

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Modifikace konvenčních ředidel za účelem zlepšení
kvalitativních parametrů konzervovaného beraního
spermatu**

Bakalářská práce

**Jan Bejček
Živočišná produkce**

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

2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Modifikace konvenčních ředidel za účelem zlepšení kvalitativních parametrů konzervovaného beraního spermatu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022 _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Martinovi Ptáčkovi, Ph.D. za trpělivost a pomoc při vedení mé bakalářské práce a dále pak mé rodině a přátelům za podporu během studia.

Modifikace konvenčních ředidel za účelem zlepšení kvalitativních parametrů konzervovaného beraního spermatu

Souhrn

Práce je zpracována jako literární rešerše a zabývá se souhrnem poznatků o zpracování ejakulátu a aditivních přísad do ředidel a následným hodnocením na bázi polních testů (inseminace) či specializovaných laboratorních testů.

Jeden z hlavních důvodů nízkého využití inseminace v chovu ovcí je kvůli tomu, že beraní ejakulát má nízkou kryotoleranci a tudíž buňky po rozmrazení mají nízkou fertilizační schopnost. Média pro konzervaci jsou primárně typována pro velké přežvýkavce. Proces zpracování ejakulátu má několik fází. Jednou z nejdůležitější a nejsložitější částí procesu byla konzervace ejakulátu a rozmrazování, kde dochází k největším ztrátám na kvalitě inseminační dávky.

K získávání ejakulátu od berana se využívá metoda odběru umělou vagínou, pomocí elektroejakulace či post mortem. Nejvyužívanější metoda je pomocí umělé vagíny, jelikož je to nejpřirozenější a nejméně stresující. Méně využívanou metodou je post mortem, neboli po smrti zvířete.

Cílem této bakalářské práce bylo zaměřit se na konvenční ředidla, které byly doplněny aditivami za účelem zlepšení kvalitativních parametrů pro konzervaci beraního spermatu. Tyto látky se do ředidla přidávají i za účelem ochrany spermií během chlazení a zmrazování. Mezi nejvýznamnějšími aditivami patří antioxidanty, vitamíny, rostlinné extrakty a další neméně významné aditiva. Antioxidanty chrání buňky před reaktivní formou kyslíku, a díky tomu udržují spermie ve správné fyziologické činnosti. Při použití antioxidantu astrayanthinu bylo zjištěno mnoha autory zlepšení životaschopnosti uloženého spermatu. Mezi nejhlavnější vitamíny patří vitamín E, trolox, kyselina askorbová či vitamín B12. Vitamíny jsou důležité k zachování kvality spermatu. Rostlinné extrakty, které jsou například z hřebíčku, rozmarýny, zeleného čaje, napomáhají ke zlepšení kvality. Velmi pozitivní vliv mělo také použití želatiny, která zvýšila viskozitu média a snížila pohyblivost spermií.

Významnou metodou inseminace byla zjištěna intracervikální metoda, díky nízkým finančním nákladům, jednoduchosti a rychlosti provedení. Avšak nejlepší výsledky zabřezávání dosáhla metoda laparoskopická, která je však z finančního hlediska mnohem dražší a její proveditelnost je složitější i časově náročnější.

Specializovanými laboratorními testy jsou počítačová metoda CASA, hypoosmotický test a průtoková cytometrie. Pomocí těchto přístrojových metod lze získat data o morfologii, motilitě, koncentraci, vitalitě spermií, dále analýza DNA a množství poškozených a mrtvých buněk.

Klíčová slova: ovce, inseminace, ředění ejakulátu, konzervace inseminačních dávek, ředidla

Modification of conventional diluents in order to improve the quality parameters of conserved ram sperm

Summary

The work is processed as a literature search and deals with a summary of knowledge about the processing of ejaculate and additive additives to diluents and subsequent evaluation based on field tests (insemination) or specialized laboratory tests.

One of the main reasons for the low utilization of insemination in sheep farming is due to the fact that lamb ejaculate has low cryotolerance and therefore the cells have a low fertilization capacity after thawing. Preservation media are primarily typed for large ruminants. The ejaculate processing process has several stages. One of the most important and complicated parts of the process was the preservation of ejaculate and thawing, where the greatest losses in the quality of the insemination dose occur.

To obtain ejaculate from the ram, the method of collection by artificial vagina, electroejaculation or post mortem is used. The most used method is using an artificial vagina, as it is the most natural and least stressful. The less used method is post mortem, or after the death of the animal. The aim of this bachelor thesis was to focus on conventional diluents, which were supplemented with additives in order to improve the quality parameters for the preservation of sheep semen. These substances are also added to the diluent to protect sperm during cooling and freezing. The most important additives include antioxidants, vitamins, plant extracts and other equally important additives. Antioxidants protect cells from a reactive form of oxygen, keeping sperm in proper physiological activity. Using the antioxidant astrayanthin, many authors have found an improvement in the viability of stored sperm. The most important vitamins include vitamin E, trolox, ascorbic acid and vitamin B12. Vitamins are important for maintaining sperm quality. Plant extracts, which are made of cloves, rosemary and green tea, for example, help to improve quality. The use of gelatin, which increased the viscosity of the medium and reduced sperm motility, also had a very positive effect.

The intracervical method was found to be an important method of insemination, thanks to its low financial costs, simplicity and speed of execution. However, the best results of conception were achieved by the laparoscopic method, which is much more expensive from a financial point of view and its feasibility is more complex and time-consuming.

Specialized laboratory tests are computer method CASA, hypoosmotic test and flow cytometry. Using these instrumental methods, data on morphology, motility, concentration, sperm vitality, DNA analysis and the number of damaged and dead cells can be obtained.

Keywords: sheep, insemination, dilution of ejaculate, conservation of insemination doses, thinners

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl práce.....	9
3. Literární rešerše	10
3.1. Získávání ejakulátu od berana	10
3.1.1. Odběr spermatu umělou vagínou	10
3.1.2. Odběr spermatu pomocí elektroejakulace.....	11
3.1.3. Odběr spermatu post-mortem.	11
3.2. Hodnocení kvality beraního spermatu.....	12
3.2.1. Makroskopické posouzení	12
3.2.2. Mikroskopické posouzení	13
3.2.3. Stanovení patologických spermií	13
3.3. Zpracování ejakulátu	15
3.3.1. Ředidla.....	15
3.3.1.1 Ředidla na krátkodobou konzervaci	15
3.3.1.2 Ředidla na dlouhodobou konzervaci	16
3.3.2. Ředění ejakulátu	17
3.3.2.1 Postup ředění krátkodobých konzervačních ředidel.....	17
3.3.2.2 Ředění dlouhodobé konzervace	18
3.3.3. Chlazení a ekvilibrace	18
3.3.4. Konzervace ejakulátu	19
3.3.4.1 Konzervace v tekutém stavu	19
3.3.4.2 Konzervace v mrazeném stavu.....	20
3.3.5. Techniky rozmrazování spermií	22
3.3.5.1 Další metody kryokonzervace	22
3.4. Modifikace konvenčních ředidel za účelem zlepšení životaschopnosti spermií.....	23
3.4.1. Aditivní látky v ředidlech	23
3.4.1.1 Antioxidanty	24
3.4.1.2 Enzymy	24
3.4.1.3 Vitamíny	25
3.4.1.4 Aminokyseliny	26
3.4.1.5 Rostlinné extráty	26
3.4.1.6 Další sloučeniny	28
3.4.1.7 Semenná plazma	29

3.4.1.8	Cukr	29
3.4.2.	Kryoprotektiva	30
3.4.3.	Ředidla obsahující vaječní žloutek	31
3.5.	Specializované metody in-vitro testů u fertilizační schopnosti spermií.	31
3.5.1.	Vyšetření počítačovou analýzou ejakulátu CASA	32
3.5.2.	Hypoosmotický test.....	34
3.5.3.	Průtoková cytometrie.....	35
3.6.	Fertilizační schopnost při umělé inseminaci	38
3.6.1.	Metody inseminace.....	39
3.6.1.1	Intravaginární metoda	40
3.6.1.2	Intracervikální metoda.....	40
3.6.1.3	Intrauterinní metoda	41
3.6.1.4	Intrauterinní transcervikální metoda	41
3.6.1.5	Intrauterinní laparoskopická metoda	41
4.	Závěr	43
5.	Seznam literatury	45

1. Úvod

Konzervace beraního spermatu na inseminaci je jako u ostatních hospodářských zvířat nejrozšířenější a nejstarší biotechnologickou metodou, která má velký význam na užitek hospodářských zvířat.

Tato metoda umožňuje rychlé rozšíření cenných genů v populaci a lepší genetický pokrok, kontrolu reprodukce a snížení přenosu pohlavních chorob (Cseh et al. 2012). Na umělou inseminaci se využívá menší počet plemenných beranů, jelikož ejakulát ředíme, abychom získali větší počet inseminačních dávek, které obsahují nižší koncentraci spermií (Leboeuf et al. 2006).

V chovu ovcí není rozvoj inseminačních dávek na takové úrovni, jako u skotu nebo prasat, ale postupně se jeho využití rozvíjí. Neustále se zdokonalují ředidla za účelem zlepšení kvalitativních parametrů konzervovaného beraního spermatu. Jelikož chovatelé v České republice nejeví vysoký zájem o chov ovcí, tak se zde tolik inseminace nevyužívá.

Abychom mohli ejakulát použít na konzervaci, musí projít hodnocením. Kvalita semene se zjišťuje ihned po jeho odběru, a to makroskopickým a mikroskopickým hodnocením, stanovením patologických spermií a specializovaným vyšetřením.

Zjišťujeme objem, konzistenci, koncentraci a aktivitu spermií dále morfologii spermií, jejich vzhled, pohyblivost a další ukazatele kvality (Louda 2001).

Dalším hodnocením, které se provádí je životaschopnost spermií a jejich aktivita před mrazením a po rozmrazení inseminační dávky. K tomu nám pomáhají ředící roztoky, o kterých se ve své práci zmiňuji. Dále jsem se zaměřoval na modifikaci konvenčních ředidel, které vedou ke zlepšení těchto parametrů.

2. Cíl práce

Využití biotechnologických metod u malých přežvýkavců je velmi omezené. Proto všechny informace vedoucí ke zlepšení dílčích postupů, jsou důležité s ohledem na potenciální rozvoj tohoto odvětví. Cílem bakalářské práce je formou literární rešerše definovat aktuální poznatky tematicky zaměřené na aditiva přidávaná do ředidel, jejichž účinkem je zlepšení kvalitativních ukazatelů konzervovaného beraního spermatu. Jako důsledek bakalářské práce bude navržen možných postupů pro optimalizaci výroby inseminačních dávek, popř. zlepšení úspěšnosti při následné inseminaci.

3. Literární rešerše

3.1. Získávání ejakulátu od berana

K odběru semene se využívá několik metod. Nejpoužívanější metodou odběru ejakulátu u přežvýkavců je odběr do umělé vagíny, která je nejvíce spolehlivá, jelikož zvířata nejsou ve stresu a zisk spermatu je větší než u druhé metody (Malejane et al. 2014). Mezi méně používané metody řadíme elektroejakulaci, kvůli menšímu zisku ejakulátu a většímu stresu zvířat při vykonávání. (Gamčík, 1984). Další nepříliš používanou metodou je post- mortem a to kvůli její složitosti provedení (Kaabi et al. 2003). S odebráním ejakulátem je potřeba zacházet velice šetrně, aby nedošlo k tepelnému a chladovému šoku. Dále musíme dbát na to, aby nedocházelo k případné kontaminaci vody nebo dezinfekčních prostředků, slunečního záření a vzduchu (Nutti 2007).

Při porovnání odběru spermatu pomocí elektroejakulaci a do umělé vagíny bylo zjištěno, že při odběru elektroejakulací je objem ejakulátu vyšší (1,12 cm³) než při odběru do umělé vagíny (0,71 cm³). Rozdílné hodnoty byli pozorováni při koncentraci spermií a jejich motilitě, kde byly tyto hodnoty při elektroejakulaci výrazně nižší (koncentrace 900-1000 mil. v 1 cm³, motilita je 76 %). Hodnoty při odběru do umělé vagíny dosahovali hodnot (koncentrace 3 586 mil. v 1 cm³, aktivita je 84 %). Dle výzkumu Tapaloaga (2016), který zkoumal u obou metod změnu morfologie spermií a došel k závěru, že ani jedna z metod na tuto změnu nemá vliv. U dalších pokusů se zjistilo, že morfologické změny na spermiích, se vyskytují více u mladších jedinců než u starších (Akpa 2012).

3.1.1. Odběr spermatu umělou vagínou

Pro odběr spermatu pomocí umělé vagíny se využívá stejný typ umělé vagíny, jako se využívá u býků, akorát atrapa vagíny je zkrácená, aby se zabránilo případným ztrátám semene (Romano & Christians, 2009). Umělá vagína se skládá z pevného vnějšího pouzdra ve tvaru trubky o délce 20 cm a průměru 5 –5,5 cm a vnitřní gumové vložky, která se vloží do pouzdra a dosahuje délky 32 cm o průměru 3 –3,5 cm (Wernerová 2015) Poslední částí je skleněný dvoustranný sběrač semene. Před samotným odběrem se mezistěna vyplní vodou o teplotě 38 –42 °C, kvůli stimulaci teploty těla samice. Pomocí vzduchového ventilku, který se nachází na straně pouzdra, regulujeme tlak, který samec vyvíjí na stěnu pochvy (Gamčík et al. 1992). Na vnitřní stranu umělé vagíny se nanese lubrikant s nespermicidními látkami, aby nedošlo k poranění penisu samce. Nejčastěji se využívá vazelína nebo sonografický gel (Kos et al. 2019). Na opačný konec umělé vagíny se připevní jednorázový sběrač semene (Wernerová, 2015). Po úspěšném odběru putuje ejakulát do laboratoře, kde se posoudí jeho makroskopické a mikroskopické vlastnosti viz kapitola „3.2 Hodnocení kvality beraního spermatu“ (Malejane et al 2014). Pro odběr do umělé vagíny se využívá umělá atrapa nebo je možné použít ovci, která je v říji, pomocí její přítomnosti se zvyšuje získání objemu ejakulátu a urychluje se i odběr semene. Odběr ejakulátu lze provádět 1–2 krát denně maximálně 5krát týdně (Louda 2009). Dle Hošek (2016) je lepší provádět odběr maximálně 2–3krát týdně. Dle

výzkumu Colenbrander (2003) má příznivý vliv na mrazivost spermií pauza 2–3 dny mezi jednotlivými odběry ejakulátu.

3.1.2. Odběr spermatu pomocí elektroejakulace

Další metodou je odběr pomocí elektroejakulace, kde se využívá bipolární elektroda, která je vsunuta do konečníku berana (Hošek 2016). Metoda se nejčastěji používá mimo připouštěcí období u zvířat, které nejsou zvyklé na umělou vagínu (Abril-Sánchez et al. 2017). Elektroda má tvar duté tyčinky o délce 32–40 cm s průměrem 1–1,5 cm. Na konci přístroje jsou dvě elektrody o délce 10 cm (Matthews et al. 2003). Elektroda působí cyklické impulzy, které lze stimulovat postupným zvyšováním impulzů. Nevýhodou této metody je změna semenné plazmy, což vede k poškození při kryokonzervaci (Santiago-Moreno et al. 2009). Další nevýhodou je její bolestivá a příliš stresující aplikace, což vyvolává zvýšení koncentrace kortizolu v séru a to má za následek zvýšenou dechovou a srdeční frekvenci. Před samotným vsunutím se elektroda vypláchne vlažným roztokem NaCl, což má za následek lehčí průchod elektrického proudu. Nakonec se sterilně očistí předkožkový otvor (Wernerová 2015). Celý proces trvá přibližně 3 minuty (Gamčík et al. 1992). Vhodnější metodou elektroejakulace je metoda TUMASG, která se provádí transrektálním ultrazvukem řízenou masáží přídatných pohlavních žláz. U této metody se nepoužívají žádné impulzy nebo mnohem méně než je tomu při normální elektroejakulaci. Dle výzkumu, kde byli porovnány tyto dvě metody, se zjistilo, že mnohem vhodnější metodou pro berana je metoda TUMASG (Abril-Sánchez et al. 2017)

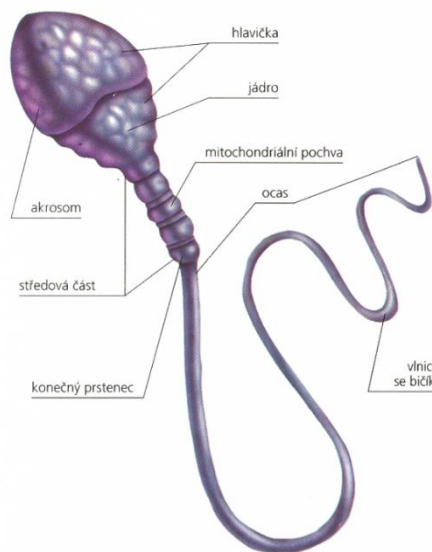
3.1.3. Odběr spermatu post-mortem.

Odběr spermatu post-mortem se řadí mezi chirurgické metody a provádí se, co nejdříve a to od 0–24hodin (Garde J et al. 1994). Dle jiných výzkumů lze vzorky odebrat z nadvarlete i do 48hodin po smrti zvířete (Kaabi et al. 2003). Jestliže nelze odebrat sperma z nadvarlete sperma okamžitě, je možnost konzervovat celé nadvarle při teplotě 5 °C a následně do 24hodin zpracovat vzorek (Kishikawa H et al. 1999, Shaken et al. 2008). Tato metoda je výhodná pro získání genetických rezerv u cenných zvířat nebo u ohrožených druhů (Hewitt et al. 2001). Ejakulát se odebírá z ocasu nadvarlete, kde se na jeho spodním konci provede několik řezů, které umožní vyplavení ejakulátu. Ten je následně shromážděn do ředidla o teplotě 37 °C (Abu et al. 2016).

Kaabi et al. (2003) ve svém výzkumu použil roztok Tes-Tris-fruktózy doplněným vaječným žloutkem (10 %) a glycerolem (4 %). Zmrazování probíhalo pomocí laboratorního mrazáku, kde teplota klesala 0–20 °C/minutu. Zjistilo se, že spermie před zmrazením i po rozmrazení vykazovali životaschopné spermie do 48 hodin po smrti zvířete. Dále zjistili, že spermie z nadvarlete skladované při teplotě 5 °C dosahovaly lepší motility a nižší procento abnormálních forem než spermie nadvarlete skladované při pokojové teplotě po 24 a 48 hodinách. S tímto výzkumem souhlasil i Bergstein-Galan et al. (2017).

3.2. Hodnocení kvality beraního spermatu.

Plodnost samců se hodnotí množstvím a kvalitou ejakulátu, oplozovací schopností spermií a schopností provádět koitus. Hlavním cílem hodnocení ejakulátu, je předpovědět oplozovací schopnost objektivně, přesně, rychle a s co nejnižšími náklady (Kubovičová 2011). K hodnocení kvality beraního spermatu se provádí makro/mikroskopické laboratorní hodnocení (Edmondson et al. 2012). Vyšetření se provádí ihned po odběru u beranů chovaných v inseminačních stanicích, pro výrobu mražených inseminačních dávek a to pravidelně. U beranů, kteří jsou sezonně s ovce v stádě, se vyšetření provádí 4-6 týdnů před zahájením připouštěcí sezóny (Louda et al. 2001). Dalším důležitým hodnocením je stanovení patologických spermií a specializované vyšetření ejakulátu (Edmondson et al. 2012).



Obrázek 1 Stavba spermie (Trojan S et al. 2002)

3.2.1. Makroskopické posouzení

Makroskopické posouzení provádíme zrakem a čichem. Posuzujeme barvu, zrnitost, konzistenci, obsah příměsí, objem a pach ejakulátu (Heidari et al. 2021).

Objem

Množství ejakulátu posuzujeme v pipetě ihned po odebrání. Objem by měl mít okolo 0,5–1,5 ml (Gamčík et al. 1992). Množství objemu ovlivňuje např: plemeno, genetické predispozice, intenzita pohlavního využívání, technika odběru, kvalita krmení, roční období a zdravotní stav (Věžník et al. 2004).

Hustota a konzistence

Hustota beraního semene se posuzuje ve sběrači, kde skrz něj necháme procházet světlo. Spermia, které má dobrou kvalitu se pozná tak, že je husté a neprůhledné

(Gamčík & Kozumplík 1992). Konzistence beraního spermatu by měla být mléčná až smetanová (Youngquist & Threfall 2007).

Barva a pach

Specifická barva spermatu je dána hustotou a konzistencí semene. Semeno je většinou krémově bílé, jasně žluté nebo světle žluté (Ahmad & Noakes 1996). Ejakulát může mít i namodralý odstín, pokud je tam vysoká koncentrace spermií. Barvu posuzujeme proti světlu nebo tmavé podložce, na kterou dopadá světlo ve sběrači (Pena et al. 2005). Pach odebraného semene by měl být cítit po vlně (Gamčík & Kozumplík 1992).

3.2.2. Mikroskopické posouzení

Mikroskopicky se zjišťuje koncentrace spermií v 1 mm^3 a v celém ejakulátu, aktivita spermií, morfologické vady a pH. (Gamčík 1984).

Koncentrace

Stanovením koncentrace ejakulátu zjistíme nejdůležitější informaci o jeho kvalitě a následném zpracování při přípravě inseminačních dávek. Pro správné určení hustoty existuje několik způsobů a to odhadem, fotometricky, hemocytometricky nebo počítačově (Wernerová 2015). Hustota ejakulátu se pohybuje okolo 2–5 milionů spermií na 1 mm^3 a dělí se na 6 stupňů. Od velmi hustého ejakulátu, který má hodnoty 4–5 $\times 10^6$ spermií v mm^3 , až po velmi řídký ejakulát, který má 1 $\times 10^6$ spermií v mm^3 . Koncentrace pro krátkodobou konzervaci ejakulátu má mít minimálně 2 $\times 10^6$ v 1 mm^3 . Pro dlouhodobou konzervaci by měla být hodnota 2,8 $\times 10^6$ v 1 mm^3 (Johansson et al. 2008).

Motilita

Tufarelli et al. (2010) ve své studii hodnotí motilitu neboli pohyblivost spermií na stupnici 1–5, kdy hodnota 1 určovala nepohyblivé spermie a hodnota 5 velmi rychlý progresivní pohyb. Motilita spermií je ovlivněna kaskádou proteinů. Poslední dobou je zaznamenán veliký pokrok ve výzkumu proteinů a jejich funkcí na spermie, ale studie prováděné na malých přežvýkavcích jsou spíše vzácné (Zhu et al. 2020). Stanovení živých a mrtvých spermií je velice důležité, jelikož inseminační dávka musí obsahovat minimálně 70 % živých spermií (Madhuri et al. 2012). Ke stanovení živých a mrtvých spermií používáme dehydrogenační zkoušku nebo tepelný test přežitelnosti (Verstegen et al. 2002).

pH

Berani mají pH ejakulátu v rozmezí okolo 6,4 –7,2, které závisí na hustotě semene. Kvalitní ejakulát by měl mít pH 6,4 –6,6. Jakmile semeno přesáhne 7 pH, sníží se koncentrace spermií (Gamčík 1984).

3.2.3. Stanovení patologických spermií

Morfologické vyšetření patří mezi neobjektivnější metody posuzování ejakulátu, které slouží jak pro vědecké účely, tak i při provádění inseminace (de Paz 2011). Účelem tohoto vyšetření

je identifikovat berany, co se nemohou kvůli negativním výsledkům zařadit do plemenitby. Pomocí morfologické analýzy zjišťujeme procento tvarově změněných spermií a normospermií bez morfologických vad (Wernerová 2015). Hodnocení se provádí s čerstvě odebraným ejakulátem, který se nanese na sklíčko a obarví se. Dříve se nejčastěji používali metody barvení dle Wels x nebo dle Brandon-Farelyho. Dnes se však na stanovení patologických změn používá přístrojové měření CASA (Kliment et al. 1989). Pozorujeme primární změny na spermiích během spermiogenetického cyklu až po příchod spermií do ocasu nadvarlete. Změny pozorujeme hlavně na hlavičce, středním mitochondriálním oddílu, v akrozomu. Všechny tyto změny poukazují na poruchy semenotvorného a vývodného systému (Gamčík & Kozumplík 1984). Sekundární změny nastávají při delším pobytu spermií v ocase nadvarlete. Zde pozorujeme vady na bičíku, kde jsou morfologické změny, v důsledku nedokončeného zrání nebo při nesprávném odběru a zpracování semene. Mezi další změny patří nabobtnání, uvolnění, roztrhnutí akrozomu a hlavičky (Věžník et al. 2004).

Vady spermií

Kvůli tvorbě inseminačních dávek musíme vyšetřovat morfologii spermií u všech plemeníků (Johansson 1997). Vady spermií jsou způsobené při vývoji nebo až po úplném dokončení vývoje. Dalšími negativními vlivy, které škodí vývoji spermií a jejich morfologii jsou toxiny, infekce a výživa. Avšak největší vady jsou vyvolané genetickými poruchami. V normálním ejakulátu by se nemělo vyskytovat více jak 15 % těchto pozměněných spermií (Gamčík & Kozumplík 1992).

Vady spermií na hlavičce

Vady na hlavičce spermie jsou nejčastějšími defekty při spermiogeneze. Dělí se na poruchy akrozomu, kterých nesmí být více než 10 % a poruchy samotné hlavičky, které nesmí přesáhnout 5 % z celkové inseminační dávky. Nejčastějšími problémy na akrozomu jsou zbobtnání, zvrásnění, knoflíkový defekt, svlečení z hlavičky, perzistující akroblast a kondenzace akrozomové hmoty. Častými vadami tvarů u hlavičky spermie jsou gigantické hlavičky, příliš malé hlavičky, hlavičky hruškovitého tvaru, zúženého tvaru, zúžení hlavičky, zvýšený počet hlaviček na jedné spermii (Kliment et al. 1989).

Vady spermie na akrozomu

Nejčastější vadou je akrozom nabobtnalý, ke kterému dochází při manipulaci se spermatem, když se do sběrače dostane voda. Další změnou akrozomu je kondenzace akrozomové hmoty k přednímu okraji hlavičky, zřasení okrajů hlaviček nebo různé granulace v akrozomu (Gamčík et al. 1984).

Vady spermie na bičíku

Vady spermií na bičíku se dělí dle místa umístění defektu. Nejdůležitější částí jsou mitochondriální pochvy, které se nachází ve spojovací části hlavičky a bičíku. První z vad u bičíku je jeho uložení v implantační jamce hlavičky. Dalšími častými problematiky jsou různá

ohnutí, zlomení, příliš dlouhé nebo krátké bičíky, vyšší počet bičíků, různé stočení bičíku, zdvojení bičíku a oddělení hlavičky a bičíku (Louda et al. 2001).

Tyto vady jsou nejvýznamnější skupinou, které se projevují na mitochondriální pochvě. Hlavním následkem je zeslabení celého spojovacího oddílu, a tím dojde k fraktuře bičíku. Příčinou je především genetická predispozice (Barth et al. 1989).

Nezralé spermie

Tyto spermie poznáme tak, že mají zadrženou protoplazmatickou kapku na krčku. V normálním ejakulátu, který se používá na inseminační dávky, nesmí být více než 2 % nezralých spermií. (Gamčík & Kozumplík 1984).

3.3. Zpracování ejakulátu

K získání kvalitní inseminační dávky vede dlouhá cesta. Od zisku semene přes ředění a správné uskladnění, manipulace s nimi a na konec k dobře provedené inseminaci. Na všech těchto bodech může dojít k znehodnocení inseminační dávky (Gamčík & Kozumplík 1984). Zpracování ejakulátu se dělí na ředění, chlazení, ekvibraci a následnou konzervaci. Účelem ředění a konzervace spermatu je zajistit potřebu maximálního využití a prodloužení oplozovací schopnosti spermií, co nejdéle je to možné (Šmerha 1980).

3.3.1. Ředidla

Ředidla by měla obsahovat pufrovací schopnost, vhodnou osmolalitu a měla by chránit spermie před kryogenním poškozením (Maksimovic et al. 2018).

Nejčastěji používaná ředidla jsou na bázi tris (hydroxymethyl-aminometan), citrátu sodného a cukrů (fruktózy, glukózy, sacharózy, rafinózy). Přidání kyseliny citronové, antioxidantů, mastných kyselin a antibiotik lze také zlepšit skladovatelnost ejakulátu. Používané látky živočišného původu jsou látky vaječného žloutku nebo mléčná ředidla, která se používají plnotučná, odstředěná nebo ve formě UHT mléka. Látky živočišného původu přinášejí riziko mikrobiální nákazy (Salamon & Maxwell 2000). Z tohoto důvodu se výzkumníci v posledních letech zaměřují na záměnu živočišných látek za neživočišné látky (Gil et al. 2003).

Ředidla je možné si vlastnoručně vyrobit nebo zakoupit již zhotovené jako např.: komerčně vyráběná ředidla bez živočišných látek pod názvem Andromed, Biociphos, Biadyl, Optidyl, Optixcell, Ovixcell atd. Ředidla s živočišnými komponenty pak Triladyl a Ovipro (Hegedúšová et al. 2012). Množství použitého ředidla a semene závisí na metodě zpracování spermatu (Faigl et al. 2011).

3.3.1.1 Ředidla na krátkodobou konzervaci

Na krátkodobou konzervaci ejakulátu se využívají stejné komponenty jako při konzervaci býčího ejakulátu. V současnosti se používají ředidla na bázi Tris – glukóza – žloutek nebo Tris – citrát – fruktóza – žloutek (Shiple et al. 2007). Ředidla používaná na krátkodobou konzervaci

jsou uchována po dobu 8–12 hodin a jsou vyráběna v laboratořích nebo v polních podmínkách. Používaná ředidla jsou žloutko-citrátová, Šmerha, žloutko-citrátové upravená, mléčná, komerční ředidla bez komponentů živočišného původu (Andromed) nebo s komponenty živočišného původu Tryladyl a ovipro (Čunát 2013).

Například Lopez Saez et al. (2002) zkoumali účinnost ředidel ejakulátu u krátkodobé konzervace. Zabývali se pohyblivostí spermií a procentem nepoškozených akrozomů. Zkoumaný ejakulát, byl skladován při 5 °C po dobu šestnácti dnů. Na výzkum bylo použité ředidlo odstředěné mléko, ředidlo Test, ředidlo Tris trehalosa. Vyhodnocení zkoumaných hodnot, bylo vždy po 24 hodinách a bylo zjištěno, že nejlepší výsledky mělo ředidlo Tris-trehalosa. U tohoto ředidla byla naměřená pohyblivost spermií ($94,7 \pm 1,36$ %) a mělo nejnižší procento spermií s nepoškozeným akrozomem. Ke konzervaci bylo použité medium trehalóza, které bylo zdrojem energie pro spermie a chránilo membrány buněk. Zjistilo se, že spermie skladované při teplotě 5 °C mají větší životaschopnost, než spermie skladované při 15 °C (Lopez Saez et al. 2002).

Kozdrowski et al. (2007) ve svém výzkumu uvádí, že separací semenné plazmy pomocí odstředění a jejím následnou náhradou ředidly zvýšíme životaschopnost spermií jak při zmrazení, tak i po rozmrazení. Ředidla, které použil, jsou tris pufr obsahující glukózu, kyselinu citrónovou a glycerol s přísadkou vaječného žloutku (Kozdrowski et al. 2007).

Salamon & Maxwell (1995) ve své práci uvádějí, že: „Při ředění laktózy s arabskou gumou, citrátem, žloutkem a glycerolem, vychází březost ovcí kolem 26–65 %“. Zatímco při běžných ředidlech laktózy s vaječným žloutkem jsou hodnoty kolem 12–46 %.

Ředidla na bázi citrátu mají mnohem lepší integritu plazmatické membrány, procento hybnosti a progresivního pohybu spermií než ředidla na bázi Tris, avšak ředidla na bázi mléka mají podobné hodnoty, jako měli ředidla na bázi citrátu. Ředidla na bázi citrátu měla ($70,32 \pm 3,93$ %) a ředidlo na bázi Tris mělo hodnotu ($55,48 \pm 5,76$ %). Ředidla na bázi mléka měla hodnotu ($65,38 \pm 3,15$ %) a při skladování kolem 24–48 hodin bylo zjištěno, že mléčné ředidlo je pro spermie méně škodlivé než u ostatních dvou (Kozdrowski et al. 2007).

3.3.1.2 Ředidla na dlouhodobou konzervaci

Mezi základní ředidla v dnešní době řadíme destilovanou vodu, která slouží jako nosič komponentů: kryoprotektiva, pufr, cukry, antibiotika, aminokyseliny a mastné kyseliny (Beran et al. 2014). Na ochranu při mrazení inseminačních dávek se přidává do ředidel glycerol, což je kryoprotektivum a jeho optimální koncentrace se pohybuje v rozmezí 4–8 % (Salamon & Maxwell 2000). Kryoprotektiva jsou důležitou součástí ředidla, jelikož chrání buňky během kryokonzervace před roztrháním ledovými krystaly. Ty vznikají při procesu mrazení. Další vlastností této látky je ochrana buněk před chladovým šokem a také zvyšuje jejich odolnost (Ball & Peters 2004). Také dýchání spermií je základní životní projev, který započne již v ejakulátu pomocí produktů látkové výměny kyseliny mléčné. Ta postupně okyseluje prostředí a zpomaluje pohyb spermií. Dále navozuje anabiózu jejich odumírání (Mutalik et al. 2014). Ředidla, která se používají k přípravě inseminačních dávek, by měla poskytovat spermiím energii, izotonický, osmotický tlak, pufrovací systém a chránit je před chladovým

šokem (Edmondson et al. 2012). Významný vliv na motilitu a dýchání spermií má hodnota pH, jeho optimální hodnota je okolo 6–6,5. V těchto hodnotách vykazují spermie nejvyšší příjem kyslíku a motilitu. Používaná ředidla jsou dostupné biochemické látky, které ovlivňují schopnost spermií a předchází jejich poškození v průběhu mrazicího procesu. Také slouží jako ochrana pro spermie během mrazení a zlepšují motilitu po jeho rozmrazování (Siddique et al. 2006).

Další, kdo zkoumali ejakulát u dlouhodobé konzervace, byli pánové Soltanpour & Moghaddam (2014), kteří posuzovali pH, životaschopnost spermií a její pohyblivost v průběhu 3 dnů skladování po rozmražení ejakulátu. Získaný ejakulát, byl smíchán s ředidly na bázi Tris o hmotnosti 3,7 g, kde byl přidán ředidlo ve formě 2 g kyseliny citronové a 1 g fruktózy. Druhé ředidlo bylo na bázi Tris 2,7 g a obsahovalo také 1 g kyselinu citronovou a 1,5 g fruktózy. Přísada Tris působila jako pufr, který zabraňoval výkyvům pH. Zdrojem energie byly přísady fruktózy a kyseliny citronové. Na ochranu buněčné membrány spermií během chlazení byla určená přísada vaječného žloutku. Poslední přísada měla za úkol chránit membránu během procesu. Z výzkumu bylo zjištěno, že lepší životaschopnost spermií a hodnot pH byli zaznamenány u druhého ředidla, kde výsledky dosahovaly hodnot životaschopných spermií přibližně ($65,5 \pm 2,44$ %) a hodnota pH byla okolo ($6,9 \pm 0,07$).

3.3.2. Ředění ejakulátu

Ředěním před konzervací spermatu zajistíme ideální podmínky pro delší životnost spermií a zachování jejich fertilizační schopnosti. Také pomocí ředění upravujeme koncentraci spermií, a tím získáme i větší objem ejakulátu, což vede k nainseminování většího počtu zvířat (Mocé et al. 2020).

V posledních pár letech se používají tři metody na ředění beraního ejakulátu: skupiny extendory, protektory a implementory. Extendory slouží ke zvětšení objemu semene, které se používá v čerstvém stavu. Protektory se používají také na zvětšení objemu, ale zajišťují zdroj výživy a ochranu spermií v prostředí mimo organismus po delší dobu. Třetí skupina implementory slouží jako skupina protektory, ke kterým byly navíc přidány látky působící příznivě na pohlavní orgány samice, a to způsobuje příznivý proces oplození (Stádník & Doležalová 2015).

3.3.2.1 Postup ředění krátkodobých konzervačních ředidel

Nejdříve se musí stanovit objem ejakulátu a pomocí koncentrace a aktivity spermií se stanoví poměr ředění. Minimální počet spermií v inseminační dávce je 100×10^6 aktivních spermií, které jsou obsažené v inseminační dávce o velikosti $0,1\text{--}0,3 \text{ cm}^3$. Ředění se provádí okamžitě po odběru přímo ve sběrači. Musíme dbát na teplotu ejakulátu, která by měla mít kolem $25\text{--}30 \text{ C}^\circ$. Tradiční poměr ředění se pohybuje v poměru od 1:2 do 1:5. Podle novějších ředících protokolů se poměr pohybuje mezi 1:10 až 1:15 (Kukovics et al. 2011).

Stanovené množství ředidla se nasaje do vyhřáté odměrné pipety, kde se nechá pomalu stékat po stěně sběrače do spermatu. Při této manipulaci současně otáčíme pomalu

se sběračem. Dále se provede promísení, kde nasáváme a zase vypouštíme směs do sběrače. Do spermatu se nesmí foukat. Poté se ejakulát naředí a následně se použije k inseminaci. Uchovává se při teplotě 15 °C po dobu 5–9 hodin. Zchlazuje se velice pomalu a opatrně na 15 °C. Poté 30 minut uchováme v lednici při teplotě okolo 3–5 °C, kde ředěný ejakulát ponecháme v nádobce obalené buničitou vatou. Takto uskladněné semeno lze použít do 12–24 hodin k inseminaci (Louda & Hegedüšová 2009).

3.3.2.2 Ředění dlouhodobé konzervace

Abychom mohli stanovit množství ředidla k ředění, musíme znát hodnoty hustoty, aktivity a objemu ejakulátu. V první části je odebrané sperma okamžitě ředěno po odběru do poloviny konečného objemu. Semeno se následně uloží do chladničky, aby bylo zchlazeno na 1–3 °C během 90 minut. Během této doby je doředěna druhá část ředidla, která je přidávána po kapkách v průběhu 5 minut. Během celého ředění musí být zajištěna neustále stejná teplota ředěného ředidla a semene (Louda 2009).

3.3.3. Chlazení a ekvilibrace

Chlazení je proces adaptace spermií na zpomalení metabolismu. Ten se snižuje o polovinu s každým poklesem teploty o 10 °C. Takže pokud zchladíme spermie z původních 39 °C na teplotu kolem 5 °C, tak se metabolismus spermií sníží na pouhých 8–10 % (Amann 1989). Jakmile rychle zchladíme spermie, začne redukce rozkladu fruktózy, obsahu kyslíku a syntézy ATP. Kvůli tomu spermie ztrácí zásobní energii a následně i motilitu. Proto naředěný ejakulát zchlazujeme pozvolna, aby nedošlo k chladovému šoku (Blackshaw & Salisbury 1957).

Další důležitou součástí výroby inseminačních dávek je ekvilibrace. Jde o proces mezi zchlazováním a mražením. Délka ekvilibrace označuje celkový čas, během kterého ejakulát zůstává v kontaktu s glycerolem a kryoprotektantem před zmrazením. Dle objektivní analýzy je doba ekvilibrace zásadní krok pro správné udržení motility a integrity membrány spermie nezávislé na ředidle (Leite et al. 2010). Zde dochází k tomu, že glycerol penetruje do spermatických buněk a nastavuje určitou bilanci mezi intracelulární a extracelulární koncentrací. Ekvilibrace spočívá v bilanci a koncentraci glycerolu, ale i v osmoticky aktivních komponent ředidel. Musíme zohlednit to, že glycerol proniká velice rychle do buněk, takže dostatečně dlouhé ekvilibrační období je spíše nutné pro adaptaci membrán spermií na nízké teplotě během mrazení než pro prostup glycerolu do buňky (Salomon & Maxwell 2000).

Délka ekvilibrace

Délka ekvilibrace je variabilní a trvá od 30 minut do 24 hodin před nástupem další fáze mrazení. Spousta vědců ve svých výzkumech dosáhli odlišné doby ekvilibrace.

Pánové Awad & Dhama (2001) uvádějí ve své práci dobu ekvilibrace na 2 hodiny při 5 °C. Dále uvádí, že při této délce a teplotě jsou výsledky přežitelnosti spermií ve srovnání s variantou bez použití ekvilibrace lepší (Awad 2011).

Kolektiv Muino et al. (2007) určili, že optimální délka ekvilibrace je kolem 4–18 hodin. Některé studie dokazují, že ekvilibrace trvající 18 hodin jsou nejvhodnější z hlediska zvýšení kvality vyrobených inseminačních dávek (Muiño et al. 2007). S tím souhlasí ve své publikaci i Arav et al. (2000) který uvádí, že pokud prodloužíme dobu ekvilibrace, tak se zvýší oplozovací schopnost spermií. Zde, ale vzniká problém mezi pracovní a časovou náročností u délky ekvilibrace ve vztahu k celkovým nákladům, které jsou vynaložené na výrobu jedné inseminační dávky.

I přes širokou škálu výzkumů, stále existují pochybnosti ohledně vlivu doby ekvilibrace na následnou pohyblivost spermií, jejich integritu spermatických membrán a mitochondriálních funkcí po rozmrazení. Minimální délka ekvilibrace je stále sporná. Spolurozhodující faktor u ekvilibrace je také teplotní gradient chlazení. Jeho maximalizace přežití buněk, které jsou podrobeny zmrazení a rozmrazení, vyžadují pečlivý proces mrznutí (Arav et al. 2000).

3.3.4. Konzervace ejakulátu

Zásadní vliv na konzervaci ejakulátu byl zaznamenán v roce 1960. V té době byla objevena v krevní plazmě Arktické tresky bílkovinná látka, která se označovala jako „Thermal hysteresis“. Ta umožňovala rybě, že nezmrzne i při $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Treska pouze zpomalila životní projevy a při $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ nad nulou plně oživila. Látku identifikoval vědec jménem Davenport jako antifreeze glykopeptidy, které jsou využívány ke zmrazení embryí a pohlavních buněk hospodářských zvířat. Konzervace ejakulátu hraje důležitou roli v reprodukční biologii. Musíme dbát na kvalitu inseminační dávky, jeho správné uskladnění, manipulaci a nakonec dobře provedenou inseminaci, která je základem každého chovu. Hlavním problémem rozvoje umělé inseminace u všech živočichů je schopnost uchovat životaschopnost spermií mimo organismus, po co nejdelší dobu. Konzervace ejakulátu u většiny živočišných druhů vyvolává poškození buněk. Pokud jsou buňky poškozené, snižuje se životaschopnost a fertilita spermií. Vhodný způsob ředění zabraňuje poškozování membrán spermií (Kubovičová 2011). Konzervace ejakulátu beranů je jedna z novějších metod, která se začala používat teprve nedávno. Ejakulát berana oproti ejakulátu býka je mnohem citlivější na nižší teploty a zmrazování (Stádník 2015). V posledních letech se zmrazování ejakulátů u beranů zefektivnili, a to za použití izotermických boxů nebo programovatelného zmrazovače, i když nedosahují takových aplikovaných hodnot jako u skotu (Kubovičová 2011).

Pro konzervaci inseminační dávky se nejčastěji využívají dvě metody. Skladování v tekutém stavu a kryokonzervace neboli mrazení (Allai et al. 2017).

3.3.4.1 Konzervace v tekutém stavu

Ejakulát, který se konzervuje v tekutém stavu, je určen k přímému použití. Skladování inseminační dávky je v teplotách okolo $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výhodou u této metody je, že si spermií uchováva na vysoké úrovni svoji oplozovací schopnost, a to do 48h po odběru (Louda et al. 2001). Použitím čerstvého ejakulátu je procento zabřeznutí až 75 % při intracervikální inseminaci, avšak každým dnem skladování tato schopnost klesá, a to až o 35 % (Hegedušová et al. 2012).

Nicméně Salamon et al. (1979) zjistili, že je možné dosáhnout uspokojivé oplozovací schopnosti, a to i po 8 dnech provedení inseminační metodou laparoskopickou.

3.3.4.2 Konzervace v mrazeném stavu

Kryokonzervace ejakulátu je jednou z nejhlavnějších a nejpoužívanějších metod, které se používají při konzervaci živočišných genetických zdrojů. Dále se využívají v chovu a šlechtění hospodářských zvířat. Tato konzervace nám umožňuje flexibilitu v načasování inseminace, a to i mimo říjivé období (Gordon 2004).

Dle Gordona (2004) je aktivita rozmraženého beraního spermatu při dlouhodobé konzervaci velmi dobrá, ale jeho oplozovací schopnost bývá velmi špatná až nulová. Mrazení snižuje životaschopnost spermií o 50 %. Na nízkou oplozovací schopnost po rozmražení inseminačních dávek má vliv průběh mrazení. Ejakulát zmrazujeme dostatečně pomalu, aby voda mohla opustit spermií buňky a nedošlo k poškození struktury spermií období (Gordon 2004).

Sharon (2015) tvrdí, že 20 mM "L-glutamin" a 25 mM "L-prolin" mohou být použity, jako přísada ejakulátu pro zmrazení ejakulátu beranů, protože zlepšují charakteristiku spermatu před zmrznutím a jeho následným rozmražením. Musí se brát i ohled na optimální rychlost mrazení, aby buňka přešla přes kritický tepelný rozsah, který je okolo -10 až -25 °C.

Dle Kumara et al. (2003) je kritický tepelný rozsah mnohem větší, a to v rozmezí -5 až -50 °C. Tento kritický bod později určí, zda spermií zůstane v rovnováze s extracelulárním prostředím nebo se postupně ochladí a zvýší se možnost tvorby intracelulárních ledových krystalů (Kumar et al. 2003).

Rubei et al. (2004) shledali jako kritickou teplotu -6 až -15 °C. Teplota ve vzorku se mění v závislosti na biologickém materiálu, tepelné vodivosti a geometrickém tvaru nádoby (Diller 1992).

Polge et al. (1957) navrhli využití pomalejšího mrazení rychlostí 1 až 2 °C/min mezi 5 až -15 °C, dále pak 4 až 5 °C/min mezi -15 až -79 °C.

Bhosrekar et al. (1994) také propagovali rychlost mrazení 15 °C/min v intervalu 5 až -100 °C a poté jeho přeložení do tekutého dusíku. U chlazení spermií od 4 do -120 °C o rychlosti 20 nebo 30 °C/min. Chlazení spermií přinášelo lepší motilitu a oplozovací schopnost v inseminačních dávkách (Bhosrekar et al. 1994).

Jedním z prvních, kdo využíval kontrolované chlazení inseminačních dávek, byl Ferero-Gonzalez et al. (2012). Ten dosáhl lepších kvalit zmrazeného ejakulátu pomocí rozdílných fází mrazení, které dosahovali lepších výsledků životaschopnosti spermií po rozmrazení.

Stradaioli et al. (2007) také využíval kontrolované chlazení, kde využíval teplotní gradient v první fázi z 5 °C na -5 °C rychlostí 3 °C/min, v další fázi z -5 °C na -42 °C rychlostí -40 °C/min a z -42 °C na -140 °C rychlostí -10 °C/min. Následně byly dávky vpraveny do tekutého dusíku -196 °C (Stradaioli et al. 2007).

Mechanismy, které snižují funkčnost životaschopnosti spermií při kryokonzervaci je složení lipidů a trans dvojvrstvé fosfolipidové asymetrie v plazmatické membrány spermií (Hinkovska Galcheva et al. 1989). Následné přechody během ochlazování a ohřívání

inseminačních dávek způsobují modifikaci plazmatických membrán, což vede ke špatné plodnosti. (Graham & Pars, 1992). Chladový šok vede k nadměrné intracelulární tvorbě hladiny, která je způsobena ničením permeabilitu membrán spermií pro vápník, která má za následek snížení aktivity spermií a následnou jejich nekrózu (Robertson et al. 1990). Za pomoci kryoprotektiv v kryokonzervantech způsobíme lepší přežitelnost spermií. O těchto přípravcích se dozvíme více v následující kapitole, „3.6.2 Kryoprotektiva“. Dříve se beraní sperma zmrazovalo v ampulích. Dnes je tato metoda málo používaná a zmrazování se provádí v PVC pejetách nebo ve formě pelet, které mají tvar kuliček. Rozdíl mezi těmito formami je i ve způsobu zmrazování. V pejetách se provádí zmrazování pomocí kapalného dusíku. V peletách se mrazí za pomoci suchého ledu. Na konci tohoto procesu se obě metody uloží do tekutého dusíku při teplotě skladování $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Salamon & Maxwell, 2000).

Postup zmrazování ejakulátu v pejetách

Naředěné semeno plníme do pejet o celkovém objemu $0,25\text{--}0,5\text{ cm}^3$. Následuje zmrazování pejet jednostupňovou nebo dvoustupňovou metodou zmrazování.

Jednostupňové mražení spočívá v tom, že se semeno naředí v požadovaném poměru i s požadovaným množstvím glycerinu (5–8 %). Teplota by se měla pohybovat okolo $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ekvilibrace trvá 1,5–2 hodiny při teplotě okolo $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

U dvoustupňového zmrazení se semeno po odběru převede na poloviční stupeň konečného ředění ředidlem bez glycerinu. Následně semeno zchladíme v ledničce na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde ho ponecháme 1,5–2 hodiny. Po uplynutí této doby přidáme druhou část ředidla s glycerinem. Uložení pejet je 3–4 cm nad hladinou tekutého dusíku při teplotě $-80\text{ až }-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 7–8 minut. Následně se pejety ponoří do kontejneru s tekutým dusíkem, kde teplota dosahuje $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zemánková 2017).

Postup zmrazování ejakulátu v peletách

Postup mrazení beraního spermatu v peletách při japonské metodě je velice jednoduchý a se svoji nenáročností na přístrojové vybavení neznámější na světě. Jedinou nevýhodou u této metody, je její náročnější příprava inseminační dávky a nebezpečí kontaminace. (Louda & Hegedüšová 2009).

K mražení touto cestou se používá složení: destilovaná voda 100 cm^3 , citrát sodný 2 g, glukóza bezvodá 4,8 g, vaječný žloutek 20 cm^3 a glycerín 6 cm^3 .

Ekvibrace s naředěním roztokem se provede 1,5–2 hodiny v chladničce při $5\text{--}6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získané semeno se zmrazuje na suchém ledu o teplotě $79\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně se nakapává do důlků zhotovených důlkovačem o objemu $0,1\text{--}0,3\text{ cm}^3$. Doba zmrazování je 7–8 minut. Po uplynutí zmrazovací doby se pelety přesypou pomocí nálevky, která je vychlazená tekutým dusíkem do kelímku. Ty jsou označeny na vnějším obvodu číslem berana a následně se dovnitř vkládá lísteček s číslem berana, datum odběru a počet inseminačních dávek. Kelímky se uloží do kontejneru, kde je tekutý dusík. Inseminační dávky by měli po rozmrazení dosahovat minimálně 40 % aktivity spermií (Zemánková 2017).

3.3.5. Techniky rozmrazování spermií

Inseminační dávka ve formě pelety

Inseminační dávka ve formě pelety se vloží do předeřáté zkumavky o objemu 2 cm^3 . Ta se ponoří do vodní lázně o teplotě $40\text{ }^\circ\text{C}$. Ve vodní lázni se inseminační dávka rozmrazí a následně se přidá 1 cm^3 roztoku citrátu sodného zahřátého na $39\text{ }^\circ\text{C}$. Nakonec se z odebraného vzorku provede mikroskopická zkouška aktivity spermií (Louda & Hegedúšová 2009).

Inseminační dávka ve formě pejety

Inseminační dávka ve formě pejety se rozmrazí ve vodní lázni o teplotě $39\text{ }^\circ\text{C}$. Získaný obsah ejakulátu, se promíchá prepouštěním vzduchové bubliny v pejetě. Následně se obsah vytlačí z pejety do vyhřáté zkumavky s $0,5\text{ cm}^3$ roztoku citrátu sodného. Nakonec se provede zkouška aktivity spermií pod mikroskopem (Shiple et al. 2007).

3.3.5.1 Další metody kryokonzervace

Dalšími metodami, které se používají na kryokonzervaci, jsou lyofilizace a vitrifikace, což je novější způsob mrazení (Gil et al. 2014, Arando et al. 2019).

Lyofilizace

Je metoda, kde je použitý materiál na inseminační dávku smíchán s lyofilizačním médiem a následně vysušen na hodnoty, při kterých neprobíhá biologické a chemické reakce. Spermie jsou nejprve zmrazené v tekutém dusíku. Po zmrazení následuje dvoufázová metoda sušení, která probíhá za velmi nízkého tlaku, při němž led se mění na vodní páru (Jennings 2002). Další částí je rehydratace spermií přidáním čisté vody, kde konečný objem by měl být stejný jako před přidáním lyofilizačního média. Nevýhodou při této metodě je, že spermie ztrácí, kvůli lyofilizaci svojí motilitu, což vede k použití metody ICSI (Intracytoplazmatické injekce spermií) (Olaciregui et al. 2017). Další velkou nevýhodou je možnost poškození integrity DNA vlivem oxidačního stresu (Gil et al. 2014). Výhodou u této metody je snížení nákladů na uskladnění a přepravu inseminačních dávek. Vzorky zmrazené touto metodou je možné skladovat při teplotě $4\text{ }^\circ\text{C}$ nebo při pokojové teplotě až jeden rok (Anzalone et al. 2018).

Ultra-rychlé mrazení (vitrifikace)

Dalším způsobem kryokonzervace je pomocí procesu ultra-rychlého mrazení (vitrifikace), která byla navržena jako nová technika používaná hlavně pro skladování embryí. Tato technika je založena na ultrarychlém mrazení buněk přímým ponořením do kapalného dusíku. Metoda se liší tím, že při normální cestě konvenční kryokonzervace dochází k tvorbě krystalů ledu. Vitrifikace, ale přeměňuje roztok z kapalného stavu na sklovatění stav, bez tvorby

intracelulárního ledu s možností použití volného žloutku. Také postup je rychlejší, jednodušší v aplikaci a nákladově efektivnější než konvenční kryokonzervace.

K ultra-rychlému mrazení (vitřifikace) se využívá vysoká koncentrace kryoprotektiv a ultrarychlé zmrazení přímo do tekutého dusíku. Nevýhodou je počáteční křehkost vzorku a vysoká cytotoxicita způsobena vysokými dávkami kryoprotektantů. Dalším problémem je, že spermie při vitřifikaci přichází o pohyblivost. To má za následky větší citlivost na osmotické a chemické účinky spermií. Avšak tento způsob má do budoucna velký potenciál, a to za pomoci technika ICSI (intracytoplazmatická injekce spermie), kde mohou být spermie injektované do oocytů (Jiménez-Rabadán et al. 2015).

S ohledem na nedostatek znalostí o optimální míře ředidla při ultra-rychlém mrazení (vitřifikace) byl proveden výzkum, kde se zkoumala toxicita sacharózy a glycerolu na základě různých koncentrací. V druhém výzkumu se zkoumala toxicita při ředidlech s vaječným žloutkem. Výsledky z výzkumu poukazyvaly na to, že ředidla s nižší koncentrací sacharózy a glycerolu vykazovaly vyšší procento pohyblivých spermií, životaschopných spermií a spermií s intaktním akrozomem než s vyšší koncentrací. Dále bylo zjištěno synergický účinek mezi cukry a kryoprotektanty. To by mohlo vést ke snížení koncentrace použité propustné kryoprotektory, čímž by se snížil negativní účinky na spermie během vitřifikace.

Na základě celkových výsledků bylo zjištěno, že ředidla založená na kombinaci glycerolu a sacharózy nejsou nijak moc užitečné pro vitřifikaci. Avšak vitřifikace za pomoci ředidel s vaječným žloutkem nabízí slibné využití do budoucna (Arando et al. 2019).

3.4. Modifikace konvenčních ředidel za účelem zlepšení životaschopnosti spermií

Úpravou konvenčních ředidel za účelem zlepšení se zajímá spousta odborníků. Avšak nikdo ještě nevynalezl žádné ředidlo, které by stoprocentně uchovalo životaschopnost spermií, zejména u beranů. Poslední roky, je tomuto zlepšení a nahrazení věnováno mnohým více úsilím a spousta výzkumů je na dobré cestě k nalezení lepšího konvenčního ředidla.

3.4.1. Aditivní látky v ředidlech

Aditivní látky se do ředidel přidávají, jelikož chrání spermie během procesu chlazení a zmrazování. To je způsobováno vysokou koncentrací polynenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně spermií berana (Jones & Mann 1976). Kvůli tomu jsou buňky tolik citlivé na chladový šok i na peroxidaci lipidů v přítomnosti reaktivních forem kyslíku (Holt 2000). Pro správné udržení fyziologické činnosti je důležitá rovnováha mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a její recyklací kolem spermií. Jakákoliv nerovnováha vede k narušení funkce spermií prostřednictvím oxidačního stresu, která vede ke ztrátě aktivity spermií při dlouhodobém skladování (Aitken & Gibb 2016). Spermie berana produkují během zpracování velké množství peroxidu vodíku, což má za následek snížení pohyblivosti po jejich rozmrazení. (Maia et al. 2014). Abychom dosáhli úspěšnému skladování, musí se zpomalit buněčnou

metabolitu spermií a tím se prodlouží jejich životaschopnost (Aitken & Gibb 2016). K dosažení zlepšení jejich kvality jsou do ředidel přidávány různé aditivní látky a kryoprotektanty. Ty jsou následně používány pro lepší proces chlazení inseminačních dávek (Fiser 1991).

Ředidla jsou navržena na základě empiricky ověřených dat, chránit a udržovat spermie při skladování a zpracování spermatu. Většina ředidel je založena na mléce nebo na vaječném žloutku. Avšak použití ředidel se složkou živočišného původu vede k velkému riziku kontaminace (Bergeron & Manjunath 2006). S tímto problémem souhlasí i řada dalších odborníků. Dle výzkumu Ptáček et al. (2019) byly zjištěny nežádoucí účinky vaječného žloutku na plodnost kryokonzervovaného spermatu u beranů. Zjistilo se, že žloutek může svou produkcí metabolitů a toxinů způsobovat snížení kvality spermatu, což může svojí přítomností v ředidlech způsobovat snížení motility a dýchání spermií (Ptáček et al. 2019).

V dnešním moderním světě se pokouší oprostít se od těchto živočišných přísad a nahradit je chemicky definovaným mrazicím médiem, které by dokázali zlepšit reprodukovatelnější výsledky. Vývoj tohoto vhodného média pro sperma berana zůstává stále v nedohledu (Fukui et al. 2008).

3.4.1.1 Antioxidanty

Ve výzkumu o zlepšení parametrů kvality spermií byly použité ředidla s použitím antioxidantů, které i v malých koncentracích, zlepšují funkci spermií během konzervace (Mara et al. 2005). Každá spermie má antioxidantní obranný systém, ale při ředění s antioxidanty tento obranný systém může být snížen (Bucak et al. 2012).

Enzymatické antioxidanty chrání buňky před reaktivní formou kyslíku. Ty udržují spermii ve správné fyziologické činnosti (Baumber et al. 2000). Hlavním aktivním antioxidantem v čerstvém spermatu je enzym superoxid dismutáza (Martí et al. 2008). Dalšími antioxidanty jsou kataláza, glutathionperoxidáza a glutathionreduktáza. Patří sem i neenzymatické antioxidanty jako jsou methionin, kyselina askorbová a α -tokoferol (Bucak et al. 2012).

Fang et al. (2015) zkoumali antioxidantní účinky astaxanthinu, který je považován za jeden z nejsilnějších antioxidantů v přírodě. Při výzkumu zjistili, že během konzervace suplementace se zlepšila životaschopnost uloženého spermatu.

3.4.1.2 Enzymy

Enzymatické antioxidanty patří do makromolekul, které chrání buňky před přítomností reaktivních forem kyslíku (Barreiros et al. 2006). Hlavním aktivním enzymem v čerstvém spermatu je enzym superoxid dismutáza (Martí et al. 2008). Antioxidantní kapacita tohoto enzymu se mění jak s kvalitou semene, tak i během procesu zmrazování a rozmrazování (Bucak et al. 2008). Mnoho autorů poukázvalo na to, že spermie po ochlazení, mají předčasné kapacity a to má za následek nízkou plodnost. Proto by se nemělo zapomínat na hodnocení motility spermií a mitochondriální funkci spermií (Câmara et al. 2011a). K hodnocení mitochondriálních funkcí se využívá Clarkovy elektrody. Pomocí toho se měří rozpuštění kyslík.

Měření je způsobeno enzymy, již jsou přírodními katalyzátory a umožňují přeměnu substrátu na produkty. Kvůli tomu můžeme měřit úbytek kyslíku nebo nárůst (Martí et al. 2008).

Forouzanfar et al. (2013) uvedl, že přidáním 800 U / ml nebo 150 μ M enzymu superoxid dismutáza k ředidlu poskytlo větší ochranu buňkám spermií berana během chlazení.

Silva et al. (2011) přišli na to, že přidáním 100 U / ml enzymu superoxid dismutáza vedlo ke zlepšení integrity akrozomu a lepší ochraně mitochondrií spermií.

Další významný enzym je kataláza, která funguje jako katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Používá se ke zlepšení antioxidační kapacity spermií (Maxwell & Stojavone, 1996). Maia (2006) zjistila, že bylo vyšší procento intaktní plazmy a akrozomových membrán, když bylo sperma berana kryokonzervováno pomocí ředidel, které obsahovaly vaječný žloutek Tris-hydroxymethylaminometan (Tris) obsahující 50 μ g/ml katalázy. V dalších pokusech se přišlo na to, že zahrnutí 100 a 200 U/ml katalázy do ředidel může zabránit škodlivým účinkům chlazení na celkovou motilitu spermií a umožnit větší procento přežití spermií během skladování kapaliny při 5 °C. Ředidla obsahující nad 200 U/ml katalázy měli však toxický účinek pro spermie

Dalšími enzymy pro řízení koncentrací buněčných peroxidů jsou, glutathionperoxidaza a glutathionreduktáza. Patří sem i neenzymatické antioxidanty jako jsou methionin, kyselina askorbová a α -tokoferol (Bucak et al. 2012). Zde však Silva et al. (2011) při svých výzkumech nezjistili žádné lepší účinky při přidání glutathionperoxidaza. S tím souhlasil i při svých výzkumech Bucak et al. (2008), kde také nedospěli k žádným pozitivním účinkům.

3.4.1.3 Vitamíny

Abychom zachovali kvalitu spermií, nesmíme zapomenout do média pro uchování spermatu přidat vitamíny. Mezi nejdůležitějšími vitamíny patří alfa-tokoferol, vitamín E, trolox, kyselina askorbová a vitamín B12. Vitamín alfa-tokoferol je jeden z antioxidantů spermií, který se hojně vyskytuje v membráně spermií (Aitken 1995). Vitamín E je lipofilní antioxidant, ten chrání polynenasycené mastné kyseliny v tkáních před peroxidací.

Výzkum Anghel et al. (2010), Azawi & Hussein (2013) a AminiPour et al. (2013) uvádí, že přidání vitamínu E zvýšilo životaschopnost a motilitu spermií, které byly uchovávány při teplotě 5 °C po dobu 120 hodin a po kryokonzervaci. S tímto souhlasil i Kheradmand et al. (2006) ve svém výzkumu, kde přidáním 1–2 mg vitamínu E do pufru vaječného žloutku, zlepšilo motilitu a integritu spermatické membrány v chlazeném semeni berana.

Vitamín trolox je analog vitamínu E a je ve vodě rozpustný. Je to [antioxidant](#) jako vitamín E a používá se v biologických nebo biochemických aplikacích ke snížení oxidačního stresu nebo poškození. Tento analog vitamínu E měl negativní výsledky ohledně kvality spermií během kapalného skladování ejakulátu. Avšak po rozmrazení kryokonzervovaných spermií se zvýšila integrita plazmatické membrány i motilita a životaschopnost spermií (Silva et al. 2013).

Maia et al. (2007) uvádějí, že přípravek Trolox v koncentracích od 50 do 100 μ M zvyšoval pohyblivost spermií po rozmrazení.

Dalším nejdůležitějším vitamínem je kyselina askorbová, neboli vitamín C. Tento vitamín udržuje genetickou integritu spermií tím, že zabraňuje oxidačnímu poškození DNA spermií. (Sonmez et al. 2005).

Fraga et al. (1991). Azawi & Hussein (2013) zjistili zlepšení životaschopnosti a motility spermatu v ředidle na bázi Tris, který obsahoval vitamín C o koncentraci 0,9 mg / ml.

Sanchez-Partida et al. (1997) uvádějí, že zahrnutí kyseliny askorbové do ředidla na bázi Tris při 50 nebo 100 mM snížilo procento pohyblivých spermií po rozmrazení ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Dalším vitamínem je vitamín B12, který slouží jako koenzym v biochemických reakcích, jako je syntéza methioninu a metabolismus rozvětvených aminokyselin (Juanchi 2000).

Asadpour et al. (2012) přišli na to, že u ředidla na bázi citrátu Tris doplněný vitamínem B12 o koncentraci 2 mg / ml zlepšili biochemické reakce.

3.4.1.4 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou neenzymatické lapače, které mají antioxidační vlastnosti a jsou v semenné plazmě. Nejdůležitější aminokyseliny, které se přidávají do ředidel, jsou: Taurin, hypotaurin, prolin, glutamin, glycin, histidin a cystein (Sánchez -Partida et al. 1997). Ty snižují fragmentaci DNA spermie a zlepšují pohyblivost, životaschopnost a integritu membrány spermií po rozmrazení. Jednou z prvních zmiňovaných aminokyselin je cystein, který chrání spermie před toxickými metabolity kyslíku vyvolanými peroxidací lipidů (Bucak et al. 2009).

Uysal & Bucak (2007) uvádějí, že aminokyselina cystein při 10 mM chrání vlastnosti spermií po procesu zmrazení a rozmrazení ve větší míře než jiné koncentrace. S tímto souhlasí i Bucak et al. (2008), který přidal cystein v koncentraci 5 mM do ředidla na bázi Tris suplementovaným a do druhého ředidla na bázi sojového lecitinu přidal 10 mM cysteinu. Obě zkoumaná ředidla vedla k větší pohyblivosti spermií po rozmrazení

Další významnou aminokyselinou je methionin, kde Bucak et al. (2012) zjistili, že přidáním 1, 2 a 4 mM methionin zlepšuje motilitu a životaschopnost spermií během skladování spermií v kapalině.

Glutamin je aminokyselina, která má příznivý vliv na zlepšení motility a životaschopnosti během mrazení. Bucak et al. (2008) uvedli, že přidáním 5 mM glutaminu se zlepšují výsledky.

Aminokyselina Taurin, která je přidaná do ředidla, zlepšuje kvalitu chlazení, pohyblivost po rozmrazení a životaschopnost. (Rather et al. 2016).

3.4.1.5 Rostlinné extráty

Rostlinné výtažky z různých druhů rostlin vedlo v několika studiích ke zlepšení kvality spermatu (Mehdipour et al. 2016).

Například hřebíček, jenž je bohatý na kyselinu fenolovou, flavonolovou, glukosidy, fenolové těkavé oleje a taniny. Tyto sloučeniny mají schopnost fungovat jako lapač volných radikálů a jako chelátor kovů (Motlagh et al. 2014).

Baghshahi et al. (2014) uvedli, že přidáním hřebíčkových pupenů k ředidlu na bázi vaječného žloutku Tris o koncentraci 35 a 75 µg / ml, mělo za následek lepší pohyblivost spermií po ochlazení a zmrazení a rozmrazení.

Extrát z rozmarýnu dle práce Motlagh et al. (2014) vedla ke zlepšení celkové motility a funkčnosti plazmatické membrány zmrazeného spermatu, a to přidáním ředidla na bázi sójového lecitinu, který byl doplněn 4 % a 6 % vodního extraktu z rozmarýnu. Studie se týkala nahrazení živočišných ředidel, které by snižovali nežádoucí účinky. Při výzkumu byli použité syntetické ředidla bez živočišných látek na bázi BSA a AndroMeda za přítomnosti sojového lecitinu a ředidla na bázi Tris, který obsahoval vaječný žloutek. Z výsledků bylo zjištěno, že se míra zabřeznutí nelišila u obou ředidel (Tris 64,5 %, BSA 58 % a AndroMed 56,7%). Míra bahnění byla u všech pozorovaných ředidel byla totožná. U ředidla Tris byly hodnoty kolem 64 % a na bázi AndroMed byly hodnoty kolem 57 % a u BSA 55 %. U všech ředidel dosahovala plodnost podobných výsledků. Pozitivní výsledky vedli k závěru, že by šlo odstranit všechny zvířecí ředidla včetně vaječného žloutku a mléka za účelem eliminaci hygienických rizik. Dále bylo prokázáno, že živočišní ředidla snižují integritu akrozomu a životaschopnost ejakulátu po rozmrazení (Gil et al. 2010). Ředidla na bázi sójových bobů nedosahoval pozitivních výsledků u plodnosti při cervikální inseminaci, kde hodnoty byly 20–30 %. Avšak u metody intrauterinní byly výsledky okolo 60–80 %. Výzkum došel k závěru, že se ředidla na bázi živočišného média dá nahradit ředidlem AndroMed, který lze použít pro intrauterinní Inseminaci (Motlagh et al. 2014.)

Mehdipour et al. (2016) zjistili, že přidáním extraktu ze zeleného čaje k ředidlu sójového lecitinu chrání spermie před poškozením, které je způsobováno oxidačním stresem během kryokonzervace.

Provedené studie od (Allai et al. 2017) uvádějí, že přidáním arganového oleje a kaktusového oleje v malém množství k ředidlu vaječného žloutku nebo k odstředěnému mléku Tris mělo za následek zvýšení motility spermií a jejich progresivního pohybu, životaschopnosti i integritu membrán. Nevýhodou bylo, že se snížila fragmentace DNA v semenu a peroxidace lipidů.

Kyselina gallová a karnosová zlepšují kvalitu zmrazených a rozmražených spermií berana. V této studii byli zjišťováni pozitivní účinky kyseliny gallové a karnosové, které by měly zlepšit kvalitu zmrazených a rozmražených spermií. Tyto látky byly získány z lusků rohovníku a extraktu z rozmarýnu. Výzkum byl prováděn na ředidlu na bázi Tris o obsahu 0,05 nebo 2 mM kyseliny gallové a 0,05 nebo 0,2 mM kyseliny karnosové. Dle výzkumu se zjistilo, že spermie doplněna 2 mM kyseliny gallové měly větší celkovou pohyblivost než kontrolní spermie. Suplementace 0,05 kyseliny karnosové vedla k nejlepší mitochondriální funkci zmrazených a rozmražených spermií berana. Dále se studie zaměřila na sloučení obou studií a stanovila pozitivní účinky na plodnost zmrazených a rozmražených spermií (Bucak et al. 2008).

3.4.1.6 Další sloučeniny

Sloučeniny resveratrolu nebo kvercetinu, které jsou neflavonoidové a flavonoidní polyfenoly se silnou antioxidační aktivitou. (Stojanovic et al. 2001). Silva et al. (2012) přidali sloučeninu resveratrolu nebo kvercetinu (5–20 µg / ml) k ředidlu na bázi vaječného žloutku Tris. Ten měl za následek zlepšení mitochondriální membrány a celkové životaschopnosti spermií.

Anel et al. (1984) uvádí, že použití sloučeniny kofeinu má za následek zlepšení stimulace motility a zlepšení kvality spermatu. Soeparna et al. (2011) uvedli, že ředidla vaječného žloutku Tris doplněný o 4 mM kofeinu mělo za následek zlepšení kvality spermatu. Špaleková et al. (2014) uvádějí, že kofein má pozitivní vliv také na pohyblivost spermií v chladu.

Želatina je další sloučeninou, co zlepšuje kvalitu ejakulátu. Meque et al. (2005) ve své práci srovnávali různé koncentrace želatiny (0,5 %, 1 %, 2% a 4%) v ředidle na bázi sójového mléka pro skladování kapaliny spermatu. Zjistili, že nejúčinnější koncentrace želatiny je 0,5%.

Nejpoužívanějším ředidlem ke konzervaci spermatu je mléko. U tohoto konzervantu však fertilizační schopnost spermií klesá a to zhruba po 8-10 hodinách skladování. Ke zvýšení fertilizaci zkusili vědci Nagy et al. (2002) a López-Gatius et al. (2005) použít želatinu, která by měla zvýšit viskozitu média a snížit pohyblivost spermií. Metoda byla poprvé zkoušena v první polovině 20. století v nynějším Rusku. Ve své novější studii pánové Nagy a Lopez-Gatius provedli tuto metodu u králíků, kde došli k uspokojivým výsledkům ohledně zachování fertilizační schopnosti u spermií po dobu 72 hodin. Dle Nagy et al. (2002) a López-Gatius et al. (2005) uvádějí, že by pevné skladování spermatu v želatinové podobě mohlo vyřešit problémy ohledně beraního spermatu. Studie zaměřená na přidání želatiny do standartního ředidel mléka byla navržena, tak aby se zjistili přínosy při skladování ovčího spermatu při 15°C. Posuzování bylo hlavně na motilitu a integritu membrán spermií, a to až do 2 dnů. Dále se posuzovala kapacita penetrace in-vitro po 24h skladování inseminační dávky. Při pokusu bylo sperma naředěno ve dvou ředidlech. První použité ředidlo bylo CONTROL a druhým ředidlem byl GEL, ke kterému byla přidána želatina. V první studii, kde se posuzovala motilita a integrita spermií, proběhli tři měření a to po 2, 24 a 48 hodinách skladování. Ve druhé studii se posuzovala kapacita penetrace in vitro po dobu 2 až 24 hodinách v ředidle CONTROL. Ve druhém ředidle GEL (doplněném 1,5 g/100 ml želatiny) proběhlo posouzení až po 24 hodin v ředidle.

Z výsledků u prvního pokusu vyplynulo, že ředidlo se želatinou mělo pozitivnější vliv než ředidlo CONTROL. V prvním měření, které proběhlo po 2 hodinách, se hodnoty nelišili u pohyblivosti spermií, ale u integrity membrán byli pozorované první odlišné hodnoty, které byli lepší u ředidla GEL. Z dalších výsledků vyplynulo, že motilita a integrita spermií byla u ředidla GEL zachována během skladování až do 48hodin. U druhého ředidla CONTROL byl pozorován pokles motility a integrity spermií už po 24 hodinách skladování.

U druhého pozorování se také prokázali lepší výsledky u ředidla Gel a to při schopnosti pronikání ovčích spermií do jehněčích oocytů in vitro po 24 hodinách skladování ejakulátu.

Největší otázkou v této studii je, jak přesně želatina zlepšuje životaschopnost spermií. Ví se, že spermie v kapalném stavu podléhají sedimentaci, která způsobuje nejenom výkyvy

ph, ale taky zvyšuje koncentraci toxických metabolických produktů. Předpokládá se, že skladování v pevném stavu zabraňuje této sedimentaci a imobilizaci spermií, kde dochází ke snížení metabolických nároků ohledně pohybu spermií, což má následně pozitivní vliv na jejich delší fertilní život. Výsledky v tomto výzkumu ukazují, že skladování v pevném stavu při 15 °C zlepšuje přežití spermií *in vitro* (Nagy et al. 2002).

Kanthaxanthin je další ze sloučenin nacházející se v rostlinách, zelených řasách atd. Souza et al. (2017) přidali 10 a 25 μM kanthaxanthinu do ředidla na bázi Tris, který obsahuje vaječní žloutek, který byl použit pro kryokonzervaci spermatu a v konečném výsledku měl za zlepšení ochranu spermatu při kinetických změnách po inkubaci při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin.

3.4.1.7 Semenná plazma

Semenná plazma je komplex složen z mnoha organických a anorganických složek. Obsahují bílkoviny, enzymy a neenzymové antioxidanty, které zlepšují ochranu spermií před oxidačním stresem a znemožňují kapacitaci spermií (van Overveld et al. 2000). Při přidání semenné plazmy do ředidla byly zjištěné pozitivní výsledky zlepšující vlastnosti kapalných, zmrazených i rozmrazených spermií a to: pohyblivost, životaschopnost, integrita akrozomu a mitochondriální aktivita (Graham 1994). Největší složkou v plazmě je však protein a je považován za hlavní modulátor funkcí spermií. Jedním ze zkoumaných proteinů byl protein: zinek-2-alfa glykoprotein, který slouží jako aktivátor a intracelulární modulátor motility spermií (Brokaw et al. 1987).

Soleilhavoup et al. (2014) testovali přidáním tohoto proteinu do semenné plazmy, kde přidali 1 μg/ml zinek-2-alfa glykoprotein. Výzkum prokázal zvýšení motility a rychlosti spermií v den odběru. Avšak po 24h skladování byl tento stimulační účinek škodlivý na konzervaci spermií

Dle výzkumu Vishwanath et al. (2003) a Moore et al. (2017) bylo zjištěno, že 5% semenné plazmy zvýšila motilitu spermií až o 40% a rychlost spermií byla mnohem lepší. Dále ve studii přišli na to, že motilita spermií je regulována změnami ve složení semenné plazmy. Také zjistili, že je možné používat semennou plazmu z předchozího ejakulátu k doředení jiného ejakulátu od stejného jedince nebo od jiného.

V práci dle Mata-Campuzano et al. (2015a) uvádějí, že přidání semenné plazmy při 20 % a 40 % koncentracích mělo ochranný účinek na pohyblivost spermií, které byly skladované v kapalině po 24 hodinách.

3.4.1.8 Cukr

Cukr má několik funkcí pro spermie, ale tou nejdůležitější je, že slouží jako energetický substrát pro ejakulát během inkubace (Fukuhara & Nishikawa 1973). Také udržují osmotickou rovnováhu ředidel (Aboagla & Terada 2003). Cukry, které se používají na ředění, jsou monosacharidy (glukóza, galaktóza a fruktóza), disacharidy (sacharóza, trehalóza) a trisacharidy (rafinóza).

Disacharid trehalóza byl používán v mnoha experimentech, kde došli k závěru, že je vhodný pro zachování motility spermií před zmrazením a po rozmrazení.

Bucak et al. (2007) prokázali, že použitím ředidla na bázi Tris 50 nebo 100 mM trehalózy obsahující glycerol (5 %) a vaječný žloutek (5%) má za následek zlepšení motility, životaschopnosti a integrity membrány.

Trisacharid rafinace hraje důležitou roli při snížení tvorby ledových krystalků během procesu mražení (Agca et al. 2002).

Bucak et al. (2013) uvedli, že 10mM rafinózy v ředidle založeném na Tris si u zmrazených a rozmrazených spermií udržuje aktivitu spermií i jejich životaschopnost, mitochondriální aktivitu a integritu akrozomu.

Ve výzkumu dle De Leeuw et al. (1993) se výzkumníci snažili nahradit živočišné ředidlo za pomocí cukernatých aditiv. První médium, které bylo použito na výzkum, obsahovalo 200 mM sacharózy a 2,8 mM glukózy. Druhé médium obsahovalo pouze disacharidy a to sacharózu, trehalózu, maltózu a laktózu. Kde každý disacharidy obsahoval v ředidle 75 mM. Třetí médium zahrnovalo směs monosacharidů (50 mM glukóza, 20 mM fruktóza a 20 mM galaktóza) a stejné disacharidy jako ve druhém vzorku. Vzorky semene berana naředené ve zmíněných médiích byly chlazeny na 5 °C po dobu 1 hodiny a znovu zahřáté až na 37 °C. Přidání monosacharidů k ředidlu nevedlo k lepšímu zachování motility nebo životaschopnosti po ochlazení, avšak spotřeba kyslíku byla nižší než u suplementů s disacharidy. Suplementy disacharidů kromě sacharózy také nezvýšili životaschopnost. Zjistilo se, že disacharidy mají příznivý účinek na přežití chlazených spermií, a to kvůli stabilizaci membránové dvojvrstvy. (De Leeuw et al. 1993; Lins et al. 2004). Na základě těchto výsledků autoři učinili doporučení, že hodnocení stavu kapacity a markerů, je dobrý pro odhalení rozdílů mezi vzorky spermatu.

3.4.2. Kryoprotektiva

Kryoprotektiva jsou látky, které chrání buňky během procesu kryokonzervace (Singh et al. 1995). Nejznámějším kryoprotektivem je glycerol. Nejlepší koncentrace, která by se měla přidávat do ředidla je mezi 4–7 %. Vyšší koncentrace než 6–7 % jsou škodlivé pro přežití spermií. (Salamon & Maxwell 2000).

Podle několika studií, které se zajímaly o koncentraci glycerolu v ředidlech, došli k závěru, že nejlepší je přidat glycerol o koncentraci 3–7 % v ředidlech obsahujících 5–20 % vaječného žloutku. To mělo za výsledek zvýšenou motilitu spermií (44–85 %) po rozmrazení (Foote El-Alamy et al. 2001).

Gil et al. (2011) zjistili ve svém výzkumu, že přidavkem 5 % vaječného žloutku a 2 % glycerolu do komerčního ředidla typu INRA96, který je na bázi mléka, tak i do ředidla UHT mléka prodloužili životaschopnost spermií o více jak 48 hodin

Byly zkoumány různé kryoprotektivní látky, jako je dimethylsulfoxid (DMSO), ethylenglykol, albumin, nízkomolekulární polyoly, polymerní sloučeniny, povrchově aktivní látky, cukry různých typů a aminokyseliny, ale žádný nedosahovali lepších výsledků než glycerol (Salamona & Maxwella 2000).

Jedním ze zkoumaných kryprotektivních látek, který se přibližoval k podobným hodnotám glycerolu, byl ethylenglykol. Ve výzkumu dle Silva et al. (2012), kde srovnával jeho účinky s dalšími kryprotektivními látkami v naředěném ředidle obsahující vaječní žloutek, byli použité tyto látky: glycerol (5 %), ethylenglykol (3 % nebo 5 %) a acetamid (3 % nebo 5 %). Výsledky poukázali podobné účinky ethylenglykolu jako má glycerol, avšak žádný z pokusu o překonání vlastností glycerolu nebyl úspěšný.

3.4.3. Ředidla obsahující vaječní žloutek

Vaječní žloutek v ředidle, chrání spermie před škodlivými účinky studeného šoku, zachovává motilitu spermií. Také snižuje ztrátu akrozomiálních enzymů a udržuje mitochondriální membrány spermií (Holt 2000). Začleněním vaječného žloutku do média můžeme snížit koncentraci glycerolu. Musíme dbát na to, že zvýšení této koncentrace neznamena, že se zvýší ochrana motility spermií (Salamon & Maxwell 2000).

Gil et al. (2003) se pokoušeli ve svém výzkumu ověřit tuto skutečnost. Ve svém výzkumu přišli na to, že zvýšením koncentrace vaječného žloutku (o více než 5 %) v mléčném nástavci nezlepšilo motilitu po rozmrazení. Je to zapříčiněno tím, že vaječní žloutek je živočišného původu a může představovat potenciální zdroj mikrobiologických kontaminantů, které zabraňují dosáhnutí lepším výsledkům. Jednou z alternativ u tohoto je média může být práškový vaječný žloutek, který je při tomto procesu pasterizován, což má za následek zničení bakterií (García et al. 2017). O tomto pokusu se zajímal Jiménez Marco et al. (2004), který srovnával čerstvý vaječný žloutek a vaječný žloutek v prášku s 10 %, 15 % a 20 % v ředidlech pro kryokonzervaci a stanovili bakteriální kontaminaci v ředidlech a kvalitu beraního spermatu po zmrazení a rozmrazení. V závěru došel k výsledkům, že práškový vaječný žloutek vedl k lepším výsledkům než u čerstvého vaječného žloutku.

Jedním z dalších pokusů ohledně nejlepšího vaječného média byli při srovnávání krůtího a slepičího vaječného žloutku. Agca et al. (2002) přišli na to, že vyšší pohyblivost, životaschopnost a akrozomální integritu spermií dosahovali u krůtího vaječného žloutku.

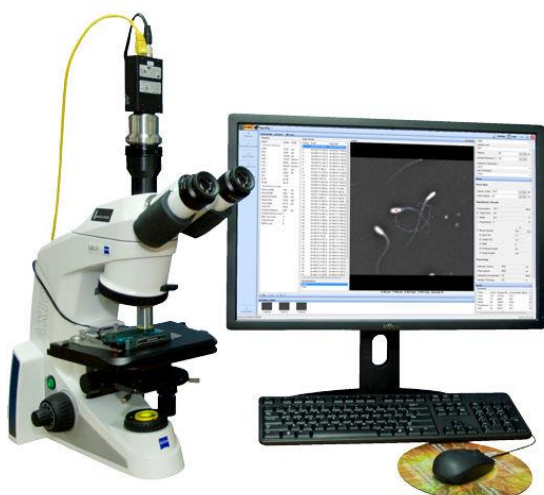
Leboeuf et al. (2000) zjistili, že je výhodnější brát vaječní žloutek od těžkých plemen kůra než od plemen patřící do kategorie lehké (Leboeuf et al. 2000).

3.5. Specializované metody in-vitro testů u fertilizační schopnosti spermií.

Specializovaná vyšetření nejsou nezbytná pro rutinní analýzu spermatu, ale za určitých okolností mohou přispět ke klinické diagnostice. Vyšetření ejakulátu se provádí pomocí počítačových metod: turbidimetricky, 46 spektrofotometricky, fotomikrografickými metodami. Dalšími přístroji používané, jsou přístroje zahrnuté do společného názvu CASA (Computer – Assisted Semen Analysis) a přístroje na bázi laserových spektroskopů, které jsou využívány na experimentální používání (Lukáč et al. 2009). K nejmodernějším přístrojům používaným na specializované vyšetření patří průtoková cytometrie a CASA. Tyto metody nejvíce přispěly k zlepšení vyšetření motility, morfologických znaků a stavu akrozomu spermií (Foote 2002).

3.5.1. Vyšetření počítačovou analýzou ejakulátu CASA

Vyšetření počítačovou analýzou ejakulátu (CASA) bylo vyvinuto v 70. letech. Při této metodě se analyzují pořízené snímky vzorku ejakulátu pomocí speciálního mikroskopu s videokamerou (Dott et al. 1979). Existuje mnoho typu přístrojů CASA, jejichž rozdíl najdeme v hardwaru a softwaru. K nejrozšířenějším přístrojům, jsou přístroje pod označením HTM (Hamilton Thorn Motility Analyzer) v různých verzích, z nich nejrozšířenější, je verze systému IVOS-HTM (obrázek 2) či HTM-CEROS (obrázek 3) (Crha a Žáková, 2003). Dalším velice častým přístrojem je přístroj CellSoft, který je velice vyhledáván, kvůli své jednoduchosti a finanční nenáročnosti. Přístroj označovaný jako Sperm Quality Analyzer (SQA) (obrázek 4) patří taky do skupiny CASA, avšak se spíše používá v humánní medicíně (Lukáč et al. 2009).



Obrázek 2 Hamilton thorne ivos 2
(zdroj medicalexpo.com).



Obrázek 3 Hamilton thorne ceros 2
(zdroj medicalexpo.com).



Obrázek 4 Sperm Quality Analyzer (SQA) (zdroj medicalexpo.com).

Dle Crha & Žáková (2003) uvádějí ve svých výzkumech, že pravdivost výsledků vyšetření CASA se vedou neustále odborné debaty. Při těžších patologiích spermatu je přesnost vyšetření menší, a to platí i při vysokém počtu spermií. Přesnost koncentrace je ovlivněna použitým typem komůrky nebo ředěním. S touto přístrojovou technologií bylo již dosaženo mnoha úspěšných výsledků. Většina těchto výsledků však byla dosažena u lidí, kdežto ve veterinární medicíně stále zůstává spousta otazníků (Verstegen et al. 2002).

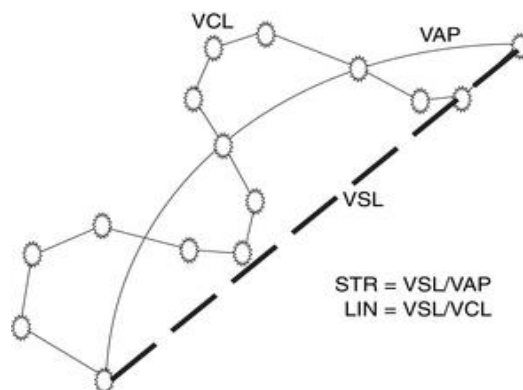
Jak už bylo řečeno pomocí CASA lze zkoumat koncentraci a dále motilitu, fragmentaci DNA vitalitu, akrozomální reakci a morfologii spermií (Amann & Katz 2004). Metoda počítačovou analýzou je přesnější než hodnocení člověkem, jelikož během krátké doby dokáže analyzovat velké množství spermií (Tsakmakidis 2010).

Přístroj CASA se skládá ze speciálního zařízení s fázovým mikroskopem, video kamerou a rekordérem, monitorem, počítačem a tiskárnou. Vzorek spermatu se vkládá do speciální komůrky a obraz je následně digitalizován. Změny jsou v obrazu analyzovány a propočítávány do výstupních veličin (Crha & Žáková 2003). Vzorek ejakulátu se hodnotí v kapce přeneseném na speciálním podložním sklíčku, které je na vyhřátém stolku. Následně se sklíčko upevní na předeřtý vysutý stolek, kde proběhne samotná analýza. Systémy přístrojů mají speciální zabudovaný mikroskopy, s využitím širokopásovým osvětlením ve viditelném spektru i negativním fázovým kontrastem. Všechny snímky jsou zachycovány pomocí snímače CCD v půlsekundových periodách a s předem stanovenou frekvencí snímače. To je následně regulováno pomocí impulsu osvětlení stroboskopem nebo fotoaparátem. Pomocí přístroje můžeme krásně vidět i trajektorii spermií, kde detekujeme hlavu spermie pomocí rozměrů, jasů a počtem pixelu. Avšak tyto parametry nám mohou ovlivnit stanovení koncentrace, a proto se používají různé algoritmy pro rozlišení spermií, které kříží trajektorie pohybu. Další algoritmy pro správné určování jsou u spermií, které během pozorování vystupují nebo vstupují do vzorného pole. Vyhodnocení objemu je dáno zvětšením a hloubkou komory použité pro analýzu. Vzorce používané pro tyto parametry nám vyhodnocují křivočarou rychlost, průměrnou rychlost, přímočarou rychlost, amplitudu laterálního posunu hlavy, linearita křivočaré dráhy, přímou průměrné cesty a kmitočtovou frekvenci (Brito et al. 2016).

Analýza většinou probíhá při vlnové délce 660 nm nebo 882 nm. Zařízení si samo vybírá pole pro analýzu nebo se toto pole může určit ručně. Vstupní parametry v přístroji jsou výrobcem nastavené, avšak je možné tyto parametry vlastnoručně upravit. Nesmíme zapomenout při každém vyhodnocení zadat i výstupní parametry. Délka analýzy je dána dle hodnotících

kritérií, ale trvá přibližně 3 minuty. Výsledky jsou následně přepočítány na celý objem vzorku a následně na objem ejakulátu. Přístroj nám je schopný i vypočítat potřebný množství ejakulátu na kvalitní inseminační dávku (Lukáč et al., 2009). Jedinou nevýhodou je pořizovací cena a následná standardizace parametrů přístroje pro daný druh. Další možností tohoto přístroje je pořizovací frekvence snímku, která je mezi 15–60 Hz (Mortimer 1994).

Také je schopna zanalyzovat motilitu spermie a vyhodnotit křivku rychlosti spermií (Verstegen et al. 2002).



Obrázek 5 Hodnoty naměřené pomocí CASA (Verstegen a kol. 2002).

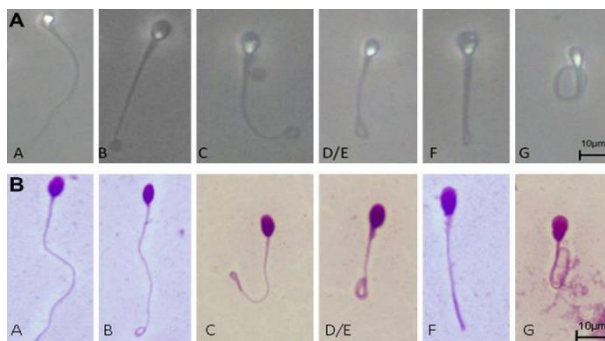
Na obrázku 5 vidíme tři různé trajektorie. První hodnota označená VCL je označena, jako křivočará rychlost. Je to průměrná rychlost měřená na dráze, kterou spermie urazí z bodu A do bodu B, včetně všech odchylek jejího pohybu. Druhá trajektorie označena zkratkou VAP představuje průměrnou rychlost. Poslední trajektorie VSL je označována, jako průměrná přímočará rychlost. Všechny parametry se měří v $\mu\text{m/s}$. Pomocí těchto údajů vypočítáme přímou trajektorie STR ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$ v %) a linearitu LIN ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$ v %) (Verstegen et al. 2002).

Další výhodou u přístroje CASA je pozorování morfologie spermií, jelikož lze analyzovat parametry, u kterých by to nebylo manuálně možné. Při pozorování vzorku musíme udržovat teplotu $37\text{ }^\circ\text{C}$, aby spermie zůstaly na živu (Olivares et al. 2017). Dále Olivares et al. (2017) při svém výzkumu s beraním ejakulátem měli parametry přístroje nastavené na 25 snímků za sekundu a zvětšení mikroskopu $\times 100$. Počítač prováděl rozbor na ploše $24 \times 24\text{ mm}$ ve vzorku o objemu $10\text{ }\mu\text{l}$. Plocha objektů, kterou počítač vyhodnotí jako hlavičku spermie, byla $18\text{--}60\text{ }\mu\text{m}^2$. Dle rychlosti křivkového pohybu (VCL) byly spermie zařazovány do skupin pod $10\text{ }\mu\text{m/s}$ byly klasifikovány jako nepohyblivé, $10\text{--}45\text{ }\mu\text{m/s}$ středně pohyblivé a rychlé nad $75\text{ }\mu\text{m/s}$. Jako spermie s progresivním pohybem byly klasifikovány ty, které dosahovaly STR nad 80 %.

3.5.2. Hypoosmotický test

Je jednoduchý test vitality spermií, který se používá k vyhodnocení nepoškozenosti povrchových plazmatických membrán spermií v oblasti bičíku. V hypoosmotickém prostředí dochází k průniku vody, což má za následek zvětšování buněčného objemu, a to vede ke stáčení bičíku spermií (Hofírek 2009). Tento test je užitečný, když se chceme vyhnout barvení spermií, avšak abychom mohli pozorovat bičík, musíme ejakulát zředit s hypoosmotickým roztokem například: fruktózu s citrátem sodným nebo roztokem sacharózy. U spermií s nedotčenou membránou dochází po cca 5 minutách v hypoosmotickém prostředí ke tvarovým změnám bičíku (Ramu & Jeyedran, 2012).

Teplota vzorku pro správné vyhodnocení musí mít 37 °C. Roztok se připraví rozpuštěním 0,735 g dihydrátu citrátu sodného a 1,351 g fruktózy ve 100ml destilované vody. Preparát se smísí s 1 ml roztoku a 100 µl ejakulátu a následně se to celé nechá inkubovat po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci se 10 µl smíšeného směsi přenesse na podložní sklíčko a překryje se krycím sklíčkem o rozměrech 22 × 22 mm (Gadea 2005).



Obrázek 6 Tvarové změny bičíku spermíí (Gadea 2005).

Vyhodnocení se provádí na mikroskopu s fázovým kontrastem o celkovém zvětšení 200×–400×. Zde zřetelně poznáme mrtvé buňky, které zůstávají beze změny, zatímco u živých buněk rozeznáváme různé druhy zduření bičíku. Obrázek 6 popisuje tvarové změny bičíku spermíí (Gadea 2005).

Nalley & Arifiantini (2014) ve své publikaci uvádí jiný postup, kterým provádí tuto metodu. Roztok se skládá ze 7,35 g citrátu sodného a 13,52 g fruktózy ve 100ml destilované vody. Preparát se smísí s 10µl ejakulátu a 2 ml hypoosmotického roztoku. Celý proces probíhá při teplotě 37 °C a pozorování je vždy po 15 minutách. Zjistilo se, že při třetím měření výsledky dosahovali nejlepších hodnot. (Nalley & Arifiantini 2014).

3.5.3. Průtoková cytometrie

V posledních letech se průtoková cytometrie vyvinula na široce používané techniky, které detailně poskytují informace o nehomogenních populacích buněk ve formě cytogramů. Jednotlivé buňky jsou zobrazovány, jako body v multidimenzionálním prostoru, se souřadnicemi přímého a bočního světelného rozptylu a intenzitou fluorescence v různých vlnových délkách (Evenson et al. 1993). Metoda umožňuje naráz zkoumat až desítky tisíc buněk a má široké uplatnění v cytologii, virologii, molekulární biologii a v mnoha odvětví v medicíně (McKinnon 2018). Nejvíce je využívána při polychromatické imunofenotypizaci krevních leukocytů a buněk kostní dřeně. Dále se využívá jako imunofenotypizace buněčných suspenzí izolovaných z jiných tělních tekutin (moč, likvor, výpotky) a také z orgánů a lymfatických tkání. Průtoková cytometrie se používá i na analýzu DNA u fixovaných i intaktních buněk, detekci apoptózy, biofyzikální a biochemické stanovení včetně kinetiky buněčných procesů (Šinkorová & Zárybnická 2008).

Metoda stanovuje koncentraci spermíí v čerstvém nebo rozmraženém spermatu. Je to technika se snadným používáním, která je velice přesná, kvůli své přesnosti a opakovatelnosti.

Pomocí této techniky dokážeme skvěle rozlišit spermie od jiných částic, jako jsou somatické buňky, tukové buňky nebo bakterie (Evenson et al. 1993).

Používání průtokové cytometrie je velice nákladné na vybavení a je potřeba k němu kvalifikovaného pracovníka, kvůli složitosti metod, kterými se připravují vzorky a vyhodnocují se data. Metoda se teda spíše využívá pro výzkumné účely než na ověřování kvalit vzorku (Ormerod 2000).

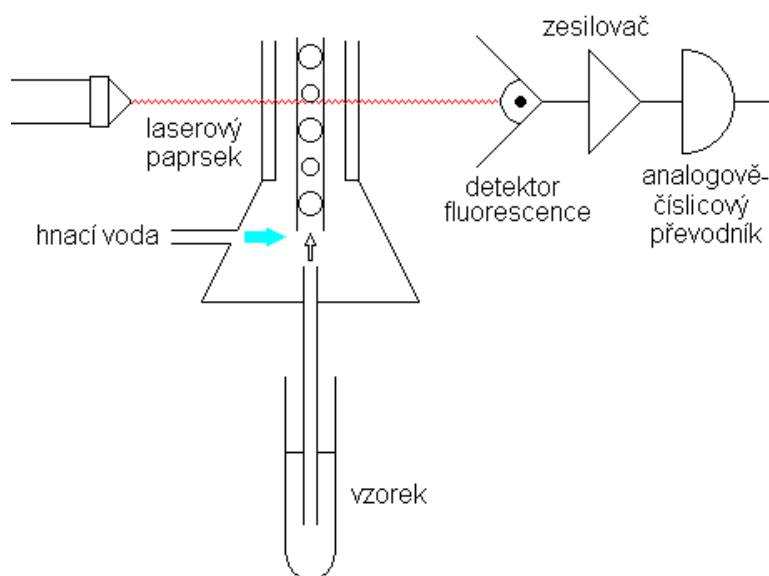
Přístroj se skládá ze tří částí: fluidiky, optiky a elektroniky. Složení optiky v průtokové cytometrie se skládá ze tří částí: laseru, filtrů a detektorů. Nejčastěji se používají lasery o vlnových délkách: délce 488 nm (modrá), 405 nm (fialová), 532 nm (zelená), 552 nm (zelená), 561 nm (žlutozelená), 640 nm (červená) a 355 nm (ultrafialová). Abychom mohli analyzovat buňky, musíme vzorek obarvit fluorochromem, což je molekula, která po osvětlení světlem určité vlnové délky absorbuje energii záření. Následně se vzorek dá do průtokové cytometrie, přesněji do vyšetřovací komory. Vzorky pro výzkum jsou aplikovány na přesných objemech. K tomu nám pomáhají elektrody, které detekují i sebemenší pokles hladiny. Pro správnou analýzu je nutné mít buňky rozptýlené v tekutině, která je pod tlakem vstřikována do uzavřeného kanálku, kde je vzorek hodnocen. Tekutina, která obsahuje buňky, opouští uzavřený kanálek a rozkládá se pomocí trysek na jednotlivé kapky, které jsou vstřikovány na místo, kde je vzorek hodnocen (Brito et al. 2016). V každé kapce je jedna buňka a velikost kapek se pohybuje v rozsahu 40–200 mikronů. Zde jsou kapky vystaveny laserovým paprskům, jimiž jsou buňky ozářeny. Toto ozáření způsobí fluorescenci jednotlivých kapek spojených se spermii. Barviva na sebe vážou světlo o určité vlnové délce a buňky s různými vlastnostmi vyzařují světlo s odlišnou vlnovou délkou, čímž vykazují rozdílnou fluorescenci. Fotonásobič, který je součástí průtokové cytometrie je schopný zachytit i slabé optické signály. Fotonásobič spojený s filtry umožňuje procházet pouze určitými vlnovými délkami světla a umožňuje určit, zda jednotlivé kapky obsahují či neobsahují buňku, a pokud buňku obsahují, tak zhodnotí specifickou barvu, s kterou je buňka spojena. Paprsky procházejí přes buňku ve dvou různých směrech, v přímém a bočním směru. V přímém směru měříme rozptyl relativní velikosti buňky. V bočním směru pozorujeme rozptyl ve struktuře a členitosti buňky (Ormerod 2000). Fluorescenční světlo je pomocí čoček a filtrů vedeno na detektory, které

sbírají data do počítače (Freneau et al. 2009). Na základě rozptylu, lze určit velikost částic a separovat spermie od ostatních buněk a nečistot.

Obrázek 7 Tok průtokovou cytometrií (*cs.differbetween.com*)

Průtoková cytometrie je využívána pro hodnocení životaschopnosti spermií, odstranění nespermatických částí, mitochondriální aktivitu, míru poškození DNA, integritu akrozomu, na sexaci spermií nebo hodnocení celkové koncentrace. Tok průtokovou cytometrií je zobrazen na obrázku 7.

Hodnocení životaschopnosti spermií, je na způsobu označených živých nebo mrtvých buněk, kde se jim zbarví integrita plazmatické membrány a tím krásně uvidíme množství živých a mrtvých spermií. Na toto hodnocení se nejčastěji využívá barvivo propidium jodid, který barví poškozenou spermii na červeně (Oldenhof et al. 2011). Živé buňky jsou obarvovány například barvivem karboxyfluorescein diacetátem, který zobrazuje nepoškozené spermie zeleně. Kombinací těmito barvivy jsme schopni pozorovat i poškozené buňky, které se zbarví oběma barvami. Spermie se zbarvují, jelikož barviva se vážou na jejich DNA.



Obrázek 7. Tok průtokovou cytometrií (Dolník et al. 2019).

Na hodnocení k odstranění nespermatických částic používáme barviva Hoechst 33342 nebo kombinace SYBR-14 a propidium iodid. Do této skupiny patří bakterie, různé cizorodé částice, krvinky a epiteliální buňky (Martínez-Pastor et al. 2010).

Hodnocení koncentrace pomocí průtokové cytometri se využívá, kvůli tomu, že lze dosáhnout více přesnějším výsledkům, než je tomu u metod běžně používaných jako: hematocytometr, spektrofotometr, nebo elektronického počítadla buněk (Hossain et al. 2011).

Metoda na poškozenou DNA spermií je založena na vyšetření struktury chromatinu spermií (SCSA). To nám umožňuje stanovit velké kvantum spermií ve vzorku. Metoda byla poprvé pospaná v roce 1980 v časopise Science (Evenson et al. 1980). Definuje abnormální strukturu chromatinu a jeho zvýšenou náchylnost k denaturaci bílkovin spermií. Chromatin se nachází v jádře spermie, kde má za úkol udržovat její DNA (Garcia-Macias et al. 2006). Tyto pozorované poruchy mohou vznikat během spermatogeneze nebo při změnách teplotního a oxidačního stresu, ale i vlivem kyselého prostředí (Aoki et al. 2006). Ejakulát je barven akridinovou oranží, která vykazuje rozdílnou fluorescenci. Jednovláknová DNA, která je poškozená, se zbarví do červena. U dvojitě vláknové nedenedurované DNA se zbarví do zelena (Falchi et al. 2018).



Obrázek 8 Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) (Evenson et al. [1980](#))

3.6. Fertilizační schopnost při umělé inseminaci

Umělá inseminace je nejstarší a nejrozšířenější technikou asistované reprodukce v živočišné výrobě, která je založena na vědeckých poznatcích ohledně biologie a fyziologie reprodukce (Nutti 2007). Jde o zavedení spermatu v inseminačních dávkách pomocí inseminačního nástroje do pohlavního traktu samice. (Barbas & Mascarenhas, 2009). Použití této techniky bylo zavedeno nejprve z hygienických důvodů, aby se zabránilo kontaminaci a šíření sexuálních a nesexuálních nemocí. Nejhlavnějšími aspekty u umělé inseminace je její jednoduchost, ekonomická výhodnost a velká úspěšnost. U malých přežvýkavců lze používat čerstvý, chlazený, tak i zmrazený ejakulát (Chemineau et al. 1991). Umožňuje rychlé šíření žádoucích vlastností samců, které mají předpoklady pro vysoký produkční potenciál. Pomocí toho můžeme ejakulát od nejlepšího genetického jedince použít k impregnaci více samic, aby se zvýšili příznivé geny, pro budoucí populaci. (Parkinson, 2009). Umělá inseminace měla pozitivní vliv i na snížení počtu samců, což vedlo ke snížení genetické variability a snížení genetických defektů a zvýšení příbuzenské plemenitby (Nutti 2007). Další velkou výhodou při umělé inseminaci je, že inseminační dávky usnadňují transport spermatu na velkou vzdálenost nebo i využívání těchto dávek po otcově smrti (Evans & Maxwell 1987). Nejvíce se umělá inseminace u ovcí využívá v Jižní Americe a v Austrálii. Méně se umělá inseminace využívá v Evropě a v Severní Americe (Shiple et al. 2007).

První zmínky o umělé inseminaci ovcí

První pověsti o inseminaci ovcí pocházejí z 16. století. V tomto století poprvé získávali semeno od beranů přirozenou připouštěcí metodou, kde nechali berana naskočit na připouštěcí ovci a do nádoby odebrali semeno, které zavedli do pochvy ovcím, které byly v říji (Gamčík & Kozumplík 1974). V poválečném období po 1.sv válce došlo k velkému pokroku, kvůli vývoji umělých vagín a fantomů. Tyto nástroje nám pomáhají získat kompletní ejakulát. Začalo se provádět i první ředění spermatu. Zředění působilo proti nepříznivému účinku semenné plazmy, což umožnilo skladování spermatu a zvýšil se i objem ejakulátu pro inseminaci (Rob & Herčík 1987). V roce 1931 prof. Milavnov sepsal první praktickou knihu o umělé inseminaci skotu a ovcí. („*Umělá inseminace skotu a ovcí*“). V tomto období se umělá inseminace výrazně rozšířila po celém světě. Maxwellem a Evansem byly prvními výzkumníky zkoumajícími odběr spermatu a její inseminaci u ovcí v roce 1987. Zabývali se jeho zmrazováním spermatu a jeho ředěním. Následně vydávají Chemineau et al. (1991) manuál k inseminaci ovcí a koz.

Dochované historické zmínky o inseminaci na našem území pocházejí už z roku 1876 v Jevičku, kde byla první specializovaná inseminační stanice pro berany (Faigl et al. 2012). V dnešní době v ČR jsou u ovcí biotechnologické metody využívány velice málo. Hlavním důvodem je rapidně snížené stavy ovcí. Dalším důvodem je, že v ČR není žádný realizační tým, který by dokázal upravit podmínky pro chov ovcí, tak že bychom mohli konkurovat vyspělým chovatelským zemím. V těchto zemích je problematika reprodukce zaměřena na intenzivní šlechtění (Pindáka 2002).

3.6.1. Metody inseminace

Inseminace ovcí je obtížnější než u jiných zvířat, kvůli složitosti anatomické stavby děložního čípku, kterým je těžší projít, kvůli výrazné klikatosti (Fukui & Roberts 1976). Anatomické složení děložního krčku u bahnice je menší, tužší, užší a s klikatějším kanálkem. Cervikální kanálek je dlouhý přibližně 7 cm a jeho anatomická stavba má tvar prstenců. Prstencové kroužky poskytují fyzickou bariéru vůči vnější kontaminaci, ale také ztěžují kanelaci a následné ukládání spermatu do dělohy (Kershaw et al. 2005). Tento faktor následně ovlivňuje míru březosti získanou zmrazeným a rozmrazeným semenem, který neprojde děložním čípkem (Nutti 2007). Kvůli tomu se inseminační dávka deponuje do vstupu děložního krčku za pomoci cervikální metody nebo do děložního lumenu stěnou dělohy pomocí intrauterinní laparoskopické nebo transcervikální metody (Casali et al. 2017). Dle různých výzkumů, se zjistilo, že čím hlouběji deponujeme inseminační dávku do pohlavního ústrojí samice, tím můžeme očekávat lepší zabřeznutí ovcí (Milovanov & Sokolovská 1980). Na inseminaci ovcí se nejvíce využívají intravaginální, intracervikální a intrauterinní metoda, která se následně dělí na transcervikální a laparoskopickou metodu (Fair 2007; Daskin et al. 2016). Na používání čerstvého semene se využívají metody intravaginální, intracervikální. Na použití zmrazeného semene se využívá metoda intrauterinní (Parkinson 2009).

3.6.1.1 Intravaginární metoda

Tento typ se spolu s metodou intracervikální nejvíce používá, avšak je nejméně spolehlivá (Polge et al 1970). Při této inseminaci se používá inseminační pipeta bez použití poševního zrcátka. Dávka se deponuje na horní klenbu poševní, nad růžici krčku děložního. Při zavádění inseminační pipety je její špička trochu zvednutá směrem ke kosti křížové, aby nebyla zavedena do vyústění močové trubice. Nejprve se do pipety nasaje malé množství vzduchu, potom vlastní inseminační dávka (Youngquist & Threfall 2007). Intravaginální inseminace je velice rychlá a dá se používat i v polních podmínkách. Nevýhodou u této metody je vysoká spotřeba ejakulátu. Metoda se nepoužívá u mrazeného spermatu, jelikož semeno má minimální přežitelnost v pochvě, a proto se používá čerstvý ejakulát nebo chlazení ejakulát. Kromě toho je úspěšnost zabřeznutí velice nízká a je mnohem vhodnější tuto metodu používat spíše na zjištění říje. K lepšímu zjištění říje u ovcí se provádí synchronizace říje, kde můžeme ve stejný čas provést u všech následnou inseminaci. K přirozené synchronizaci říje může být zařazení berana do stáda 2–4 týdny před očekávanou říjí. Další možností vyvolání říje je použitých hormonálních přípravků gestagenů v kombinaci s injekcí PMSG nebo PGF 2 alfa. Ideální čas pro umělou inseminaci touto metodou je kolem 12–18 hodiny po začátku říje (Evans & Maxwell, 1987). Inseminační dávka by měla mít objem 0,3–0,5 ml s koncentrací kolem 400×10^6 spermií. Úspěšnost zabřeznutí je kolem 20–60 % (tabulka 1) (Macías et al. 2020).

3.6.1.2 Intracervikální metoda

Tato metoda poskytuje nejekonomičtější použití a je nejpoužívanější metodou pro inseminaci mrazeným spermatem u ovcí (Anel et al. 2006). Na tuto metodu se používá čerstvý ejakulát i krátkodobě a dlouhodobě uchovávané semene. Metoda má pozitivní výsledky při použití čerstvého nebo chlazeného spermatu, ale není dostatečně účinný při použití zmrazeným a rozmrazeným spermatem (Chemineau et al. 1991). Inseminační dávka se deponuje, pomocí inseminační pipety 10–20 mm do kanálku děložního krčku, a to za první až druhou příčnou řasu. (Youngquist & Threfall 2007). K tomuto druhu inseminace se používá spekulum neboli poševního zrcátka se světelným zdrojem, které se zavádí do hloubky 100–130 mm pohlavním traktem. Zde je potřeba dávat pozor, aby se semeno nevracelo zpátky do pipety nebo do pochvy, jelikož reflux semene by mělo za následek nižší oplodnění (King et al. 2004). Kvůli tomuto problému se vyvinul nový typ násady na inseminační pipetu DARIO, která minimalizuje reflux semene. Výsledky prokazují zlepšení až o 10 % oproti staré metodě (Macías et al. 2017). Inseminační dávka čerstvého ejakulátu by měla obsahovat 1×10^9 spermií. U chlazeného spermatu by měl být počet spermií 1,5 krát více než u čerstvého semene (Edmondson et al., 2012). Inseminační dávka u rozmrazeného semene by se měla pohybovat o objemu 0,2ml a měla by obsahovat 200×10^6 spermií (tabulka 1). Úspěšnost zabřeznutí metodou dlouhodobé je okolo 40–80 % (Fair 2007). Ve výzkumu dle Paulenz et al. (2004), kde zkoumali úspěšnost inseminaci mrazeným semenem, došli k závěru, že

inseminační dávka by měla obsahovat minimálně 240×10^6 spermií. Ideální doba pro úspěšné zabřeznutí je 15–17 hodin po nástupu zjištěné říje (Chemineau et al. 1991).

3.6.1.3 Intrauterinní metoda

Metoda intrauterinní spočívá v deponování rozmražené inseminační dávky na kraj dělohy. U této metody se používá menší procento spermií, avšak objem inseminační dávky zůstává stejný. To má za následek přesnější ředění a nejlepší výsledky v zabřeznutí při použití mrazeného spermatu (Edmondson et al. 2012). U intrauterinní metody jsou dva způsoby vpravení inseminační dávky přes krček děložní, a to laparoskopický a transcervikální (Faigl et al. 2012).

3.6.1.4 Intrauterinní transcervikální metoda

Metoda je méně používána než laparoskopická. Na tuto metodu musíme ovci zafixovat ve speciální kolébce, kde je ovce zafixovaná na zádech (Casali et al. 2017). Tato poloha usnadňuje průchod inseminační pipetou děložním čípkem (Sohnrey & Holtz 2005). Při této metodě nejčastěji využívá inseminační pipeta, spekulum a kleště (WulsterRadcliffe et al. 2004). Pomocí spekulu rozšíříme pochvu a následně kleštěmi uchopíme děložní krček. Poslední část vyžaduje vysokou odbornou zkušenost, jelikož musíme děložní krček prohánkovat upravenou inseminační pipetou a následně můžeme inseminační dávku vpravit na rozhraní krčku a dělohy (Yungquist & Threlfall 2007). Vpravení inseminační dávky do dělohy provádíme stejně jako u metody intracervikální nebo laparoskopické (Faigl et al. 2011). Mražené beraní sperma má sníženou schopnost procházet děložním krčkem a tím mají výrazně porušenou oplozovací schopnost. Inseminační dávka má objem 0,1–0,5 ml a počet pohyblivých spermií se pohybuje okolo $60\text{--}150 \times 10^6$ spermií (tabulka 1). Úspěšnost zabřeznutí se pohybuje u čerstvého semene mezi 40–70 % a u mraženého semene 30–70 % (tabulka 1) (Macías et al. 2020). Dle výzkumu Killeen a Caffery, (1982) ukazují, že usazení semene v jednon děložním rohu vede k oplození vajíček v obou rozích. Byla použita dávka 0,2–0,5 ml s pohyblivými spermií $100\text{--}200 \times 10^6$. Největší nevýhodou u této metody je možnost poranění děložního čípku, abscesy, infekce nebo špatná míra březosti (Perry et al. 2010).

3.6.1.5 Intrauterinní laparoskopická metoda

Laparoskopická inseminace se provádí jak s čerstvým, tak i mražením spermatem. Ještě, než se provede samotná inseminace, ovce se musí zafixovat, jako je tomu u transcervikální metody. (Edmondson et al. 2012). Inseminace touto metodou se provádí v anestezii přes stěnu břišní většinou na levé straně. K této metodě je zapotřebí endoskop, který se spolu se sondou zavádí do břišní dutiny dvěma operačními vpichy. Inseminace se provádí do obou děložních rohů, nejlépe doprostřed mezi uterotubálním spojením a bifurkací (Faigl et al. 2011). Zárok se pohybuje mezi 5–10 minuty a pomocí této metody lze za jeden den nainseminovat i pár stovek bahnic (Luther 2008). Pomocí tohoto postupu se vyhneme

cervikální bariéry a tím se sníží množství potřebného spermatu pro úspěšné zabřeznutí. Do obou rohů se dává inseminační dávka o objemu 0,05–0,10 ml a obsahu 20–50 x 10⁶ spermií (tabulka 1). Kvůli menšímu počtu spermií v těchto inseminačních dávkách lze vytvořit mnohem více inseminačních dávek, které mají za následek snížení nákladů (Perkins et al. 1996).

Metoda laparoskopická dosahuje nejlepších výsledků ze všech metod používané při inseminaci ovcí, kvůli vpravení spermií přes děložní krček (Casali et al. 2017). Tato metoda se ale může potýkat s mnoha nevýhodami, jako je případné zranění při zákroku, při infekci, anestezii nebo manipulaci se zvířetem v bezvědomí (McCappin & Murray 2011). Další hlavní nevýhodou je drahé vybavení, které potřebujeme pro jeho provedení a celková náročnost provedení. Všechny tyto parametry se potom projevují, na celkové ceně inseminační dávky. Úspěšnost zabřeznutí při použití čerstvého spermatu je okolo 40–70 % a u zmrazeného 30–70 % (tabulka 1) (Youngquist & Threfall 2007). Další studie uvádí úspěšnost dosahující až 80 % (Anel et al. 2006). Tato metoda se využívá i při diagnostice reprodukčního traktu a odhalování zdravotních problémů (Casali et al. 2017).

Metoda	Objem ejakulátu	Úspěšnost zabřeznutí	Koncentrace spermií v ID
Intravaginální	0,3-0,5 ml	20-60 %	400*10 ⁶
Intracervikální	0,05-0,2 ml	40-80 %	200-240*10 ⁶
Intrauterinní transcervikální	0,1-0,5 ml	40-70 %	60-150*10 ⁶
Intrauterinní laparoskopická	0,05-0,1 ml	30-70 %	20-50*10 ⁶

Tabulka 1 Parametry metod inseminace (Chemineau et al. 1991; Casali et al. 2017; Perry et al. 2010).

4. Závěr

V této práci byly sepsány nejnovější a dosavadní poznatky, týkající se modifikaci konvenčních ředidel za účelem zlepšení kvalitativních parametrů konzervovaného spermatu. Z dostupných studií vyplývá, že nejsložitějším procesem při výrobě inseminační dávky je konzervace a následné rozmrazení. Mnoho autorů poukázali na různé rychlosti chlazení a mrazení, avšak skoro všichni se shodli, že kritický tepelný rozsah se pohybuje od -10 do -25 °C.

Dále jsem se v práci zaměřil na nové alternativy pro zlepšení komerčních ředidel a možnosti náhrady látek živočišného původu za látky rostlinného typu. „Dosud nebylo nalezeno vhodné rostlinné médium, které by mohlo plnohodnotně nahradit látky živočišného původu. Ačkoliv existují studie, které prokazují zlepšení kvality a plodnosti semene při užití rostlinných extraktů“. K těmto studiím řadíme například extrakt z rozmarýnu, který byl doplněn do ředidla na bázi sójového lecitinu. Toto ředidlo vedlo ke zlepšení motility spermií a funkčnosti plazmatické membrány zmrazeného spermatu. Dalšími rostlinnými látkami, které skvěle nahrazovaly živočišné látky, jsou zelený čaj a arganový olej.

Závěrečné poznatky o zlepšení konvenčních ředidel doplněnými různými aditivními látkami, které se zabývají zlepšením kvality semene a plodnosti poukazují na fakt, že tyto přísady z přírodních zdrojů mají různé účinky v závislosti na posuzované proměnné kvalitě spermatu. Pochopení biologických mechanismů těchto doplňků o kvalitě spermatu by umožnilo zlepšení stávajících nebo vývoj nových ředidel. Ty mohou zvýšit kvalitu konzervovaných spermií berana a následně dosáhnout žádoucí míry oplození.

Aditivní látky se do ředidel přidávají za účelem ochrany spermií během chlazení a zmrazování. Mezi nejvýznamnější aditiva patří: antioxidanty, vitamíny, aminokyseliny a mnoho dalších významných látek. Antioxidanty zlepšují funkci spermií během konzervace a ochraňují spermií před reaktivní formou kyslíku. Mezi nejhlavnější látky jsou superoxid-dismutáza, astaxanthinu. Vitamíny jsou přidávány do ředidel za účelem zlepšení kvality spermií. Například vitamín E, dle několika výzkumu zlepšilo životaschopnost a motilitu spermií. Další vitamíny, které byly zkoumány na zlepšení funkcí spermií, byly vitamín C a vitamín trolox. Aminokyseliny se nacházejí v semenné plazmě a přidávají se do ředidel za účelem snížení fragmentaci DNA spermie, zlepšení pohyblivosti, životaschopnosti a integrity membrány spermií po rozmrazení. Mezi nejhlavnější aminokyseliny jsou methionin, Taurin a cystein, u kterých bylo prokázáno požadované zlepšení.

V neposlední řadě následovalo ověření kvality inseminačních dávek. Testování se provádí specializovanými laboratorními testy a na bázi polních testů (inseminací). Kde bylo zjištěno, že nejlepších výsledků zabřezávání dosáhla metoda laparoskopická, která je však z finančního hlediska mnohem dražší a její proveditelnost je složitější i časově náročnější. Specializované laboratorní testy se provádí pomocí přístrojových metod, jakými jsou průtoková cytometrie, hypoosmotický test a CASA (Computer – Assisted Semen Analysis). Tyto metody poskytují kvalitní informace o vlastnostech spermií.

V navazující diplomové práci by se mohla porovnávat jednotlivá ředidla u různých plemen beranů a tak zjistit jaké ředidlo by bylo nejlepší pro dané plemeno.

5. Seznam Literaturny

Azawi, O.I., Hussein, E.K. 2013. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. *Vet. Res. Forum* **4**, 157–160.

AminiPour H, Tahmasbi AM, Naserian AA. 2013. The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen proces. *Eur. J. Med. Res* 2:94–99.

Asadpour R, Pourseif MM, Moghadam G, Jafari R, Tayefi H, Mahmodi H. 2012. Effect of vitamin B12 addition to extenders on some physicochemical parameters of semen in crossbred rams. *Afr. J. Biotechnol* **11**:11741–11745.

Allai L, Druart X, Contell J, Louanjli N, Moula A.B, Badi A, Essamadi A, Nasser B, El Amiri B. 2015. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Anim. Reprod. Sci.* **160**, 57–67.

Allai L, Druart X, Louanjli N, Contell J, Nasser B, EL Amiri B. 2017. Improvements of ram semen quality using cactus seed oil during liquid preservation in Tris egg yolk and skim milk based extenders. *Small Rumin. Res.* **151**, 16–21.

Anel L, de Paz P, Alvarez M, Chamorro C.A, Boixo J.C, Manso A, González M, Kaabi M, Anel E. 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* **60**, 1293–1308.

Aboagla E.M.-E, Terada T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* **69**, 1245–1250.

Ahmad N, Noakes D. E. 1996. Seasonal variations in the Semen quality of young British goats. *British Veterinary Journal*.

Aoki V W, Emery B R, Liu L, Carrell D. T. 2006. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J. Androl.*

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.

Awad M. M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa.

Amann RP, Waberski D. 2014. *Theriogenology Computer-assisted sperm analysis (CASA)*: Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**:5–17.e3. Elsevier Inc.

- Arando A, Delgado J V, Arrebola FA, León JM, Alcalá CJ, Pérez-Marín CC. 2019. Vitrification induces critical subcellular damages in ram spermatozoa. *Cryobiology* **87**:52–59.
- Anzalone DA, Palazzese L, Iuso D, Martino G, Loi P. 2018. Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species. *Animal Reproduction Science* **190**:85–93
- Akpa G N, Sukeunan I O, Alphonsus C, Adu O A. 2012. The variation of age, hair type and body condition score with sperm morphology and cation concentration in yankasa ram. *Elixir Appl. Biology* **47**, 8629-8632.
- Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Damián JP, Giriboni J, Villagrà-García A, Ungerfeld R. 2017. Ejaculation does not contribute to the stress response to electroejaculation in sheep. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* **52**:403–408.
- Abu AH, Kisani AI, Ahemen T. 2016. Evaluation of sperm recovered after slaughter from cauda epididymides of red Sokoto bucks. *Veterinary World* **9**:1440–1444
- Agca. 2002. Biology of Reproduction, Volume 67, Issue 5. Pages 1493–1501*
- Bucak M.N, Cuyan K, Oztürk C, Güngör S, Omür A.D. 2012. Methionine supplementation improves ram sperm parameters during liquid storage at 5°C. *Cryobiology* **65**, 335–337.
- Bucak M.N, Ateşşahin A, Varişli O, Yüce A, Tekin N, Akçay A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* **67**, 1060–1067.
- Baumber J, Ball B.A, Gravance C.G, Medina V, Davies-Morel M.C. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* **21**,
- Baghshahi H, Riasi A, Mahdavi A.H, Shirazi A. 2014. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology* **69**, 482–487.
- Barth A. D, Bowmann P. A. 1994. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Canadian Veterinary Journal.*
- Barth A, Oko R. 1989. *Abnormal Morphology of Brovine Spermatozoa*. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Beranová M, Kubáček A. 2010. *Dějiny zemědělství v Čechách a na Moravě*. Praha: Lybri.

Bhosrekar M. R, Mokashi S. P, Purohit J. R, Gokhale S. B, Mangurkar B. R. 1994. Effect of glycerolization and deep freezing on the levels and release of enzymes in buffalo semen in relation to initial seminal attributes. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, Proceedings of 4th World Buffalo Cong., Sao Paulo, Brazil.

Brokaw C.J. 1987 Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *J. Cell Biochem.* **35**, 175–184.

Blackshaw A. W, Salisbury G. W. 1957. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa 11: cold-shock and its prevention.

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.

Brito LFC et al. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* **85**:1507–1527. Elsevier Inc.

Bergstein-Galan T. G, Weiss R. R, Bertol M. A. F, Abreu A. C. M. R, Busato E, Kozicki L. E, Bicudo S. D. 2017. Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18–25 °C) for up to 48 h post mortem. *Theriogenology.* **96**, 69-75.

Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of reproduction* 63: 1531-1537. DOI: 10.1095/biolreprod63.5.1531

Ball BSc, PhD,, A.R. Peters BA, DVetMed, PhD, FRCVS, FIBiol, 2004 *Reproduction in Cattle*, Third Edition.

Barbas, J.P, Mascarenhas R.D. 2009 Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. Cell Tissue Bank, 10, 49-62.

Bergeron A, Manjunath P. 2006. New Insights towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk.

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

Čunát L, Hegedúšová Z, Vejnar J, Štolc L, Louda F, Vejčík A. 2013. *Využití inseminace ovcí v chovatelské praxi: uplatněná certifikovaná metodika. Vyd. 1. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra speciální zootechniky. Praha.*

Crha I, Žáková J. 2003: Základní vyšetření spermatu. Urologické listy. Dostupné z:http://www.prolekare.cz/pdf?ida=ul_03_02_05.pdf

Cseh S, Faigl V, Amiridis GS. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* **130**:187–192

Colenbrander B, Gadella BM, Stout TAE. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Production In Domestic Animals* **38**: 305-311. DOI: 10.1046/j.1439-0531.2003.00451.x

Del Valle I, Souter A, Maxwell W.M.C, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J.A. 2013. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Anim. Reprod. Sci.* **138**, 213–219.

Diller K. R. 1992. Modeling of bioheat transfer processes at high and low temperatures. In: Cho, Y. I. (Ed.), *Bioengineering Heat Transfer*, vol. 22. Academic Press, San Diego.

Dott H. M, Foster G. C. 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *Journal of Reproduction and Fertility*.

DE PAZ, Paulino. 2011The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology*. 1313–1325

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

Daskin A, Tekin K, Tirpan M. B, Inanc M. E, Cil B, Alemdar H. 2016. The effect of different insemination techniques and cervical conformation index on fertility rates in Angora goat. *Animal Reproduction Science*. 169, 116.

Edmondson M, Roberts J, Baird A, Bychawski S, Pugh D. 2012. *Theriogenology of Sheep and Goats*. Sheep and Goat Medicine. Elsevier.

Evenson D.P, Larson K., Jost L.K. (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in maleinfertility and comparisons with the other techniques. *J. Androl*.

Fukuhara R, Nishikawa Y. 1973. Effects of pH, Sperm Concentration, Washing and Substrate Concentration on Respiration and Motility of Goat Spermatozoa. *Nihon Chikusan Gakkaiho* 44, 266–270.

Fang Y, Zhong R, Zhang X, Zhang J, Zhou D. 2018. Boar seminal plasma inhibits cryo-capacitation of frozen-thawed ram sperm and improves fertility following intracervical insemination. *Theriogenology* **105**, 84–89.

Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini S.M, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani H.R, Nasr-Esfahani M.H. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* **73**, 480–487.

Fraga C.G, Motchnik P.A, Shigenaga M.K, Helbock H.J, Jacob R.A, Ames B.N. 1991. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 11003–11006.

Faigl V, Vass N, Jávora A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica*.

Fair S, Hanrahan J, Donovan A, Duffy P, O'meara C, et al. 2007. Hormonal relationships during the periovulatory period among ewe breeds known to differ in fertility after cervical artificial insemination with frozen thawed semen. *Animal reproduction science*

Fair S, Hanrahan J. P, O'Meara C. M, Duffy P, Rizos D, Wade M, Donovan A, Boland M. P, Lonergan P, Evans A. C. O. 2005. Differences between Belclare and Suffolk 34 ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*.

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.

Foote R. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables¹. *Journal of Animal Science*.

Fukui Y, Roberts E. 1977. Repeatability of non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology*. 8 (2-3). 77-81.

Falchi L, Galleri G, Zedda M. T, Pau S, Bogliolo L, Ariu F, Ledda S. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science*, 207, 1–6

Freneau G E, Chenoweth P J, Ellis R, Ropp G. 2009. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Animal Reproduction Science*. roč. **118**, 2-4, 176–181

FISER P. S, FAIRFULL R. W. 1986: The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23(6): 518–524.

Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* **59**, 1241–1255.

Graham J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* **41**, 1151–1162.

Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*.

Gamčík P, Kozumplík J. 1975. *Andrologie a umělá inseminace hospodářských zvířat. 2., přeprac. vyd. Praha.*

Gamčík P, Kozumplík J. et al. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda, Bratislava.*

Gamčík P, Kozumplík J, et al. 1992. *Andrológia a umela inseminácia hospodárskych zvierat. Príroda. Bratislava,*

Garcia-Macias V, Martinez-Pastor F, Alvarez M, Garde J.J, Anel E, Anel L, Paz P. 2006. Assessment of chromatin status (SCSA) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*.

Grasa P, Pérez-pé R, Abecia J. A, Forcada F, Muiño-blanco T, Cebrián-pérez J. 2005. Sperm survival and heterogeneity are correlated with fertility after intrauterine insemination in superovulated ewes. *Theriogenology*.

Gordon I. 2004. *Reproductive technologies in farm animals. CABI Pub. Cambridge, MA.*

Horák F. et al. 2004. *Atlas plemen ovcí a koz chovaných v České republice, Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR.*

Horák F. et al. 2012: *Chováme ovce. Vyd. v češtině 1. Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda.*

Hošek M. 2014. *Sheep and goat insemination. Mendel University in Brno, Brno.*

Hofírek B a kol. 2009. *Nemoci skotu. Brno: Noviko. ISBN 978-80-86542-19-5.*

Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GC.2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci*;67:101–11.

Hossain MdS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* 13:406–419

Hegedúšová Z, Štolc L, Louda F, Čunát L, Vejnar J. 2012. Effect of different extenders on ram sperm traits during storage. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 60:111–116

Holt C, Holt W. V, Moore H. D. M, Reed H. C. B, Curnock R. M. 1997: Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of onfarm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of Andrology*, **18**(3):12–23.

Heidari AH, Zamiri MJ, Nazem MN, Shirazi MRJ, Akhlaghi A, Pirsaraei ZA. 2021. Detrimental effects of long-term exposure to heavy metals on histology, size and trace elements of testes and sperm parameters in Kermani Sheep. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **207**: 111563

Chemineau P, Malpoux B, Pelletier J, Lebouef B, Delgadillo J, Deletang F, Pobel T, Brice G. 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Prod. Anim.*

Juanchi X.G.A. 2000. Radiolysis of cyanocobalamin (vitamin B12). *Radiat. Phys. Chem.* **57**, 337–339.

Johansson C. S, Matsson F. C, Lehn-jensen H, Nielsen J. M, Petersen M. M. 2008. Equine spermatozoa viability comparing the nucleo counter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. *Animal Reproduction Science.*

Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, IniestaCuerda M, Fernández-Santos MR, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science* **167**:103–108. Elsevier B.V.

Jennings TA. 1999. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles* 1 edition. CRC Press, Englewood. CO

Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Boixo J. C, Anel L, Paz P, Herraéz P, Rouissi H. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem *Theriogenology.*

Kliment J, et al. 1989. *Reprodukcia hospodárských zvierat.* Bratislava.

Kubovičová E. 2011. *Metody konzervace a hodnocení spermatu beranů: metodická příručka.*

Kumar S, Millar J. D, Watson P. F. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines.

Kozdrowski R, Dubiel A, Bielas W, Dzieciol M. 2007. Two protocols of cryopreservation of goat semen with the use of computer-assisted semen analysis system. *Acta Veterinaria Brno*.

Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 48 C. *J Reprod Fertil*;116:217–22.

Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo J. C, Rouissi H, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, **60**(7), 1249–1259.

Kukovics S, Gyoker E, Nemeth T, Gergatz E. 2011. Artificial Insemination of Sheep - Possibilities, Realities and Techniques at the Farm Level. Manafi, Milad (ed.), Milad Manafi. *Artificial Insemination in Farm Animals*. InTech.

Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* **64**:1225–1235

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.

Killeen I. D, Caffery G. J, Holt N. 1982. Fertility of ewes following intra-uterine insemination with the aid of a laparoscope. *Proc. 14th Annu. Conf. Aust. Soc. Reprod. Biol.* p. 104.

López-Gatius *et al* (2005). Effect of solid storage at 15 °C on subsequent motility and fertility of rabbit semen *Theriogenology*

Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*.

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.

Lopez Saez A, Ortiz N, Gallego L, Garde J. 2002. Liquid Storage (5 0 C) of Ram Semen in Different Diluents. *Archives of Andrology*.

Louda F, Hegedüšová Z. 2009. Inseminace ovcí – intenzifikační faktor šlechtitelské práce. *Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Rapotín*.

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

Luther J. 2008. Application of Laparoscopic Artificial Insemination Techniques to the North Dakota Sheep Industry. Sheep Res. Rep. . 24-26

Lukáč N, Massanyi P, Šťastný P. 2009. Možnosti počítačového hodnotenia kvality spermií v súčasnosti. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. Dostupné z:http://old.agroporadenstvo.sk/zv/ostatne/spermie_poc.htm?start

Mara et al. 2005. *Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study* Theriogenology

Marti J.I, Marti E, Cebrian-Perez J.A, Muino-Blanco T. 2003. Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. Theriogenology **60**, 1025–1037.

Maia M.S. 2006. Sperm viability and reactive oxygen species (ROS) generation in ram semen cryopreserved in extenders with sodium lauryl sulfate (OEP), Trolox-c and catalase. Thesis (Doctor in Veterinary Medicine). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu.

Meque L.C, Gil L, Mualuzanga D, Gonzalez N, Akourki A, Cano R, Espinosa E, Josa A. 2005. Effect of different concentrations of two types of gelatine in soya milk extender for storage of liquid ram semen. ESDAR, September 3–5, Murcia, Spain, Abstract P 137, Reprod. Domest. Anim. 40, 353.

Mehdipour M, Daghigh Kia H, Najafi A, Vaseghi Dodaran H, García-Álvarez O. 2016. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology **73**, 297–303.

Moore S.G, Hasler J.F. A. 2017. 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **100**, 10314–10331.

Mata-Campuzano M, Soleilhavoup C, Tsikis G, Martinez-Pastor F, de Graaf S.P, Druart X. (2015a). Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. Anim. Reprod. Sci. **162**, 31–36.

Motlagh M.K, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S. 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean

lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology* **69**, 217–222.

Malejane C. M, Greyling J. P. C, Raito M. B. 2014. Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *Agriculture, Dairy & Animal Science*.

Matthews N, Bester N, Schwalbach L. M. J. 2003. A comparison of ram semen collected by artificial vagina and electro-ejaculation. *South African Society for Animal Science*.

McKinnon KM. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*

Mutalík S, Salian S. R, Avadhani K, Menon J, Joshi H, Hegde A. R, Kumar P, Kalthur G, Adiga S. K. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium.

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.

Madhuri D, Gupta V, Nema S, Patidar A, Shivhare M, Singh N, et al. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *DHR Int. J. Biomed. Life Sci.* 2012; **3**(1): 62-83

Mortimer D. 1994. *Practical laboratory andrology*. Oxford University Press, New York. 416 s.

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, Paz PD. 2010. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:67–78

McKinnon KM. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology* 120:5.1.1-5.1.11.

Maksimovic N, Milovanovic A, Barna T, Caro Petrovic V, Pantelic V, Lazarevic M, Stojanov I. 2018. Short-term liquid storage of ram semen in various extenders. *South African Journal of Animal Science* **48**:717–723. *South African Society for Animal Science (SASAS)*.

Maxwell W. M. C, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction Fertility and Development*. 5 (6), 613–638.

McCappin N, Murray R. 2011. Some factors affecting pregnancy rate in ewes following laparoscopic artificial insemination. *Veterinary Record*. **168** (4). 99-99.

Macías A, Martín E, Laviña A, Ferrer LM, Lidón I, Rebollar R, Tejedor MT. 2020. Cervical artificial insemination in sheep: sperm volume and concentration using an antiretrograde flow 37 device. *Animal Reproduction Science* 221: 106551.

Mocé E, Lozano-Palazón SA, del Mar Martínez-Granell M, Mocé ML, Gómez EA. 2020. Effect of the Refrigeration System on In Vitro Quality and In Vivo Fertility of Goat Buck Sperm. *Animals* **10**: 2399.

Nagy *et al.* 2002. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender *Anim Reprod*

Nuti I. 2007. Techniques for artificial insemination of goats. In: Youngquist, R. S. and Threlfall, W. R. (eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd edition. SaundersElsevier, St. Louis, MO. pp. 529–534

Olivares C. C. S, de Souza-Fabjan J. M. G, Balaro M. F. A, Brandão F. Z, da Fonseca J. F, Freitas V. J. F, de Oliveira R. V. 2017. Comparison of Different Sperm Selection Techniques in Ram Frozen - Thawed Sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*.

Ormerod M. G. 2000. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. 3rd ed. Oxford University Press, New York.

Oldenhof H, Blässe A-K, Wolkers WF, Bollwein H, Sieme H. 2011. Osmotic properties of stallion sperm subpopulations determined by simultaneous assessment of cell volume and viability. *Theriogenology* **76**:386–391

Olaciregui M, Luño V, Domingo P, González N, Gil L. 2017. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific Reports* **7**:1096.

Pindřák A, Horák F, Mareš V. 2003. *Atlas plemen ovcí a koz chovaných v ČR*. Brno: SCHOK.

Polge C. 1957. Low temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society London*.

Perry K, Haresign W, Wathe, D. C, Khalid M. 2010. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology* **74**, 1685–1690.

Parkinson T. 2009. Artificial insemination of ewes. In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J. and England, G. C. W. (eds) *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 9th edition. SaundersElsevier, London, UK. pp. 765–808.

Peña F. 2015. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. *Animal Reproduction* **12**:351–355.

Paulenz H, Adnoy T, Fossen O, Soderquist L, Berg K. 2002. Effect of deposition site and sperm number on fertility in sheep inseminated with liquid semen. *Vet. Rec.* **150**, 299–302.

- Ptáček M, Stádníková M, Savvulidi F, Stádník L. 2019. Ram Semen Cryopreservation Using Egg Yolk or Egg Yolk-free Extenders: Preliminary Results. *Scientia Agriculturae Bohemica* **50**:96–103
- Rather H.A, Islam R, Malik A.A, Lone F.A. 2016. Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4°C. *Small Rumin. Res.* **141**, 24–28.
- Rob O, Herčík J. 1987. *Inseminace I*. Vysoká škola zemědělská. Praha.
- Root Kustritz M. V. 2007. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology*.
- Rubei M, Degl'Innocenti S, De Vries P. J, Catone G, Morini G. 2004. Directional freezing (Harmony Cryocare – Multi Thermal Gradient 516): a new tool for equine semen cryopreservation. 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil.
- Ramu S, Jeyendran R. S. 2012. *The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity*. Humana Press. 21-25.
- Romano JE, Christians CJ. 2009. Sperm loss using different artificial vaginas in rams. *Small Ruminant Research* **83**:85–87.
- Silva E.C.B, Cajueiro J.F.P, Silva S.V, Soares P.C, Guerra M.M.P. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology* **77**, 1722–1726.
- Sönmez M, Türk G, Yüce A. 2005. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology* **63**, 2063–2072
- Sánchez-Partida L.G, Setchell B.P, Maxwell W.M. 1997. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **9**, 689–696.
- Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke P.L, Dacheux J.L, Guerin Y, Gatti J.L, De Graaf S.P, Druart. 2014. X. Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *J. Proteom.*, **109**, 245–260
- Stojanovic S, Sprinz H, Brede O. 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **391**, 79–89.
- Singh M.P, Sinha A.K, Singh B.K. 1995. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* **43**, 1047–1053.

- Salamon S, Maxwell W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* **62**, 77–111.
- Soeparna I, Tita D.L, Lies N. 2011. The effect of caffeine egg yolk tris semen extender to the quality of separation of Garut ram sperm. *Lucr. Stiintifice Ser. Zooteh. - Univ. Stiinte Agric. Si Med. Vet. Ion Ionescu Brad Rom.* **55**, 34–36.
- Souza H.M, Arruda L.C.P, Monteiro M.M, Nery I.H.A.V, Araújo Silva R.A.J, Batista A.M, Guerra M.M.P. 2017. The Effect of Canthaxanthin on the Quality of Frozen Ram Spermatozoa. *Biopreservation Biobanking* **15**, 220–227.
- Špaleková E, Makarevich A.V, Kubovičová E, Ostró A, Chrenek P. 2014. Effect of caffeine on functions of cooling-stored ram sperm in vitro. *Acta Vet. Brno* **83**, 19–25.
- Salamon S, Maxwell W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*.
- Salamon S, Maxwell W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*.
- Sharon S, et al. 2015. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post- thawed ram semen.
- ShIPLEY C. F. B, Buckrell B. C, Mylne M. J. A, Pollard J, Hunton J. R. 2007. *Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep. Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Elsevier.
- Siddique M, Ali R, Raza A. 2006. Effect of buffers on freezing of buffalo bull semen.
- Stádník L, Doležalová M. 2015. Možnosti optimalizace oplozovací schopnosti inseminačních dávek býků, Intenzifikační faktory plodnosti skotu.
- Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders.
- Soltanpour F, Moghaddam G. 2014. Effect of diluents on storage of ram semen. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*.
- Sohnrey, B. and Holtz, W. 2005: Transcervical deep corneal insemination of goats. *J. Anim. Sci.* **83**, 1543–1548.
- Šinkorová Z, Záribnická L. 2008. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. *Vojenské zdravotnické listy*, s 98-103 Dostupné z:http://www.pmfhk.cz/VZL/vzl3_2008/05-%C5%A1inkorov%C3%A1.pdf
- Santiago-Moreno J, Coloma M, Dorado J, Pastor A, Gómez-Guillamón F, Salas-Vega R, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. 2009. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* **71**:1253–60.

Shaken M, Roshanfekar H, Mamoei M, Mirzadeh Kh. 2008. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. **3**(6), 400-408.

Šmerha J, a kol. 1980. *Reprodukce hospodářských zvířat I.*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 270s.

Tufarelli V, Lacalandra G. M, Aiudi G, Binetti F, Laudadio V. 2010. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics of Sardinian rams reared under intensive conditions. *Tropical Animal Health and Production*.

Tsakmakidis I. A. 2010. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*. **92** (1), 126-130

Tapaloaga D, Tapaloaga P. 2016. Assessment of Some Morphometric Parameters in Ram Sperm Correlated with the Collection Method. 5th International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture", *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. **10**, 340-354.

Trojan, S. a kol. 2002. *Atlas biologie člověka, Scientia*

Uysal O, Bucak M.N. 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *Acta Vet. Brno* 76, 383–390.

van Overveld F.W, Haenen G.R, Rhemrev J, Vermeiden J.P, Bast A. 2000. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem. Biol. Interact.* 127, 151–161

Věžník Z, et al. 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno.

Vishwanath R. 2003. Artificial insemination: The state of the art. *Theriogenology* 59, 571–584.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*.

Wernerová K. 2015. *Hodnocení kvality ejakulátu beranů vybraných plemen*. Brno. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, ústav chovu a šlechtění zvířat.

Wulster-Radcliffe M. C, Wang S, Lewis G. S. 2004. Transcervical artificial insemination in sheep: Effects of a new transcervical insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. *Theriogenology* **62**, 990–1002

Youngquist R. S, Threfall W. R. 2007. *Current therapy in large animal theriogenology*. Saunders, Philadelphia.

Zemánková N. 2017. Aspekty spermatologického vyšetření inseminačních dávek beranů. Brno.

Zhu W, Zhang Y, Ren CH, Cheng X, Chen JH, Ge ZY, Zun ZP, Zhuo X, Sun FF, Chen YI, Jia XJ, Zhang Z. 2020. Identification of proteomic markers for ram spermatozoa motility using a tandem mass tag (TMT) approach. *Journal of proteomics* **210**: 10343

