

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv délky ekvilibrace na motilitu spermií býků po rozmrazení

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Beran, PhD.

Autor: Bc. Karolína Krátílová

České Budějovice, 2020

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Karolína KRÁTILOVÁ
Osobní číslo: Z18429
Studijní program: N4103 Zootechnika
Studijní obor: Zootechnika
Téma práce: Vliv délky ekvilibrace na motilitu spermií býků po rozmrazení
Zadávací katedra: Katedra zootechnických věd

Zásady pro vypracování

V posledních letech byl zaznamenán rostoucí zájem o zvyšování kvality zmrazených inseminačních dávek býků. Zásadní vliv na přežitelnost spermií v inseminační dávce mají jednotlivé fáze výroby, zejména ředění, zchlazení, ekvilibrace a mrazení. Ekvilibrace je proces, který následuje po zchlazení naředěných inseminačních dávek před mrazením, kdy kryoprotektanty pronikají do buněk spermií. Délka ekvilibrace je variabilní a nejvhodnější délka ještě nebyla jednoznačně stanovena.

Cílem práce je proto vyhodnotit vliv různých délek ekvilibrace na motilitu spermií býků po rozmrazení inseminační dávky.

Od vybrané skupiny plemenných býků, chovaných na inseminační stanici, budou získány vzorky ejakulátu. Vzorky, které projdou vstupním hodnocením, budou využity k výrobě inseminačních dávek podle metodických postupů inseminační stanice. Naplněné pejety od každého býka rozdělíte na skupiny a každou skupinu budete ekvilibrovat po různě dlouhou dobu. Kvalita inseminačních dávek bude ověřena na základě hodnocení motility spermií po zmrazení/rozmrazení inseminační dávky. Vhodnými biometrickými metodami následně vyhodnotíte výsledky použití různých délek ekvilibrace.

Rozsah pracovní zprávy: 40 – 50 stran
Rozsah grafických prací: dle pokynů vedoucího práce
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

Januskauskas A., Gil J., Soderquist L., Haard M.G.M., Haard M.C., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. (1999): Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52, 641-658.

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

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

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

Gil J., Januskauskas A., Haard M., Johannisson A., Soderquist L., Rodriguez-Martinez H. (2000): Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reproduction in Domestic Animals*, 35, 69-77.

Hafez, E. S. E.; Hafez, B.: *Reproduction in Farm Animals*, 6th Ed, Lippincott: Williams and Wilkins, 2000, 495 s.

Vědecké a odborné články týkající se sledované problematiky v internetových databázích a odborných časopisech, např. *Journal of Dairy Science*, *Journal of Animal Science*, *Animal Reproduction Science*, *Czech Journal of Animal Science*, *Journal of Central European Agriculture*, *Náš Chov*, *Farmář*.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Beran, Ph.D.
Katedra zootechnických věd

Datum zadání diplomové práce: 21. března 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2020

V Českých Budějovicích dne 25. března 2019



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Budejovická 1658, 370 06 Česká Budějovice

L.S.



prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum _____

Podpis studenta _____

V první řadě děkuji insemináčnické stanici za umožnění uskutečnění experimentální části této kvalifikační práce, zpracování a vyhodnocení vzorků. Dále děkuji Ing. Janu Beranovi, PhD., vedoucímu diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytl v průběhu zpracování a také děkuji Mgr. Veronice Čoudkové za konzultace při statistickém hodnocení výsledků.

Vliv délky ekvilibrace na motilitu spermií býků po rozmrazení

Krátilová, K.

Zemědělská fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Abstrakt

Cílem práce bylo sledovat změnu motility spermií býků po rozmrazení v závislosti na době ekvilibrace před mrazením inseminačních dávek. Dále byl stanoven procentuální podíl progresivní aktivity spermií po rozmrazení z průměrné progresivní aktivity spermií po odběru. Hodnocení probíhalo u 6 býků, přibližně stejného věku, chovaných za stejných podmínek na inseminační stanici. Odebráno bylo 15 ejakulátů od každého býka a následně zpracováno do inseminačních dávek, které byly rozděleny do čtyř skupin podle délky ekvilibrace: 1, 3, 8 a 24 hodin. Ekvilibrace probíhala v chladničce při teplotě 5 °C. Poté byly dávky zmrazeny a po týdnu skladování v tekutém dusíku hodnoceny. Průměrné hodnoty vstupních parametrů byly: progresivní motilita při odběrech měla hodnotu 74,63±9,07 %, množství ejakulátu 10,08 g a hustota 0,91 x 10⁶ ml⁻¹ spermií.

Výsledky dokumentují vyšší progresivní motilitu spermií při delší době ekvilibrace (8 a 24 hodin) na rozdíl od dob kratších (1 a 3 hodiny) (p <0,01). Nejlepší procentuální progresivní motilita byla zaznamenána při době ekvilibrace 8 hodin, kdy měla 58,74±13,92 % z počáteční hodnoty (43,84 % skutečné progresivní aktivity). Při hodnocení progresivní motility spermií býků po rozmrazení byly mezi býky zaznamenány statistické rozdíly (p <0,05), které se projeví u býka č. 4 v době ekvilibrace 24 hodin.

Stanovení progresivní motility spermií býků je významné z hlediska hodnocení fertility býků. Doba ekvilibrace je pouze jedním z mnoha faktorů působících na kvalitu vyrobených inseminačních dávek.

Klíčová slova: býk; sperma; motilita; doba ekvilibrace; rozmrazení

Effect of equilibration time on thawing motility on bull sperm

Krátilová, K.

Faculty of Agriculture

University of South Bohemia in České Budějovice

Abstract

The aim of the study was to monitor the change in motility of bull sperm post-thawing depending on the time of equilibration before freezing of insemination doses. The percentage of progressive sperm activity post-thawing was determined from the average progressive sperm activity after collection. The evaluation was performed on 6 bulls, approximately the same age, reared under the same conditions at the insemination station. 15 ejaculates were taken from each bull and subsequently processed into insemination doses, which were divided into four groups according to the length of equilibration: 1, 3, 8 and 24 hours. Equilibration was performed in a refrigerator at 5 ° C. The doses were then frozen and evaluated after one week of storage in liquid nitrogen. The mean values of the input parameters were: progressive motility at sampling was 74.63 ± 9.07 , the amount of ejaculate 10.08 g and the density $0.91 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ sperm.

The results document higher progressive sperm motility with longer equilibration times (8 and 24 hours) as opposed to shorter times (1 and 3 hours) ($p < 0.01$). The best procentual progressive motility was recorded at the equilibration time of 8 hours, when it was 58.74 ± 13.92 % of the initial value (43,84 % of real progressive activity). When evaluating the progressive motility of bull sperm after thawing, statistical differences were observed between bulls ($p < 0.05$).

Determination of the progressive motility of bull sperm is important in terms of assessing bull fertility. The equilibration time is only one of many factors influencing the quality of the produced insemination doses.

Key words: bull, semen; motility; equilibring time; post-thaw

Obsah

1	Úvod	10
2	Literární přehled	11
2.1	Historie	11
2.1.1	Historie inseminace	11
2.1.2	Historie konzervace	12
2.2	Pohlavní dospělost býků	13
2.3	Spermatogeneze	14
2.4	Složení spermatu	15
2.4.1	Stavba spermií	16
2.5	Metody odběru ejakulátu	18
2.6	Ředění ejakulátu	19
2.7	Plnění a identifikace	21
2.8	Chlazení a ekvibrace	21
2.8.1	Doba ekvibrace	22
2.9	Konzervace	23
2.9.1	Krátkodobá konzervace	23
2.9.2	Dlouhodobá konzervace – kryokonzervace	23
2.10	Makroskopické hodnocení ejakulátu	25
2.11	Mikroskopické hodnocení ejakulátu	26
2.11.1	Motilita spermií	26
2.11.2	Hodnocení morfologie	27
2.11.3	Test přežitelnosti	28
2.11.4	CASA – počítačem podporované systémy pro analýzu spermií	28
2.11.5	Hodnocení spermatu po rozmrazení	28
2.12	Skladování a manipulace se zmrazeným spermatem	29
2.13	Vlivy na plodnost a kvalitu spermií	30

2.14	Neplodnost	31
3	Cíl práce	32
4	Materiál a metodika	33
4.1	Zpracování a hodnocení spermatu	33
4.2	Statistické vyhodnocení výsledků	34
5	Výsledky a diskuse	36
5.1	Základní statistické charakteristiky	36
5.2	Vliv délky ekvibrace	38
6	Závěr	43
7	Seznam literatury	44
8	Přílohy	56
9	Seznam použitých obrázků, tabulek, grafů	54
10	Seznam použitých zkratk	55

1 Úvod

Celosvětová poptávka po živočišných bílkovinách v posledních desetiletích enormně vzrostla, což vyžaduje zvýšenou účinnost produkce potravin po celém světě. Toho je možné dosáhnout umělou inseminací krav, která je již běžně používanou metodou reprodukce ve velkochovech, ale i u menších chovatelů. U většiny druhů dominuje použití chlazeného spermatu, zatímco u skotu je pravidlem kryokonzervace, což znamená uchovávání biologického materiálu pod bodem mrazu.

Kryokonzervace spermií přispívá k rozšíření reprodukčních technik jako je umělé oplodnění, oplodnění *in vitro*, sexování semene i embryotransferu. Význam kryokonzervace není pouze v reprodukci, nýbrž jeho velký význam je i v uložení genetického materiálu, jako genetický zdroj, ale také i v biomedicínském výzkumu. Významné je i zkrácení generačního intervalu a možnost výběru specifických znaků v dané populaci.

Konzervované semeno nízkými teplotami napomáhají také křížení na velké vzdálenosti. Plemenářské společnosti běžně nabízejí inseminační dávky ze zemí EU i z USA aj. Použití je velmi výhodné i ve velkochovech, kde by přirozená reprodukce nebyla možná vzhledem k technologickým i organizačním možnostem chovů. Zároveň usnadňuje následnou diagnostiku gravidity a tím i lepší průběh březosti krav (přesnější doba zasušení a datum předpokládaného porodu).

Zpracování spermatu má obecně vliv na následnou aktivitu spermií. Proto je důležité se věnovat jednak samotnému býkovi, ale také každému kroku při zpracování ejakulátu, které může snížit či ohrozit životnost spermií.

Pro správné zamrazení a uchování se používají ředidla, které obsahují kryoprotektiva. Tyto látky pomáhají spermatu přežít nízké teploty při konzervaci a zároveň zlepšují obnovení po rozmrazení. Přidáním ředidla začíná interakce ejakulátu s obsahem ředidla. Pro vytvoření rovnováhy je nutný určitý čas, kterému se říká doba ekvibrace.

Jak pro plemenářské společnosti, tak pro chovatele, je prioritou vysoká kvalita inseminačních dávek. Na kvalitu spermií po rozmrazení má vliv mnoho faktorů, od zdraví býka, přes výživu, odběr, zpracování, uchování, až po uskladnění a manipulaci. Proto je důležité dodržovat všechna doporučení ve všech krocích, aby došlo k uchování vysoké kvality. To vede k lepším chovatelským a tím i ekonomickým výsledkům.

2 Literární přehled

2.1 Historie

2.1.1 Historie inseminace

Existují příběhy ze 14. století o Arabech, kteří získávali sperma z pochvy připuštěných klisen patřících ke konkurenčním skupinám a pomocí spermatu inseminovali své vlastní klisny (FOOTE, 2002) zavedením bavlny do jejího reprodukčního orgánu (LONERGAN, 2018).

Leeuwenhoek (1678) a jeho asistent Hamm byli první lidé, kteří spatřili sperma, které nazvali „animalcules“ (FOOTE, 2002; OMBELET *et* ROBAYS, 2015). Téměř o 100 let později Lazaro Spallanzani (1771) pozoroval animalcules u různých druhů zvířat, včetně lidí, a zároveň dokumentoval fertilizační schopnosti (PRATHIMA *et al.*, 2015). Věnoval se i umělé inseminaci a byl první, komu se povedla úspěšná inseminace u feny (1784), která porodila tři štěňata o 62 dní později (FOOTE, 2002; OMBELET *et* ROBAYS, 2015).

V roce 1897 Heape, vynikající reprodukční biolog z Cambridge, v několika zemích uvedl, že byla použita umělá inseminace (AI) v izolovaných studiích s králíky, psy a koňmi (FOOTE, 2002; OMBELET *et* ROBAYS, 2015).

V roce 1899 popsal první pokusy vyvinout praktické metody umělé inseminace Ilya Ivanovič Ivanoff (Rusko, 1870–1932). Byl průkopníkem ve výběru vynikajících hřebců, kteří znásobili své potomstvo prostřednictvím AI. Práce Ivanoffa převzal další ruský vědec Milovanov, který navrhl první umělé vagíny, velmi podobné těm, které se dnes používají (FOOTE, 2002; OMBELET *et* ROBAYS, 2015; LONERGAN, 2018).

V roce 1909 byla ruským ministerstvem zemědělství zřízena laboratoř určená pro školení veterinářů v technikách umělé inseminace. Velké rozmnožování krav prostřednictvím AI bylo poprvé provedeno v Rusku, kde bylo v roce 1931 chováno 19 800 krav (LONERGAN, 2018).

Ve 40. letech dánští veterináři zavedli metodu rektovaginální fixace krčku umožňující zavedení ejakulátu do děložního čípku nebo do těla dělohy. Toto zůstává standardní metodou AI u skotu (LONERGAN, 2018).

2.1.2 Historie konzervace

Předpokládá se, že Spallanzani byl první, kdo oznámil účinky chlazení na lidské sperma, když v roce 1776 poznamenal, že sperma chlazená sněhem se stala nehybnou (OMBELET *et* ROBAYS, 2015).

Phillips a Lardy (1939) jako první použili vaječný žloutek k ochraně býčích spermatických buněk před tepelným šokem po ochlazení. Salisbury a kol. (1941) zlepšili médium použitím vaječného žloutku s citrátem sodným, což umožnilo použití spermatu při 5 °C až po dobu tří dnů. Polge a spolupracovníci (1949) byli první, kdo zmrazil drůbeží a býčí spermie pomocí glycerolu v ředidle (OMBELET *et* ROBAYS, 2015; LONERGAN, 2018). Tento postup umožnil větší časové, a tedy i prostorové oddělení mezi odběrem spermatu a inseminací (LIEBERMAN *et al.*, 2016). V roce 1950 vědci z Cornell University (New York) objevili přínos antibiotik přidaných do roztoku spermií v procesech umělé inseminace. Takzvaný Cornellův nástavec obsahoval antibiotickou směs penicilinu, streptomycinu a polymyxinu B a byl používán po mnoho let jako standard. Antibiotika se stále používají pro ochranu před možnou kontaminací (OMBELET *et* ROBAYS, 2015; LONERGAN, 2018).

Arthur Walton (1897–1959) v Anglii vedl studie na Cambridge o skladování a manipulaci se spermatem a jeho dálkové přepravě. Úspěšně odeslal chlazené králičí sperma. Walton následně použil termosku obsahující drcený led, aby odeslal do Polska chlazené sperma při 10 °C (LONERGAN, 2018).

Dánu Sørensenovi je připisován vynález pejetý pro balení tekutého spermatu, která byla dále vyvinuta a upravena Francouzem Robertem Cassou a nyní se používá po celém světě pro zpracování a skladování zmrazeného spermatu (LONERGAN, 2018).

V roce 1953 Dr. Jerome K. Sherman, americký průkopník v zmrazování spermií, představil jednoduchou metodu zachování lidského spermatu pomocí glycerolu. Kombinoval to s pomalým ochlazováním spermatu a skladováním s tuhým oxidem uhličitým jako chladičem. Sherman také poprvé prokázal, že zmrazené spermie, když jsou rozmrazeny, byly schopny oplodnit vajíčko a vyvolat jeho normální vývoj (OMBELET *et* ROBAYS, 2015).

Ve světě se zvýšila poptávka po spermatu vybraných býků. Pro její uspokojení byla zvolena cesta maximalizace zisku spermií od jednoho býka. Když byly ejakuláty odebírány za srovnatelných podmínek, vyskytly se velké rozdíly ve produkci

spermatu býků. Byly vyvinuty metody pro hodnocení jak kvality, tak kvantity spermatogeneze u býků (FOOTE, 2002).

2.2 Pohlavní dospělost býků

Pohlavní dospělost býků je charakterizována produkcí ejakulátu s minimálním množstvím spermií 50 milionů a s ne méně než 10% progresivní motilitou (RAWLINGS *et al.*, 2008; THUNDATHIL *et al.*, 2016). Kromě toho musí mít býci odpovídající libido a dostatečně vyvinut penis, aby došlo ke kopulaci a ejakulaci (THUNDATHIL *et al.*, 2016). Základem libida a schopnosti páření je nenarušený průběh nepodmíněných pohlavních reflexů. Schopnost oplození je dána kvalitou produkovaných spermií (HOFÍREK *et al.*, 2009).

Varlata býka rostou relativně pomalu až do věku přibližně 25 týdnů a poté dochází k rychlé fázi růstu až do puberty ve věku 37–50 týdnů. Během časně postnatální fáze pomalejšího růstu varlat, prespermatogonií a některých spermatogonií, vznikají dospělé buňky Leydigovy a produkují se nediferencované Sertoliho buňky. Rychlý růst varlat po věku 25 týdnů spočívá ve výrazném zvětšení průměru a délky semenných kanálků, dramatické proliferaci a diferenciaci zárodečných buněk, přičemž zralé spermie se vyskytují ve věku 32 až 40 týdnů. Populace dospělých buněk Leydigových je z velké části na místě ve věku 30 týdnů a populace buněk Sertoliho ve věku 30–40 týdnů. Koncentrace luteinizačního hormonu v séru se zvyšují od 4 do 5 týdnů věku, k časnému postnatálnímu vrcholu ve věku 12–16 týdnů, následuje pokles na 25 týdnů věku. Koncentrace folikuly stimulujícího hormonu v séru jsou vysoké postnatálně a postupně klesají přibližně do 25 týdnů věku. Koncentrace testosteronu v séru se zvyšují během fáze rychlého růstu varlat. Časná postnatální sekrece gonadotropinu je klíčová pro zahájení procesu pohlavního zrání u telete (RAWLINGS *et al.*, 2008).

U býků evropských plemen je puberta dosažena v rozmezí přibližně 37–50 týdnů věku, plemena mléčných býků o něco dříve než u plemen masných (RAWLINGS *et al.*, 2008). Podle LOUDY *et al.* (2007) se pohlavní dospělost u býků dostavuje v 7 až 12 měsících věku. Ejakulátu je nejprve nižší množství s obsahem nezralých a patologických spermií, a však postupně (do 18–20 měsíců) nabývá objemu i kvality.

2.3 Spermatogeneze

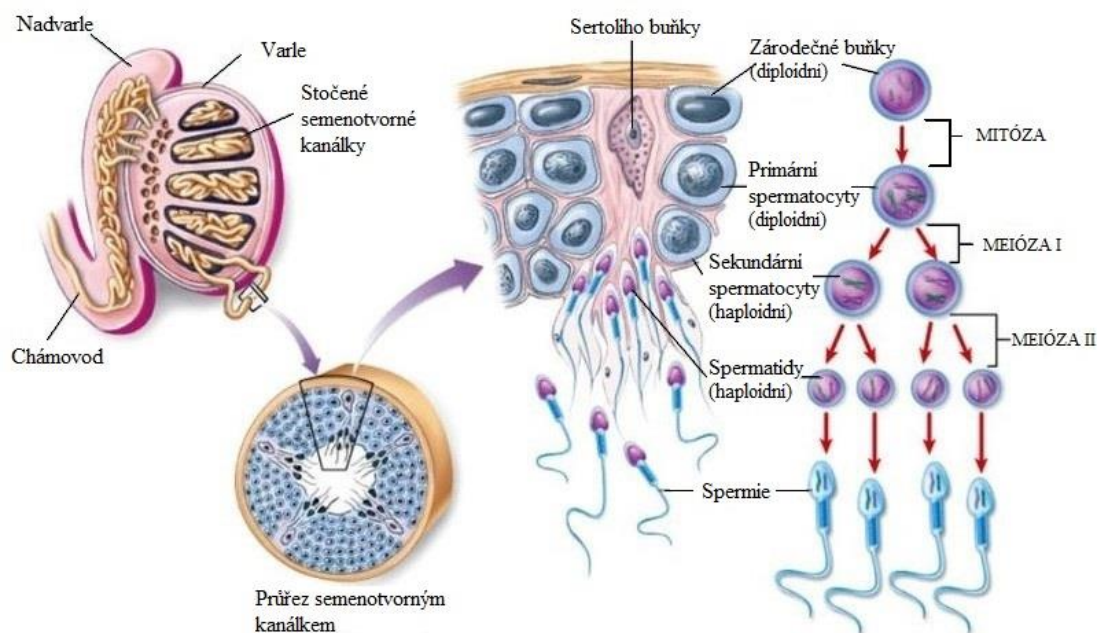
Spermatogeneze je plně regulovaný proces množení zárodečných buněk a diferenciace vedoucí k produkci spermatu v semenotvorných tubulech, které jsou následně uloženy v *epididymis* (STAUB *et* JOHNSON, 2018) probíhající po dosažení pohlavní dospělosti. Tento proces se cyklicky opakuje každých 54 dní (u býků) a probíhá kontinuálně v průběhu celého reprodukčního období. Každý další začíná přibližně se zpožděním jedné čtvrtiny předešlého cyklu (JELÍNEK *et* KOUDELA, 2003).

WANG *et al.* (2019) rozděluje spermatogenezi do tří částí: mitózu, meiózu a spermiogenezi. JELÍNEK *et* KOUDELA (2003) zahrnuje mitotické a meiotické dělení do procesu zvaného spermatocytogeneze.

První krok zahrnuje mitotické dělení buněk, které umožňuje množení časného stádia buněk, spermatogonií. Druhý krok vyžaduje meiózu, ve které diploidní buňky tvoří haploidní buňky. K dělení dochází, dokud nevzniknou kulaté spermatidy (SUEDE *et* SAPRA, 2020) (Obrázek 1).

Po dvou kolech meiotických dělení jsou generovány haploidní spermatidy a poté je zahájen jedinečný proces diferenciace, zvaný spermiogeneze, za účelem produkce prodloužených spermatidů (WANG *et al.*, 2019).

Obrázek 1: Schéma spermatogeneze



Zdroj: <https://biologigonz.blogspot.com/2015/10/soal-biologi-remedial-reproduksi-kelas.html>

Vzniklé spermatidy procházejí diferenciálním procesem, ve kterém vzniknou zralé spermie. Tento děj, zvaný spermiogeneze, zahrnuje strukturální změny, ke kterým dochází v několika buněčných kompartmentech. Jedná se o opětovné zabalení chromatinu pro transport, vývoj akrosomu, prodloužení bičíku, vytvoření mitochondriálního pláště ve středním dílu a zmenšení objemu cytoplazmy. Poté se spermie uvolňují do lumen semenotvorných kanálků (HORST *et al.*, 2019).

2.4 Složení spermatu

Sperma (ejakulát, semeno, chám) je viskózní tekutina složená ze spermií a semenné plazmy (JELÍNEK *et* KOUDELA, 2003; KUBÍČEK, 2010). Fyziologické sperma je směs složená ze spermatozoí vyloučených v sekretech z varlat a nadvarlat, které se při ejakulaci smíchají se sekretem z prostaty, semenných váčků a bulbouretrálních žláz (KUBÍČEK, 2010). Semenná tekutina je produkována hlavně, ale nikoliv výlučně, přídatnými pohlavními žlázami (POIANI, 2006).

Semenná tekutina obsahuje komplexní médium molekul, které jsou nákladné na tvorbu a které ovlivňují výkon spermií (CORNWALLIS *et* O'CONNOR, 2009). Složky semenné plazmy mohou zahrnovat proteiny nebo peptidy semenné tekutiny, soli a cukry, obranné sloučeniny, lipidy, vodu a mikroby (PERRY *et al.*, 2013). Podíl semenné plazmy u býků je 90 % (JELÍNEK *et* KOUDELA, 2003).

Z chemického pohledu semenná plazma obsahuje 90 g/100 ml vody, 6,8 g/100 ml proteinu, 460 až 600 ppm fruktózy, 10 až 140 ppm sorbitolu, 620 až 800 ppm kyseliny citronové, 350 ppm glycerolfosfocholinu a 60 ppm inositolu (BARSZCZ, 2012). Z enzymů je zde přítomná například alkalická fosfatáza, laktátdehydrogenáza, glutamát-pyruvát transamináza, glutamát-oxalacetát transamináza a další (TALLURI *et al.*, 2017).

Non-spermatické komponenty ejakulátu vykonávají celou řadu funkcí: jsou často nezbytné pro plodnost, regulují ukládání a používání spermií a mohou výrazně ovlivnit kondici u obou pohlaví prostřednictvím účinků na fyziologii samic, chování, imunitu a také lze prostřednictvím spermatu ovlivnit výsledky konkurence mezi samci (PERRY *et al.*, 2013).

Semenná plazma slouží jako prostředek transportu ejakulovaných spermií směrem k jejich cestě od nadvarlat k oocytu. Další funkcí semenné plazmy je poskytnutí ochrany a výživy spermiím. Odhad biochemických složek a enzymů v semenné plazmě lze značit jako biologické markery pro kvalitu spermatu, protože

jejich hladina či hodnoty naznačují funkci, integritu a poškození spermatu (TALLURI *et al.*, 2017).

JELÍNEK *et* KOUDELA (2003) uvádí průměrný objem ejakulátu u býků 4 ml s pH 6,4–7,0. Průměrná koncentrace v 1 mm³ ejakulátu je 1 x 10⁶ spermií, celkové množství spermií v ejakulátu jsou 4 x 10⁹ a podíl semenné plazmy u býka tvoří 90 %. Ejakulát by měl být bělavě nažloutlý až smetanový.

2.4.1 Stavba spermií

Savčí spermatozoon je charakterizován dvěma morfologickými a funkčními částmi, tj. hlavičkou (A) a bičíkem (obrázek 2), z nichž každá je optimalizována pro specifický úkol. Obě tyto jednotky jsou formovány a vytvářeny během cytomorfogení fáze spermatogeneze, tzv. spermiogeneze. Zatímco bičík je motorickým modulem, který pomáhá zajistit „sílu“, která pohání ejakulované sperma do vejcovodu k místu oplodnění, hlavička zapouzdří přesně polovinu otcovského genomu, který, jakmile pohltní *zonu pellucidu*, vede k tvorbě zygoty a při obnově diploidního stavu. (BERRUTI *et* PAIARDI, 2014)

Na morfologii spermií má vliv jak genetický faktor, tak i faktor enviromentální a faktory působící na spermie v průběhu zpracování ejakulátu (BUTTS *et al.*, 2011).

Spermie je téměř bez cytoplazmy, s velkým jádrem obsahující vysoce kondenzované chromozomy, které brání transkripční aktivitě pro nahrazení proteinů (BARBAS *et* MASCARENHAS, 2008).

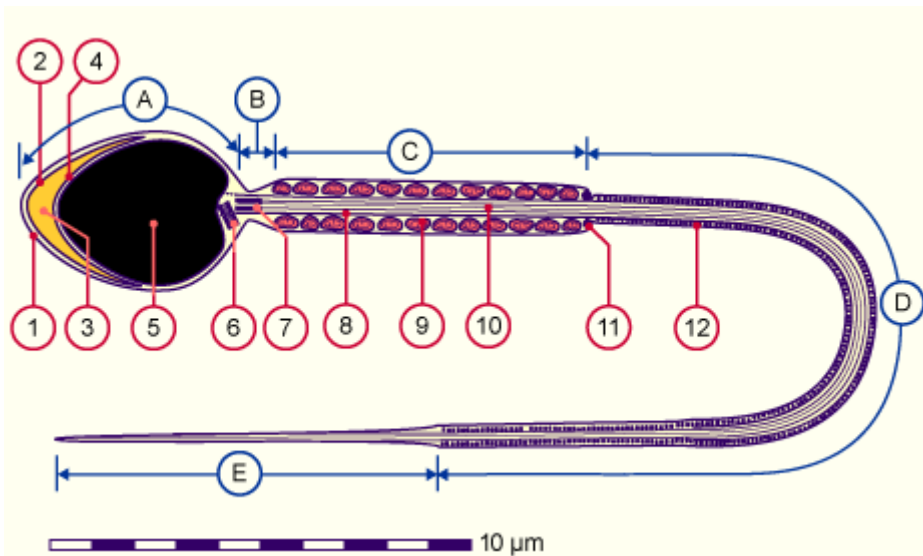
Morfologie hlavičky spermií byla identifikována jako charakteristika, kterou lze použít k predikci kvality spermatu u samce. Morfologické hodnocení spermií má mimo jiné také význam při zkoumání vhodnosti spermií ke kryokonzervaci (BUTTS *et al.*, 2011). Hlavička je oválného a zploštělého tvaru a je rozdělena do dvou segmentů: přední akrosom a zadní postakrosomální oblast. Spojení přední a zadní oblasti je známé jako jaderný kruh. Základem předního akrosomu je jádro, které pokračuje k bázi hlavičky (CHENOWETH *et* LORTON, 2014).

Akrosom je jedinečná membránová organela čepičkového tvaru, odvozená od Golgiho aparátu, umístěná nad přední částí jádra spermie (KHAWAR *et al.*, 2019). Tento kyselý vakuol obsahuje řadu hydrolytických enzymů, které, když jsou vylučovány, pomáhají spermiím proniknout do pláště vajíčka (BERRUTI *et* PAIARDI, 2014). Ačkoli jeho morfologie se liší od druhu k druhu, dvě základní části tvoří

akrosom u všech savců: velká přední část, která se liší tvarem (pádlo, háček a podobná lopatce) a velikostí a rovníkový segment, což je menší a tenčí část akrosomu nalezená ve středu hlavičky spermatu. Akrosomální obsah se nachází mezi vnější a vnitřní akrosomální membránou (KHAWAR *et al.*, 2019).

Největší složkou hlavičky spermii je jádro, které obsahuje vysoce kondenzovanou DNA spojenou protaminy, specifickými proteiny pro spermie. Tento kondenzovaný stav DNA charakterizuje buňku jako nedělící se a transkripčně neaktivní. Kompaktovaná spermatická DNA dále zaujímá velmi malý objem ve srovnání s DNA v mitotickém chromozomu. Jádro je obklopeno zvláštním cytoskeletálním komplexem perinukleární theky, který se nazývá postakrosomální list (CHENOWETH *et* LORTON, 2014).

Obrázek 2: Stavba spermie



(Zdroj: <http://www.embryology.ch/anglais/cgametogen/spermato05.html>)

Vysvětlivky: 1 – plazmatická membrána; 2 – vnější akrosomální membrána; 3 – akrosom; 4 – vnitřní akrosomální membrána; 5 – jádro; 6 – proximální centriola; 7 – zbytek distální centrioly; 8 – vnější fibrózní vlákna; 9 – mitochondrie; 10 – axonema; 11 – terminální disk (anulus); 12 – prstencová vlákna

Bičík je organela zodpovědná za pohyb samčí gamety u většiny zvířat (LINDEMANN *et* LESICH, 2016) a jeho správná ultrastruktura je zásadní pro správnou funkci spermie. Dle struktury lze bičík rozdělit do čtyř hlavních částí. Nejvíce proximální část bičíku, zvaná spojovací část (B), se váže k jádru uloženém v hlavičce spermie (TURNER, 2006). Každý z vnějších devíti mikrotubulárních dubletů je spojen vnitřním a vnějším dienovým ramenem, přičemž tato vazba je zodpovědná za hybnou sílu spermie (TURNER, 2006; LINDEMANN *et* LESICH, 2016). Druhá část, část střední

(C), je definována přítomností devíti vnějších hustých vláken obklopující každé z devíti vnějších axonemálních mikrotubulárních dubletů a mitochondriálním pouzdem. Tato část je zakončena prstencem, od kterého dále pokračuje hlavní část (D). Na začátku hlavní části se ukončuje mitochondriální pouzdro a dvě vnější hustá vlákna, která jsou nahrazena dvěma podélnými sloupci vláknitého pláště (specifika pro hlavní část). Koncová část (E) obsahuje pouze axonem obklopený plazmovou membránou (TURNER, 2006).

JELÍNEK *et* KOUDELA (2003) udávají celkovou délku spermie 85 μm , z čehož hlavička měří 10 μm , spojovací část 15 μm a bičík 60 μm .

Spermie mají malou biosyntetickou aktivitu a závisí do velké míry na katabolické funkci, aby se udržely životaschopné (BARBAS *et* MASCARENHAS, 2008).

2.5 Metody odběru ejakulátu

Na výrobu inseminačních dávek se pečlivě vybírají býci s vysoce kvalitním ejakulátem jak z reprodukčního (pohlavní dospělost, sexuální libido a schopnost kopulace), tak i z fyzického hlediska (hlavně poloha hrudních a pánevních končetin a stavba paznehtu) (BARSZCZ *et al.*, 2011). Vzorky spermatu mohou být odebírány několika metodami: pomocí umělé vagíny, vnitřní umělé vagíny, elektroejakulátoru, transrektální masáže a transrektální ultrazvukem řízené masáže (BAIEE *et al.*, 2017).

Při odběrech ejakulátu do umělé vagíny je hodnoceno sexuální libido, a to formou šestistupňového měřítka. Odběr spermatu se provádí ve speciální místnosti, která musí splňovat hygienické a zdravotní podmínky a musí mít protiskluzovou podlahu (BARSZCZ *et al.*, 2011). V přípouštědle se připraví býk, tzv. atrapa (zafixovaný, čistý a suchý) nebo fantom a přivede se býk k odběru, který je čistý, s umytou předkožkou. Když je býk připraven a dostatečně sexuálně vydrážděn, skočí na atrapu či fantoma. Technik nasměruje pyj pomocí předkožky k ústí umělé pochvy a nechá býka vysemenit (LOUDA *et al.*, 2007).

Vnitřní umělá vagína je levné zařízení pro odběr spermatu, které se vkládá do vagíny těsně za hloubku vestibulárního svěrače krávy. Býk při skoku na krávu zasune pyj a sperma ejakuluje do vzorkového vaku (BARTH *et al.*, 2004).

Dle SARSAIFI *et al.* (2015) je transrektální masáž zaměřená konkrétně na vyměšovací žlázy umístěné na dorsálním krku močového měchýře účinná metoda při získávání spermatu býků. Masáž je prováděna rukou přibližně dvě minuty.

Použití transrektální ultrazvukem řízené masáže přídatných pohlavních žláz je alternativní metodou odběru spermatu u malých přežvýkavců. Tato metoda nevyžaduje žádné elektrické impulsy, případně pouze v malém množství (ABRIL-SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

Pomocí elektroejakulace je sperma odebíráno snadno a efektivně, v současné době se u většiny býků ve světě provádí bez anestezie (BARTH *et al.*, 2004) a vyžaduje minimální vybavení. Elektrická stimulace je indukována pomocí rektální sondy, která stimuluje nervy a přídatné pohlavní žlázy k emitování spermatu. V době ejakulace je peristaltika chámovodu a uzavření vnitřního uretrálního svěrače způsobeno sympatickým nervem; současně parasympatické impulsy způsobují peristaltiku uretrálního svalu a větev pudendálního nervu způsobuje kontrakci bulbospongiósního svalu k ejakulaci spermatu (BAIEE *et al.*, 2017).

Hlavním nedostatkem v protokolech o zdravotním stavu býků založených pouze na elektroejakulaci je však neschopnost posoudit libido a páření. V některých zemích byla tato praxe zakázána z důvodů nedodržování welfare zvířat a byla nahrazena novou metodou s použitím interní umělé vagíny, při které lze zároveň vyhodnotit sexuální libido býků (BARTH *et al.*, 2004).

Metody umělé vagíny a vnitřní umělé vagíny produkují vzorky spermatu s nejvyšší koncentrací spermií vzhledem k jejich blízkosti k přirozenému chovu. Nevýhodou těchto metod je trénování a zvykání býků na figurínu nebo atrapu, u vnitřní umělé vagíny je riziko i přenos nemocí. Charakteristiky spermatu odebraného metodou elektroejakulace byly lepší než transrektální masáží, ale ne tak kvalitní jako sperma odebrané pomocí umělé vagíny (BAIEE *et al.*, 2017).

2.6 Ředění ejakulátu

Z důvodu požadavku na oplodnění velkého počtu krav kvalitním semenem od vybraného býka, je nutné jeho sperma naředit kvalitním prostředkem, tzv. ředidlem (RAHEJA *et al.*, 2018). Ředidlo je chemické médium používané k uchování, zvětšení objemu a ochraně spermatických buněk před různými tepelnými šoky během zpracování, skladování a přepravy (RASAD *et al.*, 2019). Každé ředidlo by mělo být izotonické, regulovat pH, chránit před chladem, dodávat energii, kontrolovat mikrobiální kontaminaci, chránit v průběhu mražení i rozmrazování a zachovávat plodnost spermií (BARBAS *et MASCERENHAS*, 2008; REHAJA *et al.*, 2018). Média obsahují neprostupující kryoprotektant (mléko nebo vaječný žloutek),

penetrační kryoprotektant (glycerol, ethylenglykol nebo dimethylsulfoxid), jeden nebo více cukrů (glukóza, laktóza, rafinóza, sacharóza nebo trehalóza), soli (citrát sodný, kyselina citrónová) a antibiotika (penicilin, streptomycin) (BARBAS *et* MASCERENHAS, 2008).

Při mražení se tvoří led extracelulárně a buňky se dehydratují. To vede k toxickým koncentracím intracelulárních solutů, které se během mražení nevracejí k bazálním koncentracím, což ohrožuje život buněk a zhoršuje životně důležité funkce spermií po rozmražení. Poškození vyvolané rozmražením může být minimalizováno selektivním použitím kryoprotektantů, jako je glycerol, dimethylsulfoxid, ethylenglykol a propylenglykol. Všechny jsou vysoce rozpustné, prostupující sloučeniny s nízkou až střední toxicitou při nízkých koncentracích. Při dostatečné koncentraci kryoprotektantů vysoké rychlosti ochlazování nakonec zpevní suspenzi spermií do metastabilního sklovitého stavu bez tvorby ledu. Toto se nazývá vitrifikace (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et* VEGA, 2013).

Během kryokonzervace jsou primárně postiženým místem biologické membrány spermií. V průběhu působení nižších teplot dochází k narušení poměru cholesterolu k fosfolipidu ve spermatických biomembránách hlavně v důsledku odplavení cholesterolu a dochází k tvorbě četných reaktivních druhů kyslíku (ROS) (REHAJA *et al.*, 2018). Proto je častým kryoprotektivem býčího spermatu žloutek v ředidle, jejichž cholesterol je vázán na membránu spermií a tím zvyšují toleranci chladu a zabraňují ztrátě fosfolipidů z membrány (MURPHY *et al.*, 2018a). Příkladem komerčně dostupných žlutkových ředidel s čerstvým žloutkem jsou Triladyl[®], Biladyl[®] (Minitübe, Tiefenbach, Německo). Žlutková ředidla jsou i s přídavkem ionizovaného žloutku jako např. Optidyl[®] (Biovet, Fleurance, Francie) (BERAN *et al.*, 2014).

Kromě vaječného žloutku se k zachování plodnosti spermií používá také homogenizované plnotučné mléko, čerstvé nebo rekonstituované odstředěné mléko a kokosové mléko. (REHAJA *et al.*, 2018).

Vedle žlutkových ředidel je i řada bezžlutkových, které jsou složené z lecitinu a glycerolu bez obsahu živočišných proteinů, čímž je sníženo mikrobiální riziko bez ovlivnění oplozovací schopnosti spermií. Příkladem komerčního bezžlutkového ředidla je AndroMed[®] (Minitübe, Tiefenbach, Německo), které je

na bázi sójového lecitinu, a např. OptiXcell® (IMV Technologies, L'Eigle, Francie) na liposomové bázi (BERAN *et al.*, 2014).

Cukry nejsou schopny difundovat přes plazmatickou membránu ani vytvářet osmotický tlak, který vyvolává dehydrataci buněk a nižší incidenci intracelulárních krystalů ledu. Cukry interagují s fosfolipidy v plazmě a zvyšují přežití spermií při kryokonzervaci. Hodnota pH ředidla se pohybuje v rozmezí 6,75–7,0 (sperma savců má pH 7,2–7,8) (BARBAS *et MASCERENHAS*, 2008).

Penetrační kryoprotektanty chrání buňky před kryokonzervací zvýšením tekutosti membrány a snížením tvorby intracelulárních ledových krystalů. Nepenetrační disacharidy, jako je trehalóza a sacharóza, jsou navrženy tak, aby chránily buňky zvýšením tonicity ředidla a stabilizací buněčné membrány (SHANMUGAM *et MAHAPATRA*, 2019).

2.7 Plnění a identifikace

Postupem času se vyvinuly tři metody balení spermatu. První metoda je balení do sterilních ampulí, kdy je sperma plněno automaticky, zároveň i automaticky uzavřeno a popsáno. Popis zabraňuje křížové kontaminaci. Jedna ampule je určena pro jednu inseminaci (HAFEZ *et HAFEZ*, 2000). Druhá metoda, metoda japonská (LOUDA *et al.*, 2001), je vytvoření pelet, které se připraví pipetováním asi 0,1 ml kapky naředěného spermatu do polokulovitého otvoru v suchém ledu. Pelety mají nejlevnější náklady na skladování. Nevýhodou u nich ovšem je popis, kdy je potřeba vložit malý potištěný papírek s identifikací býka do kapky spermatu před mražením. (HAFEZ *et HAFEZ*, 2000). V současné době se nejvíce plní do pejet (LIEBERMAN *et al.*, 2016) o objemu 0,25 (Kanadské a evropské země) a 0,50 ml (standard pro USA) spermatu (STROUD, 2013). Každá pejeta je potištěna údaji o čísle býka, plemeni a datumu odběru a následně plněna automatickými stroji (JEROME *et al.*, 2019). Jedná se o francouzskou metodu konzervace (LOUDA *et al.*, 2001).

2.8 Chlazení a ekvilibrace

Před mražením se sperma ochlazuje na teplotu 4–5 °C a následuje proměnlivá doba ekvilibrace. Ekvilibrace umožňuje spermatu přizpůsobit se chladnějším teplotám, což usnadňuje pohyb kryoprotektantu přes membránu a umožňuje pohyb

vody ven z buňky, čímž minimalizuje poškození způsobené tvorbou ledových krystalů během procesu mrazení a rozmrazování (MURPHY *et al.*, 2018a).

Původně se předpokládalo, že při ekvilibraci pronikal do spermatu glycerol, i když novější pozorování ukazují, že penetrace glycerolu je velmi rychlá a že většina rovnovážného období se týká stabilizace membrány během vystavení nízkým teplotám (Artificial insemination, 2001) a netrvá déle než pět minut (MURPHY *et al.*, 2018a). Glycerol může být přidán do spermatu kdykoliv během chlazení (LEITE, 2010).

Nemělo by se přehlížet, že proces ekvibrace se vztahuje nejen na glycerol, ale také na další osmoticky aktivní složky ředidla. Proto rovnovážný proces snadno může interagovat s použitým typem média (pufr a kryoprotektant) a mohl by interagovat s jinými kryogenními postupy (SHAHVERDI *et al.*, 2014).

Při chlazení dochází k adaptaci spermie na zpomalení metabolismu, který se snižuje o polovinu s každým poklesem teploty o 10 °C. Rychlým chlazením může dojít k chladovému šoku, proto je důležité ejakulát chladit pomalu (STÁDNÍK *et al.*, 2015) a vybrat správné ředidlo (DOLEŽALOVÁ *et al.*, 2016).

2.8.1 Doba ekvibrace

Kratší doba ekvibrace (4–6 hodin) může být problémová pro pracovníky inseminačních stanic z důvodu mrazení ve shodný den jako odběry (MURPHY *et al.*, 2018a). FLEISCH *et al.* (2017) studií potvrdil zlepšení kvality spermatu při použití doby ekvibrace 24 hodin, což je i vhodnější pro pracovní harmonogram v laboratořích inseminačních stanic při odběru většího množství býků v jeden den. Zároveň je delší doba ekvibrace vhodná pro převoz odebraného spermatu na větší vzdálenosti (MURPHY *et al.*, 2018a).

SHAHVERDI *et al.* (2014) ve své studii píše, že ideální dobou určenou k ekvibraci je 18 hodin případně noční ekvibrace. STÁDNÍK *et al.* (2016) potvrzuje nejlepší výsledky při použití čtyřhodinové ekvibrace, kdy byla v porovnání s půlhodinovou a dvouhodinovou dobou ekvibrace, nejvyšší hodnota průměrné motility spermií. Snahy jsou však takové, aby doba byla co nejkratší, a to i vzhledem k velké produkci inseminačních dávek (DOLEŽALOVÁ *et al.*, 2016).

Minimální doba trvání rovnováhy potřebné k dosažení uspokojivých výsledků při kryokonzervaci spermatu zůstává kontroverzní (LEITE, 2010). TIRPAN *et al.* (2017) uvádí, že úspěšná doba ekvibrace závisí na osobních zkušenostech.

S tím souhlasí i STÁDNÍK *et al.* (2016), kteří v certifikované metodice doporučují doby ekvibrace vyzkoušet a pracovat s nejlepšími výsledky.

2.9 Konzervace

K prodloužení životaschopnosti spermií je třeba zpomalit jejich metabolismus, čímž se sníží jejich rychlost využití substrátů a produkce toxinů. (LEMMA, 2011)

2.9.1 Krátkodobá konzervace

Základním faktorem je teplota skladování. Zředěné sperma skladované o teplotě 5 °C by mělo mít minimální trvanlivost 2 až 4 dny. Snížením teploty při skladování na 5 °C klesne metabolická rychlost spermií, což přispívá k prodloužení životnosti. Pro skladování při 5 °C byly navrženy alternativní metody inhibice metabolismu jako je narkóza CO₂, snížení pH nebo plynování N₂ (VISHWANATH *et SHANNON*, 2000).

Existují i nevýhody zpomaleného metabolického procesu. Příkladem jsou snížení aktivity Na⁺/K⁺ pumpy což má za následek neschopnost vyrovnat difúzi iontů přes membránu a zvýšení intracelulární koncentrace Na⁺, které má negativní vliv na životaschopnost spermie (VISHWANATH *et SHANNON*, 2000).

Při použití média, které i bez chlazení dokáže inhibovat procesy poškozující spermie při vyšších teplotách, lze skladovat spermie i při teplotě v rozmezí 18–24 °C (VISHWANATH *et SHANNON*, 2000).

2.9.2 Dlouhodobá konzervace – kryokonzervace

Kryokonzervace sestává v podstatě ze snížení teploty, dehydratace buněk, zmrazování a rozmrazování (TIRPAN *et al.*, 2017). Účinné skladování spermatu ve zmrazeném stavu znamená úplné zastavení vývojového procesu spermatických buněk (VISHWANATH *et SHANNON*, 2000). Pro optimalizaci výsledku zmrazení spermií bylo vyvinuto mnoho různých standardizovaných kryokonzervačních médií a jsou nyní komerčně dostupná. Tato média jsou tvořena hlavně glycerolem, zdrojem energie, pH pufrům a dalšími sloučeninami, které by mohly snížit negativní účinky kryokonzervace na lidské spermie (RAAD *et al.*, 2018).

Kryokonzervace spermií však indukuje tvorbu intracelulárních ledových krystalů, osmotické poškození a poškození chlazením, které způsobuje poškození

buněk spermií, porušení cytoplazmy nebo dokonce účinky na struktury spojené s cytoskeletem nebo genomem (BARBAS *et* MASCARENHAS, 2008).

Do 80. let se zmrazené sperma skladovalo v mechanických mrazničkách asi při teplotě $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, v pevném oxidu uhličitým při $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo v kapalném dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ovšem bylo prokázáno, že skladování ve směsi suchého ledu a alkoholu při $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ snižuje plodnost, nicméně skladování při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ v peletách a pejetách byly bez zaznamenaných změn v plodnosti v rámci procesu zmrazení a následného rozmrazení. V současné době je konzervace v tekutém dusíku nejčastěji využívanou technikou dlouhodobého skladování inseminačních dávek (RAMÍREZ-REVECO *et al.*, 2016). Pejety jsou umístěny v horizontálních stojanech v izotermických zařízeních 1–4 cm nad tekutým dusíkem po dobu 10–20 minut, poté jsou ponořeny do nádob s tekutým dusíkem a uskladněny v kontejnerech. Na řízené zmrazování dávek při definovaných rychlostech mrazení jsou již běžně dostupné programovatelné mrazničky (JEROME *et al.*, 2019).

Dvojité mrazení je metoda, při které dochází ke zmrazení spermatu poprvé v celkovém objemu, následné rozmrazení, naplnění spermatu do pejet a opětovné mrazení. Velkoobjemové mrazení se provádí technikou směrového mrazení, kdy je možná řízená propagace krystalů ledu a tím se optimalizuje jejich morfologie. Tímto je zajištěna homogenní rychlost ochlazování v průběhu celého mrazení a minimalizované poškození buněk (SARAGUSTY *et al.*, 2009).

Peletová metoda kryokonzervace nebo vitrifikace je proces, kdy se roztok velmi rychle ochlazuje, viskozita je tak velká a molekulární difúze je zastavena. V tomto stavu se uvádí, že se jedná o sklo nebo sklovitou pevnou látku (SHANMUGAM *et* MAHAPATRA, 2019).

Výsledek kryokonzervace spermatu je ovlivněn typem a průběhem zmrazovací křivky. Spermie jsou poškozeny teplotním šokem a rozsah poškození závisí na teplotě i rychlosti poklesu teploty. Obecně platí, že čím vyšší je rychlost chlazení, tím vážnější je poškození spermií. (DOLEŽALOVÁ *et al.*, 2016)

Spermie se sníženou funkčností a životaschopností nevydrží nízké teploty při kryokonzervaci. Buněčné defekty různých stupňů mohou nastat v každém kroku konzervace. Kvalita spermií po rozmrazení je závislá na těchto defektech (TIRPAN *et al.*, 2017). Hlavní nevýhodou kryokonzervačního procesu spočívá ve ztrátě životnosti mnoha buněk a v jejich dysfunkci (SARAGUSTY *et al.*, 2009).

2.10 Makroskopické hodnocení ejakulátu

Prvním hodnocením ejakulátu po odběru je makroskopické hodnocení parametrů kvality spermatu, které poskytuje hrubé odhady reprodukčních vlastností býků. Pomáhá také při výběru vzorků pro další mikroskopickou analýzu. Makroskopicky se vyhodnocuje objem, barva, konzistence, hustota, viskozita, pH a zápach, a to pouhýma očima za denního světla (SRIVASTAVA, 2017).

Množství ejakulátu závisí hlavně na velikosti varlat, frekvenci odběrů, věku, cvičení, úrovni sexuálního dráždění, pracovní vytížení, sezóna a další (SRIVASTAVA, 2017). BARSZCZ *et al.* (2012) uvádí hodnotu 2–8 ml jako standardní množství odebraného ejakulátu. Stanovení správného celkového množství ejakulátu je směrodatné pro výpočetní programy na stanovení počtu dávek (SRIVASTAVA, 2017) a lze ho stanovit například volumetrickým měřením (OSTERMEIER *et al.*, 2001).

Barva ejakulátu je hodnocena při denním světle. Barvou připomíná plnotučné mléko v závislosti na koncentraci spermatických buněk a přítomnosti nezáradečných buněk (žlutavé po šedavou bílou) (SRIVASTAVA, 2017). BARSZCZ *et al.* (2012) charakterizují barvu jako bílou s charakteristickým odstínem krému. Spermie způsobují neprůhlednost tekutiny, zatímco různé odstíny žluté jsou způsobeny přítomností riboflavinu, který po vystavení světlu mizí. Melanin nebo lipochrom (z ampuly) nebo flavin (ze semenných váčků) také dodávají žluté zbarvení (SRIVASTAVA, 2017). Například světle hnědé zbarvení může znamenat kontaminaci fekáliemi, hnis může způsobit zeleno šedé zbarvení a tmavě červená až růžová barva může naznačovat kontaminaci erytrocyty (BARSZCZ *et al.*, 2012; SRIVASTAVA, 2017).

Konzistence spermatu se liší v závislosti na koncentraci spermií stejně jako je tomu u barvy. Stupně konzistence jsou zaznamenávány od husté pěny po vodu v kontrastu s kontrolním vzorkem vody. Na konzistenci má vliv zdravotní stav varlat, *epididymis* a vedlejších pohlavních žláz. Makroskopické stanovení hustoty je pouze hrubý odhad proti světlu. Hustotu ejakulátu může ovlivnit stupeň zrání a věk spermií (SRIVASTAVA, 2017). Koncentraci spermií je možno vyhodnotit pomocí spektrofotometrie (OSTERMEIER *et al.*, 2001).

Viskozita a pH jsou dva z parametrů motility spermií ve vaginálním kanálku, které by mohly mít hlavní počáteční účinek na pohyblivost spermií během procesu oplodnění. Hodnota pH spermatu je mírně alkalická a pohybuje se mezi 7,5 a 8,5. Při poklesu pH ze 6,5 na 6,0 je pozorováno významné zvýšení počtu imotilních

spermií (RIZVI *et al.*, 2009). Měření pH u zvířat má malou praktickou hodnotu, nicméně se používá u zvířat s podezřením z nízké kvality (SRIVASTAVA, 2017).

2.11 Mikroskopické hodnocení ejakulátu

Primárním cílem analýzy spermií, ať už je to klasická nebo nová metodika, je levně, rychle, a především objektivně a přesně předpovědět fertilizační kapacitu jakéhokoli daného vzorku (CENARIU *et al.*, 2018). Účelem hodnocení spermatu je identifikovat ejakuláty nízké kvality nebo ejakuláty podezřelé z nízké plodnosti a tyto vzorky vyloučit. Proto je nutné zajistit přesnost a opakovatelnost hodnocení (OSTERMEIER, 2001). Klasická metodologie je indikována hlavně mikroskopickou analýzou (CENARIU *et al.*, 2018).

Pro posouzení fertilizační schopnosti samců/býků/plemeníků je ejakulát spermatu hodnocen z hlediska různých fyzikálních proměnných, jako je objem, barva, konzistence, koncentrace (viz makroskopické hodnocení), procento živých spermií, procento abnormalit spermií, akrosomální integrita, hromadná pohyblivost spermií, počáteční progresivní pohyblivost spermií a pohyblivost spermií po rozmrazení před zahájením šlechtitelského programu. Pro určování fertilizační schopnosti spermií býků existuje mnoho ukazatelů, z nichž hlavním je motilita spermií. Bylo navrženo mnoho metod analýzy *in vitro*, které určují fertilizační kapacitu ejakulátů (YATHISH *et al.*, 2016).

Tradiční reprodukční vyšetření plemenného býka nebo systematická analýza zmrazeného spermatu vylučuje býky nebo vzorky spermatu, které jsou hrubě neobvyklé. Vzorky spermatu klasifikované jako uspokojivé na základě tradičních přístupů se však liší plodností. Pokročilé testy funkce spermií vyvinuté pro hodnocení kompenzačních a nekompenzačních (submikroskopických) vlastností spermií mohou předpovídat takové změny v plodnosti býků (THUNDATHIL *et al.*, 2016).

2.11.1 Motilita spermií

Motilita spermií po rozmrazení je hlavním parametrem pro posouzení účinků zmrazení ejakulátu a použitelnosti či vyřazení spermatu pro následnou umělou inseminaci. Míra motility po rozmrazení závisí na mnoha faktorech, jako je věk býka, roční období, zmrazovací postupy, použité kryoprotektanty apod. (JEROME *et al.*, 2019).

Některé laboratoře používají pro zjištění procenta pohyblivých spermií metodu odhadu na binokulárním mikroskopu s fázovým kontrastem a objektivy s jasným polem a termostatickém stativu, který umožňuje vyšetření při doporučené teplotě (AMANN *et* WABERSKI, 2014). Mikroskopické pole je systematicky skenováno a pohyblivost každé nalezené spermatické buňky se hodnotí dle rychlosti rychlé progresivní pohyblivosti až k nepohyblivosti (CENARIU, 2018). Metoda není příliš přesná a je potřeba pravidelné rekvalifikace osob pro zpřesnění odhadů (AMANN *et* WABERSKI, 2014).

Pohyblivost spermií se odhaduje vyšetřením spermatu na čistém a teplém sklíčku. Hromadná pohyblivost (ovlivněná pohyblivostí a koncentrací) je detekovatelná při nízkém zvětšení, ale progresivní pohyblivost je hodnocena při 400násobném zvětšení (THUNDATHIL *et al.*, 2016). Vyhodnocuje se kapka spermatu po zředění na suchém podložním sklíčku temperovaném na 37 °C a přikrytém krycím sklíčkem. Počítá se poměr progresivně se pohybujících spermií (JEROME *et al.*, 2019).

Býk, který je zdravý s přiměřeným obvodem varlat, větší než 30% progresivní motilitou, více než 70 % morfologicky normálním spermatem a méně než 20 % defektů hlaviček, je označen jako býk s „uspokojivým potenciálem“. V případě nesplněných požadavků, nicméně s očekávaným zlepšením, je býkovi přidělena „odložená klasifikace“. „Neuspokojivý potenciál“ je připsán býkům s dědičnými vadami, malým obvodem varlat, zraněním či nemocemi atd. (THUNDATHIL *et al.*, 2016)

2.11.2 Hodnocení morfologie

Morfologické vyšetření spermií je komplikováno jejich morfologickou variabilitou (KUBÍČEK, 2010) a jeho hodnocení obecně závisí na subjektivním mikroskopickém vyšetření spermatu (OSTERMEIER *et al.*, 2001).

Pro vyhodnocení morfologie se sperma ředí eozin-nigrosinem (nátěrem) nebo 10% neutrálním pufrovaným formalinem (mokrý metoda) a vyhodnotí se nejméně 100 spermií (až 300, pokud existuje více abnormalit) (THUNDATHIL *et al.*, 2016) pod olejovou imerzí (1000 násobné zvětšení) (JEROME *et al.*, 2019).

Hodnocení morfologie lze využít například pro odhalení rozdílu ve tvaru hlavičky. Sledování změny tvaru hlavičky lze sledováním délky, šířky, plochy

a obvodu hlavičky, zakřivení obvodu hlavičky nebo změn tvaru akrosomu (OSTERMEIER *et al.*, 2001).

2.11.3 Test přežitelnosti

Procento živých spermií určuje kvalitu ejakulátu, proto je potřeba diferenciací živých a odumřelých spermií. K tomuto hodnocení se používá techniky barvení, když je část spermatu smíchána s eosinem nebo nigrosinem jako kontrastním barvivem a rozetřena po sklíčku. Roztěr je sušen na vzduchu a poté vyhodnocen pod mikroskopem. Hlava mrtvé spermie je zabarvena červeně, zatímco živá spermie je i nadále bezbarvá (JEROME *et al.*, 2019).

2.11.4 CASA – počítačem podporované systémy pro analýzu spermií

Tento systém umožňuje objektivní vyhodnocení kinematických charakteristik spermií, jako jsou trajektorie, pohyblivost, rychlost, linearita a laterální posunutí hlaviček (THUNDATHIL *et al.*, 2016). Vyznačuje se vysokou přesností a kvantitativními daty kinetiky spermií, což jsou hlavní přednosti ve srovnání s manuálním počítáním (KUBÍČEK, 2010).

CASA nemůže přesně předpovědět „plodnost“, která bude získána se vzorkem spermatu. Při pečlivé validaci však současné systémy CASA poskytují informace důležité pro zajištění kvality spermatu plánovaného pro marketing a pro pochopení rozmanitosti odpovědí spermií na změny mikroprostředí ve výzkumu (AMANN *et al.*, 2014).

2.11.5 Hodnocení spermatu po rozmrazení

Jakmile je sperma zamrazeno do jednotlivých pejet, většina inseminačních stanic provádí hodnocení kontroly kvality, které jsou spojeny s fertilizační schopností (LIEBERMAN *et al.*, 2016). Rozmrazení zmrazeného spermatu by mělo proběhnout velmi rychle. Tímto je snížen škodlivý účinek rekrystalizace a rehydratace vody, čímž se zabraňuje poškození membrány a cytoplazmy spermií. Kritická teplotní zóna pro vytvoření ledových krystalů je mezi $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DISKIN, 2018).

Životaschopnost po rozmrazení (procento progresivně pohyblivých spermií, rychlost progresu a integrita akrosomu), počet pohyblivých spermií na dávku a morfologie spermií jsou kritickými součástmi hodnocení zmrazeného spermatu.

Životaschopnost spermií by měla být vyhodnocena okamžitě po rozmrazení a po 2 hodinách inkubace při 37 ° C. Pejety by měly být rozmrazeny při 37 ° C po dobu 1 minuty. Na sklíčko mikroskopu se umístí malá kapka spermatu, přikryje se krycím sklíčkem, udržuje se v teple a zkoumá se při 400násobném zvětšení. Odhaduje se počet buněk postupujících postupně a počet mrtvých buněk (imobilních nebo nepohybujících se postupně) a vypočítá se procento progresivně pohyblivých buněk. Měl by být vyhodnocen více než jeden rámeček, včetně 10 až 15 polí a ~ 500 spermií. Průměrná rychlost progresivní motility by měla být odstupňována na stupnici od 0 (žádný pohyb) do 5 (velmi rychlý progresivní pohyb, velmi obtížné sledovat jednotlivé buňky). Minimální standard je 25% pohyblivost ihned po rozmrazení se stupněm rychlosti progresivní motility 3 a 15% pohyblivost se stupněm rychlosti 2 po inkubaci po dobu 2 hodin. Podobně by mělo být 60 % a 40 % intaktních akrozomů po 0 a 2 hodinách inkubace. Morfologii spermatu lze hodnotit na obarveném spermatu (eosin-nigrosin). Přijatelný vzorek by měl obsahovat alespoň 70 % morfologicky normálních spermií s ne více než 15 % až 20 % nekompensovatelných abnormalit (např. jaderné vakuoly a pyriformní hlavičky) (THUNDATHIL *et al.*, 2016).

2.12 Skladování a manipulace se zmrazeným spermatem

Správně skladování a manipulace s konzervovaným spermatem je základem udržení jeho kvality. Zmrazené sperma je skladováno v kontejnerech na tekutý dusík, tzv. Dewarově konterjneru. K významnému snížení plodnosti spermatu dochází při přerušení chladícího řetězce vyjmutím z konterjneru. Doporučená doba vyjmutí dávky z tekutého dusíku je různá, ale vždy jen v řádu vteřin (8, 5 i jen 3 vteřiny) (LIEBERMAN *et al.*, 2016).

Do Dewarových konterjnerů jsou umístěny plastové goblety a kelímky, které pomáhají zlepšit ochranu dávek před neúmyslným vyjmutím z tekutého dusíku (LIEBERMAN *et al.*, 2016). Gobletky a kelímky jsou v konterjneru řádně označeny (DISKIN, 2018). Manipulace s inseminačními dávkami uvnitř kanystru je zajištěna pomocí válcovitého kelímku s rukojetí a s hákem na krku. Tyto háky jsou zachyceny do roštů nebo drenážních otvorů, které jsou zabudovány do dna nádoby (LIEBERMAN *et al.*, 2016). Každý konterjner má aktualizovaný seznam obsahujících inseminačních dávek (DISKIN, 2018).

Při rutinní manipulaci je mnoho případů, kdy jsou zmrazené reprodukční buňky vystaveny potenciálně škodlivým teplotám. Při jakémkoliv přesunu spermatu

by neměly pejet dosáhnout nad $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (STROUD, 2013). U pejet o objemu 0,25 ml je výraznější zranitelnost spermií vlivem špatné manipulace. Jejich velký poměr povrchu k objemu je činí náchylnější k rychlému kolísání teploty (DISKIN, 2018).

Skladování spermatu ve zmrazeném stavu je velmi nákladné z důvodu nutnosti pořízení izolovaných kontejnerů a neustálého doplňování tekutého dusíku (VISHWANATH *et SHANNON*, 2000).

2.13 Vlivy na plodnost a kvalitu spermií

Vlivů na plodnost a pohlavní aktivitu je mnoho. Reprodukční výkonnost je odrazem celkového zdraví zvířete, proto je potřeba udržovat zdravotní stav a pohodu zvířat (HOFÍREK *et al.*, 2009).

Pro hodnocení reprodukčního stavu býků je důležité znát i jeho zdravotní stav a pohodu zvířat, ve kterém se odráží jejich pohlavní aktivita a plodnost. STÁDNÍK *et al.* (2014) rozdělují faktory ovlivňující reprodukci býků na vnitřní (plemeno, genotyp, individualita a věk) a vnější (klimatické podmínky, podnebí, technologie ustájení, management chovu, výživa, frekvence odběru a manipulace se spermatem).

Vzhledem k nízké heritabilitě ukazatelů plodnosti a pohlavní aktivity, nemá vliv samotného plemene velký význam. Vliv plemene je zprostředkován geneticky danou adaptabilitou a odolností k vnějším faktorům prostředí nebo rozdílnou rychlostí somatického vývoje (HOFÍREK *et al.*, 2009).

BERAN *et al.* (2011) ve své práci publikuje věk plemeníků jako velmi důležitý faktor na kvalitu spermatu. Do sedmého roku je kvalita spermatu i produkce vzrůstající, poté nastává stagnace do desátého roku života. Množství a kvalita spermatu, podle KENNY *et BYRNE* (2018), je dána i věkem, ve kterém tato zvířata dosáhnou puberty.

Temperament ovlivňuje jednak pohlavní aktivitu plemeníka, jednak i charakter zvířete, schopnost spolupracovat a učit se. Jako vhodný je považován flegmatik, naopak nevhodný choleric a melancholik (STÁDNÍK *et al.*, 2014).

Výživa patří k nejvýznamnějším vlivům na reprodukci (HOFÍREK *et al.*, 2009). Nadměrná tučnost zvířete negativně ovlivňuje živost spermií, ale nedostatek bílkovin snižuje sexuální aktivitu a kvalitu spermií. Poruchy reprodukce u samců mohou být způsobeny také nedostatkem vitamínů (vitaminy skupiny A, E, skupiny B) a nedostatkem mikroprvků (zinek, selen, mangan, jód) (BARSZCZ *et al.*, 2011).

Dalším z mnoha vlivů na kvalitu spermatu je časový interval odběru. KANTHIYA *et al.* (2020) uvádí, že u býků, odebíraných po pěti denním intervalu, měla významně vyšší objem a koncentraci spermatu než skupina býků s dvoudenním intervalem. Dále prokázali, že skupina s pěti denním intervalem měla i lepší funkční integritu membrány. Z toho vyplývá, že při odběrech prováděných s větším časovým odstupem, lze získat lepší kvalitu spermatu z více hledisek.

Separace spermií při zpracování je dalším z vlivů na kvalitu spermií. Získání separovaných spermií pomocí separačních metod Swim-up nebo hustotního gradientu vykazují podle ARIAS *et al.* (2017) vyšší motilitu a funkci spermií. Analýza CASA ukázala, že celková a progresivní pohyblivost byla významně vyšší ve všech metodách separace spermií ve srovnání s neoddělenou kontrolou. To ukazuje, že tyto techniky separace spermií zvyšují potenciál plodnosti vzorků spermatu býků.

2.14 Neplodnost

Neplodnost je většinou dána špatně pohyblivým či zcela imotilním spermatem, který je spíše jen klinickým příznakem. Skutečná příčina astenozoospermie (špatná pohyblivost spermií) obvykle není známa, pokud se nejedná o nepatrně množství genetických poruch či zjevných poškození varlat (trauma, tepelný šok) či špatným zacházením se spermatem po ejakulaci (TURNER, 2006).

3 Cíl práce

Cílem experimentální části diplomové práce je vyhodnotit vliv čtyř různých délek doby ekvibrace při zpracování býčího ejakulátu mrazením na výslednou motilitu spermií po rozmrazení inseminačních dávek. Hypotézou diplomové práce je předpoklad, že delší doba ekvibrace má pozitivní vliv na motilitu spermií po rozmrazení inseminační dávky.

4 Materiál a metodika

Pro účely experimentálního pokusu byly použity vzorky ejakulátu od šesti býků různých plemen z jedné inseminační stanice se stejnou frekvencí odběrů 1krát týdně. Hodnocena byla aktivita inseminační dávky po rozmražení v závislosti na délce doby ekvibrace před mražením. K experimentální části byly vybráni býci:

Býk č. 1: Český strakatý skot, nar. 11. 4. 2016

Býk č. 2: Holštýnský skot, nar. 5. 12. 2017

Býk č. 3: Masný simentál, nar. 10. 11. 2017

Býk č. 4: Český strakatý skot, nar. 4. 10. 2017

Býk č. 5: Holštýnský skot – red, nar. 2. 4. 2018

Býk č. 6: Holštýnský skot, nar. 2. 6. 2018

4.1 Zpracování a hodnocení spermatu

Během čtyř měsíců byl odebírán ejakulát od šesti býků do umělé vagíny. Odebráno bylo celkem 15 vzorků od každého býka, přičemž v jednom odběrovém dni byl býk odebrán dvojskokem (dvě ejakulace za sebou do jednoho odběrového sáčku). Sperma bylo nejprve sensoricky hodnoceno, posléze laboratorně vyšetřeno, zpracováno do inseminačních dávek do pejet, chlazeno a zamraženo. Po několikadenním skladování byly dávky rozmrazeny a hodnoceny.

Získaný ejakulát v odběrovém sáčku byl předán do laboratoře, ve které byla udržována teplota 18–20 °C. V laboratoři byl ejakulát sensoricky zhodnocen jedním pracovníkem laboratoře (barva, zápach, konzistence, příměsi). Pomocí automatické váhy Pocket Scale P221 bylo určeno množství (1 g byl považován za 1 ml). Dále byl vytvořen vzorek v ependorf zkumavce Expell™ tips smícháním automatickou pipetou 25 µl spermatu se 725 µl ředidla AndroMed®, důkladně byl promíchán a uložen na vyhřívanou desku Control unit HT 200. Dále bylo odebráno 2,7 µl a vloženo na sklíčko s komůrkou uložené na vyhřevné desce mikroskopu. Mikroskopem Motic BA 310 s kamerou Camera Minitel byl vzorek zhodnocen v CASA programu SpermVision™ Production, kterým byly získány informace o koncentraci vzorku, progresivní motilitě a počtu spermíí. Po celou dobu vyšetřování byl odběrový sáček s ejakulátem odložen v kádince na vyhřevné desce o teplotě 38 °C.

Vzhledem k omezenému množství odebraného ejakulátu byly vyřazeny pouze vzorky obsahující krev. Vzorky s nižší aktivitou než 70 % (které se pro běžné zpracování nepoužívají) byly k experimentu použity.

Následovala výroba inseminačních dávek, která zahrnovala naředění ejakulátu, promíchání, po kterém naředěný ejakulát 10 minut odpočíval uložený v kádince na pracovní desce. Dále bylo vykonáno naplnění do různě barevných pejet o velikosti 0,25 ml na přístroji MPC UNO. Po celou dobu plnění byl naředěný ejakulát promícháván v kónickém kelímku na oscilačním stolku. Naplněné pejety byly automatickým zařízením potištěny registrem a jménem býka, datumem výroby a číslem inseminační stanice.

Vyrobené pejety byly rozděleny tak, aby od každého býka byly 4 pejety na 4 racích a ty byly vloženy do chladničky LKexv 3600 MediLine o teplotě 5 °C. Následovala ekvilibrace různě dlouhou dobu. Na základě studia literatury byly vybrány 4 časy ekvilibrace: 1 hodina (E1) (DOLEŽALOVÁ *et al.*, 2016), 3 hodiny (E3) (LEITE *et al.*, 2010), 8 hodin (E8) (MURPHY *et al.*, 2018a) a 24 hodin (E24) (TIRPAN *et al.*, 2017).

Po uplynutí těchto časů ekvilibrace byly dávky postupně mrazeny parami tekutého dusíku v mrazícím zařízení MT Freezer 2.0 v teplotě -190 °C po dobu 10 minut. Zamrazené dávky se posléze uchovávaly v gobletách v dewarových kontejnerech s tekutým dusíkem Taylor při teplotě -196 °C.

Po dvoutýdenním uchování v tekutém dusíku byly dávky rozmrazeny ve vodní lázni v termostatu se 38 °C po dobu jedné minuty (3 měření od každého vzorku). Následně byly analyzovány pod mikroskopem se 400násobným zvětšením 400krát a vyhodnoceny pomocí programu SpermVision™ Production stejným způsobem, jakým byly hodnoceny při odběrech. Výsledkem analýzy je protokol o aktivitě spermatu, kde je zelenou barvou zobrazen progresivní pohyb spermií, modrou barvou lokální motilita a červená barva zobrazuje nepohyblivé, mrtvé spermie (viz Přílohy).

Veškeré vybavení (pomůcky a přístroje) pro zpracování a hodnocení spermatu byly od firmy Minitübe, Tienfenbach, Německo.

4.2 Statistické vyhodnocení výsledků

Rozmrazené dávky byly hodnoceny *in vitro*. Od každého ze šesti býků bylo získáno 15 odebraných ejakulátů. Z každého ejakulátu bylo vyrobeno 16 dávek:

4 pejety na každou stanovenou dobu ekvilibrace. Vyřazeny byly pouze čtyři vzorky ejakulátu odebraného od býka č. 5 z důvodu příměsi krve. Celkem bylo zpracováno 1056 vzorků. Veškerá data byla zaznamenána do programu Microsoft Office Excel 2007.

K lepšímu porovnání progresivní aktivit mezi skoky a býky byly naměřené hodnoty přepočteny na procentuální hodnotu z progresivní aktivity při odběrech. Tato procenta byla zpětně převedena na skutečnou progresivní aktivitu spermii (viz příloha 2).

Pro statistické hodnocení výsledků byla použita analýza rozptylu s opakováním pro porovnání hodnot motility býků a získání základních popisných statistik, dále byla použita korelace pro vyhodnocení vlivu množství spermatu a koncentrace. Rozdíly ve sledovaných znacích mezi býky byly vyhodnoceny na hladině statistické průkaznosti kdy:

$p \leq 0,05$ * statisticky významný rozdíl – 95 %,

$p \leq 0,01$ ** statisticky vysoce významný rozdíl – 99 %,

$p > 0,05$ statisticky nevýznamný rozdíl.

Všechna statistická hodnocení byla provedena v programu Statistica 12 (StatSoft CR s.r.o.).

5 Výsledky a diskuse

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na kvalitu ejakulátu. Po odběrech, před naředěním a zpracováním, bylo sledováno množství, hustota a progresivní motilita. Po zamrazení a následném rozmrazení byla sledována progresivní motilita spermií v inseminačních dávkách. Dále byl vyhodnocen vliv počátečních parametrů (hustoty, množství a aktivita při odběrech) na aktivitu po rozmrazení. Celkově byl zhodnocen vliv doby ekvibrace na motilitu spermií býků po rozmrazení.

5.1 Základní statistické charakteristiky

V Tabulka 1 jsou uvedeny základní charakteristiky vstupních parametrů pro všechny býky: průměrná hodnota ze všech odběrových dní pro množství čerstvého ejakulátu, jeho hustotu a aktivitu (progresivní motilitu) při odběrech. Z tabulky lze vyčíst, že průměrné množství ejakulátu od všech býků bylo 10,08 ml, kdy nejmenší množství měl býk č. 5 s hodnotou 6,46 ml, naopak největší množství měl býk č. 3, 12,65 ml. Podle LOUDY *et al.* (2007) by se množství odebraného ejakulátu mělo pohybovat v rozmezí 3–12 cm³. Sledování býci byly odebrány dvojskokem, do jednoho odběrového sáčku se býk vysemenil dvakrát za sebou. To vysvětluje lehce vyšší množství u býka č. 3. Jak uvádí MURPHY *et al.* (2018b), sběr více ejakulátů ve stejný den nemá vliv na motilitu spermií po rozmrazení. Interval odběru do 1 hodiny, kdy je sperma schopné udržet si svůj funkční stav, zvyšuje produktivitu.

Koncentrace spermií v ejakulátu se pohybovala od $0,51 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ do $1,37 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, s průměrnou hodnotou $0,91 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. BHAKAT *et al.* (2011) ve své studii potvrzují vliv věku na koncentraci spermií, kdy nejvyšší koncentrace byla zjištěna ve věku 4–5 let. Býci č. 3 a 6 s nejnižšími koncentracemi jsou ve věku do dvou let, a to může být důvodem k nižším hodnotám koncentrací, než které uvádí LOUDA *et al.* (2007) jako optimální ($0,8\text{--}2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$).

Progresivní pohyb v čerstvém ejakulátu na inseminačních stanicích by měl mít 45–75 % i více (LOUDA *et al.*, 2007). Průměrná aktivita sledovaných býků byla 74,63 %, s minimální hodnotou 49 % (býk č. 5) a maximální 90 % (býk č. 4).

Parametry čerstvého spermatu zjištěné v experimentální části odpovídaly hodnotám, které ve své práci zveřejnili DOLEŽALOVÁ *et al.* (2015). Jednalo se o objem 9,97 g, koncentraci $1,00 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ a progresivní motilita spermií 72,22 %.

Ejakulát odebíraný na inseminační stanici od licencovaných býků musí splňovat stanovené normy pro daný druh plemenů hospodářských zvířat, aby mohlo být semeno použito k umělé inseminaci (LOUDA *et al.* 2007). K laboratornímu hodnocení charakteristik spermatu *in vitro* po kryokonzervaci se v dnešní době využívají klasické i moderní metody, jejichž hlavním účelem je predikce potenciálu plodnosti vzorku spermatu (ZOCCOLARO *et al.*, 2013).

Tabulka 1: Vstupní parametry čerstvého ejakulátu

Býk č.	A [%]	SE	Min. [%]	Max. [%]	Mn [g]	H [10^6 ml^{-1}]
1	74,27	6,64	57,00	86,00	12,15	0,99
2	65,87	7,05	53,00	75,00	11,89	1,02
3	72,60	7,39	60,00	84,00	12,65	0,67
4	82,80	5,70	67,00	90,00	7,78	1,37
5	72,55	11,43	49,00	89,00	6,46	0,94
6	79,13	6,50	62,00	86,00	8,57	0,51
všichni	74,63	9,07	49,00	90,00	10,08	0,91

Vysvětlivky: průměr progresivní motilita čerstvého ejakulátu (A); Směrodatná odchylka průměru (SE); množství odebraného ejakulátu (Mn); koncentrace/hustota čerstvého ejakulátu (H)

Při použití korelační analýzy byla zjištěna závislost množství a koncentrace čerstvého ejakulátu a výsledné aktivity ve všech časech ekvilibrace na počáteční aktivitě spermií při odběrech (**Tabulka 2**). Počáteční aktivita má vliv na ostatní vstupní parametry, se kterými je v nízké korelační závislosti ($r=0,0-0,3$). Doby ekvilibrace E1 a E3 jsou v mírné korelační závislosti ($r=0,31-0,5$) s počáteční aktivitou ($p < 0,01$) a doby ekvilibrace E8 a E24 jsou ve významné korelační závislosti ($r=0,51-0,7$) s počáteční aktivitou ($p < 0,01$). Množství a hustota čerstvého ejakulátu nevykazují žádnou statisticky významnou korelaci ($p > 0,05$). U množství byla zjištěna nízká korelace ($r=0,27$) s aktivitou v E8 ($p < 0,01$) a u hustoty byla zjištěna mírná korelace s aktivitou v E8 i E24.

MURPHY *et al.* (2018b) potvrzuje lineární zvýšení celkového počtu buněk se zvyšujícím se objemem ejakulátu a pozitivní vliv vyššího věku na koncentraci spermií v ejakulátu.

Tabulka 2: Korelační vztahy vstupních parametrů s časy ekvilibrace

Znak		Mn	H	E1	E3	E8	E24
A	r	-0,23	0,27	0,40	0,41	0,51	0,53
	p	0,032 *	0,012 *	<0,001 **	<0,001 **	<0,001 **	<0,001 **
Mn	r	x	-0,02	-0,15	-0,20	-0,23	-0,20
	p	x	0,842	0,171	0,06	0,029	0,064
H	r		x	0,31	0,17	0,36	0,33
	p		x	0,775	0,109	0,001 **	0,002 **

Vysvětlivky: průměr progresivní motilita čerstvého ejakulátu (A); Směrodatná odchylka průměru (SE); množství odebraného ejakulátu (Mn); koncentrace/hustota čerstvého ejakulátu (H); p <0,05 * – 95 %; p <0,01 ** – 99 %.

5.2 Vliv délky ekvilibrace

Výsledky vlivu délky ekvilibrace jsou uvedeny v tabulce č. Tabulka 3 a Tabulka 4 a grafu č. Graf 1 a Graf 2. Změřená aktivita po rozmrazení byla vyjádřena procentuálním podílem z počáteční aktivity po odběrech, aby byl lépe zřetelný rozdíl mezi skoky a býky.

Z Tabulka 3 vyplývá statisticky významný (p <0,01) vliv býka a času na výslednou dobu ekvilibrace. Mezi sledovanými býky ve stanovených dobách ekvilibrace byl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Při hodnocení vlivu času ekvilibrace jsme dospěli ke statisticky vysoce významnému rozdílu. Tyto rozdíly byly dále vyhodnoceny.

Tabulka 3: Vliv býka a času na motilitu po rozmrazení v různých časech ekvilibrace

	F-test	p
Býk	3,20	0,011 *
Čas	172,61	<0,001**

Vysvětlivky: p <0,05 * – 95 %; p <0,01 ** – 99 %

V tabulce č. 4 jsou porovnání býci v jednotlivých časech ekvilibrace. Původní hypotéza prokázala rozdíl mezi býky, ovšem při důkladnějším rozboru byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze v E24 u býka č. 4. Průměrná procentuální aktivita všech býků v tomto čase byla 55,47±17,59 %. Býk č. 4 měl v E24 nejvyšší hodnotu (68,90±10,14 %) a tím značně převýšil ostatní býky.

Tabulka č. 4 a graf č. 2 a 3 popisují vztah mezi dobou ekvilibrace a výslednou motilitou a porovnávají doby u býků jednotlivě a následně i jejich průměrnou hodnotou. Nejnížší doba ekvilibrace měla 1 hodinu a výsledky aktivity s tímto časem byly nejnížší u všech býků. Průměrný procentuální podíl aktivity spermií

po rozmrazení ($31,08 \pm 9,75$ %) z aktivity při odběrech ($74,63 \pm 9,07$ %) dává přibližně pouhých 23 % spermií s progresivní motilitou.

Při zvýšení doby ekvibrace na 3 hodiny došlo ke zvýšení výsledné aktivity na $46,73 \pm 12,33$, což z průměrné aktivity při odběrech činí přibližně 35 %.

Nejvyšší hodnoty motility spermií po rozmrazení byly zaznamenány téměř u všech býků při době ekvibrace 8 hodin. Výjimkou byl býk č. 4, který měl nejvyšší hodnotu při 24hodinové ekvibraci. Ovšem rozdíl mezi těmito hodnotami nebyl statisticky významný ($p > 0,05$). Průměrná zjištěná hodnota v čase ekvibrace 8 hodin byla $58,74 \pm 13,92$ %. Průměrná aktivita při odběrech byla $74,63 \pm 9,07$ % (viz tab. č. 1), z čehož vyplývá, že průměrná aktivita po rozmrazení v této době ekvibrace je přibližně 43 %.

Aktivita naměřená po 24hodinové ekvibraci byla v průměru $55,47 \pm 17,59$ %, což je nepatrně nižší hodnota než u ekvibrace 8 hodin, nicméně tento rozdíl není statisticky významný. Po přepočtu z počáteční aktivity vychází průměrná aktivita této době ekvibrace přibližně 41 %.

Tabulka 4: Výsledné hodnoty procentuální aktivity spermií po rozmrazení, vliv býka a vliv ekvibrační doby

Býk	E1		E3		E8		E24	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1	30,94 ^{A1}	12,52	38,94 ^{AC1}	12,81	52,12 ^{B1}	11,68	49,21 ^{BC1}	16,30
2	33,02 ^{A1}	9,75	53,80 ^{B1}	13,66	64,63 ^{B1}	14,26	56,86 ^{B1}	13,99
3	30,00 ^{A1}	9,47	44,12 ^{B1}	14,51	53,37 ^{B1}	19,18	54,25 ^{B1}	22,83
4	30,56 ^{A1}	10,69	52,69 ^{B1}	10,01	67,50 ^{C1}	7,07	68,90 ^{C2}	10,14
5	30,35 ^{A1}	8,26	46,09 ^{B1}	5,43	62,56 ^{C1}	4,62	58,10 ^{BC1}	11,67
6	31,44 ^{A1}	8,15	44,57 ^{B1}	8,44	53,25 ^{B1}	12,75	46,22 ^{B1}	18,98
∅	31,08 ^{A1}	9,75	46,73 ^{B1}	12,33	58,74 ^{C1}	13,92	55,47 ^{C1}	17,59

Vysvětlivky: Stejná písmena a číslice v horním indexu dokumentují statistickou významnost rozdílu – A, B, C ($p < 0,05$); 1, 2 ($p < 0,05$); Písmena značí rozdíl mezi časy ekvibrace u jednotlivých býků (řádky), číslice značí rozdíl mezi býky v určitých časech (sloupce); LSM – průměr nejmenších čtverců; SE – střední chyba průměru.

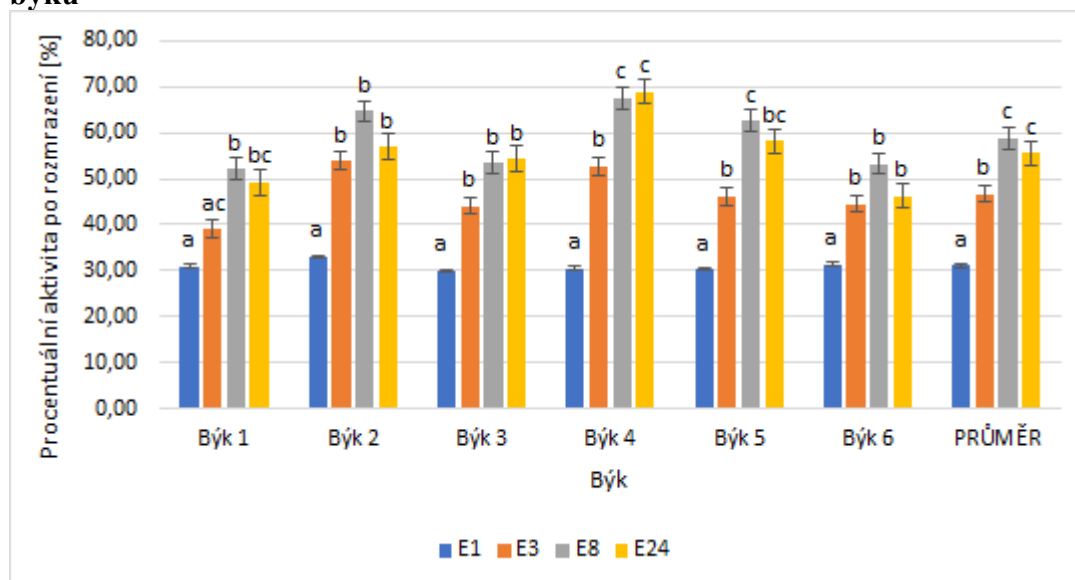
Schopnost spermie být progresivně pohyblivá je podle AMAL *et al.* (2019) považována za nejdůležitější atribut spermatu pro hodnocení potenciálu plodnosti kryokonzervovaného spermatu. Životaschopnost spermií po rozmrazení je stále nízká a mezi chovnými býky se výrazně liší. Tyto slabiny jsou důležité, protože brání

pokroku v reprodukční biologii (UGUR *et al.*, 2019). Jedním z důležitých vlivů je doba ekvibrace (MURPHY *et al.*, 2018a).

Aktivita kvalitní inseminační dávky po rozmrazení s dobrou oplozovací schopností by se měla pohybovat od 30 do 50 % a měla by obsahovat 10 milionů aktivních spermií s progresivní motilitou (LOUDA *et al.*, 2008). Inseminační stanice, na které byl proveden pokus, ředí čerstvý ejakulát tak, aby každá inseminační dávka obsahovala 30 milionů spermií. Toto ředění je automaticky vypočteno programem na analýzu ejakulátu. Vzhledem k tomuto nastavení není v diplomové práci množství celkových spermií zaznamenáváno. LOUDA *et al.* (2008) zároveň uvádí, že optimální počet spermií v inseminační dávce potřebný k úspěšnému oplození plemenic je u býků rozdílná.

Při porovnání jednotlivých dob ekvibrace u každého býka samostatně byl prokázán statisticky vysoce významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi E1 a E3 je u býků č 2-6. U býka č. 1 mezi těmito časy ekvibrace není statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).

Graf 1: Vliv doby ekvibrace na aktivitu spermií po rozmrazení u jednotlivých býků



Vysvětlivky: Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi hodnotami jsou označeny indexy „a“, „b“, „c“, přičemž nejnižší hodnota je označena indexem „a“. Hodnoty, mezi kterými nebyly zjištěny průkazné ($p > 0,05$) rozdíly, jsou označeny stejným indexem „a“.

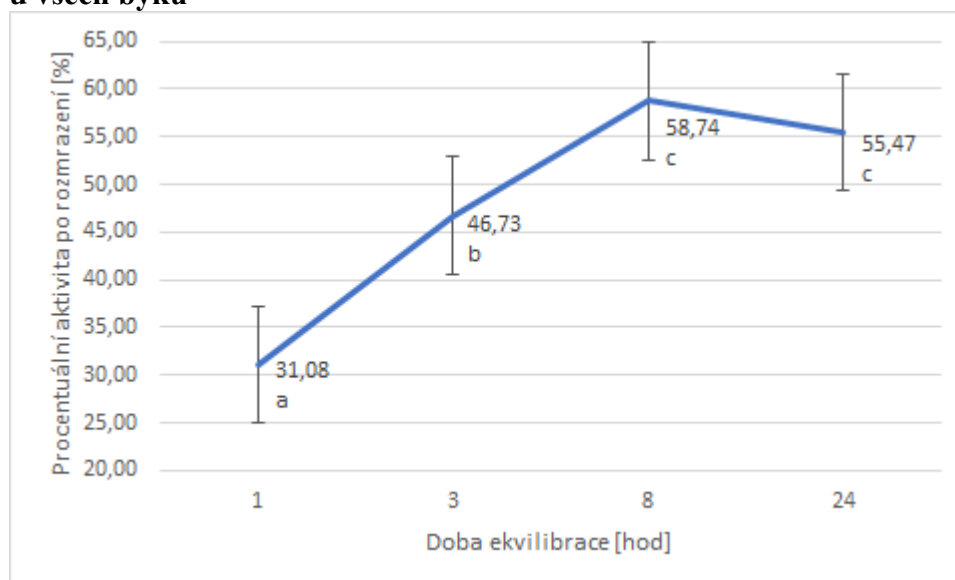
Zvýšení doby ekvibrace ze 3 hodin na 8 hodin byl vysoce statisticky významný ($p < 0,01$) u býků č. 1, 4 a 5. Naopak býci č. 2, 3 a 6 nevykazovali statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).

Další navýšení z 8 hodin na 24 hodin nevykázalo statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) u žádného býka. Nicméně z průměrů aktivit lze vyčíst, že došlo k mírnému snížení aktivity v porovnání s aktivitou v E8. MURPHY *et al.* (2018a) ve své práci uvádí, že prodloužením rovnovážného stavu z 8 na 18 hodin nebo ze 4 na 72 hodin zvýšilo kvalitu motility a životaschopnost býčích spermií a nebyla ovlivněna plodnost.

U býka č. 1 je patrný vysoce významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi E1 a E8 i E24, dále mezi E3 a E8. Býk č. 2, 3 a 6 prokazuje vysoce významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi E1 a E3, E8 i E24. U býka č. 4 jsou vysoce statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) mezi E1 a E3, E8 i E24, dále mezi E3 a E8 i E24. U býka č. 5 se zaznamenal vysoce statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi E1 a E3, E8 i E24 a mezi E3 a E8.

SHAHVERDI *et al.* (2014) uvádí, že délka ekvibrace výrazně ovlivňuje celkovou i progresivní motilitu spermií po rozmrazení. Posouzení motility je proto nedílnou součástí analýzy kvality spermatu s využitím systémů CASA, které umožňují objektivní přesné hodnocení kinematiky motility spermií (MURPHY *et al.*, 2018a).

Graf 2: Vliv doby ekvibrace na aktivitu spermií po rozmrazení v průměru u všech býků



Vysvětlivky: Statisticky vysoce významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi hodnotami jsou označeny indexy „a“, „b“, „c“, přičemž nejnižší hodnota je označena indexem „a“. Hodnoty, mezi kterými nebyly zjištěny průkazné ($p > 0,05$) rozdíly, jsou označeny stejným indexem „a“.

V experimentální části diplomové práce byl tento výrok potvrzen. Při E1 se motilita snížila o téměř 70 %, u E3 více jak 50 % a u E8 a E24 o necelých 50 %

(graf č. 3). Významný statistický rozdíl byl zjištěn mezi hodnotami E1 a E3, E8 i E24, mezi E3 a E8 a E24 také. Statisticky nevýznamný rozdíl byl mezi průměrnými hodnotami všech býků v čase 8 a 24 hodin.

Vhodná doba ekvilibrace je stále nezjištěna a jejím studiem se zabývá mnoho autorů. LEITE *et al.*, (2010) potvrdil nejnižší hodnoty při době ekvilibrace 0 hodin, v porovnání s 2 a 4 hodinami. Nejlepších výsledků dosáhl ve 4 hodinách. AMAL *et al.* (2016), BELALA *et al.* (2016), DOLEŽALOVÁ *et al.* (2016) a STÁDNÍK *et al.* (2016) svým výzkumem potvrdili, že velmi nízká doba ekvilibrace (30 minut) je nedostatečná a vyšší doba ekvilibrace (4 hodiny) vykazuje vyšší motilitu po rozmrazení.

Narozdíl od zmíněných studií, které doporučují mrazit inseminační dávky ve stejný den odběru ejakulátu, existují jiné studie, které toto tvrzení vyvracejí (ARAV *et al.*, 2000, MUIÑO *et al.*, 2007, LEITE *et al.*, 2010 a SHAHVERDI *et al.*, 2014).

Výsledky této práce jsou v nesouladu se SHAH *et al.* (2016), kteří prodloužili dobu ekvilibrace na 6 hodin a nejlepší výsledky obdrželi opět v čase 4 hodiny.

Doba ekvilibrace je nezbytná pro zachování motility spermií (SHAHVERDI *et al.* 2014). Ovšem přesná doba ekvilibrace, která by měla nejlepší vliv na vitalitu spermií, není dosud známá (LEITE *et al.*, 2010).

Inseminační stanice mají velký zájem o zlepšení kvality inseminačních dávek uvádějící na trh. Proto se v posledních desetiletí experimentuje s různými přísadami a ředidly, různými rychlostmi chlazení, zmrazování i rozmrazování (MUIÑO *et al.*, 2007). Kryokonzervace je nefyziologická metoda, která zahrnuje vysokou úroveň přizpůsobení biologických buněk osmotickým a termickým šokům, ke kterým dochází jak během zředění, ochlazování-zmrazení, tak během rozmrazovacích postupů (ANDRABI, 2009). ZOCCOLARO *et al.* (2013) zdůrazňuje manipulaci jako významný faktor kvality inseminační dávky.

6 Závěr

Umělá inseminace je reprodukční biotechnologie, která výrazně přispěla ke genetickému zlepšení, zejména u dojnic. Tento dopad by nebyl možný bez úspěšného zmrazení býčího spermatu. Proces kryokonzervace představuje umělé přerušování procesu maturace a oplodnění po ejakulaci. Hlavní nevýhoda spočívá v tom, že postupy podílející se na procesu kryokonzervace jsou škodlivé pro spermie, a dokonce i nejlepší techniky konzervace vedou ke snížení životaschopných spermií na polovinu.

Rovnováha je nezbytným krokem při kryokonzervaci spermatu. Kromě působení proti krystalům ledu díky kryoprotektantu umožňuje stabilizaci spermatozoální membrány a její přizpůsobení nízkým teplotám při přípravě na zmrazení.

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit vliv doby ekvilibrace na progresivní motilitu spermií po rozmrazení. Z výsledků experimentální části vyplývá, že doba ekvilibrace 1 hodinu je neefektivní z hlediska kvality inseminační dávky a nesplňuje minimální požadavky progresivní motility inseminačních dávek (23 %). Mezi vybranými časy ekvilibrace bylo působení 8 a 24 hodin nejvíce pozitivní k motilitě spermií po rozmrazení a snížili motilitu na $58,74 \pm 13,92$ % a $55,47 \pm 17,59$ % z počáteční aktivity. Vliv býka byl potvrzen pouze u jednoho býka v jednom čase.

Na inseminačních stanicích je proto vhodné z hlediska nejlepší kvality inseminačních dávek mrazit po osmi hodinách doby ekvilibrace. Ovšem mrazení druhý den po odběrech je pro šlechtitelské podniky organizačně přijatelnější a rozdíl v kvalitě inseminačních dávek na rozdíl od ekvilibrace 8 hodin je nevýznamný.

7 Seznam literatury

- ABRIL-SÁNCHEZ, S., F. BERACOCHEA, A. FREITAS-MELO, J. P. DAMIÁN, J. GIBIRONI, N. ZAMBRA, A. FERNANDEZ, J. SANTIAGO-MORENO *et* R. UNGERFELD “Semen collection by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands is less stressful than electroejaculation in non-anaesthetised goat bucks.” *Animal reproduction* 14 (2017): 285-285. DOI: 10.13140/RG.2.13644.46729.
- AMAL, A. S., R. I. ARIFANTINI, M. A. SETIADI *et* S. SAID. Characteristics of the post-thawed Balinese bull semen extended in three different extenders and equilibration times. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* [online]. 2019, **44**(2), 135-145. DOI: 10.14710/jitaa.44.2.135-145. ISSN 2460-6278.
- AMANN, R. P. *et* D. WABERSKI. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014, **81**(1), 5-17.e3. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.004. ISSN 0093691X.
- ANDRABI, S. Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009, **44**(3), 552-569. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01240.x.
- ARAV A., Y. ZERON *et* A. OCHERETNY. (2000): *A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes*. *Theriogenology*, 53, 248-249.
- ARIAS, M. E., ANDARA K., BRIONES, E. *et* FELMER R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology* [online]. 2017, **17**(2), 126-132. DOI: 10.1016/j.repbio.2017.03.002. ISSN 1642431X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1642431X17300177>.
- Artificial insemination. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* [online]. Elsevier, 2001, 2001, s. 751-778. DOI: 10.1016/B978-070202556-3.50035-9. ISBN 9780702025563. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702025563500359>.

- BAIEE, F., W. HARON, R. YUSOFF, A. OMAR, N. YIMER, S. HAMMADI, T. AHMEDELTAIEB *et* A. KAKA. Modification of Electro-Ejaculation Technique to Minimise Discomfort during Semen Collection in Bulls. *Pakistan Journal of Zoology*. 2017, **50**(1). DOI: 10.17582/journal.pjz/2018.50.1.83.89.
- BARBAS, J. P. *et* A. R. D. MASCARENHAS. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* 2009, **10**(1), 49-62. DOI: 10.1007/s10561-008-9081-4.
- BARSZCZ, K., D. WIESETEK, M. WASOWICZ *et* M. KUPCZYNSKA. Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science*. 2011, **4**(3). DOI: 10.5539/jas.v4n3p1.
- BARTH, A. D., A. A. ARTEAGA, L. F. C. BRITO *et* A. C. W. PALMER. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. *Animal Reproduction Science*. 2004, **84**(3-4), 315-325. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.02.010.
- BELALA, R., L. BRIAND-AMIRAT, L. VINCIGUERRA, D. TAINTURIER, R. KAIDI, C. THORIN, S. MICHAUD, M. ANTON *et* D. BENCHARIF. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. *Research in Veterinary Science* 2016, **106**, 66-73. DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.03.010.
- BERAN, J., L. STÁDNÍK, M. DOLEŽALOVÁ *et* R. TOUŠOVÁ. *Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu: uplatněná certifikovaná metodika*. Praha: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra speciální zootechniky, 2014. ISBN 978-80-213-2537-1.
- BERAN, J., STÁDNÍK, L., DUCHÁČEK, J., TOUŠOVÁ, R., LOUDA *et* F., ŠTOLC, L.: Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.*, 2011, **59**(6), 37-44. DOI: 10.11118/actaun201159060037.
- BERRUTI, G. *et* CH. PAIARDI. Acrosome biogenesis. *Spermatogenesis*. 2014, **1**(2), 95-98. DOI: 10.4161/spmg.1.2.16820. ISSN 2156-5562.

- BHAKAT, M., T. K. MOHANTY, V. S. RAINA, A. K. GUPTA, H. M. KHAN, R. K. MAHAPATRA *et* M. SARKAR. Effect of age and season on semen quality parameters in Sahiwal bulls. *Tropical Animal Health and Production*. 2011, **43**(6), 1161-1168. DOI: 10.1007/s11250-011-9817-1.
- BUTTS, I.A.E., M.A.R. WARD, M.K. LITVAK, T.E. PITCHER, S.M.H. ALAVI, E.A. TRIPPEL *et* R.M. RIDEOUT. (2011): Automated sperm head morphology analyzer for open-source software. *Theriogenology*. **76**(9), 1756-1761.
- CENARIU, M., E. PALL, M. BORZAN, L. BOGDAN *et* I. GROZA. Advanced Techniques of Bovine Semen Analysis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicin*. 2018, **75**(1), 58-65. DOI: 10.15835/buasvmcn-vm:004317. ISSN 1843-5378.
- CORNWALLIS, CH. K. *et* E. A. O'CONNOR. Sperm: seminal fluid interactions and the adjustment of sperm quality in relation to female attractiveness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009, **276**(1672), 3467-3475. DOI: 10.1098/rspb.2009.0807. ISSN 0962-8452.
- DISKIN, M. G. Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal* [online]. 2018, **12**(s1), s75-s84 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1017/S1751731118000952. ISSN 1751-7311. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118000952/type/journalarticle>.
- DOLEŽALOVÁ, M., L. STÁDNÍK, Z. BINIOVÁ, J. DUCHÁČEK *et* J., BERAN. Effect of freezing curve type on bull spermatozoa motility after thawing. *Acta Veterinaria Brno* (2015) 84, s. 383–391. doi:10.2754/avb201584040383.
- DOLEŽALOVÁ, M., L. STÁDNÍK, Z. BINIOVÁ, J. DUCHÁČEK *et* R. STUPKA. Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*. 2016, **61**(11), 515-525. DOI: 10.17221/23/2016-CJAS.
- FLEISCH, A., E. MALAMA, U. WITSCHI, C. LEIDING, M. SIUDA, F. JANETT *et* H. BOLLWEIN. Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 2017, 89, 255-262. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.10.018. ISSN 0093691X.

- FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *Journal of Animal Science*. 2002, **80**(2), 1-10. DOI: 10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a. ISSN 0021-8812.
- HAFEZ, B. et E. S. E. HAFEZ. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2000. ISBN 0-683-30577-8.
- HOFÍREK B, R. DVOŘÁK, L. NĚMEČEK, R. Doležel et Z. Pospíšil. 2009. Nemoci skotu. ČR: Noviko, a. s. Brno. ISBN: 9788086542195.
- CHENOWETH, P. J. et S. P. LORTON, *Animal andrology: theories and applications*. Wallingford: CABI, c2014. ISBN 9781780643168.
- JELÍNEK, P. et K. KOUDELA. Fyziologie hospodářských zvířat. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7644-1.
- JEROME, A., P. KUMAR, S. PATIL et R. BALA. Techniques of semen collection and cryopreservation. *ICAR-Central Institute for Research on Buffaloes*. Hisar, 2019.
- KANTHIYA S., P. JITBORISUTTHIPONG, S. TEEPATIMAKORN, V. PUNYAPORNWITHAYA, J. ITO et A. SATHANAWONGS. The effect of semen collection interval on semen quality in frozen bull semen production. *Veterinary Integrative Sciences*. 2020, 18(1): 53–60 [cit. 2020-06-03]. ISSN: 2629-9968.
- KENNY, D. A. et C. J. BYRNE. Review: The effect of nutrition on timing of pubertal onset and subsequent fertility in the bull. *Animal*. 2018, **12**(s1), s36-s44. DOI: 10.1017/S1751731118000514. ISSN 1751-7311.
- KHAWAR, M. B., H. GAO a W. LI. Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2019, **7** [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.3389/fcell.2019.00195. ISSN 2296-634X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00195/full>.
- KUBÍČEK, V. Spermatologické vyšetření. *Urologie pro praxi*. 2010, **11**(4), 204-210 [cit. 2020-03-08]. Dostupné také z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2010/04/08.pdf>.
- LEITE, T. G., V. R. DO VALE FILHO, R. P. DE ARRUDA, A. F. C. DE ANDRADE, L. L. EMERICK, F. G. ZAFFALON, J. A. M. MARTINS et V. J. DE ANDRADE. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity

of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*. 2010, **120**(1-4), 31-38. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.04.005. ISSN 03784320.

LEMMA A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, *Artificial Insemination in Farm Animals*, Dr. Milad Manafi (Ed.). 2011[cit. 2020-01-11], ISBN: 978-953-307-312-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/effect-of-cryopreservation-on-spermquality-and-fertility>.

LIEBERMAN, D., E. MCCLURE, S. HARSTON et D. MADAN. Maintaining semen quality by improving cold chain equipment used in cattle artificial insemination. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1038/srep28108. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep28108>.

LINDEMANN, CH. B. et K. A. LESICH. Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* [online]. 2016, **73**(11), 652-669. DOI: 10.1002/cm.21338. ISSN 19493584.

LONERGAN P. Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal* [online]. 2018, **12**(s1), s4-s18 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1017/S175173111800071X. ISSN 1751-7311. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S175173111800071X/type/journal_article

LOUDA, F., et al. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2001. Živočišná výroba. ISBN 80-213-0702-1

LOUDA, F., M. BJELKA, A. JEŽKOVÁ, J. POZDÍŠEK et J. BEZDÍČEK. *Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby: metodika*. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, 2007. ISBN 978-80-87144-01-5.

LOUDA, F., D. VANĚK, A. JEŽKOVÁ, L. STÁDNÍK, M. BJELKA, J. BEZDÍČEK et J. POZDÍŠEK. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic: metodika*. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, 2008. ISBN 978-80-87144-05-3.

- MUIÑO, R., M. FERNÁNDEZ *et* A.I. PENA. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk- based or two egg-yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. *Reproduction Domestic Animal*, 42, s. 305 - 31.
- MURPHY, E. M., B. EIVERS, C. O'MEARA, P. LONERGAN *et* S. FAIR. Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. *Theriogenology* [online]. 2018, **108**, 217-222. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.034. ISSN 0093691X. Dostupné z: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X17305757\(a\)](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X17305757(a))
- MURPHY, E. M., A. K KELLY, C. O'MEARA, B. EIVERS, P. LONERGAN *et* S. FAIR. Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal of Animal Science* [online]. 2018, **96**(6), 2408-2418. DOI: 10.1093/jas/sky130. ISSN 0021-8812. Dostupné z: [https://academic.oup.com/jas/article/96/6/2408/4996161\(b\)](https://academic.oup.com/jas/article/96/6/2408/4996161(b))
- OMBELET W. *et* J. V. ROBAYS. Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts Views Vis Obgyn*. 2015;7(2):137–143.
- OSTERMEIER, G. CH., G.A. SARGEANT, B.S. YANDELL *et* J.J. PARRICH. Measurement of Bovine Sperm Nuclear Shape Using Fourier Harmonic Amplitudes. *Journal of ANDROLOGY*. 2001, 22(4), 584-594.
- PERRY, J. C., L. SIROT *et* S. WIGBX. The seminal symphony: how to compose an ejaculate. *Trends in Ecology & Evolution* [online]. 2013, **28**(7), 414-422 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1016/j.tree.2013.03.005. ISSN 01695347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534713000840>
- POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* [online]. 2006, **60**(3), 289-310 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1007/s00265-006-0178-0. ISSN 0340-5443. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00265-006-0178-0>
- PRATHIMA, T., S. RANJANI *et* N. PANDIYAN. From the Pages of History: History of Semen Analysis. *Chettinad Health City Medical Journal*. 2015, **4**(1), 63-64.

- RAAD, G., L. LTEIF, R. LAHOUD, J. AZOURY, J. AZOURY, J. TANIOS, M. HAZZOURI *et* J. AZOURY. Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology* [online]. 2018, **6**(6), 836-845 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1111/andr.12531. ISSN 20472919. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/andr.12531>
- RAHEJA N, S. CHOUDHARY. S. GREWAL, N. SHARMA *et* N. KUMAR. A Review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *J. Ento. and Zool. Stud.* 2018 **6** (2) 239-45
- RAMÍREZ-REVECO, A., J. L. HERNÁNDEZ *et* P. AROS. Long-Term Storing of Frozen Semen at -196°C does not Affect the Post-Thaw Sperm Quality of Bull Semen. MARCO-JIMENEZ, Francisco a Hülya AKDEMIR, ed. *Cryopreservation in Eukaryotes* [online]. InTech, 2016, 2016-11-30 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.5772/64948. ISBN 978-953-51-2779-6. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/cryopreservation-in-eukaryotes/long-term-storing-of-frozen-semen-at-196-c-does-not-affect-the-post-thaw-sperm-quality-of-bull-semen>
- RASAD, S. D, N. SOLIHATI, K. WINANGUN, M. F. AVICENNA, A. YUSRINA, M. MELINDA *et* A. N. RAUF. Evaluation of Pasundan Cattle semen quality in three different types of extender. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019, **247**. DOI: 10.1088/1755-1315/247/1/012011. ISSN 1755-1315.
- RAWLINGS, N., A. EVANS, R. CHANDOLIA *et* E. BAGU. Sexual Maturation in the Bull. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008, **43**, 295-301. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01177.x. ISSN 09366768.
- RIZVI, A. A., M. I. QURAIHI, V. SARKAR, CH. DUBOIS, S. BIRO *et* J. MULHALL. The effect of pH and viscosity on bovine spermatozoa motility under controlled conditions. *International Urology and Nephrology* [online]. 2009, **41**(3), 523-530 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1007/s11255-008-9493-x. ISSN 0301-1623. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11255-008-9493-x>.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. *et* F. P. VEGA. Semen technologies in domestic animal species. *Animal Frontiers* [online]. 2013, **3**(4), 26-33. DOI: 10.2527/af.2013-0030. ISSN 2160-6056. Dostupné z: <https://academic.oup.com/af/article/3/4/26/4638652->

- SARAGUSTY, J., H. GACITUA, Y. ZERON, I. ROZENBOIM *et* A. ARAV. Double freezing of bovine semen. *Animal Reproduction Science* [online]. 2009, **115**(1-4), 10-17 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.11.005. ISSN 03784320. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432008004685>.
- SARSAIFI, K., J. VEJAYAN, A. W. HARON, R. YUSOFF, H. HANI, M. RASOLI, M. A. OMAR *et* A. M. OTHMAN. Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. *Livestock Science*. 2015, **172**, 96-105. DOI: 10.1016/j.livsci.2014.12.004. ISSN 18711413.
- SHAH, S. A. H., S. M. H. ANDRABI *et* I. Z. QUERESHI. Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*. 2016, **4**(5), 972-976, DOI: 10.1111/andr.12214. ISSN 20472919
- SHAHVERDI, A., A. RASTEGARNIA, *et* R. T. TOPRAGGALEH. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell journal*, 2014 **16**(3), 279–288.
- SHANMUGAM, M. *et* R. MAHAPATRA. Pellet Method of Semen Cryopreservation: Effect of Cryoprotectants, Semen Diluents and Chicken Lines. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2019, **62**. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180188. ISSN 1678-4324.
- SRIVASTAVA, N. *et* M. PANDE. *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*. Singapore: Springer Singapore, 2017. DOI: 10.1007/978-981-10-5200-2. ISBN 978-981-10-5199-9.
- STÁDNÍK, L., J. BERAN, M. DOLEŽALOVÁ, J. DUCHÁČEK *et* R. TOUŠKOVÁ. *Vybrané faktory ovlivňující kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků: uplatněná certifikovaná metodika*. Praha: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra speciální zootechniky, 2014. ISBN 978-80-213-2536-4.
- STÁDNÍK L., M. DOLEŽALOVÁ *et* J. DUCHÁČEK. *Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky: uplatněná certifikovaná metodika*. Praha: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra speciální zootechniky, 2015. ISBN 978-80-213-2615-6.

- STÁDNÍK L., M. DOLEŽALOVÁ *et* J. DUCHÁČEK (2016): *Vliv délky ekvilibrace na kvalitativní ukazatele inseminační dávky: uplatněná certifikovaná metodika*. Praha: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra speciální zootechniky, 2016. ISBN: 978-80-213-2710-8.
- STAUB, C. *et* L. JOHNSON. Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal* [online]. 2018, **12**(s1), s27-s35 [cit. 2020-02-23]. DOI: 10.1017/S1751731118000435. ISSN 1751-7311. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118000435/type/journal_article.
- STROUD, B., Consequences of mishandling frozen semen and embryos, *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 2013.
- SUEDE, S. H., A. MALIK *et* A. SAPRA. *Histology, Spermatogenesis* [online]. January 2020, 6 [cit. 2020-02-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553142/>.
- TALLURI, T. R., G. MAL *et* S. K. RAVI. Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and Poitou jacks. *Veterinary World* [online]. 2017, **10**(2), 214-220 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.14202/vetworld.2017.214-220. ISSN 09728988. Dostupné z: <http://www.veterinaryworld.org/Vol.10/February-2017/12.html>.
- THUNDATHIL, J. C., A. L. DANCE *et* J. P. KASTELIC. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology* [online]. 2016, **86**(1), 397-405 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.054. ISSN 0093691X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16300930>.
- TIRPAN, M. B., K. T. OLĞAÇ, H. GÜRLER *et* U. KAYA. Effects of Different Equilibration Conditions on Cryopreserved Bovine Sperm Quality. *Kocatepe Veterinary Journal*. 2017, **10**(2), 57-62.
- TURNER, R. M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* [online]. 2006, **18**(2) [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1071/RD05120. ISSN 1031-3613. Dostupné z: <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD05120>.

- UGUR, M. R., A. S. ABDELRAHMAN, H. C. EVANS, A.A. GILMORE, M. HITIT, R. I. ARIFANTINI, B. PURWANTARA, A. KAYA *et* E. MEMILI. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019, **6** . DOI: 10.3389/fvets.2019.00268. ISSN 2297-1769.
- VAN DER HORST, G., S. H. KOTZÉ, M. J. O'RIAIN *et* L. MAREE. Testicular Structure and Spermatogenesis in the Naked Mole-Rat Is Unique (Degenerate) and Atypical Compared to Other Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2019, **7** [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.3389/fcell.2019.00234. ISSN 2296-634X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2019.00234/full>.
- VISHWANATH, R. *et* P. SHANNON. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* [online]. 2000, **62**(1-3), 23-53 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00153-6. ISSN 03784320. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432000001536>.
- WANG, G., Y. LI, Q. YANG, S. XU, S. MA, R. ZHANG, G. JIA. D. Ai *et* Q. YANG. Gene expression dynamics during the gonocyte to spermatogonia transition and spermatogenesis in the domestic yak. *Journal of Animal Science and Biotechnology* [online]. 2019, **10**(1). DOI: 10.1186/s40104-019-0360-7. ISSN 2049-1891.
- YATHISH H.M., S. KUMAR, P. P. DUBEY, R. P. MODI, R. CHAUDHARY, S. A. KUMAR, S. K. GHOSH, M. SARKAR *et* B.SIVAMANI. Profiling of sperm gene transcripts in crossbred (*Bos taurus* x *Bos indicus*) bulls. *Animal Reproduction Science* 2017, **177**, 25-34. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.12.003. ISSN 03784320.
- ZOCCOLARO, L., F. MORATO, R. P. DE ARRUDA *et* E. C. C. CELEGHINI. The Importance of Semen Quality in AI Programs and Advances in Laboratory Analyses for Semen Characteristics Assessment. Lemma, Alemayehu, ed. *Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed*. InTech, 2013, 2013-01-09. DOI: 10.5772/52022. ISBN 978-953-51-0920-4.

8 Seznam použitých obrázků, tabulek, grafů

Obrázek 1: Schéma spermatogeneze	14
Obrázek 2: Stavba spermie	17
Tabulka 1: Vstupní parametry čerstvého ejakulátu.....	37
Tabulka 2: Korelační vztahy vstupních parametrů s časy ekvibrace.....	38
Tabulka 3: Vliv býka a času na motilitu po rozmrazení v různých časech ekvibrace.....	38
Tabulka 4: Výsledné hodnoty procentuální aktivity spermií po rozmrazení, vliv býka a vliv ekvibrační doby	39
Graf 1: Vliv doby ekvibrace na aktivitu spermií po rozmrazení u jednotlivých býků.....	40
Graf 2: Vliv doby ekvibrace na aktivitu spermií po rozmrazení v průměru u všech býků	41

9 Seznam použitých zkratk

A ... výchozí aktivita (progresivní motilita) při odběrech

AI... umělá inseminace (artificial insemination)

CASA... computer assisted sperm analysis

E₁ ... aktivita spermií po rozmrazení při době ekvilibrace 1 hod.

E₃ ... aktivita spermií po rozmrazení při době ekvilibrace 3 hod.

E₈ ... aktivita spermií po rozmrazení při době ekvilibrace 8 hod.

E₂₄ ...aktivita spermií po rozmrazení při době ekvilibrace 24 hod.

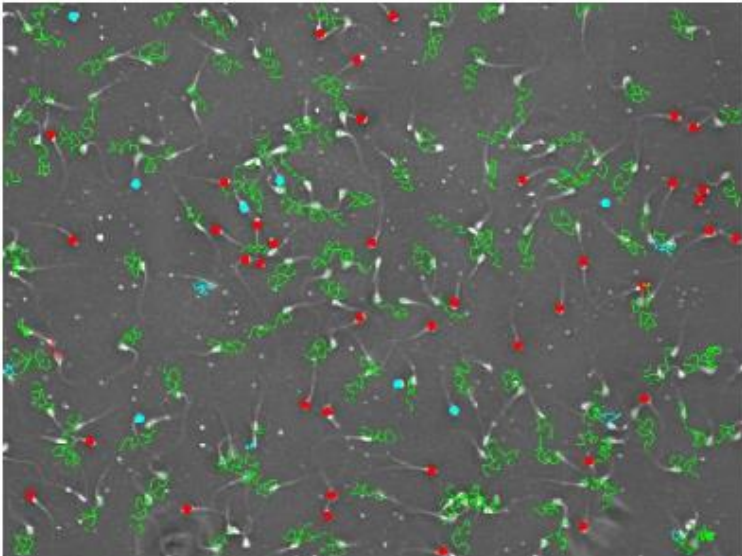



H ... hustota/koncentrace spermií v odebraném ejakulátu

Mn ... množství odebraného ejakulátu

10 Přílohy

Příloha 1: Vzor protokolu o kvalitě spermatu býka

Analýza semene SpermVision

Jméno dárce:	ID dárce:	Plemeno:
		
Legenda		
	Progresivní motilita	
	Lokální motilita	
	Nepohyblivé	
Technik:	Číslo vzorku: 1	Ředidlo: ANDROMED
Objem (ml): 15	Progresivní motilita: 75,64%	
Koncentrace (B/ml): 1,140	Lokální motilita: 6,88%	
Buňky celkem (B): 16,65	Nepohyblivé: 17,48%	
Životaschopné buňky celk. (B): 16,65	Celková motilita: 82,52%	
Poznámky:		
Datum analýzy: _____		
Podpis: _____		

Příloha 2: Tabulka skutečných hodnot aktivity spermií po rozmrazení v různých časech ekvilibrace

Býk	A [%]	E1 [%]	E3 [%]	E8 [%]	E24 [%]
1	74,27	22,98	28,92	38,71	36,55
2	65,87	21,75	35,44	42,57	37,45
3	72,60	21,78	32,03	38,75	39,39
4	82,80	25,30	43,62	55,89	57,05
5	72,55	22,02	33,44	54,41	42,15
6	79,13	24,88	35,26	42,14	36,57
∅	74,63	23,20	34,87	43,84	41,40