

# Technologie zmrazování spermií býků ve vztahu k jejich přežitelnosti a oplozovací schopnosti

---

Autoreferát doktorské disertační práce

---

Ing. Martina Doležalová

Praha 2016

Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita  
v Praze  
Kamýcká 129  
165 21, Praha 6 - Suchbátka

[www.af.czu.cz](http://www.af.czu.cz)



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů

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

**Ing. Martina Doležalová**

.....  
Katedra: Speciální zootechnika

**Technologie zmrazování spermií býků ve vztahu k jejich přežitelnosti a  
oplozovací schopnosti**

**Freezing technology of bull sperm in relation to their survivability and  
fertilization ability**

.....  
**autoreferát doktorské disertační práce**

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Speciální zootechnika

Školitel: **doc. Ing. Stádník Luděk, Ph.D.**  
katedra: speciální zootechnika

Oponenti: prof. Ing. Gustav Chládek, CSc.  
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.  
Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne: .....  
v .....hod. na: Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU  
v Praze

*S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU v Praze.*

**P r a h a 2 0 1 6**

## **OBSAH**

1	ÚVOD .....	1
2	VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	2
3	MATERIÁL A METODIKA .....	3
3.1	I. Metodický okruh .....	3
3.2	II. Metodický okruh .....	5
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	8
4.1	Odolnost spermií vůči chladovému šoku .....	8
4.2	Vliv přídatku LDL do ředidel na odolnost spermií vůči chladovému šoku .....	8
4.3	Vliv rozdílné délky ekvibrace na parametry spermií po rozmrazení .....	9
4.4	Vliv rozdílné mrazicí křivky na parametry spermií po rozmrazení .....	10
4.5	Individualita mezi býky .....	11
5	ZÁVĚR .....	13
6	SUMMARY .....	14
7	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA .....	17

# 1 ÚVOD

Průměrná úroveň plodnosti dojnic je nedostatečná a tato situace je ekonomicky dlouhodobě neudržitelná. Ekonomika chovu skotu závisí na co nejvyšší úrovni zabřezávání dojnic inseminovaných optimálně geneticky nejceněnějšími býky. Plodnost je ovlivňována mnoha genetickými faktory i faktory vnějšího prostředí. Schopnost spermií oplodnit vajíčko má zásadní význam pro efektivní management chovu skotu. Jedním z dílčích faktorů podílejících se na výsledku plodnosti dojnic, je plodnost býka. Plodnost býků je důležitým faktorem v reprodukci skotu a je reprezentována vstupní kvalitou čerstvého ejakulátu a výslednou oplozovací schopností inseminační dávky. Hlavní ekonomické ztráty chovatelů jsou způsobeny v důsledku zvýšení nákladů spojených s ustájením nezabřezlých samic, stejně jako samců, kteří nemají požadovanou kvalitu ejakulátu.

Pro úspěšné zabřeznutí jsou důležité jak samičí, tak i samčí gamety. Nejrozšířenější biotechnologickou metodou u skotu je umělá inseminace (AI), využívaná pro zlepšení parametrů reprodukce a zajištění genetického zisku. Analýza ejakulátu je v současné době nejvíce používaným postupem pro hodnocení plodnosti samců. Hlavním zájmem je produkce vysoce kvalitních inseminačních dávek (ID) a snaha dosáhnout podobného stupně zabřezávání při inseminaci rozmrazeným ejakulátem jako při využití přirozené plemenitby.

Na inseminačních stanicích po celém světě je široce využívána kryokonzervace ejakulátu býků. Nicméně významné procento spermií odumře v průběhu výroby ID právě v důsledku ztráty oplozovací schopnosti spermií vzniklé poškozením v důsledku změny teplot, respektive chladovým šokem, při procesu chlazení a mrazení ID. Najít optimální podmínky pro zpracování ejakulátu může být obtížné, vzhledem k interakcím mezi různými parametry, jako například složení ředícího média, nebo podmínky ekvilibrace a mrazení.

Udržení oplozovací schopnosti ejakulátu v průběhu dlouhého a náročného procesu jeho zpracování, ředění a mrazení, při výrobě inseminační dávky či po jejím rozmrazení může zajistit vyšší úroveň zabřezávání dojnic, snížit spotřebu inseminačních dávek, zkrátit délku mezidobí a zlepšit celkovou ekonomickou efektivitu jejich chovu.

## 2 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

- *hypotézy*
  - ❖ Předpokládáme, že ředění čerstvého ejakulátu různými typy ředidel, současně s přidavkem LDL, různým způsobem ovlivní odolnost spermií vůči chladovému šoku.
  - ❖ Lze předpokládat, že odlišné délky ekvibrace a různé technologie mrazení inseminačních dávek býků ovlivní kvalitativní parametry inseminační dávky.
  
- *Cílem práce je vyhodnotit vliv:*
  - ❖ ředění ejakulátu různými typy komerčních ředidel při konvenčním postupu i současném přidavku LDL do ředidel na kvalitativní ukazatele naředěného ejakulátu vystaveného chladovému šoku,
  - ❖ prodloužení, respektive zkrácení délky ekvibrace, současně změnu času a teploty konvenční technologie mrazení na kvalitativní ukazatele inseminační dávky po rozmrazení.

### 3 MATERIÁL A METODIKA

V průběhu 2012 – 2016 byl opakovaně odebírán ejakulát od skupiny plemenných býků (n=27, býci holštýnského a českého strakatého plemene) na inseminační stanici býků Natural s.r.o. se sídlem v Hradištku pod Medníkem, s důrazem na stejný věk, systém ustájení, výživu a ošetřování, standardně využívané pro komerční účely. Býkům byla podávána stejná krmná dávka: seno (10 kg), sláma (5 kg), sójový šrot (0,5 kg), směs obilných šrotů: 1/3 ovesného, 1/3 pšeničného a 1/3 ječného šrotu, v celkové dávce 3 kg a směs minerálií Premin 22 Natural od firmy VVS Verměřovice s. r. o. Tento minerální doplněk obsahuje: 25% žitných otrub, 25 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 19%  $\text{CaCO}_3$ , 13%  $\text{NaCl}$ , 9%  $\text{MgO}$ , 4% řepné melasy a ostatní minerály (obsah na 1 kilogram krmné směsi): Ca (11,4%), P (6%), Na (5%), Mg (5,2%), Vitamín A (1250000 i.u.), Vitamín D3 (250000 i.u.), Vitamín E (5000 mg), Vitamín B1 (61 mg),  $\text{FeCO}_3$  (8200 mg),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (600 mg),  $\text{MnO}$  (3000 mg),  $\text{ZnO}$  (5500 mg),  $\text{Ca}(\text{IO}_3)_2$  (45 mg),  $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (45 mg),  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (36,5 mg), Niacin (825 mg), Beta karoten (800 mg).

Ejakulát byl standardně odebrán pomocí umělé vaginy a neprodleně předán k hodnocení do laboratoře inseminační stanice, kde byla vyškoleným personálem na základě platné metodiky vyhodnocena jeho vstupní kvalita. Byl hodnocen objem ejakulátu (g), koncentrace ( $\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ ) a motilita spermií (progresivní pohyb spermií vpřed za hlavičkou, %). K výrobě byl využit ejakulát s minimální koncentrací spermií  $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$  a progresivní motilitou minimálně 70 %.

Metodika pokusu byla rozdělena na dva okruhy, první se týkal vlivů přídatku frakce vaječného žloutku LDL cholesterolu do několika typů ředidel na následnou odolnost spermií vůči chladovému šoku. Druhý okruh se poté věnoval další fázi procesu výroby inseminačních dávek a to hledání nejvhodnější délky ekvibrace naředěných dávek a následně mrazení dle rozdílných typů mrazicích křivek, které se lišily teplotou a rychlostí poklesu teploty v komoře mrazicího boxu a jejich vlivu na následnou životaschopnost spermií po rozmrazení.

#### 3.1 I. Metodický okruh

##### *Příprava ředidel*

V práci byly testovány dvě varianty 3 komerčně vyráběných ředidel a to kontrolní skupiny bez přídatku LDL a skupiny ředidel obohacených o přídatok LDL o určité koncentraci. Hodnocena byla ředidla: AndroMed<sup>®</sup> na bázi sójového lecitinu (Minitübe, GmbH, Tiefenbach, Germany), bezžloutkové ředidlo Bioxcell<sup>®</sup> (IMV, L'Aigle, France) a ředidlo Triladyl<sup>®</sup> obsahující 20 % přídatok vaječného žloutku (Minitübe, GmbH, Tiefenbach,

Germany). Pokusné varianty ředidel AndroMed® a Bioxcell® byly obohacené o přídavek LDL o koncentraci 4 – 8 %, ředidlo Triladyl® obsahovalo koncentraci LDL 6 – 10 %. Vyšší koncentrace LDL v ředidle Triladyl® nahrazovala přídavek vaječného žloutku, který patří mezi základní komponenty tohoto ředidla. Ředidla byla připravena přesně podle návodu výrobce a před samotným použitím byla uchována v chladicím boxu o teplotě 5 – 10 °C.

### *Ředění a zpracování ejakulátu*

Ejakulát splňující standardní vstupní podmínky byl rovnoměrně rozdělen pomocí sterilní pipety na 6 - 12 částí. Ejakulát byl po odběru uložen v chladicím boxu (4 °C) po dobu cca 1 hodiny, kdy byl převezen z inseminační stanice na ČZU. Ejakulát byl rozpipetován do předem vychlazených sterilních skleněných zkumavek (5 – 10 °C). Byly vytvořeny kontrolní varianty ředění ejakulátu ředidly AndroMed®, Bioxcell® a Triladyl® bez přídavku. Dále byly připraveny varianty ředění obohacené o přídavek LDL cholesterolu a to AndroMed® a Bioxcell® s 4 %, 6 % a 8% LDL, k ředidlu Triladyl® bylo pak přidáno 6 %, 8 % a 10 % LDL. Čerstvý ejakulát byl naředěn pomocí sterilní pipety na požadovanou výslednou koncentraci spermií  $30 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ .

### *Hodnocení odolnosti spermií vůči chladovému šoku*

Od každé varianty byly naplněny dvě skleněné kapiláry o objemu 0,1 ml o teplotě +4 ° a vložen na 10 minut do chladicího boxu (No Ice, Bibby Scientific, Ltd., Staffordshire, UK) o teplotě 0 °C. Po uplynutí stanovené doby byl objem kapiláry na hodinovém sklíčku o teplotě 37 °C smícháván s 20 µl Eosinu po dobu 30 s a poté bylo přidáno 40 µl Nigrosinu. Z výsledného roztoku bylo odebráno 20 µl a přeneseno na předehřáté podložní sklíčko, následně byl proveden roztěr. Totožný vzorek byl z chladicího boxu přemístěn do vodní lázně o teplotě 37 °C, kde byl vzorek 120 minut inkubován, a následně byl opět proveden roztěr. Pomocí barvení Eosinem a Nigrosinem byl hodnocen vliv chladového šoku na podíl živých spermií v ejakulátu na začátku a po ukončení tepelného testu přežitelnosti. Roztěry byly hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Eclipse, E200, Nikon®, Tokyo, Japan) při zvětšení 1000 x. Bylo napočítáno minimálně 100 spermií a byl zjišťován podíl živých spermií, které neměly zabarvenou hlavičku a podíl mrtvých spermií, které měly hlavičku obarvenou.

Metodický okruh I. je podrobněji definován detailními metodikami uvedenými v následujících publikacích:

- Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šimoník, O., **Doležalová, M.**, Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P. 2015. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Vet. Brno* 2015, 84: 125-131, doi: 10.2754/avb201584020125.
- Beran, J., Šimoník, O., Stádník, L., Rajmon, R., Ducháček, J., Krejčárková, A., **Doležalová, M.**, Šichtař, J. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* LXI (6), 1575-1581.
- Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Krejčárková, A., Ducháček, J., Šichtař, J. 2016. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(2): 395–399, <http://dx.doi.org/10.11118/actaun201664020395>.

### 3.2 II. Metodický okruh

#### *Ředění a zpracování ejakulátu*

Ejakulát, který splňoval vstupní podmínky byl naředěn standardně využívaným ředidlem AndroMed na bázi sojového lecitinu (Minitübe, GmbH, Tiefenbach, Germany). Naředěný ejakulát byl po promísení naplněn do pejet (0,25 ml, IMV, L'Aigle, France), zchlazen a ekvilibrován v chladicím boxu (4 °C) po dobu 30, 120 a 240 minut. Ejakulát byl následně mrazen v programovatelném mrazicím boxu (Digit Cool, IMV, L'Aigle, France) dle 4 typů mrazicích křivek lišících se teplotou a rychlostí poklesu teplot v komoře. K mrazení byla využita standardně využívaná a výrobcem doporučená 3 – fázová mrazicí křivka, kde v první fázi teplota klesala z +4 °C na -10 °C rychlostí 5 °C/min, v další fázi teplota klesala na -100 °C rychlostí 35 °C/min a v závěrečné fázi klesala na -140 °C rychlostí 20 °C/min, dále 2 – fázová mrazicí křivka, kde v první fázi teplota klesala z +4 °C na -10 °C rychlostí 4 °C/min, ve druhé fázi pak klesala na -150 °C rychlostí 40 °C/min. Dále byla vybrána 3 – fázová mrazicí křivka s pomalejším poklesem teplot v komoře, v první fázi teplota klesala z +5 °C na -5 °C rychlostí 3 °C/min, v další fázi klesala na -42 °C rychlostí 40 °C/min a ve třetí fázi klesala na -140 °C rychlostí 10 °C/min a 3 – fázová mrazicí křivka s rychlejším poklesem teplot v komoře, kde teplota klesala v první fázi z +4 °C na -10 °C rychlostí 10 °C/min, v další fázi klesala na -100 °C rychlostí 20 °C/min a v poslední fázi teplota klesala na -140 °C



rychlostí 60 °C/min. Neprodleně po mrazení byly dávky přemístěny do kontejneru s tekutým dusíkem -196 °C.

### *Hodnocení spermií*

Kvalita vyrobených dávek byla testována pomocí motility spermií zjištěné na základě CASA a podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti trvajícím po dobu 120 minut od rozmrazení dávky. V průběhu tepelného testu byly vzorky inkubovány ve výhřevném bloku o teplotě 37 °C. Pejety byly rozmrazovány ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C po dobu 30 vteřin (Rubio-Guillén et al. 2007). Následně byl jejich obsah smíchán s vytemperovaným fyziologickým roztokem (500 µl; 37,5 °C) a byla zjišťována motilita spermií (%) pomocí počítačové analýzy motility spermií CASA (SCA<sup>®</sup> Production v. 5.3., MICROPTIC, Spain) s mikroskopem s fázovým kontrastem (Eclipse E200, Nikon<sup>®</sup>, Tokyo, Japan) při 200-300x zvětšení. Z každého vzorku bylo hodnoceno 5 zorných polí (Tuncer et al. 2011). Současně byl hodnocen podíl živých spermií, ihned po rozmrazení a po 120 minutách trvání tepelného testu přežitelnosti. Sterilní nahřátou pipetou bylo ze vzorku odebráno 20 µl a přeneseno na hodinové sklíčko o teplotě 37 °C. Následně byl vzorek mícháván s 20 µl Eosinu po dobu 30 s a poté bylo přidáno 40 µl Nigrosinu. Z výsledného roztoku bylo odebráno 20 µl a přeneseno na předeřáté podložní sklíčko, následně byl proveden roztěr. Roztěry byly hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Eclipse, E200, Nikon<sup>®</sup>, Tokyo, Japan) při zvětšení 1000 x. Bylo napočítáno minimálně 100 spermií a zjišťován podíl živých spermií, které neměly zabarvenou hlavičku a podíl mrtvých spermií, které měly hlavičku obarvenou.

Metodický okruh II. je podrobněji definován detailními metodikami uvedenými v následujících publikacích:

**Doležalová, M.,** Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Stupka, R. 2016. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11): 00 -, doi:10.17221/23/2016-CJAS – accepted.

**Doležalová, M.,** Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno*, 84 (4): 383-391, doi: 10.2754/avb201584040383.

V rámci statistického hodnocení byl ve všech publikacích jako sekundární faktor hodnocen vliv individuality býka. Data byla hodnocena pomocí statistického softwaru SAS (SAS/STAT<sup>®</sup>, 2011) použitím procedury UNIVARIATE, CORR, MIXED a GLM. Podrobnější popis aplikovaných statistických modelů obsahují jednotlivé následující publikace.

## **4 VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1 Odolnost spermií vůči chladovému šoku**

Byla zjišťována odolnost spermií vůči chladovému šoku v průběhu krátkodobého chladového testu (0 °C) trvajících po dobu 10 minut po výrobě vzorků z čerstvého ejakulátu. Odolnost spermií vůči chladovému šoku je hlavní metodou hodnocení kvality spermií (Benson et al. 1967). Podíl živých spermií byl zjišťován po zahřátí vzorku a po 120 minutách trvání tepelného testu přežitelnosti. Vzorky byly vyrobeny ředěním různými komerčně vyráběnými ředidly (AndroMed<sup>®</sup>, Bioxcell<sup>®</sup>, Triladyl<sup>®</sup>) a zároveň byla ke každému z nich přidána frakce vaječného žloutku LDL o různých koncentracích: A, B – 4 %, 6 % a 8 %; T -6 %, 8 % a 10 %. Nejvyšší podíl živých spermií byl zaznamenán na začátku testu u ředidel Andromed<sup>®</sup> (71,22 %) a Bioxcell<sup>®</sup> (71,46 %), nejnižší podíl živých spermií byl zaznamenán u ředidla Triladyl<sup>®</sup> (69,46 %). Tyto výsledky souhlasí se Stradaoli et al. (2007), kteří doporučili jako nejvhodnější ředidla pro dlouhodobou konzervaci býků AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup>. Nejvyšších hodnot podílu živých spermií po 120 minutové inkubaci bylo dosaženo u ředidla Andromed, u kterého byl také současně zaznamenán nejnižší pokles podílu živých spermií v průběhu inkubace oproti ostatním ředidlům (-4,29 %; -9,31 %,  $P < 0,01$ ). Pozitivní vliv přídavku LDL do ředidel na odolnost spermií vůči chladovému šoku se projevil v celkovém průměrném poklesu podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti, kdy byl pokles hodnot nižší při přídavku LDL do ředidel o -2,42 %, rozdíly mezi hodnotami zjištěnými bez a s přídavkem LDL byly statisticky průkazné ( $P < 0,05$ ). LDL působí pozitivně na plazmatickou membránu spermie v podobě její ochrany před poškozením způsobeným chladovým šokem (Hu et al., 2010; Vera-Munoz et al., 2011).

### **4.2 Vliv přídavku LDL do ředidel na odolnost spermií vůči chladovému šoku**

Na základě studie, kde byl vyhodnocen pozitivní vliv přídavku LDL do ředidel na spermie a zvýšení jejich odolnosti vůči chladovému šoku, bylo nutné zjistit jaká koncentrace LDL v ředidlech je nejvhodnější. Byla využita komerčně vyráběná ředidla Andromed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> bez a s přídavkem LDL o koncentracích 4%, 6% a 8%, ředidlo Triladyl<sup>®</sup> bylo připraveno bez a s přídavkem LDL 6%, 8% a 10 % LDL. Byla zjišťována odolnost spermií vůči chladovému šoku v průběhu krátkodobého chladového testu (0 °C) trvajících po dobu 10 minut po výrobě vzorků z čerstvého ejakulátu. Odolnost spermií byla hodnocena podílem živých spermií po zahřátí vzorku a po 120 minutách trvání tepelného testu přežitelnosti. Shodně nejvyšších průměrných hodnot podílu živých spermií na začátku tepelného testu

přežitelnosti bylo dosaženo při ředění ředidly Andromed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> (71,65 % a 71,88 %), rozdíly mezi ředidly nebyly statisticky průkazné ( $P < 0,05$ ). Po uplynutí 120 minutové inkubace byl nejvyšší průměrný podíl živých spermií nalezen při ředění ředidlem AndroMed<sup>®</sup> (+4,23%; 11,5 %), současně také pokles v průběhu celého trvání testu byl nejnižší při použití tohoto ředidla, rozdíly oproti ostatním ředidlům (-4,24 %; -9,19 %) byly statisticky průkazné ( $P < 0,01$ ). Při hodnocení celkového přídatku LDL do ředidel (0 %, 4 %, 6 %, 8 % a 10 %) byl nejvyšší podíl živých spermií na začátku testu vyhodnocen u 8% přídatku LDL do ředidla (72,18 %), rozdíly oproti ostatním variantám přídatku LDL se pohybovaly v rozmezí +2,31 % až +0,92 %, u tohoto přídatku byl současně zaznamenán i nejvyšší pokles v průběhu testu (23,20 %), avšak nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi uvedenými variantami přídatku LDL v průběhu tepelného testu přežitelnosti spermií. Nejnižších hodnot podílu živých spermií na začátku testu bylo dosaženo ve variantách ředidel bez přídatku LDL (69,87 %), současně bylo dosaženo i nejnižšího poklesu podílu živých spermií v průběhu 120 minut trvání tepelného testu (20,12 %).

Na základě výsledků prací jiných autorů byl testován vliv určitého přídatku LDL do různých typů ředidel na odolnost spermií vůči chladovému šoku. Byla použita ředidla Andromed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> bez a s 6% přídatkem LDL, déle pak Triladyl<sup>®</sup> bez a s 10 % přídatkem LSL. Celkově nejvyššího průměrného podílu živých spermií bylo na začátku testu dosaženo při ředění ředidlem Bioxcell<sup>®</sup> s 6 % přídatkem LDL a to 69,17 % (+4,42 % až 1,31 %) a po 120 minutové inkubaci 52,94 % (+6,78 % až +1,54 %). Byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami zjištěnými u ředidla Bioxcell<sup>®</sup> s 6 % přídatkem LDL a stejným ředidlem bez přídatku na začátku testu (+3,35 %), po uplynutí 120 minut inkubace (+6,78 %) a v průběhu testu (-3,23 %) ( $P < 0,05$ ). Nejnižšího poklesu podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti spermií bylo dosaženo při použití ředidla Triladyl<sup>®</sup> bez přídatku LDL (16,01 %), naopak nejvyššího poklesu podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti spermií trvajících 120 minut bylo dosaženo u totožného ředidla s 10 % přídatkem LDL (+5,43 %;  $P < 0,05$ ).

#### **4.3 Vliv rozdílné délky ekvilibrace na parametry spermií po rozmrazení**

Byl hodnocen vliv délky ekvilibrace na následnou motilitu a podíl živých spermií. Byly testovány délky ekvilibrace 30, 120 a 240 minut v chladicím boxu (4 °C) před samotným mrazením. Nejvyšších průměrných hodnot motility v průběhu tepelného testu přežitelnosti bylo dosaženo při nejdelší hodnocené délce ekvilibrace a to 240 minut (39,83

%), naopak nejnižší motilitu vykazovala ekvilibrace trvající 30 minut (-4,58 %), zaznamenané rozdíly mezi všemi testovanými délkami ekvilibrace byly statisticky průkazné ( $P < 0,05$ ). Leite et al. (2010) dosáhli souhlasně nejvyšších hodnot motility spermií po rozmrazení při délce ekvilibrace 240 minut v porovnání s ekvilibrací trvající 120 minut a s úplným vynecháním procesu ekvilibrace. Nejvyššího průměrného rozdílu motility spermií po rozmrazení zjištěné v průběhu TDT testu přežitelnosti spermií bylo dosaženo při ekvilibraci trvající 30 minut (10,45 %), nejnižší pokles byl pak zaznamenán při ekvilibraci trvající 120 minut (-4,93 %;  $P < 0,05$ ). Při vynechání procesu ekvilibrace byl v ejakulátu zastoupen vyšší podíl spermií s intaktní membránou (Leite et al., 2010), dále byla snížena přežitelnost spermií a jejich oplozovací schopnost (Dhami et al., 1992). Nejvyšší podíl živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti byl zaznamenán při použití délky ekvilibrace 120 minut, což je standard při výrobě, avšak rozdíly oproti ostatním testovaným délkám ekvilibrace (-6,87; -8,68%) nebyly statisticky významné. Současně byl u délky ekvilibrace 120 minut zjištěn nejvyšší pokles podílu živých spermií v průběhu trvání tepelného testu přežitelnosti spermií. Tyto výsledky podpořili Herold et al. (2006), kteří vyhodnotili nejvhodnější délku ekvilibrace 120 – 540 minut. Nezbytnost procesu ekvilibrace souhlasí s tvrzením Shahverdi et al. (2014), že doba kontaktu spermií a kryoprotektantů je důležitá pro zachování motility spermií, integrity membrán a má přímý vliv na charakteristiky spermií po rozmrazení.

#### **4.4 Vliv rozdílné mrazicí křivky na parametry spermií po rozmrazení**

Nejvyšších průměrných hodnot motility v průběhu tepelného testu přežitelnosti trvajícího 120 minut po rozmrazení insemináční dávky bylo dosaženo při mrazení na základě 2 – fázové mrazicí křivky a to 35,3 %, rozdíly oproti ostatním typům mrazicích křivek byly statisticky průkazné (+4,37 %; +8,82 %;  $P < 0,05$ ). Při mrazení na základě 2 – fázové mrazicí křivky bylo dosaženo nejvyšších hodnot motility ihned po rozmrazení i v průběhu TDT testu. Nejnižších výsledků průměrné motility bylo dosaženo u 3 – fázové mrazicí křivky s pomalým poklesem teplot v mrazicím boxu (26,48 %). Zjištěné výsledky souhlasí s Januskauskas et al. (2005), podle kterých proces mrazení ovlivňuje motilitu spermií. Podle Muiño et al. (2008) metody kryokonzervace významně ovlivňuje výslednou motilitu po rozmrazení. Taktéž Defoin et al. (2008) vyhodnotil různý vliv procesu mrazení na spermie býků v závislosti na jejich individualitě. Příliš rychlý pokles teplot indukuje větší poškození spermií (Lemma, 2011).

Pro další výzkum na základě předchozích výsledků byla vybrána 2 – fázová mrazicí křivka a 3 – fázová mrazicí křivka, standardně využívaná při mrazení ejakulátu býků. Vyšších průměrných hodnot motility a podílu živých spermií ve vzorku bylo opět dosaženo při mrazení dle 2 – fázové mrazicí křivky (38,41 %), rozdíl mezi uvedenými křivkami činil +2,02 % a byl statisticky průkazný ( $P < 0,05$ ). Podíl živých spermií v průběhu TDT testu byl souhlasně vyšší při mrazení dle 2 – fázové mrazicí křivky (+11,77;  $P < 0,01$ ). Současně byly testovány interakce mezi délkou ekvibrace (30, 120 a 240 minut) a dvěma typy mrazicích křivek (2 – fázová a 3 – fázová standardní), kde byla potvrzena nejvyšší průměrná motilita spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti vždy při využití délky ekvibrace 240 minut (40,06 % a 39,61 %), nejnižších průměrných hodnot motility pak bylo souhlasně dosaženo u obou mrazicích křivek při využití délky ekvibrace 30 minut (33,28 % a 37,22 %), zatímco vliv mrazicí křivky nebyl potvrzen. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny pouze při mrazení dle 3 – fázové mrazicí křivky a to mezi ekvibrací trvající 30 a 240 minut ( $P < 0,01$ ). Nejnižší pokles motility spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti trvající 120 minut byl shodně zaznamenán při využití délky ekvibrace 120 minut u obou mrazicích křivek (-4,79 % a -5,97 %; -3,89 % a -3,34 %).

Při hodnocení průměrného podílu živých spermií bylo zjištěno, že nejnižší hodnoty poskytovala 30 minutová ekvibrace v kombinaci s mrazením jak dle 3 – fázové mrazicí křivky (-3,69% a -0,32%) tak i 2 – fázové mrazicí křivky (-13,67% a -3,29%). Nejvyšší podíl živých spermií byl vyhodnocen při kombinaci délky ekvibrace 120 minut a 2 – fázové mrazicí křivky (+21,11%, +17,42%, +20,79%, +13,67%, +10,38%). Rychlost poklesu teplot v mrazicí komoře determinuje následnou životaschopnost spermií po rozmrazení (Andrabi et al., 2007). Chen et al. (1993) vyhodnotili jako nejvhodnější mrazicí protokol pro mrazení spermií býků pokles z +5 °C do -100 °C rychlostí 15 °C/minutu. Obecně process mrazení čítající pokles teplot v mrazicí komoře od +10 °C do -100 °C přináší dobrou přežitelnost spermií po rozmrazení (Lemma, 2011).

#### **4.5 Individualita mezi býky**

Dále byla potvrzena rozdílná reakce ejakulátu různých býků na mrazení, současně také citlivost k mrazení u jednoho býka v rámci několika odběrů. Výsledky potvrdily potřebu individuální technologie zpracování ejakulátu v závislosti na býkovi pro zajištění co nejvyšší oplozovací schopnosti inseminační dávky. Obecně byla ve všech zmiňovaných studiích zjištěna individualita mezi býky ( $P < 0,05$ ). Lze tudíž tvrdit, že výsledná oplozovací schopnost inseminační dávky je ovlivněna jak individualitou býka, tak manipulací a technologií výroby

dávek před samotným mrazením. Podle Amann a Katz (2004) je odolnost spermií vůči chladovému šoku dána individualitou býků, současně také rozdílností mezi ejakuláty jednoho býka. Defoin et al. (2008) popsali rozdílný vliv mrazení na následnou motilitu spermií po rozmrazení v závislosti na individualitě ejakulátu. Oplozovací schopnost vyrobených inseminačních dávek je tudíž ovlivněna individuální odpovědí spermií na proces chlazení a mrazení (Thara a Nair, 2007).

**(Seznam použité literatury je uveden v disertační práci)**

## 5 ZÁVĚR

Přídavek LDL obecně zvyšoval odolnost spermií vůči chladovému šoku, byl zde zaznamenán nižší pokles podílu živých spermií ve vzorku v průběhu tepelného testu přežitelnosti spermií než při ředění ejakulátu ředidly bez přídavku LDL. Ředidla Andromed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> přispívají k zajištění vyšší životaschopnosti spermií, zejména se jako vhodná ukázala 6% koncentrace LDL v ředidle Bioxcell<sup>®</sup>. Po procesu ředění následoval proces chlazení a ekvilibrace, kde bylo nejvyšších hodnot motility spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti spermií po rozmrazení dosaženo při využití nejdelší ekvilibrace a to 240 minut. Na základě porovnání různých typů mrazicích křivek a jejich vlivu na oplozovací schopnost spermií po rozmrazení byl zjištěn pozitivní vliv na následnou motilitu spermií při mrazení dle 2 – fázové mrazicí křivky s pozvolným, přitom dostatečně rychlým, poklesem teplot v mrazicím boxu. Výsledná motilita po rozmrazení byla ovlivněna zejména technologií zpracování ejakulátu před samotným zmrazením. Ve všech zmíněných studiích byla souhlasně potvrzena individualita mezi býky, což poukazuje na potřebu volit individuálně ke každému býkovi jinou technologii zpracování ejakulátu a výroby inseminačních dávek. Obecně lze tedy pro zvýšení oplozovací schopnosti vyrobených dávek doporučit přídavek LDL do ředidel, která v základu neobsahují vaječný žloutek (AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup>). Současně je také spolurozhodující délka ekvilibrace, která by měla být 120 minut a déle v chladicím boxu (+4 °C) a pozvolný, přitom dostatečně rychlý pokles teplot v mrazicím boxu a to zejména pokles teplot v rozmezí +4 °C do -10 °C.



## 6 SUMMARY

The aim of optimization the insemination doses production is to provide the highest fertilization ability of spermatozoa during the demanding process of processing fresh semen and its subsequent cryopreservation. Temperature changes causes spermatozoa damage during the cooling and freezing. Spermatozoa is exposed to cold shock and many others limiting factors, which leads to cell death and therefore to decline of fertilization ability of thawed insemination doses. For increasing spermatozoa resistance, exactly the plasma membrane resistance against cold shock was fraction of egg yolk – LDL cholesterol (low density lipoprotein) at various concentrations into the commercially produced diluents added. It is believed that LDL acts positively to plasma membrane and helps to maintain the fertilization ability of spermatozoa after thawing. Following step in the process of insemination doses production is slow cooling of diluted semen and equilibration, when the straws are stored at cooling box for 30 minutes to 240 hours. This period is necessary to penetrate of certain diluent components into the spermatozoa also maintain the balance between their intracellular and extracellular concentration. Also important is subsequent freezing temperature gradient of insemination doses. The most suitable freezing method is based on computer – controlled temperature decline in freezing chamber which allows the precise control of ice crystals formation that could tear and kill the cell.

During 2012 – 2016 was repeatedly collected semen from the group of breeding bulls ( $n = 27$ , Holstein and Czech Fleckvieh breed) at AI centre. Semen which fulfill the standard entrance conditions in first step was evenly into several parts divided. For dilution the three types of commercially diluents – AndroMed<sup>®</sup>, Bioxcell<sup>®</sup> and Triladyl<sup>®</sup> with and without LDL addition were used. Into the diluents AndroMed<sup>®</sup> and Bioxcell<sup>®</sup> the concentration of LDL 4 %, 6 % and 8% into the diluent Triladyl<sup>®</sup> – 6 %, 8 % and 10 % was added. Diluted semen was filled into the glass capillaries with volume 0,1 ml and temperature +4 °C. Subsequently the sample was placed to cold bath (0°C) for 10 minutes. Then the volume of capillary with physiological solution (37 °C) was mixed and for next 120 minutes was incubated. The effect of cold shock to proportion of live spermatozoa was evaluated by using Eosin and Nigrosine staining technique during heat test of spermatozoa survivability after spermatozoa heating and after 120 minutes of incubation.

The more suitable semen diluents which provide the higher spermatozoa resistance against cold shock were AndroMed<sup>®</sup> and Bioxcell<sup>®</sup>. Together the positive effect of LDL addition into the diluents to lower decrease of proportion of live spermatozoa during heat test

was found ( $P < 0.05$ ). The most suitable LDL concentration which had a favorable influence at spermatozoa resistance against cold shock was 6 % in diluent Bioxcell<sup>®</sup>. Values of the proportion of live sperm were higher at the beginning of the heat test (+1.31% to + 3.2%) and after 120 minute incubation (+5.82% to +8.41%) compared to other diluents with and without addition of LDL.

In the next step the process of equilibration was optimized, is an important part of insemination doses production. The effect of the length of equilibration for subsequent fertilization ability of spermatozoa was evaluated using spermatozoa motility based of CASA and proportion of live spermatozoa after thawing and during heat survival test lasting 120 minutes (37 ° C). Suitable semen was diluted by commercially used diluent AndroMed<sup>®</sup> based on soya lecithin, filled into the straws (0.25 ml), cooled and equilibrated in cooling box for 30, 120 and 240 minutes and freezed in programmable freezing box applying four types of freezing curves differing in temperature rate decline. There was used standard and by producer recommended 3 – phase freezing curve, then 2 - phase freezing curve, and 3 - phase freezing curve with slower as well as rapid decline of temperature rate in freezing chamber, compared with standard freezing curve. The highest spermatozoa motility was found using 240 minutes of equilibration by +2.72% and +4.58% compared to other lengths of equilibration ( $P < 0.05 - 0.01$ ). The highest proportion of live spermatozoa was found using 120 minutes of equilibration (+6.87 % and +8.68 %). The highest average spermatozoa motility during heat test after thawing was achieved by using 2 –phase freezing curve (from +2.97% to +10.37%,  $P < 0.05$ ), also in the proportion of live spermatozoa (from + 4.37% to +8.82%,  $P < 0.01$ ). When evaluating interaction between the length of equilibration and freezing curve (standard 3 – phase and 2 – phase freezing curve), the highest average spermatozoa motility and proportion of live spermatozoa using 240 minutes of equilibration by both freezing curves was reached, there was no statistically significant differences. As well as, in all evaluated parts of this study the individual differences between ejaculate of bulls and within semen from one bull ( $P < 0.05$ ) as secondary effect were found.

To maintain good fertilization ability of semen during cryopreservation is necessary to increase the spermatozoa resistance against cold shock using addition of correct concentration of LDL into the commercially used diluents AndroMed<sup>®</sup> and Bioxcell<sup>®</sup>. Subsequently the fertilization ability of insemination dose is influenced by cooling, the length of equilibration and freezing. The length of equilibration 120 minutes and more as well as gentle way of freezing according to freezing curve, which ensures a gradual decrease of temperature in

freezing chamber provided the higher average spermatozoa motility and proportion of live spermatozoa.

## 7 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### *Vědecké publikace s IF:*

- Doležalová, M.**, Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Stupka, R. 2016. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. Czech Journal of Animal Science, 61(11): 00 -, doi:10.17221/23/2016-CJAS – accepted.
- Doležalová, M.**, Stádník, L., Biniová, Z., Ducháček, J., Beran, J. 2015. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. Acta Veterinaria Brno, 84 (4): 383-391. doi: 10.2754/avb201584040383
- Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šimoník, O., **Doležalová, M.**, Šichtař, J., Stupka, R., Folková, P. 2015. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. Acta Vet. Brno 2015, 84: 125-131, DOI: 10.2754/avb201584020125.
- Ducháček, J., Beran, J., Ptáček, M., Stádník, L., Okrouhlá, M., Toušová, R., **Doležalová, M.** 2015. Relationships of fatty acid group contents in milk and reproductive performance in Holstein cows. Turk J Vet Anim Sci, 39 (3), 357-363. doi:10.3906/vet-1411-43
- Šimoník, O., Šichtař, J., Krejčárková, A., Rajmon, R., Stádník, L., Beran, J., **Doležalová, M.**, Biniová, Z. 2015. Computer Assisted Sperm Analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. Indian Journal of Animal Sciences, 85 (1), 3-11.
- Stádník, L., Makarevich, A.V., **Doležalová, M.**, Kubovičová, E., Beran, J., Hegedušová, Z., Čítek, J., Holásek, R., Stupka, R. 2014. The yield and cell viability of bovine in vivo recovered embryos in relation to season of flushing. Journal of Animal and Feed Sciences, 23, 2014, 309-316.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., **Doležalová, M.**, Kadlecová, V., Ptáček, M. 2013. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows, Animal Reproduction Science, 142, 28-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.005>.

### *Vědecké recenzované publikace:*

- Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Krejčárková, A., Ducháček, J., Šichtař, J. 2016. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on

resistance of spermatozoa against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(2): 395–399.  
<http://dx.doi.org/10.11118/actaun201664020395>.

Beran, J., Šimoník, O., Stádník, L., Rajmon, R., Ducháček, J., Krejčárková, A., **Doležalová, M.**, Šichtař, J. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* LXI (6), 1575-1581.

**Doležalová, M.**, Stádník, L., Nejdlová, M., Němečková, D., Beran, J., Ducháček, J. 2013. The relationship between energy balance after calving and reproductive functions in Holstein dairy cows treated by the OVSYNCH system. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.* LXI (3), 601-610.

#### ***Příspěvky z konferencí publikované ve sbornících:***

Beran, J., Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Krejčárková, A., Ducháček, J., Šichtař, J. 2013. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. *Book of Abstracts of the 8th International Conference of Journal of Central European Agriculture*. 20-22. 11. 2013. Nitra, Slovak Republic. s. 32-32. ISBN: 978-80-552-1102-2.

Stádník, L., Ducháček, J., Ptáček, M., **Doležalová, M.**, Beran, J. 2015. Effect of climatic condition on basic ejaculate characteristics in Holstein bulls. In *Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 19th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) Albena, Bulgaria, 17th – 19th September 2015*, Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, Volume 50, Issue Supplement S3, s. 78-78.

Ducháček, J., Biniová, Z., Stádník, L., Ptáček, M., **Doležalová, M.**, Beran, J. 2015. Effect of breed on basic bulls semen characteristics immediately after collection. In *Reproduction in Domestic Animals, Special Issue: Proceedings of the 19th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) Albena, Bulgaria, 17th – 19th September 2015*, Wiley Online Library, Blackwell Verlag GmbH, Volume 50, Issue Supplement S3, s. 51-51.

Bezdiček, J., Stádník, L., Makarevich, A., Kubovičová, E., Louda, F., **Doležalová, M.**, Holásek, R., Hegedušová, Z., Fellnerová, I. 2014. The response to the superovulation in cows with different inbreeding level. *The 2nd International Scientific Conference*

"Animal Biotechnology" in Slovak Journal of Animal Science. 11.12.2014 Nitra, Slovak Republic, NPPC – Research Institute for Animal Production Nitra, Slovak Republic, s. 205-206 ISSN 1337-9984.

Stádník, L., **Doležalová, M.** 2015. Možnosti optimalizace oplozovací schopnosti inseminačních dávek býků. Sborník příspěvků ze semináře „Intenzifikační faktory plodnosti skotu“, 24.3.2015, Rapotín, Agrovýzkum Rapotín s.r.o., s. 25-31. ISBN 978-80-87592-23-6.

### ***Odborné publikace:***

Bezdiček, J., Stádník, L., Makarevich, A., Kubovičová, E., Louda, F., Hegedušová, Z., Holásek, R., Beran, J., **Doležalová, M.** 2015. Nepříznivé dopady inbreedingu na kvalitu a množství embryí. *Náš chov* 46 (3), 34 – 35.

**Doležalová, M.**, Stádník, L., Vodička, J. 2014. Přídavek kryoprotektantů do ředidel ejakulátu býků. *Náš chov*, 45 (7), 24-25.

**Doležalová, M.**, Stádník, L., Vodička, J. 2014. Chlazení a ekvibrace při výrobě inseminačních dávek. *Náš chov*, 45 (6), 22-23.

**Doležalová, M.**, Stádník, L., Nejdlová, M. 2014. Energetická bilance po otelení a reprodukční funkce dojníc. *Náš chov*, 45 (4), 28-32.

**Doležalová, M.**, Stádník, L., Beran, J. 2013. Inseminace – intenzifikační faktor reprodukce. *Náš chov*, 44 (10), 56-57.

**Doležalová, M.**, Stádník, L., Louda, F. 2013. Zásady manipulace s inseminačními dávkami. *Náš chov*, 44 (6), 10-13.

**Doležalová, M.**, Stádník, L. 2013. Metody mrazení ejakulátu býků. *Náš chov*, 44 (5), 36-38.

### ***Certifikované metodiky:***

Stádník, L., **Doležalová, M.**, Ducháček, J. 2015. Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky. Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 21.12.2015, č.j. 17210/2015-5, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 27 stran. ISBN 978-80-213-2615-6.

Stádník, L., Beran, J., **Doležalová, M.**, Ducháček, J., Toušová, R. 2014. Vybrané faktory ovlivňující kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků. Uplatněná

certifikovaná metodika, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-8, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 37 stran. ISBN 978-80-213-2536-4.

Beran, J., Stádník, L., **Doležalová, M.**, Toušová, R. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. Uplatněná certifikovaná metodika, certifikace 30.12.2014, č.j. 17210/2014-7, ČZU v Praze, Copy Centrum Powerprint, Praha, 1. vydání, 30 stran. ISBN 978-80-213-2537-1.