

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Vliv přidavku proteinových frakcí semenné plazmy na  
motilitu hřebčích spermií**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Daniela Nová  
Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze



### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv přídatku proteinových frakcí semenné plazmy na motilitu hřebčích spermií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.7.2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph. D., pod jehož vedením jsem tuto práci začínala psát a Ing. Filipě Bubeníčkové, s jejíž velkou pomocí jsem práci dokončila. Oběma děkuji za trpělivost a skvělé vedení. Poděkování také patří RNDr. Pavle Postlerové Ph.D. za to, že převzala vedení mé práce a umožnila mi tak ji úspěšně dokončit. V neposlední řadě bych zde ráda poděkovala své rodině za poskytnutou podporu během celého studia.

# Vliv přídavku proteinových frakcí semenné plazmy na motilitu hřebčích spermií

## Souhrn

Cílem této diplomové práce je prokázat, že přídavek proteinových frakcí semenné plazmy ke hřebčím spermiím před mražením, má vliv na jejich motilitu po rozmražení. Celá práce je zaměřena na motilitu již od samého začátku, tedy od kapitol anatomie a fyziologie spermií.

Sperma použité v experimentu bylo odebíráno standardním způsobem od šesti hřebců různého věku i plemene. Odebraný ejakulát byl naředěn ředidlem s kryokonzervačními látkami a z každého odběru bylo vytvořeno sedm pokusných alikvot – jedna kontrolní, tři s přídavkem heparin-vázající frakce proteinů semenné plazmy (HEP+) a tři s přídavkem heparin-nevázající frakce proteinů semenné plazmy (HEP-). Proteinové frakce byly přidány ve třech koncentracích - 125, 250 a 500  $\mu\text{g/ml}$ . Takto připravené vzorky byly naplněny do polypropylenových pejet o objemu 0,5 ml, zamrazeny a uchovávány v tekutém dusíku. Rozmrazeny byly ve vodní lázni o teplotě 37 °C (30 sekund), následně byly naředěny na vhodnou koncentraci a ihned hodnoceny systémem CASA.

Přídavek proteinových frakcí neměl signifikantní vliv na celkovou motilitu ani progresivní motilitu spermií, nicméně jednotlivé kinematické parametry motility spermií byly ovlivněny nejen přidanou frakcí HEP+ či HEP-, ale i jednotlivými koncentracemi. Náš experiment prokázal, že obě proteinové frakce mohou v určité koncentraci pozitivně ovlivnit kinematické parametry. Při porovnání obou frakcí a kontrolní skupiny bez rozlišení jednotlivých koncentrací, měly nejlepší hodnoty kinematických parametrů vzorky s přídavkem HEP- proteinové frakce. Spermie s HEP+ proteinovou frakcí měly ve dvou parametrech horší hodnoty než skupina s HEP-, ale i tak jejich výsledky byly lepší než u kontrolní skupiny. Frakce HEP+ měla v porovnání s kontrolní skupinou pozitivní účinky na pohyb spermií v koncentracích 125  $\mu\text{g/ml}$  a 500  $\mu\text{g/ml}$ , zatímco koncentrace 250  $\mu\text{g/ml}$  měla účinky negativní. Frakce HEP- měla signifikantní pozitivní účinky v koncentraci 125  $\mu\text{g/ml}$ , koncentrace 500  $\mu\text{g/ml}$  měla srovnatelné výsledky s kontrolní skupinou a koncentrace 250  $\mu\text{g/ml}$  způsobila ve většině kinematických parametrů zhoršení naměřených hodnot.

Náš experiment se také zabýval individualitou jednotlivých hřebců, protože rozdíly v mrazitelnosti hřebčích spermií jsou značné. Vidament et al. (1997) a Hoffmann et al. (2011) uvádějí, že pouze 20 % hřebců produkuje ejakulát, který je možné mrazit bez výrazného snížení jeho kvality, a 20 – 50 % hřebců produkuje ejakulát, který naopak procesy mražení a rozmražení netoleruje. I naše výsledky prokázaly, že kinematické parametry motility spermií jsou u každého hřebce ovlivněny přídavkem proteinových frakcí semenné plazmy různým způsobem.

**Klíčová slova:** hřelec, motilita, semenná plazma, heparin-vázající proteinová frakce semenné plazmy, heparin-nevázající proteinová frakce semenné plazmy, spermie

# **Influence of specific seminal plasma proteins addition on motility of stallions spermatozoa**

## **Summary**

The goal of this thesis is to prove that addition of seminal plasma protein fractions to stallion spermatozoa before cryopreservation affects their motility after thawing. The focus of this thesis is on motility from the very beginning, that means from the sperm anatomy and physiology chapters.

The sperm used in the experiment had been collected by standard collection method from six stallions of different age and breed. Collected ejaculates were diluted with extender containing cryopreservation chemicals and every collected ejaculate was divided into seven experimental patches – one control, three with addition of heparin-binding seminal plasma protein fraction (HEP+) and three with addition of heparin-non-binding seminal plasma protein fraction (HEP-). Protein fractions were added in three concentrations – 125, 250 and 500 µg/ml. Prepared patches were filled into 0.5 ml polypropylene straws, freezed and stored in liquid nitrogen. After thawing (30 sec in 37 °C water bath) the batches were diluted to suitable sperm concentration and immediately assessed by CASA system.

The addition of protein fractions did not significantly affect neither total sperm motility nor progressive sperm motility, but individual kinematic parameters of sperm motility were affected not only by adding protein HEP+ or HEP- fraction but also by used concentrations. Our experiment proved that both seminal plasma protein fractions can positively affect kinematic parameters of spermatozoa when used in correct concentration. Overall results of comparison of both protein fractions and control group showed that the best values of kinematic parameters reached batches with addition of HEP- protein fraction. Spermatozoa in batches with addition of HEP+ protein fraction showed lower values in two parameters in comparison to HEP- batches, but even though the results were better than values of spermatozoa in control batches. In comparison to the control group, HEP+ protein fraction showed positive effects on sperm motility when concentrations 125 µg/ml and 500 µg/ml were added, while in 250 µg/ml concentration the kinematic parameters of sperm motility were lower than in control batches. HEP- protein fraction showed significant positive effects in 125 µg/ml concentration, while 500 µg/ml concentration showed similar results like control group, and 250 µg/ml concentration had negative effect on most of the kinematic parameters of sperm motility.

Our experiment also considered the individuality of the stallions, because the differences in sperm freezability are substantial. Studies Vidament et al. (1997) and Hoffmann et al. (2011) present as fact, that only 20 % of stallions are good freezers (their ejaculates are not negatively affected by freezing-thawing proceses) and 20 – 50 % of stallions are bad freezers (their ejaculates do not tolerate freezing-thawing proceses). Our results confirm that values of kinematic parameters of sperm motility varies greatly in response to addition of seminal plasma protein fractions among stallions.

**Keywords:** stallion, motility, seminal plasma, heparin-binding seminal plasma protein fraction, heparin-non-binding seminal plasma protein fraction, spermatozoa

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Anatomie a fyziologická funkce pohlavního traktu hřebce</b>	<b>12</b>
3.1.1	Reprodukční soustava hřebce	12
3.1.1.1	Přídavné pohlavní žlázy	13
3.1.2	Hormonální řízení spermatogeneze	13
3.1.3	Spermatogeneze a zrání spermií	15
3.1.4	Spermie	16
3.1.4.1	Mechanismus pohybu spermie	17
<b>3.2</b>	<b>Výroba kryokonzervované inseminační dávky</b>	<b>18</b>
3.2.1	Odběr ejakulátu	19
3.2.2	Kryokonzervace	19
<b>3.3</b>	<b>Kvalita ejakulátu po rozmražení</b>	<b>20</b>
3.3.1	Motilita	21
3.3.1.1	CASA systém – princip	21
3.3.2	Faktory ovlivňující motilitu	24
<b>3.4</b>	<b>Semenná plazma</b>	<b>24</b>
3.4.1	Komponenty semenné plazmy	25
3.4.1.1	Ionty a vitamíny	25
3.4.1.2	Proteiny	26
3.4.2	Heparin a jeho interakce s proteiny semenné plazmy hřebců	28
3.4.3	Vliv proteinů semenné plazmy na spermie	29
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Odběr ejakulátu</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Odběr a zpracování semenné plazmy</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Izolace proteinů semenné plazmy</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Příprava pokusných inseminačních dávek</b>	<b>33</b>
<b>4.5</b>	<b>Příprava rozmraženého vzorku na mikroskopické hodnocení</b>	<b>33</b>
<b>4.6</b>	<b>Hodnocení motility spermií pomocí systému CASA</b>	<b>34</b>
<b>4.7</b>	<b>Statistická analýza</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>47</b>



<b>8 Literatura .....</b>	<b>48</b>
<b>9 Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

S rychlým postupem dnešního vývoje šlechtění zvířat roste poptávka po semeni těch nejvýkonnějších hřebců. Jelikož přirozenou plemenitbou by nebylo možné naplnit rostoucí poptávku, roste zájem o inseminační dávky. I přesto, že z jednoho odebraného ejakulátu je většinou možné vytvořit větší počet inseminačních dávek, nemusí být jejich množství dostatečné. Proto je snaha odebírat plemeníky nejen během připouštěcího období, ale celoročně, takže je nutné inseminační dávky dlouhodobě uchovávat pomocí kryokonzervace. Nicméně pouze přibližně 20 % hřebců produkuje semeno, které dobře toleruje procesy mražení a rozmražení, aniž by kvalita rozmraženého ejakulátu výrazně poklesla, a zdaleka ne všichni výkonnostně žadaní hřebci patří do této skupiny s dobře mrazitelným ejakulátem. Proto se mnoho dnešních výzkumů věnuje látkám, které by mohly pomoci uchovat i ejakuláty hřebců se špatnou mrazitelností v dobré kvalitě. Mezi zkoumané látky, které by mohly vyřešit problém s mražením hřebčích spermií, patří i proteiny jejich semenné plazmy. Semenná plazma je sekret produkovaný přídatnými pohlavními žlázami, který po smísení se spermiemi při ejakulaci tvoří semeno. Mezi složky semenné plazmy patří cukry, vitamíny, minerály, aminokyseliny a proteiny. Většina proteinů semenné plazmy má schopnost se vázat na plazmatickou membránu spermií a tím ovlivňovat některé vlastnosti a schopnosti spermií, například odolnost vůči tepelnému stresu během kryokonzervace. Proteiny semenné plazmy lze rozdělit na dvě frakce - heparin-vázající a heparin-nevázající, podle jejich vztahu k heparinu. Heparin je látka produkovaná epitelem samičí pohlavní soustavy, jejíž funkcí je kromě jiných i indukce kapacity spermií, a tedy spuštění akrozomové reakce. Mnoho studií se již zabývalo vlivem proteinů semenné plazmy na motilitu či fertilitu spermií u různých druhů savců včetně býků, kanců a hřebců. Tato práce je zaměřena na přidávek heparin-vázající i heparin-nevázající frakce proteinů semenné plazmy ve třech koncentracích ke spermiím hřebců před jejich zamražením a sleduje, jak je ovlivněna motilita spermií po rozmražení.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce je ověřit hypotézu, že přídavek heparin vázající frakce semenné plazmy před kryokonzervací zlepší motilitu hřebčích spermií po rozmrazení.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Anatomie a fyziologická funkce pohlavního traktu hřebce

#### 3.1.1 Reprodukční soustava hřebce

Reprodukční soustava hřebce se skládá z páru varlat, nadvarlat a chámovodů, přídatných pohlavních žláz a penisu. Varlata a nadvarlata jsou uložena externě v šourku, což je velmi důležité pro korektní průběh spermatogeneze. Přídatné pohlavní žlázy se nacházejí v dutině pánevní (Amann 2011a).

Varlata jsou hlavními pohlavními žlázami samců, jejichž hlavní funkcí je produkce nezralých spermií a samčího pohlavního hormonu - testosteronu. Parenchym varlat je tvořen semenotvornými kanálky a vmezeřenou tkání, kde se nacházejí Leydigovy buňky sekretující testosteron. Epitel semenotvorných kanálků je tvořen zárodečnými buňkami, které jsou procesem metamorfózy přeměňovány na spermie, a Sertoliho buňkami, které koordinují dělení zárodečných buněk a diferenciaci budoucích spermií. Semenotvorné kanálky se sbíhají do kanálků *rete testis*, které vedou vytvořené nezralé spermie z varlete do nadvarlete (Amann 2011a).

Nadvarlata jsou místem, kde dozrávají nezralé spermie proudící z varlat. Nadvarle je anatomicky rozděleno do tří částí: hlava, tělo a ocas. Proximálně do hlavy nadvarlete vstupuje 13 – 15 kanálků vedoucích z *rete testis* (Amann et al. 1977; Hemeida et al. 1978), které se v hlavě nadvarlete spojují v jediný kanálek nadvarlete (Hemeida et al. 1978). Každá část nadvarlete má jinou funkci. Epitel proximální části kanálků hlavy nadvarlete resorbuje většinu tekutiny a látek v ní rozpuštěných, která přitéká z varlat spolu se spermiemi, a zároveň jiné látky sekretuje. Větší část hlavy a celé tělo nadvarlete jsou místem, kde probíhá maturace spermií, která vyžaduje specifické sekrety epitelu. V ocasu nadvarlete se skladují již zralé spermie (Amann 2011a).

Chámovod je trubice vedoucí spermie z ocasu nadvarlete do ampule chámovodu a následně pokračuje jako močová trubice ven z těla (Amann 2011a). Do močové trubice ústí vývody jednotlivých přídatných žláz, jejichž výměšky se přidávají k ejakulovaným spermiím a tvoří semennou plazmu (Amann 2011b).

Penis je samčí kopulační orgán. Je tvořen dvěma druhy topořivých těles; kavernózním, které je schopno naplnit se krví a umožnit tak erekci penisu, a houbovitým, které udržuje močovou trubici otevřenou a také tvoří žalud penisu, což je bohatě inervované a na tlak citlivé zakončení penisu (Amann 2011a).

### 3.1.1.1 Přídavné pohlavní žlázy

Přídavné pohlavní žlázy jsou párová ampule chámovodu, párové semenné váciky, nepárová prostata a párové bulbouretrální žlázy. Souborně všechny přídavné pohlavní žlázy tvoří většinu semenné plazmy ejakulátu. Thompson et al. (1979) uvádí, že normální funkce všech přídavných pohlavních žláz je závislá na dostupnosti testosteronu v periferním krevním oběhu. Spermie z ocasu nadvarlete a chámovodu jsou imobilní do té doby, než přijdou do kontaktu se sekrety přídavných pohlavních žláz (Amann 2011b).

Semenné váciky jsou podlouhlé duté kapsy v průměru 5 cm široké a 15 – 20 cm dlouhé ústící do močové trubice mezi močovým měchýřem a prostatou. Produkují želatinový sekret, jehož množství záleží na sezóně a individuálním hřebci. Největší množství semenné plazmy semenné váciky tvoří od dubna do července (Mann & Lutwak-Mann 1981). Tyto sezónní změny či rozdíly mezi jednotlivými hřebci v množství gelu v ejakulátu mohou být způsobeny rozdílnými koncentracemi testosteronu v krvi (Amann 2011b).

Prostata je pevná uzlíkovitá žláza, která je tvořena dvěma laloky spojenými tenkým krčkem, obklopující močovou trubici (Amann 2011a). Sekret prostaty je řídký, vodový a tvoří největší frakci ejakulátu, obzvláště pokud ejakulace následuje 1 – 3 hodiny po předchozí (Mann & Lutwak-Mann 1981). Pravděpodobná funkce je vyčištění močové trubice během ejakulace (Amann 2011b).

Bulbouretrální žlázy jsou velmi malé a nacházejí se laterálně na močové trubici kaudálně od prostaty poblíž pánevního dna. Produkují velmi malou frakci semenné plazmy (Amann 2011b).

### 3.1.2 Hormonální řízení spermatogeneze

Funkce reprodukčních orgánů je kontrolována z velké části neuroendokrinním systémem. Ten je tvořen specializovanými skupinami těl nervových buněk a endokrinní tkání, které produkují chemické sloučeniny, které nazýváme hormony (Roser 2011). Tyto hormony jsou z místa sekrece transportovány krevním oběhem do orgánu, jehož funkci mají ovlivňovat. V řízení funkce reprodukčního traktu má svou roli i autonomní nervová soustava, která řídí například pasivní transport nemotilních spermií nadvarlaty a chámovody, erekci, emisi a ejakulaci, ale neuroendokrinní soustava má v řízení reprodukční soustavy větší rozsah (Amann 2011b).

Hlavními žlázami, které sekretují hormony ovládající funkci reprodukčních orgánů, jsou hypothalamus, který produkuje gonadotropin-uvolňující hormon (GnRH), hypofýza produkující folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) a varlata, ve kterých se sekretuje testosteron, androgeny-vázící hormon (ABP), aktivin, inhibin a oxytocin. Celý mechanismus

hormonálního řízení funguje na základě zpětných vazeb, které mohou být pozitivní nebo negativní (Roser 2011).

### GnRH

Gonadotropin-releasing hormon, česky gonadotropin-uvolňující hormon pochází z hypotalamu, který přímo kontroluje reprodukční funkce organismu. GnRH je uvolňován v krátkých pulzech a je opět rychle z krve odstraňován, což stimuluje buňky v adenohipofýze, které sekretují gonadotropní hormony – LH a FSH (Roser 2011).

### FSH a LH

Oba tyto hormony jsou sekretovány adenohipofýzou a jejich produkce je řízena hormonem GnRH pozitivní zpětnou vazbou – tedy čím více GnRH je v krvi, tím více je podporována sekrece navazujících hormonů. FSH je navíc řízen ještě aktivinem a inhibinem. FSH není u hřebců nezbytně nutný k udržení spermatogeneze na rozdíl od jiných živočišných druhů, ale má svou funkci při zahájení spermatogeneze a také řídí sekreci ABP Sertoliho buňkami. Funkcí LH je kontrola produkce testosteronu. LH je uvolňován v pulzech, což znamená, že se periodicky zvyšuje koncentrace LH v krvi, která je vedena do varlat (Roser 2011).

### Testosteron

Testosteron je produkován Leydigovými buňkami, které se nacházejí v intersticiálním prostoru varlat, tedy mezi semenotvornými kanálky. Leydigovy buňky neustále produkují bazální množství testosteronu a několika dalších steroidních hormonů, nicméně periodicky jsou stimulovány hormonem LH ke zvýšení produkce. Přítomnost testosteronu ve varlatech je naprosto klíčová pro normální průběh spermatogeneze, je ovšem nezbytná i v hlavě a těle nadvarlete (Orgebin-Crist et al. 1975; Amann 1987; Robaire & Hermo 1988) pro sekreci proteinů buňkami epitelu (Amann 2011b). Také koncentrace testosteronu v periferní krvi je důležitá, protože řídí zpětnou negativní vazbou produkci GnRH. Pokud je koncentrace testosteronu v krvi relativně vysoká, je potlačena sekrece GnRH, čímž je potlačena sekrece LH, a tím pádem i testosteronu. Když koncentrace poklesne, je opět zahájena produkce GnRH a hladina testosteronu opět roste (Thompson et al. 1979; Irvine et al. 1986).

### ABP

Androgeny vážící protein je produkován Sertoliho buňkami a jeho funkcí je, jak název říká, vázat na sebe androgeny, například dihydrotestosteron a  $3\alpha$ -androstaneol (Amann 2011b) a transportovat je do různých částí reprodukčního traktu (Roser 2011).

### Inhibin a aktivin

Funkcí inhibinu a aktivinu je kontrolovat činnost adenohipofýzy a ovlivňovat produkci FSH, aniž by byla ovlivněna produkce LH, a tím pádem i produkce testosteronu. Aktivin stimuluje sekreci FSH a inhibin ji potlačuje (Roser 2011).

## Oxytocin

Oxytocin je produkován Leydigovými buňkami do intersticiální tekutiny a jeho funkcí je usnadnit rytmické kontrakce semenotvorných kanálků, čímž napomáhá transportu spermií (Knickerbocker et al. 1988).

### 3.1.3 Spermatogeneze a zrání spermií

Spermatogeneze je proces, při kterém z jedné kulaté diploidní buňky vznikají čtyři haploidní pohyblivé buňky s bičíkem, které jsou schopny po dozrání a průchodu samičím reprodukčním traktem oplodnit oocyt. Jako spermatogenezi označujeme dva hlavní děje, a sice buněčné dělení a transformaci spermatogonií na spermie. Celý tento proces se odehrává v semenotvorných kanálcích varlat, u hřebců trvá přibližně 57 dní (Amann et al. 1976; Amann 1981; Pickett et al. 1989; Johnson 1990) a je možné ho rozdělit na tři fáze – spermatocytogeneze, meioza a spermiogeneze (Amann 2011b).

Spermatocytogeneze trvá 19,4 dne a je charakterizována mitotickým dělením spermatogonií a jejich diferenciací na primární spermatocyty. Během této fáze se spermatogonie mitoticky dělí pro zachování svého počtu a zároveň pro produkci primárních spermatocytů. Fáze meiozy trvá také 19,4 dne, kdy na homologních chromozomech primárních spermatocytů dochází ke „crossing-overu“ (výměně části genetické informace na homologních chromozomech) a následně dochází k meiotickému dělení, kdy z diploidních buněk vznikají haploidní spermatidy. Poslední fází je spermiogeneze, která trvá 18,6 dne a je charakteristická diferenciací a funkční specializací, které přemění kulatou buňku na buňku s bičíkem (Amann 2011b). Fáze spermiogeneze má několik stádií. Během Golgiho stádia se vytváří váček obsahující enzymy, který se diferencuje v akrozom, a centrioly migrují k jádru, kde z distálního centriolu vzniká axonema. Během fáze čepičky se váček zploští a zformuje se do čepičky obalující jádro – akrozomu. Fáze prodlužování je fází, kdy se prodlužuje jádro a vzniká manžeta. Manžeta je organela specifická pouze pro spermatické buňky. Skládá se z mikrotubulů navzájem propojených dyneinovými raménky, které jsou obalené pochvou. Poslední fází je fáze dozrání, kdy manžeta migruje kaudálně po tvořeném bičíku budoucí spermie a mitochondrie se koncentricky řadí k sobě v oblasti střední části bičíku (Johnson et al. 2011). Na konci této fáze již plně vyvinuté buňky opouštějí lumen semenotvorných kanálků varlete a jsou nazývány spermie. Tyto spermie ještě nejsou schopné oplodnit oocyt, protože nejsou zralé. Proces zrání spermií probíhá v nadvarlatech, kam jsou spermie z varlat pasivně vyplavovány pomocí kontrakčních pohybů hladké svaloviny semenotvorných kanálků (Amann 2011b).

V každé funkční zóně nadvarlete je složení luminální tekutiny, která přichází do kontaktu s nezralými spermii, jiné a má během maturace spermií jinou funkci. Enzymy a proteiny obsažené v luminální tekutině modifikují plazmatickou membránu a další části spermií. Všechny tyto změny nakonec vedou k získání schopnosti oplodnit oocyt a progresivně se pohybovat vpřed, a také ke změnám v metabolismu spermií (Glover & Nicander 1971; Orgebin-Crist et al. 1975; Johnson et al. 1978; Cooper 1986; Lopez et al. 1987; Amann 1988; Robaire & Hermo 1988). Epitel kanálku nadvarlete produkuje proteiny, které postupně

interagují s membránou spermie a mění tím její složení. Nicméně pro správné a kompletní dozrání spermií je nutné, aby byly spermie posouvány mezi jednotlivými funkčními částmi kanálku nadvarlete v dostatečně pomalém tempu, při kterém mohou proběhnout všechny potřebné metabolické změny (Orgebin-Crist et al. 1975; Cooper 1986; Robaire & Hermo 1988).

Spermie, které jsou skladovány v ocasu nadvarlete, jsou již zralé, tedy schopné projít procesem kapacitace a oplodnit zralý oocyt. Nicméně dokud se nacházejí v nadvarleti, jsou udržované v chemické anabióze, což znamená, že nejsou aktivně pohyblivé (Amann 2011b). Johnson et al. (1978) sice uvádí, že část hřebčích spermií může být schopna se aktivně pohybovat už v distální části těla nadvarlete, přesto je však obecně uznávanější fakt, že se spermie začínají aktivně pohybovat až po kontaktu se semennou plazmou při ejakulaci (Varner & Johnson 2011).

Procesem zrání spermií při průchodu nadvarletem se zabývala studie Magistrini et al. (1987), která prokázala, že hřebčí spermie odebrané z hlavy nebo proximální části těla nadvarlete jsou po přidání do solného fyziologického roztoku nemotilní, zatímco procento motilních spermií odebraných z ocasu nadvarlete přidaných do puřovacího ředidla je podobné procentu motilních spermií ejakulátu daného hřebce. Takže pokud se progresivní motilita použije jako měřítko pro zrání spermií, dá se podle Magistrini et al. (1987) říci, že zrání spermií je dokončené už před jejich vstupem do ocasu nadvarlete. Johnson et al. (1978) potvrzuje, že hřebčí spermie opouštějící varle do kanálků nadvarlete se posouvají pomocí peristaltických kontrakcí okolních tkání, ale už v distální části těla nadvarlete získávají schopnost se samy aktivně pohybovat, musí tedy být udržovány v anabióze.

#### 3.1.4 Spermie

Spermii je možné rozdělit na dvě hlavní části - hlavičku a bičík. Hlavička je tvořena převážně akrozomem a koncentrovaným jádrem s haploidním počtem chromozomů, zatímco bičík se skládá z krčku, spojovací části, prstence, hlavní části bičíku a koncové části bičíku (Varner & Johnson 2011). Hlavní struktura, která je zodpovědná za pohyb spermie, se nazývá axonema. Axonema prochází bičíkem spermie a skládá se z centrálního páru mikrotubulů obklopeného vnějším prstencem devíti dubletů mikrotubulů, který je k centrálnímu páru připojen devíti radiálními paprsky. Vnější páry mikrotubulů jsou navzájem propojeny nexinovými spoji. Každý z vnějších dubletů má vnitřní a vnější dyneinové raménko. ATPáza přítomná v těchto dyneinových ramenech konvertuje chemickou energii na mechanický pohyb jednotlivých vnějších párů mikrotubulů každého zvlášť, což umožňuje ohýbání bičíku (Hodder & Liu 2011).

Další strukturální elementy napomáhající motilitě spermie jsou vnější denzní vlákna a fibrózní pochva. Denzní vlákna, pokrývající vnější prsteneček mikrotubulárních dubletů, poskytují bičíku strukturální oporu. Tato vlákna probíhají od krčku spermie přes spojovací oddíl až do větší části hlavního oddílu bičíku, kde končí. V distální části hlavního oddílu a v



koncovém oddílu bičíku se již nenacházejí. Fibrózní pochva pokrývá hlavní oddíl bičíku a poskytuje mu pevnou oporu. Také byly ve fibrózní pochvě objeveny proteiny, které se podílejí na signální kaskádě pohybu bičíku a metabolismu spermie (Turner et al. 1999).

Dyneinová raménka, nacházející se na vnějších dubletech mikrotubulů, potřebují pro generování pohybu bičíku zdroj energie. Tato energie je poskytována molekulami adenosintrifosfátu (ATP), které jsou tvořeny mitochondriemi aerobním dýcháním nebo anaerobní glykolýzou lokálně v hlavní části bičíku. Mitochondrie se ve spermii nacházejí pouze v mitochondriální vrstvě ve spojovací části bičíku spermie. Mitochondrie jsou zde uloženy helikálně, u hřebce typicky v padesáti otočkách kolem vnějšího prstence osových mikrotubulů (Amann & Graham 1993).

#### 3.1.4.1 Mechanismus pohybu spermie

Spermie se pohybují pomocí kmitavých pohybů ve vysoké frekvenci. Síla pro pohyb bičíku je vyvíjena posunováním vnějších dubletů mikrotubulů, které je řízené molekulárními motory – dyneiny. Aktivita dyneinů je regulována radiálními paprsky fosforylací proteinů, které vedou k ohnutí bičíku. Signální mechanismus modulace motility spermii zahrnuje několik signálních molekul, membránových receptorů a kanálů, které aktivují samotný pohyb bičíku spermie (Inaba 2003).

Jednou z důležitých signálních molekul ovlivňující motilitu spermii je cholesterol, protože ovlivňuje fluiditu membrány spermii. Další důležitou signální molekulou je oxid dusnatý (NO), který řídí produkci dalšího signálního posla, cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). cGMP aktivuje specifické typy transportního kanálu pro přenos iontu  $K^+$ , čímž je následně způsobena hyperpolarizace membrány. Membránová hyperpolarizace stimuluje několik napětím-řízených transportních kanálů nebo iontových přenašečů. Například přenašeče  $Na^+/H^+$ , který indukuje intracelulární alkalizaci - vytvoří prostředí, ve kterém se zvýší aktivita dyneinových enzymů. Signální molekuly cAMP regulují aktivitu některých kanálů  $Ca^{2+}$ . Zvýšení intracelulární koncentrace iontů  $Ca^{2+}$  aktivuje další signální molekuly a transportní kanály a způsobí změnu asymetrie pohybu bičíku. Množství molekul cGMP a cAMP je řízeno diesterázami systémem negativní zpětné vazby (Inaba 2003).

Hlavní roli v regulaci pohybu axonemy má fosforylace proteinů (Inaba 2003) tyrosinu (Hayashi et al. 1987; Visconti et al. 1995; Dey & Brokaw 1991; Si & Okuno 1999). Bylo zjištěno několik proteinů, které jsou fosforylovány pravděpodobně z důvodu aktivace motility spermii. Fosforylace tyrosinu je většinou regulována cAMP-dependentní proteinkinázou (Hayashi et al. 1987; Visconti et al. 1995). Fosforylace proteinů cAMP-dependentní kinázou a proteinovou tyrosin kinázou moduluje proteiny bičíku a tím aktivuje motilitu spermie.

Změny směru pohybu spermii jsou způsobené modulací oscilačních vln bičíku. Tento proces zahrnuje  $Ca^{2+}$ -dependentní změny ve flagelární asymetrii (Brokaw 1979). Ionty vápníku

cílí na systém radiálních paprsků připojujících vnější dublety k centrálnímu páru (Bannai et al. 2000; Smith 2002) pomocí vápník-vázajících proteinů jako je kalmodulin a několik kalmodulin-vázajících proteinů (Wasco et al. 1989; Ueno et al. 2003). Některé vápník-vázající proteiny jsou komponenty nebo přidružené proteiny vnějších dyneinových ramének, které také mohou být zapojeny v asymetrickém pohybu bičíku (Inaba 2003).

Mechanismus pohybu bičíku spermie zajišťují dyneinová raménka, která využívají energii z ATP k zachycení sousedního mikrotubulového dubletu vždy pouze na jedné straně prvního dubletu, čímž vytváří postupnou vlnu ohybu bičíku, která se šíří po celé jeho délce. Vždy po posunutí dubletů vůči sobě se raménko prvního dubletu odpojí, a raménko druhého dubletu se připojí na třetí dublet, vůči kterému posune druhým dubletem, a tak vlna postupuje dál. Jak vlna postupuje po celé délce bičíku, spermie je poháněna vpřed a hlavička rotuje kolem dlouhé osy směru pohybu (Mortimer 2000).

### **3.2 Výroba kryokonzervované inseminační dávky**

S postupným zlepšováním technologií asistované reprodukce roste poptávka po genetickém materiálu nejlepších plemenů. Pokrytí rostoucí poptávky vyžaduje využívání inseminačních dávek (ID), které umožní produkovat více hřebců na plemeno za rok (Panarace et al. 2014). Z jednoho ejakulátu je možné vytvořit poměrně vysoký počet ID, a zároveň je při inseminaci sníženo riziko přenosu infekčních nemocí mezi hřebci a klisnami. Další výhodou je možnost využít i plemeny z jiných států, nebo možnost uchovávat vyrobené ID po delší časové období (Miller 2008). Uchování ID je možné krátkodobě (Kayser et al. 1992) nebo dlouhodobě (Hernández et al. 2018). Při krátkodobém uchování je sperma chlazené na teploty vyšší než 0 °C, není tedy nutné přidávat kryoprotektiva, která jsou pro spermie toxická (Squires et al. 2004), avšak uchování oplození schopných spermií je možné pouze v rámci hodin až několika dnů, nicméně i přestože spermie nejsou vystaveny procesu mražení, jsou vystaveny poškozujícímu chladovému šoku (Watson 1981). Dlouhodobé uchování mražených ID je velmi efektivní, jelikož je možné odebírat hřebce po celý rok i mimo reprodukční sezónu (Pickett & Shiner 1994), nicméně kvalita rozmražených spermií je nižší než kvalita spermií nativního nebo chlazeného ejakulátu (Jasko et al. 1992). Vidament (2005) ve své studii prokázal, že pouze 30 - 35 % hřebců zařazených do programu kryokonzervace ID ve Francii produkovalo spermie, které po rozmražení vykazovaly uspokojivé hodnoty progresivní motility, a další autoři studií Tischner (1979), Vidament et al. (1997) a Loomis & Graham (2008) provedených v USA a v Evropě jeho výsledky potvrdili (30 – 50 % plemenů s uspokojivými výsledky kvality spermií po rozmražení). Obecně se odhaduje, že ejakulát produkový 20 % hřebců je dobře mrazitelný, 60 % hřebců produkuje ejakulát, který má po rozmražení přijatelnou kvalitu, a 20 % hřebců produkuje ejakulát, který procesy mražení a rozmražení netoleruje vůbec (Vidament et al. 1997).

### 3.2.1 Odběr ejakulátu

Ejakulát je možné odebírat několika způsoby, nicméně je i pár pravidel, která by se vždy měla dodržovat. Například asistující personál by měl být vyškolený a zručný v manipulaci s hřebci při odběru. Místo, kde odběr probírá, by mělo být prostorné, tedy bezpečné pro hřebce i pro personál, a podlaha by měla být pevná, porézní, dobře omyvatelná, nenáchylná k opotřebení a nesmí klouzat (Love 1992). Všechny pomůcky, které jsou k odběru použity, musí být nahřáty na 45 – 50 °C a použitý lubrikant a ostatní materiály nesmí být spermicidní (Šichtař et al. 2014).

Konkrétní techniky odběru a použité pomůcky, které mohou být použity samostatně nebo v kombinaci jsou odběr ze skoku na fantoma, za přítomnosti říjící klisny, s použitím moči říjící klisny, použití umělé vagíny a její typ. Umělá vagína může být uzavřená nebo otevřená. Pomocí uzavřeného typu je odebírán ejakulát celý, zatímco pomocí otevřeného typu je možné odebrat pouze žádanou frakci ejakulátu bohatou na spermie (Love 1992).

Ihned po samotném odběru je nutné co nejrychleji transportovat ejakulát do laboratoře, kde proběhne hodnocení kvality ejakulátu. Všechny pomůcky, které s ejakulátem přijdou do kontaktu, musí být nahřáty na 37 - 38 °C. Kvalita ejakulátu je určována pomocí měření objemu ejakulátu, koncentrace spermií, motility, přežitelnosti spermií (HOS test), procenta živých a mrtvých spermií, morfologie, případně bakteriologického a cytologického testu (Šichtař et al. 2014).

### 3.2.2 Kryokonzervace

Kryokonzervace semene plemeníků je velmi žádaná a důležitá metoda používaná v odvětví reprodukce koní, nicméně její využití je limitováno nízkou fertilitou některých plemeníků. Důvodem může být například osmotický stres, kterým spermie prochází po přidání kryoprotektantů před samotným mražením, protože používaný glycerol je pro spermie toxický (Fahy 1986; Hammerstedt & Graham 1992). Dalšími důvody mohou být chladový šok, který způsobí nevratné poškození spermií, které je charakteristické abnormálním pohybem, rapidním snížením motility, poškozením akrozomu a plazmatické membrány, či sníženým metabolismem (Quinn 1989; Samper et al. 1991).

Samotná kryokonzervace následuje po laboratorním vyhodnocení kvality nativního ejakulátu a pokračuje se pouze s těmi, jejichž parametry jsou alespoň dostačující, protože mražení a následné rozmražení kvalitu významně snižuje (Graham 1996). Prvním krokem po vyhodnocení kvality je centrifugace, kdy se odstraní většina semenné plazmy. Následně se spermie naředí do požadované koncentrace vhodným ředidlem, které obsahuje cukry, soli, kryoprotektanty, lipidy (vaječného žloutku nebo mléčné), proteiny a antibiotika. Takto připravený ejakulát je naplněn do polypropylenových pejet většinou o objemu 0,5 ml, které jsou označeny identifikačními údaji. Poté jsou hotové pejety buď manuálně stabilizovány ve 4 - 7

°C, poté přesunuty nad páry tekutého dusíku a nakonec ponořeny do - 196 °C (Šichtař et al. 2014), nebo je možné využít automatických přístrojů, které pejety postupně zchlazují až zamrazují podle zvoleného protokolu (Wu et al. 2015).

Pro rozmražení ID je nutné pejetu vytáhnout z tekutého dusíku pomocí pinzety nebo peřanu a ihned celou ponořit do vodní lázně o teplotě 37 °C, aby se zabránilo pomalému rozmrazování. Po 30 sekundách je pejeta z lázně vytažena, důkladně osušena, protože voda je spermicidní, zatavený konec pejety se odstříhne a ID se vypustí buď do zkumavky, pokud je určena k testování, nebo do „inseminační zbraně“, pokud je určena k inseminaci (Šichtař 2014).

## Ředidla

Ředidla spermatu používaná při mražení ejakulátu obsahují energeticky bohaté sloučeniny, proteiny, lipidy, lipoproteiny, antibiotika, pufrovací a kryoprotektivní látky (Loomis 2011). Cukry a soli jsou rozpuštěny v médiu ve vysokých koncentracích a mají více důležitých funkcí. Cukry samozřejmě fungují jako zdroje energie pro metabolismus spermií před mražením a po rozmražení, ale během samotného procesu mražení slouží i jako membránou nepronikající kryoprotektiva membrány spermií, látky udržující osmotickou rovnováhu a také zabraňují vytváření ledových krystalů, které mohou poškodit membránu spermií a tím buňky poškodit. Konkrétně se využívají cukry glukóza, sacharóza, laktóza a manóza, buď samostatně, nebo v kombinaci více různých sacharidů (Loomis 2011). Lipoproteiny a lipidy jsou důležitou součástí ředidel z důvodu stabilizace membrány při tepelných změnách, jde tedy opět o kryoprotektanty nepronikající membránou. Nejčastěji využívané zdroje lipoproteinů jsou mléko (například EDTA) a vaječný žloutek (například komerční ředidlo Gent (Minitube, Německo)). Ve studii Neuhauser et al. (2013) bylo zjištěno, že ředění spermatu ředidly na bázi odtučněného mléka nebo vaječného žloutku zlepšilo nebo alespoň udrželo motilitu spermií odebraných z různých částí nadvarlete hřebců. Antibiotika mají zabránit bakteriálnímu růstu v semeni, a tedy i přenosu nemocí či vzniku zánětu dělohy (Pickett & Amann 1987). Do ředidel používaných pro ředění hřebčího spermatu se používá hlavně gentamycin sulfát a polymycin β sulfát (Squires et al. 1981). Kryoprotektiva pronikající membránou (například glycerol) mají pomáhat stabilizaci membrány spermie během mražení a rozmražení tím, že zabrání vytváření ledových krystalů uvnitř buněk. Nicméně pokud kryoprotektanty nejsou použity správným způsobem nebo se použijí ve špatné koncentraci, mohou negativně ovlivnit motilitu spermií, případně i jejich oplozovací schopnost (Hodder & Liu 2011).

### 3.3 Kvalita ejakulátu po rozmražení

Proces zamražení i rozmražení je pro spermie velmi destruktivní, proto je vhodné minimálně na začátku sezóny provést testy mrazitelnosti semene plemeníků, kteří mají být

zařazení do skupiny pro kryokonzervaci ID (Šichtař et al. 2014). Mezi testy určující kvalitu spermatu po rozmražení patří například viabilita spermií, potenciál mitochondriální membrány, integrita plazmatické membrány a membrány akrozomu, celková motilita a progresivní motilita (Wu et al. 2015).

### 3.3.1 Motilita

Z možných parametrů, které se používají k hodnocení hřebčího spermatu, se motilita spermií považuje za jednu z nejdůležitějších, neboť se dá obecně považovat za odraz viability spermií v daném vzorku (Varner et al. 1991). Spermie, které se hýbou málo nebo se nehýbou vůbec, jsou v případě, kdy se nepoužívá asistované reprodukční metody, považovány za neschopné oplození vajíčka (Turner 2003). Podle Voss et al. (1981) může být plodnost individuálního hřebce neuspokojivá i přesto, že motilita spermií je v pořádku, a proto by samotná motilita nikdy neměla být používána k odhadu plodnosti hřebce (Varner et al. 1993), neboť spermie potřebuje k úspěšnému oplodnění oocyty více vlastností.

Aktivovaná motilita je fyziologická a typická symetrickým pohybem bičíku spermie s nízkou amplitudou, jehož výsledkem je relativně přímočarý pohyb spermie. Tento druh pohybu je možné vidět u právě ejakulovaných spermií a je považován za nezbytný pro pohyb spermií k vejcovodu a následně vejcovodem k oocyty. Aktivovaná motilita je velmi důležitá pro optimální fertilitu, jelikož imobilní spermie nejsou schopné se dostat k uterotubálnímu spoji (Turner 2005).

#### 3.3.1.1 CASA systém – princip

Systém CASA (Computer-assisted sperm analysis) byl vyvinut pro objektivní hodnocení spermií. CASA analyzuje trasy velkého počtu spermií, ze kterých následně stanoví kinematické parametry (tabulka 1 a obrázek 1).

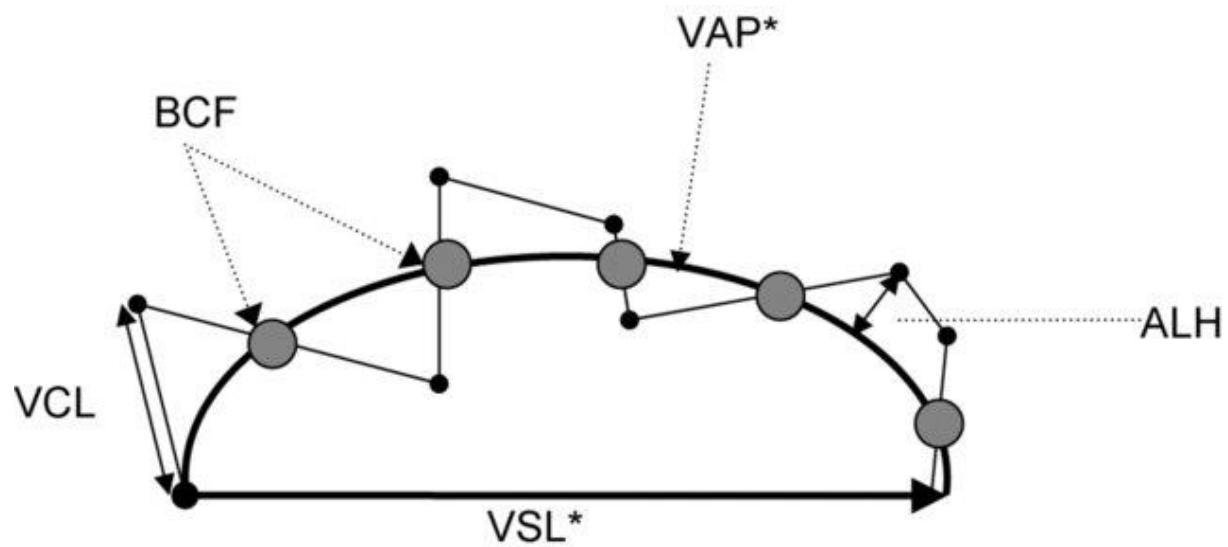
Systém CASA se skládá z kamery, počítače a stříhové karty. Počítačový software identifikuje a sleduje všechny spermie na snímcích videa a poté získaná data vyhodnotí. Snímek pole pod mikroskopem je poslán z kamery do počítače a převeden do digitálního snímku. Nejjednodušší možností zobrazení spermií pro zachycení systémem počítače je použití temného pole nebo negativního fázového kontrastu, kde se hlavičky spermií zobrazují bíle na černém pozadí. Světlost hlavičky na snímku zůstává stejně konzistentní i během pohybu spermie, protože rotace hlavičky nemění intenzitu bílé na snímku. Obraz každé spermie je pak digitalizován. Následně počítač stanoví počet pixelů, které hlavička pokrývá. Je jasné určené rozmezí počtu pixelů, které je akceptovatelné pro hlavičku spermie s předpokladem, že se počítá s minimální a maximální velikostí spermií jednotlivých živočišných druhů. Počítač následně rozeznává objekty, které odpovídají velikosti a tvaru hlavičky spermie (Mortimer 2000).

Tabulka 1. Parametry, pomocí kterých CASA hodnotí motilitu spermií.

VAP	<ul style="list-style-type: none"> <li>- average-path velocity</li> <li>- rychlost hlavičky po napřímené dráze → vyjádření pohybu po průměrné křivce</li> </ul>
VCL	<ul style="list-style-type: none"> <li>- curvilinear velocity</li> <li>- rychlost hlavičky na skutečné dráze → průměr mezi dvěma body měření</li> </ul>
VSL	<ul style="list-style-type: none"> <li>- straight-line velocity</li> <li>- rychlost hlavičky na přímé dráze od počátečního bodu k poslednímu</li> </ul>
ALH	<ul style="list-style-type: none"> <li>- amplitude of lateral head displacemant</li> <li>- odvozením od VCL a VAP se změří maximální možná oscilace hlavičky spermie → odraz pohybu bičíku.</li> </ul>
BCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- beat cross frequency</li> <li>- kolikrát skutečná dráha spermie překříží napřímenou dráhou [Hz]</li> </ul>
STR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- straightness</li> <li>- přímost napřímené dráhy</li> <li>- <math>VSL / VAP \times 100</math> [%]</li> </ul>
LIN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- linearity</li> <li>- linearita skutečné dráhy</li> <li>- <math>VSL / VCL \times 100</math> [%]</li> </ul>
WOB	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wobble</li> <li>- stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřímené dráhy</li> <li>- <math>VAP / VCL \times 100</math> [%]</li> </ul>

(Věžník 2004)

Obrázek 1. Znázornění jednotlivých kinematických parametrů



Calculated parameters:  
 $LIN^* = VSL^*/VCL \times 100$   
 $STR = VSL^*/VAP^* \times 100$

(Sloter et al. 2006)

### 3.3.2 Faktory ovlivňující motilitu

Bylo popsáno několik skupin faktorů, které mohou mít na motilitu spermií hřebců velký vliv. Tyto faktory mohou být fyziologické, patologické a také se sem řadí chyby v managementu hřebce, včetně špatného odběru či zpracování ejakulátu. Mezi fyziologické faktory patří například příliš nízký nebo vysoký věk pleménika (Card 2005), dlouhé období sexuálního klidu a roční období, ve kterém se hřelec odebírá (Magistrini et al. 1987). Patologické faktory zahrnují zranění varlat, edémy, záněty a také zvýšenou teplotu celého organismu, tedy horečku. Zvýšená teplota varlat neumožňuje správný průběh spermatogeneze a vyprodukované spermie mohou mít nejen sníženou motilitu, ale také mohou být nezralé nebo morfologicky defektní. Také degenerace varleční tkáně související s narůstajícím věkem je řazena k patologiím. Mezi faktory ovlivňující motilitu spermií, které lze způsobit špatným managementem, patří nesprávně složená krmná dávka, hormonální léčba hřebce, použití spermicidního lubrikantu při odběru semene nebo nevhodné ředidlo spermatu (Hodder & Liu 2011). Nové techniky hodnocení kvality spermatu umožňují navíc hodnotit interakce spermií s okolními tekutinami - semennou plazmou, hlenem v samičím reprodukčním traktu nebo kultivačním činidlem při *in vitro* oplození (Rodriguez-Martinez & Vega 2013). Kareskoski et al. (2006) ve své studii prokázali, že přídavek malého množství semenné plazmy ke spermiím před mražením měl pozitivní účinky na motilitu a přežití spermií po rozmražení.

## 3.4 Semenná plazma

Semenná plazma (SP) je tekutá frakce ejakulátu, která má důležitou roli v procesech zrání spermií, kapacitace a interakce spermie s oocytem. Tato tekutina je komplexní směs látek, které jsou sekretovány hlavně v nadvarlatech a přídatných pohlavních žlázách a slouží jako přepravní médium ejakulovaných spermií do samičího pohlavního traktu. Navíc má SP mnoho efektů na funkci spermií i na celé pohlavní ústrojí samice – modulace odpovědi imunitního systému (Assreuy et al. 2002; Alghamdi et al. 2004), ovlivnění transportu spermií a u prasnic může za jistých podmínek ovlivnit ovulaci (Waberski et al. 1995). Studie Töpfer-Petersen (1999) tvrdí, že kombinace účinků komponent SP podporuje přežití spermií v samičím pohlavním traktu a zaručuje, že se funkčně kompetentní spermie dostanou k ovulovanému vajíčku do místa fertilizace včas.

SP obsahuje proteiny a nebílkovinné substance, jako jsou například ionty a organické sloučeniny nízké molekulární hmotnosti, mezi které patří třeba volné aminokyseliny, monosacharidy, lipidy, polyaminy, prostaglandiny a steroidní hormony. Všechny tyto komponenty SP mají důležitou roli během fyziologických procesů, kterými spermie prochází (Töpfer-Petersen et al. 2005).



### 3.4.1 Komponenty semenné plazmy

#### 3.4.1.1 Ionty a vitamíny

Ionty a jejich koncentrace mají v SP nezastupitelné místo (Pesh et al. 2006). Zinek kupříkladu má kriticky důležitou roli při spermatogenezi a vyskytuje se v semeni savců ve vysokých koncentracích (Shquirat et al. 2014). Měď je velmi důležitá pro syntézu mnoha metaloenzymů a metaloproteinů, které se účastní energetického metabolismu a také metabolismu antioxidantů. Nicméně pokud se měď nachází ve formě iontu  $\text{Cu}^{2+}$  a ve vysoké koncentraci, může se tento stopový prvek velmi rychle stát toxickým pro mnohé buňky (Usuga et al. 2017)

Juyena & Stelletta (2012) uvádí, že funkce spermií je na koncentraci iontů velmi závislá. Usuga et al. (2017) zjistili, že při vysoké koncentraci mědi v SP měly hřebčí spermie lepší hodnoty celkové motility, progresivní motility, kinematických parametrů VCL a ALH a nižší počet spermií s abnormální morfologií. Naopak nízká koncentrace mědi zapříčinila nejnižší hodnoty celkové motility, progresivní motility, vitality spermií a integrity plazmatické membrány spermií. Ve stejné studii byla také prokázána pozitivní korelace mezi koncentrací hořčíku a hodnotami celkové motility, progresivní motility, kinematickými parametry rychlosti spermie a vitality spermií, zatímco korelace mezi hořčíkem a abnormální morfologií spermií byla stejně jako u mědi negativní. Důvodem pozitivní korelace hořčíku s hodnotami kvality spermatu hřebců může být fakt, že hořčík je součástí téměř všech enzymatických systémů, a je považován za ukazatel sekrece semenných váčků. Zinek může ovlivňovat motilitu tím, že potlačí využití energie přes systém ATP a přes regulaci rezerv energie fosfolipidů (Juyena & Stelletta 2012).

Železo se většinou vyskytuje vázané v transferrinu, který je produkován Sertoliho buňkami; v haptoglobinu, který produkují Sertoliho, Leydigovy a zárodečné buňky; a v laktoferrinu, který produkují spermie a semenné váčky. Jmenované proteiny obsahují katalyticky inaktivní železo kvůli zamezení extenzivní oxidace (Pesh et al. 2006). Výsledky studií, které se zabývaly přidavkem železa, jsou méně jednoznačné než výsledky experimentů s přidavkem hořčíku. Usuga et al. (2017) zjistili negativní korelaci mezi koncentrací železa v ejakulátu a celkovou motilitou, vitalitou spermií, abnormální morfologií a integritou plazmatické membrány. Nízká koncentrace železa v ejakulátu byla v pozitivní korelaci s výsledky vitality spermií a integrity membrány, zatímco vysoká koncentrace pozitivně korelovala s výsledky celkové a progresivní motility.

Další skupinou látek obsaženou v SP jsou vitamíny. Některé vitamíny tvoří důležitý ochranný systém proti poškození spermií oxidačním stresem (Almeida & Ball 2005). Koncentrace některých vitamínů obsažených v SP je závislá na jejich příjmu organismem z vnějšího prostředí, například konzumací (Williams & Carlucci 2006). Nicméně například

vitamín C měl při vysokém množství v SP škodlivý efekt na vitalitu spermií a normální morfologii spermií v čerstvém spermatu. Podobně při nízké koncentraci vitamínu A měly hodnoty vitality spermií a integrity plazmatické membrány lepší výsledky. Toto může být vysvětleno faktem, že některé antioxidanty vyskytující se v SP se mohou stát prooxidanty (Carocho & Ferreira 2013), nicméně tato jejich možná funkce je podmíněna koncentrací a charakterem sousedních molekul (Villanueva & Kross 2012).

Usuga et al. (2017) zjistili, že vysoké koncentrace vitamínu E, mědi, železa a zinku zlepšily integritu plazmatické membrány spermií a vitalitu spermií v čerstvém ejakulátu. Tento efekt může být vysvětlen skutečností, že tyto mikroelementy SP jsou součástí antioxidantního systému hřebců, který je schopný neutralizovat nebo odstranit některé formy reaktivního kyslíku (ROS) (Waheed et al. 2013). DL- $\alpha$ -tokoferol (vitamín E) je nejen důležitou součástí obranného systému proti buněčnému poškození oxidativním stresem, ale i lipofilní komponentou, která nejen odstraňuje radikály kyslíku z membrány, ale také zachycuje lipidové peroxylové radikály, které zřejmě mají důležitou roli v šíření řetězové reakce lipidové peroxidace. (Almeida & Ball 2005; Carocho & Ferreira 2013)

Podle studie provedené autory Usuga et al. (2017) dosahovaly všechny hodnocené kinematické parametry motility rozmražených spermií kromě hodnot ALH a BCF nejlepších hodnot při nízké koncentraci vitamínu C v SP. Takže autoři došli ke stejnému závěru jako ve studii Waheed et al. (2013), která potvrdila negativní účinek vysoké koncentrace vitamínu C na kvalitu rozmražených spermií. V jiné studii (Vasconcelos et al. 2013) bylo zjištěno, že suplementace vysokými koncentracemi kyseliny askorbové (vitamín C) přidáním do ID má negativní efekt i na peroxidaci lipidů plazmatické membrány mražených hřebčích spermií. To může být způsobeno přítomností přechodných kovů, které vitamín C mění na vysoce reaktivní radikály, které řetězem destrukcí okolních molekul a atomů vytváří ještě více volných radikálů. Navíc má kyselina askorbová schopnost zvyšovat uvolňování těchto přechodných kovů z proteinů, čímž opět podporuje nežádoucí tvorbu volných radikálů.

#### 3.4.1.2 Proteiny

Proteiny patří mezi nejdůležitější komponenty SP. Tyto proteiny se navazují na membránu spermií (Katila & Kareskoski 2006), čímž mohou ovlivňovat přežití spermií při kryokonzervaci a následném rozmražení, a také bránit kapacitním změnám, ke kterým může během těchto procesů docházet (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Proteiny SP jsou sekretované hlavně v nadvarlatelych a přídatných pohlavních žlázách. Účastní se remodelace povrchu spermií, kterou spermie prochází během metamorfózy při průchodu samčím pohlavním traktem a následně i později během ejakulace. Během tohoto procesu, který se nazývá post-testikulární maturace spermií, získávají spermie schopnost oplodnit oocyt. Proteiny SP přispívají k počátečním a centrálním krokům fertilizace: vznik

rezervoáru spermií ve vejcovodu, modulace kapacity a interakce gamet (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Skupina proteinů, které je možné identifikovat v SP, je velmi různorodá. Je možné najít hormony, enzymy, inhibitory proteináz, růstové faktory proteinů a glykoproteinů, u kterých stále není jasné, jakou mají funkci (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Obsah proteinů v SP hřebců je relativně nízký, 10 mg/ml, na rozdíl od jiných savců, u kterých se obsah proteinů pohybuje mezi 20 – 60 mg/ml (Töpfer-Petersen et al. 2005). Autoři von Fellenberg et al. (1985) zjistili, že semenné proteiny hřebců (přibližně 70 %) inklinují ke tvorbě multiproteinových agregátů o molekulové hmotnosti kolem 800 kDa, které jsou tvořeny proteiny o hmotnosti 11 – 30 kDa.

Proteiny obsažené v hřebčí SP jsou označovány jako HSP (horse seminal plasma proteins) 1 – 8. Tyto proteiny, které izolovali a popsali Calvete et al. (1994), mají nízkou molekulovou hmotnost 14 – 30 kDa a tvoří většinu celkového množství proteinů v SP. Většina izolovaných hřebčích semenných proteinů, konkrétně HSP-1, HSP-2, HSP-3, HSP-5, HSP-6, HSP-7 a HSP-8, podobně jako u býků a kanců byla objevena na povrchu spermií, což indikuje potenciální roli při oplodnění. Tyto proteiny, kromě HSP-4, který je podobný kalcitoninu, tedy mají vlastnost vázat se na spermie a mohou být izolovány z ejakulovaných „umytých“ spermií (Töpfer-Petersen et al. 2005). Mungan et al. (2001) uvádí, že v myši a mužské SP pozitivně korelovalo množství kalcitoninu s motilitou spermií. Fraser et al. (2005) uvádí, že HSP-4 je preventivním opatřením proti „over-capacitation = překapacitování“ spermií a spontánní akrozomové reakci tím, že kapacitaci reguluje pomocí systému adenylátcykláza / cAMP.

Proteiny SP kopytnatců se dělí na tři rodiny, které obsahují často se vyskytující proteinové moduly. Tyto rodiny se nazývají Fn-2, CRISP a spermadheziny, přičemž u většiny druhů, kromě hřebců, jsou v SP nejvíce zastoupeny proteiny rodin Fn-2 a spermadhesiny. Hřebci mají pouze jeden protein řazený mezi spermadhesiny a většina jejich proteinů jsou tedy Fn-2 a CRISP proteiny (Kelly et al. 2006; Calvete & Sanz 2007)

Proteiny Fn-2 typu jsou charakterizovány dvěma nebo čtyřmi Fn-2 fibronektinovými doménami typu II tandemově spojenými za sebou a jsou v celkovém množství proteinů nejvíce zastoupeny. Proteiny Fn-2 se podílejí na modulaci kapacity spermií a patří mezi ně HSP-1 a HSP-2. Proteiny typu Fn-2 jsou tvořeny v různých částech samčího traktu (Töpfer-Petersen et al. 2005), což dokazuje například fakt, že protein EQ-12 je produkován v těle a ocasu nadvarlete, zatímco malé proteiny HSP-1 a HSP-2 se syntetizují převážně v ampuli chámovodu (Saalman et al. 2001; Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005a). Nejvýraznější vlastností proteinů SP Fn-2 typu je jejich schopnost specificky interagovat s fosforylcholinem (druhem fosfolipidů buněčné membrány spermie) a schopnost vázat heparin, což je jeden z glykosaminoglykanů, které se nacházejí v samičím reprodukčním traktu a mají schopnost indukovat kapacitaci spermií (Varner et al. 1993). Proteiny Fn-2 typu se na membránu spermií navazují až v oblasti těla nadvarlete a distálnějších částech samčího pohlavního traktu. Navazují se na membránu v

post-akrozomální části a střední části bičíku pevnou vazbou a na membránách ejakulovaných spermií jsou vždy přítomné (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Dalším typem proteinů jsou CRISP proteiny, které jsou bohaté na cystein. CRISP proteiny se účastní procesů fúze spermie s oocytem a blokády průchodu iontů přes membránu (Töpfer-Petersen et al. 2005). Patří sem proteiny CRISP-1 – CRISP-4 a HSP-3, který se může nazývat i CRISP-3. Protein CRISP-1 se syntetizuje pouze v nadvarlatech, zatímco CRISP-2 se syntetizuje nejen v nadvarlatech, ale také ve varlatech a semenných váčcích (Giese et al. 2002a,b). Podle studie Schambony et al. (1998a) je hřebec jako živočišný druh unikátní v tom, že jedním z nejvíce zastoupených proteinů jeho SP je protein CRISP-3, který je syntetizován v ampuli chámovodu a také ve slinných žlázách. Protein CRISP-4 byl objeven ve varletních kanálcích myši (Jalkanen et al. 2005). CRISP proteiny jsou lokalizovány na ekvatoriální a post-akrozomální části spermie a střední části bičíku, a na membránu spermie se váží už v těle nadvarlete (Schambony et al. 1998b). Proteiny rodiny CRISP nejsou na membránu vázány pevně, takže k jejich umytí stačí roztok s vysokou koncentrací soli, i když určité množství proteinů vždy na membráně zůstane navázáno. Bylo prokázáno, že množství CRISP proteinů, které na membráně spermií zůstává i po umytí přímo koreluje s fertilitou individuálních hřebců (Reineke et al. 1999). Různé profily exprese genů pro CRISP proteiny u hřebců s různou fertilitou mohou poskytnout porozumění pro nezbytnost obsahu těchto proteinů v ejakulátech hřebců pro úspěšnou reprodukci koní. Jako příklad pravdivosti tohoto tvrzení může být fakt, že u kryptorchidů vůbec neprobíhá exprese genů pro protein CRISP-2 ve varlatech ani v nadvarlatech (Reineke & Töpfer-Petersen, unpublished).

Proteiny, které se řadí mezi spermadheziny se objevují pouze v semenné plazmě kopytnatců, tedy býků, kanců a hřebců. U hřebců byl objeven pouze jediný protein, který je řazen do skupiny spermadhezínů, protein HSP-7 (Töpfer-Petersen et al. 2005). Tento protein je schopný vázat karbohydráty a také intaktní zonu pellucidu. Možnou funkcí tohoto proteinu by tedy mohlo být napomáhání při rozpoznání gamet (Reinert et al. 1996). Narozdíl od jiných proteinů SP i od spermadhezínů jiných živočišných druhů je u hřebců možné detekovat HSP-7 už na membránách spermatogonií, dále ve spermiích odebraných z *rete testis* a kanálku nadvarlete, a také v sekretu semenných váčků (Reinert et al. 1997; Hoshiba & Sinowatz 1998). Místem navázání HSP-7 na membránu spermií je ekvatoriální segment.

Všechny proteiny HSP patří mezi heparin-vázající proteiny (Töpfer-Petersen et al. 2005) kromě jediného z nich, a tím je HSP-3 (Magdaleno et al. 1997). HSP-3 nebo také CRISP-3 byl identifikován jako jeden z proteinů, který je v pozitivní korelaci s fertilitou hřebců (Schambony et al. 1998a).

#### 3.4.2 Heparin a jeho interakce s proteiny semenné plazmy hřebců

Heparin sulfát patří mezi glykosaminoglykany, které jsou sekretovány epitelem samičí reprodukční soustavy hlavně během folikulární fáze estrálního cyklu (Kumar et al. 2013). U

některých savců je známo, že funkcí glykosaminoglykanů (GAG) je spuštění kapacitace spermií (Varner et al. 1993) a že efekt GAG je zprostředkován heparin-vázajícími proteiny SP, které obalují membránu ejakulovaných spermií (Miller et al. 1990). Tyto poznatky vedly k přesvědčení, že v SP jsou faktory, které regulují stav spermií pozitivně i negativně. Negativní faktory mohou například maskovat místa vazby na zoně pellucidě, nebo mohou stabilizovat membránu spermií, což zabrání předčasné akrozomové reakci. Postupné uvolňování negativních faktorů během kapacitace spermií dovoluje expresi endogenních nebo vnějších faktorů, které na interakci gamet a zonou pellucidou-indukovanou akrozomovou reakci působí pozitivně (Florman & First 1988).

U hřebců, kanců a býků je možné izolovat většinu proteinů SP díky jejich vlastnosti vázat se na heparin. U mnoha druhů savců včetně býků (Miller et al. 1990) a hřebců (Varner et al. 1993) se heparin váže na ejakulované spermie a moduluje proces kapacitace, čímž zvyšuje schopnost spermií podstoupit akrozomovou reakci vyvolanou zonou pellucidou (Florman & Babcock 1991). I přestože faktory ovlivňující schopnost hřebčích spermií projít akrozomovou reakcí stále nebyly identifikovány, dá se podle autorů Manjunath & Therien (2002) předpokládat, že specifický efekt heparinu na spermie může být *in vivo* zprostředkován pomocí heparin-vázajících proteinů SP. Nicméně složení proteinů SP a fyziologický efekt heparinu na spermie se liší mezi jednotlivými živočišnými druhy (Calvete et al. 1995a). U hřebců je vliv heparinu na kapacitaci spermií mírný. Kančí spermie pro *in vitro* kapacitaci heparin nepotřebují vůbec (Calvete et al. 1995a; Calvete et al. 1995b). U býků bylo zdokumentováno, že navázání heparinu na membránu spermií, má při *in vitro* kapacitaci významný vliv (Therien et al. 1995; Calvete et al. 1995a; Calvete et al. 1995b).

V hřebčím ejakulátu jsou v nejvyšší koncentraci proteiny HSP-1 a HSP-2 – tvoří 70 – 80 % obsahu všech proteinů (Töpfer-Petersen et al. 2005). Podle výsledků studie Calvete et al. (1997) proteiny HSP-1 a HSP-2 tvoří agregát, který je následně schopný vázat heparin a fosforylcholin, přičemž fosforylcholin vytvořený proteinový agregát opět štěpí na původní samostatné proteiny, které heparin nevážou. Jiná studie (Calvete et al. 1995c) tvrdí, že oba proteiny HSP-1 a HSP-2 mohou být, na rozdíl od ostatních proteinů, heparin-vázající i heparin-nevážající i v monomerním stavu, záleží na tom, v jaké glykoformě je protein uspořádán. Ostatní proteiny, jak již bylo zmíněno výše, jsou rozděleny jasně. Tedy HSP-4 – HSP-8 jsou heparin-vázající, zatímco HSP-3 je heparin-nevážající (Magdaleno et al. 1997).

### 3.4.3 Vliv proteinů semenné plazmy na spermie

Mnoho studií se zabývá účinkem proteinů semenné plazmy u savců, hlavně u býků a kanců, kvůli možnému snížení nevratného poškození spermií během procesů mražení a rozmražení ejakulátu, a tedy pozitivnímu ovlivnění motility a fertility samčích gamet. Bylo zjištěno, že heparin-vázající (HEP+) proteiny působí pozitivně na kapacitaci spermií,

akrozomovou reakci a alternaci odpovědi imunitního systému samice na přítomnost spermií v reprodukčním traktu (Patel et al. 2016). HEP+ proteiny, navázané na membránu spermie býků, v prostředí samičího traktu naváží heparin, a následně zvýší schopnost spermie projít procesem akrozomové reakce (Ax et al. 2002). Navázání proteinů izolovaných ze SP může snížit poškozující dopad chladového šoku na plazmatickou membránu býčích spermií (Barrios et al. 2000). Studie Shi et al. (1998) potvrzuje, že HEP+ proteiny chrání spermie před tepelným stresem během kryokonzervace a pomáhají udržet intracelulární homeostázu spermií mužů. Studie Kumar et al. (2008) prokázala, že HEP+ proteiny chrání spermie před peroxidací lipidů během kryokonzervace. Bylo také potvrzeno, že přídavek určitých proteinů SP býků (rFAA a rTIMP-2) ke spermiím před mražením pomohl stabilizovat membránu akrozomu a tím snížil jeho poškození po rozmražení (Alvarez-Gallardo et al. 2013). Naopak u kanců bylo v nativním ejakulátu prokázáno, že HEP+ proteiny SP neměly žádný pozitivní efekt na přežitelnost spermií, zatímco HEP- proteiny – konkrétně PSP-1 a PSP-2 heterodimer – měly pozitivní účinky na přežitelnost, stav akrozomu, motilitu a mitochondriální aktivitu (García et al. 2006; Caballero et al. 2008).

HEP+ proteiny jsou na membráně epididymálních spermií býků navázané vzácně, ale na ejakulovaných spermiích je jich již navázáno velké množství (Miller et al. 1990). U samců skotu navázání proteinů SP na membránu spermií zvyšuje počet míst, kam se může vázat heparin. Navazování proteinů na membránu probíhá 20 – 30 min po smíchání spermií se SP a ejakulaci. Bovinní proteiny SP stimulují uvolňování cholesterolu z plazmatické membrány. Cholesterol je pokládán za jeden z faktorů stabilizujících membránu spermií (Yeagle 1985) a jeho efflux je signálem pro reorganizaci nebo destabilizaci membrány (Manjunath & Therien 2002).

Kareskoski & Katila (2008) během experimentů s rozmraženým hřebčím semenem zjistili, že přidání SP jako celku ke spermiím před kryokonzervací má na rozmražené spermie neblahý účinek. Nicméně přítomnost určitého množství SP se zdá být nezbytná pro úspěšné uchování živých spermií a zachování jejich oplozeníschopnosti (Kareskoski & Katila 2008; Carochi & Ferreira 2013), jelikož nejdůležitější formy obranného systému antioxidantů, které jsou spermiím k dispozici, se nacházejí právě v semenné plazmě (Fazeli & Salimi 2016). Usuga et al. (2017) zjistili, že přidání každé z jimi použitých komponent lyofilizované SP k dávce spermií před jejich zamražením, mělo pozitivní efekt na kvalitu rozmraženého ejakulátu. Při přidání střední koncentrace všech proteinů obsažených v SP byly naměřeny vyšší hodnoty celkové motility, progresivní motility, kinematických parametrů VSP a VAP, a lepší hodnoty abnormální morfologie a integrity plazmatické membrány. Přidání vysoké koncentrace proteinů naopak negativně působilo na celkovou motilitu, progresivní motilitu a integritu membrány, a pozitivně na kinematické parametry VSP, VAP a ALH, vitalitu spermií a abnormální morfologii. Přidání střední koncentrace proteinů SP působilo pozitivně na procento motility u čerstvého semene, zatímco přidání vysoké koncentrace proteinů způsobilo lepší výsledky pro vitalitu spermií a integritu plazmatické membrány. Odlišnost efektů působení jednotlivých koncentrací SP může být vysvětlena různým množstvím odlišných proteinů v SP, kdy každý má jinou funkci - některé proteiny mají pozitivní efekt, jiné mají efekt spíše poškozující (Jobim et al. 2004).

Usuga et al. (2016) uvádí, že vysoké množství všech proteinů SP může vést k větší proteinové oxidaci a tím pádem i ke snížení kvality spermatu. U hřebců mají proteiny, jako jsou například CRISP-3 a HSP-2, pozitivní efekt na fertilitu a vysokou odolnost vůči procesům mražení a rozmražení semene, zatímco proteiny jako jsou kallikrein, laktoferrin, klusterin a HSP-1 mají negativní účinek. (Novak et al. 2010; Jobim et al. 2011)

## 4 Metodika

### 4.1 Odběr ejakulátu

Ejakulát byl odebrán od 7 hřebců ze Zemského hřebčince Písek, s.p.o. (CZ71294562). Hřebci byli různých plemen a různého věku v rozmezí 5 – 22 let. Odběry probíhaly v březnu, dubnu, srpnu a prosinci roku 2018. Před odběrem ejakulátu pro výrobu pokusných inseminačních dávek byli hřebci několikrát odebíráni kvůli ustálení spermatogeneze. Odběr probíhal standardním způsobem pomocí fantomu a umělé pochvy za přítomnosti říjné klisny. Ihned po odběru byl ejakulát podroben laboratornímu hodnocení. Pro další zpracování byl vybrán ejakulát s motilitou minimálně 70% a musel splňovat minimální požadavek na koncentraci  $300 \times 10^6$  /ml.

### 4.2 Odběr a zpracování semenné plazmy

Semenná plazma byla odebrána z ejakulátu hřebce s průměrně mrazitelným semenem v certifikovaném Equinním reprodukčním centru s.r.o. (ERC). Ejakulát byl centrifugován  $10\,000 \times g$  10 minut, supernatant (SP) byl odebrán a znovu centrifugován  $10\,000 \times g$  10 minut. Poté byl mikroskopicky zkontrolován, zda jsou v supernatantu přítomny spermie. Po prokázání jejich nepřítomnosti byl supernatant uskladněn při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  až do následného zpracování.

### 4.3 Izolace proteinů semenné plazmy

Proteiny semenné plazmy byly separovány na afinitním nosiči Heparin-Sepharose (GE Healthcare) na dvě frakce: heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-). Předpřipravená semenná plazma byla rozmrazena při laboratorní teplotě a následně centrifugována  $10\,000 \times g$  5 min. Poté byl vzorek nanesen na kolonu Heparin-Sepharose, která byla připojena k pumpě a automatickému sběrači. Průtok pumpy při sběru HEP- frakce byl 1,5 ml / 10 min a sběrač měnil zkumavku každých 10 min. Při sběru HEP- frakce byla kolona po nasátí semenné plazmy připojena k zásobníku s roztokem PBS (solný roztok pufrovaný sulfátem), kterým byla frakce po dobu separace promývána. Po uplynutí 150 min byla kolona přepojena na roztok 3M NaCl v PBS, který při průtoku 4 ml / 10 min po dobu 60 min uvolňoval navázané HEP+ proteiny z kolony. Jednotlivé zkumavky s roztoky po separaci byly proměřeny spektrofotometrem (Biochrom, Libra S22, Fisher Scientific) při vlnové délce 280 nm na obsah proteinů. Frakce s absorbcí nad 0,03 mg / ml byly zamrazeny a ponechány v mrazáku před dalším krokem přípravy proteinových frakcí – dialýzou.



Jednotlivé proteinové frakce byly následně dialyzovány a lyofilizovány. Dialýza trvala 48 hodin a byla provedena v 3% roztoku kyseliny octové o obsahu 4,5 l. Vyseparované proteinové frakce v dialyzační membráně (Membrana-Cel Dialysis Tubing, MWCO 3500, SERVA) byly ponořené do roztoku kyseliny octové, který byl po celou dobu separace pomalu promícháván. Roztok kyseliny octové byl minimálně 3x během 2 dnů vyměněn za čerstvý z důvodu odstranění všech solí z proteinových frakcí. Po dialýze byly frakce přeměřeny na konduktometru (Eutech ECTestr 11, OAKTON Instruments) pro stanovení obsahu solí a kontrolu, zda proběhla dialýza v pořádku. Před následnou lyofilizací se vzorky proteinových frakcí umístily do mrazáku v lyofilizačních baňkách. Zmražené proteinové frakce v lyofilizačních baňkách byly lyofilizovány (LYOVAC GT 2 E, FINN-AQUA) přes noc až do úplného vysušení.

#### **4.4 Příprava pokusných inseminačních dávek**

Po odběru byl ejakulát naředěn mléčným ředidlem (dle Kenneyho) v poměru 1:2-5 a následně centrifugován 700 x g 13 minut. Po odstředění byl odebrán supernatant a vzniklá peleta spermií byla naředěna kryokonzervačním ředidlem s přídavkem proteinových frakcí na finální koncentraci  $250 \times 10^6$  /ml. Jednotlivé proteinové frakce byly přidány k naředěným spermiím ve třech koncentracích 125, 250 a 500  $\mu\text{g/ml}$ . Získaná peleta spermií po odstředění byla rozdělena do 7 alikvot, přičemž 1 byla kontrolní bez přídavku proteinových frakcí, ke 3 byly přidány proteiny semenné plazmy HEP+ frakce a ke zbylým 3 byly přidány proteiny HEP-frakce ve výše zmíněných koncentracích. Takto připravené alikvoty byly naplněny do polypropylenových pejet o objemu 0,5 ml a následně dvě hodiny ekvilibrovány při teplotě 5 °C. Poté byly pejety přesunuty do polystyrenového boxu 4 cm nad hladinu tekutého dusíku, kde byly uloženy 15 minut v horizontální poloze a následně byly tyto inseminační dávky uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem. Rozmrazeny byly ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 30 sekund.

#### **4.5 Příprava rozmraženého vzorku na mikroskopické hodnocení**

Po rozmrazení byly dávky ponechány 5 minut ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Poté byl ejakulát naředěn a hodnocen pro zjištění vlivu přídavku proteinových frakcí na motilitu rozmražených spermií. Pro naředění rozmraženého semene byl používán Tyrodový roztok modifikovaný pro spermie (Sp-TALP) (114 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,34 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 10 mM laktát sodný; 2,0 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O; 10 mM HEPES, redestilovaná Milli-Q voda).

## 4.6 Hodnocení motility spermií pomocí systému CASA

Rozmražené inseminační dávky byly naředěny Tyrodovým roztokem (Sp-TALP) na koncentraci spermií  $20 \times 10^6$  / ml z důvodu získání optimální koncentrace pro hodnocení pomocí systému CASA (Nis-Elements, verze 4.30, Laboratory Imaging, Česká republika). Naředěný vzorek o objemu 4  $\mu$ l byl napipetován do Maklerovy komůrky (Sefi-Medical Instrument, Izrael) přehřáté na 37 °C. V každém vzorku se pomocí digitální kamery (DMK 23UM021; Imaging Source, Německo) nastavené na frekvenci 60 fsp nasnímalo 6 polí rovnoměrně rozmístěných po ploše celého vzorku. Ze získaných záznamů CASA systém hodnotil následující kinematické parametry: ALH ( $\mu$ m/s), BCF (Hz), STR (%), VAP ( $\mu$ m/s), VCL ( $\mu$ m/s), VSL ( $\mu$ m/s) a WOB (%). Spermie byly považovány za motilní při  $VAP \geq 15 \mu\text{m/s}$  a spermie s progresivní motilitou splňovaly VAP minimálně 30  $\mu\text{m/s}$  a STR minimálně 50 %.

## 4.7 Statistická analýza

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu Statistica (ver. 12, StatSoft, CZ). Pro vyhodnocení jednotlivých kinematických parametrů motility spermií v ejakulátu byly použity vhodné statistické metody. Po testování normálního rozdělení dat a homogenity rozptylů byla použita jednofaktorová a vícefaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Pro detailní zhodnocení efektu přídatku testovaných látek byl použit Fischerův LSD test. Data jsou prezentována jako  $LSM \pm SEM$  a byla hodnocena na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

## 5 Výsledky

Tabulka 1. Vliv přidavku heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) frakce na celkovou (TMOT) a progresivní (PMOT) motilitu hřebčích spermií po rozmražení.

Motilita (%)	Skupiny		
	K	HEP+ frakce	HEP- frakce
TMOT	19,8 ± 3,4	16,5 ± 2,3	17,5 ± 1,8
PMOT	18,6 ± 3,2	15,6 ± 2,2	16,5 ± 1,7

Výsledky celkové a progresivní motility hřebčích spermií uvedené v tabulce 1 ukázaly, že přidavek HEP+ a HEP- proteinových frakcí semenné plazmy před kryokonzervací způsobil mírné snížení hodnot motility spermií po rozmražení oproti hodnotám, kterých dosahovaly spermie bez přidavku proteinů semenné plazmy (K). Hodnoty motility spermií byly nejnižší u skupiny s přidáním HEP+ frakce, avšak hodnoty třech porovnávaných skupin se mezi sebou statisticky nelišily ( $p < 0,05$ ).

Tabulka 2. Vliv přidavku různých koncentrací (125, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ ) heparin-vázající (HEP+) frakce semenné plazmy na celkovou (TMOT) a progresivní (PMOT) motilitu hřebčích spermií po rozmražení.

Motilita (%)	Skupiny koncentrací HEP+ frakce ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	K	H+ 125	H+ 250	H+ 500
TMOT	19,8 ± 3,4	17,9 ± 3,9	16,7 ± 3,9	14,4 ± 4,3
PMOT	18,6 ± 3,2	17,1 ± 3,7	15,7 ± 3,7	13,7 ± 4,1

Z tabulky 2 je patrné, že přidavek HEP+ proteinové frakce semenné plazmy ke spermiím před mražením způsobil snížení hodnot celkové i progresivní motility po rozmražení. Se stoupající koncentrací proteinových frakcí klesaly hodnoty motility spermií, nicméně rozdíly opět nebyly statisticky významné ( $p < 0,05$ ).

Tabulka 3. Vliv přidavku různých koncentrací (125, 250, 500 µg/ml) heparin-nevázající (HEP-) frakce semenné plazmy na celkovou (TMOT) a progresivní (PMOT) motilitu hřebčích spermií po rozmražení.

Motilita	Skupiny koncentrací HEP- frakce (µg/ml)			
	K	H- 125	H- 250	H- 500
PMOT	18,6 ± 3,2	18,4 ± 3,1	14,2 ± 2,8	17,5 ± 3,2
TMOT	19,8 ± 3,4	19,7 ± 3,3	14,6 ± 3,0	18,8 ± 3,4

Vliv přidavku různých koncentrací HEP- proteinové frakce semenné plazmy je uveden v tabulce 3. Přídavek HEP- proteinové frakce v koncentraci 125 µg/ml měl srovnatelné výsledky hodnot celkové a progresivní motility hřebčích spermií po rozmražení s kontrolní skupinou (K). Při přidání HEP- frakce v koncentraci 250 µg/ml dosahovaly rozmražené spermie nejnižších hodnot motility. Přídavek proteinů HEP- frakce v koncentraci 500 µg/ml hodnoty motility spermií pouze mírně snížil oproti hodnotám motility spermií v kontrolní skupině (K). Ani zde se hodnoty motility spermií jednotlivých skupin statisticky nelišily ( $p < 0,05$ ).

Efekt přidání proteinových frakcí ke spermiím před zamražením u hodnot kinematických parametrů byl statisticky průkazný ( $p < 0,05$ ). Výsledky uvedené v tabulce 4. prokázaly, že přídavek proteinů HEP+ a HEP- frakcí ke spermiím měl signifikantní vliv ( $p < 0,05$ ) na parametry ALH, LIN, STR a WOB, zatímco na parametry BCF, VAP, VCL a VSL statisticky významný vliv neměl. Po přidavku HEP- proteinové frakce dosahovaly rozmražené spermie nižších hodnot parametru ALH v porovnání s hodnotami spermií ve skupině K ( $p < 0,05$ ). Naopak hodnoty parametrů LIN, STR a WOB rozmražených spermií byly po přidání HEP- frakce vyšší oproti hodnotám skupiny K ( $p < 0,05$ ). Po přidavku proteinů HEP+ frakce dosahovaly spermie nižších hodnot parametru LIN v porovnání se skupinou s přídavkem HEP- proteinové frakce, ale současně byly hodnoty skupiny HEP+ vyšší než u K ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru STR byly vyšší při přidání proteinů HEP+ frakce spolu s hodnotami spermií s přídavkem HEP- frakcí v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru WOB byly průkazně nižší u skupiny spermií s přídavkem proteinů H+ frakce spolu s kontrolní skupinou v porovnání se vzorky s přídavkem HEP- frakce ( $p < 0,05$ ). Přídavek obou frakcí měl tedy pozitivní vliv na přímočarý pohyb spermií vpřed v porovnání se skupinou K.

Tabulka 4. Vliv přísavky heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) frakce semenné plazmy na kinematické parametry hřebčích spermíí po rozmrazení.

Sk.	Kinematické parametry spermíí							
	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (μm)	VCL (μm)	VSL (μm)	WOB (%)
K	4,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,0 ± 0,3	45,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	86,1 ± 0,6 <sup>ab</sup>	69,4 ± 1,1	137,5 ± 2,1	61,8 ± 1,1	51,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
HEP+	4,4 ± 0,0	14,0 ± 0,2	47,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	88,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	69,3 ± 0,7	135,4 ± 1,4	62,8 ± 0,7	52,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
HEP-	4,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	14,3 ± 0,1	48,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	88,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	69,5 ± 0,6	135,2 ± 1,1	63,3 ± 0,6	53,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Tabulka 5. Vliv přísavky různých koncentrací (125, 250, 500 μg/ml) heparin-nevázající (HEP-) frakce semenné plazmy na kinematické parametry hřebčích spermíí po rozmrazení.

Koncentrace proteinů H-frakce (μg/ml)	Kinematické parametry spermíí							
	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (μm)	VCL (μm)	VSL (μm)	WOB (%)
K	4,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	14,0 ± 0,3	45,8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	86,1 ± 0,6 <sup>abc</sup>	69,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	137,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	61,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	51,6 ± 0,5 <sup>ab</sup>
H- 125	4,5 ± 0,1 <sup>cd</sup>	14,5 ± 0,2	49,5 ± 0,5 <sup>ac</sup>	88,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	72,5 ± 0,9 <sup>abc</sup>	138,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	65,8 ± 0,9 <sup>abc</sup>	54,6 ± 0,4 <sup>acd</sup>
H- 250	4,2 ± 0,1 <sup>ac</sup>	14,2 ± 0,2	48,8 ± 0,6 <sup>bd</sup>	89,9 ± 0,5 <sup>bd</sup>	66,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	129,8 ± 1,9 <sup>abc</sup>	61,4 ± 1,0 <sup>b</sup>	53,1 ± 0,5 <sup>bce</sup>
H- 500	4,2 ± 0,1 <sup>bd</sup>	14,0 ± 0,2	46,4 ± 0,6 <sup>cd</sup>	88,2 ± 0,5 <sup>cd</sup>	68,4 ± 1,0 <sup>c</sup>	136,0 ± 1,9 <sup>c</sup>	61,9 ± 1,0 <sup>c</sup>	51,6 ± 0,5 <sup>de</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Přidání různých koncentrací HEP- proteinové frakce mělo signifikantní vliv na všechny měřené kinematické parametry spermií kromě BCF (viz tabulka 5). Hodnoty parametru ALH byly vyšší u skupiny K a koncentrace 125  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s výsledky vzorků s koncentracemi HEP- proteinové frakce 250 a 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru LIN byly signifikantně vyšší při přidání HEP- frakce v koncentraci 125  $\mu\text{g/ml}$  současně s 250  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s kontrolní skupinou spolu se spermiemi s přidáním koncentrace 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru STR byly vyšší u koncentrací 125  $\mu\text{g/ml}$  a 250  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s hodnotami kontrolních vzorků ( $p < 0,05$ ). U parametrů VAP a VSL měla nejvyšší naměřené hodnoty skupina vzorků s koncentrací 125  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s ostatními skupinami ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru VCL byly prokazatelně nižší při koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s koncentracemi 125 a 250  $\mu\text{g/ml}$  spolu s kontrolou. Parametr WOB měl nižší hodnoty u kontrolní skupiny a vzorků spermií s přidáním koncentrace 500  $\mu\text{g/ml}$ , zatímco průkazně vyšší hodnoty byly naměřeny u koncentrace 125  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ).

Jak je zřejmé z výsledků v tabulce 6, přidavek jednotlivých koncentrací HEP+ proteinové frakce má odlišné účinky než přidavek HEP- frakce ve stejných koncentracích. Přidání HEP+ frakce ke spermiím před zamražením signifikantně ovlivnilo hodnoty všech měřených kinematických parametrů ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru ALH byly nižší při přidání koncentrace 250  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s ostatními skupinami, které se mezi sebou statisticky nelišily ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru BCF byly nižší při přidání HEP+ proteinové frakce v koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  než při přidání koncentrace 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). Parametr LIN shodně s parametrem WOB měly vyšší hodnoty u koncentrací 125 a 500  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s kontrolní skupinou spolu se skupinou spermií s přidanou koncentrací 250  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). U parametru STR byly výsledky statisticky nižší u kontrolní skupiny v porovnání se vzorky s přidanou HEP+ frakcí, jednotlivé koncentrace se však mezi sebou nelišily ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametrů VAP, VCL a VSL byly nižší při přidání HEP+ proteinové frakce v koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ ). U parametru VCL byly shodně lepší výsledky u kontrolní skupiny, koncentrace 125 i 500  $\mu\text{g/ml}$ . U parametrů VAP a VSL měla kontrolní skupina signifikantně vyšší hodnoty než koncentrace 250  $\mu\text{g/ml}$  a současně koncentrace 125  $\mu\text{g/ml}$  spolu s koncentrací 500  $\mu\text{g/ml}$  měla statisticky vyšší hodnoty než kontrola ( $p < 0,05$ ).

Tabulka 6. Vliv přidavku různých koncentrací (125, 250, 500 µg/ml) heparin-vázající (HEP+) frakce semenné plazmy na kinematické parametry hřebčích spermií po rozmražení.

Koncentrace H+ frakce (µg/ml)	Kinematické parametry spermií									
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)		
Kontrola	4,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,0 ± 0,3	45,8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	86,1 ± 0,6 <sup>abc</sup>	69,4 ± 1,1 <sup>abc</sup>	137,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	61,8 ± 1,1 <sup>abc</sup>	51,6 ± 0,5 <sup>a</sup>		
H+ 125	4,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	14,1 ± 0,3	47,9 ± 0,7 <sup>ac</sup>	88,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	73,6 ± 1,2 <sup>ad</sup>	142,4 ± 2,2 <sup>b</sup>	67,1 ± 1,2 <sup>ad</sup>	52,9 ± 0,5 <sup>b</sup>		
H+ 250	4,1 ± 0,1 <sup>abc</sup>	13,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	45,2 ± 0,7 <sup>cd</sup>	87,9 ± 0,6 <sup>b</sup>	61,6 ± 1,2 <sup>bde</sup>	125,2 ± 2,3 <sup>abc</sup>	55,5 ± 1,3 <sup>bde</sup>	50,3 ± 0,6 <sup>bc</sup>		
H+ 500	4,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	14,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	49,3 ± 0,8 <sup>bd</sup>	89,3 ± 0,7 <sup>c</sup>	73,8 ± 1,5 <sup>ce</sup>	139,5 ± 2,7 <sup>c</sup>	66,8 ± 1,5 <sup>ce</sup>	54,0 ± 0,6 <sup>ac</sup>		

<sup>a,b,c,d,e</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Tabulka 7. Vliv přidavku heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) frakce semenné plazmy v koncentraci 125 µg/ml na kinematické parametry hřebčích spermií po rozmražení.

Koncentrace proteinů 125 µg/ml	Kinematické parametry spermií							
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)
K	4,5 ± 0,1	14,0 ± 0,3	45,8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	86,1 ± 0,6 <sup>ab</sup>	69,4 ± 1,1 <sup>ab</sup>	137,5 ± 2,1	61,8 ± 1,2 <sup>ab</sup>	51,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
H+ 125	4,6 ± 0,1	14,1 ± 0,3	47,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	88,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	73,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	142,4 ± 2,3	67,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	52,9 ± 0,6 <sup>b</sup>
H- 125	4,5 ± 0,1	14,5 ± 0,2	49,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	88,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	72,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	138,7 ± 1,8	65,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	54,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Jak je vidět v tabulce 7, přídavek HEP+ a HEP- proteinových frakcí semenné plazmy hřebců v koncentraci 125 µg/ml významně ovlivnil ( $p < 0,05$ ) hodnoty parametrů LIN, STR, VAP, VSL a WOB, zatímco hodnoty parametrů ALH, BCF a VCL se mezi skupinami statisticky nelišily. Hodnoty parametrů LIN, STR, VAP a VSL shodně ukázaly, že přídavek HEP+ i HEP- frakcí v koncentraci 125 µg/ml významně zvýšil naměřené hodnoty v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). Naopak u parametru WOB byly hodnoty u kontrolních vzorků spolu s frakcí HEP+ v koncentraci 125 µg/ml nižší než u HEP- frakce v koncentraci 125 µg/ml ( $p < 0,05$ ).

Přídavek proteinových frakcí semenné plazmy v koncentraci 250 µg/ml významně ovlivnil všechny kinematické parametry rozmražených spermií ( $p < 0,05$ ), jak dokládá tabulka 8. Hodnoty parametrů ALH a VCL byly vyšší u kontrolní skupiny v porovnání s přidáním HEP+ a HEP- proteinových frakcí v koncentraci 250 µg/ml ( $p < 0,05$ ). Parametr BCF měl vyšší hodnoty při přidání HEP- frakce v koncentraci 250 µg/ml v porovnání s přidáním HEP+ frakce v koncentraci 250 µg/ml ( $p < 0,05$ ). U parametrů LIN a WOB byly hodnoty významně vyšší při přidání HEP- frakce oproti skupině spermií s přidáním HEP+ frakce spolu s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). U parametru STR byly nejnižší naměřené hodnoty u kontrolní skupiny, hodnoty HEP+ frakce byly významně vyšší a současně hodnoty HEP- frakce byly významně vyšší v porovnání s kontrolou spolu se skupinou s přidáním HEP+ frakce ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametrů VAP a VSL byly významně nižší u HEP+ frakce oproti hodnotám kontrolní skupiny spolu se skupinou s přidáním HEP- frakcí ( $p < 0,05$ ).



Tabulka 8. Vliv přísady heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) frakce semenné plazmy v koncentraci 250 µg/ml na kinematické parametry hřebčích spermii po rozmražení.

Koncentrace proteinů 250 µg/ml	Kinematické parametry spermii							
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)
K	4,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	14,0 ± 0,3	45,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	86,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	69,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	137,5 ± 2,0 <sup>ab</sup>	61,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	51,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
HEP+ 250	4,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	45,2 ± 0,7 <sup>b</sup>	87,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	61,6 ± 1,2 <sup>ab</sup>	125,2 ± 2,3 <sup>a</sup>	55,5 ± 1,2 <sup>ab</sup>	50,3 ± 0,6 <sup>b</sup>
HEP- 250	4,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	14,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	48,8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	89,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	66,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	129,8 ± 1,9 <sup>b</sup>	61,4 ± 1,0 <sup>b</sup>	53,1 ± 0,5 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Tabulka 9. Vliv přísady heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) frakce semenné plazmy v koncentraci 500 µg/ml na kinematické parametry hřebčích spermii po rozmražení.

Koncentrace proteinů 500 µg/ml	Kinematické parametry spermii							
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)
K	4,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,0 ± 0,3	45,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	86,1 ± 0,6 <sup>ab</sup>	69,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	137,5 ± 2,1	61,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	51,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
HEP+ 500	4,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	14,6 ± 0,3	49,3 ± 0,8 <sup>ab</sup>	89,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	73,8 ± 1,4 <sup>ab</sup>	139,5 ± 2,6	66,8 ± 1,4 <sup>ab</sup>	54,0 ± 0,6 <sup>ab</sup>
HEP- 500	4,2 ± 0,1 <sup>ab</sup>	14,0 ± 0,2	46,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	88,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	68,4 ± 1,0 <sup>b</sup>	136,0 ± 1,9	61,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	51,6 ± 0,5 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Přidání HEP+ a HEP- proteinových frakcí k hřebčím spermii před kryokonzervací v koncentraci 500 µg/ml významně ovlivnilo všechny kinematické parametry kromě BCF a VCL (tabulka 9). Hodnoty parametru ALH byly vyšší u kontrolní skupiny spolu se skupinou s HEP+ frakcí v porovnání se skupinou s přidáním HEP- frakce ( $p < 0,05$ ). Hodnoty parametru STR byly u kontrolní skupiny nižší oproti hodnotám, kterých dosáhly spermie s přidáním HEP+ a HEP- frakcí ( $p < 0,05$ ), výsledky obou frakcí se však mezi sebou nelišily. Hodnoty parametrů LIN, VAP, VSL a WOB byly shodně vyšší při přidání HEP+ frakce v koncentraci 500 µg/ml v porovnání s kontrolní skupinou a se skupinou s přidáním HEP- proteinové frakce ( $p < 0,05$ ). Při porovnání kontrolní skupiny a skupin s přidáním HEP+ a HEP- proteinových frakcí v koncentraci 500 µg/ml měla jednoznačně vyšší hodnoty kinematických parametrů skupina s přidáním HEP+ frakce v porovnání s hodnotami ostatních skupin spermii ( $p < 0,05$ ).

Přídavek HEP+ a HEP- proteinových frakcí se významně lišil ve svém účinku na kinematické parametry spermii jednotlivých hřebců ( $p < 0,05$ ), jak je uvedeno v tabulce 10. Spermie jednoho (hřelec E) ze šesti hřebců využitých v experimentu na přidání proteinových frakcí nereagovaly významnou změnou kinematických parametrů ( $p < 0,05$ ). U tří (hřebci B, D a F) ze šesti hřebců byl vidět významně rozdílný efekt po přidání HEP+ a HEP- frakcí na rozmražené spermie u pěti a více kinematických parametrů ( $p < 0,05$ ). U spermii posledních dvou (hřebci A a C) ze šesti hřebců bylo významné ovlivnění přidáním HEP+ a HEP- frakcí prokázáno u jednoho a dvou parametrů ( $p < 0,05$ ). Při bližším pohledu na hodnoty kinematických parametrů spermii hřebců, u kterých měl přídavek proteinových frakcí významný efekt na více parametrů, lze zjistit, že rozmražené spermie hřebce B dosahovaly vyšších hodnot při přidání HEP+ i HEP- frakcí oproti kontrolní skupině ( $p < 0,05$ ). Spermie hřebce D dosahovaly vyšších hodnot při přidání HEP- proteinové frakce spolu se spermii v kontrolní skupině v porovnání se skupinou s přidáním HEP+ frakce ( $p < 0,05$ ). Rozmražené spermie hřebce F dosahovaly vyšších hodnot po přidání HEP+ proteinové frakce, zatímco kontrolní skupina a skupina s přidáním HEP- frakcí měly nižší hodnoty měřených parametrů motility spermii ( $p < 0,05$ ). Rozmražené spermie hřebce C, které na přídavek proteinových frakcí reagovaly významnou změnou pouze v parametru VCL, měly lepší hodnoty u skupiny s přidáním HEP- frakce v porovnání se skupinou s přidáním HEP+ frakcí, a hodnoty kontrolní skupiny se statisticky nelišily ( $p < 0,05$ ). Rozmražené spermie hřebce A, které na přídavek proteinových frakcí reagovaly změnou v parametrech LIN a WOB, dosahovaly vyšších hodnot v kontrolní skupině v porovnání se skupinou s přidáním HEP- frakce, zatímco hodnoty skupiny s přidáním HEP+ frakce se od ostatních skupin nelišily ( $p < 0,05$ ).

Tabulka 10. Vliv přísádku heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) frakce semenné plazmy na kinematické parametry rozmražených spermií jednotlivých hřečů (A – F).

Hřebeč/skupina	Kinematické parametry spermií										
	ALH (μm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (μm)	VCL (μm)	VSL (μm)	WOB (%)			
A/K	4,2 ± 0,2	16,2 ± 1,0	65,4 ± 2,1 <sup>a</sup>	95,0 ± 2,1	70,7 ± 4,0	107,9 ± 7,3	67,5 ± 4,0	68,1 ± 1,8 <sup>a</sup>			
A/HEP+	4,0 ± 0,1	16,6 ± 0,6	62,1 ± 1,4	94,0 ± 1,4	67,8 ± 2,6	107,8 ± 4,8	65,0 ± 2,7	64,5 ± 1,2			
A/HEP-	3,8 ± 0,1	15,8 ± 0,4	59,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	94,0 ± 0,8	63,3 ± 1,5	105,2 ± 2,8	60,5 ± 1,6	62,5 ± 0,7 <sup>a</sup>			
B/K	4,0 ± 0,2	11,6 ± 0,9 <sup>ab</sup>	39,9 ± 2,1 <sup>bc</sup>	76,8 ± 2,1 <sup>ab</sup>	52,3 ± 4,0 <sup>a</sup>	111,2 ± 7,3	41,7 ± 4,0 <sup>ab</sup>	49,6 ± 1,8 <sup>bc</sup>			
B/HEP+	4,5 ± 0,3	14,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	56,6 ± 2,5 <sup>b</sup>	87,7 ± 2,4 <sup>a</sup>	63,7 ± 4,7	107,6 ± 8,7	58,1 ± 4,8 <sup>a</sup>	62,0 ± 2,1 <sup>b</sup>			
B/HEP-	4,1 ± 0,1	15,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	59,9 ± 1,3 <sup>c</sup>	89,7 ± 1,3 <sup>b</sup>	64,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	101,5 ± 4,6	60,5 ± 2,5 <sup>b</sup>	65,0 ± 1,1 <sup>c</sup>			
C/K	4,7 ± 0,1	14,6 ± 0,5	48,2 ± 1,1	90,0 ± 1,1	75,0 ± 2,1	146,9 ± 3,8	68,6 ± 2,1	52,5 ± 0,9			
C/HEP+	4,5 ± 0,1	14,2 ± 0,3	47,4 ± 0,7	90,8 ± 0,7	73,5 ± 1,3	146,2 ± 2,3 <sup>a</sup>	67,2 ± 1,3	51,4 ± 0,6			
C/HEP-	4,7 ± 0,1	14,3 ± 0,3	47,2 ± 0,6	90,2 ± 0,6	76,6 ± 1,2	152,8 ± 2,1 <sup>a</sup>	69,8 ± 1,2	51,6 ± 0,5			
D/K	4,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,0 ± 0,5	40,8 ± 1,2	84,0 ± 1,2	73,7 ± 2,3 <sup>b</sup>	154,5 ± 4,2 <sup>b</sup>	65,3 ± 2,3 <sup>c</sup>	47,1 ± 1,0			
D/HEP+	4,3 ± 0,1 <sup>ab</sup>	12,1 ± 0,4 <sup>c</sup>	40,3 ± 0,8	84,4 ± 0,8	63,4 ± 1,6 <sup>bc</sup>	135,7 ± 2,9 <sup>bc</sup>	55,7 ± 1,6 <sup>cd</sup>	46,8 ± 0,7			
D/HEP-	4,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	13,2 ± 0,3 <sup>c</sup>	42,2 ± 0,6	85,2 ± 0,6	75,8 ± 1,1 <sup>c</sup>	159,1 ± 2,1 <sup>c</sup>	67,1 ± 1,1 <sup>d</sup>	48,1 ± 0,5			
E/K	4,0 ± 0,1	13,9 ± 0,6	45,7 ± 1,4	87,5 ± 1,3	59,3 ± 2,6	117,5 ± 4,8	53,4 ± 2,6	51,2 ± 1,2			
E/HEP+	3,7 ± 0,1	13,1 ± 0,4	45,1 ± 1,0	90,3 ± 0,9	56,4 ± 1,8	118,5 ± 3,4	51,6 ± 1,9	49,4 ± 0,8			
E/HEP-	3,7 ± 0,1	13,7 ± 0,4	46,7 ± 0,8	89,9 ± 0,8	56,5 ± 1,6	113,9 ± 2,9	51,9 ± 1,6	50,9 ± 0,7			
F/K	5,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	14,8 ± 0,7	43,0 ± 1,6 <sup>de</sup>	80,9 ± 1,5 <sup>cd</sup>	77,1 ± 2,9 <sup>d</sup>	153,5 ± 5,4 <sup>d</sup>	65,3 ± 2,9	50,9 ± 1,3 <sup>de</sup>			
F/HEP+	5,0 ± 0,1 <sup>d</sup>	15,4 ± 0,4	49,5 ± 0,8 <sup>d</sup>	86,6 ± 0,8 <sup>c</sup>	79,2 ± 1,6 <sup>e</sup>	143,8 ± 2,9 <sup>e</sup>	71,2 ± 1,6 <sup>e</sup>	55,6 ± 0,7 <sup>d</sup>			
F/HEP-	4,5 ± 0,1 <sup>cd</sup>	14,8 ± 0,3	48,5 ± 0,7 <sup>e</sup>	87,2 ± 0,7 <sup>d</sup>	70,3 ± 1,3 <sup>de</sup>	132,0 ± 2,5 <sup>de</sup>	63,6 ± 1,4 <sup>e</sup>	54,4 ± 0,6 <sup>e</sup>			

<sup>a,b,c,d,e</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

## 6 Diskuze

Kryokonzervace spermatu je důležitý prostředek asistované reprodukce koní, avšak tento proces má na značnou část ejakulátu negativní vliv, včetně snížení motility spermií a narušení integrity jejich membrány (Pace & Sullivan 1975; Moffet et al. 2003; Vidament 2005). Proto se mnoho výzkumů zabývá možnostmi, jak docílit snížení negativních efektů kryokonzervace na spermie, ať už reformulací používaných protokolů nebo vytvořením nových přístupů (Medeiros et al. 2002). Byly provedeny studie zabývající se například efektem přidavku enzymů a antioxidantů ke spermiím před mražením (Baumber et al. 2005), případně efektem různých ředidel na kvalitu rozmražených spermií (Neuhauser et al. 2013). I přesto, že bylo již dříve prokázáno, že odstranění většiny semenné plazmy z hřebčího ejakulátu před jeho dlouhodobým uchováváním má pozitivní vliv na přežitelnost spermií a zvyšuje jejich motilitu (Varner et al. 1987), nejnovější studie se zabývají vlivem přidavku malého množství semenné plazmy (Alghamdi et al. 2002), nebo efektem přidání lyofilizovaných proteinů semenné plazmy (Usuga et al. 2017).

Tato práce se zabývala efektem přidavku heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) proteinové frakce SP ke spermiím hřebců před kryokonzervací. Výsledky prokazují, že přidání HEP+ i HEP- frakce SP nemělo žádný statisticky významný vliv na procento celkové ani progresivní motility rozmražených spermií všech hřebců v našem experimentu v žádné z použitých koncentrací ( $p < 0,05$ ). Při pohledu na kinematické parametry motility spermií hodnocené systémem CASA však signifikantní rozdíly zaznamenány byly ( $p < 0,05$ ).

Při porovnání efektu přidání HEP+ a HEP- proteinové frakce bylo zjištěno, že přidavek frakce HEP+ zvýšil hodnoty parametrů LIN a STR oproti kontrolní skupině. Přidání HEP- frakce zvýšilo hodnoty parametrů LIN, STR a WOB nejen vůči kontrolní skupině, ale i oproti frakci HEP+ ( $p < 0,05$ ). V obecném porovnání obou frakcí tedy měla lepší výsledky v hodnotách pozorovaných kinematických parametrů frakce HEP-, shodně jako ve studii Centurión et al. (2003) provedené na kančím nativním ejakulátu.

Proteinová frakce HEP+ v nejnižší a také nejvyšší koncentraci výrazně zvýšila ( $p < 0,05$ ) hodnoty kinematických parametrů v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak HEP+ frakce v koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  zapříčinila pokles hodnot sedmi z osmi kinematických parametrů ( $p < 0,05$ ). Naopak koncentrace 125  $\mu\text{g/ml}$  a 500  $\mu\text{g/ml}$  zapříčinily vyšší hodnoty parametrů LIN, STR a VAP, což znamená, že spermie při těchto dvou koncentracích byly rychlejší a směr jejich pohybu byl přímější než u kontrolní skupiny a skupiny s přidanou koncentrací 250  $\mu\text{g/ml}$ . Ve studii Harshan et al. (2006) byly v experimentu použity jiné koncentrace a zkoumal se ejakulát jiného živočišného druhu, nicméně podle jejich výsledků měl buvolí ejakulát s přidavkem nižší koncentrace HEP+ frakce (40  $\mu\text{g/ml}$ ) vyšší motilitu než kontrolní skupina, zatímco vyšší koncentrace (80  $\mu\text{g/ml}$ ) se od kontrolní skupiny nelišila. Pravděpodobný důvod, proč nejvyšší a nejnižší koncentrace HEP+ frakce měly lepší výsledky než přidavek střední koncentrace je

fakt, že HEP+ frakce je tvořena mnoha proteiny různých funkcí, které jsou zastoupeny v různém množství, tudíž přidání rozdílných koncentrací může mít velmi odlišné účinky (Jobim et al. 2004).

Nejlepší hodnoty s přidavkem frakce HEP- měly spermie, ke kterým byla přidána koncentrace 125  $\mu\text{g/ml}$ , a konkrétně se zvýšení hodnot týkalo parametrů LIN, STR, VAP, VSL a WOB ( $p < 0,05$ ). Dráha rozmražených spermií tedy opět byla přímější a rychlost vyšší. Pozitivní účinky přidavku HEP- frakce SP na motilitu rozmražených spermií zaznamenala i studie Kumar et al. (2008) provedená na ejakulátu býků. Podle jejich výsledků byla naměřená motilita vzorků s přidavkem HEP+ frakce (vzorky pouze HEP+ a vzorky s přidavkem obou frakcí současně) nižší ( $p < 0,05$ ) než u vzorků kontrolních i s přidavkem pouze HEP- frakce. Nejvyšší motilita byla v této studii naměřena u vzorků s nejvyšší koncentrací HEP- frakce. U vzorků s HEP+ frakcí byla naměřena nižší progresivní motilita než u vzorků s přidavkem obou frakcí, z čehož autoři vyvodili závěr, že právě přidavek frakce HEP- snížil poškození rozmražených spermií. Podobné výsledky publikovaly i studie Harshan et al. (2006) a Singh et al. (2007) při mražení ejakulátů buvolů. Kumar et al. (2008) své výsledky vysvětluje faktem, že BSP heparin-vázající proteiny SP býků iniciují efflux cholesterolu a fosfolipidů z plazmatické membrány spermií. Právě cholesterol je jedním z faktorů, který udržuje stabilitu membrány (Yeagle 1985) a zvyšuje odolnost spermií vůči poškození stresovými faktory, kterým jsou vystaveny během procesu mražení a rozmražení. Podle jejich vysvětlení proteiny HEP- frakce mohou snížit množství heparin-vázajících proteinů, které se navážou na membránu spermií, čímž mohou snížit efflux cholesterolu z membrány spermií, a tedy zvýšit její stabilitu a odolnost vůči stresovým faktorům.

Při porovnání jednotlivých koncentrací HEP+ a HEP- frakcí mezi sebou bylo zjištěno, že při přidání nízkých koncentrací obou frakcí (125  $\mu\text{g/ml}$ ) mají spermie vyšší hodnoty kinematických parametrů než kontrolní skupina, konkrétně v parametrech LIN, STR, VAP a VSL. V nižších koncentracích tedy jak HEP+ tak HEP- frakce mají pozitivní vliv na kinematické parametry motility rozmražených spermií hřebců. Při navýšení množství proteinů však jsou již rozdíly mezi frakcemi zřetelné. V koncentraci 250  $\mu\text{g/ml}$  byly hodnoty kinematických parametrů s přidavkem HEP+ frakce významně nižší než hodnoty HEP- frakce ve stejné koncentraci ( $p < 0,05$ ). Při přidání nejvyšší koncentrace proteinů 500  $\mu\text{g/ml}$  naopak frakce HEP+ byly hodnoty kinematických parametrů významně vyšší než hodnoty HEP- frakce ve stejné koncentraci ( $p < 0,05$ ). Stejně jako jiné studie jsme tedy potvrdili, že vliv proteinů semenné plazmy je závislý na použité koncentraci. Studie Jasko et al. (1991) a Pruitt et al. (1993) prokázaly, že při krátkodobém uchovávání chlazeného ejakulátu hřebců měly vysoké koncentrace (50 – 60 %) SP škodlivé účinky na motilitu spermií. Nižší koncentrace (20 %) již poškozující efekt na motilitu po 24 – 48 hodinách chlazení neměla (Jasko et al. 1992; Rigby et al. 2001), ale další studie zjistily, že při koncentraci SP  $\leq 10$  % byla motilita po 48 h lepší než při přidavku 20 % SP (Palmer 1984, Pruitt et al. 1993). Nicméně podle výsledků studie Todd et al. (2001) je optimální koncentrace SP v chlazeném ejakulátu ještě nižší, 1,25 nebo 2,5 %. Při těchto hodnotách koncentrace SP byly naměřeny vyšší hodnoty progresivní motility než u vzorků s 10 % SP. I studie Kumar et al. (2008) prokázala, že vliv přidané koncentrace proteinů SP je značný. Podle jeho výsledků byla progresivní motilita býčích spermií v pozitivní korelaci

s koncentrací přidané HEP- frakce. Ve studii Moore et al. (2005), ve které se autoři zabývali efektem doby inkubace spermií v SP před kryokonzervací, bylo také prokázáno, že koncentrace SP je důležitá. Při inkubaci spermií po dobu 2 hodin před zamražením s přídatkem 5 % SP bylo procento motilních spermií po rozmražení vyšší než při použití koncentrace 20 %, nicméně dobou inkubace (2 - 6 hodin) přežitelnost rozmražených spermií ovlivněna nebyla.

Účinek semenné plazmy na přežití mražených spermií je stále diskutován; studie Jasko et al. (1992); Maxwell et al. (1996); Moore et al. (2005) potvrdily pozitivní účinek, zatímco studie Love et al. (2005) a Akcay et al. (2006) zaznamenaly spíše negativní účinek. Jedním z důvodů rozporuplných výsledků studií zaměřených na vliv přídatku proteinových frakcí k hřebčím spermiím mohou být podle Šichtař et al. (2019) rozdílné metody zpracování použitého semene (všechny spermie nebo použití selekce nejlepších spermií), zpracování SP (heterogenní nebo homogenní), koncentrace SP (5%, 20%, nebo více) a čas, kdy je SP přidána (před mražením nebo po rozmražení).

Dalším důvodem rozdílných výsledků jednotlivých studií je i individualita hřebců, což jsme prokázali i v našem experimentu. Práce Aurich et al. (1996) už se zaměřuje přímo na rozdíly mrazitelnosti ejakulátu hřebců a uvádí, že se motilita spermií špatně mrazitelných hřebců po rozmražení zlepšila, když byla ke spermiím před mražením přidána SP od dobře mrazitelných hřebců. Naopak když ke spermiím dobře mrazitelných hřebců byla přidána SP špatně mrazitelných hřebců (motilita spermií po rozmražení byla  $\leq 20\%$ ), tak byla progresivní motilita spermií po rozmražení značně snížena, přestože viabilita spermií ovlivněna nebyla. I v našem experimentu si lze všimnout, jak individualita hřebců ovlivňuje výsledky motility spermií po rozmražení. Konkrétně hřelec E (viz tabulka 10) měl hodnoty kinematických parametrů motility spermií bez významného rozdílu mezi kontrolní skupinou a HEP+ a HEP-skupinami, spermie hřebce C reagovaly na přídatvek proteinových frakcí v jednom parametru a naopak u hřebce F bylo možné zaznamenat rozdíly u 7 z 8 kinematických parametrů. Individualitu hřebců v mrazitelnosti jejich ejakulátů potvrdila i studie Jobim et al. (2011). Podle jejich výsledků se významně lišilo relativní množství několika proteinů semenné plazmy hřebců s dobře mrazitelným semenem (good freezers = GF) a se špatně mrazitelným semenem (bad freezers = BF). Konkrétně se jednalo o proteiny CRISP-3, HSP-1 a HSP-2. Protein CRISP-3 byl elektrofozéróu v polyakrylovém gelu identifikován ve dvou různých molekulárních hmotnostech, přičemž ejakuláty GF obsahovaly větší relativní množství tohoto proteinu ve větší molekulární hmotnosti (80 to 85 kDa), zatímco ejakuláty BF obsahovaly větší relativní množství proteinu CRISP-3 s menší molekulární hmotností (25 kDa). Protein HSP-1 byl nalezen ve větším relativním množství u BF hřebců v porovnání s relativním množstvím v ejakulátech GF. Naopak protein HSP-2 se ve větším relativním množství vyskytoval v ejakulátech GF v porovnání se skupinou BF. Tyto výsledky potvrdila studie Jobim et al. (2004) v podobném experimentu s proteiny SP býků. Bylo zjištěno, že protein HSP-2 je analogem proteinů BSP-1/2 obsažených v býčí SP a že stejně jako u proteinu HSP-2 bylo vyšší relativní množství proteinů BSP-1/2 identifikováno v ejakulátech GF býků v porovnání se skupinou BF.

## 7 Závěr

Hypotéza, že přidáním HEP+ proteinové frakce semenné plazmy k hřebčím spermii před kryokonzervací lze zvýšit jejich motilitu po rozmražení, byla potvrzena.

- Přídavek HEP+ a HEP- frakcí neměl vliv na procento celkové ani progresivní motility rozmražených spermií
- Přídavek HEP+ a HEP- frakcí před mražením ovlivnil kinematické parametry spermií po rozmražení
- Při přidání HEP+ frakce byly naměřeny vyšší hodnoty kinematických parametrů motility spermií při použití koncentrací 125 a 500  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s hodnotami kontrolních vzorků
- Při přidání HEP- frakce byly naměřeny vyšší hodnoty kinematických parametrů v koncentraci 125  $\mu\text{g/ml}$  v porovnání s hodnotami kontrolních vzorků
- Byl prokázán signifikantní vliv individuality hřebců na efekt přídatku proteinových frakcí k ejakulátu před kryokonzervací

## 8 Literatura

Akçay E, Reilas T, Andersson M, Katila T. 2006. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *Journal of Veterinary Medicine Series A* **53**:481-485.

Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MHT. 2004. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* **127**:593-600.

Alghamdi AS, Troedsson MH, Xue JL, Crabo BG. 2002. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American Journal of Veterinary Research* **63**:880-885.

Almeida J, Ball BA. 2005. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **87**:321-337.

Alvarez-Gallardo H, Kjelland ME, Moreno JF, Welsh TH, Jr, Randel RD. 2013. Gamete therapeutics: Recombinant protein adsorption by sperm for increasing fertility via artificial insemination. *Plos One*.

Amann RP, Graham JK. 1993. Spermatozoal function. Pages 715-45 in: DiRienzi D, editor. *Equine Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia.

Amann RP, Johnson L, Pickett BW. 1977. Connection between the seminiferous tubules and the efferent ducts in the stallion. *American Journal of Veterinary Research* **38**:1571-1579.

Amann RP, Johnson L, Thompson DL Jr, Pickett BW. 1976. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. *Biology of Reproduction* **15**:586-589.

Amann RP. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology* **2**:37-58.

Amann RP. 1987. Function of the epididymis in bulls and rams. *Journal of Reproduction and Fertility* **34**:115-131.

Amann RP. 1988. Maturation of spermatozoa. Pages 320-328 in: *Proceedings of the International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, vol. 5.



Amann RP. 2011a. Functional anatomy of the adult male. Pages 867-880 in: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner VV, editors. Equine reproduction. Second edition. Wiley-Blackwell, Singapore.

Amann RP. 2011b. Physiology and Endocrinology. Pages 881-908 in: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner VV, editors. Equine reproduction. Second edition. WileyBlackwell, Singapore.

Assreuy AMS, Calvete J, Alencar NMN, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Melo SC, Cunha Q, Ribeiro RA. 2002. Spermadhesin PSP-I/PSP-II Heterodimer and Its Isolated Subunits Induced Neutrophil Migration into the Peritoneal Cavity of Rats<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **67**:1796–1803.

Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* **46**:791-797.

Ax RL, Hawkins HE, DeNise SK, Holm TR, Zhang HM. Boca Raton, FL. 2002. New developments in managing the bull. Pages 287–295 in: Fields MJ, Sand RS, Yelich JV, editors. *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*. CRC Press LLC.

Bannai H, Yoshimura M, Takahashi K, Shingyoji C. 2000. Calcium regulation of microtubule sliding in reactivated sea urchin sperm flagella. *Journal of Cell Science* **113**:831–839.

Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction* **63**:1531–1537.

Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research* **66**:772-779.

Brokaw CJ. 1979. Calcium-induced asymmetrical beating of tritondemembranated sea urchin sperm flagella. *Journal of Cell Biology* **82**:401–411.

Caballero I, Vazquez JM, Garcia EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martinez EA. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* **70**:1352–1355.

Calvete JJ, Mann KH, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Topfer-Petersen E. 1995a. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochemistry* **310**:615–622.

- Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, Topfer-Petersen E. 1994. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. *Reproduction of Domestic Animals* **29**:411–426.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters* **407**:201–206.
- Calvete JJ, Reinert M, Sanz L, Topfer-Petersen E. 1995b. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *Journal of Chromatography A* **711**:167–173.
- Calvete JJ, Reinert M, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1995c. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *Journal of Chromatography A* **711**:167-173.
- Calvete JJ, Sanz L. 2007. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Society of Reproduction and Fertility* **65**:201–215.
- Card C. 2005. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* **64**:558-567.
- Carocho M, Ferreira IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* **51**:15–25.
- Carocho M, Ferreira IC. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* **51**:15–25.
- Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Martinez EA. 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction* **69**:640-646.
- Cooper TG. 1986. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization*. Berlin: Springer-Verlag **17**:221-223.
- Dey CS, Brokaw CJ. 1991. Activation of Ciona sperm motility: phosphorylation of dynein polypeptides and effects of a tyrosine kinase inhibitor. *Journal of Cell Science* **100**:815–824.
- Ekhlasi-Hundrieser M, Schafer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Muller P, Topfer-Petersen E. 2005a. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**:45–57.

- Fahy GM. 1986. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* **23**:1-13.
- Fazeli F, Salimi S. 2016. Correlation of seminal plasma total antioxidant capacity and malondialdehyde levels with sperm parameters in men with idiopathic infertility. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry* **4**:29736.
- Florman HM, Babcock DF. 1991. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. Pages 195–232 in: Wassarman PM, editor. *Elements of Mammalian Fertilization: Basic Concepts*. CRC Press, Boca Raton.
- Florman HM, First NL. 1988. The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro. *Developmental Biology* **128**:453–463.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO. 2005. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *Journal of Reproduction and Development* **51**:37–46.
- García EM, Vázquez JM, Calvete JJ, Sanz L, Caballero I, Parrilla I, Gil MA, Roca J, Martínez EA. 2006. Dissecting the protective effect of the seminal plasma permadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *Journal of Andrology* **27**:434–443.
- Giese A, Jude R, Kuiper H, Piumi F, Schambony A, Guerin G, Distl O, Topfer-Petersen E, Leeb T. 2002a. Molecular characterization of the equine AEG1 locus. *Gene* **292**:65–72.
- Giese A, Jude R, Kuiper H, Raudsepp T, Piumi F, Schambony A, Guerin G, Chowdhary BP, Distl O, Topfer-Petersen E, Leeb T. 2002b. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene* **299**:101–109.
- Glover TD, Nicander L. 1971. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* **13**:39–50.
- Graham JK. 1996. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **12**:131–147.
- Hammerstedt RH, Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* **29**:26-38.
- Harshan HM, Singh LP, Arangasamy A, Ansari MR, Kumar S. 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **93**:124–133.

- Hayashi H, Yamamoto K, Yonekawa H, Morisawa M. 1987. Involvement of tyrosine protein kinase in the initiation of flagellar movement in rainbow trout spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* **262**:16692–16698.
- Hemeida NA, Sack WO, McEntee K. 1978. Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *American Journal of Veterinary Research* **39**:1892–1900.
- Hernandez-Aviles C, Love CC, Serafini R, Ghosh S, Teague SR, LaCaze KA, Varner DD. 2018. The effects of extender glucose concentration and storage temperature on stallion semen quality following cooled storage. *Journal of Equine Veterinary Science* **66**:46.
- Hodder ADJ, Liu IKM. 2011. Spermatozoal motility. Pages 1293-1296 in: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner VV, editors. *Equine reproduction*. Second edition. WileyBlackwell, Singapore.
- Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for freezing. *Animal Reproduction Science* **125**:112–118.
- Hoshiba H, Sinowatz F. 1998. Immunohistochemical localization of the spermadhesin AWN-1 in the equine male genital tract. *Anatomia, Histologia, Embryologia* **27**:351–353.
- Inaba K. 2003. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological Science* **20**:1043–1056.
- Irvine CHG, Alexander SL, Turner JE. 1986. Seasonal variation in the feedback of sex steroid hormones on serum LH concentrations in the male horse. *Journal of Reproduction and Fertility* **76**:221–230.
- Jalkanen J, Huhtaniemi I, Poutanen M. 2005. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the Crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biology of Reproduction* **72**:1268–1274.
- Jasko DJ, Hathaway VL, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* **37**:1241-1252.
- Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL. 1991. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* **35**:1059-1067.
- Jasko DJ, Squires EL, Moran DM, Farlin ME. 1992. Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. Pages 649-660 in: *International Congress Animal Reproduction*.

- Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* **61**:255–266.
- Jobim MIM, Trein C, Zirkler H, Gregory RM, Sieme H, Mattos RC. 2011. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* **76**:765–771.
- Jobim MIM, Treina C, Zirklerb H, Gregorya RM, Siemec H, Mattosa RC. 2011. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* **76**:765–771.
- Johnson L, Amann RP, Pickett BW. 1978. Scanning electron and light microscopy of the equine seminiferous tubule. *Fertility and Sterility* **29**:208–15.
- Johnson L, Griffin CE, Martin MT. 2011. Spermatogenesis. Pages 1026-1052 in: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner VV, editors. *Equine reproduction*. Second edition. WileyBlackwell, Singapore.
- Johnson L. 1990. Spermatogenesis. Pages 173–219 in: Cupps PT, editor. *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, New York.
- Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal plasma: an essential Attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**:536–551.
- Kareskoski AM, Reilas T, Andersson M, Katila T. 2006. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reproduction in Domestic Animals* **41**:33– 8.
- Kareskoski M, Katila T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science* **107**:249–256.
- Katila T, Kareskoski M. 2006. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde* **22**:193-200.
- Kayser JP, Amann RP, Shideler RK, Squires EL, Jasko DJ, Pickett BW. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* **38**:601-614.
- Kelly VC, Kuy S, Palmer DJ, Xu Z, Davis SR, Cooper GJ. 2006. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics* **6**:5826–5833.

Knickerbocker JJ, Sawyer HR, Amann RP, Tekpetey FR, Niswender GD. 1988. Evidence for the presence of oxytocin in the ovine epididymis. *Biology of Reproduction* **39**:391–397.

Kumar A, Singh LP, Harshan HM, Majumdar AC. 2008. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). *Animal Reproduction Science* **104**:220–226.

Kumar Yadav V, Saraswat M, Chhikara N, Singh S, Yadav S. 2013. Heparin and heparin binding proteins: potential relevance to reproductive physiology. *Current Protein and Peptide Science* **14**:61-69.

Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* **105**:119-128.

Loomis PR. 2011. Basic Principles and Techniques for semen Freezing. XVII Congresso Internazionale SIVE. USA.

Lopez ML, de Souza W, Bustos-Obregon E. 1987. Cytochemical analysis of the anionic sites on the membrane of the stallion spermatozoa during the epididymal transit. *Gamete Research* **18**:319–332.

Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* **63**:1584-1591.

Love CC. 1992. Semen Collection Techniques. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **8**:111–128.

Magdaleno L, Dasset M, Varea J, Schambony AM, Urbanke C, Raida M, Topfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS letters* **420**:179-185.

Magistrini M, Chanteloube P, Palmer E. 1987. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *Journal of Reproduction and Fertility* **35**:127–133.

Manjunath P, Therien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* **53**:109–119.

Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin

- Maxwell WM, Welch GR, Johnson LA. 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development* **8**:1165-1178.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* **57**:327-344.
- Miller CD. 2008. Optimizing the use of frozen–thawed equine semen. *Theriogenology* **70**:463–468.
- Miller DJ, Winer MA, Ax RL. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction* **42**:899–915.
- Moffet PD, Bruemmer JE, Card C, Squires EL. 2003. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. Page 42 in: *Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference*.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* **63**:2372-2381.
- Mortimer ST. 2000. CASA—Practical Aspects. *Journal of Andrology* **21**:515-524.
- Mungan NA, Mungan G, Basar MM, Baykam M, Atan A. 2001. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm mobility. *Archives of Andrology* **47**:113–117.
- Neuhauser S, Rheinfeld S, Handler J. 2013. Motility of fresh and frozen-thawed stallion sperm from three segments of the epididymal cauda and the effect of post-thaw seminal plasma addition on motility. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**:942-949.
- Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR. 2010. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* **74**:956–967.
- Orgebin-Crist M-C, Danzo BJ, Davies J. 1975. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. Pages 319–338 in: Hamilton DW, Greep RO, editors. *Handbook of Physiology*. American Physiology Society, Washington DC.
- Pace M, Sullivan JJ. 1975. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility* **23**:115-121.
- Palmer E. 1984. Factors affecting stallion semen survival and fertility. 10th ICAR, Urbana-Champaign, Illinois, USA, vol III. 377-378.

Panarace M, Pellegrini RO, Basualdo MO, Belé M, Ursino DA, Cisterna R, Desimonea G, Rodríguez E, Medina MJ. 2014. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large-scale embryo transfer program. *Theriogenology* **81**:520–525.

Patel M, Gandotra VK, Cheema RS, Bansal AK, Kumar A. 2016. Seminal plasma heparin binding proteins improve semen quality by reducing oxidative stress during cryopreservation of cattle bull semen. *Asian-Australasian journal of Animal Sciences* **29**:1247.

Pesch S, Bergmann M, Bostedt H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* **66**:307–313.

Pickett BW, Amann RP, McKinnon AO, Squires EL, Voss JL. 1989. Management of the Stallion for Maximum Reproductive Efficiency, II. *Animal Reproduction Laboratory Bulletin* No. 05. Fort Collins, Colorado.

Pickett BW, Amann RP. 1987. Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. *Journal of Equine Veterinary Science* **7**:289–302.

Pickett BW, Shiner KA. 1994. Recent developments in artificial insemination in horses. *Livestock Production Science* **40**:31–36.

Pruitt JA, Arns MJ, Pool KC. 1993. Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37°C) and cold-storage (5°C). *Theriogenology* **39**:291.

Quinn PJ. 1898. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **21**:3.

Reineke A, Hess O, Schambony A, Petrunkina AM, Bader H, Sieme H, Topfer-Petersen E. 1999. Sperm-associated seminal plasma proteins—a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions? *Pferdeheilkunde* **6**:531–537.

Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Topfer-Petersen E. 1996. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European Journal of Biochemistry* **242**:636–640.

Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Topfer-Petersen E. 1997. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia* **29**:179–186.

Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD. 2001. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Animal Reproduction Science* **68**:171–180.



- Robaire B, Hermo L. 1988. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. Pages 999–1080 in: Knobil E, Neill J, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.
- Rodríguez-Martínez H, Peña Vega F. 2013. Semen technologies in domestic animal species. *Animal Frontiers* **3**:26-33.
- Rodriguez-Martinez. 2013. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Animal Reproduction* **10**:148-159.
- Roser JF. 2011. Endocrine–Paracrine–Autocrine Regulation of Reproductive Function in the Stallion. Pages 996-1014 in: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner VV, editors. *Equine reproduction*. Second edition. WileyBlackwell, Singapore.
- Saalmann A, Munz S, Ellerbrock K, Ivell R, Kirchhoff C. 2001. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Molecular Reproduction and Development* **58**:88–100.
- Samper JC, Hellander JC, Crabo BG. 1991. Relation between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality measured as sperm motility and with glass wool/ sephadex filters. *Journal of Reproduction and Fertility* **44**:107.
- Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. 1998. Molecular chaperones as HSF1 -specific transcriptional repressors. *Genes & Development* **12**:654–666.
- Shquirat WD, Daghistani HIA, Hamad AWR, Dayem MA, Swaifi MA. 2014. Zinc, Manganese, and Magnesium in seminal fluid and their relationship to male infertility in Jordan. *International Journal of Pharma Medicine and Science* **3**:1–10.
- Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Topfer-Petersen E. 1998a. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica Biophysica Acta* **1387**:206–216.
- Schambony A, Hess O, Gentzel M, Topfer-Petersen E. 1998b. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. *Journal of Reproduction and Fertility* **53**:67–72.
- Si Y, Okuno M. 1999. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biology of Reproduction* **61**:240–246.
- Singh LP, Harshan HM, Ansari MR. 2007. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **99**:395–400.

- Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. 2006. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Human Reproduction* **21**:2868-28675 .
- Smith EF. 2002. Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase. *Molecular Biology of the Cell* **13**:3303–3313.
- Squires E, Keith S, Graham J. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* **62**:1056–1065.
- Squires EL, McGlothlin DE, Bowen RA, Bemdtson WE, Pickett BW. 1981. Use of antibiotics in stallion semen for the control of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Equine Veterinary Science* **1**:43-48.
- Šichtař J, Bubeníčková F, Sirohi J, Šimoník O. 2019. How to Increase Post-Thaw Semen Quality in Poor Freezing Stallions: Preliminary Results of the Promising Role of Seminal Plasma Added after Thawing. *Animals* **9**:414-424.
- Šichtař J, Hošková K, Bubeníčková F. 2014. Důležité předpoklady úspěšného zabřeznutí - Kvalitní ejakulát (díl první). *Jezdectví* **62**:70-71.
- Therien I, Bleau G, Manjunath P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction* **52**:1372-1379.
- Thompson DL Jr, Pickett BW, Squires EL, Nett TM. 1979. Effect of testosterone and estradiol-17 $\beta$  alone and in combination on LH and FSH concentrations in blood serum and pituitary of geldings and in serum after administration of GnRH. *Biology of Reproduction*. **21**:1231-1237.
- Thompson Jr DL, Pickett BW, Squires EL, Nett TM. 1979. Effect of testosterone and estradiol-17 $\beta$  alone and in combination on LH and FSH concentrations in blood serum and pituitary of geldings and in serum after administration of GnRH. *Biology of Reproduction* **21**:1231–1237.
- Tischner M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* **27**:53-59.
- Todd P, Arns MJ, Chenoweth P, Schultz B. 2001. Influence of seminal plasma and processing on cold-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **68**:335-336.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* **89**:159-170.
- Töpfer-Petersen E. 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update* **5**:314-329.

- Turner RM, Eriksson RL, Gerton GL, Moss SB. 1999. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and h-AKAP82. *Molecular Human Reproduction* **5**:816–824.
- Turner RM. 2003. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of Andrology* **24**:790-803.
- Turner RM. 2005. Current techniques for evaluation of stallion fertility. *Clinical Techniques in Equine Practice* **4**:257-268.
- Ueno H, Gonda K, Takeda T, Numata O. 2003. Identification of elongation factor-1 $\alpha$  as a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-binding protein in Tetrahymena cilia. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **55**:51–60.
- Usuga A, Restrepo G, Rojano B. 2016. Criotolerancia del Semen Equino, Estabilidad Oxidativa y Componentes del Plasma Seminal. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* **27**:505–517.
- Usuga A, Rojano B, Restrepo G. 2017. Effect of Seminal Plasma Components on the Quality of Fresh and Cryopreserved Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **58**:103-111.
- Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. 1987. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* **28**:709-723.
- Varner DD, Bowen JA, Johnson L. 1993. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. *Archives of Andrology* **31**:199–207.
- Varner DD, Johnson L. 2011. From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. Pages 909-998 in: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner VV, editors. *Equine reproduction*. Second edition. WileyBlackwell, Singapore.
- Varner DD, Vaughan SD, Johnson L. 1991. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *American Journal of Veterinary Research* **52**:224-230.
- Vasconcelos J, Chaveiro A, Góis A, Moreira da Silva F. 2013. Effects of atocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**:787–793.
- Věžník Z, Švecová D, Zajícová A, Přinosilová P. 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. Brno.

- Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. 1997. Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology* **48**:907-917.
- Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. 1997. Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology* **48**:907-917.
- Vidament M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science* **89**:115-136.
- Villanueva C, Kross RD. 2012. Antioxidant-induced stress. *International Journal of Molecular Sciences* **13**:2091-2109.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**:1129-1137.
- von Fellenberg R, Zweifel HR, Grunig G, Pellegrini A. 1985. Proteinase inhibitors of horse seminal plasma. A high molecular mass, acid-soluble proteinase inhibitor. *Biology and Chemistry* **366**:705-712.
- Voss JL, Pickett BW, Squires EL. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationships to fertility. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **178**:287.
- Waberski D, Südhoff H, Hahn T, Jungblut PW, Kallweit E, Calvete JJ, Ensslin M, Hoppen HO, Wintergalen N, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. 1995. Advanced ovulation in gilts by the intrauterine application of a low molecular mass pronase-sensitive fraction of boar seminal plasma. *Reproduction* **105**:247-252.
- Waberski D. 1995. Boar seminal plasma and fertility. *Reproduction in Domestic Animals* **31**:87-90.
- Waheed M, El-Bahr SM, Al-haider AK. 2013. Influence of seminal plasma antioxidants and osteopontin on fertility of the Arabian horse. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**:705-709.
- Wasco WM, Kincaid RL, Orr GA. 1989. Identification and characterization of calmodulin-binding proteins in mammalian sperm flagella. *Journal of Biological Chemistry* **264**:5104-5111.
- Watson PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 C by egg-yolk lipoprotein. *Reproduction* **62**:483-492.

Williams C, Carlucci S. 2006. Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Veterinary Journal* **36**:617–621.

Wu Z, Zheng X, Luo Y, Huo F, Dong H, Zhang G, Yu W, Tian F, He L, Chen J. 2015. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science* **163**:75–81.

Yeagle DL. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **822**:267–287.



## **9 Samostatné přílohy**

Tabulka A. Vliv přidání jednotlivých koncentrací (125, 250 a 500 µg/ml) heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) proteinových frakcí SP před mražením na kinematické parametry rozmražených spermií hřbece A.

Skupina a koncentrace (µg/ml)	Kinematické parametry spermií									
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)		
K	4,2 ± 0,2	16,2 ± 1,0	65,4 ± 2,1 <sup>ab</sup>	95,0 ± 2,1	70,7 ± 4,0	107,9 ± 7,3	67,5 ± 4,0	68,1 ± 1,8 <sup>ab</sup>		
H+ 125	4,1 ± 0,2	16,6 ± 0,8	63,2 ± 1,8 <sup>c</sup>	94,9 ± 1,7	69,6 ± 3,3	108,9 ± 6,0	66,9 ± 3,3	65,6 ± 1,5 <sup>cd</sup>		
H+ 250	3,6 ± 0,4	15,8 ± 1,7	60,7 ± 3,7	88,9 ± 3,6	57,6 ± 6,9	95,4 ± 12,7	54,9 ± 7,0	63,4 ± 3,1 <sup>e</sup>		
H+ 500	3,9 ± 0,3	17,0 ± 1,3	59,9 ± 3,0	95,0 ± 2,9	68,9 ± 5,6	112,6 ± 10,2	66,4 ± 5,6	62,2 ± 2,5		
H- 125	3,8 ± 0,1	15,8 ± 0,6	63,0 ± 1,3 <sup>de</sup>	94,4 ± 1,3	62,9 ± 2,4	99,5 ± 4,5	60,2 ± 2,5	65,8 ± 1,1 <sup>fg</sup>		
H- 250	3,9 ± 0,1	16,1 ± 0,6	59,0 ± 1,2 <sup>adif</sup>	94,2 ± 1,2	63,6 ± 2,3	106,5 ± 4,2	60,8 ± 2,3	61,8 ± 1,0 <sup>acfh</sup>		
H- 500	3,8 ± 0,2	15,3 ± 0,9	53,6 ± 2,0 <sup>bcef</sup>	92,8 ± 2,0	63,2 ± 3,8	115,2 ± 6,9	60,3 ± 3,8	56,4 ± 1,7 <sup>bdegh</sup>		

<sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)



Tabulka B. Vliv přidání jednotlivých koncentrací (125, 250 a 500 µg/ml) heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) proteinových frakcí SP před mražením na kinematické parametry rozmražených spermií hřebce B.

Skupina a koncentrace (µg/ml)	Kinematické parametry spermií									
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)		
K	4,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	11,6 ± 0,9 <sup>abc</sup>	39,9 ± 2,1 <sup>abcdef</sup>	76,8 ± 2,1 <sup>abcde</sup>	52,3 ± 3,9 <sup>abc</sup>	111,2 ± 7,2	41,7 ± 4,0 <sup>abcd</sup>	49,6 ± 1,8 <sup>abcdef</sup>		
H+ 125	4,4 ± 0,5	12,7 ± 2,0 <sup>d</sup>	56,2 ± 4,5 <sup>a</sup>	83,3 ± 4,4 <sup>f</sup>	55,1 ± 8,4 <sup>d</sup>	93,7 ± 15,4	49,6 ± 8,5	63,0 ± 3,8 <sup>a</sup>		
H+ 250	5,5 ± 0,5 <sup>abcd</sup>	18,4 ± 2,3 <sup>a</sup>	59,2 ± 5,1 <sup>b</sup>	87,7 ± 4,9 <sup>a</sup>	83,7 ± 9,3 <sup>adef</sup>	133,0 ± 17,2 <sup>a</sup>	73,9 ± 9,5 <sup>a</sup>	66,1 ± 4,2 <sup>b</sup>		
H+ 500	4,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	14,1 ± 1,7	55,5 ± 3,8 <sup>cg</sup>	90,8 ± 3,7 <sup>b</sup>	58,5 ± 7,1 <sup>e</sup>	103,0 ± 13,0	55,2 ± 7,2	59,1 ± 3,2 <sup>cg</sup>		
H- 125	4,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	17,1 ± 0,9 <sup>bde</sup>	64,7 ± 2,1 <sup>dghi</sup>	93,5 ± 2,0 <sup>cfigh</sup>	66,5 ± 3,8 <sup>b</sup>	100,1 ± 7,0	64,1 ± 3,9 <sup>b</sup>	68,3 ± 1,7 <sup>dgh</sup>		
H- 250	4,6 ± 0,3 <sup>e</sup>	13,9 ± 1,1 <sup>e</sup>	53,9 ± 2,6 <sup>eh</sup>	86,9 ± 2,5 <sup>dg</sup>	66,4 ± 4,7 <sup>c</sup>	114,3 ± 8,7	61,5 ± 4,8 <sup>c</sup>	59,3 ± 2,1 <sup>ehi</sup>		
H- 500	3,8 ± 0,3 <sup>de</sup>	14,6 ± 1,1 <sup>c</sup>	58,4 ± 2,5 <sup>fi</sup>	87,0 ± 2,4 <sup>eh</sup>	58,2 ± 4,6 <sup>f</sup>	91,5 ± 8,4 <sup>a</sup>	54,5 ± 4,7 <sup>d</sup>	65,7 ± 2,1 <sup>fi</sup>		

≡

a,b,c,d,e,f,g,h,i stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Tabulka C. Vliv přidání jednotlivých koncentrací (125, 250 a 500 µg/ml) heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) proteinových frakcí SP před mražením na kinematické parametry rozmražených spermií hřebce C.

Skupina a koncentrace (µg/ml)	Kinematické parametry spermií									
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)		
K	4,7 ± 0,1 <sup>abcde</sup>	14,6 ± 0,5	48,2 ± 1,1	90,0 ± 1,1	75,0 ± 2,0 <sup>abc</sup>	146,9 ± 3,8 <sup>abc</sup>	68,6 ± 2,1 <sup>ab</sup>	52,5 ± 0,9		
H+ 125	5,1 ± 0,1 <sup>afghi</sup>	14,1 ± 0,5	47,8 ± 1,1	90,1 ± 1,1	83,8 ± 2,0 <sup>adef</sup>	163,4 ± 3,8 <sup>adef</sup>	75,9 ± 2,1 <sup>acde</sup>	52,3 ± 0,9		
H+ 250	4,1 ± 0,1 <sup>bjfk</sup>	14,6 ± 0,5	47,8 ± 1,2	91,6 ± 1,2	67,5 ± 2,3 <sup>bdgh</sup>	134,2 ± 4,2 <sup>bdgh</sup>	62,6 ± 2,3 <sup>cfg</sup>	51,3 ± 1,0		
H+ 500	4,1 ± 0,1 <sup>eglm</sup>	14,0 ± 0,5	46,6 ± 1,2	90,7 ± 1,2	67,3 ± 2,2 <sup>ceij</sup>	137,4 ± 4,1 <sup>ej</sup>	61,3 ± 2,3 <sup>bdhi</sup>	50,5 ± 1,0		
H- 125	5,0 ± 0,1 <sup>djno</sup>	14,2 ± 0,4	46,4 ± 0,9	89,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	79,1 ± 1,7 <sup>gik</sup>	158,5 ± 3,1 <sup>egik</sup>	71,3 ± 1,7 <sup>fhj</sup>	51,3 ± 0,8		
H- 250	4,6 ± 0,1 <sup>hkmp</sup>	14,9 ± 0,5	49,0 ± 1,2	92,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	78,5 ± 2,2 <sup>hjl</sup>	153,7 ± 4,0 <sup>hjl</sup>	72,8 ± 2,2 <sup>gik</sup>	52,5 ± 1,0		
H- 500	4,1 ± 0,1 <sup>eiop</sup>	13,9 ± 0,5	46,6 ± 1,2	89,6 ± 1,2	69,9 ± 2,3 <sup>fkl</sup>	141,5 ± 4,2 <sup>fkl</sup>	63,7 ± 2,3 <sup>ejk</sup>	51,0 ± 1,0		

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Tabulka D. Vliv přidání jednotlivých koncentrací (125, 250 a 500 µg/ml) heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) proteinových frakcí SP před mražením na kinematické parametry rozmražených spermií hřebce D.

Skupina a koncentrace (µg/ml)	Kinematické parametry spermií									
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)		
K	4,7 ± 0,1 <sup>ab</sup>	13,0 ± 0,5	40,8 ± 1,2	84,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	73,7 ± 2,2 <sup>ab</sup>	154,5 ± 4,1 <sup>abc</sup>	65,3 ± 2,3 <sup>ab</sup>	47,1 ± 1,0		
H+ 125	4,5 ± 0,1 <sup>cd</sup>	12,5 ± 0,5	41,2 ± 1,2	86,5 ± 1,1 <sup>bc</sup>	69,4 ± 2,1 <sup>cdef</sup>	148,4 ± 3,9 <sup>def</sup>	62,0 ± 2,2 <sup>cd</sup>	46,8 ± 1,0 <sup>a</sup>		
H+ 250	4,1 ± 0,1 <sup>acefg</sup>	11,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	39,1 ± 1,3 <sup>a</sup>	81,8 ± 1,2 <sup>bde</sup>	57,1 ± 2,3 <sup>acghi</sup>	122,2 ± 4,3 <sup>adghi</sup>	48,9 ± 2,4 <sup>acefg</sup>	46,9 ± 1,1		
H+ 500	3,6 ± 0,5 <sup>bhij</sup>	12,8 ± 2,1	42,5 ± 4,7	84,0 ± 4,5	51,1 ± 8,7 <sup>bdjkl</sup>	112,4 ± 15,9 <sup>bejkl</sup>	45,8 ± 8,8 <sup>bhij</sup>	47,3 ± 3,9		
H- 125	5,0 ± 0,1 <sup>dehkl</sup>	12,8 ± 0,4	40,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	83,3 ± 1,0 <sup>cf</sup>	77,7 ± 1,9 <sup>egj</sup>	165,3 ± 3,4 <sup>cfghim</sup>	68,2 ± 1,9 <sup>deh</sup>	47,1 ± 0,8		
H- 250	4,7 ± 0,1 <sup>fik</sup>	12,9 ± 0,5	41,9 ± 1,2	85,3 ± 1,1 <sup>d</sup>	73,5 ± 2,2 <sup>hk</sup>	154,5 ± 4,0 <sup>hkm</sup>	65,3 ± 2,2 <sup>fi</sup>	47,8 ± 1,0		
H- 500	4,6 ± 0,1 <sup>gil</sup>	13,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	43,8 ± 1,0 <sup>ab</sup>	87,0 ± 0,9 <sup>aef</sup>	75,7 ± 1,8 <sup>fil</sup>	156,4 ± 3,3 <sup>il</sup>	67,2 ± 1,8 <sup>gi</sup>	49,3 ± 0,8 <sup>a</sup>		

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Tabulka E. Vliv přidání jednotlivých koncentrací (125, 250 a 500 µg/ml) heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) proteinových frakcí SP před mražením na kinematické parametry rozmražených spermií hřebce E.

Skupina a koncentrace (µg/ml)	Kinematické parametry spermií									
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)		
K	4,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,9 ± 0,6	45,7 ± 1,4	87,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	59,3 ± 2,6	117,5 ± 4,7	53,4 ± 2,6	51,2 ± 1,2		
H+ 125	3,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	14,1 ± 1,5	44,4 ± 3,4	85,0 ± 3,3	50,0 ± 6,2	103,3 ± 11,5	45,1 ± 6,3	51,6 ± 2,8		
H+ 250	3,8 ± 0,1	12,6 ± 0,5	44,7 ± 1,2	90,2 ± 1,2	55,0 ± 2,2	116,8 ± 4,1	50,1 ± 2,3	49,0 ± 1,0 <sup>a</sup>		
H+ 500	3,8 ± 0,2	14,0 ± 0,9	46,4 ± 1,9	92,4 ± 1,9 <sup>a</sup>	62,1 ± 3,6	128,0 ± 6,6	57,7 ± 3,7	49,7 ± 1,6		
H- 125	3,7 ± 0,3	15,2 ± 1,4	49,3 ± 3,1	89,5 ± 3,0	54,9 ± 5,7	110,5 ± 10,5	50,7 ± 5,8	53,2 ± 2,6		
H- 250	3,8 ± 0,1	13,5 ± 0,5	47,4 ± 1,0	90,0 ± 1,0	57,4 ± 1,9	114,1 ± 3,6	52,6 ± 2,0	51,7 ± 0,9 <sup>ab</sup>		
H- 500	3,6 ± 0,2	13,8 ± 0,7	44,1 ± 1,6	90,0 ± 1,6	54,9 ± 3,0	114,4 ± 5,5	50,6 ± 3,0	48,4 ± 1,3 <sup>a</sup>		

<sup>a,b</sup> stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)

Tabulka F. Vliv přidání jednotlivých koncentrací (125, 250 a 500 µg/ml) heparin-vázající (HEP+) a heparin-nevázající (HEP-) proteinových frakcí SP před mražením na kinematické parametry rozmražených spermií hřebce F.

Skupina a koncentrace (µg/ml)	Kinematické parametry spermií									
	ALH (µm)	BCF (Hz)	LIN (%)	STR (%)	VAP (µm)	VCL (µm)	VSL (µm)	WOB (%)		
K	5,2 ± 0,2 <sup>abcde</sup>	14,8 ± 0,7	43,0 ± 1,6 <sup>abc</sup>	80,9 ± 1,5 <sup>abcdef</sup>	77,1 ± 2,9 <sup>abc</sup>	153,5 ± 5,3 <sup>abcde</sup>	65,3 ± 2,9 <sup>a</sup>	50,9 ± 1,3 <sup>ab</sup>		
H+ 125	4,5 ± 0,1 <sup>af</sup>	15,2 ± 0,6	48,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	87,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	71,7 ± 2,6 <sup>d</sup>	132,3 ± 4,7 <sup>af</sup>	66,1 ± 2,6 <sup>b</sup>	54,2 ± 1,2 <sup>c</sup>		
H+ 250	4,5 ± 0,2 <sup>bg</sup>	15,4 ± 0,8	47,4 ± 1,7 <sup>d</sup>	87,2 ± 1,7 <sup>b</sup>	70,0 ± 3,2 <sup>e</sup>	135,8 ± 5,9 <sup>bg</sup>	62,6 ± 3,3 <sup>c</sup>	52,9 ± 1,5 <sup>de</sup>		
H+ 500	5,6 ± 0,1 <sup>ghij</sup>	15,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	51,7 ± 1,3 <sup>bdef</sup>	85,5 ± 1,2 <sup>c</sup>	90,7 ± 2,4 <sup>adefgh</sup>	158,1 ± 4,4 <sup>ghij</sup>	80,2 ± 2,4 <sup>abcdef</sup>	58,2 ± 1,1 <sup>acdfg</sup>		
H- 125	4,4 ± 0,1 <sup>ch</sup>	15,2 ± 0,4	50,6 ± 0,9 <sup>cg</sup>	88,3 ± 0,9 <sup>d</sup>	70,5 ± 1,7 <sup>bf</sup>	128,8 ± 3,2 <sup>chk</sup>	64,2 ± 1,7 <sup>d</sup>	56,4 ± 0,8 <sup>bghi</sup>		
H- 250	4,0 ± 0,3 <sup>dik</sup>	16,6 ± 1,4	44,8 ± 3,1 <sup>e</sup>	85,2 ± 2,9	60,8 ± 5,6 <sup>cg</sup>	120,7 ± 10,4 <sup>di</sup>	55,1 ± 5,7 <sup>e</sup>	50,4 ± 2,5 <sup>fh</sup>		
H- 500	4,7 ± 0,1 <sup>ejk</sup>	13,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	45,4 ± 1,2 <sup>fg</sup>	85,7 ± 1,2 <sup>e</sup>	71,5 ± 2,2 <sup>h</sup>	139,3 ± 4,1 <sup>ejk</sup>	63,8 ± 2,3 <sup>f</sup>	51,8 ± 1,0 <sup>gi</sup>		

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k stejné indexy označují statisticky významný rozdíl mezi hodnotami ve stejném sloupci (p<0,05)