

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Perspektivní kryoprotektory využívané při konzervaci
spermatu u původních plemen ovcí v ČR**

Bakalářská práce

Adéla Jirásková

Chov hospodářských zvířat

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

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Perspektivní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u původních plemen ovcí v ČR" jsem vypracoval(a) 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(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martinu Ptáčkovi Ph.D. za cenné rady, veškeré konzultace a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu a motivaci ve studiu.

Perspektivní kryoprotektory využívané při konzervaci spermatu u původních plemen ovcí v ČR

Souhrn

Kryokonzervace ejakulátu se používá jako metoda zachování genetického materiálu, a je tudíž důležitá pro záchranu původních plemen ovcí. Kryokonzervace umožňuje uchovat spermie v extrémně nízkých teplotách až do doby, kdy jsou potřeba pro inseminaci nebo jiné reprodukční techniky. V případě původních plemen ovcí může být kryokonzervace ejakulátu klíčovou metodou pro zachování genetické rozmanitosti. Uchování spermatu by mohlo umožnit obnovu populace daného plemene a tím i ochranu jeho genetického materiálu pro budoucí generace. Nicméně beraní semeno je náchylné na poškození v průběhu kryokonzervace a po jeho následném rozmrazení. Z tohoto důvodu bylo cílem bakalářské práce zpracovat formou literární rešerše souhrn poznatků o moderních kryoprotektorech.

Kryoprotektory jsou látky používané k ochraně spermatu před poškozením během procesu zmrazování a rozmrazování. Tyto látky pomáhají snížit tvorbu ledových krystalů ve spermatických buňkách, což umožňuje zachovat životaschopnost spermatu pro inseminaci. Nejčastěji používaným kryoprotektorem je glycerol. V této práci budou zmíněny například i amidy, antioxidanty, vitamíny a aminokyseliny. Výzkum v oblasti kryoprotekce spermatu beranů stále pokračuje a hledají se nové látky s lepšími kryoprotektivními vlastnostmi a menšími vedlejšími účinky. V poslední době byly zkoumány kryoprotektory založené na přírodních látkách, jako jsou například rostlinné extrakty, mezi které patří hřebíček a rozmarýn.

V návaznosti na výzkum kryoprotekce spermatu je také důležité sledovat a optimalizovat postupy výroby inseminačních dávek s cílem zlepšit úspěšnost inseminace. Výroba inseminačních dávek ovcí začíná sběrem ejakulátu od beranů pomocí umělé vagíny nebo elektroejakulace. Po odběru následuje vyšetření a ředění speciálními ředidly. Zředěný ejakulát se uchovává v chlazeném nebo zmrazeném stavu. Inseminace ovcí je moderní metoda reprodukce, která umožňuje chovatelům zlepšit genetické vlastnosti stáda a zvýšit jeho výkonnost. Beran hraje klíčovou roli v procesu inseminace ovcí, protože poskytuje kvalitní sperma, které je nezbytné pro úspěšné oplodnění vajíčka. Bakalářská práce popisuje 4 typy metod inseminace: intravaginální, intracervikální, transcervikální a laparoskopická.

Klíčová slova: genová rezerva, inseminace ovcí, průtoková cytometrie, CASA, ředidlo

Promising cryoprotectors used for the ram semen preservation in original Czech sheep breeds

Summary

Cryopreservation of semen is used as a method of preserving genetic material and is therefore important for the conservation of original sheep breeds. Cryopreservation allows sperm to be stored at extremely low temperatures until they are needed for insemination or other reproductive techniques. In the case of original sheep breeds, semen cryopreservation may be a key method for preserving genetic diversity. Preserving semen could enable the restoration of the population of a given breed and thus protect its genetic material for future generations. However, ram semen is susceptible to damage during cryopreservation and after subsequent thawing. For this reason, the aim of the bachelor thesis was to process a summary of knowledge on modern cryoprotectants in the form of a literary research.

Cryoprotectants are substances used to protect sperm from damage during the freezing and thawing process. These substances help to reduce the formation of ice crystals in sperm cells, allowing the sperm to remain viable for insemination. The most commonly used cryoprotectant is glycerol. This work will also mention compounds such as amides, antioxidants, vitamins, and amino acids. Research in the field of ram sperm cryopreservation is ongoing, and new substances with better cryoprotective properties and fewer side effects are being sought. Recently, natural-based cryoprotectants have been investigated, such as plant extracts, including clove and rosemary.

In connection with the research on cryopreservation of sperm, it is also important to monitor and optimize the production procedures of insemination doses in order to improve the success rate of insemination. The production of sheep insemination doses begins with the collection of semen from rams using either an artificial vagina or electroejaculation. After collection, the semen is evaluated and diluted with special diluents. The diluted semen is stored in a cooled or frozen state. Sheep insemination is a modern reproductive method that allows breeders to improve the genetic traits of their flock and increase its performance. Rams play a crucial role in the sheep insemination process as they provide high-quality sperm necessary for successful fertilization of the egg. The bachelor's thesis describes four types of insemination methods: intravaginal, intracervical, transcervical and laparoscopic.

Keywords: gene sources, sheep insemination, flow cytometry, CASA, diluent

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Spermatogeneze.....	10
3.2 Ejakulát.....	11
3.3 Odběr ejakulátu.....	11
3.3.1 Odběr do umělé vagíny	12
3.3.2 Elektroejakulace.....	13
3.4 Hodnocení ejakulátu.....	13
3.4.1 Makroskopické.....	13
3.4.2 Mikroskopické.....	14
3.5 Zpracování	15
3.5.1 Ředění.....	15
3.5.2 Konzervace.....	16
3.5.2.1 Konzervace chlazením	17
3.5.2.2 Konzervace mražením	17
3.6 Kryoprotektory	18
3.6.1 Intracelulární kryoprotektory	19
3.6.1.1 Glycerol.....	19
3.6.1.2 Amidy.....	20
3.6.2 Extracelulární kryoprotektory.....	21
3.6.2.1 Vaječný žloutek	21
3.6.2.2 Cukry.....	21
3.6.2.3 Antioxidanty.....	22
3.6.2.4 Vitamíny.....	23
3.6.2.5 Melatonin	23
3.6.2.6 Aminokyseliny.....	24
3.6.2.7 Proteiny	25
3.6.2.8 Jiné sloučeniny	26
3.7 Rozmrazení před inseminací.....	27
3.8 Lyofilizace	27
3.9 Stanovení fertilizační schopnosti in vitro.....	29
3.9.1 Počítačová analýza CASA.....	29

3.9.2	Průtoková cytometrie	30
3.9.3	Hypoosmotický test HOS.....	32
3.9.4	Vyšetření struktury chromatinu spermií SCSA	33
3.10	Stanovení fertilizační schopnosti in vivo (inseminace)	33
3.10.1	Intravaginální inseminace	33
3.10.2	Intracervikální inseminace.....	34
3.10.3	Intrauterinní transcervikální inseminace	34
3.10.4	Laparoskopická inseminace.....	34
4	Závěr	36
5	Literatura.....	37
6	Seznam použitých zkratk a symbolů	47
7	Seznam obrázků	48
8	Seznam tabulek	49

1 Úvod

Zmrazování spermií beranů s využitím kryoprotektorů je velmi důležité v moderním chovu ovcí, protože umožňuje zlepšit genetický potenciál stáda a minimalizovat riziko přenosu pohlavních chorob a infekce mezi zvířaty. Kryoprotektory jsou klíčovým prvkem pro úspěšné mrazení spermií, uchovávání po dobu několika měsíců až let bez výrazného snížení kvality a jejich následné použití pro umělou inseminaci.

2 Cíl práce

Důležitým bodem záchranného programu původních plemen ovcí je vytvoření dostatečného reservoáru kvalitních inseminačních dávek dlouhodobě uchovávaných v tekutém dusíku. Obecně je známo, že sperma u malých přežvýkavců má nízkou toleranci vůči konzervaci tímto způsobem. Proto všechny informace, které vedou ke zlepšení kryokonzervace, jsou důležité s ohledem na záchranu původního českého genofondu ovcí. Cílem bakalářské práce je soupis aktuálních poznatků tematicky zaměřených na využití perspektivních kryoprotektorů při konzervaci semene. Dalším cílem bakalářské práce bude navržení možných postupů pro optimalizaci výroby inseminačních dávek, popř. potenciálního zlepšení úspěšnosti při následné inseminaci.

3 Literární rešerše

3.1 Spermatogeneze

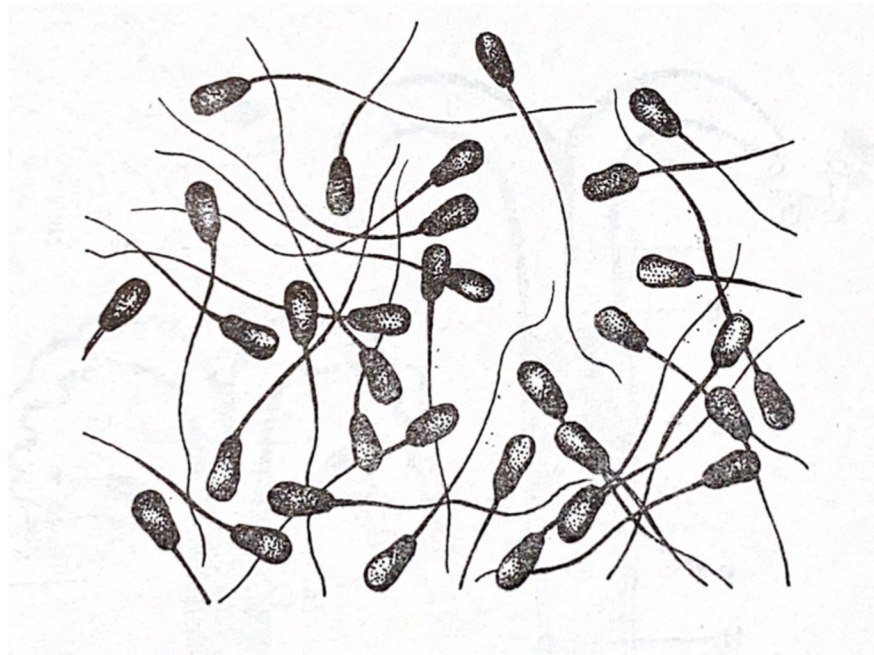
Spermatogeneze je složitý a specializovaný proces redukce DNA a metamorfózy zárodečných buněk. Spermatogeneze zahrnuje (1) proliferační fázi, kdy se spermatogonie dělí, aby nahradily jejich počet nebo se diferencovaly na dceřiné buňky, které se stávají zralými gametami, (2) meiotická fáze, kdy zárodečné buňky procházejí redukčním dělením, jehož výsledkem jsou haploidní (polovina normálního komplementu DNA) spermie a (3) fáze spermiogeneze, ve které spermie procházejí hlubokou metamorfózou, aby se staly zralými spermii (Partin 2021).

V prvním meiotickém dělení vytváří každý chromozóm dvě chromatidy, které zůstávají spojeny a proto mají duplikované geny. V okamžiku dělení primárního spermatocytu na dva sekundární spermatocyty obsahuje každý spermatocyt jeden chromozóm. Ve druhém meiotickém dělení vznikají ze sekundárního spermatocytu dvě spermie. V tomto procesu dojde k oddělení chromatid a vytvoří se dva duplicitní soubory genů. Každý soubor následně přejde do jedné ze dvou vzniklých spermií. Každá spermie obsahuje jen jednu sadu chromozómů (Reece 2011). Spermie se zanořují do záhybů cytoplazmatické membrány podpůrných buněk, kde z nich složitým procesem metamorfózy vznikají bičíkaté spermie. Hotové spermie se uvolňují z podpůrných buněk, přecházejí do lumenu kanálku a jím do vývodných cest. Vrstva zárodečného epitelu obsahující spermie a spermie se označuje jako pásmo metamorfózy (Marvan et al. 2017).

Spermie

V období pohlavního dospívání, u berana ve věku 3 – 6 měsíců, začíná spermatogeneze a v lumenu kanálků se objevují první volné spermie (Marvan et al. 2017). Spermie je samčí pohlavní buňka složená z hlavičky a bičíku. Na bičíku se dále nachází krček, spojovací část, hlavní a koncový oddíl. Hlavička vznikla z jádra a bičík z cytoplazmy spermie (Míhlová & Lipský 1976). Celou spermii pokrývá cytoplazmatická membrána, která obsahuje bílkovinu podobnou keratinu. Je bohatá na histidin, cystin a arginin. Membrána je acidorezistentní a permeabilní. Bílkovina tvoří více než polovinu hmotnosti spermie (Gamčík & Kozumplík 1984).

Zrání spermii je částečně regulováno proteiny přítomnými v epididymální tekutině (Dacheux et al. 2009). Spermie však dosáhnou své plné fertilizační schopnosti až po ejakulaci, kdy se dostanou do kontaktu se sekrety přídatných pohlavních žláz a podstoupí druhou sérii biochemických a strukturálních změn (van Tilburg et al. 2013). Zralé spermie jsou vysoce specializované buňky se specifickými funkcemi zaměřenými na oplodnění. Proces oplodnění u savců vyžaduje, aby se spermie navázaly a pronikly do zona pellucida, která obklopuje oocyt (Luna et al. 2015).



Obrázek 1: Spermie berana (Miholová & Lipský 1976)

3.2 Ejakulát

Ejakulát berana se vyznačuje malým objemem a vysokou koncentrací spermií (Maxwell & Evans 1987). Ejakulát se skládá ze spermií a výměšků přídatných pohlavních žláz. Obsahuje i buněčné elementy, mezi které patří odloupané epitelie a leukocyty. Přes 90 % jeho celkové hmotnosti tvoří voda. Z anorganických látek obsahuje Na, K, Cl, P a stopy Mg. Z organických látek bílkoviny, cukry, tuky (Miholová & Lipský 1976). Hlavní podíl ejakulátu představuje svým objemem semenná plazma (u berana 70 – 75 %), která je tvořena převážně výměšky přídatných pohlavních žláz. Semenná plazma vytváří svým pestrým chemickým složením přirozené prostředí pro spermie, které je chrání před nepříznivými vlivy, umožňuje jejich pohyb a je zdrojem výživy (Marvan et al. 2017). Na kvalitu i kvantitu má vliv mnoho faktorů, mezi hlavní faktory patří stáří, ustájení, pohyb a výživa. Množství a složení ejakulátu se u jednotlivých druhů zvířat liší. Ejakulát berana má objem 1 – 2 ml a obsahuje 2 – 10 miliard spermií. Vzhled je řídký, smetanovitý (Miholová & Lipský 1976).

3.3 Odběr ejakulátu

Sperma beranů se odebírá hlavně ze dvou důvodů: pro hodnocení zdravého chovu (plodnost) a k použití pro umělou inseminaci (Matthews et al. 2003). Nejčastěji se u beranů semeno odebírá do umělé vagíny, ojediněle se používá i elektroejakulace (Gamčík & Kozumplík 1984).

3.3.1 Odběr do umělé vagíny

Umělá vagína je široce používána pro odběr spermatu přežvýkavců. Jedná se o praktickou metodu a použití této techniky nevede ke změnám v kvalitě spermatu ve srovnání s přirozenou plemenitbou (Abril-Sánchez et al. 2019). Umělá vagína se sládá z vnějšího válce a vnitřní vložky (Gamčík & Kozumplík 1984). Na jeden konec je připevněna skleněná nebo plastová sběrná nádoba a na ni je aplikován kryt nebo rukáv, aby se zabránilo chladovému šoku spermii. Otevřený konec je lubrikován nespermicidním sterilním gelem. Každý beran by měl mít svou vlastní umělou vagínu, která musí být vyčištěna vodou, opláchnuta alkoholem a mezi použitím by měla být vysušena na vzduchu. Odběratelé mají při manipulaci a odběru čisté vyšetřovací rukavice. Těsně před použitím je třeba umělou vagínu do poloviny naplnit vodou o teplotě 50 – 55 °C a na jeden konec zasunout sběrnou nádobku. Správného tlaku se dosáhne vhnáním vzduchu do umělé vagíny přes ovládací ventil. Přesný tlak a teplota se budou u jednotlivých beranů lišit, ale konečná sběrná teplota se pohybuje mezi 40 – 45 °C (Shipleý et al. 2007). Jako atrapa se používá ovce v říji, ovce s uměle vyvolanou říjí, beran, nebo vhodně přizpůsobený fantom. Po ejakulaci se umělá vagína opatrně drží kolmo dolů, aby se ejakulát dostal co nejdříve do sběrače semene, který se odevzdá do laboratoře (Gamčík & Kozumplík 1984). U beranů se běžně provádí 2 – 3 odběry za den. Objem spermatu odebraného umělou vagínou je 0,5 – 2,0 ml (Liu & Ott 2018). Umělá vagína vyžaduje předchozí trénink beranů, je časově náročnější, ale vede k odběru lepších vzorků spermatu s vyšší koncentrací a lepším procentem živých spermii (Matthews et al. 2003).



Obrázek 2: Umělá vagína (osobní archiv)

3.3.2 Elektroejakulace

Elektroejakulace je spolehlivou metodou získávání vzorku spermatu. Obvykle se používá u mladých beranů, kteří nejsou vycvičeni k používání umělé vagíny (Napolitano et al. 2020). Použití elektroejakulace spočívá v podávání elektrických impulzů do samčího rekta pomocí transrektální sondy vybavené elektrodami. To vyvolává erekci penisu, emisi semene a nakonec ejakulaci (Brindley 1981). Mezi nejběžnější vybavení patří sonda Bailey nebo Ruakura. Tyto typy sond mají jednoduchý vypínač, který poskytuje stimulaci 10 – 15 voltů 30 – 50 sinusových nebo čtvercových vln. Berani mohou být odebíráni se sedativy nebo bez nich, v závislosti na dovednostech asistentů, frekvenci a cílech odběru. Beran by měl být v poloze na boku. Penis se uchopí těsně pod žaludem sterilní gázovou houbou a močová trubice směřuje do sběrné nádoby. Je třeba dbát na to, aby se sperma nedostalo do chladového šoku, proto je vhodné použít vodní lázeň kolem odběrové nádoby. Rektum se zbaví výkalů a na sondu i řitní otvor se nanáší gel. Jemná masáž žláz pomůže stimulovat berana a usnadnit odběr. Obecně se tento postup provádí po dobu 10 – 15 sekund a poté se stimulace aplikuje pomocí sondy v rytmické sekvenci 3 – 5 sekund zapnuto a 5 – 15 sekund vypnuto. K ejakulaci dochází po 3 – 5 stimulacích (Shiple et al. 2007). Elektroejakulací se semeno může odebírat bez poškození kvality spermií a škodlivého vlivu na zdravotní stav berana (Gamčík & Kozumplík 1984). U beranů mají spermie odebrané pomocí elektroejakulace více intaktní plazmatické membrány a mají normální mitochondriální funkci ve srovnání se spermii odebranými pomocí umělé vagíny (Ledesma et al. 2014). Marco-Jiménez et al. (2005) ve své studii uvedli, že ve vztahu k metodě odběru byla ovlivněna pouze koncentrace spermií s výrazně nižším počtem spermií na mililitr v ejakulátech získaných pomocí elektroejakulace, než pomocí umělé vagíny. Elektroejakulací byl získán ejakulát o objemu 1,0 ml a koncentraci spermií $5,2 \times 10^9/\text{ml}$, zatímco při odběru umělou vagínou byl objem spermií 1,2 ml a koncentrace $6,2 \times 10^9/\text{ml}$.

3.4 Hodnocení ejakulátu

Počáteční hodnocení vzorků čistého spermatu se provádí ihned po odběru (Mocé & Graham 2008). Ejakulát můžeme hodnotit makroskopicky, mikroskopicky a pomocí in vitro analýz, kterým bude věnována celá kapitola níže.

3.4.1 Makroskopické

Pohlavně dospělý zdravý beran má objem ejakulátu v průměru 1 – 1,5 cm³. Nejmenší průměrný objem semene bývá na jaře, v létě se postupně zvětšuje a na podzim je největší. Jestliže se ejakulát odebírá v průběhu celého roku, rozdíly podle ročního období jsou malé. Objem ejakulátu ovlivňuje věk, plemeno, živá hmotnost berana, výživa, metoda a frekvence odběru. Minimální objem beraního ejakulátu, který je možné použít pro umělou inseminaci je 0,7 cm³ (Gamčík & Kozumplík 1984). Objem spermatu lze určit pomocí odměrných značek na

odběrové zkumavce, nalitím spermatu do odměrného válce nebo zvážením vzorku (Mocé & Graham 2008).

Beraní sperma dobré kvality je neprůhledná, hustá tekutina smetanovité konzistence, která má vysokou viskozitu a dobrou zrnitost (Gamčík & Kozumplík 1984). Barvu podmiňuje hustota a konzistence semene. Sperma bývá krémově šedé až mléčné (Gamčík & Kozumplík 1984). Mocé & Graham (2008) uvádí, že by ejakulát měl mít bílý vzhled. Semeno může být znečištěno chlupy, vazelínou, kožními parazity, prachem, krví, močí, případně hnisem. Používá se pouze čisté semeno (Gamčík & Kozumplík 1984).

3.4.2 Mikroskopické

Semeno berana je možné podle hustoty rozdělit na 6 stupňů. Např. velmi husté sperma (VH) obsahuje $4 - 5 \times 10^6$ spermií v mm^3 a velmi řídké sperma (O) obsahuje 1×10^6 spermií v mm^3 . V použitelném semeni nesmí klesnout koncentrace spermií pod 2×10^6 spermií v mm^3 (Gamčík & Kozumplík 1984). Koncentraci spermií je možné určit počítáním buněk ve vyhrazené počítací komoře nebo hemocytometru, např. Bürker-Türk. Hemocytometry se vyznačují vysokou přesností a nízkou cenou, jejich použití je však časově náročné a zdlouhavé. Pro stanovení koncentrace buněk lze také použít automatizovanou fluorescenční mikroskopii ve formě nukleopočítačů (Pataki et al. 2022). Koncentrace spermií v ejakulátu je potřebná k určení, jak moc je třeba vzorek naředit před použitím nebo zmrazením, aby bylo možné zahrnout definovaný počet spermií do inseminační dávky (Mocé & Graham 2008).

Motilita je jedním z nejdůležitějších parametrů používaných pro hodnocení kvality spermií, poskytuje důležité informace o energetickém stavu spermií (Palacín 2013). Pohyblivost spermií berana se bez zředění nemůže spolehlivě určit, proto se zředí nejčastěji teplým citrátem sodným v poměru 1 : 20 ($0,01 \text{ cm}^3$ semene : $0,2 \text{ cm}^3$ citrátu sodného). Množství pohyblivých spermií zjištěných odhadem se vyjadřuje desetibodovou stupnicí, přičemž jeden supeň představuje 10 % spermií z celkového počtu. Jestliže počet progresivně se pohybujících spermií klesne pod 70 %, ejakulát této kvality se nepoužívá (Gamčík & Kozumplík 1984).

pH ejakulátu berana se pohybuje v rozpětí 6,4 – 7,2. Hodnota pH přímo závisí na hustotě semene. Ejakuláty dobré kvality mají pH 6,4 – 6,6, zatímco ejakuláty horší kvality mají pH 6,9 – 7,2. Zvyšování pH nad 7,0 bývá zároveň důkazem poklesu koncentrace spermií (Gamčík & Kozumplík 1984).

Tabulka 1: Vlastnosti semene berana (Gamčík & Kozumplík 1984)

Objem	1 – 1,5 cm^3
Konzistence	Smetanovitá

Barva	Mléčná, krémová
Pach	Nevýrazný
Minimální koncentrace v 1 mm ³	2 × 10 ⁶
Minimální aktivita	70 %
pH	6,4 – 6,6

3.5 Zpracování

3.5.1 Ředění

Samotná semenná plazma poskytuje spermii pouze omezenou ochranu proti změnám teploty (Salamon & Maxwell 1995). Sperma berana se ředí v poměru 1 : 4 – 8, podle kvality semene a použité technologie konzervování. Aby se zabránilo chladovému šoku, je třeba semeno ochlazovat z pokojové teploty postupně. Nejprve na 15 °C a dále na 2 °C. Ředěné semeno se nejlépe uchovává při teplotě 2 °C. Z jednotlivých ředidel se nejvíce osvědčili glukózovo-citrátové ředidlo a glukózovo-fosfátové ředidlo. Dále je možné použít mléčno-žloutkové ředidlo (Gamčík & Kozumplík 1984). Nově vyvinutá ředidla, používaná především pro kryokonzervaci, jsou založena na disacharidech, trisacharidech, komplexních polysacharidech nebo jiných komplexních molekulách (Cseh et al. 2012). Na potlačení mikroflóry se mohou do ředidla přidávat také antibiotika: Penicilin, Streptomycin, Chloramphenicol, Polymyxin nebo Gentamycin (Gamčík & Kozumplík 1984).

Ředidla založená na citrátovém pufru v kombinaci s cukrem byla testována na spermatu berana, protože se osvědčila při zmrazování býčího semene. Tato média však měla při úpravě pro semeno berana omezení a většina z nich byla upravena. Názory se lišily na typ cukru, který má být použit v citrátových médiích. Emmens & Blackshaw (1950) zjistili, že zahrnutí 0,9 – 1,25 % arabinózy poskytlo nejlepší přežití spermií po rozmrazení. Jiní preferovali 1,25 % fruktózy nebo 1,5 – 4,0 % glukózy. Většina výzkumníků zjistila, že regenerace spermií po rozmrazení se zlepšila, když se zvýšila tonicita ředidla (Salamon & Maxwell 1995).

Mléko je izotonické médium obsahující mnoho složek příznivých pro udržení životaschopnosti spermií. Sperma berana bylo ředěno mlékem hlavně pro okamžité použití nebo pro konzervaci v chlazeném stavu (Salamon & Maxwell 1995). Pro zmrazování beraního semene bylo mléko upraveno v kombinaci s arabinózou, fruktózou nebo vaječným žloutkem (Salamon & Maxwell 2000). Yániz et al. (2005) ve své studii zkoumali přežití spermií v mléčném ředidle s přísadkou želatiny (1,5 g želatiny/100 ml ředidla) při teplotě skladování 15 °C. Byla zjištěna míra motily 51 % v ředidle s želatinou, zatímco u samotného ředidla 44 %. Skladování v želatině by mohlo mít dva pozitivní účinky: zabránit sedimentaci spermií a imobilizovat spermie (snížit metabolické nároky na pohyb) (Yániz et al. 2005).

Úspěšné použití mléčného cukru laktózy jako hlavní složky ředidel pro zmrazování býčího semene podnítilo jeho použití pro semeno beranů. Uvádí se, že kombinace laktózy s dalšími složkami, jako je rafinóza a citrát, zlepšuje kryoprotektivní účinek ve srovnání s jednoduchým médiem laktóza-žloutek. Dále bylo zjištěno, že disacharidy (laktóza a sacharóza) jsou účinnější při snižování krystalizační teploty během zmrazování než monosacharidy (Salamon & Maxwell 1995).

Sacharóza byla používána jako hlavní složka syntetických ředidel, protože bylo zjištěno, že chrání integritu akrozomů spermií lépe než glukóza, fruktóza nebo laktóza. Vzhledem k tomu, že semeno berana neobsahuje žádné antioxidanty (na rozdíl od jiných druhů), syntetické antioxidanty byly obecně přidávány k ředidlům sacharózy, aby inhibovaly peroxidaci fosfolipidů spermií, zejména nenasycených mastných kyselin (Salamon & Maxwell 1995).

Komerčně dostupná ředidla

BioXcell je ředidlo bez živočišných bílkovin (na bázi sójového lecitinu), které se běžně používá pro konzervaci spermií beranů a býků. INRA96 je ředidlo na bázi mléka, které bylo primárně vyvinuto k udržení plodnosti semene hřebců, ale v posledních letech se používá také pro sperma jiných druhů včetně ovcí a poskytuje přijatelnou plodnost po cervikální inseminaci. Mezi další komerčně dostupná ředidla patří AndroMed, které je na bázi sójového lecitinu bez vaječného žloutku (Murphy et al. 2017).

O'Hara et al. (2010) konstatují, že skladování semene berana v INRA96 při konstantní teplotě 15 °C vedlo k významnému snížení motility spermií, ale když bylo skladováno při teplotě 5 °C, INRA96 fungoval dobře jak z hlediska fertility in vitro, tak in vivo. V současné studii INRA96 zaznamenala druhé nejvyšší skóre celkové a progresivní motility ve srovnání s ostatními ředidly (O'Hara et al. 2010).

Gil et al. (2003) uvedli nedostatek rozdílů v motilitě a kapacitním stavu mezi semenem berana nařazeným v BioXcell a jiným kontrolním ředidlem. Dále neuvedli žádný rozdíl v plodnosti, což naznačuje, že ačkoli BioXcell nezlepšil kvalitu spermií in vitro ani in vivo, mohl by nabídnout bezpečnější alternativu k uchování spermatu berana kvůli sníženému zdravotnímu riziku (neobsahuje živočišné bílkoviny). Murphy et al. (2017) ve své studii zmiňují, že BioXcell hůře toleruje kolísání teploty, což má za následek snížení plodnosti.

Kasimanickam a kol. (2011) uvedli, že ředidla na bázi sóji mají podobné ochranné účinky jako vaječný žloutek a jsou lepší, než ředidla na bázi mléka.

3.5.2 Konzervace

V současnosti se pro skladování spermatu berana používají dvě hlavní metody: konzervace chlazením a konzervace mrazením (Allai et al. 2018).

3.5.2.1 Konzervace chlazením

Hlavní způsoby skladování spermatu v chlazeném stavu jsou skladování při snížené teplotě 0 – 5 nebo 10 – 15 °C (Salamon & Maxwell 2000). Cílem snížení teploty je zpomalit bazální metabolismus a prodloužit životnost spermií od ejakulace po inseminaci (Faigl et al. 2012). Během skladování v tekutém stavu spermie podléhají sedimentaci, což může způsobit výkyvy pH a místní zvýšení koncentrace metabolických produktů (Anel et al. 2006). V současnosti se pro skladování chlazeného semene berana obecně používají ředidla na bázi vaječného žloutku a mléka. Chlazené zředěné sperma je dobrou alternativou ke zmrazenému spermatu, pokud se použije během krátké doby po odběru (Kasimanickam et al. 2011). Salamon et al. (1979) zaznamenali přijatelnou plodnost při použití zředěného, chlazeného semene berana, skladovaného po dobu až 6 dní. Údaje, které získal O'Hara et al. (2010) ukazují, že semeno berana chlazené a skladované při teplotě 15 °C má kratší životnost než při teplotě 5 °C. Skladování při 5 °C udrželo přijatelnou pohyblivost a životaschopnost až 72 hodin ve srovnání se skladováním při 15 °C.

3.5.2.2 Konzervace mrazením

Spolehlivá metoda dlouhodobého konzervování semene je velmi důležitým opatřením pro intenzifikaci reprodukce ovcí (Gamčík & Kozumplík 1984). Kryokonzervace vede k možnosti distribuce uskladněného spermatu pro inseminaci samic po celém světě. Po odběru se sperma zředí, ochladí a konzervuje (Mortazavi et al. 2020). Po naředění se musí sperma pomalu ochladit na 5 °C. Chlazení by mělo proběhnout během 1,5 – 2,0 hodin (Shipley et al. 2007). Poté lze sperma zamrazit ve formě pelet nebo pejet (Faigl et al. 2012). Na hluboké zmrazování lze použít pouze semeno o koncentraci nejméně $3 - 4 \times 10^6$ spermií v mm^3 s aktivitou 80 % (Gamčík & Kozumplík 1984). Spermie jsou během procesu kryokonzervace vystaveny drastickým změnám teploty, tvorbě ledových krystalů a různým typům stresu (fyzikálnímu, chemickému, osmotickému a oxidačnímu), které zhoršují kvalitu spermií a jejich plodnost (Peris-Frau et al. 2020). Při kryokonzervaci dochází k destabilizaci plazmatické membrány spermií, změně membránové aktivity ATPázy a peroxidaci lipidů v důsledku tvorby reaktivních forem kyslíku (Mortazavi et al. 2020). U malých přežvýkavců obsahuje plazmatická membrána spermatu vysoké hladiny nenasycených fosfolipidů a nízké hladiny cholesterolu. Takové složení, zejména nižší obsah cholesterolu, snižuje odolnost spermií vůči procesu zmrazování a rozmrazování (Peris-Frau et al. 2020). Tyto rozdíly činí spermie berana velmi náchylné k peroxidaci lipidů plazmatické membrány (Mortazavi et al. 2020). Poškození akrozomu spermií beranů po hlubokém zmrazování je vyšší, než u spermií býků. Normální (nepoškozený) akrozomální systém u beranů má jen 11,3 – 16,0 %, zatímco u býků 28,7 – 30,0 % spermií. Při použití alumíniové fólie je procento traumatizace akrozomu spermie nižší. Důležitým činitelem je také teplota při chlazení a rozmrazování, případně rychlost jejího snižování. Až 50 % spermií se poškodí během ředění a zchlazování a dalších 50 % během zmrazování a rozmrazování. Podle intenzity stupně poškození lze použít toto hodnocení poškození akrozomu: intaktní membrána, lehký stupeň bobtnání, ruptura akrozomových membrán, ztráta akrozomu a

postakrozomální čepičky. Další částí spermie, které ovlivňuje neadekvátní prostředí vyvolané konzervací spermatu, je mitochondriální oddíl bičíku. Jeho poškození způsobuje porušenou motilitu a spermie se pohybují na místě. Jen v menší míře změnám podléhá bičík spermie. Na mitochondriálním a terminálním oddílu lze najít bobtnání, zkřivení nebo různé tvary, případně stupně kličkovitého otočení bičíku. Na krčku spermie se může vzácněji vyskytnout zřasení membrán (Gamčík & Kozumplík 1984).

Zmrazování semene do pejet

Semeno se ředí v poměru 1 : 5 – 7 ředidlem, které se skládá z vodného roztoku laktózy, žloutku a glycerolu. Po zředění se semeno ochladí na 5 °C a plní se do pejet o délce 65 mm s průměrem 3 mm. Pejety se hermeticky uzavřou, umístí se nad hladinou tekutého dusíku a zamrazí se (Gamčík & Kozumplík 1984). Zmrazování semene v pejetách se provádí suspendováním v parách kapalného dusíku. Spermie berana tolerují řadu rychlostí zmrazování (Salamon & Maxwell 2000). Ve Francii se doporučuje zavěsit pejety nad tekutý dusík ve 2 krocích, nejprve ve výšce 16 cm po dobu 2 minut, poté ve výšce 4 cm po dobu 3 minut před ponořením do tekutého dusíku. Rychlost chlazení lze regulovat vzdáleností pejet od hladiny tekutého dusíku a velikostí pejet (0,25 ml nebo 0,50 ml) (Leboeuf et al. 2000). Čas od získání po zamrazení semene by nemělo trvat déle než 60 minut (Gamčík & Kozumplík 1984).

Zmrazování semene do pelet

Po laboratorním posouzení se semeno ředí v poměru 1 : 4. Po zředění se semeno ekvilibruje 2 – 3 hodiny při 2 – 4 °C, následně se zmrazuje 7 minut na suchém ledu nebo na aluminiové fólii při teplotě -79 °C do pelet o objemu 0,1 – 0,2 cm³. Po zmrazení se pelety v označených dózách vloží do kontejneru s tekutým dusíkem (Gamčík & Kozumplík 1984). Zmrazování pelet na suchém ledu při -79 °C a ponoření pelet do tekutého dusíku při -196 °C je rychlá a jednoduchá metoda. Rychlost ochlazování lze regulovat objemem pelet. I když po rozmrazení byla životaschopnost spermií po peletování lepší, než u pejetování (které je také časově náročnější), zmrazení v pejetách preferuje většina komerčních obchodníků, protože umožňuje přesnější identifikaci dávek spermatu (Leboeuf et al. 2000).

3.6 Kryoprotektory

Základní princip uchování buněk, tkání nebo orgánů po neurčitou dobu při nízkých teplotách spočívá v potlačení buněčného metabolismu. Klíčovým faktorem pro kryokonzervované spermie pro zachování jejich funkční integrity je okolní prostředí. To musí spermiím poskytnout požadované podmínky energie, pH, osmolality a iontové síly, aby vydržely pokles teploty a minimalizovaly tak fyzikální změny, které vedou ke strukturálnímu poškození (Morrell & Mayer 2017).

Kryoprotektory jsou látky, které se přidávají do ředícího média, aby chránily buňku před poškozením mrazem (Allai et al. 2018). Snižují velikost i množství ledových krystalků vzniklých během kryokonzervace spermií a tím snižují poškození plazmatické membrány způsobené těmito krystaly (Paul et al. 2021). Mají významnou roli pro skladování při hlubokých kryogenních teplotách a schopnosti regenerace buněk. 5 – 15 % koncentrace kryoprotektantů stačí k tomu, aby izolované buňky přežily po zmrazení a rozmrazení z teploty kapalného dusíku (Kar et al. 2019). Kryoprotektory mohou být klasifikovány na intracelulární a extracelulární (Peris-Frau 2020). Vaječný žloutek a glycerol jsou nepostradatelné sloučeniny pro prakticky všechna média používaná pro konzervaci spermatu v chlazeném nebo zmrazeném stavu (Álvarez et al. 2012). U většiny druhů jsou média pro kryokonzervaci spermií složena z pufru (Tris), extracelulárního kryoprotektoru (vaječný žloutek), intracelulárního kryoprotektoru (glycerol), zdroje energie (glukóza) a dalších přísad (antibiotika, vitamíny a antioxidanty) (Abdelhafez et al. 2009).

3.6.1 Intracelulární kryoprotektory

Intracelulární kryoprotektory mají nízkou molekulovou hmotnost a amfipatické vlastnosti, prostupují buňkami a jsou účinné při minimalizaci poškození buněk (Motta et al. 2014). Intracelulární kryoprotektory, jako je glycerol, polyethylenglykol a dimethylsulfoxid vnikají do spermatu a vytěsňují intracelulární vodu, a tak způsobují buněčnou dehydrataci. Také se na intracelulární vodu vážou a zabraňují tvorbě intracelulárního ledu, který může poškodit spermie (Paul et al. 2021). Kryoprotektanty, které se vážou na intracelulární molekuly vody a zabraňují tvorbě ledových krystalů, nemohou při rozmrazení buněk vycházet z buňky. Proto je narušena intracelulární osmotická rovnováha. Když se extracelulární ledové krystaly rozpouštějí během rozmrazování, extracelulární osmotický tlak je vyšší než intracelulární osmotický tlak. Buňka má tedy tendenci přijímat vodu zvenčí. Protože však intracelulární kryoprotektant nemůže odtékat a zvyšuje se prostupnost vody do buňky, buňka se zvětšuje, což nakonec může poškodit buněčnou membránu (Öztürk et al. 2020).

3.6.1.1 Glycerol

Glycerol je nejpronikavější kryoprotektant používaný v ředidlech pro zmrazování beraního semene (Allai et al. 2018). Glycerol přispívá k zachování integrity spermií při kryokonzervačních postupech (Álvarez et al. 2012). Má schopnost pronikat do lipidové dvojvrstvy a měnit rychlost membránové difúze, což způsobuje snížení koncentrace elektrolytu a osmotické smrštění objemu spermií, které jim umožňuje odolávat nízkým teplotám (Holt 2000). Množství glycerolu přidaného do ředidel pro kryokonzervaci je omezené kvůli jeho potenciální cytotoxicitě (Allai et al. 2018). Ochranný účinek je připisován jeho koligativní vlastnosti a bakteriostatickému účinku. Působí také jako ředidlo a snížením stupně disociace solí snižuje osmotický tlak mrazícího média. Glycerol má schopnost bránit nukleaci a růstu ledových krystalů (Salamon & Maxwell 1994). Při rozmrazování se však mohou vyskytnout určité problémy, protože glycerol není zcela odstraněn z plazmatické membrány. Citlivost spermií na škodlivé účinky glycerolu souvisí s koncentrací a ta se u jednotlivých druhů liší

(Alvarenga et al. 2005). Koncentrace poskytující nejžádanější míru přežití po rozmrazení je mezi 4 – 7 %. Koncentrace vyšší než 6 % jsou škodlivé pro přežití spermií (Salamon & Maxwell 2000). Výsledky několika studií ukázaly, že přidání glycerolu v koncentracích 3 – 7 % do ředidel obsahujících 5 – 20 % vaječného žloutku poskytlo žádoucí obnovení motility (44 – 85 %) po rozmrazení beraních spermií (Allai et al. 2018). El-Alamy & Foote (2001) ve svém experimentu testovali ejakulát odebraný od 4 beranů Finn a 4 beranů Dorset. Ředidlo bylo složeno z 20 % vaječný žloutek-tris-glycerol-STLS (triethanolamin laurylsulfát). Výsledek prokázal 71 % progresivně pohyblivých spermií od berana Finn a 76 % progresivně pohyblivých spermií od berana Dorset.

I když bylo provedeno mnoho hodnocení alternativních sloučenin, žádná není tak účinná jako glycerol, jakožto intracelulární kryoprotektivní prostředek. Alternativně došlo k několika pokusům o smíchání relativně nižších koncentrací glycerolu s extracelulárními kryoprotektivy, jako je L-glutamin nebo trehalóza (de Mercado et al. 2009). Smíchání trehalózy (60 – 100 mM) s glycerolem v malé koncentraci (1,5 – 3 %) vede k většímu kryoprotektivnímu účinku na DNA zmrazených a rozmrazených beraních spermií, než při použití pouze 5 % glycerolu (Öztürk et al. 2020). Öztürk et al. (2020) ve své studii porovnávali účinky různých koncentrací glycerolu a trehalózy na parametry spermií berana po rozmrazení. Ejakuláty odebrali od 6 beranů Merino. Skupina vzorků obsahujících 5 % glycerolu vykazovala vyšší procenta subjektivní motility (45,62 %), životaschopnosti (52,99 %) a mitochondriální aktivity (45,63 %) spermií ve srovnání s ostatními skupinami. Skupina 3 % glycerolu + 60 mM trehalózy poskytla druhé nejlepší výsledky pro subjektivní pohyblivost (34,37 %), životaschopnost (41,86 %) a mitochondriální aktivitu spermií (34,99 %). Výsledky dalšího testu prokázaly, že použití nízkých koncentrací kryoprotektantů v kombinaci s trehalózou snížilo poškození DNA spermií. V souladu s tím skupina 1,5 % glycerolu + 100 mM trehalózy měla prospěch z výrazně silnějšího kryoprotektivního účinku na integritu DNA (poškození DNA spermií 5,96 %) ve srovnání se skupinou pouze 5% glycerolu (poškození DNA spermií 8,89 %). V závěru studie doporučují použití zmrazovacích ředidel obsahujících nízké koncentrace glycerolu (1,5 – 3 %) v kombinaci s trehalózou, aby se zabránilo vysoké hladině toxického a osmotického poškození způsobeného samotným 5% glycerolem (Öztürk et al. 2020).

3.6.1.2 Amidy

Další skupinou propustných kryoprotektantů jsou amidy, zejména methylformamid a dimethylformamid. Hlavní výhodou amidů ve srovnání s glycerolem je menší osmotické poškození kvůli nižší molekulové hmotnosti amidů (Alvarenga et al. 2005). Když je glycerol nahrazen methylformamidem a dimethylformamidem, dochází k většímu zachování motility, životaschopnosti, mitochondriálního membránového potenciálu a akrozomální integrity po postupech zmrazování a rozmrazování (Yáñez-Ortiz et al. 2021).

3.6.2 Extracelulární kryoprotektory

Extracelulární kryoprotektory tvoří štít kolem buňky, čímž se minimalizují účinky dehydratace v důsledku procesu zmrazování (Motta et al. 2014).

3.6.2.1 Vaječný žloutek

Vaječný žloutek je běžnou složkou ředidel spermatu, chrání spermie před chladovým šokem a poskytuje ochranu při zmrazování a rozmrazování. Předpokládá se, že působí na úrovni buněčné membrány (Salamon & Maxwell 2000). Příznivý účinek vaječného žloutku byl připisován přítomnosti lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), které mají schopnost vázat se na plazmatickou membránu a vytvářet ochranný film, který stabilizuje lipidovou dvojvrstvu (Bergeron & Manjunath 2006). Koncentrace vaječného žloutku používaného v ředidlech pro zmrazování semene berana se značně liší. Použití relativně vyšších koncentrací vaječného žloutku nemusí nutně vést ke zvýšenému zachování motility spermií. Ačkoli vaječný žloutek prospívá spermii, protože je živočišného původu, může představovat potenciální zdroj mikrobiologických kontaminantů, které mohou zhoršit kvalitu spermií. Z tohoto důvodu by mohl být sušený vaječný žloutek bezpečnější alternativou k čerstvému žloutku, protože prochází procesem pasterizace za účelem zničení bakterií (Allai et al. 2018). Gholami et al. (2012) uvedli větší motilitu, životaschopnost a akrozomální integritu spermií berana po rozmrazení s ředidlem obsahujícím žloutek krůtího vejce, ve srovnání se žloutkem slepičího vejce. Současný trend omezování látek živočišného původu podpořil hledání alternativ, jak nahradit vaječný žloutek jako kryoprotektivum z důvodu jeho potenciální kontaminace. Jednou z alternativ je hodnocení látek rostlinného původu jako potenciálních náhražek vaječného žloutku a extracelulárních kryoprotektiv v mrazicích médiích (Murphy et al. 2018). Sojový lecitin je jednou z alternativ, která má schopnost usnadnit mechanismus účinku, který je podobný mechanismu LDL (Vidal et al. 2013).

3.6.2.2 Cukry

Jak monosacharidy, tak disacharidy byly široce používány pro skladování semene berana. Cukr má několik funkcí, například slouží jako energetický substrát pro spermie a udržuje osmotickou rovnováhu ředidel. Předchozí studie porovnávaly účinky různých koncentrací monosacharidů (glukóza, galaktóza a fruktóza), disacharidů (sacharóza, trehalóza) a trisacharidů (rafinóza) na parametry spermií ve spermatu berana. Glukóza byla navržena jako vhodnější než fruktóza, laktóza nebo rafinóza v ředidle na bázi Tris pro semeno berana (Allai et al. 2018). Trehalóza je disacharid, který stabilizuje membránové fosfolipidy. Pokud membrána není stabilizována, dochází k několika trhlinám ve vnitřní a vnější vrstvě buněčné membrány, což vede k buněčné dehydrataci a osmotické nerovnováze. Trehalóza stabilizuje buněčnou membránu, zabraňuje dehydrataci buněk a projevuje svůj ochranný účinek v extracelulárním prostředí, jelikož zmenšuje velikost molekul vody vazbou na atomy vodíku (Öztürk et al. 2019). Bucak et al. (2007) uvedli, že ve srovnání s taurinem a glutathionem bylo nejvyššího ochranného účinku dosaženo při použití trehalózy během chlazeného skladování

beraního semene. Využití disacharidů v buněčné ochraně během zmrazování je omezeno, protože jsou tyto cukry příliš velké a nemají volný přístup přes buněčnou membránu. V souladu s tím nejsou tyto kryoprotektanty tak účinné jako ty, které pronikají do buňky. Přítomnost extracelulární trehalózy je nedostatečná pro maximální účinnost ochrany, protože trehalóza je vyžadována na obou stranách buněčné membrány (Motta et al. 2014).

3.6.2.3 Antioxidanty

Doplnění zmrazovacího ředidla antioxidanty snižuje negativní účinky způsobené nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) během kryokonzervace, což zlepšuje kryopřežití spermií. Antioxidanty lze rozdělit na enzymatické a neenzymatické a oba typy lze přidat do zmrazovacího média. První typ zahrnuje superoxiddismutázu (SOD), glutathionreduktázu (GR), glutathionperoxidázu (GPx) a katalázu (CAT), zatímco druhý typ zahrnuje redukovaný glutathion (GSH), vitamíny, rostlinné extrakty (například aminokyseliny a proteiny) (Peris-Frau 2020). Potenciál antioxidantů při zlepšování kvality spermatu se stává zjevnějším, když jsou spermie vystaveny stresovým podmínkám, jako je vysoká ROS a nízká antioxidační aktivita ejakulátu, což je častá charakteristika nekvalitních ejakulátů (Tiwari et al. 2021). Pokroky v nanotechnologiích přispěly k návrhu nových nano-sloučenin, které mají antioxidační vlastnosti, jako jsou nanočástice zlata a stříbra obsahující selen, oxid zinečnatý a apoferritin. Přidání nanočástic selenu do mrazícího ředidla zvýšilo životaschopnost, motilitu a integritu chromatinu kryokonzervovaných beraních spermií (Peris-Frau 2020).

Kyselina kávová a její deriváty, jako jsou diterpeny, triterpeny, flavonoidy a polyfenoly, patří mezi hlavní charakteristické složky rozmarýnu, které mají antioxidační vlastnosti (del Baño et al. 2004). Motlagh et al. (2014) ve své studii zjistili, že přidání 4 – 6 % vodného extraktu z rozmarýnu do ředidla zlepšuje celkovou a progresivní motilitu beraních spermií, bez jakéhokoli škodlivého vlivu na jejich pohyblivost a rychlost. Přesný mechanismus, kterým vodný extrakt z rozmarýnu zvyšuje kvalitu spermií, zůstává nejasný a je sám o sobě velmi zajímavý. Vodný extrakt rozmarýnu obsahuje důležité lapače volných radikálů, které mohou následně podporovat mezibuněčný antioxidační systém (Motlagh et al. 2014).

Olivový olej a některé jeho deriváty mají vysoké procento fenolických složek s antioxidačními účinky. Přítomnost jednoduchého fenolu zvaného hydroxytyrosol (HT) s významnou antioxidační vlastností, byl popsán v plodu olivy s odpovídajícími pozitivními zdravotními účinky (Fernandez-Bolanos et al. 2008). Dalším menším jednoduchým fenolem, který byl izolován z olivového oleje, je 3,4-dihydroxyfenylglykol (DHPG). U tohoto antioxidantu byly zjištěny silné antioxidační a potenciálně protizánětlivé vlastnosti (Rodríguez et al. 2007). Výsledky studie Arando et al. (2019) naznačují, že přidání antioxidantů pocházejících z olivového oleje (HT, DHPG nebo obojí) do zmrazovacího ředidla na bázi Tris nabízí významnou ochranu proti LPO plazmatické membrány u zmrazených a rozmrazených beraních spermií, přičemž zaznamenané hodnoty jsou podobné těm z čerstvých spermií. Nicméně další charakteristiky spermií, jako je motilita, kinetické a rychlostní parametry, integrita membrány, stav akrozomu a potenciál mitochondriální membrány nebyly pozitivně ovlivněny. Kromě toho přidáním HT v kombinaci s DHPG byla zjištěna nižší životaschopnost

spermií a stav akrozomů ve srovnání s aplikací jednotlivých antioxidantů. Z tohoto pozorování je doporučeno použití čistých antioxidantů (Arando et al. 2019).

Resveratrol a kvercetin jsou popisovány jako silné antioxidanty s podobným účinkem, které vyplývají z jejich schopnosti inhibovat tvorbu ROS enzymatickými i neenzymatickými systémy (Delmas et al. 2005). Protože resveratrol a kvercetin ovlivňují intracelulární uvolňování vápníku, jsou důležité pro prevenci akrozomové reakce. Jelikož jsou tyto polyfenoly schopny snižovat peroxidaci lipidů ve spermatu, mají potenciál při kryokonzervaci spermatu. Pro stanovení optimálních koncentrací jsou však nutné další studie (McNiven & Richardson 2006). Silva et al. (2012) ve své studii zjistili, že přidání buď resveratrolu nebo kvercetinu (5 – 20 µg/ml pro každou sloučeninu) k ředidlu Tris-vaječný žloutek-glycerol, snížilo mitochondriální membránový potenciál beraních spermií.

Hřebíček je známý jako účinný rostlinný antioxidant, který obsahuje fenolické sloučeniny (hlavně eugenol) (Baghshahi et al. 2014). Studie Baghshahi et al. (2014) prokázala, že ošetření extraktem z pupenů hřebíčku během procesů kryokonzervace účinně chrání spermie berana a nejlepší množství použitého extraktu je 75 µg/ml.

3.6.2.4 Vitamíny

Přítomnost vitamínů ve spermatu má důležitou roli v kvalitě spermií (Allai et al. 2018).

Vitamin E je jednou z neúčinnějších molekul, o kterých je známo, že inhibují produkci reaktivních forem kyslíku a peroxidaci lipidů. Vitamin E, lipofilní molekula, se používá jako antioxidant a stabilizátor plazmatických membrán (Benhenia et al. 2018). Přidání vitamínu E v různých formách (Trolox, α-tokoferol) do ředidel pro konzervaci spermatu berana může zlepšit jeho kvalitu (Allai et al. 2018). Kheradmand et al. (2006) uvedli, že přidání 1 nebo 2 mg vitamínu E k vaječnému žloutku zlepšilo motilitu a integritu membrány spermií u chlazeného semene berana.

Kyselina askorbová, známá také jako vitamín C, je ve vodě rozpustný vitamín, který je nezbytný pro normální fungování těla. Kyselina askorbová může hrát roli při udržování genetické integrity buněk spermií tím, že brání oxidativnímu poškození DNA spermií (Allai et al. 2018). Azawi a Hussein (2013) pozorovali zlepšení životaschopnosti a motility spermií berana Awassi v ředidle na bázi Tris obsahující vitamín C v koncentraci 0,9 mg/ml a skladované při 5 °C.

Vitamín B 12 je další ve vodě rozpustný vitamín, který funguje jako koenzym v řadě biochemických reakcí (Allai et al. 2018). Ve studii Fu a Youzhang (2003) uvedli, že komplex vitamínu B (3 %) by mohl zlepšit motilitu po rozmrazení a chránit integritu membrán berana spermatu během kryokonzervace.

3.6.2.5 Melatonin

Neurohormon melatonin je produkován mnoha buňkami, zejména buňkami epifýzy, kde je produkce modulována účinky cyklu světlo-tma. Kvůli malé velikosti a vlastnostem

rozpuštěným v tucích a vodě může melatonin snadno procházet plazmatickou membránou různých buněk. Receptory melatoninu, zejména MT1 a MT2, byly identifikovány v mnoha buňkách a orgánech, včetně spermií a oocytů (Tamura et al. 2020). Vzhledem k důležitosti v cirkadiálním cyklu má melatonin hlavní funkce v regulaci tělesné teploty a sekreci různých reprodukčních hormonů (Pool et al. 2020).

Příznivé účinky melatoninu na kryokonzervaci spermií spočívají na jeho silné antioxidační vlastnosti a jeho schopnost stimulovat enzymatickou aktivitu SOD, GPx a CAT (Peris-Frau 2020). Podle bioinformatické analýzy může mít melatonin pozitivní účinky na zmrazené spermie berana tím, že reguluje změny exprese životně důležitých proteinů a metabolitů souvisejících s metabolismem a funkcí spermií (Li et al. 2023).

Nedávná studie u berana ukázala, že melatonin zlepšuje mitochondriální oxidativní fosforylaci zmrazených a rozmrazených spermií potlačením otevírání mitochondriálních permeabilních přechodových pórů (MPTP). MPTP je vícesložkový proteinový agregát v mitochondriích, který má dvě hlavní funkce: regulaci oxidativní fosforylace pro syntézu energie a indukci buněčné smrti při přeměně na nespecifický kanál. Když je tento komplex otevřený, mitochondriální funkce klesá a uvolňuje se faktor indukující apoptózu (buněčnou smrt). Přidání melatoninu do zmrazovacího ředidla zabraňuje prodlouženému otevření MPTP během kryokonzervace, což zvyšuje produkci ATP a zlepšuje motilitu spermií po rozmrazení (Peris-Frau 2020). Je ale možné, že kryoprotektivní účinky melatoninu závisí na buněčném prostředí, době expozice a jeho koncentraci (Li et al. 2023).

Na základě mnoha studií je použití melatoninu při kryokonzervaci spermií hospodářských zvířat obecně slibné. Melatonin působí na ochranu spermií před poškozením vyvolaným oxidativním stresem během kryokonzervace prostřednictvím několika mechanismů, včetně přímého vylučování nadměrného ROS k ochraně kryokonzervovaných spermií před škodlivými účinky, stabilizace integrity membrány, zlepšení mitochondriální integrity a funkce, zlepšení enzymatických aktivit, inhibice apoptózy a ochrana DNA spermií. Melatonin zlepšuje motilitu, rychlost, integritu membrány, fertilizační kapacitu a životaschopnost zmrazených a rozmrazených spermií (Ofosu et al. 2021).

3.6.2.6 Aminokyseliny

Ochranné účinky aminokyselin proti procesu zmrazování a rozmrazování spermií pocházejí ze skutečnosti, že některé rostliny mohou akumulovat prolinovou aminokyselinu v reakci na velmi nízké teploty. Studie ukázaly, že některé aminokyseliny, jako je glycin a glutamin, jsou syntetizovány z glukózy v semenotvorných kanálcích. Některé aminokyseliny (např. prolin, glutamin, glycin a histidin) byly detekovány v semenné plazmě a byly použity jako ředidlo pro kryokonzervaci spermií beranů, nicméně přesný molekulární mechanismus aminokyselin při kryokonzervaci vzorků spermatu zůstal neznámý (Merati & Farshad 2021).

Cystein je nízkomolekulární aminokyselina, která chrání spermie před toxickými metabolity kyslíku, udržuje kvalitu spermií a zabraňuje ztrátám membrány a integritě akrozomů spermatu berana po rozmrazení (Allai et al. 2018).

Taurin je sulfonová aminokyselina, která je přítomna v tekutině nadvarlete a hraje důležitou roli v ochraně spermií proti ROS a peroxidaci lipidů. Příznivý účinek začlenění

taurinu do ředidla zlepšuje motilitu, životaschopnost a integritu membrány beraních spermií po rozmrazení (Allai et al. 2018).

Merati & Farshad (2021) na základě svých experimentálních výsledků konstatují, že přidání aminokyselin samotných nebo společně s vitamínem E do zmrazovacích ředidel představuje jeho schopnost účinně chránit kryokonzervované spermie. Toto pozorování ukazuje, že synergický účinek 1 mM/ml vitamínu E + 10 mM/ml aminokyselin byl nejlepším ředidlem. Lze tedy pečlivě konstatovat, že použití aminokyselin v ředidlech samotných nebo v kombinaci s vitamínem E může být slibným kryoprotektantem při zmrazení spermatu. K vysvětlení přesného problému zmrazování a přesných účinků aminokyselin na zlepšení kvality kryokonzervovaného beraního spermatu je však zapotřebí dalších výzkumů (Merati & Farshad 2021).

Poznatky Bucak et al. (2009) prokázaly, že suplementace 5 mM glutaminu v ředidle spermatu byla přínosem pro zmrazené a rozmrazené beraní spermie. Ejakuláty odebrali od 4 akkaramanských beranů a vzorky spermatu byly zředěny ředidlem na bázi tris obsahujícím glutamin (2,5 nebo 5 mM). Zmrazovací ředidla doplněna 5 mM glutaminem vedla k vyšší rychlosti motility (68,0 %) a hypoosmotickému testu HOS (64,1 %) ve srovnání s 2,5 mM glutaminem (motilita 57,5 % a HOS 47,5 %).

3.6.2.7 Proteiny

Proteiny jsou potenciálně klíčovými faktory s velkým dopadem na kryopřežití spermií. Kromě toho byly některé specifické proteiny použity jako potenciální biomarkery pro hodnocení zmrazení spermií (Jia 2022).

Bovinní sérový albumin (BSA) chrání integritu membrány spermií před teplem. V různých studiích bylo uvedeno, že 10 % nebo 15 % BSA lze použít jako náhradu za vaječný žloutek v ředidlech beraního spermatu a zvýšit pohyblivost a životaschopnost spermií po procesu zmrazování a rozmrazování (Allai et al. 2018).

Binder of Sperm Proteins (BSP) neboli vazebné proteiny spermií jsou hojné proteiny seminální plazmy berana, o kterých se předpokládá, že mají významné ochranné účinky na spermie během chladového šoku. To je v přímém protikladu k býčím spermiím, kde BSP způsobují poškození spermií během manipulace in vitro (Pini et al. 2018). BSP mají příznivé účinky na kvalitu spermií po rozmrazení a chrání spermie před poškozením mrazem (Peris-Frau et al. 2020).

Antifreeze proteins (AFP) neboli nemrznoucí proteiny jsou skupiny polypeptidů, které se vyvinuly v tekutinách bezobratlých a obratlovců, hmyzu a rostlinách, hrajících základní roli pro jejich přežití při teplotách pod nulou, které u těchto druhů působí jako přirozené kryoprotektory. Tyto proteiny lze použít pro kryokonzervaci buněk, včetně spermií. AFP snižují ztrátu motility, udržují životaschopnost, funkčnost membrány a integritu akrozomu ve zmrazeném a rozmrazeném spermatu. Existují čtyři hlavní typy: typ I, typ II, typ III a glykoprotein – AFGP. Bylo prokázáno, že procento pohyblivých spermií po rozmrazení je vyšší po přidání AFP I a AFGP (Correia et al. 2021). AFP látky vzbudily zájem o výzkum v biomedicínských oblastech, protože mají jedinečné vlastnosti, jako je biologická nemrznoucí směs (Monteiro et al. 2023). AFP látky interagují nejen s ledovými krystaly, ale také s

buněčnými povrchy a povrchy rozpuštěných látek během konzervace při nízké teplotě (Rubinsky & Devries 1989). Tyto proteiny vyvolávají tepelnou hysterezi, navozují rekrytalizaci ledu, snižují kinetiku tvorby ledu a ovlivňují morfologii (Vejketesh & Dayananda 2008). Je obtížné předpovědět interakce protein-led s membránou spermií, protože protein může během teplotních změn podléhat strukturálním změnám a ztrácet tak svou ochrannou schopnost (Antson et al. 2001). Nezávislost na koncentraci AFP byla také pozorována při kryokonzervaci spermií berana. Předpokládá se, že zatímco AFP typu I je toxický během fáze předchlazení, koncentrace 10 µg/ml AFP by mohla významně chránit spermie (Robles et al. 2019). Vyšší koncentrace AFP by však způsobila tvorbu jehličkovitých ledových krystalů, které mohou protrhnout buněčnou membránu a snížit přežití kryokonzervovaných buněk po rozmrazení (Lee et al. 2020). Proto je vhodná dávka AFP klíčová pro kryokonzervaci, která velmi závisí na typu AFP a buňkách (Wu et al. 2021).

V současné době pokrok v proteomických technologiích poskytuje slibnou příležitost objevit klíčové proteiny odvozené ze spermií, které jsou modifikovány procesem kryokonzervace, a prozkoumat mechanismy kryopoškození vedoucí k poklesu plodnosti spermií (Jia 2022).

3.6.2.8 Jiné sloučeniny

Astaxanthin, silný červený karotenoidní pigment rozpustný v tucích, který se nachází v určitých mořských rostlinách a zvířatech, je uznáván jako jeden z nejsilnějších antioxidantů v přírodě (Allai et al. 2018). Fang a kol. (2015) zkoumali antioxidační účinky astaxanthinu na sperma berana během konzervace. Jeho suplementace zlepšila životaschopnost skladovaných spermií berana ochranou integrity plazmatické membrány.

Bylo také popsáno, že použití kofeinu (1,3,7-trimethyl-2,6-dioxypurin) má schopnost stimulovat motilitu a zlepšit kvalitu spermií berana (Allai et al. 2018). Při použití koncentrace 4 mM kofeinu, Špaleková et al. (2014) uvedli, že kofein měl pozitivní vliv na chlazenou motilitu spermií, udržoval motilitu spermií po delší dobu a snižoval apoptózu.

Karboxymethylcelulóza (CMC), derivát celulózy, je nízkoviskózní a netoxický aniontový polysacharid obsahující karboxymethylové skupiny, které zvyšují rozpustnost ve vodě. Vzhledem k tomu, že jde o větší molekulu, je osmoticky neaktivní a může působit jako neprostupný kryoprotektant (Paul et al. 2021). Studie Paul et al. (2021) prokázala, že kombinace glycerolu a CMC byla lepší než samotný glycerol při obnově progresivní motility se zlepšením životaschopnosti spermií v kryokonzervovaném spermatu. Snížení glycerolu z 6 % na 5 % spolu se suplementací CMC mělo synergické kryoprotektivní účinky na semeno berana (Paul et al. 2021).

Mateří kašička (RJ) je produkována hypofaryngeálními a mandibulárními žlázami včel dělnic a slouží jako primární potrava včelí královny a včelích larev. Mateří kašička se skládá hlavně z vody (60 – 70 %), bílkovin (12 – 15 %), cukrů, lipidů, vitamínů, soli a volných aminokyselin (Moradi et al. 2013). RJ lapá volné radikály a má antioxidační účinky (Amini et al. 2019). Saberivand et al. (2022) v závěru své práce uvádí, že přidání 2 % RJ + 3 % DMSO (dimethylsulfoxid) a 3 % glycerolu do zmrazovacího ředidla zlepšilo mikroskopické a biochemické parametry beraních spermií po procesu zmrazování a rozmrazování. Mateří

kašička, doplněna spolu s glycerolem a DMSO v mírném množství, účinněji chrání spermie před poškozením mrazem než vysoké hladiny (3 a více %) (Saberivand et al. 2022).

Zajímavou metodou, která se v posledních letech objevila ke zmírnění nepříznivých účinků kryokonzervace, je přidání plazmy bohaté na destičky (PRP) do mrazicích médií. PRP sestává z unikátní autologní skupiny krevních destiček, jejichž koncentrace je třikrát až sedmkrát vyšší než fyziologická koncentrace. U hospodářských zvířat bylo přidání PRP do kryokonzervačního média hodnoceno pouze u ovcí. Doplnění zmrazovacího média pro ovčí sperma s poměrem 1:1 (PRP : spermie) přináší větší celkovou a progresivní pohyblivost spermií po rozmrazení (Hernández-Corredor et al. 2020).

3.7 Rozmrazení před inseminací

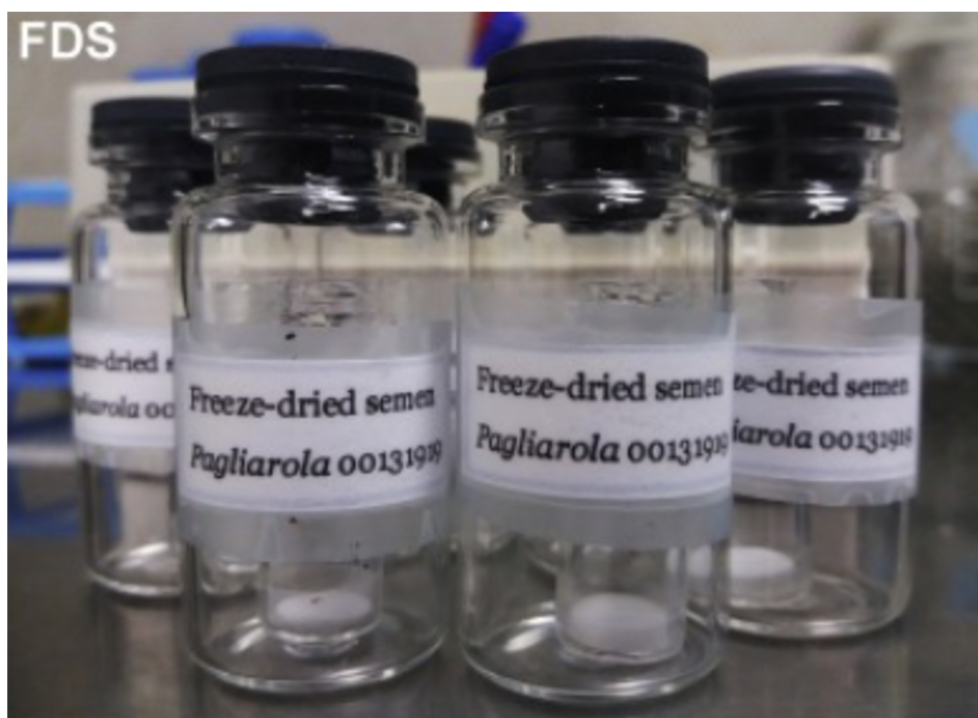
Zmrazené sperma lze rozmrazit buď v roztoku (mokré rozmrazování) nebo ve zkumavce (suché rozmrazování). Zpočátku se uvádělo, že je výhodnější rozmrazovat pelety v roztoku než v suchých zkumavkách (Salamon & Maxwell 1995). Semeno se rozmrazuje tak, že se do zkumavky pinzetou vloží 2 – 3 pelety a zkumavka se ponoří na 8 sekund do vody o teplotě 60 – 70 °C. Pelety se rozmrazují ponořením do vodní lázně o teplotě 75 °C na 12 sekund. Aktivita spermií po rozmrazení se posuzuje při teplotě 40 °C. Semeno použitelné pro inseminaci musí obsahovat nejméně 30 % spermií s progresivním pohybem a mělo by se použít do 30 minut po rozmrazení (Gamčík & Kozumplík 1984). Deka & Rao (1987) pozorovali vyšší míru motility a více neporušených akrozomů po rozmrazení semene při 37 °C než při 5 °C. Práce Andersen (1969) popisuje, že rozmrazování při 75 °C po dobu 10 sekund bylo lepší než při 35 °C za 30 sekund. Je však třeba poznamenat, že rozmrazování spermatu při 37 °C je v praktických podmínkách umělé inseminace vhodnější a je také vyloučeno riziko přehřátí rozmraženého spermatu (Leboeuf et al. 2000). Rozmrazené sperma se uchovává ve vodní lázni o teplotě 30 °C až do inseminace (Salamon & Maxwell 2000, Shipley et al. 2007).

3.8 Lyofilizace

Konzervace spermií lyofilizací je nová atraktivní metoda, pomocí které lze spermie dlouhodobě uchovávat jak v lednici, tak při pokojové teplotě. To znamená, že není potřeba žádný kapalný dusík, což výrazně snižuje náklady na skladování a přepravu (Olaciregui et al. 2017). Proces lyofilizace vede k odstranění vody, a tím ke konzervaci vzorků v bezvodém stavu. Nejprve je třeba vzorek zmrazit při nízkých teplotách (krok zmrazení) a poté se pomocí procesu sublimace odstraní voda přechodem z pevného do aeriformního stavu (krok sušení). Konečný produkt může být snadno přepravován po celém světě (Anzalone et al. 2018). Rehydratace je proces používaný k obnovení původního složení lyofilizovaného produktu. Lyofilizované spermie se rehydratují přidáním čisté vody, jejíž objem by měl být stejný jako původní objem suspenze spermií před lyofilizací. Koncentrace spermií v konečném rehydratačním médiu by měla být dostatečná pro účely injekce spermií do oocytů (Gil et al.

2014). I přes výhody této metody zůstává hlavním omezením poškození spermatu. Spermie po lyofilizaci ztrácí především svou pohyblivost (Olaciregui et al. 2017). Lyofilizace ohrožuje stabilitu DNA fyzickým poškozením způsobeným rychlým ochlazením s následnou vakuovou extrakcí vody. Při lyofilizaci způsobuje zmrazení vzorků silné mechanické namáhání. Před zmrazením nelze přidat žádný kryoprotektor, protože jsou při pokojové teplotě kapalné, a proto nejsou vhodné pro suché skladování (Palazzese et al. 2020). Práce Palazzese et al. (2020) prokázala, že pouze mírné zmrazení spermií před sušením zachovává strukturální stabilitu a stabilitu DNA, a to vede k významnému zlepšení jejich fertilizačního potenciálu. Protože savčí spermie ztrácejí při lyofilizaci svou pohyblivost, životaschopnost a alespoň částečně integritu DNA, musí být spermie vpravena do oocytu intracytoplazmatickou injekcí (ICSI) (Gil et al. 2014).

Současné lyofilizační postupy aplikované na spermie jsou v podstatě podobné těm, které se používají pro konzervaci potravin nebo farmaceutických produktů. Lyofilizační technologie pro spermie jsou tedy v raných stádiích vývoje. Tyto pokroky by mohly spočívat ve vývoji vylepšených médií pro použití této technologie a lyofilizace by mohla být účinná pro nahrazení tradičních způsobů kryokonzervace spermií (Anzalone et al. 2018). Suché skladování by výrazně zjednodušilo zakládání a správu biobank, zejména v rozvojových zemích. Uložené genomy mohou být nakonec rehydratovány a použity k rozšíření populací zvířat prostřednictvím přenosu jádra somatických buněk (Loi et al. 2013).



Obrázek 3: Skleněné lahvičky obsahující lyofilizované spermie (Anzalone et al. 2018)

3.9 Stanovení fertilizační schopnosti in vitro

Hlavním cílem analýzy spermatu je stanovení fertilizačního potenciálu vzorku spermatu pomocí rychlých a nenákladných postupů. Testování plodnosti jednotlivých beranů umělou inseminací je nákladné a náročné na práci. Existuje tedy potřeba vyvinout účinné laboratorní měření funkce spermií in vitro, které spolehlivě koreluje s plodností in vivo (O'Meara et al. 2008).

3.9.1 Počítačová analýza CASA

CASA (Computer Aided Sperm Analysis) je systém, který umožňuje hodnocení trajektorie pohybu spermií v konkrétním čase vyhodnocením sekvence kontinuálních snímků (snímky/s, Hz) získaných pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem, videokamery a prohlížených na obrazovce počítače (Yánez-Ortiz et al. 2021). Přestože standardizace a optimalizace postupů a vybavení může být problémem, všechny různé přístroje CASA prokázaly vysokou úroveň přesnosti a spolehlivosti. V systémech CASA mohou uživatelé vybrat rychlost snímání snímků (počet analyzovaných snímků za sekundu) mezi 15, 30 nebo 60 Hz a mohou vybrat počet snímků, které mají být analyzovány, ze kterých bude spermie úspěšně sledována pro její zahrnutí do analýzy pohybu (Tsakmakidis 2010). Pomocí systému CASA se zaznamenávají nejen celkové a progresivní hodnoty pohyblivosti spermií, ale také rychlost [křivočará (VCL, $\mu\text{m/s}$), přímočará (VCL, $\mu\text{m/s}$) a střední (VAP, $\mu\text{m/s}$)] pohybu každého z nich za jednotku času. Z těchto proměnných lze určit další ukazatele, jako je linearita (LIN, %), přímost (STR, %) a oscilace (WOB, %) pohybů spermií. Systém také umožňuje určit laterální posun (ALH, μm) a tepovou frekvenci hlavičky (BCF, Hz) (Yánez-Ortiz et al. 2021). Za posledních 20 let prošly systémy CASA revolucí především díky pokroku ve vývoji hardwaru i softwaru, přičemž většina systémů poskytuje vysokou úroveň kontroly a ověřování kvality. Některé ze systémů CASA navíc poskytují v rámci automatizované analýzy nejen funkční aspekty, jako je průnik spermií do sliznice, hyperaktivace, ale také morfologii, vitalitu, fragmentaci a akrozomovou reakci (Horst 2020). Na rozdíl od subjektivního hodnocení, poskytují systémy CASA konzistentní a spolehlivé výsledky analýzou více než 500 spermií pro vzorek, sledováním pohybu každé spermie. Tyto systémy mohou extrahovat jednotlivé kinematické parametry pohybu a rozdělit celkovou populaci spermií do subpopulací spermií s podobnými charakteristikami motility (obvykle rychlá, středně rychlá, pomalá a nepohyblivá) (Del Prete et al. 2022). Stále není jasné, které charakteristiky pohybu spermií hodnocené CASA mají skutečnou diagnostickou hodnotu pro predikci plodnosti a míry oplodnění u ovcí. Nicméně motilita je široce považována za jednu z nejdůležitějších charakteristik spojených s oplodňovací schopností spermií (Tsakmakidis 2010). Hodnocení motility pomocí systémů CASA se rychle stalo zlatým standardem při hodnocení spermatu mnoha druhů (Del Prete et al. 2022).



Obrázek 4: Analýza CASA (osobní archiv)

3.9.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM) se široce používá ke studiu savčích spermií v oblastech reprodukční toxikologie, veterinární vědy (k předběžnému výběru pohlaví potomstva tříděním chromozomů X a Y) a klinické andrologie. Pomocí FCM lze nyní rychle měřit různé vlastnosti spermií na bázi buňky po buňce (Cordelli et al. 2005). Tato technologie hodnotí několik vlastností spermií, včetně měření plazmatické membrány spermií, integrity akrozomů, potenciálu mitochondriální membrány, reaktivních forem kyslíku (ROS) a poškození DNA (Quirino et al. 2022). Použitím fluorescenčních barviv dochází ke stanovení podílů životaschopných (CFDA nebo CDMFDA) a neživotaschopných/poškozených spermií (HED nebo PI) (Purdy et al. 2021). Neživotaschopné buňky mohou být určeny pomocí membránově nepropustných barviv nukleových kyselin, které pozitivně identifikují mrtvé spermie penetrací do buněk s poškozenými membránami. Neporušená plazmatická membrána zabrání těmto produktům vstoupit do spermií a zabarvit jádro (Gillan et al. 2005). Některá barviva je však obtížné použít, protože mají tendenci unikát z buněk během inkubace (Purdy et al. 2021). Neustále se vyvíjejí nová fluorescenční barviva a techniky, které mají potenciální použití při hodnocení spermií průtokovou cytometrií (Gillan et al. 2005). Několik funkčních testů

využívajících fluorochromy bylo založeno na barvení spermií a analýze buněk fluorescenční mikroskopií. Mikroskopická analýza hodnotí malý počet spermií v populaci, je časově náročná, může být subjektivní a obvykle měří pouze jednu spermatickou charakteristiku. Proto přizpůsobení těchto analýz automatizované technice, jako je průtoková cytometrie, zajišťuje objektivní a rychlé hodnocení (de Lima Rosa et al. 2023). Průtoková cytometrie měří jednotlivé buňky v suspenzi, jednu po druhé, jak procházejí detekčním bodem. Během několika minut získá průtokový cytometr data o všech subpopulacích vzorků, takže je ideální pro hodnocení heterogenních populací, jako je sperma. Spermie jsou označeny vybraným fluorochromem a používají se buď v životaschopném nebo fixovaném stavu. Výběr fluorochromu je ovlivněn jak aplikací, tak excitačními vlnovými délkami dostupnými na průtokovém cytometru. Jakmile jsou spermie označeny, odsají se a rychle protékají průtokovou kyvetou nebo proudem ve vzduchu, kde jsou osvětleny světelným zdrojem. Ve většině moderních průtokových cytometrů se používá laser, který vyzařuje koherentní světlo o stanovené vlnové délce. Když jsou spermie vyšetřovány laserovým paprskem, rozptýlené a emitované světlo je shromažďováno dvěma čočkami a řadou optik, děličů paprsků a filtrů, což vede k měření specifických pásů fluorescence (Gillan et al. 2005). Průtoková cytometrie má také schopnost detekovat značení více fluorochromy asociovanými s jednotlivými spermii, což znamená, že lze současně hodnotit více než jeden atribut spermií. Tato funkce má další přínos pro analýzu spermatu, protože jen málo jednotlivých parametrů spermií vykazuje významnou korelaci s plodností in vivo pro sperma v přijatelném rozsahu normality a čím více parametrů spermií lze testovat, tím přesnější je predikce plodnosti (Larsson & Rodríguez-Martínez 2000). V současné době byly vyvinuty postupy průtokové cytometrie, které současně hodnotí životaschopnost spermií, integritu akrozomů a mitochondriální funkci. Pro tuto analýzu jsou životaschopné spermie definovány jako buňky, které mají neporušenou plazmatickou membránu. Tato vlastnost se hodnotí barvením vzorku spermatu propidium jodidem (PI). Buňky s neporušenou plazmatickou membránou budou bránit PI ve vstupu do buňky a obarvení jádra. Buňky s poškozenou plazmatickou membránou však umožní PI vstoupit do buňky a navázat se na DNA, což způsobí, že buňky budou fluoreskovat červeně (Graham et al. 1990, Wilhelm et al. 1996). Akrozomální integrita se měří pomocí rostlinných lektinů. Zpočátku byl k hodnocení akrozomální integrity použit fluorescenčně značený lektin z rostliny hrachu (PSA) (Wilhelm et al. 1996). Spermie s neporušeným akrozomem se při inkubaci s PSA nezbarví. PSA se váže na části akrozomální matrice poškozených spermií, což způsobuje, že akrozomální oblast těchto spermií fluoreskuje (Farlin et al. 1992). Lektiny samy o sobě nejsou fluorescenční, ale mohou být značeny mnoha různými fluorescenčními sondami (Graham 2001). Fluorescenční sondy, jako je H33258, vyžadující průtokovou cytometrickou analýzu pomocí laseru, který pracuje v oblasti ultrafialového světla, se používají méně běžně, protože to není standardní funkce u menších analytických strojů. Jednou z alternativ je však použití fluorometru. Fluorometr je relativně levné přenosné zařízení, které umožňuje rychlou analýzu vzorku. Fluorochromy používané k hodnocení životaschopnosti spermií oběma metodami lze použít ve vzájemné kombinaci. Například, když se CFDA použije spolu s PI, lze identifikovat tři populace buněk: živé (zelené), mrtvé (červené) a třetí populace, která je obarvena oběma a představuje umírající spermie (Gillan et al. 2005). Harrison & Vickers (1990) použili tuto kombinaci s fluorescenčním mikroskopem a zjistili, že je účinným indikátorem životaschopnosti čerstvých nebo chladem uchovávaných spermií berana. I když existuje mnoho výhod použití průtokového

cytometru pro rutinní analýzu spermatu, jeho použití je často omezeno kvůli nákladům a obtížnému provozu. Je tudíž zapotřebí zkušený operátor. Kromě toho je průtokový cytometr poměrně velký a nemůže být vystaven třesům spojeným s pohybem, což znamená, že vyžaduje vyhrazené místo v laboratoři (Gillan et al. 2005).



Obrázek 5: Průtokový cytometr (osobní archiv)

3.9.3 Hypoosmotický test HOS

HOS hodnotí funkční stav plazmatické membrány spermií. Princip HOS testu je založen na transportu vody přes membránu spermií za hypoosmotických podmínek (Leboeuf et al. 2006). Plazmatická membrána spermií je citlivá na poškození různými faktory, jako je osmotický stres nebo peroxidace lipidů. Fyzický tlak způsobený osmotickým stresem může skončit poškozením plazmatické membrány, ale pokud není překročena určitá úroveň stresu, plazmatická membrána může reagovat a spermie vyvolá morfologickou reakci. Hypoosmotický test využívá tuto náchylnost tím, že vystavuje vzorky spermatu hypoosmotickým roztokům (HS). Pokud je plazmatická membrána funkční, následuje endosmóza a buňky vykazují zvětšení objemu (otok) a stočení ocasu (Vásquez et al. 2013). Čím vyšší je počet buněk s oteklými membránami, tím lepší je kvalita plazmatické membrány (Leboeuf et al. 2006). Test HOS se stal rutinním hodnocením používaným k posouzení integrity plazmatické membrány a má vysokou relevanci v technologiích asistované reprodukce (Vásquez et al. 2013).

3.9.4 Vyšetření struktury chromatinu spermií SCSA

SCSA je test založený na průtokové cytometrii a definuje abnormální strukturu chromatinu (Evenson et al. 1980). Tato technika identifikuje spermie s abnormálním chromatinem na základě metachromatického barviva akridinová oranž (Falchi et al. 2018). Normální vývoj spermií vede k chromatinové struktuře, ve které je DNA plně odolná vůči denaturaci. DNA spermií s abnormální strukturou chromatinu je však náchylná k denaturaci a rozsah této abnormality lze detekovat pomocí SCSA. Akridinová oranž interkaluje dvouvláknovou DNA (nativní) fluoreskující zeleně, zatímco jednovláknová DNA (denaturovaná) fluoreskuje červeně. Poměr červené k celkové fluorescenci lze určit průtokovou cytometrií, aby se získal index normality/abnormality (Gillan et al. 2005).

3.10 Stanovení fertilizační schopnosti in vivo (inseminace)

Inseminace je zásadní biotechnologická metoda, která pomáhá využít geneticky cenné jedince v populaci a zásadním způsobem pomáhá zpřesňovat šlechtitelská schémata. Nezastupitelnou roli má inseminace v záchranném programu ohrožených druhů hospodářských zvířat, kde je inseminace mrazeným ejakulátem genových rezerv klíčovým bodem tohoto programu (Ptáček et al. 2023). Umělá inseminace může být výnosnější, než přirozená plemenitba (řízení stáda, zdravotní náklady, genetické kontroly populace) (Raoul & Elsen 2020). U velkého počtu samic lze použít genetický materiál od malého počtu vynikajících samců (Allai et al. 2018). Semeno používané pro inseminaci může být čerstvé (neředěné, ředěné) nebo zmrazené (pelety, pejetý) (Gamčík & Kozumplík 1984). Existují tři klasické techniky inseminace: vaginální, cervikální a transcervikální intrauterinní. Tyto techniky se obecně používají u čerstvě chlazeného spermatu. Pokud se vezme v úvahu zmrazené sperma, nejběžnější technikou je laparoskopická intrauterinní inseminace (Daskin et al. 2016). Nejrozšířenější technikou inseminace u ovcí je deponování semene do děložního čípku, obvykle pomocí zrcadla. Děložní čípek působí nejen jako rezervoár, ale i jako bariéra pro spermie a obecně platí, že čím hlouběji do děložního čípku je semeno vpraveno, tím vyšší je šance na zabřeznutí (Evans 1988). U ovcí, na rozdíl od krav, je hlavním limitujícím faktorem inseminace obtížnost průchodu inseminační pipety děložním čípkem. Děložní krček ovce je malý, úzký, tuhý a klikatý útvar, který ztěžuje kanylací a ukládání semene do dělohy (Casali et al. 2017).

3.10.1 Intravaginální inseminace

Při intravaginální inseminaci se sperma vpravuje do pochvy bez pokusu o lokalizaci děložního čípku (Faigl et al. 2012). Postup je velmi rychlý, snadno se provádí v terénních podmínkách a může vést až k přijatelné míře zabřeznutí (30 – 50 %), ale dochází při něm k neefektivnímu využití spermatu. Ideální načasování inseminace je před ovulací, 12 – 18 hodin po začátku říje. Doporučený objem spermatu pro použití jsou 0,2 ml (Cseh et al. 2012). Tato metoda není účinná pro zmrazený ejakulát (Evans 1988).

3.10.2 Intracervikální inseminace

Preferovanou metodou u malých přežvýkavců je intracervikální inseminace, kdy je čípek lokalizován pomocí světelného zdroje a inseminační pipeta je poté protažena zrcátkem do děložního čípku (Faigl et al. 2012). Cervikální inseminace využívající chlazené sperma je nejčastěji používanou technikou, přičemž doporučený objem a počet pohyblivých spermií je 0,2 ml a 400×10^6 (Cseh et al. 2012). K dosažení dobré plodnosti, zejména při použití zmrazeného semene, se musí semeno deponovat co nejdál do kanálku děložního čípku, nejméně do hloubky 10 – 20 mm mezi první a druhou příčnou řasou. Hloubka zavedení inseminační dávky o každý milimetr do děložního kanálku zvyšuje plodnost o 10 – 12 %. Sožitá stavba kanálku děložního čípku s přítomností 5 – 9 příčných řas často překáží hlubší intracervikální inseminaci. Inseminační pipeta se zasouvá krouživým pohybem bez použití velké síly, protože by mohla nastat traumatizace sliznice děložního čípku (Gamčík & Kozumplík 1984). Zvláštní pozornost by měla být věnována zamezení zpětného toku spermatu nebo jeho omezení na minimum. Ideální doba pro inseminaci je 15 – 17 hodin po nástupu detekované říje (Faigl et al. 2012). Výsledky cervikální inseminace chlazeným semenem jsou na úrovni 40 – 80 %, mrazeným semenem v tekutém dusíku jsou výsledky nižší: 15 – 50 % (Ptáček et al. 2023).

3.10.3 Intrauterinní transcervikální inseminace

Transcervikální inseminace umožňuje průnik přes děložní hrdlo do dělohy (Underwood et al. 2015). Pomocí zrcátka s kachním zobákem a externího zdroje světla se identifikuje děložní krček. Vstup děložního čípku je fixován pomocí netraumatických Allisových kleští. Čípek je uchopen tak, aby umožňoval kompletní manipulaci dvěma prsty pro katetrizaci tenkou kovovou kanylou o průměru 2 mm a tupým hrotem. Po kanylaci se 0,25 ml semene vypustí co nejhluběji nebo přímo do dělohy (Casali et al. 2017). S touto technikou jsou spojena poranění děložního čípku, abscesy a infekce, avšak ty se liší podle operátora, dávky spermatu, stavu ovcí a zkušeností. Obecně se míra zabřeznutí při této technice pohybuje mezi 40 – 70 % při použití čerstvého sperma a 30 – 70 % při použití zmrazeného sperma, což je nižší než u laparoskopické inseminace (Faigl et al. 2012).

3.10.4 Laparoskopická inseminace

Laparoskopická inseminace ovcí je nejběžněji používanou metodou kvůli vysoké plodnosti, které je dosahováno. Tento postup je však drahý a vyžaduje odborné znalosti veterináře (Purdy et al. 2020). Při laparoskopické metodě se sperma ukládá přímo do lumenu děložních rohů. Proto jsme pomocí tohoto postupu schopni obejít cervikální bariéru a snížit množství spermatu používaného pro inseminaci (Faigl et al. 2012). Současné techniky doporučují inseminovat polovinu celkové dávky semene do střední oblasti každého děložního rohu. Požadovaný objem inseminovaných spermií je 0,05 ml a počet pohyblivých spermií 20×10^6 . Vhodně naředěný ejakulát lze použít k inseminaci až 50 ovcí a zkušený tým může být schopen inseminovat 250 – 300 ovcí za den (Cseh et al. 2012).

I když je laparoskopická inseminace minimálně invazivní, stále je to chirurgický zákrok, a proto jsou mladé, zdravé ovce s odpovídajícím skóre tělesného stavu (BCS) ideálními kandidáty. U zvířat s BCS pod 2 a nad 4 bylo pozorováno snížení embryonální životaschopnosti a následně nižší míra březosti. Doporučuje se držet zvířata bez krmiva po dobu alespoň 16 – 20 hodin a bez vody alespoň 12 hodin, aby se zabránilo naplnění břicha. Obvykle se doporučuje lehká sedace, protože celková délka výkonu (příprava a operace) trvá pouze zhruba 10 – 15 minut. Jakmile je potvrzena dostatečná sedace, zvíře je zvednuto na speciální laparoskopické kolébce. Vlno na ventrálním břiše je oholena od úrovně mléčných žláz a zasahuje kranálně až k pupku. Tupá struková kanyla připojená ke sterilní insulační hadici je zavedena tak, aby směřovala laterálně přes svalové vrstvy a intraabdominálně přes řez dále od chirurga. Insuflace vzduchu se provádí, dokud není ventrální břicho dostatečně napnuté. Jakmile je reprodukční trakt vizualizován, je vedle strukové kanyly vložen další trokar a kanyla podobné velikosti. Nabitá laparoskopická inseminační pistole se zavede tímto otvorem a zároveň se proti většímu zakřivení děložních rohů pod laparoskopickým vedením. Sperma může být aplikováno buď do jednoho nebo obou děložních rohů. Při inseminaci je třeba dbát na správnou hloubku umístění jehly, aby se zabránilo úniku spermatu do břicha. Jakmile jsou děložní rohy injikovány, provede se rychlé posouzení, aby se zjistilo, jestli nedochází k nadměrnému krvácení nebo tržným ranám děložního rohu. Laparoskop a inseminační pistole jsou vytaženy z kanyl. Kožní řezy se uzavřou pomocí nevstřebatelného šicího materiálu. Většina zvířat se po položení na zem okamžitě postaví nebo alespoň zaujme sternální leh (Sathe 2018). Při správném provedení má tato metoda úspěšnost přibližně 60 – 75 %, ale tato míra se bude lišit v závislosti na kvalitě semene, roční době, kondici bahnice a zručnosti inseminátorů. Míra zabřeznutí dosažená u zmrazeného spermatu použitého touto metodou je vyšší než u intracervikální inseminace, důvodem je místo inseminace, které zabraňuje průchodu spermií děložním čípkem (Faigl et al. 2012).



Obrázek 6: Laparoskopická inseminace (Sathe 2018)

4 Závěr

Z této literární rešerše vyplývá, že kryoprotektory jsou nezbytnou součástí procesu konzervace spermatu a následné inseminace ovcí. Díky nim je možné zachovat kvalitu spermatu i po jeho zmrazení a pozdějším rozmrazení. V této práci byly popsány jednotlivé typy kryoprotektorů a jejich vliv na kvalitu spermatu. Správný výběr kryoprotektoru a použití správného postupu zmrazování a rozmrazování jsou klíčové faktory pro úspěšnou konzervaci spermatu ovcí. Nejlepším ze všech zmíněných kryoprotektorů se zdá glycerol, který má vysoké procento motility. Smíchání 60 – 100 mM trehalózy s glycerolem v malé koncentraci 1,5 – 3 % vede k většímu kryoprotektivnímu účinku spermií, než při použití samotného glycerolu. Dále se zdá perspektivní přidání glycerolu o koncentraci 3 – 7 % do ředidel obsahujících 5 – 20 % vaječného žloutku. Bezpečnější alternativou je sušený vaječný žloutek.

Původní plemena ovcí jsou cenná pro svou genetickou rozmanitost, která může být ohrožena poklesem populace nebo vyhynutím některých plemen. Kryokonzervace spermatu původních plemen umožňuje uchovat genetickou informaci pro budoucí chov a využití.

Tato práce může být přínosem pro chovatele ovcí a vědce zabývající se reprodukcí zvířat, kteří mohou využít poznatků k optimalizaci procesu konzervace spermatu ovcí a zlepšení úspěšnosti reprodukce.

5 Literatura

AbdelHafez, F., Bedaiwy, M., El-Nashar, S. A., Sabanegh, E., Desai, N. 2009. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 15(2), 153-164.

Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R. 2019. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: a review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*, 205, 1-9.

Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., El Amiri, B. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 192, 6–17.

Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 105-113.

Álvarez, M., Tamayo-Canul, J., Martínez-Rodríguez, C., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel, L., de Paz, P. 2012. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Animal Reproduction Science*, 132(3-4), 145–154.

Amann, R. P., Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5–17.e3.

Amini, S., Masoumi, R., Rostami, B., Shahir, M. H., Taghilou, P., Arslan, H. O. 2019. Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. *Cryobiology*, 88, 75-80.

Andersen, K. 1969. Insemination with frozen semen in goats. *Nordisk veterinær medicin*, 21(12), 625.

Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E., de Paz, P. 2006. Improvement Strategies in Ovine Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(2), 30–42.

Antson, A. A., Smith, D. J., Roper, D. I., Lewis, S., Caves, L. S. D., Verma, C. S., Buckley, S. L., Lillford, P. J., Hubbard, R. E. 2001. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. *Journal of Molecular Biology*, 305(4), 875–889.

Anzalone, D. A., 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.

Arando, A., Delgado, J. V., Fernández-Prior, A., León, J. M., Bermúdez-Oria, A., Nogales, S., Pérez-Marín, C. C. 2019. Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology*, 86, 33-39.

- 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. *Veterinary Research Forum. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.* p. 157.
- 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(3), 482–487.
- Benhenia, K., Rahab, H., Smadi, M.-A., Benmakhlouf, H., Lamara, A., Idres, T., Iguer-Ouada, M. 2018. Beneficial and harmful effects of cyclodextrin-vitamin E complex on cryopreserved ram sperm. *Animal Reproduction Science*, 195, 266–273.
- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular reproduction and development*, 73(10), 1338-1344.
- Brindley, G. S. 1981. Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 44(1), 9-18.
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Ulutaş, P. A. 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, 81(1), 13–17.
- Bucak, M. N., Tekin, N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 103-108.
- Casali, R., Pinczak, A., Cuadro, F., Guillen-Muñoz, J. M., Mezzalira, A., Menchaca, A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*, 103, 30–35.
- Cordelli, E., Eleuteri, P., Leter, G., Rescia, M., Spanò, M. 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, 72(4), 273–279.
- Correia, L. F. L., Espírito-Santo, C. G., Braga, R. F., Carvalho-de-Paula, C. J., da Silva, A. A., Brandão, F. Z., Freitas, V.J.F., Ungerfeld, R., Souza-Fabjan, J. M. G. 2021. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. *Cryobiology*. doi:10.1016/j.cryobiol.2020.11.
- Cseh, S., Faigl, V., Amiridis, G. S. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 187–192.
- Dacheux, J. L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J. L., Dacheux, F. 2009. Mammalian epididymal proteome. *Molecular and cellular endocrinology*, 306(1-2), 45-50.
- 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.

- Deka, B. B., Rao, A. R. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post thawing preservation of goat semen. *Indian Veterinary Journal*, 64(7), 591-594.
- Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Marín, M. P., Del Río, J. A., Ortuño, A., Ibarra, I. 2004. Flavonoid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a Biosynthetic Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 4987–4992.
- De Lima Rosa, J., Dell’Aqua, C. D. P. F., de Souza, F. F., Missassi, G., Kempinas, W. D. G. 2023. Multiple flow cytometry analysis for assessing human sperm functional characteristics. *Reproductive Toxicology*, 117, 108353.
- Delmas, D., Jannin, B., Latruffe, N., Latruffe, P. N. 2005. Resveratrol: natural properties against atherosclerosis, associated proinflammatory effects and aging. *Mol Nutr Food Res*, 49, 377-95.
- De Mercado, E., Hernandez, M., Sanz, E., Rodriguez, A., Gomez, E., Vazquez, J. M., Roca, J. 2009. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 115(1-4), 149-157.
- Del Prete, C., Prieto, O. B., Mislei, B., Iacono, E., Mari, G., Cocchia, N., Bucci, D. 2022. Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. *Animal Reproduction Science*, 247, 107089.
- El-Alamy, M. A., Foote, R. H. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 65(3-4), 245–254.
- Evans, G. 1988. Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. *Australian Journal of Biological Sciences*, 41(1), 103.
- Evans, G., Maxwell, W. C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Boston: Butterworths, ISBN 9780409491777.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M. R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210(4474), 1131-1133.
- Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G., Cseh, S. 2012. Artificial insemination of small ruminants — A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(1), 115–129.
- 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.
- Fang, Y., Zhong, R., Chen, L., Feng, C., Sun, H., Zhou, D. 2015. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. *Small Ruminant Research*, 130, 178–182.

- Farlin, M. E., Jasko, D. J., Graham, J. K., Squires, E. L. 1992. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 32(1), 23-27.
- Fernandez-Bolanos, J. G., Lopez, O., Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez-Gutierrez, G. 2008. Hydroxytyrosol and derivatives: Isolation, synthesis, and biological properties. *Current Organic Chemistry*, 12(6), 442-463.
- Fu, H., Youzhang, Z. 2003. Vitamin B complex as a complements in the cryopreservation dilutions of the ram semen. *Gansu Nongye Daxue Xuebao*, China.
- Gamčík, P., Kozumplík, J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava.
- Garcia-Macias, V., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Garde, J. J., Anel, E., Anel, L., de Paz, P. 2006. Assessment of chromatin status (SCSA®) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*, 66(8), 1921–1930.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
- Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 59(5-6), 1157-1170.
- Gil, L., Olaciregui, M., Luño, V., Malo, C., González, N., Martínez, F. 2014. Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 72–81.
- Graham, J. K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 239–247.
- Graham, J. K., Kunze, E., Hammerstedt, R. H. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of reproduction*, 43(1), 55-64.
- Harrison, R. A. P., Vickers, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 88(1), 343-352.
- Hernández-Corredor, L., León-Restrepo, S., Bustamante-Cano, J., Báez-Sandoval, G., Jaramillo, X. 2020. Effect of the incorporation of plasma rich of platelets on the spermatozoa physiology of ram semen. *J. Dairy Vet. Anim. Res*, 9(1), 34-38.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 3-22.
- Jia, B., Larbi, A., Lv, C., Liang, J., Xiang, D., Zhang, B., Fang, Y., Shen, W., Wu, G., Quan, G. 2022. Identification and validation of ram sperm proteins associated with cryoinjuries caused by the cryopreservation process. *Theriogenology*, 184, 191-203.

- Kar, M., Chourasiya, Y., Maheshwari, R., Tekade, R. K. 2019. Current Developments in Excipient Science. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, 29–83.
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., Pelzer, K. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Ruminant Research*, 99(2-3), 208–213.
- Kheradmand, A., Babaei, H., Abshenas, J. 2006. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. 40-45.
- Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal reproduction science*, 60, 327-336.
- Leboeuf, B., Le Vern, Y., Furstoss, V., Kerboeuf, D., Guillouet, P., Magistrini, M. 2006. Response of goat sperm to hypoosmotic steps modelled probit analysis. *Animal Reproduction Science*, 91(3-4), 265–274.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 113–141.
- Ledesma, A., Manes, J., Cesari, A., Alberio, R., Hozbor, F. 2014. Electroejaculation Increases Low Molecular Weight Proteins in Seminal Plasma Modifying Sperm Quality in Corriedale Rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 324-332.
- Lee, Y. H., Kim, K., Lee, J. H., Kim, H. J. 2020. Protection of alcohol dehydrogenase against freeze–thaw stress by ice-binding proteins is proportional to their ice recrystallization inhibition property. *Marine drugs*, 18(12), 638.
- Li, C., Ren, C., Chen, Y., Wang, M., Tang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Zhang, Z. 2023. Changes on proteomic and metabolomic profiling of cryopreserved sperm effected by melatonin. *Journal of Proteomics*, 273, 104791.
- Loi, P., Iuso, D., Czernik, M., Zacchini, F., Ptak, G. 2013. Towards storage of cells and gametes in dry form. *Trends in Biotechnology*, 31(12), 688–695.
- Luna, C., Colás, C., Casao, A., Serrano, E., Domingo, J., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T. 2015. Ram seminal plasma proteins contribute to sperm capacitation and modulate sperm–zona pellucida interaction. *Theriogenology*, 83(4), 670–678.
- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J. S., Viudes-de-Castro, M. P. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8), 1756–1765.
- Marvan, F., Hampl, A., Hlořánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2017. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda, Praha. ISBN 978-80-213-2751-1.
- 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*. 4(1), 28-30.

- McNiven, M. A., Richardson, G. F. 2006. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology*, 4(3), 169-177.
- Merati, Z., Farshad, A. 2021. Supplementary role of vitamin E and amino acids added to diluent on goat sperm freezability. *Cryobiology*, 100, 151–157.
- Miholová, B., Lipský, O. 1976. *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Mocé, E., Graham, J. K. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 104-118.
- Monteiro, M. M., de Mello Seal, D. C., de Souza, J. H., Trevisan, M., Arruda, L. C. P., Silva, S. V., Guerra, M. M. P. 2023. Effect of antifreeze protein type III on frozen/thawed of spermatozoa recover from goat epididymis. *Research in Veterinary Science*, 154, 108-112.
- Moradi, A. R., Malekinejad, H., Farrokhi-Ardabili, F., Bernousi, I. 2013. Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small ruminant research*, 113(2-3), 346-352.
- Morrell, J. M., Mayer, I. 2017. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote*, 25(5), 545-557.
- Mortazavi, S.-H., Eslami, M., Farrokhi-Ardabili, F. 2020. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Animal Reproduction Science*, 106533.
- 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(2), 217–222.
- Motta, J. P. R., Paraguassú-Braga, F. H., Bouzas, L. F., Porto, L. C. 2014. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*, 68(3), 343–348.
- Murphy, E. M., Murphy, C., O’Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., Fair, S. 2017. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1541–1554.
- Murphy, E. M., O’Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., Fair, S. 2018. Comparison of plant-and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal reproduction science*, 191, 70-75.
- Napolitano, F., Arney, D., Mota-Rojas, D., De Rosa, G. 2020. Reproductive technologies and animal welfare. *Reproductive Technologies in Animals*, 275–286.
- Ofosu, J., Qazi, I. H., Fang, Y., Zhou, G. 2021. Use of melatonin in sperm cryopreservation of farm animals: A brief review. *Animal Reproduction Science*, 233, 106850.

- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., Lonergan, P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541-549.
- O' Meara, C. M., Hanrahan, J. P., Prathalingam, N. S., Owen, J. S., Donovan, A., Fair, S., Lonergan, P. 2008. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 69(4), 513–522.
- 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(1), 1096.
- Öztürk, A. E., Bodu, M., Bucak, M. N., Ağır, V., Özcan, A., Keskin, N., Dursun, Ş. 2020. The synergistic effect of trehalose and low concentrations of cryoprotectants can improve post-thaw ram sperm parameters. *Cryobiology*, 95, 157-163.
- Öztürk, A. E., Bucak, M. N., Bodu, M., Başpınar, N., Çelik, İ., Shu, Z., Gao, D. 2019. Cryobiology and cryopreservation of sperm. In *Cryopreservation-Current Advances and Evaluations*. London, UK: IntechOpen.
- Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., Yániz, J. L. 2013. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*, 112(1-3), 128–135.
- Palazzese, L., Anzalone, D. A., Turri, F., Faieta, M., Donnadio, A., Pizzi, F., Pittia, P., Matsukawa, K., Loi, P. 2020. Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature. *Scientific Reports*, 10(1), 18873.
- Partin, A. W. 2021. *Male Reproductive Physiology*. Campbell-Walsh-Wein Urology. ISBN: 9780323672276.
- Pataki, B., Horváth, Á., Mészáros, G., Kitanović, N., Ács, A., Hegyi, Á., Urbányi, B. 2022. Adjustment of common carp sperm concentration prior to cryopreservation: Does it matter? *Aquaculture Reports*, 24, 101109.
- Paul, R. K., Kumar, D., Singh, R. 2021. Carboxymethyl cellulose and glycerol act synergistically as cryoprotectant during cryopreservation of ram semen. *Cryobiology*, 101, 61–66.
- Peris-Frau, P., et al. 2020. Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2781.
- Pini, T., Farmer, K., Druart, X., Teixeira-Gomes, A. P., Tsikis, G., Labas, V., Leahy, T., de Graaf, S. P. 2018. Binder of Sperm Proteins protect ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Cryobiology*, 82, 78–87.

- Pool, K. R., Rickard, J. P., Tumeth, E., de Graaf, S. P. 2020. Treatment of rams with melatonin implants in the non-breeding season improves post-thaw sperm progressive motility and DNA integrity. *Animal Reproduction Science*, 221, 106579.
- Ptáček, M., Savvulidi, F. G., Hrdlička, M., Málková, A., Janošíková, M., Uhlířová, J., Ranná, T. 2023. Reprodukční ukazatele koz po cervikální inseminaci. *Odborný časopis Náš chov*. 1. zemědělská a.s. Chorušice, Katedra chovu hospodářských zvířat, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Purdy, P. H., Graham, J. K., Azevedo, H. C. 2021. Evaluation of boar and bull sperm capacitation and the acrosome reaction using flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 106846. doi:10.1016/j.anireprosci.2021.106846.
- Purdy, P. H., Spiller, S. F., McGuire, E., McGuire, K., Koepke, K., Lake, S., Blackburn, H. D. 2020. Critical factors for non-surgical artificial insemination in sheep. *Small Ruminant Research*, 106179. doi:10.1016/j.smallrumres.2020.
- Quirino, M., Jakop, U., Mellagi, A. P. G., Bortolozzo, F. P., Jung, M., Schulze, M. 2022. A 5-color flow cytometry panel to assess plasma membrane integrity, acrosomal status, membrane lipid organization and mitochondrial activity of boar and stallion spermatozoa following liquid semen storage. *Animal Reproduction Science*, 247, 107076.
- Raoul, J., Elsen, J.-M. 2020. Effect of the rate of artificial insemination and paternity knowledge on the genetic gain for French meat sheep breeding programs. *Livestock Science*, 232, 103932.
- Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada, Praha. ISBN 978-80-247-3282-4.
- Robles, V., G. Valcarce, D., & F. Riesco, M. 2019. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*, 9(5), 181.
- Rodríguez, G., Rodríguez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Jiménez, A. 2007. Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste. *European Food Research and Technology*, 224, 733-741.
- Rubinsky, B., DeVries, A. L. 1989. Effect of ice crystal habit on the viability of glycerol-protected red blood cells. *Cryobiology*, 26(6), 580.
- Saberivand, A., Pashapour, S., Noghani, A. E., Namvar, Z. 2022. Synergistic effect of royal jelly in combination with glycerol and dimethyl sulfoxide on cryoprotection of Romanov ram sperm. *Cryobiology*, 104, 87-97.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249.

- Salamon, S., Maxwell, W. M. C., Firth, J. H. 1979. Fertility of ram semen after storage at 5°C. *Animal Reproduction Science*, 2(4), 373–385.
- Sathe, S. R. 2018. Laparoscopic Artificial Insemination Technique in Small Ruminants—A Procedure Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. doi:10.3389/fvets.2018.00266.
- 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*, 629–641.
- 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(8), 1722–1726.
- 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 Veterinaria Brno*, 83(1), 19–25.
- Tamura, H. et al. 2020. Importance of melatonin in assisted reproductive technology and ovarian aging. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 1135.
- Tiwari, S., Mohanty, T. K., Bhakat, M., Kumar, N., Baithalu, R. K., Nath, S., Yadav, H.P., Dewry, R. K. 2021. Comparative evidence support better antioxidant efficacy of mitochondrial-targeted (Mitoquinone) than cytosolic (Resveratrol) antioxidant in improving in-vitro sperm functions of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Cryobiology*, 101, 125–134.
- Tsakmakidis, I. A. 2010. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*, 92(1-3), 126–130.
- Underwood, W. J., Blauwiekel, R., Delano, M. L., Gillesby, R., Mischler, S. A., Schoell, A. 2015. *Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle)*. Laboratory Animal Medicine, 623–694.
- Van der Horst, G. 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal Reproduction Science*, 106350.
- Van Tilburg, M. F., Rodrigues, M. A. M., Moreira, R. A., Moreno, F. B., Monteiro-Moreira, A. C. O., Cândido, M. J. D., Moura, A. A. 2013. Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. *Theriogenology*, 79(9), 1247–1261.
- Vásquez, J., Florentini, E. A., Camargo, L. A., Gonzales, J., Valdivia, M. 2013. Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. *Livestock Science*, 157(2-3), 618–622.
- Venketesh, S., Dayananda, C. 2008. Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins. *Critical reviews in biotechnology*, 28(1), 57-82.

Vidal, A. H., Batista, A. M., da Silva, E. C. B., Gomes, W. A., Pelinca, M. A., Silva, S. V., Guerra, M. M. P. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small ruminant research*, 109(1), 47-51.

Wilhelm, K. M., Graham, J. K., Squires, E. L. 1996. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, 46(4), 559-578.

Wu, X., Yao, F., Zhang, H., Li, J. 2021. Antifreeze proteins and their biomimetics for cell cryopreservation: Mechanism, function and application-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 1276-1291.

Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., Yeste, M. 2021. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*. 106904.

Yániz, J., Martí, J. I., Silvestre, M. A., Folch, J., Santolaria, P., Alabart, J. L., López-Gatius, F. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 64(8), 1844–1851.

6 Seznam použitých zkratek a symbolů

CASA počítačem asistovaná analýza spermií
FCM průtoková cytometrie
ROS reaktivní forma kyslíku
PSA rostlina hrachu *Pisum sativum agglutinin*
HOS hypoosmotický test
SCSA metoda vyšetření struktury chromatinu spermií
DMSO dimethylsulfoxid
SOD superoxiddismutáza
GR glutathionreduktáza
GPx glutathionperoxidáza
CAT kataláza
MPTP mitochondriální permeabilní přechodové póry
ATP adenosintrifosfát
BSA bovinní sérový albumin
BSP vazebné proteiny spermií
AFP nemrznoucí proteiny
CMC karboxymethylcelulóza
AI umělá inseminace
HT hydroxytyrosol
DHPG 3,4-dihydroxyfenylglykol
LPO peroxidace lipidů

7 Seznam obrázků

Obrázek 1: Spermie berana (Miholová & Lipský 1976)	11
Obrázek 2: Umělá vagína (osobní archiv)	12
Obrázek 3: Skleněné lahvičky obsahující lyofilizované spermie (Anzalone et al. 2018)	28
Obrázek 4: Analýza CASA (osobní archiv)	30
Obrázek 5: Průtokový cytometr (osobní archiv)	32
Obrázek 6: Laparoskopická inseminace (Sathe 2018)	35

8 Seznam tabulek

Tabulka 1: Vlastnosti semene berana (Gamčík & Kozumplík 1984)	14
---	----

