tekutého dusíku. Teplota v komoře se pohybuje v rozmezí od -150 °C do +50 °C, rychlost mrazení je 0,1 až 60 °C za minutu. V případě použití této technologie zůstává otázkou definice nejvhodnější mrazicí křivky.

Přestože existují komerční doporučení jednotlivých firem dodávajících potřebné vybavení, v rámci jednotlivých výzkumných studií je zpravidla zjišťováno, že je třeba průběžně upravovat parametry mrazení dle druhu zvířat, resp. individuality konkrétního plemena. Například Saragusty a kol. (2007) ve své práci využíval standardní mrazicí křivku, zatímco Stradioli a kol. (2007) aplikoval mrazicí křivku odlišující se v rychlosti poklesu teploty i v celkové délce mrazení. Doležalová a kol. (2015c) porovnávali 4 vybrané mrazicí křivky a zjistili, že dvoufázová křivka s pozvolnějším poklesem teplot do -90 °C zajišťuje nejvyšší motilitu spermií zjištěnou po rozmrazení i v průběhu celého termodynamického testu.

Dále jsou k dispozici technologie mrazení s využitím teplotního gradientu (Directional Freezing) založené na řízení postupu tuhnutí vzorku, který umožňuje přesnou kontrolu tvorby ledových krystalů během procesu mrazení. Vzorek je v podstatě vložen do vhodné nádoby, která je umístěna horizontálně a posouvána určitou rychlostí předem určeným teplotním stupněm (gradientem), který postupně překonává bod mrznutí až do velmi nízkých teplot. Metodicky jsou postupy mrazení pomocí teplotního gradientu známé a definované, nicméně k jejich plošnému praktickému rozšíření zatím brání nízké povědomí o jejich dostupnosti a také poměru zvýšených nákladů, tj. ceny inseminační dávky vůči zlepšení oplozovací schopnosti inseminační dávky.

Uvedené faktory působí jednotlivě i v interakci mezi sebou, proto je pro požadovanou optimalizaci výroby inseminačních dávek nezbytné přesně definovat individuální vliv konkrétního faktoru i vliv dané kombinace. Na základě těchto znalostí je pak možné upravovat postupy výroby inseminačních dávek individuálně pro konkrétní býky, a tím docílit efektivnější výroby. Následně aplikace nových technologických postupů při výrobě inseminačních dávek může vést ke zlepšení jejich kvalitativních ukazatelů a oplozovací schopnosti. Přehled vybraných faktorů ovlivňujících výslednou oplozovací schopnost dávky po rozmrazení poskytuje obecnější povědomí o širší problematice.

2.5 Způsoby konzervace inseminačních dávek

2.5.1 Inseminace čerstvým semenem – krátkodobá konzervace

Při inseminaci čerstvým spermatem dochází k deponaci čerstvého semene ihned na místě odběru nebo může být čerstvé sperma transportováno na krátkou vzdálenost (max 2 hodiny). Výhodou inseminace čerstvým spermatem jsou dobré výsledky zabřezávání, výroba inseminační dávky není náročná a díky tomu je tento způsob inseminace finančně nej dostupnější. Neodpadá ale nutnost přepravy zvířat v případě, že chceme spojit pár z větší vzdálenosti. Inseminační dávku čerstvého spermatu nelze dlouho uchovávat, proto je nutné správné načasování inseminace (www.genomia.cz/cz/reprodukce-inseminace).

2.5.2 Inseminace chlazeným semenem – střednědobá konzervace

Druhým způsobem inseminace je inseminace spermatem chlazeným (krátkodobá konzervace spermatu). V tomto případě se sperma ošetří speciálním ředidlem, díky kterému je možné sperma zchladit a transportovat po dobu přibližně 72 hodin při 4 až 5 °C. Výhodou je, že tyto inseminační dávky je možné transportovat na delší vzdálenost (chlazené). Výroba chlazených inseminačních dávek není složitá ani finančně náročná a výsledky zabřezávání jsou velmi dobré. Nevýhodou je časová limitace schopnosti oplození inseminačními dávkami, proto je nutná pohotová koordinace odběru, distribuce a použití inseminačních dávek (www.genomia.cz/cz/reprodukce-inseminace).

2.5.3 Inseminace zmrazeným semenem – dlouhodobá konzervace

Poslední možností inseminace je inseminace kryokonzervovaným spermatem (hluboce zmrazeným). Odebrané sperma je před zmrazením pečlivě vyšetřeno a odborně zpracováno. Po zmrazení jsou inseminační dávky skladovány v tekutém dusíku. Inseminace mrazeným spermatem se stále rozšiřuje a stává se oblíbeným díky svým výhodám. Odběr spermatu není závislý na estrálním cyklu samice. Inseminační dávky mohou být v budoucnu kdykoliv pohotově využity. Výhodné je semeno odebírat v nejproduktivnější fázi reprodukčního věku zvířete. Semeno lze využít k oplození samice po uplynutí plodného věku samce nebo dokonce dlouho po jeho smrti. Mrazené inseminační dávky lze transportovat na velké vzdálenosti

bez nutnosti přepravy zvířat, je tedy možné šířit genetický materiál z prakticky neomezeně vzdálených destinací.

Inseminace kryokonzervovaným semenem se stále zdokonaluje a výsledky zabřezávání dosahují dobrých parametrů při využití intracervikální inseminace, kdy je semeno deponováno pomocí aparatury do děložního krčku. Další výhodou je, že lze z jednoho odběru vyrobit desítky inseminačních dávek, a tak oplodnit mnoho plemenic, což nelze uskutečnit u přirozené reprodukce. Z jednoho ejakulátu optimální kvality lze získat i více než 100 dávek. Díky vyšetření ejakulátu před zpracováním se zabraňuje šíření pohlavních chorob (například herpes viru nebo brucelózy). Nevýhodou tohoto způsobu inseminace je náročnost výroby inseminačních dávek a s tím spojené i vyšší finanční náklady. U rozmrazeného semene se mohou vyskytovat rozdíly ve viabilitě (životaschopnosti) spermií mezi jednotlivými inseminačními dávkami (www.genomia.cz/cz/reprodukce-inseminace).

2.6 Ekvilibrace

Součástí technologického procesu výroby inseminačních dávek je ekvilibrace. Ekvilibrace je proces, který následuje po zchlazení naředěných inseminačních dávek před samotným mrazením (Dhami a kol., 1992). Délkou ekvilibrace se pak označuje čas, kdy spermie zůstává v kontaktu s kryoprotektantem před samotným mrazením (Leite a kol., 2010). Kryoprotektanty jsou základní složkou ředidel spermatu, chrání integritu membrány spermie během chlazení a mrazení (Linhartová a kol., 2014), chrání strukturu buňky před jejich roztrháním a zničením ledovými krystaly, vznikajícími během mrazení, zvyšují jejich odolnost a chrání je před chladovým šokem (Beran a kol., 2014) a pomáhají udržet motilitu spermií po následném rozmrazení (Muchlisin a kol., 2015). Přesto nejvhodnější interakce použitého ředidla a délky ekvilibrace ještě nejsou dostatečně stanoveny (Shahverdi a kol., 2014).

Délka ekvilibrace je variabilní. Dhami a kol. (1992) doporučuje délku ekvilibrace od 30 minut do 24 hodin před mrazením. Talevi a kol. (1994) shledal jako nejvhodnější dobu trvání ekvilibrace 1 hodinu. (Awad, 2011; Dhami a kol. (1996) ve své práci využívali dobu trvání ekvilibrace 2 hodiny při 5 °C. Muiño a kol. (2007) určili optimální délku ekvilibrace od 4 do 18 hodin. Některé studie dokazují, že doba ekvilibrace 18 hodin nebo dokonce přes noc, jsou nejvhodnější z hlediska zvýšení kvality vyrobených inseminačních dávek (Shahverdi a kol., 2014). Výsledky práce Arav a kol. (2000) také naznačují, že prodloužení doby ekvilibrace zvyšuje oplozovací schopnost spermií. Avšak z pohledu producentů

inseminačních dávek je snaha ekvilibraci zkrátit, nebo ji úplně eliminovat, a tak urychlit proces zpracování spermatu a kryokonzervaci, což je rozhodně žádoucí. To je však v rozporu s faktem, že ekvilibrace je nezbytná pro zachování oplozovací schopnosti spermií po následném rozmrazení (Gao a kol., 1997). Bois a kol. (2012) porovnávali vliv ekvilibrace o délce 30 a 60 minut na následnou motilitu a membránovou integritu spermií. Dospěli k závěru, že krátký čas ekvilibrace – 30 minut negativně ovlivnil integritu membrány spermií, avšak rozdíly mezi výsledky motility nebyly statisticky významné.

Délka ekvilibrace, jakož i typ mrazící křivky jsou odpovědné za mnoho důležitých fyzikálně-chemických změn, které vedou k různým stupňům poškození spermií (Ferro-Gonzales a kol., 2012), které zhoršují jejich vlastnosti po rozmrazení (Špaleková a kol., 2014). Dle výše uvedených skutečností nejsou uvedené interakce dosud dostatečně prozkoumány. Proto bylo cílem této metodiky vyhodnotit vliv různých délek ekvilibrace, typů mrazících křivek a jejich interakce na motilitu spermií a podíl živých spermií po rozmrazení inseminační dávky.

2.7 Kryokonzervace

Úspěch kryokonzervace závisí zejména na průběhu chlazení a mrazení (Clulow a kol., 2008). Interakce mezi teplotou a typem použitého ředidla následně ovlivňuje odolnost spermií vůči chladovému šoku (Stádník a kol., 2015b). Rozsah poškození spermií způsobených chladovým šokem závisí nejen na teplotě, ale i na rychlosti poklesu teploty. Čím vyšší je rychlost zchlazení, tím větší je poškození spermií (Lemma, 2011), které určuje následnou motilitu spermií po rozmrazení (Andrabi, 2007). Úspěšnost kryokonzervace spermií je tedy ovlivněna typem a průběhem mrazící křivky (Doležalová a kol., 2015b).

Mrazení a následné rozmrazení býčího ejakulátu vede ke snížení procenta neporušených spermií a ke snížení procenta životaschopných spermií na přibližně 50 až 60 % (Woelders a kol., 1997). V porovnání s čerstvým ejakulátem je potřeba tři krát vyšší dávky spermií při použití zmrazeného ejakulátu, aby bylo dosaženo stejné úrovně zabřeznutí (Van Essen a kol., 1995).

Kromě technologie mrazení má vliv na přežitelnost spermií v průběhu kryokonzervace zejména použití vhodného ředidla. Různé faktory komplikují kryokonzervaci spermií – patří mezi ně mechanické a biochemické namáhání, volné radikály odvozené od kyslíku, vysoká citlivost na změny osmotického tlaku, chlazení, mrazení a rozmrazovací proces (Garde a kol., 2008). Nejvhodnější ředidlo lze vybrat na základě výsledků biologických

zkoušek ejakulátu. Mezi výsledky těchto testů a skutečnou plodností byly zjištěny vysoké korelace (Louda, 2001).

Umělá inseminace byla nejdříve prováděna čerstvým a zchlazeným ejakulátem. Objev kryoprotektivních účinků u glycerolu v roce 1949 (Polge a kol., 1949) vedlo k možnosti mrazit spermie. Ačkoli byl současně zkoumán účinek několika potenciálních kryoprotektivních substancí (dimetylsulfoxid, propandiol), glycerol zůstal jako nejvhodnější kryoprotektant pro spermie u všech druhů zvířat (Aires a kol., 2003). Glycerol je znám jako penetrující kryoprotektant schopný vniknout do membrány spermie.

Cílem většiny studií pro úspěšnou kryokonzervaci spermií je určit vhodná ředidla ejakulátu včetně jejich kryoprotektantů a antioxidantů (Hu a kol., 2010).

2.7.1 Kryokonzervace - podmínky

Kryokonzervace je důležitým nástrojem asistované reprodukce, která také současně způsobuje částečné poškození gamet a způsobuje u spermií změny podobné kapacitaci známé jako kryokapacitace. Kryokonzervace vyvolává změny spermatické membrány, která se v důsledku toho stává reaktivnější (citlivější) vůči prostředí po rozmrazení (Watson, 2000) a podléhá kapacitaci mnohem rychleji, než je tomu u čerstvého ejakulátu (Perez a kol., 1996). Předčasná kapacitace po rozmrazení souvisí s obtížným zabřezáváním, tj. subfertilitou (Kuroda a kol., 2007).

Kryokonzervace býčího ejakulátu se stále potýká s problémem nižší oplozovací schopnosti ve srovnání s čerstvým ejakulátem, protože všechny procesy kryokonzervace jako je chlazení, mrazení nebo rozmrazování vytváří oxidační stres, který působí na membránu spermie (Chatterjee a kol., 2001). Obecně oxidační stres vede ke ztrátě motility, k poškození nebo snížení propustnosti plazmatické membrány spermie (White, 1993).

Je známo, že savčí spermie obsahují vysoké koncentrace polynenasycených mastných kyselin a jsou proto citlivé na oxidační stres, který je zodpovědný za produkci reaktivních forem kyslíku (ROS – *reactive oxygen species*) (Cassani and Beconi, 2005). Fyziologická kapacitace spermií vyžaduje nízké koncentrace ROS. Za normálních podmínek je produkce ROS v rovnováze s vychytáváním pomocí antioxidantů; nadměrné množství ROS zhoršuje funkce spermií a jejich enzymatickou aktivitu (Baumber a kol., 2000).

Savčí spermie jsou citlivé na enzym laktoperoxidázu, která ničí strukturu lipidového matrix spermatické membrány. Poškození lipidové matrix nakonec způsobí ztrátu membránové integrity, snížení motility, ztrátu oplozovací schopnosti a poškození DNA

spermií, a to prostřednictvím oxidativního stresu a produkci cytotoxických aldehydů (Baumber a kol., 2000). Superoxid dismutáza je enzym, který vychytává ROS jako superoxidový anion a hydroxylové radikály a tím chrání spermie savců proti oxidačnímu poškození (Fridovich, 1985).

2.8 Ředění ejakulátu

Úspěšnost kryokonzervace závisí na udržení oplozovací schopnosti spermií. Pomocí vhodného ředidla se musí vytvořit optimální podmínky pro zmrazení spermií a zároveň se tak zvýší i objem odebraného ejakulátu, množství inseminačních dávek a ekonomika podniku (Beran a kol., 2014).

Postup a způsob ředění spermatu je důležitou součástí přípravy inseminační dávky. Ředěním se vytváří podmínky pro přežívání spermií mimo organismus. Dýcháním spermií vznikají v ejakulátu produkty látkové výměny – kyselina mléčná. Kyselina mléčná postupně okyseluje prostředí, zpomaluje pohyb spermií, navozuje anabiózu a jejich odumření (Věžník a kol., 2004).

Proces ředění musí být zahájen do 15 minut po odběru. Ředění předchází makroskopické a mikroskopické zhodnocení ejakulátu. Teplota ředidla i ředěného ejakulátu musí být stejná ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), aby se zabránilo chladovému šoku. Ředidlo se vždy přidává do ejakulátu určeného k ředění postupně, za neustálého míchání. Používané ředidlo musí být sterilní a předeřtáté (Ball a Peters, 2004).

2.8.1 Stupeň ředění

Ředění savčích spermií v malých objemech s fyziologickým roztokem soli nebo s jinými izotonickými roztoky způsobuje aktivaci nebo excitaci jejich pohyblivosti. Při nadměrném přídavku ředidla dochází k nevratné ztrátě motility, metabolické aktivity a oplozovací schopnosti spermií *in vivo*, známé jako efekt ředění (*dilution effect*) (Mann, 1964). Mechanismus ztráty motility spermie při nadměrném ředění se podobá stárnutí spermie v průběhu skladování v důsledku chladového šoku a podobných drastických situací, ke kterým dochází v důsledku destabilizace membrány spermie a zhoršení jejích funkcí (Gillan a Maxwell, 1999).

Genetický vliv individuality býka v inseminaci je limitován produkcí spermií, odběrem ejakulátu a jeho ředěním. Mnoho studií se zabývalo zajištěním vhodného stupně zabřezávání při množství spermií v inseminační dávce (ID) 10×10^6 (Garner a kol., 1997). Nižší počet spermií v jedné ID znamenal snížení životaschopnosti spermií po rozmrazení (Maxwell a Johnson, 1999). Snížení životaschopnosti spermií po rozmrazení je ve vztahu s objemem a koncentrací ejakulátu a koncentrací semenné plazmy při konečném zředění (Garner a kol., 2001).

Efekt ředění byl zaznamenán u králíků (Harrison a kol., 1982), u beranů (Ashworth a kol., 1994), býků (Garner a kol., 2001), kanců (Centurion a kol., 2003), u psů (Wales a White, 1963), u hřebců (Jasko a kol., 1992) a u mužů (Rowley a kol., 1990). Přirozeně se objevuje u beraního ejakulátu při ředění na méně než 20×10^6 spermií/ml (Garner a kol., 2001). Milovanov (1934) jako první popsal efekt ředění. Semenná plazma, která je součástí zředěného ejakulátu, může zvýšit nebo snížit efekt ředění v závislosti na její koncentraci (Jasko a kol., 1992). Nicméně jiné studie nezaznamenaly žádný vliv koncentrace semenné plazmy na efekt ředění, ale spíše ukazují na skutečnost, že se na efektu ředění podílí konečná koncentrace spermií (Garner a kol., 2001). Roli hraje také typ přidaného ředidla, jako je například izotonické ředidlo, ředidlo s vysokou molekulovou hmotností přídavku – vaječný žloutek a mléčné ředidlo (Bredderman a Foote, 1971). Hayden a kol. (2012) dospěli k závěru, že při ředění ejakulátu na počet spermií 1×10^6 /ID bylo dosaženo vyššího procenta zabřezávání než u inseminačních dávek ředěných na množství $0,5 \times 10^6$ spermií. Hayden a kol. (2015) zjišťovali přítomnost efektu ředění při ředění ejakulátu hřebců komerčně dostupnými ředidly. Efekt ředění se dostavuje při přídavku velkého množství ředidla k čerstvému ejakulátu, což má za následek nízkou koncentraci spermií a má škodlivý vliv na kvalitu (motilitu) spermií.

Ředění ejakulátu na nízký počet spermií v ID způsobuje sníženou životaschopnost spermií po rozmrazení. Důvodem tohoto poklesu je nedostatečné množství zásadních složek plazmatické membrány, při vyšším ředění a v průběhu mrazení (Vera-Munoz a kol., 2009). V této studii byly hodnoceny účinky kryokonzervace při vysokém stupni ředění na motilitu spermií a integritu cytoplazmatické membrány při použití ředidla Bioxcell[®] s přídavkem LDL (8 % LDL) v porovnání se standardním žloutkovým ředidlem Triladyl[®] (20 % vaječného žloutku). Bylo využito 3 stupňů ředění 120×10^6 , 60×10^6 , 20×10^6 spermií/ml, což odpovídalo počtu spermií 30×10^6 , 15×10^6 , 5×10^6 v jedné ID o objemu 0,25 ml. Nejvyšší motilita spermií a integrita plazmatické membrány po rozmrazení byla zaznamenána u všech použitých ředidel při nejvyšším počtu spermií 30×10^6 /ID, přičemž nejvyšších

průměrných hodnot motility bylo dosaženo při ředění ředidlem s přídavkem 8 % LDL. Motilita spermií i integrita plazmatické membrány se lišily v závislosti na použitém ředidle, což naznačuje, že ředidla mají různé účinky na plazmatickou membránu a struktury bičíku.

2.8.2 Složení ředidel

Složení ředidel spermatu býků zásadně ovlivňuje životaschopnost a oplozovací schopnost spermií v inseminační dávce. Jako ředidla jsou dostupné specifické biochemické látky, které předcházejí poškození spermií v průběhu mrazícího procesu (snaha zabránit chladovému šoku) a zlepšují jejich motilitu po následném rozmrazení (Siddique a kol., 2006). Ředidlo musí být zdrojem energie pro spermie, musí mít dobrou pufovací schopnost (Rasul a kol., 2000), musí obsahovat malé množství elektrolytu, musí zajistit požadovaný osmotický tlak, stálou hodnotu pH, nesmí být toxické pro spermie (Beran a kol., 2014), musí být sterilní a ekonomicky dostupné (Ball a Peters, 2004).

Z počátku doby vývoje inseminace bylo býčí sperma před použitím ředěno a konzervováno jen krátkodobě, po dobu maximálně 96 hodin (Verberckmoes a kol., 2005) a inseminace se prováděla čerstvým nebo chlazeným ejakulátem (Papa a kol., 2015). Byly prokázány negativní změny v buněčných membránách spermií v závislosti na délce uložení a na použitém ředidle (Frydrychová a kol., 2010). K rozhodující kvalitativní změně ve využití inseminace došlo však teprve po úspěšném vývoji kryokonzervace a dlouhodobého uchovávání býčího spermatu v tekutém dusíku a jejím zavedení do široké praxe (Louda a kol., 2008). S objevením složky kryoprotektantů a výhod spojených s použitím ředidel a kryokonzervace, bylo postupně omezováno použití čerstvého nebo chlazeného ejakulátu (Papa a kol., 2015). Ve srovnání s čerstvým ejakulátem, se stejným počtem spermií, kryokonzervované sperma přináší ovšem nižší plodnost.

Mezi základní stavební kameny ředidla v současné době patří bi-destilovaná voda sloužící jako nosič ostatních komponent, kryoprotektiva, pufrů, cukry, antibiotika, aminokyseliny a mastné kyseliny (Beran a kol., 2014).

2.8.2.1 Kryoprotektiva

Biochemické a anatomické vlastnosti spermií mohou být během zmrazování pozměněny. Pro zvýšení přežitelnosti buněk se před zmrazením k ejakulátu přidávají

kryoprotektanty (Loomis a Graham, 2008). V důsledku toho se neustále zkoumá nevhodnější použití ředidla, které ochrání spermie *in vivo*. Kryoprotektiva chrání buňky před roztrháním ledovými krystaly, které vznikají během procesu mrazení, taktéž chrání buňky před chladovým šokem a zvyšují jejich odolnost (Ball a Peters, 2004).

Kryoprotektivní látky můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou látky penetrující do spermie skrz cytoplazmatickou membránu, působící intra- i extra- celulórně. Tyto látky mohou mít toxický vliv na spermie, a to destabilizací membrán a denaturací proteinů a enzymů (Swain a Smith, 2010, Rosato a Iafaldano, 2013). Zvyšují tekutost membrán pomocí uspořádání membránových lipidů a bílkovin, které se projevuje větší dehydratací při nižších teplotách a sníženou formací ledu uvnitř buněk (Holt, 2000).

Druhou skupinou jsou nepenetrující látky, které působí pouze extracelulórně. Jedná se zejména o bílkoviny, aminokyseliny a cukry, které se chovají jako osmoprotektanty (pomáhají spermii stabilizovat vnitřní prostředí při osmotickém stresu) a které mohou mírnit poškození způsobená penetrujícími kryoprotektanty (Swain a Smith, 2010). Nicméně oba typy kryoprotektantů vyvolávají změny objemu, který může poškodit buňky (Loomis a Graham, 2008).

2.8.2.1.1 Penetrující kryoprotektanty

Do této skupiny řadíme zejména:

- glycerol
- dimetylsulfoxid
- etylenglykol
- metanol
- fosfolipidy
- low-density-lipoprotein (LDL)
- monosacharidy a
- dimetylacetamid.

2.8.2.1.1.1 Glycerol

Glycerol je nejpoužívanějším penetrujícím kryoprotektantem při konzervaci spermatu býků. Spolu s ionty a makromolekulami zastává nezbytnou funkci během procesu mrazení, kdy chrání spermie před mechanickým poškozením (De Leeuw a kol., 1993) a snižuje bod

mrznutí intra- i extra- celulární tekutiny na hodnoty pod bodem mrazu vody (Medeiros a kol., 2002). Tím dochází k omezení vlivu nízké teploty na koncentraci roztoků a rozdíly osmotických tlaků (Amann a Picket, 1987).

Optimální koncentrace glycerolu je ovlivněna ostatními komponenty ředidla (Woelders a kol., 1997). Ovšem glycerol prostupující do buněk může být v určité koncentraci toxický a může vyvolat poškození membrán a následně snížení pohyblivosti spermií (Medeiros a kol., 2002). Pokud je použit ve vysokých koncentracích, tak může způsobovat závažná osmotická poškození, protože překonává membrány spermií mnohem pomaleji, než jiné kryoprotektanty (Guthrie, 2002).

2.8.2.1.1.2 Dimetylsulfoxid, etylenglykol a metanol

Dimetylsulfoxid (DMSO), má podobné kryoprotektivní účinky jako glycerol (Lovelock a Bishop, 1959). Při kryokonzervaci spermatu králíků bylo při použití DMSO dosaženo vyšší motility spermií po rozmrazení ve srovnání s glycerolem (Rosato a Iaffaldano, 2013).

U kryoprotektantů s nízkou molekulární hmotností, jako je etylenglykol, se pak předpokládá nižší rozsah poškození spermií, neboť díky své nízké molekulové hmotnosti překonávají snadněji membrány spermií (Moore a kol., 2006). Etylenglykol byl použit jako náhrada glycerolu při mrazení spermatu hřebců (Henry a kol., 2002) a beranů (Molinia a kol., 1994).

Guthrie a kol. (2002) srovnávali působení glycerolu, DMSO a etylenglykolu. Dospěli k závěru, že nejvyšší motilita spermií byla detekována u vzorků ředěných etylenglykolem. Naproti tomu Taşdemir a kol. (2013) určili jako nejvhodnější kryoprotektantem glycerol o 6% koncentraci v ředidle.

Metanol je dalším možným kryoprotektantem. Byl s úspěchem použit při mrazení spermatu lososovitých ryb (Lahnsteiner a kol., 1997).

2.8.2.1.1.3 Vaječný žloutek

Vaječný žloutek je základní komponentou ředidel spermatu býků od roku 1939, kdy byly objeveny jeho příznivé účinky na ochranu semene vůči chladovému šoku a na ochranu membrán během zmrazení a rozmrazení (Amirat a kol., 2004), zlepšuje jejich funkce a udržuje jejich oplozovací schopnost (Barak a kol., 1992). Frakcemi vaječného žloutku, které chrání spermie během chlazení a mrazení, jsou fosfolipidy a LDL (Kampschmidt a kol., 1953; Quinn a kol., 1980; Medeiros a kol., 2002). Naopak high-density-

lipoprotein (HDL), obsažený ve žloutku, má opačné účinky než low-density-lipoprotein (LDL) (Bergeron a kol. 2004), který způsobuje vyloučení cholesterolu z plazmatických membrán spermie, což má za následek změnu tekutosti těchto membrán a vyšší citlivost spermií k chladovému šoku (Amirat a kol., 2005). Dále urychluje kapacitaci spermií a zároveň spouští akrozómovou reakci (Anton a kol., 2003).

Literatura uvádí, že optimální koncentrace vaječného žloutku v ředidle pro kryokonzervaci býčího ejakulátu je 20 %. Ve větších koncentracích se vaječný žloutek stává pro spermie toxickým (Sansone a kol., 2000; Moussa a kol., 2002; Amirat a kol., 2004). Další nevýhodou žloutku je jeho nekonzistentní složení a vaječná granula, ztěžující stanovení motility spermií (Ansari a kol., 2010). Přidání čerstvého žloutku do ředidla představuje značné hygienické riziko (Bousseau a kol., 1998), což je další velkou nevýhodou vaječného žloutku. Proto se do komerčního ředidla Optidyl[®] přidává v ionizované formě nebo se od něj úplně upouští a je nahrazen sójovým lecitinem (De Leeuw a kol., 2000).

2.8.2.1.1.4 LDL (Nízkodenzitní lipoprotein)

Mrazení ovlivňuje lipidové zastoupení a chemické složení plazmatické membrány spermie (Manjunath a kol., 2002). Předpokládá se, že LDL přímo nebo nepřímo ovlivňuje změny plazmatické membrány spermie v průběhu výroby ID (Bergeron a kol., 2004). K purifikaci vaječného žloutku se standardně využívá hustotní gradientová centrifugace (Pace a Graham, 1974). Tato technika izolace poskytuje dokonale čistý LDL. Nicméně celý postup je velmi časově náročný a množství vyextrahovaného LDL je velmi malé, což prozatím brání komerčnímu využití této metody (Moussa a kol., 2002).

Bylo navrženo několik hypotéz pro vysvětlení mechanismů působení LDL na spermie. Manjunath a kol. (2002) a Bergeron a kol. (2004) poskytli vysvětlení, že LDL chrání spermie sekvestrací proteinů v semenné plazmě (BSP) s ohledem na to, že hlavní proteiny semenné plazmy se vážou na povrch spermie v průběhu ejakulace a stimulují tak výplach cholesterolů a fosfolipidů z membrány spermie. Díky specifickému vztahu LDL a BSP, LDL snižuje navázání hlavních proteinů semenné plazmy na spermie a může tak zabránit vyplavení lipidů ze spermatické membrány. Bergeron a Manjunath (2006) dospěli k závěru, že LDL zachytává škodlivé proteiny semenné plazmy a zlepšuje tak úspěšnost mrazení spermií. Nicméně přesný způsob ochrany spermií a přídavku LDL na jejich motilitu je zatím nejasný (Bathgate a kol., 2006). Vaječný žloutek také poskytuje ochranu spermiím, ale současně obsahuje komponenty způsobující inhibici dýchání spermie

a snížení jejich motility. Tyto komponenty pravděpodobně v LDL chybí (Kampschmidt a kol., 1953).

V posledních letech byl nově v několika studiích testován například pozitivní vliv LDL vaječného žloutku na morfologickou strukturu spermií a vyšší úroveň jejich přežitelnosti po rozmrazení u různých druhů zvířat: psů (Bencharif a kol., 2012), buvolů (Andrabi a kol., 2008; Akhter a kol., 2011), beranů (Watson, 1981; Moustacas a kol. 2011), kanců (Jiang a kol., 2007; Hu a kol., 2008), hřebců (Pillet a kol., 2011), kozlů (Ali a kol., 2008). V neposlední řadě byl také studován vliv na spermie býků (Vera-Munoz a kol., 2011; Amirat-Briand a kol., 2010). Jejich výsledky naznačují významný a pozitivní kryoprotektivní efekt LDL s následným zlepšením oplozovací schopnosti ID.

Podle Moussa a kol. (2002) se jako optimální koncentrace jeví 8% přídavek LDL v ředidle. Bylo také publikováno několik různých studií, v kterých byl sledován efekt LDL na přežitelnost spermií po rozmrazení v porovnání s komerčně vyráběnými ředidly. Například Amirat a kol. (2004) porovnávali LDL s Optidylem[®] (komerční žloutkové ředidlo). Došli k závěru, že spermie mrazené v LDL mají vyšší motilitu (54,4 % versus 30,2 %; $P < 0,05$), přičemž integrita akrozomu a plazmatické membrány byla u obou ředidel shodná. V roce 2005, Amirat a kol. (2005) opět porovnávali LDL, tentokrát s jinými ředidly: s Triladylem[®] (komerční žloutkové ředidlo) a Biociphosem-Plus[®] (komerční bezžloutkové ředidlo). Aktivita spermií po rozmrazení byla dvakrát vyšší ($p < 0,05$) v Biociphosu-Plus[®] (64 %) a LDL (61 %) než v Triladylu[®] (32 %). Na základě všech dosažených výsledků opět konstatovali, že ředidlo na bázi LDL nejlépe chrání zmrazené spermie.

Výhodou ředidel s přídavkem LDL oproti standardním žloutkovým ředidlům je méně složité chemické složení LDL a fakt, že neobsahuje žloutková granula, což usnadňuje mikroskopické posouzení spermií (Amirat a kol., 2004).

2.8.2.1.1.5 Monosacharidy

Spermie spotřebovávají energii, pokud mají přežít v *in vitro* podmínkách. Za tímto účelem se do ředidel přidávají jednoduché cukry, jako například fruktóza, laktóza nebo kyselina citrónová (Amirat a kol., 2005). Kromě toho, cukry hrají roli při ochraně životaschopnosti spermií po rozmrazení. Přídavek cukrů jako kryoprotektantů byl navržen pro zmírnění komplikací v průběhu mrazicího procesu – přítomnost cukrů pravděpodobně zvyšuje odolnost membrán k rychlým fyzikálním a morfologickým změnám, které nastávají při rychlém vyloučení vody ze spermií (Beran a kol., 2014). Woelders a kol. (1997) uvedli,

že mrazicí médium na bázi cukru by mohlo být přínosné pro konzervaci býčích spermií díky zmírnění velké koncentrace solí během dehydratace spermií.

Akhter a kol. (2014) zjišťovali vliv přídavku fruktózy do ředidel na zabřezávání. Byla použita ředidla na bázi sušeného mléka s přídavkem fruktózy a bez přídavku. Podíl zabřezlých krav po inseminaci byl vyšší u dávek s přídavkem fruktózy.

2.8.2.1.2 Nepenetrující kryoprotektanty

Do této skupiny dle De Leeuw a kol. (1993) řadíme látky, které se chovají jako osmoprotektanty, kterými jsou zejména:

- aminokyseliny
- disacharidy
- bovinní sérový albumin (BSA) a
- trehalóza.

Jedná se o látky působící extra-celulárně, které mírní poškození způsobená penetrujícími kryoprotektanty. Jsou méně toxické než penetrující kryoprotektanty, inhibují růst ledu a pomáhají spermiím stabilizovat vnitřní prostředí při osmotickém stresu (Cleland a kol., 2004), čímž redukuje množství potřebných penetrujících kryoprotektantů (Swain a Smith, 2010). Jedná se o látky vyznačující se nižší molekulární hmotností, hydrofilii a nulovou toxicitou. Díky své neschopnosti překonat plazmatickou membránu vytvářejí osmotický tlak, který snižuje bod mrazu média a tím i tvorbu extracelulárního ledu (Aisen a kol., 2002), čímž poskytují buňkám spermií ochranu.

2.8.2.1.2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny zajišťují ochranu struktury biologické membrány spermie během procesu mrazení a rozmrazování díky svým antioxidačním vlastnostem. Mezi používané aminokyseliny patří zejména glutamin (Amirat-Briand a kol., 2009; Bucak a kol., 2009; Tuncer a kol., 2011) a cystein (Topraggaleh a kol., 2014).

Studie Sariozkan a kol. (2009) a Tuncer a kol. (2010) prokázaly, že přídavek cysteinu do ředidel zlepšil motilitu a životaschopnost rozmrazených spermií.

Dle Yamada a kol. (2011) může glutamin vyvolat expresi HSP proteinů v *in vivo* i v *in vitro* prostředí a lze jej využít jako kryoprotektiva pro zlepšení kvality rozmrazených spermií. Studie Bucak a kol. (2009) a Tuncer a kol. (2011) prokázaly, že přídavek glutaminu do ředidla před mrazením měl za následek vysokou kvalitu spermií po mrazení.

Topraggaleh a kol. (2014) zjistili, že přídavek 7,5 mmol cysteinu a 15 mmol glutaminu výrazně zvýšil motilitu spermií a integritu membrán po rozmrazení spermií.

2.8.2.1.2.2 Disacharidy

Nepenetrující cukry přispívají k buněčné dehydrataci před zmrazením, di- a tri-sacharidy zvyšováním osmotické dehydratace (Sun a kol., 1978). Přídavek cukru do ředidla se ukázal jako vhodný, protože cukr není schopný se rozptýlit přes plazmatickou membránu. Proto laktóza, sacharóza, rafinóza anebo dextransy přidávané do ředidel působí jako kryoprotektanty. V takovýchto sloučeninách vytváří cukr osmotický tlak, proto se zde intracelulární ledové krystaly vyskytují méně. Cukr také reaguje s fosfolipidy v cytoplazmatické membráně, reorganizuje membránu a způsobuje, že jsou spermie schopné přežít během procesu kryokonzervace (Aisen a kol., 2002).

Cukry jako je rafinóza, trehalóza ve vysoké koncentraci v roztoku podporují vylučování vody z buněk a tím snižují možnost tvorby intracelulárních ledových krystalů (Agca a kol., 2002). Účinek rafinózy ve vztahu k oxidačnímu stresu je považován za nepřímý, dále blokuje extracelulární tvorbu ledu (Storey a kol., 1998). Nicméně jejich účinky jsou závislé na teplotě skladování, na jejich molekulové hmotnosti a použitém pufru v ředidle (Abdelhakean a kol., 1991; Garde a kol., 2008). Avšak bylo zaznamenáno poškození prospěšných antioxidačních a kryokonzervačních účinků cukrů vlivem chladového šoku a procesem mrazení/rozmrazování (Bucak a kol., 2007; Malo a kol., 2010; Tuncer a kol., 2010). Tuncer a kol. (2011) porovnávali vliv cukrů jako trehalóza, sacharóza a rafinóza v komerčním ředidle Optidyl[®] doplněném o glutamin na parametry spermií, oplozovací schopnost spermií. Zjistili, že lepších výsledků motility spermií bylo dosaženo při použití kombinace rafinózy a glutaminu nebo glutaminu samotného v ředidle.

Kryoprotektivní vlastnosti různých cukrů byly dokumentovány u mnoha různých typů buněk (Yildiz a kol., 2000; Bucak a Tekin, 2007). Disacharidy poskytují vynikající ochranu pro motilitu spermií, integritu cytoplazmatické membrány a oplozovací schopnost rozmrazených spermií (Garde a kol., 2008). Trehalóza ukázala lepší kryoprotektivní vlastnosti oplozovací schopnosti spermií po rozmrazení u spermií myši, beranů a býků (Aisen a kol., 2002).

2.8.2.1.2.3 Bovinní sérový albumin

Bovinní sérový albumin (BSA) neposkytuje spermiím ochranu, pokud je jediným kryoprotektantem v ředícím médiu. Dobrých výsledků mrazení (aktivita, celistvost membrán)

a zabřezávání bylo dosaženo v kombinaci BSA s trehalózou a sacharózou. V kombinaci BSA / sacharóza bylo u králíků dosaženo podobných výsledků v zabřezávání jako při inseminaci čerstvým semenem (Rossato a Iaffaldano, 2013).

2.8.3 Typy ředidel

2.8.3.1 Bezžloutková ředidla

Jedná se o ředidla na bázi glycerolu, obsahující lecitin, bílkovinu získanou extrakcí ze sójových bobů, jako náhradu za vaječný žloutek nebo žloutek a mléko (Nehring a kol., 2005). Nejpoužívanějším bezžloutkovým ředidlem v České republice je AndroMed[®] (MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Německo), dále je na trhu dostupné ředidlo Bioxcell[®], v minulosti Biociphos-Plus[®] (obě IMV, L'Aigle, Francie).

Mezi bezžloutková ředidla dále řadíme např. citrátové ředidlo nebo citrátové ředidlo s přídavkem cukru (laktóza, sacharóza, rafinóza). Dále jsou k dispozici mléčná ředidla v kombinaci s fruktózou nebo citrátem, ředidla na bázi laktózy, sacharózy, Tris (hydroxymethylaminomethan) a další (Salamon a Maxwell, 1995).

Dále byl nově například testován přídavek iodoxanolu do ředidel, který napomáhá spermii v zachování jejich motility, integrity membrán, vytváří pro ně lepší prostředí a brání vzniku ledových krystalů během mrazení a rozmrazení (Saragusty a kol., 2009).

Hu a kol. (2009) sledovali vliv trehalózy na spermie kanců, Tonieto a kol. (2010) se zabývali jejím působením na spermie beranů a Reddy a kol. (2010) posuzovali interakci tohoto disacharidu a taurinu u spermii buvolů. Alternativou nejsou jen uvedené sacharidy, dále bylo také posuzováno působení aminokyseliny glutaminu (Amirat-Briand a kol., 2009; Tuncer a kol. 2011). V současnosti však nejsou dostupná komerčně vyráběná ředidla obsahující tyto látky, která by ve výsledku mohla zlepšit kvalitu inseminačních dávek. Proto vývoj komerčního ředidla obsahujícího nové komponenty zlepšující jeho kryoprotektivní účinky s jeho následným praktickým uplatněním může přispět ke zvýšení kvalitativních ukazatelů inseminačních dávek býků a tím i k vyššímu zabřezávání plemenic skotu.

2.8.3.2 Žloutková ředidla

Další skupinu tvoří ředidla žloutková, jejichž základní komponentou je již od roku 1949 vaječný žloutek (Polge a kol., 1949). Je stále populární, ačkoliv přidáním čerstvého

žloutku se složení ředidla stává velmi variabilním (Amirat a kol., 2004). V současnosti je vaječný žloutek do ředidel přidáván buď těsně před jejich použitím, např. Triladyl[®], Biladyl[®] a BoviPro CryoGuard[®] (všechna Minitüb, Tiefenbach, Německo), BullXcell[®] (IMV, L'Aigle, Normandie, Francie) nebo je přidáván v ionizované formě při výrobě, např. Optidyl[®] (Biovet, Fleurance, Francie), Steridyl[®] (Minitüb, Tiefenbach, Německo).

Jejich použití je doporučováno, protože výborně chrání spermatické buňky (Celeghini a kol., 2008). Nicméně od používání vaječného žloutku jako kryoprotektiva se v poslední době upouští, protože představuje velké hygienické riziko (Thun a kol., 2002). Kromě toho, některé studie (např. Amirat a kol., 2005) prokázaly, že ředidla na bázi vaječného žloutku mohou mít negativní vliv na respiraci a pohyblivost spermií. Proto byla snaha odebrat celý vaječný žloutek z ředidel spermatu býků (Pace a Graham, 1974). Tito autoři čistili vaječný žloutek ultracentrifugací a objevili, že frakce žloutku známá jako LDL má kryoprotektivní účinky (viz výše). Toto zjištění bylo potvrzeno také studiemi Demianowicz a Strezek (1996), Moussa a kol. (2002), Amirat a kol. (2004), kteří došli ke stejnému závěru.

3 HYPOTÉZY A CÍL PRÁCE

- **Hypotézy:**

- Různé složení ředidel inseminačních dávek býků, případně přidavek vybrané substance do běžně používaných ředidel inseminačních dávek býků zvýší jejich kryoprotektivní účinek projevující se vyšší úrovní přežitelnosti spermií v průběhu procesu výroby inseminačních dávek a vyšší oplozovací schopností po rozmrazení.
- Současně existuje předpoklad, že rozdílná koncentrace přídavku vybrané substance s kryoprotektivním účinkem do běžně používaných ředidel inseminačních dávek býků, různým způsobem ovlivní přežitelnost spermií při výrobě inseminačních dávek býků i jejich oplozovací schopnost po rozmrazení.

- **Cíle práce:**

- Vyhodnotit účinky různých bází 3 komerčně dostupných ředidel – AndroMed[®] (na bázi sójového lecitinu), Optidyl[®] (s přídavkem ionizovaného vaječného žloutku) a BullXcell[®] (s přídavkem čerstvého vaječného žloutku) – na kvalitu býčích spermií.
- Vyhodnotit vliv přídavku různých koncentrací LDL do 2 vybraných komerčně dostupných ředidel spermatu býků – AndroMed[®] a Bioxcell[®] (obě na bázi sójového lecitinu) na přežitelnost a oplozovací schopnost spermií po jejich rozmrazení, po chladovém šoku a po tepelném testu přežitelnosti spermií.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Odběr spermatu

Odběr spermatu probíhal na inseminační stanici býků společnosti Natural, spol. s r. o. v Hradištku pod Medníkem (ČR, Středočeský kraj). Sperma bylo opakovaně odebíráno od předem vybrané skupiny holštýnských býků používaných k reprodukci stejného věku, typu ustájení a podmínek chovu. Býci byli krmeni stejnou krmnou dávkou, která obsahovala seno, slámu, sójový šrot, směs obilných šrotů (ovesného, pšeničného a ječného) a směs minerálních látek od firmy VVS Verměřovice, vyrobenou přímo pro potřeby inseminační stanice.

Všichni býci byli standardně využíváni pro komerční účely. Po standardním odběru spermatu pomocí umělé vagíny vyhodnotil vyškolený personál v laboratoři vstupní kvalitu každého odebraného vzorku spermatu. Hlavními parametry byly objem (VOL g), hustota spermií (DEN $\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$) a procento motility (MOT %). Pro další zpracování byla vyžadována minimální koncentrace a pohyblivost spermií (DEN $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ a MOT 70 %).

Pro vyhodnocení vlivu přídavku různých koncentrací LDL do vybraných komerčně dostupných ředidel spermatu býků na přežitelnost a oplozovací schopnost byla vybrána skupina plemenných býků ($n = 8$) dojených plemen (H, C) se zřetelem na objektivní hodnocení odpovídajícího výživného a zdravotního stavu.

Pro vyhodnocení účinků 3 různých komerčně dostupných ředidel byla vybrána skupina býků ($n = 4$) plemene H.

Ejakulát hodnocených býků byl odebírán standardním postupem (Louda a kol., 2007) do umělé vagíny odborným personálem inseminační stanice.

4.2 Hodnocení spermatu po odběru

Odebrané vzorky ejakulátu byly hodnoceny ihned po odběru v laboratoři inseminační stanice podle standardní metodiky (Věžník a kol., 2004) proškolenými laborantkami. Ejakulát byl nejprve zhodnocen sensoricky na přítomnost cizích přímísenin a zápachů. Dále byla na spektrofotometru SPEKOL 11 (Carl Zeiss, Jena, Německo) změřena koncentrace spermií v ejakulátu, zvážením na digitální automatické váze Scout Pro (OHAUS CORPORATION, New Jersey, USA) bylo stanoveno jeho množství a aktivita spermií byla hodnocena pomocí mikroskopu MEOPTA (MEOPTA – optika, s.r.o., Přerov, ČR) s fázovým kontrastem

subjektivní metodou. K dalšímu zpracování bylo použito pouze sperma o koncentraci minimálně $0,7 \times 10^6$ spermií / mm^3 , s minimální aktivitou 70 % (přímočarý pohyb za hlavičkou, odpovídající rychlosti).

4.3 Zpracování spermatu

4.3.1 Zpracování pro hodnocení účinků různých bází ředidel

Pro hodnocení účinků různých bází ředidel na kvalitu inseminačních dávek hodnocením pohyblivosti spermií, životaschopností, narušením plazmatické membrány a akrozomu a mitochondriální aktivitou během dvouhodinového testu termorezistence po rozmrazení (TT) komerčně dostupných ředidel býčího spermatu pro kryokonzervaci různých typů byly vybrána 3 v současné době nejpoužívanější ředidla – AndroMed[®] (MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Německo) bezvaječného žloutku na bázi sójového lecitinu, Optidyl[®] (Biovet, Fleurance, Francie) na bázi ionizovaného žloutku a BullXcell[®] (IMV, L'Aigle, Normandie, Francie) na základě čerstvého vaječného žloutku.

Každý odebraný ejakulát byl rozdělen na 3 stejné části a každá část byla zředěna v jiném komerčně vyráběném ředidle, lišící se typem použitého kryoprotektiva. Prvním vybraným ředidlem byl AndroMed[®], standardně používané ředidlo bez vaječného žloutku obsahující extrakt ze sójového lecitinu a antibiotika (Gentamycin, Spectinomycin, Linkomycin a Tylosin). Druhým bylo ředidlo Optidyl[®], obsahující ionizovaný vaječný žloutek, Tris a antibiotika (Streptomycin, Penicilin, Linkomycin a Spectinomycin). Třetím ředidlem byl BullXcell[®] s 20% přídavkem čerstvého vaječného žloutku. Zředěné sperma bylo naplněno do pejet (0,25 ml, IMV, L'Aigle, Normandie, Francie), poté bylo pomalu ochlazen na + 4 °C a ekvilibrováno po dobu 2 hodin v chladicím boxu.

Pro zmrazení byla použita metoda přímého zmrazení v mrazícím boxu Minidigitcool[®] (IMV, Cryo Bio System, L'Aigle, Normandie, Francie). Zředěné sperma bylo zmrazeno pomocí dvoufázové křivky zmrazování (Doležalová a kol. 2015) a poté skladováno v inseminačním kontejneru s LN2 (tekutým dusíkem).

4.3.2 Zpracování pro hodnocení přídavku různých koncentrací LDL

Pro hodnocení přídavku různých koncentrací LDL (4, 6 a 8 %) byla porovnávána 2 komerčně vyráběná bezžloutková ředidla AndroMed[®] (MiniTüb GmbH, Tiefenbach,

Německo) a Bioxcell[®] (IMV, L'Aigle, Francie), každé v kontrolním vzorku (0 % procent přídavku LDL) a v pokusných variantách obohacených o 4, 6 a 8 % přídavku LDL, jak je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – Vzorky inseminačních dávek dle použitých ředidel a koncentrací LDL

Označení vzorku	Ředidlo	Přídavek LDL
A0	AndroMed [®]	0 % - kontrola
A4	AndroMed [®]	4 %
A6	AndroMed [®]	6 %
A8	AndroMed [®]	8 %
B0	Bioxcell [®]	0 % - kontrola
B4	Bioxcell [®]	4 %
B6	Bioxcell [®]	6 %
B8	Bioxcell [®]	8 %

Ředidla byla připravována vždy v den odběru podle návodu výrobce. Čistý, dialyzovaný LDL cholesterol, extrahovaný z vaječného žloutku byl připravován v souladu s metodikou dle Moussa a kol. (2002). Slepíčí vejce byla získávána od společnosti Biopharm[®] (BIOPHARM spol. s r.o., Rájec Jestřebí, ČR) a produkce LDL frakce byla zajišťována firmou Henna (Henna s.r.o., Nový Jičín, ČR).

Odebraný a vyhodnocený ejakulát byl následně rozdělen na 8 dílů a každý díl byl naředěn jiným ředidlem dle tabulky č. 1 na 10×10^6 aktivních spermií v inseminační dávce po rozmrazení. Naředěný ejakulát byl následně naplněn do pejet o objemu $0,25 \text{ cm}^3$, zchlazen na teplotu $4 \text{ }^\circ\text{C}$, ekvilibrován po dobu 2 hodin a mrazen v automatickém mrazicím boxu Minidigitcool (IMV, Cryo Bio Systém, L'Aigle, Normandie, Francie) standardní mrazicí křivkou pro sperma býka. Z každého dílu bylo vyrobeno cca 30 kusů inseminačních dávek, které byly po zmrazení uloženy v kontejneru s LN2 (tekutým dusíkem) na uskladnění inseminačních dávek při teplotě $-196 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4 Rozmrazování spermatu a hodnocení vzorků

Inseminační dávky byly dále po rozmrazení hodnoceny ve specializovaných andrologických laboratořích Katedry chovu hospodářských zvířat a Katedry veterinárních

disciplín Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze.

4.4.1 Hodnocení vlivu báze ředidla

Rozmrazování spermatu a hodnocení vzorků

POSTUP: Pejety byly rozmrazovány ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 30 sekund a následně hodnoceny. Celková motilita spermií udávaná v % byla hodnocena pomocí metody CASA – počítačem asistovaná analýza spermií (SCA[®] Production v. 5.3., MICROPTIC, Barcelona, Španělsko) s mikroskopem s fázovým kontrastem Eclipse E200 (Nikon[®], Tokio, Japonsko) při 200 – 300násobném zvětšení, přičemž bylo hodnoceno minimálně 5 zorných polí na každou pejetu dle Tuncer a kol. (2011).

Dále bylo provedeno vyhodnocení průtokové cytometrie, jak je popsáno dle Savvulidi a kol. (2021) s malou modifikací v hodnocení celkové životaschopnosti, protože životaschopné spermie byly hodnoceny jako buňky s intaktní plazmatickou membránou a intaktním akrozomem.

Analýzy proběhly bezprostředně po rozmrazení inseminační dávky a poté po uplynutí 1 a 2 hodiny trvající inkubaci. Pro každou analýzu bylo z inkubované inseminační dávky odebráno 25 µl ejakulátu, který byl pipetován do 225 µl Dulbecova fosfátového pufru bez bivalentních kationtů (Biosera Europe, Nuaille, Francie) obohaceného o 12,5 µl směsi čtyř fluorochromů. Vzniklý vzorek byl přenesen do inkubátoru, kde byl ponechán po dobu 10 minut ve tmě při 38 °C. Tato časová dotace sloužila k navázání použitých fluorochromů na svá vazebná místa.

Konečná koncentrace fluorescenčních barviv ve vzorcích byla následující: 16.2 µM H-342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro odlišení nebuněčných částic, 12 µM PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro zjištění poškození plazmatické membrány, 0.5 µg / mL FITC-PNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pro stanovení akrozomálního statutu a 80 nM MTR DR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pro analýzu úrovně potenciálu mitochondriální membrány.

Použitým analyzním přístrojem byl průtokový cytometr NovoCyte, modelové řady 3 000 (Acea Biosciences, součásti Agilent, Santa Clara, Kalifornie, USA). Tento cytometr byl vybaven fialovým (405 nm vlnové délky), modrým (488 nm vlnové délky) a červeným laserem (640 nm vlnové délky) a adekvátními optickými filtry pro detekci emitovaných fluorescenčních signálů. Každý odebraný ejakulát byl vyhodnocen v technických duplikátech.

Koncentrace buněk pro analýzu cytometrem byla $0,8 \times 10^6$ spermií na 1 ml. Rychlost analýzy byla nastavena na 14 μl za minutu a z každého vzorku byla nahrána fluorescence z 30 000 událostí. Před každou další analýzou bylo provedeno čištění přístroje. Kontrola kvality měření přístroje a kalibrace byla prováděna rutinně na denní bázi.

Pro práci s cytometrickými daty byl prvotně využit software NovoExpress verze 1.3.0 (Acea Biosciences, součástí Agilent, Santa Clara, Kalifornie, USA) a dále Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2021, Redmont, Washington, USA). Prvotně byly ze získaných dat odfiltrovány události, které nesplňovaly vlastnosti spermií (patříčná délka či přítomnost DNA). Dále byly již události rozděleny na různé subpopulace spermií, a to na životaschopné (spermie, které měly neporušenou plazmatickou i akrozomální membránou) a na spermie s poškozenou plazmatickou membránou. Dle poškození plazmatické membrány, byly dále rozděleny na subpopulace dle poškození akrozomu a subpopulace s rozlišenou úrovní mitochondriální membrány.

Vyhodnocení CASA a průtokové cytometrie bylo provedeno ihned po rozmrazení a poté 1 a 2 hodiny po rozmrazení. Během dvouhodinového testu termorezistence po rozmrazení byly vzorky uchovávány v inkubátoru INB 400 (Memmert GmbH, Schwabach, Německo) při 38 °C.

4.4.2 Hodnocení vlivu koncentrace LDL

Stanovení procenta živých / mrtvých spermií barvením

POSTUP: Pejety byly rozmrazovány ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 30 sekund a následně hodnoceny. Pro hodnocení vlivu koncentrace LDL bylo provedeno Eosin / Nigrosin barvení na živé/mrtvé spermie, a to bezprostředně po rozmrazení (37 °C, 30 sekund), po chladovém šoku (0 °C, 10 min.) a po tepelném testu přežitelnosti spermií (37 °C, 120 min.).

Na předeřtáté hodinové sklo bylo nanesen obsah pejety, k němu přidáno 20 μl Eosinu a krouživými pohyby jemně promícháváno po dobu 30 sekund. Následně pak bylo ještě přidáno 40 μl Nigrosinu a jemně opět byla suspenze promíchána. Poté bylo 20 μl vzniklé suspenze nanášeno na předeřtáté podložní sklo a vyhotoven nátěr.

Po zaschnutí byly nátěry vyhodnocovány mikroskopem s fázovým kontrastem při 1 000násobném zvětšení za použití olejové imerze. Barvivo Eosin prostupuje buněčnými stěnami mrtvých spermií a zbarví je do červena. Živé spermie nepropustí barvivo a zůstávají

tak bílé. Z každého preparátu bylo vyhodnoceno minimálně 200 spermií a dle toho vyjádřen procentní podíl živých spermií.

Hodnocení odolnosti k chladovému šoku

POSTUP: Z každého vzorku byly naplněny 3 kapiláry o objemu 0,1 ml, které byly na jednom konci uzavřeny gumovou zátkou. Následně pak byly kapiláry vloženy na 10 min. do chladicí lázně NoIce (Cole-Parmer[®], Vernon Hills, Illinois, USA) o teplotě 0 °C. Po skončení inkubace byl obsah kapiláry převeden na předeřáté hodinové sklo a bylo dle výše uvedeného postupu provedeno barvení na živé / mrtvé spermie. Následně bylo provedeno vyhodnocení (viz kapitola 4.5). Procentní podíl živých spermií je výrazem odolnosti k chladovému šoku.

Tepelný test přežitelnosti spermií

POSTUP: Vzorek ejakulátu (0,5 ml) byl napipetován do zkumavky o objemu 2 ml a vložen do vodní lázně o teplotě 37 °C. Po skončení 120 min. inkubace bylo opět dle výše uvedeného postupu provedeno barvení na živé / mrtvé spermie. Následně bylo provedeno vyhodnocení (viz kapitola 4.5). Procentní podíl živých spermií je výrazem odolnosti k jejich tepelnému zatížení.

4.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Při hodnocení vlivu různých bází ředidel byla získaná data analyzována pomocí statistického softwaru SAS 9.3. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Pro hodnocení jednotlivých efektů byl použit zobecněný lineární model (postup GLM). Pro hodnocení rozdílů průměrů nejmenších čtverců byla využita Tukey-Kramerova metoda. Pro vyhodnocení byla použita následující modelová rovnice:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + e_{ijk},$$

kde:

Y_{ijk} – závislá proměnná (motilita spermií, životaschopnost spermií, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu, vysoká mitochondriální aktivita po rozmrazení, tj. 0, 60 a 120 min. testu termorezistence po rozmrazení [T0-T120]);

μ – průměrná hodnota závislé proměnné;

A_i – fixní efekt býka třídy i (pro motilitu spermií: $i = 1, n = 45; i = 2, n = 45; i = 3, n = 45; i = 4, n = 45$; pro průtokový cytometr hodnocené parametry: $i = 1, n = 90, i = 2, n = 90, i = 3, n = 90, i = 4, n = 90$);

B_j – fixní efekt ředidla třídy j (pro motilitu spermií: $j = \text{AndroMed}^{\text{®}}, n = 60; j = \text{Optidyl}^{\text{®}}, n = 60; j = \text{BullXcell}^{\text{®}}, n = 60$; pro průtokový cytometr hodnocené parametry: $j = \text{AndroMed}^{\text{®}}, n = 120; j = \text{Optidyl}^{\text{®}}, n = 120; j = \text{BullXcell}^{\text{®}}, n = 120$);

C_k – fixní efekt času hodnocení třídy k (pro pohyblivost spermií: $k = 0, n = 36; k = 60, n = 36; k = 120, n = 36$; pro průtokový cytometr hodnocené parametry: $k = 0, n = 120; k = 60, n = 120; k = 120, n = 120$);

(AB) ij – interakce mezi fixním efektem býka a vybraným ředidlem;

(AC) ik – interakce mezi fixním efektem býka a časem hodnocení;

E_{ijk} – zbytková chyba

Pro hodnocení vlivu koncentrace LDL byla získaná data zaznamenávána v programu MS Excel a statisticky vyhodnocena pomocí programu SAS (SAS/STAT[®] 9.1, 2009), metodami MEANS, UNIVARIATE a MIXED.

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

5 VÝSLEDKY

5.1 Vyhodnocení vlivu báze ředidla

V rámci hodnocení vlivu báze ředidla byla provedena postupná hodnocení u použitých vybraných ředidel. Jedná se o 3 v současné době nepoužívanější ředidla – AndroMed[®] (MiniTüb GmbH, Tiefenbach, Německo), které je postaveno na bázi sójového lecitinu, Optidyl[®] (Biovet, Fleurance, Francie), kde je použita báze na základě ionizovaného žloutku a ředidlo BullXcell[®] (IMV, L'Aigle, Normandie, Francie), kde je jako báze použit čerstvý vaječný žloutek. Výsledky jednotlivých hledisek hodnocení jsou uvedeny v tabulkách č. 2, 3 a 4.

Nejprve byl ze všech 12 kombinací (4 býci a 3 ředidla) vyhodnocen pro každého použitého býka zvlášť právě vliv býka na jednotlivé hodnocené ekvivalenty kvality spermií, tj. na celkovou motilitu, na životaschopnost, na mitochondriální aktivitu, na poškození plazmatické membrány a na poškození akrozomu.

Následovalo pak u všech 12 kombinací vyhodnocení vlivu doby hodnocení po rozmrazení inseminační dávky, tj. ihned po rozmrazení inseminačních dávek v čase 0 min. a dále pak v časech 60 min. a 120 min. po rozmrazení inseminačních dávek jako forma termorezistentního testu.

Závěrečné vyhodnocení bylo u všech kombinací provedeno dle jednotlivých druhů ředidel – AndroMed[®], Optidyl[®] a BULLXcell[®], respektive jejich použitých bází – báze ze sójového lecitinu, báze na základě ionizovaného žloutku a báze na základě čerstvého vaječného žloutku.

Hodnocení vlivu býka po rozmrazení inseminační dávky

Jak je zřejmé z tabulky č. 2 a z tabulky č. 4 si zachoval nejvyšší celkovou pohyblivost spermií v průběhu testu termorezistence po rozmrazení. Rozdíly od ostatních býků byly statisticky významné ($P < 0,01$).

Nejvyšších hodnot životaschopnosti během testu termorezistence po rozmrazení dosáhl také býk č. 4 (52,62 %), kde byly rozdíly oproti ostatním býkům (- 5,17 %; - 6,58 % a - 6,69 %) statisticky významné ($P < 0,01$). V tabulce č. 2 lze dále pozorovat, že býk č. 4 a býk č. 2 dosahovali nejvyšší mitochondriální aktivitu během testu termorezistence po rozmrazení ($P < 0,01$). Býk č. 4 dosáhl nejnižších hodnot poškození plazmatické membrány během testu termorezistence po rozmrazení ($P < 0,01$) a spolu s býkem č. 3 také

vykázali nejnižší hodnoty akrozomálního poškození během testu termorezistence po rozmrazení ($P < 0,01$).

Tabulka č. 2 – Hodnocení vlivu býka po rozmrazení inseminační dávky (%)

Hodnocený znak	Celková motilita	Života-schopnost	Mitochondriální aktivita	Poškození plazmatické membrány	Poškození akrozomu
Číslo býka					
Býk č. 1	43,67 ± 0,95 ^A	47,45 ± 0,49 ^A	59,76 ± 1,21 ^{A,C}	50,81 ± 0,48 ^{A,a,c}	31,63 ± 0,40 ^{A,C}
Býk č. 2	40,44 ± 0,95 ^C	46,04 ± 0,49 ^C	65,82 ± 1,21 ^{A,D}	52,73 ± 0,85 ^{A,d}	33,70 ± 0,40 ^{A,D,E}
Býk č. 3	31,89 ± 0,95 ^{B,D,E}	45,93 ± 0,49 ^A	49,88 ± 1,21 ^B	52,89 ± 0,48 ^{A,b}	29,50 ± 0,40 ^B
Býk č. 4	49,11 ± 0,95 ^{B,D,F}	52,62 ± 0,49 ^{B,D}	66,93 ± 1,21 ^{A,D}	45,66 ± 0,48 ^B	29,70 ± 0,40 ^{D,F}

Legenda:

Výsledky jsou vyjádřeny jako nejmenší čtvercové průměry ± standardní chyba.

Označení písmeny (A-B, C-D, E-F) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,01$.

Označení písmeny (a-b, c-d) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,05$.

Hodnocení vlivu doby hodnocení po rozmrazení inseminační dávky

Během testu vlivu doby hodnocení (0, 60 a 120 min.) po rozmrazení inseminační dávky, tj. provedení testu termorezistence bylo dle údajů uvedených v tabulce č. 3 pozorováno postupné snižování celkové motility spermií a také mitochondriální aktivity, protože průměrná motilita a mitochondriální aktivita se po rozmrazení snížily z hodnot 51,53 % a 65,21 % na hodnoty 29,44 % a 54,44 % postupně po 60 a 120 minutách inkubace ($P < 0,01$).

Tabulka č. 3 – Hodnocení vlivu doby hodnocení po rozmrazení inseminační dávky (%)

Hodnocený znak	Celková motilita	Života-schopnost	Mitochondriální aktivita	Poškození plazmatické membrány	Poškození akrozomu
Doba hodnocení					
0 min.	51,53 ± 1,06 ^A	46,72 ± 0,42 ^A	65,21 ± 1,05 ^A	52,25 ± 0,42 ^A	25,52 ± 0,35 ^A
60 min.	42,08 ± 1,87 ^{B,C}	51,28 ± 0,42 ^{B,C}	62,15 ± 1,05 ^A	47,42 ± 0,42 ^{B,C}	29,96 ± 0,35 ^{B,C}
120 min.	29,44 ± 1,06 ^{B,D}	46,02 ± 0,42 ^D	54,44 ± 1,05 ^B	51,89 ± 0,42 ^D	37,92 ± 0,34 ^{B,D}

Legenda:

Výsledky jsou vyjádřeny jako nejmenší čtvercové průměry ± standardní chyba.

Označení písmeny (A-B, C-D, E-F) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,01$.

Označení písmeny (a-b, c-d) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,05$.

Hodnocení vlivu báze ředidla po rozmrazení inseminační dávky

Jak je patrné z údajů tabulky č. 4, nejméně vhodným ředidlem bylo ředidlo AndroMed[®], které mělo všechny hodnocené parametry ejakulátu a spermií na nejnižších hodnotách, s výjimkou hodnocení poškození plazmatické membrány a poškození akrozomu, které byly naopak nejvyšší. Rozdíly v ředidlech postavených na bázi vaječného žloutku byly statisticky významné ve všech měřených ukazatelích ($P < 0,01$).

Tabulka č. 4 – Hodnocení vlivu báze ředidla po rozmrazení inseminační dávky (%)

Hodnocený znak	Celková motilita	Životaschopnost	Mitochondriální aktivita	Poškození plazmatické membrány	Poškození akrozomu
Použité ředidlo					
AndroMed [®]	36,00 ± 0,82 ^A	42,55 ± 0,42 ^A	54,56 ± 1,046 ^A	56,1 ± 0,42 ^A	36,13 ± 0,35 ^A
Optidyl [®]	43,50 ± 0,822 ^B	49,42 ± 0,424 ^{B,C}	67,20 ± 1,05 ^{B,C}	49,16 ± 0,42 ^{B,C}	29,1 ± 0,34 ^B
BULLXcell [®]	44,33 ± 0,82 ^B	52,06 ± 0,42 ^{B,D}	60,03 ± 1,05 ^{B,D}	46,25 ± 0,42 ^{B,D}	28,09 ± 0,35 ^B

Legenda:

Výsledky jsou vyjádřeny jako nejmenší čtvercové průměry ± standardní chyba.

Označení písmeny (A-B, C-D, E-F) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,01$.

Označení písmeny (a-b, c-d) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,05$.

Dále byly v rámci této práce hodnoceny vlivy interakcí mezi jednotlivými býky (býci č. 1 až 4) a jednotlivými sledovanými ekvivalenty, kterými byly doba hodnocení po rozmrazení inseminační dávky (0, 60 a 120 min.) a sledované ředidlo, tedy použitá báze ředidla, tj. ředidla AndroMed[®], Optidyl[®] a BULLXcell[®], respektive jejich báze složení – báze postavená na sójovém lecitinu, báze na základě ionizovaného žloutku a báze na základě čerstvého vaječného žloutku

Vyhodnocení vlivu interakcí mezi býkem a dobou hodnocení po rozmrazení inseminační dávky

Další interpretované výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5, která sumarizuje hodnocené interakce – jednotlivých býků (býk č. 1 až 4) a dobou hodnocení (0, 60 a 120 min.) po rozmrazení inseminačních dávek.

Zde lze pozorovat u jednotlivých býků pozitivní vliv testu termorezistence na životaschopnost spermií. Narozdíl od klesajícího podílu spermií vykazujících u jednotlivých býků znaky poškození plazmatické membrány.

V dalších sledovaných ukazatelích, kterými byly celková motilita spermií, mitochondriální aktivita a podíl spermií s poškozeným akrozomem je dle tabulky č. 5 u všech sledovaných býků znatelná nejednotnost vlivu působení času na uvedené hodnocené ekvivalenty.

Zde se projevuje značná individualita každého jednotlivého býka k působení vlivu času během průběhu testu termorezistence, kdy např. býk č. 4 se se svými hodnotami vymyká hodnotám zjištěným u ostatních sledovaných býků. Zvláště je tomu tak v hodnocení celkové motility spermií.

Další sledované ukazatele jsou v rámci vykazovaných hodnot u jednotlivých býků značně nejednotné a je nutné tyto interpretovat u každého býka při hodnocení vlastností jeho ejakulátu a spermií zvlášť. Nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi životaschopností spermií u jednotlivých býků v časech hodnocení 0 a 120 min. po rozmrazení inseminačních dávek.

Tabulka č. 5 – Hodnocení vlivu interakcí mezi býkem a dobou hodnocení po rozmrazení inseminační dávky (%)

Hodnocený znak	Celková motilita	Života-schopnost	Mitochondriální aktivita	Poškození plazmatické membrány	Poškození akrozomu
Býk a doba hodnocení					
Býk č. 1 0 min.	42,33 ± 1,64 ^{A,a}	39,72 ± 0,85 ^{A,a}	35,17 ± 2,09 ^A	59,20 ± 0,84 ^A	31,00 ± 0,69 ^A
Býk č. 1 60 min.	45,00 ± 1,64 ^{C,c}	48,32 ± 0,85 ^{B,C}	60,43 ± 2,09 ^{B,C}	50,50 ± 0,835 ^{B,C}	28,10 ± 0,69 ^C
Býk č. 1 120 min.	43,67 ± 1,64 ^{E,e}	49,76 ± 0,85 ^{B,E}	54,06 ± 2,09 ^{B,E,a}	48,98 ± 0,84 ^{B,E,a}	29,39 ± 0,69 ^{E,a}
Býk č. 2 0 min.	33,33 ± 1,64 ^{B,D,F,G,g}	40,76 ± 0,85 ^{D,F,G}	54,86 ± 2,09 ^{B,E,c}	57,80 ± 0,84 ^{D,F,G}	41,73 ± 0,69 ^{B,D,F,G,c}
Býk č. 2 60 min.	43,00 ± 1,64 ^{H,I,i}	48,74 ± 0,85 ^{B,H,I,a}	65,23 ± 2,09 ^{B,b,d}	49,59 ± 0,84 ^{B,H,I,c}	27,28 ± 0,69 ^{B,H,I}
Býk č. 2 120 min.	45,00 ± 1,64 ^{H,K,k}	52,85 ± 0,85 ^{B,D,H,K,b}	59,19 ± 2,09 ^{B,G,e}	45,03 ± 0,84 ^{B,D,H,J,K,b,e}	25,89 ± 0,69 ^{B,H,K,b}
Býk č. 3 0 min.	25,33 ± 1,64 ^{B,D,F,J,L,M,h,l}	49,35 ± 0,85 ^{B,H,M}	66,56 ± 2,09 ^{B,F}	49,21 ± 0,84 ^{B,H,M,f}	33,36 ± 0,69 ^{C,D,F,H,J,L,M}
Býk č. 3 60 min.	35,33 ± 1,64 ^{D,L,N,O,f}	52,92 ± 0,85 ^{B,D,H,K,b}	69,90 ± 2,09 ^{B,F,f}	45,33 ± 0,83 ^{B,D,H,O,d}	29,06 ± 0,69 ^{C,H,N,O}
Býk č. 3 120 min.	35,00 ± 1,64 ^{D,L,N,Q,f,j,m}	55,58 ± 0,85 ^{B,D,F,H,J,N,O}	64,33 ± 2,09 ^{B,b}	42,46 ± 0,84 ^{B,D,F,H,J,N,Q}	26,68 ± 0,69 ^{B,H,N,Q}
Býk č. 4 0 min.	43,00 ± 1,64 ^{H,N,S,n}	40,35 ± 0,85 ^{D,F,J,L,N,P,Q}	61,67 ± 2,09 ^{B,I}	58,43 ± 0,84 ^{D,F,J,L,N,P,R,S}	38,44 ± 0,69 ^{B,D,F,J,L,N,P,R,S,d}
Býk č. 4 60 min.	50,67 ± 1,64 ^{H,N,P,R,b}	47,70 ± 0,85 ^{B,H,L,P,R}	73,26 ± 2,09 ^{B,D,F,H,J,g}	51,20 ± 0,84 ^{B,H,L,P,R,T}	32,22 ± 0,69 ^{D,H,J,L,R,T}
Býk č. 4 120 min.	53,67 ± 1,64 ^{B,F,H,I,J,N,P,R,T,d}	50,05 ± 0,85 ^{B,H,P,R}	62,54 ± 2,09 ^{B,h}	48,54 ± 0,84 ^{B,H,R,T}	30,43 ± 0,69 ^{C,H,L,R,T}

Legenda:

Výsledky jsou vyjádřeny jako nejmenší čtvercové průměry ± standardní chyba.

Označení písmeny (A-B, C-D,...) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,01$.

Označení písmeny (a-b, c-d,...) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,05$.

Vyhodnocení vlivu interakcí mezi býkem a ředidlem inseminační dávky

Dále pak jsou v tabulce č. 7 uvedeny interakce mezi jednotlivými hodnocenými býky (č. 1 a 4) a bázemi použitých ředidel inseminačních dávek – AndroMed[®] na bázi sójového lecitinu, Optidyl[®] s přídavkem ionizovaného vaječného žloutku a BullXcell[®] s přídavkem čerstvého vaječného žloutku.

Ve studii byly pozorovány signifikantní dopady vlastního vlivu býků (tzv. býčí individualita) na motilitu, životaschopnost, mitochondriální aktivitu a poškození membrán rozmrazených spermií v jednotlivých ředidlech ($P < 0,01$; $P < 0,05$).

Navíc bylo statisticky prokázáno ($P < 0,01$), že ředidla na bázi vaječného žloutku dosáhla vyšší pohyblivosti spermií než ředidlo bez vaječného žloutku u všech býků kromě býka č. 1. Mezi jednotlivými býky byly statisticky významné rozdíly v hodnocení motility spermií po rozmrazení a hodnocení motility na konci testu termorezistence po rozmrazení u býků 2, 3 a 4 ($P < 0,01$). Největšího poklesu motility spermií během testu termorezistence po rozmrazení vykázal býk č. 2 ve výši 27,77 % ($P < 0,01$).

Tabulka č. 7 – Hodnocení vlivu interakcí mezi býkem a ředidlem inseminační dávky (%)

Hodnota znaku					
Býk a ředidlo	Celková motilita	Života-schopnost	Mitochon-driální aktivita	Poškození plazmatické membrány	Poškození akrozomu
Býk č. 1 +AndroMed [®]	48,89 ± 2,12 ^A	46,04 ± 0,85 ^A	57,41 ± 2,09 ^A	53,11 ± 0,84 ^{A,a}	24,24 ± 0,69 ^A
Býk č. 1 +Optidyl [®]	43,33 ± 2,12 ^C	48,67 ± 0,85 ^{C,a}	50,80 ± 2,09 ^{C,a}	50,22 ± 0,84 ^{C,c}	28,28 ± 0,69 ^{B,C}
Býk č. 1 +BULLXcell [®]	38,89 ± 2,12 ^{E,e}	43,09 ± 0,85 ^{D,E}	41,45 ± 2,09 ^{B,E}	55,35 ± 0,84 ^{D,E}	35,97 ± 0,69 ^{B,D,E,a}
Býk č. 2 +AndroMed [®]	54,44 ± 2,12 ^{D,F,G,g}	46,83 ± 0,85 ^{G,c}	61,83 ± 2,09 ^{F,b,c}	52,32 ± 0,84 ^G	23,30 ± 0,69 ^{D,F,G}
Býk č. 2 +Optidyl [®]	41,11 ± 2,12 ^{H,I}	51,19 ± 0,85 ^{B,F,I,d}	60,15 ± 2,09 ^{F,G,e}	47,26 ± 0,84 ^{B,F,H,I}	30,74 ± 0,69 ^{B,F,H,I}
Býk č. 2 +BULLXcell [®]	26,67 ± 2,12 ^{B,D,H,J,K,f}	44,32 ± 0,85 ^{I,J,K,b}	57,29 ± 2,09 ^{F,I}	52,84 ± 0,84 ^{I,K}	40,86 ± 0,69 ^{B,D,F,H,J,K}
Býk č. 3 +AndroMed [®]	43,33 ± 2,12 ^{L,M,h}	49,61 ± 0,85 ^{F,L,M}	71,58 ± 2,09 ^{B,D,F,H,J,K,d,g}	49,12 ± 0,84 ^{F,M,b}	25,23 ± 0,69 ^{F,J,L,M}
Býk č. 3 +Optidyl [®]	33,33 ± 2,12 ^{B,H,O}	56,05 ± 0,85 ^{B,D,F,H,J,L,N,O}	71,24 ± 2,09 ^{B,D,F,J,K,f,g}	42,54 ± 0,84 ^{B,D,F,H,J,L,N,O}	28,42 ± 0,69 ^{B,F,H,L,O}
Býk č. 3 +BULLXcell [®]	17,22 ± 2,12 ^{B,D,F,H,J,N,P,Q}	52,19 ± 0,85 ^{B,F,H,L,Q}	57,98 ± 2,09 ^{F,L,M}	45,34 ± 0,84 ^{B,D,F,H,L,Q,e}	35,45 ± 0,69 ^{B,D,H,J,L,N,P,Q}
Býk č. 4 +AndroMed [®]	59,44 ± 2,12 ^{D,F,J,L,N,P,R,S}	44,41 ± 0,85 ^{J,N,P,R,S,b}	70,02 ± 2,09 ^{B,D,F,J,N,f}	54,45 ± 0,84 ^{J,N,P,R,S,d}	29,31 ± 0,69 ^{B,F,H,J,L,N,R,S}
Býk č. 4 +Optidyl [®]	50,56 ± 2,12 ^{L,P,R,U,f}	49,22 ± 0,85 ^{F,L,P,T,U}	66,41 ± 2,09 ^{D,F}	49,67 ± 0,84 ^{F,P,T,f,g}	32,39 ± 0,69 ^{B,D,H,J,L,N,P,U,b}
Býk č. 4 +BULLXcell [®]	35,00 ± 2,12 ^{B,H,R,T,V}	44,48 ± 0,85 ^{J,N,P,R,V,b}	61,03 ± 2,09 ^{F,b,h}	54,06 ± 0,84 ^{J,N,P,R,h}	39,39 ± 0,69 ^{B,D,H,J,N,P,R,T,V,b}

Legenda:

Výsledky jsou vyjádřeny jako nejmenší čtvercové průměry ± standardní chyba.

Označení písmeny (A-B, C-D,...) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,01$.

Označení písmeny (a-b, c-d,...) v horním indexu označuje hladinu statistické významnosti $P < 0,05$.

5.2 Vyhodnocení vlivu koncentrace LDL

V rámci hodnocení vlivu koncentrace LDL bylo provedeno postupné hodnocení jednotlivých hledisek, tj. hodnocení nejprve po rozmrazení inseminačních dávek, dále po chladovém šoku a po provedení tepelného testu.

Nejprve bylo provedeno celkové vyhodnocení procentního podílu živých spermií ze všech vzorků dle býků (č. 1 až 8). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8. Následovalo pak vyhodnocení dle použitých ředidel (Andromed[®] a Bioxcell[®]). Tyto výsledky jsou graficky znázorněny v grafu č. 1. Na konec pak bylo provedeno vyhodnocení jednotlivých použitých koncentrací přídatku LDL (4 %, 6 % a 8 %) vůči vzorkům bez použití přídatku LDL (0 %). Výsledky tohoto hodnocení jsou uvedeny v tabulce č. 9.

Vyhodnocení procentního podílu živých spermií dle býků

Výsledky vyhodnocení procentního podílu živých spermií v závislosti na individualitě býka jsou uvedeny v tabulce č. 8. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u býků č. 1, 2, 3 a 7, u kterých byly detekovány nejvyšší hodnoty % živých spermií jak po rozmrazení, tak i po chladovém šoku a také po tepelném testu. Nejnížší hodnoty % živých spermií byly naopak detekovány u býků č. 4 a 6, které byly po rozmrazení dokonce průkazně ($P < 0,05$) nejnižší. Pokles % živých spermií byl po jednotlivých zátěžích pozorován nejnižší v hodnotě -9,01 u býka č. 4 ($P < 0,05$).

Tabulka č. 8 – Vyhodnocení podílu živých spermií dle jednotlivých býků (%)

Číslo býka	Po rozmrazení	Po chladovém šoku	Pokles % živých spermií po chlad. šoku	Po tepelném testu	Pokles % živých spermií po tepel. testu
1	59,53 ^B	48,12 ^B	-11,41 ^B	39,72 ^B	-19,81 ^B
2	68,18 ^B	52,93 ^B	-15,25 ^B	41,17 ^B	-27,01 ^B
3	52,80 ^B	41,95	-10,85	35,96	-16,84
4	34,97 ^A	27,64 ^A	-7,33 ^A	25,96 ^A	-9,01 ^A
5	47,23	31,50	-15,73 ^B	26,35	-20,88 ^B
6	33,71 ^A	24,63	-9,08	17,61 ^A	-16,10
7	53,14 ^B	42,18	-10,96	40,32	-12,82
8	46,23	35,21	-11,02 ^B	32,71	-13,52

Legenda:

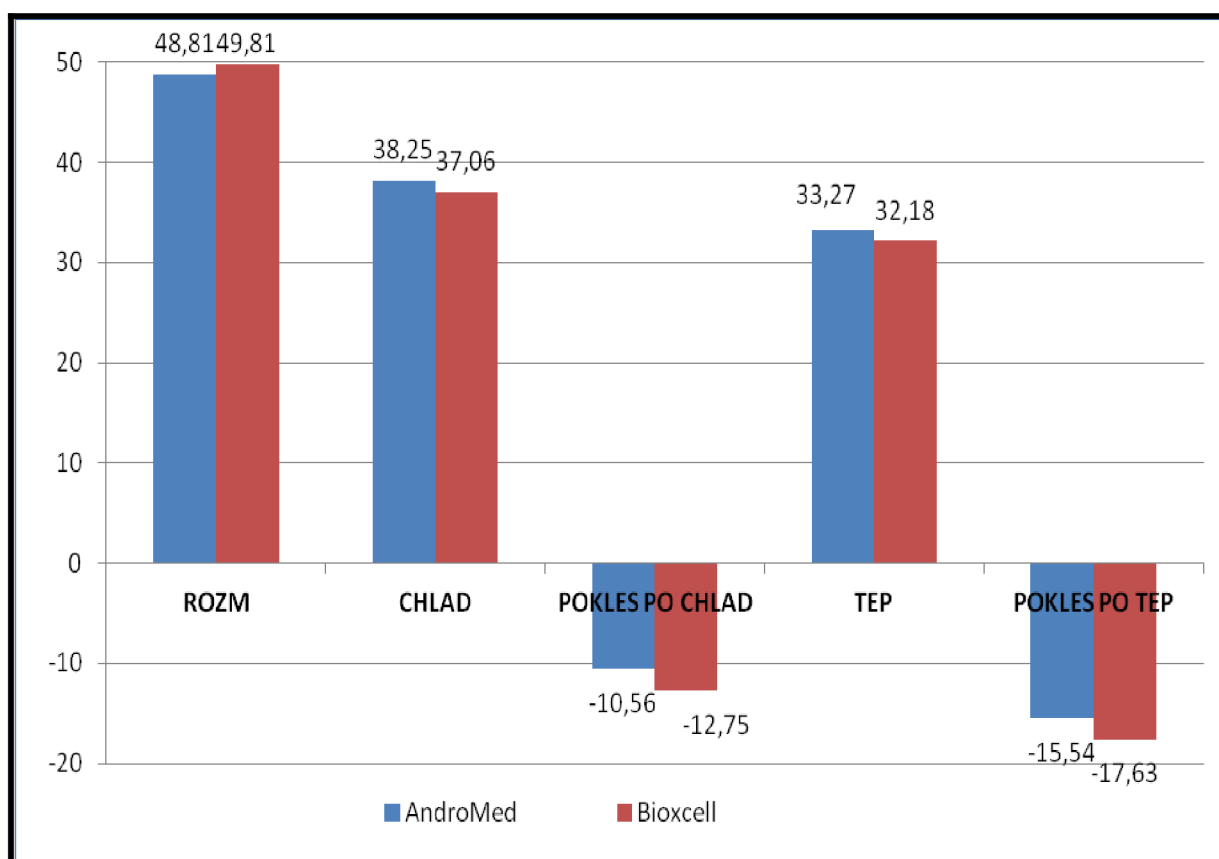
A, B – v horním indexu označují statisticky významný rozdíl na hladině $P < 0,05$.

Vyhodnocení procentního podílu živých spermií dle ředidel

V grafickém znázornění výsledků jsou v grafu č.1 znázorněny výsledky vyhodnocení % živých spermií podle jednotlivých sledovaných ředidel, bez ohledu na výši podílu přídatku LDL.

Rozdíly mezi použitými ředidly AndroMed® a Bioxcell® byly statisticky neprůkazné ($P > 0,05$). K nižšímu poklesu % živých spermií došlo v obou případech zátěže tj, chladovém šoku a tepelném testu u vzorků ředěných ředidlem AndroMed® (-10,56 % a -15,54 %).

Graf č. 1 – Vyhodnocení podílu živých spermií podle jednotlivých ředidel (%)



Legenda:

ROZM – % živých spermií po rozmrazení

CHLAD – % živých spermií po chladovém šoku

TEP – % živých spermií po tepelném testu

POKLES PO CHLAD – pokles % živých spermií

POKLES PO TEP – pokles % živých spermií

Vyhodnocení procentního podílu živých spermií dle přídatku LDL

Výsledky vyhodnocení procentního podílu živých spermií v závislosti na koncentraci přídatku LDL v ředidle jsou uvedeny v tabulce č. 3. Průkazné rozdíly ($P < 0,05$) byly nalezeny mezi kontrolními vzorky a vzorky s přídatkem 8 % LDL u ředidla AndroMed®

jak po rozmrazení, tak i po chladovém šoku i po tepelném testu. Vzorky s 8 % přídavku LDL měly zároveň průkazně ($P < 0,05$) nejnížší pokles % živých spermií v průběhu tepelného testu (-12,84 %) než vzorky bez přídavku LDL (-20,52 %). Z tabulky je dále patrný trend, že se zvyšující se koncentrací LDL v ředidle se zvyšuje také % živých spermií ve vzorku.

U ředidla Bioxcell[®] byly neprůkazné rozdíly mezi kontrolními vzorky a vzorky s přídavkem 6 % LDL. U vzorků s 8% přídavkem byly naopak zjištěny největší poklesy podílu živých spermií. Z údajů tabulky je dále patrný jasný trend, že se zvyšující se koncentrací LDL v ředidle se zvyšuje také % živých spermií ve vzorku pouze do výše 6 % přídavku LDL.

Tabulka č. 9 – Vyhodnocení podílu živých spermií dle přídavku LDL (%)

Označení vzorků	Po rozmrazení insem. dávky	Po chladovém šoku	Pokles % živých spermií po chlad. šoku	Po termo-rezistentním testu	Pokles % živých spermií po tepel. testu
A0	45,08 ^A	32,13 ^A	-12,95 ^A	24,56 ^A	-20,52 ^A
A4	49,02	38,44	-10,58	35,47	-13,55
A6	49,37	40,86	-8,51	34,15	-15,22
A8	51,98 ^B	42,31 ^B	-9,67 ^B	39,14 ^B	-12,84 ^B
B0	49,57	36,85	-12,72	28,77	-20,80
B4	49,54	38,64	-10,90	34,44	-15,10
B6	48,49	38,48	-10,01	33,89	-14,60
B8	51,68 ^B	34,06	-17,62	30,75	-20,93

Legenda:

A, B – v horním indexu označují statisticky významný rozdíl na hladině $P < 0,05$.

Označení vzorků: A0 – AndroMed[®] + 0 % LDL

A4 – AndroMed[®] + 4 % LDL

A6 – AndroMed[®] + 6 % LDL

A8 – AndroMed[®] + 8 % LDL

B0 – Bioxcell[®] + 0 % LDL

B4 – Bioxcell[®] + 4 % LDL

B6 – Bioxcell[®] + 6 % LDL

B8 – Bioxcell[®] + 8 % LDL

6 DISKUSE

Úspěšná kryokonzervace spermií závisí na několika vzájemně souvisejících faktorech, včetně počáteční kvality spermatu, složení ředidla, použitého kryoprotektiva, chladicího protokolu, formy balení, rychlosti rozmrazování včetně vzájemného působení těchto jednotlivých ekvivalentů, jakož i individuálních vlastností zvířat. (Cooter a kol., 2005; Andrabi, 2007; Clulow a kol., 2008). Zdokonalování produkce inseminačních dávek je proto stále důležitým a nepřetržitým procesem, protože pouze cca 50 % spermií se po rozmrazení zotaví, a to i za těch nejušlechtilejších a nejkontrolovanějších mrazicích podmínek a modifikací (Layek a kol., 2016). Rozdíly v pohyblivosti spermií a dalších charakteristikách spermií během testu termorezistence po rozmrazení potvrzují účinky individuality pleménika na konečnou oplozovací schopnost spermií. Mohou také korelovat s genetickými faktory vysvětlujícími mezidruhové či meziplenné vlivy, stejně jako individuální rozdíly u přímo jednotlivých zvířat (Thurston a kol., 2012).

Zjištěné změny motility spermií v této práci během testu termorezistence po rozmrazení jsou v souladu s Beranem a kol. (2013) a Doležalovou a kol. (2016), kteří zaznamenali nejvyšší motilitu na začátku termorezistentního testu bezprostředně po rozmrazení inseminačních dávek. Alcaý a kol. (2015) ve studii porovnávající motilitu spermií po rozmrazení v ředidlech s přídavkem čerstvého nebo lyofilizovaného vaječného žloutku, nenašli žádné statisticky významné rozdíly mezi těmito variantami ředidel, což je také v souladu se zjištěními v této práci.

Báze ředidel

V této práci byly hodnoceny účinky různých bází 3 komerčně dostupných ředidel na kvalitu býčích spermií:

- AndroMed®, které je sestaveno na bázi sójového lecitinu,
- Optidyl®, které obsahuje přídavek ionizovaného vaječného žloutku,
- BullXcell®, kde je použit přídavek čerstvého vaječného žloutku.

Ohledně bází ředidel jsou výsledky zjištěné v této práci také srovnatelné s Muiño a kol. (2007), Celeghini a kol. (2008), Crespilho a kol. (2012) a Singh a kol. (2018), kteří zjistili, že ředidla na bázi vaječného žloutku vykazují vyšší hodnoty motility spermií po rozmrazení ve srovnání s ředidly na bázi sójového lecitinu. Protichůdná zjištění však objevili Kumar a kol. (2015), kteří uvedli vyšší motilitu spermií v inseminačních dávkách ředěných ředidlem na bázi rostlinného původu spíše než v ředidlech postavených na bázi vaječného žloutku. Ve studii provedené Murphym a kol. (2018) nebyly hlášeny žádné

statisticky významné rozdíly mezi celkovou pohyblivostí spermií inseminačních dávek ředěných ředidly AndroMed[®] a BullXcell[®].

Naproti tomu Amirat a kol. (2005) pozorovali, že ředidla na bázi vaječného žloutku negativně ovlivňují motilitu spermií, pravděpodobně díky látkám, které tato ředidla obsahují, zatímco ředidla na bázi sójového lecitinu zachovávají vyšší celkovou motilitu spermií. S rostoucím důrazem na otázky biologické bezpečnosti a na kontrolu nemocí s ohledem na mezinárodní obchodování se spermatem se ředidla založená na bázi vaječného žloutku stala podezřelými z možného přenosu určitých onemocnění.

Potenciálem plniva na bázi sójového lecitinu nahrazujícího plnivo vyrobené z vaječného žloutku se proto zabývalo několik výzkumných prací (Aires a kol., 2003; Muiño a kol., 2007, Miguel a kol., 2008, Miguel-Jimenez a kol., 2020). Aires a kol. (2003) a Amirat a kol. (2005) uvedli, že ředidla založená na bázi sójového lecitinu vycházela po procesu kryokonzervace spermatu odebraného od holštýnských býků v parametrech kvality spermií lépe než ředidla postavená na bázi vaječného žloutku.

Naopak vyšší procento životaschopných spermií kryokonzervovaných ředidlem na bázi vaječného žloutku ve srovnání s ředidly na bázi lecitinu ze sójových bobů bylo pozorováno ve studiích Crespilha a kol. (2012) a Singh a kol. (2018). Akhter a kol. (2010), kteří porovnávali ředidla založená na bázi extraktu ze sójových bobů s ředidly na bázi vaječného žloutku hodnocením životaschopnosti, akrozomálního stavu, pohyblivosti spermií a 60 až 90minutovou mírou přežitelnosti spermií u holštýnských býků. V těchto parametrech nebyl mezi ředidly nalezen žádný významný rozdíl. Stejně výsledky, týkající se míry poškození spermií, když byla použita ředidla založená na bázi vaječného žloutku nebo sójového lecitinu, byly zjištěny Murphym a kol. (2018).

Tato zjištění jsou v rozporu nejen s našimi výsledky, ale také s pracemi Celeghini a kol. (2008) a Crespilha a kol. (2012), kde vzorky spermatu naředěné ředidly na bázi sójového lecitinu vykazaly nejnižší pohyblivost spermií, životaschopnost, neporušenost plazmatické membrány včetně horšího stavu akrozomů a mitochondrií po rozmrazení, což jsou základní předpoklady pro vyšší plodnost in vivo (Thun a kol., 2002 Veerabramhaiah a kol., 2015). Ochranná fáze sójového lecitinu je zjevně omezena procesem kryokonzervace, což má za následek sníženou životaschopnost spermií po rozmrazení a horší výsledky zabřezávání při použití umělé inseminace (Crespilha a kol., 2012).

Zhoršené hodnoty a rozdíly pozorované v jednotlivých parametrech kvality býčích inseminačních dávek částečně závisí na ředidlech použitých pro kryokonzervaci, což ukazuje,

že látky přítomné v ředidle ovlivňují kvalitu spermatu po rozmrazení odlišně (Kumar a kol., 2003; Beran a kol., 2012).

Jak je patrné z výsledků této studie, kvalita spermií některých býků se nelišila, ať už byly spermie naředěny ředidlem na bázi vaječného žloutku nebo lecitinu ze sójových bobů, zatímco jiní býci si po zředění ejakulátu ředidly na bázi vaječném žloutku zachovali lepší hodnocené vlastnosti spermií. Tato zjištění jsou v souladu se závěry práce Berana a kol. (2012), kde je rovněž potvrzen vliv individuality býka na vlastnosti a kvalitu spermií po rozmrazení inseminační dávky.

Aplikace nových technologických postupů při výrobě inseminačních dávek býků může vést prostřednictvím zlepšení jejich kvalitativních ukazatelů a oplozovací schopnosti ke zlepšení reprodukčních ukazatelů skotu, zejména snížení inseminačního indexu a tím také zkrácení mezidobí, které je velmi významným ekonomickým ukazatelem.

U vedené přínosy jsou ve velmi úzkém vztahu ke zvýšení rentability produkce z chovu skotu, která se po dlouhou dobu pohybuje v záporných hodnotách a má zásadní vliv na udržení chovu skotu a objemu jeho produkce v České republice jak mléka, tak i masa alespoň na stávající úrovni. Udržení chovu skotu a jeho produkce alespoň na současné úrovni je z důvodu nízké rentability nutné ze strany státu stimulovat různými dotačními opatřeními. Navržená řešení tak mohou mít nejen přímý ekonomický dopad do rentability chovu skotu, ale potažmo i pozitivní vliv na snížení náročnosti zemědělského komplexu na veřejné financování jak z národních, tak i evropských finančních zdrojů.

Přídavek LDL

Ohledně přídavku LDL, který je součástí vaječného žloutku, se má za to, že je z velké části zodpovědný za ochranu spermií v průběhu procesu jejich mrazení (Pace a Graham, 1974) neboť je chrání proti chladovému šoku (Moussa a kol., 2002).

Předpokládá se, že LDL působí na spermatickou membránu její stabilizací. Druhá hypotéza tvrdí, že fosfolipidy obsažené v LDL chrání povrch spermie ochranným filmem anebo nahrazují fosfolipidy spermatické membrány, které jsou ztraceny nebo poškozeny během procesu kryokonzervace (Graham a Foote, 1987). A třetí možný způsob ochrany je, že LDL zachytává škodlivé proteiny přítomné v semenné plazmě, což zlepšuje schopnost mrazení spermií (Bergeron a Manjunath, 2006). Přesný způsob ochrany spermií a vliv na jejich motilitu pomocí LDL není zatím přesně jasný (Bathgate a kol., 2006, Amirat a kol. 2004).

V poslední době byla testována ředidla z vaječného žloutku, přičemž se osvědčila kombinace s přídavkem 6 % LDL s 20 mmol glutaminu (Bencharif a kol., 2012). Podle Moussa a kol. (2002) se jako optimální koncentrace jeví 8% přídavek LDL do ředidla. Další možná ředění jsou s 4, 5, 6, 7, 8 a 10 % přídavku LDL (Moussa a kol., 2002).

V této práci byly zjištěny průkazné rozdíly mezi kontrolními vzorky a vzorky s přídavkem 8 % LDL u ředidla AndroMed[®] po rozmrazení, chladovém šoku i po tepelném testu. Vzorky s 8 % přídavku LDL měly zároveň průkazně nejnižší pokles % živých spermií v průběhu tepelného testu (-12,84 %), než kontrolní vzorky bez přídavku LDL (-20,52 %). Ve výsledcích je patrný trend, že se zvyšující se koncentrací přídavku LDL v tomto ředidle se také zvyšuje % živých spermií ve vzorku.

U ředidla Bioxcell[®] jsou neprůkazné rozdíly mezi kontrolními vzorky a vzorky s přídavkem 6 % LDL. U vzorků s 8 % přídavku byly naopak zjištěny největší poklesy podílu živých spermií. Ve výsledcích se projevil trend, že se zvyšující se koncentrací LDL v ředidle Bioxcell[®] se zvyšuje také % živých spermií ve vzorku pouze do výše 6 % přídavku LDL.

Možností ředění spermatu a použití různých ředidel a koncentrací přídavků je v realu velmi mnoho. V této práci byl hodnocen vliv koncentrací přídavku LDL ve výši 4, 6 a 8 % do komerčně dostupných ředidel AndroMed[®] a Bioxcell[®] na přežitelnost a oplozovací schopnost spermií po jejich rozmrazení, po chladovém šoku a po tepelném testu přežitelnosti spermií.

Pozitivní vliv přídavku LDL v uvedených koncentracích se projevil u použitých ředidel AndroMed[®] a Bioxcell[®] různě. Zcela průkazné na rozdíl od ředidla Bioxcell[®] bylo zvyšování pozitivního vlivu na přežitelnost a oplozovací schopnost se zvyšující se koncentrací – do 8 % u ředidla Andromed[®]. Kdežto u ředidla Bioxcell[®] tomu tak bylo pouze do výše koncentrace 6 %. Při hladině 8 % naopak došlo k výraznému poklesu oplozovací schopnosti spermií. Touto skutečností se jeví, že je pro různá v současné době využívaná a komerčně dostupná ředidla vhodné vybrat právě pro dané ředidlo určitou výši přídavku LDL. Obecně se má za to, že LDL – nízkodenzitní cholesterol, který je součástí vaječného žloutku je z velké části zodpovědný za ochranu spermií v průběhu procesu jejich mrazení, neboť je chrání proti chladovému šoku. Cholesterol je hydrofobní molekula ve vodě nerozpustná, má ale multifunkční vliv na buněčnou membránu spermie včetně její stabilizace a snížení propustnosti. Právě poměr cholesterolu a fosfolipidů v cytoplazmatické membráně spermie je důležitým determinantem tekutosti a stability buněčné membrány za působení nízkých teplot při jejich konzervaci hlubokým mrazením. Ředění ejakulátu přídavkem LDL

před mrazením pozitivně mění odolnost spermatické membrány vůči působení chladového šoku.

Předpokládá se, že LDL působí na stabilizaci spermatické membrány. Fosfolipidy obsažené v LDL chrání povrch spermie ochranným filmem nebo nahrazují fosfolipidy spermatické membrány, které jsou ztraceny nebo poškozeny během procesu kryokonzervace. V neposlední řadě možným způsobem ochrany je, že LDL zachytává škodlivé proteiny (BSP) přítomné v semenné plazmě, tedy že zlepšuje schopnost mrazení spermií. Způsob ochrany spermií a vliv na jejich motilitu pomocí LDL není zatím přesně jasný.

Obecně ředidla obsahující LDL, který je extrahovaný z vaječného žloutku, mohou být využita jako ředidla s lepšími účinky na spermie během mrazení než ředidla komerčně využívaná. Úspěch mrazení spermií závisí na stupni ředění a v současné době mnoho studií zkoumá využívání změn bází a různých koncentrací kryoprotektantů. Protože v současné době není známý přesný vliv LDL na spermie a ani není nikde doporučena jeho jednoznačná koncentrace v ředidle, je tato záležitost právě předmětem budoucího zkoumání na tento proces působících jiných vlivů.

To znamená, že se s vyšší přídavku LDL projevuje nejen vliv daného druhu ředidla, ale zejména pak různé vnitřní vlivy daného býka, a pak je to celý soubor navzájem se prolínajících a v čase se měnících vnějších vlivů. Projevuje se zde vztah býčí individuality daného plemenného býka ve vztahu k danému chovnému prostředí, kdy se dá předpokládat vliv nejen technologie ustájení, ale i vliv pastvy provozované v době pastevního období, včetně postupně probíhajících změn ve výživě býků – mění se složení krmné dávky v průběhu hospodářského roku.

7 ZÁVĚR A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

Cílem výroby inseminačních dávek (konzervace ejakulátu býků) je zajistit co nejvyšší oplozovací schopnost spermií, která v průběhu náročného procesu samotné výroby a následné manipulace s inseminačními dávkami klesá o cca 40 až 50 %. Proto je snaha optimalizovat proces výroby dávek pomocí použití vhodného ředidla, popřípadě vhodné koncentrace přísad různých komponentů, zde tedy LDL cholesterolu, do komerčně vyráběných ředidel. V celém procesu od výroby přes skladování až po užití inseminačních dávek je snaha se vyvarovat, či co nejvíce snížit toxicitu použitých ředidel a jejich přísad, dále pak také zajistit spermiím dostatečnou odolnost vůči chladovému šoku, ke kterému dochází v průběhu poklesu teplot a zajistit tak harmonický proces mrazení v mrazicím boxu. Stejně tak tomu musí být u následného procesu rozmrazení inseminačních dávek ve vodní lázni vůči zachování jejich co největší oplozovací schopnosti.

Postup a způsob ředění spermatu je důležitou součástí výroby inseminační dávky. Jako ředidla jsou dostupné specifické biochemické látky, které ovlivňují oplozovací schopnost spermií a předcházejí jejich poškození v průběhu mrazicího procesu, protože slouží jako ochrana pro spermie během procesu mrazení (snaha zabránit chladovému šoku) včetně dosažení zlepšení motility po následném rozmrazení. Spermie jsou citlivé na teplotu a jejich motilita se snižuje postupně, jak jsou spermie zchlazovány. Chladový šok způsobuje nevratnou ztrátu motility, které lze předcházet mimo jiné také použitím vhodné báze ředidla a aplikací přísady ochranné látky pro spermie.

V rámci sledování vlivu báze ředidla bylo v této práci zjištěno, že ředidla na bázi vaječného žloutku dosáhla vyšší zachování pohyblivosti spermií, než tomu bylo u ředidla bez vaječného žloutku u většiny býků, kromě jednoho. Ve studii byly prokázány významné dopady vlastního vlivu býků tzv. býčí individualita na motilitu, životaschopnost, mitochondriální aktivitu a poškození membrán rozmrazených spermií v jednotlivých ředidlech. Tato skutečnost ukazuje na to, že je velmi vhodné pro konkrétního býka – býčí individualitu (vnitřní podmínky), chovaného za daných vnějších podmínek, pro zachování co nejvyšší oplozovací schopnosti spermií vybrat v rámci inseminační stanice právě dle v této metodice sledovaných ukazatelů, kterými jsou životaschopnost, mitochondriální aktivita a poškození membrán rozmrazených spermií, jedno určité ředidlo z celé škály v současné době vyráběných a komerčně dostupných ředidel, která jsou založena právě na různých bázích.

Stejně tomu tak je u stanovení procentní výše přídatku LDL, kde se u daného býka využívaného pro produkci inseminačních dávek v určitých procentních hladinách přídatku LDL oplozovací schopnost spermií zvyšuje či naopak snižuje. Dle výsledků této práce nelze plošně určit, které ředidlo nebo která ředidla jsou pro zachování oplozovací schopnosti v rámci procesu kryokonzervace nejlepší, či jaká je nejvhodnější výše hladiny přídatku LDL. Jedná se zde o působení kombinace vnitřních a vnějších vlivů, včetně frekvence odběrů působících na každého plemenného býka velmi individuálně.

Výsledky sledování a jejich vyhodnocení prokazují, že nejen použité báze ředidel založené jak na bázi vaječného žloutku či ionizovaného vaječného žloutku, tak na bázi sójového lecitinu, mají u jednotlivých hodnocených býků rozdílné výsledky v jednotlivých kvalitativních parametrech rozmrazené inseminační dávky. Podobně je tomu ale i u použité výše koncentrace přídatku LDL do inseminační dávky. I zde měly jednotlivé hodnocené kvalitativní parametry u jednotlivých býků v daných koncentracích rozdílné výsledky v kvalitativních parametrech rozmrazených inseminačních dávek.

Z uvedených zjištění lze přijmout jednoznačný závěr, že se zde plně projevuje vliv tzv. individuality býka, kdy je velmi vhodné na inseminačních stanicích provést u každého býka použitého v inseminaci sledování reakce jeho ejakulátu či kvalitativních parametrů spermií na dané ředidlo, respektive jeho bázi, a na výši koncentrace přídatku LDL do inseminační dávky.

Na základě uvedených poznatků lze v návazných sledováních a výzkumech sledovat další kombinace býčí individuality daného plemenného býka ve vztahu k chovnému prostředí, kdy se dá předpokládat vliv technologie ustájení nebo pastvy v době její sezóny. Zejména je pak účelné v čase sledovat parametry ejakulátu či kvalitativní ukazatele spermií v rámci vlivu býčí individuality ve vztahu k dané krmné dávce, která se přirozeně v průběhu hospodářského roku mění nebo se mění dle zdrojů krmiv.

Tak jako se v poslední době v chovu hospodářských zvířat, v tomto případě chovu skotu, stále více do praxe aplikují jednotlivé prvky tzv. precizního zemědělství – nejen v oblasti produkce a využívání krmiv, či technologií získávání mléka – dojení nebo používání sofistikovaných technologií či prvků ustájení a řízení různých vlivů a podmínek chovu, ale v posledních letech i využívání řízených procesů reprodukce ze strany samic, tak se v současné době stále více ukazuje uplatnění i využití různých prvků v rámci precizního zemědělství i u samčí komponenty, tj. inseminační dávky využívané k reprodukci skotu.

8 PUBLIKAČNÍ AKTIVITA

Vědecká publikace s IF:

- **Vodička, J.**, Pytlík, J., Stádníková, M., Stádník, L., Ducháček, J., Cobl, R., Biniová, Z., 2022, The effects of egg yolk-based and egg yolk-free diluents on the post-thaw quality of bull spermatozoa, *Acta Veterinaria Brno* 2022, 91: 81–88.

Dokumentace publikování je uvedena jako Příloha č. 1

Odborné publikace:

- Doležalová, M., Stádník, L., **Vodička, J.**, 2014. Chlazení a ekvilibrace při výrobě inseminačních dávek. *Náš chov* 74 (6): 22–23.

Dokumentace publikování je uvedena jako Příloha č. 2

- Doležalová, M., Stádník, L., **Vodička, J.**, 2014. Přídavek kryoprotektantů do ředidel ejakulátu býků. *Náš chov* 74 (7): 24–25.

Dokumentace publikování je uvedena jako Příloha č. 3

The effects of egg yolk-based and egg yolk-free diluents on the post-thaw quality of bull spermatozoa

Jan Vodička, Jan Pytlík, Martina Stádníková, Luděk Stádník, Jaromír Ducháček, Radim Čodl, Zuzana Biniová

Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy,
Department of Animal Science, Prague, Czech Republic

Received April 12, 2022

Accepted

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of 3 different commercially available extenders – AndroMed® (soy lecithin-based), Optidyl® (with the addition of ionized egg yolk), and BULLXcell® (with the addition of fresh egg yolk) – on bull spermatozoa quality, which was evaluated using the parameters of spermatozoa motility, viability, plasma membrane damage, acrosome damage, and mitochondrial activity after thawing and during a 2 h long thermoresistance test. The spermatozoa quality indicators were appraised by computer-assisted semen analysis and a flow cytometer. Significant differences ($P < 0.01$) between bulls were registered in all indicators measured. The highest average values of spermatozoa total motility and viability were achieved using BULLXcell® extender (44.33%; 52.06%). Variances in comparing this extender with Optidyl® and AndroMed® were –0.83%, –2.64%; –8.33%, –9.51%. The differences found between the egg yolk-based diluents (BULLXcell® and Optidyl®) and AndroMed® were significant ($P < 0.01$). Therefore, the more valuable extenders for bull semen dilution were egg yolk-based extenders, which provided higher post-thaw spermatozoa survival and quality than the soy lecithin-based extender.

Insemination dose, sire, semen, extender, thermoresistance, spermatozoa survival

Preserving the fundamental abilities of sperm during the long and demanding process of insemination dose production can provide a higher level of pregnancy rates in cows. It also reduces the consumption of straws, shortens the calving interval, and improves the economic effectiveness of breeding itself. The main objective is to achieve a pregnancy rate with frozen semen that is similar to that of with fresh semen or simply with natural breeding (Mocé et al. 2010). The process of cryopreservation generally reduces the viability of semen, and damages all the structures of spermatozoa, thereby impairing fertilization ability (Ugur et al. 2019). During the production of insemination straws, the functional status of spermatozoa is affected by many factors, such as pH, osmotic pressure, and stress associated with temperature changes (Lessard et al. 2000; Watson 2000; Rehman et al. 2013; Parisi et al. 2014). These stress factors cause reactive oxygen species production and lipid peroxidation of the cell membrane, which affect spermatozoa unfavourably (Wang et al. 1997). The elimination of these negative effects is obtained with the addition of suitable cryoprotectants in bull semen extenders, by its interaction with bulls' individuality (Vera-Munoz et al. 2011), by the controlled process of cooling, and by the use of optimal freezing curves (Pena et al. 2011).

Currently, there is a wide variety of available bull semen diluents of diverse origins. The most conventional ones are egg yolk-based, while relatively newly developed diluents are comprised solely of plant components (Murphy et al. 2018). Plant-based extenders should provide a comparable quality of frozen insemination doses and, at the same time, eradicate the possible disadvantages of egg yolk-based diluents, such as disease transmission,

Address for correspondence:

Doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.
Department of Animal Science
Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources
Czech University of Life Sciences Prague
Kamýčká 129, 165 00 Prague 6 - Suchbátol, Czech Republic

Email: stadnik@af.czu.cz
Phone: +420 224 383 057
<http://actavet.vfu.cz/>

microbial risk, and difficulty in standardization (Aires et al. 2003; Yildiz et al. 2013). The existence of an extender with such features would provide a valuable contribution to the artificial insemination industry; however, there are ongoing concerns over reduced fertility when plant-based extenders are used in bull semen cryopreservation (Layek et al. 2016). While some studies approved comparable *in vitro* quality or fertility rates of insemination straws diluted in egg yolk-free extenders (Aires et al. 2003; Stradaoli et al. 2007; Miguel et al. 2008; Miguel-Jimenez et al. 2020), others stated superior outcomes in preserving the sperm's abilities and in the fertilizing potential of straws diluted in egg yolk-based extenders (Muiño et al. 2007; Crespilho et al. 2012; Crespilho et al. 2014).

The aim of this study was to evaluate the effects of using various types of commercially available bull semen extenders for cryopreservation – egg yolk-free AndroMed® (based on soy lecithin), Optidyl® (based on ionized egg yolk), and BULLXcell® (based on fresh egg yolk) – on insemination straws' quality appraised by sperm motility, viability, plasma membrane and acrosome lesions, and mitochondrial activity during a 2 h long post-thaw thermoresistance test (TT).

Materials and Methods

Semen collection

Semen collection took place at the Artificial Insemination Center (Hradištko, Central Bohemian Region, Czech Republic) over the course of one year. The semen was repeatedly collected from a pre-selected group of Holstein bulls used for breeding ($n = 4$) of the same age, type of housing, and management. All the bulls were standardly used for commercial purposes. After standard semen collection using an artificial vagina, trained staff in the laboratory evaluated the input quality of every semen sample collected. The main indicators were volume (VOL, g), density of the spermatozoa (DEN, $\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$), and motility percentage (MOT, %). For further processing, a minimal concentration and spermatozoa motility (DEN $0.7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ and MOT 70%) was required.

Semen processing

The amount of each semen sample obtained ($n = 44$) was split into 3 equal parts, and each part was diluted in a different commercially produced extender, differing in the type of cryoprotectant used. The first selected extender was AndroMed® (Minitube GmbH, Tiefenbach, Germany), a standardly used egg yolk-free extender containing an extract of soy lecithin and antibiotics (Gentamicin, Spectinomycin, Lincomycin, and Tylosin). The second was Optidyl® (Biovet, Fleurance, France), an extender containing ionized egg yolk, Tris, and antibiotics (Streptomycin, Penicillin, Lincomycin, and Spectinomycin). The third extender was BULLXcell® (IMV, L'Aigle, France), with a 20% addition of fresh egg yolk. The diluted semen was filled into straws (0.25 ml, IMV, L'Aigle, France), then slowly cooled to 4 °C and equilibrated for 2 h in a cooling box.

After the timed equilibration was complete, the doses were transferred into a freezer which was already cooled to 4 °C. A direct freezing method (Digitcool®; IMV Cryo Bio System, L'Aigle, France) was used for freezing. The diluted semen was frozen by using a 2-phase freezing curve (Doležalová et al. 2015) and then stored in a liquid nitrogen container.

Semen thawing and sample evaluation

The straws were thawed in a 38 ± 1 °C water bath for a period of 30 s and subsequently evaluated. Spermatozoa total motility (%) was assessed using the CASA (computer assisted sperm analysis) method (SCA® Production v. 5.3., MICROPTIC, Spain) with a phase contrast microscope (Eclipse E200, Nikon®, Tokyo, Japan) at a $\times 200$ – 300 magnification whereby a minimum of five fields of view per each straw were evaluated (Tuncer et al. 2011). Furthermore, the flow cytometry evaluation was performed as described by Savvulidi et al. (2021) with a small modification in the total viability evaluation, as the viable sperm were assessed as cells with an intact plasma membrane and an intact acrosome. The CASA and flow cytometry evaluations were performed immediately after thawing, and then 1 and 2 h after thawing. During the TT, the samples were kept in an INB 400 incubator (Mettmert GmbH, Schwabach, Germany) at 38 °C.

Statistical evaluation

The acquired data were analyzed using the statistical software SAS 9.3. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The generalised linear model (GLM procedure) was used for the evaluation of individual effects. The Tukey-Kramer method was used for the evaluation of differences of the least square means. The following model equation was used:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + e_{ijk}$$

Description:

- Y_{ijk} – dependent variable (spermatozoa motility, spermatozoa viability, plasma membrane damage, acrosome damage, high mitochondrial activity after thawing, i.e. 0, 60, and 120 min of TT [T0-T120]);
- μ – average value of the dependent variable;
- A_i – i class bull fixed effect (for spermatozoa motility: $i = 1, n = 45; i = 2, n = 45; i = 3, n = 45; i = 4, n = 45$; for flow cytometer evaluated parameters: $i = 1, n = 90; i = 2, n = 90; i = 3, n = 90; i = 4, n = 90$);
- B_j – j class extender fixed effect (for spermatozoa motility: $j = \text{AndroMed}^{\text{®}}, n = 60; j = \text{Optidyl}^{\text{®}}, n = 60; j = \text{BULLXcell}^{\text{®}}, n = 60$; for flow cytometer evaluated parameters: $j = \text{AndroMed}^{\text{®}}, n = 120; j = \text{Optidyl}^{\text{®}}, n = 120; j = \text{BULLXcell}^{\text{®}}, n = 120$);
- C_k – k class evaluation time fixed effect (for spermatozoa motility: $k = 0, n = 36; k = 60, n = 36; k = 120, n = 36$; for flow cytometer evaluated parameters: $k = 0, n = 120; k = 60, n = 120; k = 120, n = 120$);
- AB_{ij} – interaction between fixed effect of the bull and chosen extender;
- AC_{ik} – interaction between fixed effect of the bull and an evaluation time;
- e_{ijk} – residual error.

Significance levels of $P < 0.05$ and $P < 0.01$ were used to evaluate the differences among groups.

Results

The model equation was significant ($P < 0.001$). All effects described were significant ($P < 0.001$), and the evaluated interactions were confirmed to be significant at a $P < 0.05$ significance level. The detailed values from the CASA and flow cytometry evaluations are presented in Table 1. As evident from Table 1, bull IV preserved the highest total motility of spermatozoa throughout the TT. The differences from the other bulls were significant ($P < 0.01$). The highest values of viability during TT were also achieved by bull IV (52.62%), where differences from the other bulls (–5.17%; –6.58% and –6.69%) were found to be significant ($P < 0.01$). Table 1 further presents that bull IV and bull II recorded the highest mitochondrial activity during TT ($P < 0.01$). Bull IV achieved the lowest values of plasma membrane damage during TT ($P < 0.01$) and, together with bull III, the lowest values of acrosomal damage during TT as well ($P < 0.01$).

A gradual decrease of the total motility and mitochondrial activity was observed during the TT, as the average motility and mitochondrial activity decreased from 51.53% and 65.21% post thawing to 29.44% and 54.44% respectively, after 120 min of incubation ($P < 0.01$). As evident from Table 1, the least suitable extender was AndroMed[®], which preserved all evaluated sperm indicators at the lowest values, with the exception of mitochondrial and acrosome damage, which were the highest. The differences in egg yolk-based extenders were significant in all measured qualities ($P < 0.01$).

Further interpreted results are shown in Table 2, which describes the evaluated interactions. Significant impacts of the inter-sire (bull's individuality) effect on the motility, viability, mitochondrial activity, and membrane damage of thawed sperm in different diluents were observed in the current study ($P < 0.01$; $P < 0.05$). Additionally, it was statistically proven ($P < 0.01$) that the egg yolk-based extenders achieved higher spermatozoa motility than egg yolk-free diluent in all bulls except bull I. There were significant differences between individual bull evaluation of post-thawed total spermatozoa motility and evaluation of the motility at the end of TT in bulls II, III, and IV ($P < 0.01$). The biggest drop in motility during the TT was achieved by bull II (27.77%, $P < 0.01$). No significant differences were found between individual bull spermatozoa viability in the T0 and T120.

Discussion

Successful spermatozoa cryopreservation depends on several interrelated factors, including the initial quality of the semen, the composition of the extender, the cryoprotectant, the cooling protocol, the packaging, the thawing rate, and the interaction of these components, as well as individual animal variation (Cooter et al. 2005; Andrabi 2007; Clulow et al. 2008). The refinement of insemination dose production is therefore still a ceaseless process

Table 1. The effect of sire, evaluation time, and diluent on a post-thaw computer assisted sperm analysis and flow cytometry variables of bull spermatozoa.

Effect	Level	Total motility	Viability	Mitochondrial activity	Plasma membrane damage	Acrosome damage
Bull	Bull 1	43.67 ± 0.95 ^A	47.45 ± 0.49 ^A	59.76 ± 1.21 ^A	50.81 ± 0.48 ^{Aa}	31.63 ± 0.40 ^A
	Bull 2	40.44 ± 0.95 ^A	46.04 ± 0.49 ^A	65.82 ± 1.21 ^B	52.73 ± 0.48 ^{Ab}	33.70 ± 0.40 ^B
	Bull 3	31.89 ± 0.95 ^B	45.93 ± 0.49 ^A	49.88 ± 1.21 ^C	52.89 ± 0.48 ^{Ab}	29.50 ± 0.40 ^C
	Bull 4	49.11 ± 0.95 ^C	52.62 ± 0.49 ^B	66.93 ± 1.21 ^B	45.66 ± 0.48 ^B	29.70 ± 0.40 ^C
Evaluation time	0	51.53 ± 1.06 ^A	46.77 ± 0.42 ^A	65.21 ± 1.05 ^A	52.25 ± 0.42 ^A	25.52 ± 0.35 ^A
	60	42.08 ± 1.06 ^B	51.28 ± 0.42 ^B	62.15 ± 1.05 ^A	47.42 ± 0.42 ^B	29.96 ± 0.35 ^B
	120	29.44 ± 1.06 ^C	46.02 ± 0.42 ^A	54.44 ± 1.05 ^B	51.89 ± 0.42 ^A	37.92 ± 0.35 ^C
Diluent	Andromed [®]	36.00 ± 0.82 ^A	42.55 ± 0.42 ^A	54.56 ± 1.05 ^A	56.16 ± 0.42 ^A	36.13 ± 0.35 ^A
	Optidyl [®]	43.50 ± 0.82 ^B	49.42 ± 0.42 ^B	67.20 ± 1.05 ^B	49.16 ± 0.42 ^B	29.16 ± 0.35 ^B
	BULLXcell [®]	44.33 ± 0.82 ^B	52.06 ± 0.42 ^C	60.03 ± 1.05 ^C	46.25 ± 0.42 ^C	28.09 ± 0.35 ^B

Results are expressed as least square means ± standard error. Different uppercase superscripts (^{A, B, C}) in columns (within each effect) indicate significance at $P < 0.01$. Different lowercase superscripts (^{a, b, c}) in columns (within each effect) indicate significance at $P < 0.05$.

of utmost importance, as about only 50% of spermatozoa recover after thawing, even under the most refined and controlled freezing conditions and modifications (Layek et al. 2016). The differences in sperm motility and other spermatozoa features during the TT test confirm the effects of sire individuality on the final fertilization capability of spermatozoa and can also correlate with genetic factors explaining inter-species and breeds, as well as individual differences (Thurston et al. 2002).

Our findings of spermatozoa motility changes during TT are in accordance with Beran et al. (2013) and Doležalová et al. (2016) who recorded the highest motility at the beginning of the TT immediately after the thawing of the straws. Alcay et al. (2015) in their study comparing post-thawing spermatozoa motility in extenders with the addition of fresh or lyophilized egg yolk found no significant differences between these extender variants, which is consistent with our findings.

Our results are also comparable to Muñio et al. (2007), Celeghini et al. (2008), Crespilho et al. (2012), and Singh et al. (2018), who detected that egg yolk-based extenders provide higher values of post-thaw spermatozoa motility compared to soybean lecithin-based extenders. Opposing findings were found by Kumar et al. (2015), who reported higher sperm motility in insemination doses diluted in plant-based extender rather than egg yolk-based diluents. In the study conducted by Murphy et al. (2018), no significant differences between the total sperm motility of insemination doses diluted in Andromed[®] and BULLXcell[®] were reported. Contrastingly, Amirat et al. (2005) observed that egg yolk-based diluents negatively affected spermatozoa motility, probably due to substances that these extenders contain, whereas soy lecithin-based diluents preserved higher total sperm motility. With an increasing emphasis on biosecurity issues and on controlling disease with regards to international sperm shipment, egg yolk extenders have become suspect for facilitating the transmission of diseases. Therefore, the potential of a soybean-based extender replacing egg yolk extenders has been investigated by several researchers (Aires et al. 2003; Muñio et al. 2007; Miguel et al. 2008;

Table 2. The effects of interactions between bull, diluter, and evaluation time on a post-thaw computer assisted sperm analysis and flow cytometry variables of bull spermatozoa.

Effect	Level	Total motility	Viability	Mitochondrial activity	Plasma membrane damage	Acrosome damage
Bull * Diluter	Bull 1 * Andromed®	42.33 ± 1.64 ^{A,a}	39.72 ± 0.85 ^{A,a}	35.17 ± 2.09 ^A	59.20 ± 0.84 ^A	31.00 ± 0.69 ^A
	Bull 1 * Optidy1®	45.00 ± 1.64 ^{A,a}	48.32 ± 0.85 ^B	60.43 ± 2.09 ^B	50.50 ± 0.84 ^B	28.10 ± 0.69 ^A
	Bull 1 * Bullxcell®	43.67 ± 1.64 ^{A,a}	49.76 ± 0.85 ^B	54.06 ± 2.09 ^{B,a}	48.98 ± 0.84 ^{B,a}	29.39 ± 0.69 ^{A,a}
	Bull 2 * Andromed®	33.33 ± 1.64 ^{B,b}	40.76 ± 0.85 ^A	54.86 ± 2.09 ^{B,a}	57.80 ± 0.84 ^A	41.73 ± 0.69 ^{B,a}
	Bull 2 * Optidy1®	43.00 ± 1.64 ^{A,b}	48.74 ± 0.85 ^{B,a}	65.23 ± 2.09 ^{B,b}	49.59 ± 0.84 ^{B,a}	27.28 ± 0.69 ^A
	Bull 2 * Bullxcell®	45.00 ± 1.64 ^{A,b}	52.85 ± 0.85 ^{C,b}	59.19 ± 2.09 ^{B,b}	45.03 ± 0.84 ^{C,b}	25.89 ± 0.69 ^{A,b}
	Bull 3 * Andromed®	25.33 ± 1.64 ^{B,c,c}	49.35 ± 0.85 ^B	66.56 ± 2.09 ^C	49.21 ± 0.84 ^{B,a}	33.36 ± 0.69 ^B
	Bull 3 * Optidy1®	35.33 ± 1.64 ^{A,D,b}	52.92 ± 0.85 ^{C,b}	69.90 ± 2.09 ^{C,a}	45.33 ± 0.84 ^{C,b}	29.06 ± 0.69 ^A
	Bull 3 * Bullxcell®	35.00 ± 1.64 ^{A,D,b}	55.58 ± 0.85 ^C	64.33 ± 2.09 ^{B,b}	42.46 ± 0.84 ^C	26.68 ± 0.69 ^A
	Bull 4 * Andromed®	43.00 ± 1.64 ^{A,a}	40.35 ± 0.85 ^A	61.67 ± 2.09 ^B	58.43 ± 0.84 ^A	38.44 ± 0.69 ^{B,b}
	Bull 4 * Optidy1®	50.67 ± 1.64 ^{E,b}	47.70 ± 0.85 ^B	73.26 ± 2.09 ^{C,a}	51.20 ± 0.84 ^B	32.22 ± 0.69 ^A
	Bull 4 * Bullxcell®	53.67 ± 1.64 ^{E,b}	50.05 ± 0.85 ^B	62.54 ± 2.09 ^{B,b}	48.54 ± 0.84 ^B	30.43 ± 0.69 ^A
	Bull 1 * 0	48.89 ± 2.12 ^{A,a}	46.04 ± 0.85 ^A	57.41 ± 2.09 ^A	53.11 ± 0.84 ^{A,a}	24.24 ± 0.69 ^A
	Bull 1 * 60	43.33 ± 2.12 ^A	48.67 ± 0.85 ^{A,a}	50.80 ± 2.09 ^{A,a}	50.22 ± 0.84 ^{A,a}	28.28 ± 0.69 ^B
	Bull 1 * 120	38.89 ± 2.12 ^{A,a}	43.09 ± 0.85 ^B	41.45 ± 2.09 ^B	55.35 ± 0.84 ^B	35.97 ± 0.69 ^{C,a}
	Bull 2 * 0	54.44 ± 2.12 ^{B,a}	46.83 ± 0.85 ^{A,a}	61.83 ± 2.09 ^{A,b}	52.32 ± 0.84 ^A	23.30 ± 0.69 ^A
Bull 2 * 60	41.11 ± 2.12 ^A	51.19 ± 0.85 ^{A,b}	60.15 ± 2.09 ^{A,b}	47.26 ± 0.84 ^B	30.74 ± 0.69 ^B	
Bull 2 * 120	26.67 ± 2.12 ^{C,b}	44.32 ± 0.85 ^{B,b}	57.29 ± 2.09 ^A	52.84 ± 0.84 ^A	40.86 ± 0.69 ^D	
Bull 3 * 0	43.33 ± 2.12 ^{A,b}	49.61 ± 0.85 ^A	71.58 ± 2.09 ^{C,a}	49.12 ± 0.84 ^{B,b}	25.23 ± 0.69 ^A	
Bull 3 * 60	33.33 ± 2.12 ^C	56.05 ± 0.85 ^C	71.24 ± 2.09 ^{C,a}	42.54 ± 0.84 ^C	28.42 ± 0.69 ^B	
Bull 3 * 120	17.22 ± 2.12 ^D	52.19 ± 0.85 ^A	57.98 ± 2.09 ^A	45.34 ± 0.84 ^{C,b}	35.45 ± 0.69 ^C	
Bull 4 * 0	59.44 ± 2.12 ^B	44.41 ± 0.85 ^{B,b}	70.02 ± 2.09 ^{C,a}	54.45 ± 0.84 ^{A,b}	29.31 ± 0.69 ^B	
Bull 4 * 60	50.56 ± 2.12 ^{B,b}	49.22 ± 0.85 ^A	66.41 ± 2.09 ^C	49.67 ± 0.84 ^{B,a}	32.39 ± 0.69 ^{C,b}	
Bull 4 * 120	35.00 ± 2.12 ^C	44.48 ± 0.85 ^{B,b}	61.03 ± 2.09 ^{A,b}	54.06 ± 0.84 ^{A,b}	39.39 ± 0.69 ^{D,b}	

Results are expressed as least square means ± standard error. Different uppercase superscripts (^{A, B, C, D}) in columns (within each effect) indicate significance at $P < 0.01$. Different lowercase superscripts (^{a, b}) in columns (within each effect) indicate significance at $P < 0.05$.

Miguel-Jimenez et al. 2020). Aires et al. (2003) and Amirat et al. (2005) reported that soy lecithin-based extenders performed better in the spermatozoa quality indicators than egg yolk-based extenders in freezing semen from Holstein bulls. On the contrary, a higher percentage of viable spermatozoa cryopreserved in egg yolk-based extender compared to soy bean lecithin-based diluents were observed in the studies by Crespilho et al. (2012) and Singh et al. (2018). Akhter et al. (2010) compared extenders based on soy bean extract with egg yolk-based diluents by evaluating viability, acrosomal status, spermatozoa motility, and a 60–90 day non-return rate in Holstein bulls. No significant difference was found between the extenders in these indicators. The same results, related to non-return rate when extenders based on egg yolk or soy lecithin were used, were found by Murphy et al. (2018).

These propositions are in contradiction not only to our results, but also to Celeghini et al. (2008) and Crespilho et al. (2012), where samples of semen diluted with soy lecithin-based extenders reached the lowest spermatozoa motility, viability, plasma membrane intactness, and acrosomal and mitochondrial status post-thawing, which are preconditions for greater *in vivo* fertility (Thun et al. 2002; Veerabramhaiah et al. 2015). The protective phase of soy lecithin is apparently limited during cryoconservation, resulting in a reduction of spermatozoa viability post-thawing and during artificial insemination (Crespilho et al. 2012).

Reduction and differences observed in individual bull spermatozoa quality indicators depend partially on the extenders used for cryopreservation, indicating that compounds present in the extender affect post-thaw semen quality differently (Kumar et al. 2003; Beran et al. 2012). As evident from the current study, some sires' sperm quality did not differ, whether the sperm was diluted in an egg yolk-based or in a soy bean lecithin-based extender, while other bulls maintained improved spermatozoa features when diluted in egg yolk-based extenders. These findings are consistent with the conclusions of Beran et al. (2012), who confirmed the effect of bull individuality on post-thaw characteristics and spermatozoa quality.

In conclusion, extenders based on egg yolk exhibited a higher spermatozoa motility after insemination dose thawing and simultaneously achieved a higher proportion of viable spermatozoa, mitochondrial activity, and membrane intactness in comparison to egg yolk-free extender. From the obtained results we can clearly recommend using egg yolk-based extenders for bull cryopreservation. In all the evaluated indicators of semen diluted with various types of extenders, individual differences among bulls were observed. To maintain the highest level of fertilizing ability of manufactured insemination straws, it would be highly appropriate to choose the proper semen extender with respect to the individuality of the bulls.

Acknowledgements

This research was funded by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic ("S" grant), the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (NAZV Project No. QK22010270) and the Czech University of Life Sciences Prague (SGS Project No. SV21-6-21320).

References

- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E 2003: *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* **60**: 269-279
- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Iqbal S, Ullah N 2010: Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology* **74**: 951-955
- Alcay S, Berk Toker M, Gokce E, Ustuner B, Tekni Onder N, Sagirkaya H, Nur Z, Kemal Soyulu M 2015: Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology* **71**: 329-333
- Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL 2005: Modification of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* **129**: 535-543

- Andrabi SMH 2007: Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *Int J Agric Biol* **9**: 367-369
- Beran J, Stádník L, Bezdiček J, Louda F, Čítek J, Ducháček J 2012: Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Arch Anim Breed* **55**: 207-218
- Beran J, Šimoník O, Stádník L, Rajmon R, Ducháček J, Krejčířková A, Doležalová M, Šichtař J 2013: Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Univ Agric Silvíc Mendel Brun* **61**: 1575-1581
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM 2008: Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci* **104**: 119-131
- Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC 2008: A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **108**: 298-308
- Cooter PZ, Goolsby HA, Prien SD 2005: Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reprod Domest Anim* **40**: 98-99
- Crespilho A, Sá Filho, Dell'Aqua M, Nichi M, Monteiro G, Avanzi B, Martins A, Papa FO 2012: Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* **149**: 1-6
- Crespilho AM, Nichi M, Guasti PN, Freitas-Dell'Aqua CP, Sa Filho MF, Maziero RR, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO 2014: Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Anim Reprod Sci* **146**: 126-133
- Doležalová M, Stádník L, Biniová Z, Ducháček J, Beran J 2015: The effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Vet Brno* **84**: 383-391
- Doležalová M, Stádník L, Biniová Z, Ducháček J, Stupka R 2016: Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech J Anim Sci* **61**: 515-525
- Kumar S, Millar JD, Watson PF 2003: The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* **46**: 246-253
- Kumar P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, Yadav PS 2015: Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci* **159**: 38-45
- Layek S, Mohanty T, Kumaresan A, Parks J 2016: Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim Reprod Sci* **172**: 1-9
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R 2000: Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl* **24**: 700-707
- Miguel CT, Pérez-Garnelo S, Breña PB, Palasz A, De la Fuente J, Rodriguez A, Hidalgo C 2008: Freezing of semen from endangered asturiana de la montana bulls in zwitterionic lipid-based extenders. *Reprod Fer Dev* **20**: 161
- Miguel-Jimenez S, Montserrat Rivera del Alamo M, Álvarez-Rodríguez M, Hidalgo CO, Peña AI, Muñío R, Rodríguez-Gil JE, Mogas T 2020: *In vitro* assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Anim Reprod Sci* **215**: 106315
- Mocé E, Purdy PH, Graham JK 2010: Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci* **118**: 236-247
- Muñío R, Fernández M, Peña AI 2007: Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Domest Anim* **42**: 305-311
- Murphy EM, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S 2018: Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on *in vitro* sperm kinematic and *in vivo* fertility of frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci* **191**: 70-75
- Parisi AM, Thomson SK, Kaya A, Memili E 2014: Molecular, cellular, and physiological determinants of bull fertility. *Turkish J Vet Anim Sci* **38**: 637-642
- Pena FJ, Macias Garcia B, Samper JC, Aparicio IM, Tapia JA, Ortega Ferrusola C 2011: Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* **76**: 1177-1186
- Rehman FU, Thao C, Shah MA, Qureshi MS, Wang X 2013: Semen extenders and artificial insemination in ruminants. *Veterinaria* **1**:1-8
- Savvulidi FG, Ptáček M, Málková A, Stádník L 2021: Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapor for Wallachian sheep conservation program. *Czech J Anim Sci* **66**: 55-64
- Singh AK, Kumar A, Honparkhe M, Kaur S, Kaur H, Ghuman SPS, Brar PS 2018: Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin-, and liposome-based extenders. *Reprod Domest Anim* **53**: 195-202
- Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M 2007: Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* **67**: 1249-1255
- Thun R, Hurtado M, Jannet F 2002: Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* **57**: 1087-1094

- Thurston LM, Watson PF, Holt WV 2002: Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo-Lett* **23**: 255-262
- Tuncer PB, Sariozkan S, Bucak MN, Ulutas PA, Akalin PP, Buyukleblebici S, Canturk F 2011: Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* **75**: 1459-1465
- Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E 2019: Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front Vet Sci* **27**: 268
- Veerabramhaiah K, Rao A, Rao VH, Naidu K, Rao ST 2015: Efficacy of the Tris and Biociphos Plus Extender on the freezability of Punganue bull semen. *Indian J Anim Reprod* **32**: 1-4.
- Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Bencharif D, Anton M, Desherces S, Schitt E, Thorin C, Tainturier D 2011: Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 °C. *Asian J Androl* **13**: 281-286
- Wang Y, Sharma RK, Agarwal A 1997: Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology* **50**: 409-413
- Watson PF 2000: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **60-61**: 481-492
- Yildiz C, Bozkurt Y, Yavas I 2013: An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology* **67**: 91-94

NÁŠ chov

6
2014

V Žernově mají kozy tradici



tema: Welfare a zoohygiena



Slavnost vyhánění stád na Hortobágyi



Ztráty selat a ekonomika chovu



- jakosti mléka, monitoringu škodlivých látek aj.) na spolkové úrovni;
- vyšší transparentnost všech opatření a realizace spíše dlouhodobých kampaní;
- vydávání informačních materiálů, příprava konceptů školení a dalšího vzdělávání;
- podpora odborných a společenských akcí organizovaných pro širokou veřejnost;
- zajišťování agrární reklamy prostřednictvím profesionálních marketingových firem;
- využívání filmu, videa a relací v televizi;
- vytvoření fondu pro reklamu a komunikaci z odvodu 0,01 centu (0,0025 Kč) za kg mléka.

Strategie komunikace mezi účastníky výroby mléka je, stejně jako komuni-

kace s veřejností a sdělovacími prostředky, dlouhodobým úkolem zahrnujícím vytvoření vzájemné důvěry.

Závěr konference

Stručný závěr konference přednesl předseda Německého mlékárenského svazu dr. Engel. Poukázal na faktory prezentované v referátech ovlivňující úspěšnost výroby mléka a na jejich význam v nastávajícím období. Ve vztahu k vývoji situace na trhu upozornil na úkoly mlékáren spočívající mimo jiné v podpoře exportu a na skutečnost, že výrobci mléka stejně jako zpracovatelé jsou „uživateli“ otevřených trhů, přičemž vyjednané obchodní dohody poskytují více šancí než rizik. Pro úspěšnou výrobu mléka i v dalších letech se přimlouval k vytvoření „klimatu podpory“ od politiků.

Vysoká účast, dobře sestavený hlavní a doprovodný program, prezentované výsledky, aktivní posluchači a optimistický průběh Mléčného fóra potvrdily dobrou připravenost všech účastníků trhu s mlékem v Německu na postupně zaváděnou reformovanou zemědělskou politiku unie. Z politické podpory agrárního sektoru a z přijatých opatření byla patrna snaha a připravenost využít předností liberalizace trhu k posílení pozice Německa ve výrobě, zpracování a exportu mléka a mléčných výrobků. Zřejmě i proto se problematika související se zrušením kvót v roce 2015 (vývoj cen mléka a mléčných výrobků, početní stav dojnic, objem výroby mléka aj.) nestala hlavním předmětem jednání a diskusí Mléčného fóra. Účastníkům Mléčného fóra z ČR se mohlo jevit, že mezi hlavní příčiny úspěšnosti ně-

meckého sektoru mléka patří jeho aktuální politická podpora, resp. že politická podpora agrárního sektoru (včetně výroby a zpracování mléka) je v ČR nedostatečná. Ve srovnání s poměry v Německu existují v ČR značné rezervy i v prosazování oprávněných zájmů a požadavků zemědělců v Bruselu a ve stanovení cílů, úkolů a priorit zemědělské politiky na národní úrovni.

Příspěvek byl zpracován v rámci řešení projektu NAZV č.ís. QJ1210301.

Ing. Jindřich Kvapilík, Dr.Sc.
Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. l.,
Praha-Uhřetěves,
Ing. Jiří Kopáček, CSc.
Českomoravský svaz mlékárenský

Chlazení a ekvibrace při výrobě inseminačních dávek

Plodnost dojnic se v posledních desetiletích průběžně snižuje a tato skutečnost negativně ovlivňuje ekonomiku jejich chovu a produkce mléka i hovězího masa. Dlouhodobě jsou proto realizována sledování zaměřená na faktory ovlivňující reprodukční schopnosti krav s cílem eliminace jejich negativního vlivu. Jedním z dílčích faktorů významně se podílejících na výsledku plodnosti dojnic je plodnost býka.

Genetický potenciál plodnosti býka je ovlivňován způsobem zpracování čerstvého ejakulátu a výroby inseminační dávky. V posledních letech byla průběžně zkoumána ředidla a jejich aditiva, různé délky a způsoby chlazení, mrazení a rozmrazování býčích ejakulátů (Holt, 2000). Nezbytnou součástí technologického procesu výroby inseminačních dávek je způsob chlazení a ekvibrace.

Chlazení

Chlazení je fáze adaptace spermií na zpomalení metabolismu, musí být provedeno za optimálních podmínek, protože savčí spermie jsou citlivé na rychlost zchlazování. Semenná plazma samotná představuje pouze minimální ochranu pro spermie během poklesu teplot. Pro uskladnění inseminačních dávek v nízkých teplotách je tudíž ne-

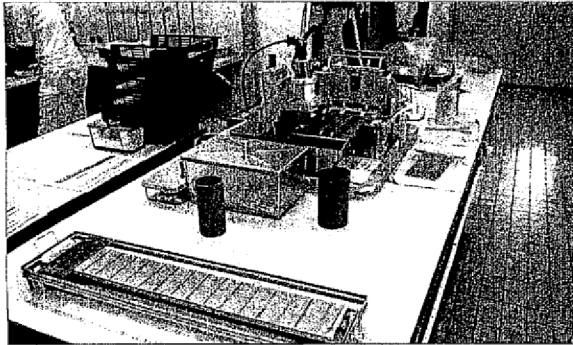
zbytné přidávat k ejakulátu před chlazením odpovídající ředidla (Salomon a Maxwell, 1995). Glycerol a vejce žlutek byly v minulosti nejvíce využívanými kryoprotektanty, ale v poslední době se upouští od používání vejce žlutku, protože zde hrozí určité riziko mikrobiální kontaminace, proto je preferováno použití žloutkových náhražek, které jsou přesně definované, bez patogenů a nejsou živočišného původu (Aires et al., 2003). Naředěný ejakulát je chlazen pomalu, aby se předešlo chladovému šoku. Věřt se, že chladový šok poškozuje funkci proteinů membrány, které jsou nezbytné pro strukturální integritu iontového metabolismu. Tyto změny se dějí za působení teplot od 15 do 5 °C, pod 0 °C ustávají (Watson, 2000). Během pomalého chlazení dochází k dehydrataci spermie, kdy může být dosaženo bodu osmotické rovnová-

hy mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím, to znamená, že buněčná dehydratace je maximální. Když se zchladí příliš rychle, rychlost dehydratace není dostačující pro předcházení výskytu intracelulárního ledu (Woelders, 1997). Rychlé chlazení také redukuje rozklad fruktózy, obsah kyslíku a syntézu ATP, což znamená, že spermie ztrácí zásobení energií a následně i motilitu (Blackshaw a Salisbury, 1957). Po naředění jsou dávky postupně zchlazovány z 34 °C na 4 °C, před vlastním mrazením jsou po určitou dobu uchovány v chladičím boxu za působení konstantní teploty (Moussa et al., 2002). Laboratorní mrazicí protokoly zahrnují metodu rychlého chlazení inseminačních dávek na teplotu 4–5 °C (Dhami et al., 1992). Podle Moussa et al. (2002) je 1,5 hodiny optimální doba zchlazování inseminační dávky na teplotu 4 °C, s tím, že následně je

dávka ekvibrována. Dhami et al. (1996) zase shledali, že nejvhodnější je pomalé chlazení pejet z 30 °C na 5 °C za 2 hodiny anebo rychlé chlazení na 10 °C.

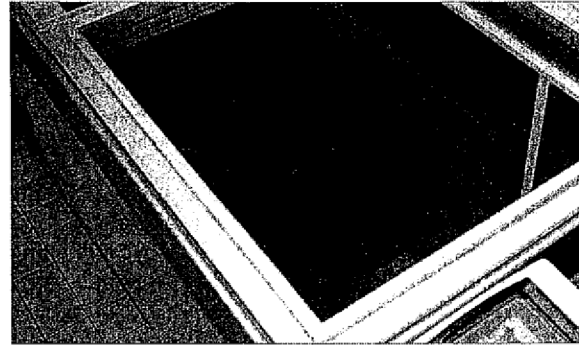
Ekvibrace

Ekvibrace byla označována jako celkový čas, během kterého spermie zůstává v kontaktu s kryoprotektantem před zmrazením. V tomto stadiu kryoprotektant jako například glycerol penetruje do spermatických buněk a nastavuje určitou bilanci mezi intracelulárním a extracelulárním koncentrací (Salomon a Maxwell, 2000). Glycerol ovšem proniká do buněk velmi rychle, tudíž dostatečně dlouhé ekvibrační období je nutné spíše pro adaptaci membrán spermií na nízké teploty během mrazení než pro prostup glycerolu do buněk (Vishwanath a Shannon, 2000; Muiño et al., 2007). Nemělo by



Při výrobě inseminačních dávek se pejetý ukládají na stojany...

Foto Luděk Stádník



...a potom procházení ekvilibrací po určitou dobu při teplotě 4 °C

Foto Luděk Stádník

být přehlíženo, že ekvilibrace včetně balancí koncentrace osmoticky aktivních komponent ředidel (Salomon a Maxwell, 2000). Ekvilibrace je proces, který následuje po zchlazení inseminačních dávek, jeho doba je variabilní, trvá od 30 minut do 24 hodin před samotným mrazením. Objevovaly se snahy zkracovat nebo úplně eliminovat tento krok ve výrobě inseminačních dávek, zrychlil by se tak proces kryokonzervace nehledě na kvalitu rozmrazeného ejakulátu (Dhami et al., 1992). Také někteří autoři jako například (Dhami a Sahní, 1993) zpochybňovali nutnost provedení ekvilibrace a její skutečný vliv na následnou životaschopnost spermií.

Ve studii Bencharif et al. (2008) byla doba ekvilibrace zkrácena na 30 minut při působení teploty 4 °C. Talevi et al. (1994) jako nejvhodnější shledali dobu trvání ekvilibrace jednu hodinu. Awad (2011) nebo Dhami et al. (1996) ve své práci využívali dobu ekvilibrace dvě hodiny při 5 °C. Minimální délka ekvilibrace vhodná pro následnou kryokonzervaci spermatu s uspokojivými výsledky životaschopnosti spermií po rozmrazení je stále sporná (Dhami a Sahní, 1993).

Ve výsledcích několika dalších studií byly zhodnoceny interakce mezi různými délkami ekvilibrace a použitými ředidly na výslednou životaschopnost spermií. Například Bois et al. (2012) porovnával vliv dvou délek ekvilibrace (30 a 60 minut) na následnou motilitu a membránovou integritu spermií. Krátký čas ekvilibrace (30 minut) měl negativní vliv na membránovou integritu spermií, avšak rozdíly mezi výsledky motility nebyly statisticky významné. Interakcí mezi použitými ředidly a délkou ekvilibrace se ve své práci zabíral

také Leite et al. (2010), který srovnával působení určité doby ekvilibrace na inseminační dávky ředěné odlišnými ředidly a sledoval jejich vzájemné interakce a vliv na motilitu spermií, integritu plazmatické a akrozomální membrány, za použití objektivních a přesných metod kontroly založených na počítačové diagnostice. Zkoumal tři délky ekvilibrace (0, 2 a 4 hodiny) a jejich vliv na inseminační dávky ředěné ředidly TRIS a Bloxcell®. Zjistil významné interakce mezi délkou ekvilibrace a použitým ředidlem na výslednou motilitu a membránovou integritu, s tím, že nejlepší výsledné hodnoty byly zjištěny u délky ekvilibrace čtyři hodiny u obou ředidel. Tudiž na základě objektivní analýzy je doba ekvilibrace zásadní krok pro udržení motility a integrity membrány spermií nezávisle na použitém ředidle (Leite et al., 2010).

Na některých inseminačních stanicích se využívá délky ekvilibrace 3–4 hodiny a ejakulát je mrazen ve stejný den, kdy byl odebrán, ale například starší studie (Pickett a Berndson, 1978) doporučuje ekvilibrovat ejakulát přes noc asi 18 hodin a mrazit až druhý den ráno, jejich zjištění dokumentují lepší výsledky plodnosti. Takové prodloužení délky ekvilibrace je vhodné pro časový harmonogram inseminační stanice, kde je každý den odebírán ejakulát od mnoha býků. Je tudiž praktičtější mrazit veškerý ejakulát až následující den ráno. První výzkumné výsledky naznačují, že prodloužení doby ekvilibrace zvyšuje oplozovací schopnost spermií (Arav et al., 2000). Většina studií na prodloužení doby ekvilibrace byla provedena na inseminačních dávkách ředěných pomocí žloutkového nebo mléčného

ředidla, avšak nejsou dosud žádné záznamy o prodloužení doby ekvilibrace a použití bezžloutkových ředidel (Muiño et al., 2007). Současně je otázkou pracovní a časová náročnost delší ekvilibrace ve vztahu k celkovým nákladům vynaloženým na výrobu jedné inseminační dávky.

Z výsledků několika dalších studií je zřejmé, že optimální doba ekvilibrace pro býčí sperma před zmrazením je uchovávání v 5 °C po dobu několika hodin (4–18 hod.). Lze tak získat maximální životaschopnost spermií po rozmrazení inseminační dávky (Muiño et al., 2007). Také výsledky práce Arav et al. (2000) naznačují, že prodloužení doby ekvilibrace zvyšuje oplozovací schopnost spermií. Přes tato zjištění stále existují pochybnosti ohledně vlivu doby ekvilibrace na následnou pohyblivost spermií, integritu spermatických membrán a jejich mitochondriálních funkcí po rozmrazení (Leite et al., 2010). A současně je stále málo známo o interakci délky ekvilibrace a použitých ředidel (Muiño et al., 2007), kdy rozhoduje doba a teplota ekvilibrace právě v závislosti na použitém ředidle. Současně je spolurozhodující také teplotní gradient chlazení, resp. následného mrazení inseminačních dávek. Ekvilibrace se jeví jako nezbytný proces pro úspěšné mrazení býčího spermatu, má vliv na jeho oplozovací schopnost a přežitelnost. Maximalizace přežití buněk, které jsou podrobny zmrazení a rozmrazení, vyžaduje pečlivou kontrolu postupu chlazení a zmrazování (Arav et al., 2002). Optimalizace technologických postupů chlazení a ekvilibrace může přispět k efektivnější výrobě inseminačních dávek s vyšší oplozovací schopností.

A proto je právě tato otázka druhým okruhem výzkumného projektu řešeného ČZU v Praze s cílem inovovat technologické postupy výroby inseminačních dávek. Předložený příspěvek představuje stručný přehled dané problematiky, ze kterého vychází metodika provozního sledování a laboratorních prací. Řešitelský tým bude průběžně odbornou veřejnost seznamovat se zajímavými zjištěními a výsledky, včetně jejich potenciálního praktického uplatnění.

Použitá literatura

- Awad, M. M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123, s. 157–162.
- Bois, S., Len, J. A., Parlevliet, J. M., Ellis, B. E. 2012. Effects of cooling time on membrane integrity and motility of frozen-thawed canine spermatozoa using two different commercial egg yolk-based extenders at two different cool-down equilibration times. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, s. 278–280.
- Leite, T. G., De Valefilhoa, V. R., De Arrudab, R. P., De Andradeb, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalonb, F. G., Martins, J. A. M., Andrade, V. J. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120, s. 31–38.

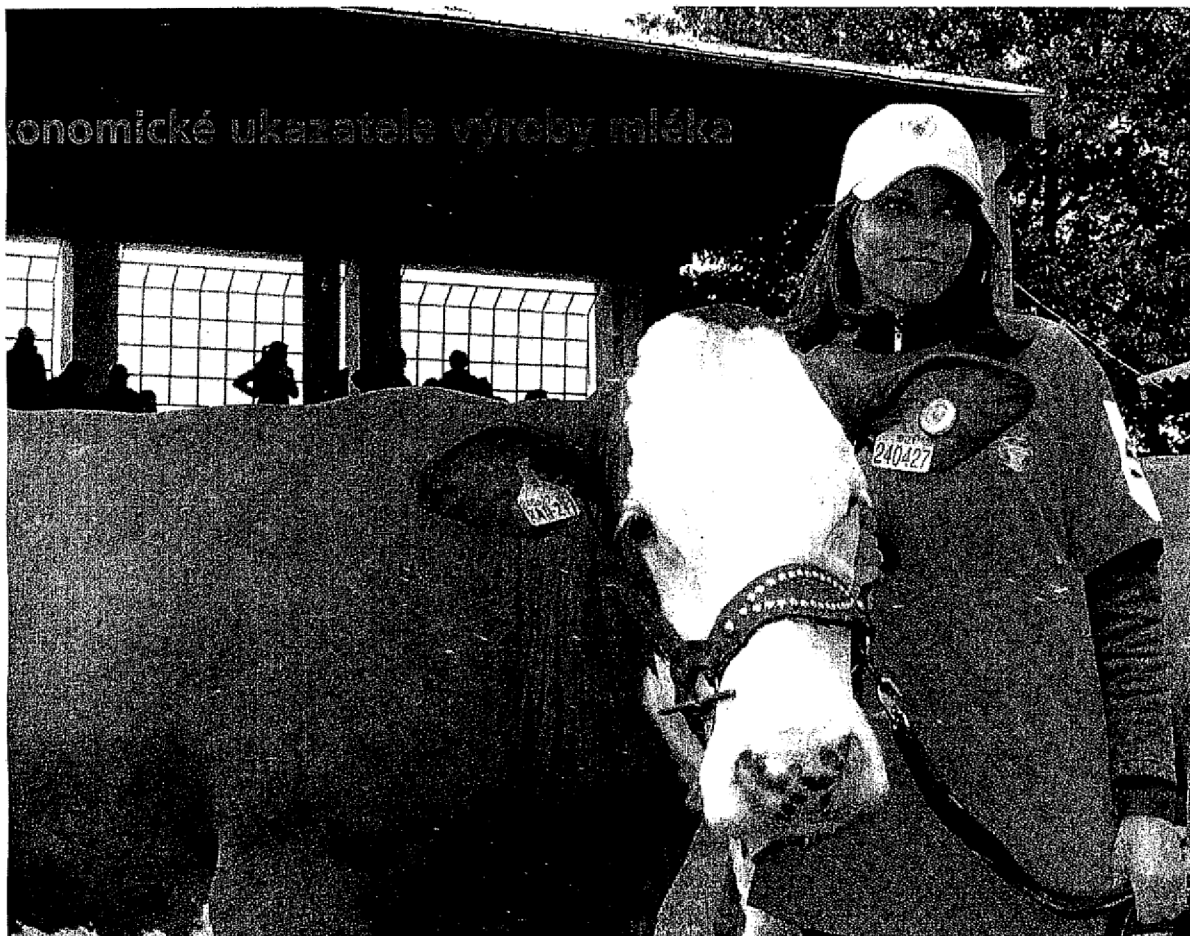
Další literatura je k dispozici u autorů.

Příspěvek byl zpracován za podpory „5ⁿ grantu MŠMT ČR a grantu NAZV QJ1210109.

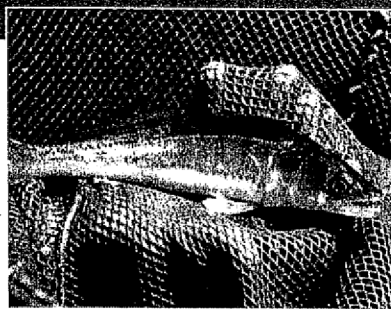
**Ing. Martina Doležalová,
doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.,
Ing. Jan Vodička,
katedra speciální zootechniky
ČZU v Praze, FAPPZ**

NÁŠ chov

7
2014



tema: Chov drůbeže



Vyrostou u nás továrny na ryby?



Na jihu Moravy se pštrosům daří



Přídavek kryoprotektantů do ředidel ejakulátu býků

Průměrná úroveň plodnosti dojnic je nedostatečná a tato situace je ekonomicky dlouhodobě neudržitelná. Skutečnost, že výsledky inseminace ve stádech dojeného skotu nejsou dlouhodobě uspokojivé, vyvolala poslední dobou zvýšený zájem o hodnocení plodnosti býka. Vzhledem k intenzitě použití vybraných plemeniků v inseminaci, a tím jejich výraznému vlivu na následující generaci představuje snížená plodnost býka riziko významných ekonomických ztrát pro celý mléčný průmysl.

Plodnost býka je ovlivněna celou řadou faktorů, které mohou ovlivnit kvalitu čerstvého ejakulátu i vyrobené inseminační dávky (Karoui et al., 2011). Četné studie prokázaly účinek vybraných faktorů, jako je věk býka, odběrový řád, sezóna, tým pro odběr spermatu nebo interval mezi odběry na znaky spermatu (Mandal et al., 2010). V rámci výroby dávek je třeba maximalizovat genetický potenciál daného plemenného býka využitím optimálních technologických postupů. Udržení oplodovací schopnosti ejakulátu v průběhu dlouhého a náročného procesu jeho zpracování, ředění a mrazení, při výrobě inseminační dávky či po jejím rozmrazení může zajistit vyšší úroveň zabezpečení dojnic, snížit spotřebu inseminačních dávek, zkrátit délku mezidobí a zlepšit tak ekonomickou efektivitu jejich chovu. Úspěšné zabezpečení a zamezení ekonomických ztrát v inseminaci závisí na schopnosti rozmrazeného spermatu oplodnit oocyt (Vera-Mu-

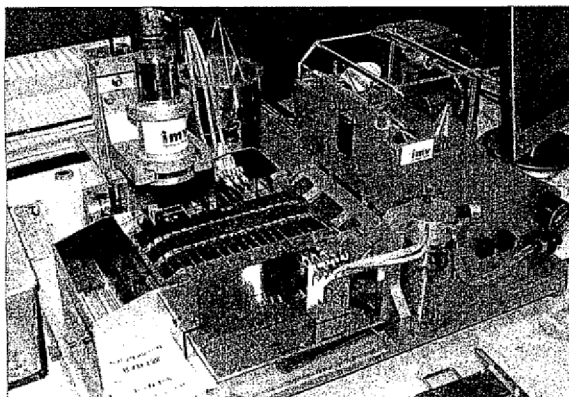
noz et al., 2009). Cílem mrazení spermií je jejich produkce do zásoby pro potřeby inseminace a je také důležitým nástrojem pro distribuci genetického potenciálu býků (Amirat et al., 2004). Kryokonzervace rozšiřuje dostupnost spermií pro oplození, nicméně potenciál oplození oocytu rozmrazenými spermii je snížen v důsledku změn ve struktuře a fyziologii spermií, které snižují jejich životaschopnost i oplodovací schopnost (Vera-Munoz et al., 2011).

Biologie spermie a teplota

Spermie býka se skládá z hlavičky a bičičku, přičemž na apikální konec hlavičky nasedá akrozom, který obsahuje enzymy (hyaluronidázu a akrozoliny), napomáhající průniku spermie přes ochranné obaly vajíčka. Celý povrch spermie pokrývá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která se skládá převážně z lipidů a proteinů. Převažujícími lipidy jsou fosfolipidy a cholesterol (Hammerstedt et al.,

1990). Vysoký obsah fosfolipidů je především v cytoplazmatické membráně spermií býka (Hofirek et al., 2009). Když je cytoplazmatická membrána spermie zchlazena, podléhá fosfolipidy v ní obsažené přeměně z tekutého stavu do stavu krystalického gelu. Každý druh lipidů podléhá této změně za působení rozdílné teploty, tudíž membrána, která je jako celek složena z mnoha různých lipidů, podléhá této změně v relativně širokém teplotním rozmezí. Ve fázi krystalického gelu se řetězce fosfolipidů narovnávají a prodlužují, což vede k jejich obalení membránou a k následnému omezení pohybu lipidů a proteinů ve vnitřním uspořádání. Samostatné proteiny jsou vyloučeny z krystalického gelu, k mnoha reakcím lipidů a proteinů proto nemůže docházet. Nahromaděním proteinů a změnou struktury lipidů se cytoplazmatická membrána stává nestabilní a její funkce jsou poškozeny (Amann a Pickett, 1987). Proces samotné kryokonzervace zhoršuje funkci spermií, což může vést ke snížení jejich oplodovací schopnosti (Celeghini et al., 2008). V důsledku změny teploty, především jejího poklesu, hrozí u spermií poškození plazmatické membrány, akrozomu, jádra a narušení jejich mitochondriálních funkcí (Celeghini et al., 2008, Amirat et al., 2004). Nutností procesu mrazení je předcházet letálními intracelulárním ledovým formacím použitím vhodných ředidel a co nejvíce tak omezit riziko poškození membrány během mrazení (Amirat et al., 2004).

nační dávky. Jako ředidla jsou dostupné specifické biochemické látky, které ovlivňují schopnost spermií a předcházejí jejich poškození v průběhu mrazicího procesu (Tatham, 2000), protože slouží jako ochrana pro spermie během mrazení (snaha zabránit chladovému šoku) a zlepšení motility po následném rozmrazení. Spermie jsou citlivé na teplotu, motilita se snižuje postupně, jak jsou spermie chlazeny. Chladový šok způsobuje nevratnou ztrátu motility. Tomuto šoku můžeme předcházet kontrolovaným procesem chlazení a přídavkem ochranné látky pro spermie (Vera-Munoz et al., 2011). Možností ředění spermatu a použití různých ředidel a přídavků je mnoho (Holt, 2000). Ředění ejakulátu vhodným puřem je důležitý faktor související s přežitelností spermií během kryokonzervace (Rasul et al., 2000). Mnoho studií se zabývalo nahrazením puřu za chemické látky jako například Matharoo a Singh (1980), Chinnaiya a Ganguli (1980), kteří využívali ředidla na bázi citrátu, Tris a kyseliny citrónové. Po dlouhou dobu se jako efektivní kryoprotektant pro konzervaci spermií využíval glycerol (Polge et al., 1949), avšak měl za následek relativně nízkou přežitelnost spermií po rozmrazení (Mocé et al., 2010). Více specifické je fyziologické působení glycerolu na spermie během procesu mrazení, zastává funkci při výměně intracelulárním tekutiny nezbytné pro udržení buněčného objemu společně s ionty a makromolekulami, snižuje bod mraznutí vody a z toho vyplývající pokles koncentrace elektrolytů ve volné frakci, tudíž se objevuje méně ledových krystalů za každé teploty (Medeiros et al., 2002). K dispozici jsou různá bezžloutková ředidla jako



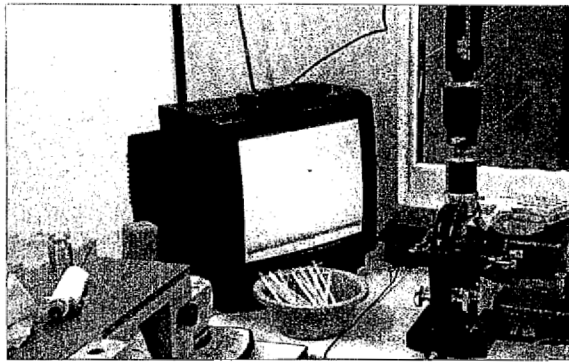
Cílem výroby inseminačních dávek a jejich mrazení je produkce pro potřeby inseminace, a tedy pro distribuci genetického potenciálu býka.
Foto Luděk Stádník

Ředění ejakulátu

Postup a způsob ředění spermatu jsou důležitými součástmi přípravy insemi-



například citrátová ředidla, popřípadě s přísadkou cukru (laktóza, sacharóza, rafinóza). Přídavek cukru do ředidla se ukázal jako vhodný, protože cukr není schopný se rozpílit přes plazmatickou membránu, proto například laktóza, sacharóza, rafinóza anebo dextrany přidávané do ředidel působí jako kryoprotektanty. V takových sloučeninách vytváří cukr osmotický tlak, proto se zde intracelulární ledové krystaly vyskytují méně. Cukr také reaguje s fosfolipidy v plazmatické membráně, reorganizuje membránu a způsobuje, že jsou spermie schopné přežít během procesu kryokonzervace (Aisen et al., 2002). Dále jsou k dispozici mléčná ředidla v kombinaci s fruktózou nebo citrátem, ředidla na bázi laktózy, sacharózy, Tris (hydroxymethyl) aminomethanu a další (Salomon a Maxwell, 1995). Vaječný žloutek je společný komponent ředidel ejakulátů u mnoha druhů hospodářských zvířat (Pace and Graham, 1974). Literatura uvádí, že pro kryokonzervaci býčích ejakulátů se doporučuje koncentrace vaječného žloutku 20% (Sansone et al., 2000), ve větších koncentracích se potom stává pro spermie toxickým (Shannon, 1972). Singh et al. (1999) dokázali, že koncentrace vaječného žloutku v ředidle 10% je lepší pro spermie v procesu mrazení. Vaječný žloutek a glycerol byly používány jako kryoprotektiva více než 50 let (Pace and Graham, 1974). Nepasterizovaný čerstvý vaječný žloutek může přinášet riziko mikrobiální kontaminace, snížená rizika přináší pasterizovaný, průmyslově vyrobený nebo mikrobiálně monitorovaný vaječný žloutek (van Wagtenonck-de Leeuw et al., 2000). Cholesterol je hydrofobní molekula ve vodě nerozpustná, má ale multifunkční vliv na buněčnou membránu spermie včetně její stabilizace, snížení propustnosti a další vlastnosti (Crockett, 1998). Poměr cholesterolu a fosfolipidů v cytoplazmatické membráně spermie je důležitým determinantem tekutosti a stability buněčné membrány za působení nízkých teplot (Watson, 1981). Ředění ejakulátu cholesterolem před mrazením může změnit odolnost spermatické membrány na chladový šok (Watson, 1981). Proto může být a je nahrazován molekulami cholesterolu podobnými (cholestanol) a dalšími (Amorim et al., 2009). Obec-



Makroskopické a mikroskopické znaky ejakulátu býčka se hodnotí ve specializované laboratoři na inseminační stanici. Foto Luděk Stádník

ně se věří, že LDL (Low Density Lipoproteins), který je součástí vaječného žloutku, je z velké části zodpovědný za ochranu spermii v průběhu mrazení (Pace a Graham, 1974), neboť je chrání proti chladovému šoku (Moussa et al., 2002).

Specifická aditiva

Předpokládá se, že LDL působí na spermatickou membránu její stabilizací. Druhá hypotéza tvrdí, že fosfolipidy obsažené v LDL chrání povrch spermie ochranným filmem anebo nahrazují spermatickou membránu fosfolipidy, které jsou ztraceny nebo poškozeny během kryokonzervace (Graham a Foote, 1987). A třetí možný způsob ochrany je, že LDL zachytává škodlivé proteiny přítomné v semenné plazmě, tedy zlepšuje schopnost mrazení spermii (Bergeron a Manjunath, 2006). Přesný způsob ochrany spermii a vliv na jejich motilitu pomocí LDL je zatím nejasný (Bathgate et al., 2006; Amirat et al., 2004). V poslední době bylo testováno ředidlo z vaječného žloutku, ovšem osvědčila se kombinace s přísadkou 6% LDL s 20 mmol glutaminu (Bencharif et al., 2012). Podle Moussa et al. (2002) se jako optimální koncentrace jeví 8% přísadka LDL do ředidla. Další možné ředění je 4, 5, 6, 7, 8 a 10% LDL (Moussa et al., 2002). Přídavek LDL do ředidla má větší vliv na kvalitu spermii po rozmrazení, na jejich oplodňovací schopnost a motilitu ve srovnání s komerčně používanými ředidly na bázi vaječného žloutku jako například Optidyl (Amirat et al., 2004), či Trilady (Amirat et al., 2005). Obecně ředidla obsahující LDL, který je extrahovaný z vaječného žloutku, mohou

být využita jako ředidla s lepšími účinky na spermie během mrazení než ředidla komerčně využívaná (Moussa et al., 2002). Přídavek LDL může být také využit při mrazení sexovaných dávek (Vera-Munoz et al., 2009). Úspěch mrazení spermii také závisí na stupni ředění (Salomon a Maxwell, 2000) a v současné době mnoho studií zkoumá využívání změn a různých koncentrací kryoprotektantů (Mocé et al., 2010). Protože v současné době není známý přesný vliv LDL na spermie a ani není doporučena jeho jednoznačná koncentrace v ředidle, je vše předmětem budoucího zkoumání. Dále je jako přísadka do běžně používaného bezžloutkového ředidla využíván například iodoxanol v různých koncentracích, který má kryoprotektivní vlastnosti a napomáhá spermii v zachování jejich motility, integrity membrán, vytváří pro ně lepší prostředí a brání vzniku ledových krystalů během mrazení a rozmrazení (Saragusty et al., 2009). Hu et al. (2009) sledovali vliv trehalózy na spermie kanců, Tonieto et al. (2010) se zabývali jejím působením na spermie beranů a Reddy et al. (2010) posuzovali interakci tohoto disacharidu a taurinu u spermii buvolů. Alternativou nejsou jen uvedené sacharidy, dále bylo také posuzováno například působení aminokyseliny glutaminu (Amirat-Briand et al., 2009; Tuncer et al., 2011) a v neposlední řadě také účinek přísadky L-cysteinu (Ansari et al., 2010). V současnosti však nejsou dostupná komerčně vyráběná ředidla ejakulátu býků obsahující tyto látky, která by ve výsledku mohla zlepšit kvalitu inseminačních dávek. Proto vývoj komerčního ředidla obsahující-

ho nové komponenty zlepšující jeho kryoprotektivní účinky s jeho následným praktickým uplatněním může přispět ke zvýšení kvalitativních ukazatelů inseminačních dávek býků, a tím i k vyššímu zabřezávání dojníc. Aplikace nových technologických postupů při výrobě inseminačních dávek může vést ke zlepšení jejich kvalitativních ukazatelů a oplodňovací schopnosti. V rámci výzkumné činnosti ČZU v Praze byl v roce 2012 s podporou MZe ČR zahájen projekt zaměřující se právě na inovaci technologických postupů výroby inseminačních dávek. Otázka optimalizace složení ředidel ejakulátu býků je první řešenou oblastí. První výsledky lze očekávat již v průběhu letošního roku a řešitelský tým s nimi bude odbornou veřejností průběžně seznamovat.

Použitá literatura

- Ansari, S. M., Rakha, B. A., Akhter, S. 2010. Effect of L-cysteine extender on post-thaw quality of Sahival bull semen. *Animal Science Papers and Reports*, 29, 197–203.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barriere, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2012. The advantages of using combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Veterinary Science*, 93, 440–447.
- Karoui, S., Diaz, C., Serrano, M., Cue, R., Celorio, L., Carabano, M. 2011. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Animal Reproduction Science*, 124, 28–38.
- Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Thorin, C., Tainturier, D. 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 degrees C. *Asian Journal of Andrology*, 13, 281–286.

Další literatura je k dispozici u autorů.

Příspěvek byl zpracován za podpory „5“ grantu MŠMT ČR – grantu NAZV QJ 1210109.

**Ing. Martina Doležalová,
doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.,
Ing. Jan Vodička
katedra speciální zootechniky
ČZU v Praze**

9 POUŽITÁ LITERATURA

Abdelhakeam, A. A., Graham, E. F., Vazquez, I. A., Chaloner, K. M., 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*, 28:43–49.

Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E. J., Liu, J., Critser, J. K., 2002. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extender and sugars. *Biology of Reproduction*, 67:1493–1501.

Aires, V. A., Hinsch, K-D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., Hinsch, E., 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60: 269–279.

Aisen, E. G., Medina, V. H., Venturino, A., 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57 (7): 1801–1808.

Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., Khalid, M., Ullah, N., 2011. Effect of low-density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*, 76 (4): 759–764.

Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., Qayyum, M., Ullah, N., 2014. Effect of fructose in extender on fertility of buffalo semen. *Pakistan Journal of Zoology*, 46 (1): 279–281.

Ali Al Ahmad, M. Z., Chatagnon, G., Amirat-Briand, L., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M., 2008. Use of glutamine and low-density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(4):429–436.

Amann, R. P., Pickett, B. W., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7 (3): 145–173.

Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J. L., Anton, M., 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61 (5): 895–907.

Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., Courtens, J. L., 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density

lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129 (4): 535–543.

Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., Tainturier, D., 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology*, 71: 1209–1214.

Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Pineau, S., Thorin, C., Destrumelle, S., Desherces, S., Anton, M., Jouan, M., Schmitt, E., Tainturier, D., 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science*, 122: 282–287.

Andrabi, S. M. H., 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9: 367–36.

Andrabi, S. M. H., Ansari, M. S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A., Akhter, S., 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 104: 427–433.

Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., Akhter, S., 2010. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reproductive Biology*, 10 (3): 235–240.

Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaurnal, V., David-Briand, E., Rabesona, H., 2003. Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83 (2): 175–183.

Arav, A., Zeron, Y., Ocheretny, A., 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 53: 248–249.

Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 77–81.

Ashworth, P. J. C., Harrison, R. A. P., Miller, N. G. A., Plummer, J. M., Watson, P. F., 1994. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*, 6: 173–180.

Awad, M. M., 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123(3–4): 157–162.

Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N., 2000. Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon, *J. Androl*, 21: 1–7.

Balic, I. M., Milinkovic-Tur, S., Samardzija, M., Vince, S., 2012. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology*, 78(2): 423–431.

Ball, P. J. H., Peters, A. R., 2004. *Reproduction in cattle*. 3rd, Great Britain: Blackwell Publishing, 242 s.

Barak, Y., Amit, A., Lessing, J. B., Paz, G., Hommonai, Z. T., Yogev, L., 1992. Improved fertilization rate in an in vitro fertilization program by egg yolk-treated sperm. *Fertility and Sterility*, 58: 197–198.

Barth, A. D., Brito, L. F. C., Kastelic, J. P., 2008. The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology*, 70 (3): 485–494.

Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., Evans, G., 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41: 68–73.

Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., Davies-Morel, M. C. G., 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, 21: 895–902.

Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M-L., Barriere, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D., 2012. The advantages of using combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Veterinary Science*, 93: 440–447.

Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Toušová, R., Louda, F., Štolc, L., 2011. Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, 59(6): 37–44.

Beran, J., Stádník, L., Bezdiček, J., Louda, F., Čítek, J., Ducháček, J., 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archiv für Tierzucht*. 55: 207–218.

Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., Doležalová, J., Kadlecová, V., Ptáček, M., 2013. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, 142(1–2): 28–34.

Beran, J., Ducháček, J., Ptáček, M., Stádník, L., 2014a. Comparison of bull' sperm extenders and their effect on sperm motility after thawing. In: *Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 18th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) 11. 9. 2014, Helsinki, Finland*: Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, 58–58.

Beran, J., Stádník, L., Doležalová, M., Toušová, R., 2014b. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. 1st ed., Praha: ČZU v Praze, 30 s.

Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., Doležalová, M., Krejčárková, A., Ducháček, J., Šichtař, J., 2015. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. *Journal of Central European Agriculture*.

Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y., Manjunath, P., 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 70 (3): 708–717.

Bergeron, A., Manjunath, P., 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 1338–1344.

Bezdiček J., Louda F., 2015. Efekty významně ovlivňující plodnost zvířat, Intenzifikační faktory plodnosti skotu: Agrovýzkum Rapotín, 3–8.

Bhoite, U. Y., Sutar, D. A., Ulmek, E. R. 2008. Studies on semen quality of crossbred bulls. *Indian Veterinary Journal*. 85: 53–55.

Blachshaw, A. W., Salisbury, G. W., 1957. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa 11: cold-shock and its prevention. *J. Dairy Sci.* 40: 1099–1106.

Blaschek, M., Kaya, a., Zwald, n., Memili, E., Kirkpatrick, B. W., 2011. A whole-genome association analysis of noncompensatory fertility in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*, 94: 9, 4695–4699.

Blesbois, E., 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poult Sci. J.*, 63: 213–222.

Bois, S., Len, J. A., Parlevliet, J. M., Eilts, B. E., 2012. Effects of cooling time on membrane integrity and motility of frozen-thawed canine spermatozoa using two different commercial egg yolk-based extenders at two different cooldown equilibration times. *Reproduction In Domestic Animals*, 47(6): 278–280.

Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guérin, B., Camus, A., Lechat, M., 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*, 50: 699–706.

Bredderman, P. J., Foote, R. H., 1971. Factors stabilizing bull sperm cell volume and prolonging motility at high dilution. *Experimental Cell Research*, 66: 458–464.

Brito, L. F. C., Silva, A., Rodrigues, L. H., Vieira, F. V., Deragon, L. A. G., Kastelic, J. P. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*. 58: 1175–86.

Bronson, F. H., 1989. *Mammalian reproductive biology*. USA: University of Chicago Press.

Bryant, J., Lopez-Villalobos, N., Holmes, C., Pryce, J., 2005. Simulation modelling of dairy cattle performance based on knowledge of genotype, environment and genotype by environment interactions: current status. *Agricultural Systems*, 86(2): 121–143.

Bucak, M. N., Atessahin, A., Varish, O., Yuce, A., Tekin, N., Akcay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen - Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67 (5): 1060–1067.

Bucak, M. N., Tekin, N., 2007. Cryoprotectants and cryoprotective effect in cryopreservation of gamete. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 54 (1): 67–72.

Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariozkan, S., Ulutas, P. A., 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81 (1): 13–17.

Cassani, P., Beconi, M. T., O’Flaherty, C., 2005. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Animal Reproduction Science*, 86: 163–173.

Castillo-Juarez, H., Oltenacu, P. A., Cienfuegos-Rivas, E. G., 2002. Genetic and phenotypic relationships among milk production and composition traits in primiparous Holstein cows in two different herd environments. *Livestock Production Science*, 78(3): 223–231.

Celeghini, E. C. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Nascimento, J., Raphael, C. F., Rodrigues, P. H. M., 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, 104 (2–4): 119–131.

Centurion, F., Vazquez, J. M., Calvete, J. J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction* 69: 640–646.

Cleland, D., Krader, P., Mc Cree, C., Tang, J., Emerson, D., 2004. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods*, 58 (1): 31–38.

Clulow, J. R., Mansfield, L. J., Morris, L. H. A., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 108: 298–308.

Collins, W. E., Inskeep, E. K., Tyler, W. J., Casida, L. E., 1962: Variation in conception rates of Guernsey cattle. *Journal of Dairy Science*, 45: 1234–1236.

Cotter, P. Z., Goolsby, H. A., Prien, S. D. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 40: 98–99.

Crockett, E. L., 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am. Zool*, 38: 291–304.

De Jarnette, J. M. 2010. The evolution of sex-sorted semen in the US dairy industry. *Journal of Dairy Science*. 93: 783–783.

De Leeuw, A. M., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L., Den Daas, J. H. G., 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*, 54 (1): 57–67.

De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., Verkleij, A. J., 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30 (1): 32–44.

Demianowicz, W., Strezek, J., 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reproduction in Domestic Animals*, 31: 279–280.

Dhami, A. J., Sahni, K. L., Mohan, G., 1992. Effect of variol cooling rates (from 30 deg to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. *Theriogenology*, 38: 565–574.

Dhami, A. J., Sahni, K. L., Mohan, G., Jani, V. R., 1996. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. *Theriogenology*, 46: 109–120.

Doležalová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., 2015a: Effect of extender on motility and live spermatozoa proportion in bull sperm after thawing. *Archiv fur Tierzucht*.

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

Doleželová, M., Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J., 2015c. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Vet. Brno*.

Dominik, S., Crook, B. J., Kinghorn, B., P., 2001. The effect of genotype x environment interaction on different traits in different environments. *Proceedings of Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics*, 14: 385–388.

Ehrenwald, E., Parks, J. E., Foote, R. H., 1988. Cholesterol efflux from bovine sperm: II. Effect of reducing sperm cholesterol on penetration of zona-free hamster and in vitro matured bovine ova. *Gamete Research*, 20: 413–420.

El-Hajj Ghaoui, R., Gillan, L., Thomson, P. C., Evans, G., Maxwell, W. M. C., 2007. Effect of SP fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status and in vitro fertility of ram spermatozoa. *Journal of Andrology*, 28: 109–22.

Ferero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., Arruda, R. P., 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44: 154–159.

Fridovich, I., 1985. Superoxide dismutase, regularities and irregularities. *Harvey Lect*, 79: 51–75.

Frydrychová, S., Čeřovský, J., Lustyková, A., Rozkot, M., 2010. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*, 55 (4): 160–166.

Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, C., Soelkner, J., 2006. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science*, 95 (1–2): 27–37.

Gamčík P., Kozumplík J., a kol., 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat: Priroda*, Bratislava, 344 s.

Gao D., Mazur P., Critser J. K., 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow A. M., Critser J. K., (eds.), 1997. *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. Academic Press San Diego, USA.

Garde, J. J., Olmo, A., Soler, A. J., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E. R., 2008. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science*, 108: 384–401.

Garner, D. L., Thomas, C. A., Allen, C. H., 1997. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *Journal of Andrology*, 18 (3): 324–331.

Garner, D. L., Thomas, C. A., Gravance, C. G., Marshall, C. E., De Jarnette, J. M., Allen, C. H., 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, 56 (1): 31–40.

Gordon, I. R., 2004. *Reproduction technologies in farm animals*. UK: CABI Publishing.

Gillan, L., Maxwell, W. M. C., 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility, Suppl.* 54: 271–283.

Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W. M. C., Evans, G. 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*. 103: 201–214.

Graham, J. K., Mocé, E., 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 105: 104–118.

Green, C. E., Watson, P. F., 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122: 889–898.

Guillou, J., Ropers, M. H., Gaillard, C., Dais-Briand, E., Desherces, S., Schmitt, E., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Tainturier, D., Anton, M., 2013. Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108: 246–254.

Guthrie, H. D., Liu, J., Critser, J. K., 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67 (6): 1811–1816.

Hafez, E. S. E., Hafez, B., 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. USA: Lippincott Williams et Wilkins.

Hansen, P. J., 2007. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology*, 68: S242–S249.

Harrison, R. A. P., Dott, H. M., Foster, G. C., 1982. Bovine serum albumin, sperm motility, and the “dilution effect”. *Journal of Experimental Zoology*, 222: 81–88.

Härtlová, H., Rajmon, R., Krontorádová, I., Mamica, J., Zita, L. a kol. 2013. Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise. *Acta Veterinaria Brno*. 82: 31–35.

Hayden, S. S., Blanchard, T. L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Hinrichs, K., Love, C. C., 2015. The “dilution effect” in stallion sperm. *Theriogenology*, 83: 772–777.

Hayden, S. S., Blanchard, T. L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Hinrichs, K., Love, C. C., 2012. Pregnancy rates in mares inseminated with 0.5 or 1 million sperm using hysteroscopic or transrectally guided deep-horn insemination techniques. *Theriogenology*, 78: 914–920.

Henry, M., Snoeck, P. P. N., Cottorello, A. C. P., 2002. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*, 58: 245–248.

Hofírek, B, Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. a kol., 2009. *Nemoci skotu*. Brno: Česká buiatrická společnost, Noviko, a. s, 1149 s.

Hoflack, G., Opsomer, G., van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Duchateau, L. 2006. Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. *Theriogenology*. 66: 1834–46.

Holt, W. V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62 (1–3): 3–22.

Hu, J. H., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, W. Y., 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing thawing. *Cryobiology*, 57 (3): 257–262.

Hu, J. H., Li, Q. W., Li, G., Jiang, Z. L., Bu, S. H., Yang, H., Wang, L. Q., 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Animal Reproduction Science*, 112 (1–2): 107–118.

Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. S., Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., Jia, Y. H., 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, 117 (1–2): 11–17.

Chatterjee, S., De Lamirande, E., Gagnon, C., 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, 60: 498–506.

Chebel, R. C., Santos, J. E. P., Reynolds, J. P., Cerri, R. L. A., Juchem, S. O., Overton, M., 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 84(3-4): 239–255.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*. 53: 859–875.

Jasko, D. J., Martin, J. M., Squires, E. L., 1992. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology*, 37: 1233–1239.

Jiang, Z. L., Li, Q. W., Li, W. Y., Hu, J. H., Zhao, H. W., Zhang, S. S., 2007. Effect of low-density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Animal Reproduction Science*, 99 (3–4): 401–407.

Kampschmidt, R. F., Mayer, D. T., Herman, H. A., 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 36: 733–742.

Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G., 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, 53(6): 1285–1293.

Karoui, S., Díaz, C., Serrano, M., Cue, R., Celorrio, I., Carabaño, M. J. 2011. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Animal Reproduction Science*. 124: 28–38.

Kelso, K. A., Redpath, A., Noble, R. C., Speake, B. K. 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*. 109: 1–6.

Kendall, N., R., McMullen, S., Green, A., Rodway, R. G., 2000. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*, 62(4): 277–283.

Komárek V., Sova, Z., a kol., 1964. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat: Státní zemědělské nakladatelství Praha*, 387 s.

Kommisurd, E., Berg, K. A. 1996. The influence of duration of sexual preparation on bovine semen characteristics and fertility rates. *Reproduction in Domestic Animals*, 31: 369–371.

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*, 39 s.

Kovář V., Sobek B., 1965. *Porodnictví a inseminace: Státní zemědělské nakladatelství, Praha*, 233 s.

Kunavongkrit, A., Suriyasomboon, A., Lundeheim, N., Heard, T. W., Einarsson, S., 2005. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenology*, 63(2): 657–667.

Kuroda, K., Fukushima, M., Harayama, H., 2007. Premature capacitation of frozen-thawed spermatozoa from subfertile Japanese black cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 53: 1079–86.

Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A., 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, 28: 471–479.

Leahy, T., de Graaf, S. P., 2012. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (4): 207–13.

Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M., de Andrade, V. J., 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr 22 bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120: 31–38.

Lemma A., 2011. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: Manafi, (eds.), 2011. *Artificial insemination in farm animals*, InTech, Chapters published. Vienna, Austria.

Linhartová Z., Rodina M., Guralp H., Gazo I., Saito T., Pšenička M., 2014. Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). *Czech Journal of Animal Science*, 59: 381–390.

Liu, J., Westhusin, M., Long, C., Johnson, G., Burghardt, R., Kraemer, D. 2010. Embryo production and possible species preservation by nuclear transfer of somatic cells isolated from bovine semen. *Theriogenology*. 74: 1629–35.

Loomis, P. R., Graham, J. K., 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105: 119–128.

Louda F., Bezdíček J., 2015. Působení býků v přirozené plemenitbě, Intenzifikační faktory plodnosti skotu: *Agrovýzkum Rapotín*, 15–20.

Louda F., 2001. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*: Česká zemědělská univerzita, Praha, 225 s.

Louda, F., Bjelka, M., Ježková, A., Pozdíšek, J., Stádník, L., Bezdíček, J., 2007. *Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby*. Rapotín: VÚCHS, s.r.o., 41 s.

Louda, F., Vaněk, D., Ježková, A., Stádník, L., Bjelka, M., Bezdíček, J., Pozdíšek, J., 2008. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic*. Rapotín: VÚCHS, s.r.o., 56 s.

Lovelock, J. E., Bishop, M. W., 1959. Prevention of freezing damage to living cells by Dimethylsulphoxide. *Nature*, 183: 1394–1395.

Machatý, Z., Peippo, J., Peter, A., 2012. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*, 78: 937–950.

Majzlík, I., 2000. Chov zvířat I. ČR: Česká zemědělská univerzita v Praze.

Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Cano, R., Blas, I., Espinosa, E., 2010. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk-based extender. *Cryobiology*, 61: 17–21.

Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Menard, M., 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, 67 (4): 1250–1258.

Mann, T., 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. 2nd ed. London, United Kingdom: Methuen, 493 s.

Mathevon, M., Buhr, M. M., Dekkers, J. C. M. 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 81: 3321–3.

Maurya, V. P., Tuli, R. K. 2003. Post-thaw thermal resistance test on motility and acrosomal integrity of filtered and non-filtered frozen semen of Murrah buffalo bulls. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 16: 1424–28.

Maxwell, W. M. C., Johnson, L. A., 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52 (8): 1353–1362.

Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., Rodrigues, J. L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57 (1): 327–344.

Milovanov, V. K. 1934. *Principles of artificial insemination*. Moscow and Leningrad: State Publishing House, 191 s.

Molinia, F. C., Evans, G., Maxwell, W. M. C., 1994. Incorporating of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 849–858.

Moore, A. I., Squires, E. L., Bruemmer, J. E., Graham, J. K., 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 26: 215–218.

Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M., 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57: 1695–1706.

Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Loaiza-Eccheverri, A. M., Varago, F. C., Neves, M. M., Heneine, L. G. D., Arruda, R. P., Henry, M., 2011. Natural, but not

lyophilized, low-density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 75, 300–307.

Muchlisin Z. A., Nadiyah W. N., Nadiya N., Fadli N., Hendri A., Khalil M., Siti-Azizah, 2015. Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*, Burchell 1822 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 10–15.

Muino-Blanco, T., Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J.A., 2008. SP proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*, 43: 18–31.

Muiño, R., Fernández, M., Peña, A. I., 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, 42: 305–311.

Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N., Ranieri, M. S., Bernabucci, U., 2010. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science*, 130(1-3): 57–69.

Neely, J. D., Johnson, B. H, Dillard, E. U., Robison, O. W., 1982. Genetic-parameters for testes size and sperm number in Hereford bulls. *Journal of Animal Science*, 55(5): 1033–1040.

Nehring, H., Rothe, L., Reguszynski, K., Schumann-Zuhlke, D., 2005. Developments in quality estimation and cryopreservation of bull semen. *Zuchtungskunde*, 77 (2–3): 93–109.

Nichi, M., Bols, P. E. J., Zuge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., Cortada, C. N. M. 2006. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*. 66: 822–828.

Nowicki, A., Baranski, W., Baryczka, A., Janowski, T. 2017. OvSynch protocol and its modifications in the reproduction management of dairy cattle herds-an update. *Journal of Veterinary Research*. 61: 329–336.

Pace, M. M., Graham, E. F., 1974. Components in egg-yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*, 39 (6): 1144–1149.

Parisi, A. M., Thompson, S. K., Kaya, A., Memili, E., 2014. Molecular, cellular, and physiological determinants of bull fertility. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 637–642.

Papa, P. M., Maziero, R. D., Guasti, P. N., Junqueira, C. R., Freitas-Dell’Aqua, C. P., Papa, F. O., Vianna, F. P., Alvarenga, M. A., Crespilho, A. M., Dell’Aqua, J. A., 2015. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, 83: 107–113.

Parks, J. E., Arion, J. W., Foote, R. H., 1987. Lipids of plasma membrane and outer akrozomal membrane from bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 37: 1249–1258.

Perez, L. J., Valcarcel, A., de las Heras, M. A., Moses, D. F., Baldassarre, H., 1996. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 45:1037–1046.

Pillet, E., Labbé, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 75: 105–114.

Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V., 2012. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int. J. Androl.* 35: 109–124.

Polák L., 1961. *Inseminace skotu: Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 525 s.*

Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S., 1949: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666–666.

Přinosilová, P., Kopecká, V., Hlavicová, J., Kunetková, M. 2014. Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Veterinaria Brno.* 83: 313–327.

Quinn, P. J., Chow, P. Y. W., White, I. G., 1980. Evidence that phospholipid protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60: 403–407.

Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N., 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59: 31–41.

Reddy, N. S. S., Mohanarao, G. J., Atreja, S. K., 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 119 (3–4): 183–190.

Reece W. O., 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat, překlad Jiří Cibulka a kol.: Grada, Praha, 480 s.*

Reid, C. E., Hermes, R., Blottner, S., Goeritz, F., Wibbelt, G., Walzer, C., Bryant, B. R., Portas, T. J., Streich, W. J., Hildebrant, T. B., 2009. Split-sample comparison of directional and liquid nitrogen vapour freezing method on post-thaw semen quality in white rhinoceroses. *Theriogenology*, 71: 275–291.

Rodríguez-Martínez, H. 1998. Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reproduction in Domestic Animals.* 33: 233–237.

Rooke, J. A., Shao, C. C., Speake, B. K., 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*, 121(2): 315–322.

Rosato, M. P., Iaffaldano, N., 2013. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79 (3): 508–516.

Rowley, H. S., Squires, E. L., Pickett, B. W., 1990. Effect of insemination volumes on embryo recovery in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 10: 298–300.

Říha, J., Frelich, J., Golda, J., Vaněk, D. 1998. Alternative methods utilizing embryotransfer (ET) for the formation of beef cattle herds. *Archiv für Tierzucht*. 41: 345–357.

Říha, J., Jakubec, V., Jílek, F., Illek, J., Kvapilík, J., Hanuš, O., Čermák, V., 2004. Reprodukce v procesu šlechtění skotu. ČR: Asociace chovatelů masných plemen Rapotín.

Salamon, S., Maxwell W. M. C., 1995. Frozen storage of ram semen: I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37: 185–249.

Sambraus, H. H., 2006. Atlas plemen hospodářských zvířat. ČR: Nakladatelství Brázda, Praha.

Sansone, G., Nastri, M. J. F., Fabbrocini, A., 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 62 (1–3): 55–76.

Saragusty, J., Gacitua, H., Pettit, M. T., Araw, A., 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 610–615.

Saragusty, J., Gacitua, H., Rozenboim, I., Arav, A., 2009. Protective effect of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 71: 1425–1432.

Sariozkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutas, P. A., Bilgen, A., 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58 (2): 134–138.

Saunders, P. T. K., 2002. Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis. *Reproduction Suppl.* 61: 91–101.

Savvulidi, F.G., Ptáček M., Málková A., Stádník L., 2021. Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapor for Wallachian sheep conservation program. *Czech J Anim Sci*, 66: 55–64.

Shahverdi A., Rastegarnia A., Topraggaleh T. R., 2014. Effect of Extender and Equilibration Time on Post Thaw Motility and Chromatin Structure of Buffalo Bull (*Bubalus Bubalis*) Spermatozoa. *Cell journal*, 16: 279–288.

Siddique, M., Ali, R., Raza, A., 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 2: 117–119.

Soderquist, L., Janson, L., Haard, M., Einarsson, S., 1996. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy AI bulls. *Animal Reproduction Science*, 44(2): 91–98.

Stádník, L., Ježková, A., Vacek, M. 2008. Factors affecting sperm survival in cervical mucus and pregnancy rates of OVSYNCH-treated Holstein cows. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 39: 24–30.

Stádník L., Beran, J., Doležalová, M., Ducháček, J., Toušová, R., 2014. Vybrané faktory ovlivňující kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků. Praha: Copy Centrum Powerprint, 37 s.

Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šimoník, O., Doležalová, M., Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P., 2015a. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno*, 84: 125–131.

Stádník L., Doležalová, M., Ducháček, J., 2015b. Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky. Praha: Copy Centrum Powerprint, 27 s.

Storey, B. T., Noiles, E. E., Thompson, K. A., 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37 (1): 46–58.

Stradioli, G., Noro, T., Sylla, L., Monaci, M., 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*, 67: 1249–1255.

Sun, M., Zigman, S., 1978. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes using the method of adrenaline autooxidation. *Analytical Biochemistry*, 90: 81–9.

Swain, J. E., Smith, G. D., 2010. Cryoprotectants. In: Chian, R. C., Quinn, P. (ed.), *Fertility cryopreservation*. New York: Cambridge University Press: 24–38.

Syrůček, J., Lipovský, D., Sládek, M., 2022. Ročenka chovu skotu v České republice – Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2021. Praha: ČMSCH, a.s., 38 s.

Šimoník, O., Šichtař, J., Krejčárková, A., Rajmon, R., Stádník, L., Beran, J., Doležalová, M., Biniová, Z., 2015. Computer Assisted Sperm Analysis – the relationship to bull field

fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85 (1): 3–11.

Špaleková, E., Makarevich, A. V., Kubovičová, E., Ostró, A., Chrenek, P., 2014. Effect of caffeine on functions of coolingstored ram sperm in vitro. *Acta Veterinaria Brno*, 83: 19–25.

Talevi, R., Pelosi, S., Sansone, G., Graso, F., Matasino, D., 1994. Effect of different prefreezing rates on buffalo sperm motility and ultrastructure preservation. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, *Proceedings of 4th World Buffalo Cong Sao Paulo, Brazil. International Buffalo Federation, Roma, Italy*, 537–539.

Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., a kol., 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: Much more than an inert envelope. *Reproduction in Domestic Animals*. 47: 65–75.

Tasdemir, U., Buyukleblebici, S., Tuncer, P. B., Coskun, E., Ozgurtas, T., Aydın, F. N., Buyukleblebici, O., Gurcan, I. S., 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*, 66: 38–42.

Thara, K. M., Nair, S. 2007. Sire effect on in vitro fertilizability of matured cattle oocytes. *Indian Journal of Biotechnology*. 6: 421–422.

Therrien, A., Manjunath, P., Lafleur, M., 2013. Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 1828: 543–51.

Thun, R., Hurtado, M., Janett, F., 2002. Comparison of Biociphos-Plus (R) and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57 (3): 1087–1094.

Tonieto, R. A., Goularte, K. L., Gastal, G. D. A., Schiavon, R. S., Deschamps, J. C., Lucia, T., 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, 93 (2–3): 206–209.

Topraggaleh, T. R., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V., Sharbatoghli, M., Esmaili, V., Janzamin, E., 2014. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia*, 46 (7): 777–783.

Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Buyukleblebici, S., Sariozkan, S., Yeni, D., Eken, A., Akalin, P. P., Kinet, H., Avdatek, F., Fidan, A. F., Gundogan, M., 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*, 61 (3): 303–307.

Tuncer, P. B., Sariozkan, S., Bucak, M. N., Ulutas, P. A., Akalin, P. P., Buyukleblebici, S., Canturk, F., 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*, 75 (8): 1459–1465.

Van Giessen, R., Van Wagendonk-de Leeuw, A., Zuidberg, C., Den Daas, J., Lansbergen, L., 1995. Top-proven sires in The Netherlands, applications of a fresh semen system. In: *Proceedings of the 7th European A.I. Vets Meeting*.

Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vasquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Anton, M., Bencharif, D., Tainturier, D., 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl (R) and Bioxcell (R). *Theriogenology*, 71 (6): 895–900.

Vera-Munoz, O., Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Thorin, C., Tainturier, D., 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 °C. *Asian Journal of Andrology*, 13: 281–286.

Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., de Kruijff, A., 2005: Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, 63 (3): 912–922.

Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P., 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Brno: VÚVeL, 258 s.

Wales, R. G., White, I. G., 1963. Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 5: 67–76.

Watson, P. F., 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5-degrees-C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of reproduction and fertility*, 62: 483–492.

Watson, P. F., 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 481–492.

White, I. G., 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction Fertility and Development*, 5: 639–58.

Woelders, H., Mathijis, A., Engel, B., 1997. Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35: 93–105.

Wolfenson, D., Roth, Z., Meidan, R., 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, 60: 535–547.

Yamada, C., Feitosa, W. B., Simoes, R., Nicacio, A. C., Mendes, C. M., Assumpcao, M., Visintin, J. A., 2011. Vitrification with glutamine improves maturation rate of

vitrified/warmed immature bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 46 (1): 173–176.

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T., 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54: 579–85.

Internetové zdroje:

www.genomia.cz/cz/reprodukce-inseminace

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AI – umělá inseminace

ATP – adenosintrifosfát

BSA – bovinní sérový albumin

BSP – bílkoviny (proteiny) semenné plazmy

CASA – počítačová metoda hodnocení spermatu (computer assisted semen analysis)

DMSO – dimetylsulfoxid

HDL – cholesterol - lipoprotein s vysokou hustotou (high density lipoprotein)

HSP – protein teplotního šoku (heat shock protein)

ID – inseminační dávka

LDL – cholesterol s nízkou hustotou - frakce vaječného žloutku (low density lipoprotein)

LN2 – tekutý dusík (liquid nitrogen)

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

Tris – hydroxymethylaminomethan