

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Výroba hřebčích inseminačních dávek**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Filipa Bubeníčková**

**Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař Ph.D.**

**© 2014 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výroba hřebčích inseminačních dávek" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 27.3.2014

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Jiřímu Šichtařovi Ph.D. za odborné vedení a vynaložený čas na konzultace a kontrolu mé bakalářské práce. Dále pak děkuji Kláře Henzlové za anglický překlad souhrnu, své babičce MUDr. Ludmile Poustecké za konstruktivní kritiku a kontrolu českého pravopisu a v neposlední řadě zaměstnancům ERC s.r.o. Mnětice za umožnění nahlédnout do praxe přípravy inseminačních dávek.

# Výroba hřebčích inseminačních dávek

## Souhrn

Inseminace je nejběžnějším způsobem reprodukce u koní. Má-li být inseminace úspěšná, je mj. nezbytné správné načasování a odborné provedení inseminace klisny kvalitní inseminační dávkou s dostatečnou koncentrací aktivních a nepoškozených spermií. Proto je velmi důležitá správná příprava inseminačních dávek, aby bylo dosaženo požadované kvality a tak úspěšného zabřeznutí klisny.

Výroba inseminační dávky začíná odběrem ejakulátu, následuje hodnocení, a pokud odebrané sperma splňuje kvalitativní parametry, lze jej použít k výrobě inseminačních dávek. Semenná plazma ejakulátu většiny hřebců má negativní vliv na spermie během přípravy inseminační dávky, proto je vhodné ji odstranit frakcionováním odběrem nebo centrifugací.

Proces chlazení, mražení i rozmrazování inseminační dávky poškozuje membránu spermií, narušuje její funkčnost, čímž dochází ke snížení životnosti a oplozovací schopnosti spermií. Za účelem eliminovat tato poškození se do ejakulátu přidávají různé druhy ředidel, jejichž komponenty musí zajistit přežití spermií během konzervace, přepravy a skladování až do doby inseminace. Z toho důvodu je důležité znát jednotlivé složky ředidel a jejich význam pro ochranu a zachování funkčnosti spermií. Ředidla určená k mražení inseminačních dávek musí poskytovat ochranu spermiím při mražení v parách tekutého dusíku na výslednou teplotu  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jejich složení vychází ze základních komponent ředidel určených pro výrobu chlazených inseminačních dávek s přidáním kryoprotektivních látek.

Přísné dodržování pracovních postupů a doporučení pro výrobu inseminačních dávek, mezi které patří zamezení kontaminace a znehodnocení ejakulátu při odběru, poměry ředění, zajištění správné rychlosti a teploty chlazení/mražení a následné vhodné zacházení s inseminační dávkou, výrazně zvyšuje fertilizační schopnost spermií.

Odběr kvalitního ejakulátu, výběr vhodného ředidla a precizní příprava inseminační dávky mohou zajistit dobré výsledky inseminace. Avšak v každém kroku procesu její výroby je mnoho příležitostí pro chyby, které mohou výsledek inseminace negativně ovlivnit.

**Klíčová slova:** hřelec, spermie, ejakulát, ředidla, inseminační dávka

# Production of stallion's insemination doses

## Summary

Insemination is the most common way of reproduction of horses. In order to make the insemination of a mare successful, it is necessary to have the right timing and apply good insemination technique using high quality insemination dose, which contains sufficient concentration of active and undamaged sperm. That is why the right preparation of insemination dose is highly important so as to achieve the required quality and therefore to impregnate the mare.

Preparation of the insemination dose starts with collecting the ejaculate and evaluating it. If the collected sperm fulfils the quality criteria, it can be used to make the insemination doses. Seminal plasma has negative effect on sperm during the preparation of insemination dose, therefore it is convenient to remove it by fractionation or centrifugation.

Process of cooling, freezing and thawing of the insemination dose damages sperm membrane and reduces its functionality and thus vitality and fertilization ability. In order to eliminate these damages, different kinds of extenders are added to the ejaculate. The extenders contain components, which help the sperm to survive during conservation, transport, storing until the time of insemination and it is important to know the individual components and their significance for protecting and maintaining the functionality of sperm. Extenders used for freezing have to provide protection during freezing in liquid nitrogen vapour up to temperature of  $-196^{\circ}\text{C}$ . Their composition is based on basic components of extenders, which are used to make cooled inseminations doses with addition of cryoprotectants.

Fertilization ability of sperm is considerably increased by strict adherence to working methods and recommendations for producing insemination doses such as prevention of contamination and damage of ejaculate during the collection, dilution ratio, right speed and temperature of cooling/freezing and appropriate manipulation with the insemination dose.

Collection of high quality ejaculate, choosing the right extender and precise preparation of insemination dose can guarantee good results of insemination. However, mistakes can occur in different steps of the production and therefore affect the insemination negatively.

**Keywords:** stallion, sperm, ejaculate, extenders, insemination dose

# Obsah

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 Úvod.....</b>                                                      | <b>1</b>  |
| <b>2 Cíl práce .....</b>                                                | <b>1</b>  |
| <b>3 Přehled literatury .....</b>                                       | <b>2</b>  |
| <b>3.1 Odběr ejakulátu .....</b>                                        | <b>2</b>  |
| <b>3.2 Hodnocení spermatu .....</b>                                     | <b>3</b>  |
| 3.2.1 Makroskopické hodnocení.....                                      | 3         |
| 3.2.2 Mikroskopické hodnocení.....                                      | 4         |
| 3.2.3 Parametry hřebčího ejakulátu .....                                | 10        |
| <b>3.3 Výroba inseminační dávky (ID).....</b>                           | <b>11</b> |
| 3.3.1 Předředění .....                                                  | 11        |
| 3.3.2 Odběr spermatické frakce, ejakulát bez potřeby centrifugace ..... | 12        |
| 3.3.3 Centrifugace .....                                                | 13        |
| 3.3.4 Alternativní způsoby odstranění SP .....                          | 14        |
| 3.3.5 Ředění .....                                                      | 15        |
| 3.3.5.1 Vliv chlazení a ředidel na buněčnou membránu spermie.....       | 15        |
| 3.3.5.2 Vliv mražení a ředidel s kryoprotektanty na spermie.....        | 18        |
| 3.3.6 Typy ředidel .....                                                | 21        |
| 3.3.6.1 Mléčná ředidla .....                                            | 23        |
| 3.3.6.2 Žloutková ředidla.....                                          | 26        |
| 3.3.7 Ředidla používaná k výrobě mražené ID.....                        | 27        |
| 3.3.7.1 Kryoprotektanty.....                                            | 29        |
| 3.3.8 Výroba chlazené inseminační dávky .....                           | 33        |
| 3.3.8.1 Poměry ředění.....                                              | 34        |
| 3.3.8.2 Chlazení.....                                                   | 35        |
| 3.3.8.3 Teplota uchovávání .....                                        | 35        |
| 3.3.8.4 Skladování a přeprava .....                                     | 36        |
| 3.3.9 Výroba mražené inseminační dávky .....                            | 37        |
| 3.3.9.1 Naředění po odstředění.....                                     | 38        |
| 3.3.9.2 Mražení ID.....                                                 | 39        |
| 3.3.9.3 Rychlost mražení .....                                          | 39        |
| 3.3.9.4 Uchovávání mražené ID .....                                     | 40        |
| 3.3.9.5 Koncentrace spermií v mražené ID .....                          | 41        |
| 3.3.9.6 Rozmrazení ID.....                                              | 42        |

|          |                                  |           |
|----------|----------------------------------|-----------|
| 3.3.9.7  | Hodnocení ID po rozmrazení ..... | 43        |
| <b>4</b> | <b>Závěr.....</b>                | <b>44</b> |
| <b>5</b> | <b>Použitá literatura .....</b>  | <b>45</b> |

# 1 Úvod

U koní existují dvě základní metody reprodukce, a to přirozená plemenitba (jako jediná možná a uznaná metoda u anglického plnokrevníka) a umělá inseminace (čerstvým, chlazeným nebo hluboce zmraženým semenem).

V současné době se stává stále populárnější umělá inseminace koní. Jedná se o techniku, při které se eliminují některé negativní faktory doprovázející přirozenou plemenitbu (např. poranění klisny nebo hřebce, přenos chorob, transport klisny ke hřebci na velké vzdálenosti, nadměrné využívání a zatěžování hřebce) a současně stoupá efektivita plemeníka, kdy z jednoho odběru je možné vyrobit více inseminačních dávek.

Inseminace má řadu výhod pro chovatele – zejména kontrolu spermatu či využití relativně nízkého počtu spermií. Hodnocení semene po každém odběru napomáhá k odhalení reprodukčních problémů hřebce, které by jinak nebyly zjištěny. V mnoha případech je inseminace jediný způsob, jak získat hříbata od starých a cenných hřebců. Díky možnosti mražení a převozu semene mohou být klisny oplodněny hřebcem na tisíce kilometrů daleko, což značně snižuje náklady na převoz hřebců a klisen a umožňuje plemenitbu mezi státy i světadíly. Inseminace zvyšuje možnost použití hřebců s výběrovou genetickou hodnotou a urychluje zavádění nového genetického materiálu do chovů prostřednictvím dovážení inseminačních dávek.

Úspěch inseminace závisí jak na získání kvalitního ejakulátu, tak na správné přípravě inseminační dávky. Spermie jako živá buňka je velmi citlivá k vnějším vlivům a snadno může být poškozena během manipulace s ejakulátem a přípravy inseminační dávky. Existuje řada doporučení a postupů, které mají za cíl maximalizovat viabilitu spermií až do doby inseminace. Pro dosažení maximální fertility se stále hledají nové možnosti v přípravě inseminačních dávek, postupy a způsoby ředění ejakulátu, popřípadě rozdílné koncentrace jednotlivých komponent ředidel.

## 2 Cíl práce

Cílem práce je sestavit literární rešerši pojednávající o možnostech ředění hřebčího ejakulátu pro přípravu inseminační dávky.



## 3 Přehled literatury

### 3.1 Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu probíhá v reprodukčních centrech, kde jsou dodržována přísná hygienická i bezpečnostní pravidla. Odebírá se od hřebců, kteří prošli výběrem a vyhovují předepsaným zdravotním podmínkám (Rob a Herčík, 1987). Odběr se provádí do různých typů umělých vagín (Brinsko et al., 2011). Může být frakcionovaný do zkráceného typu umělé pochvy, tzv. otevřeného typu, nebo odběr celého ejakulátu do uzavřeného systému pochev se zabudovaným sběračem spermatu (Rob a Herčík, 1987).

Umělá pochva, do níž se má hřebec odsemenit, musí mít odpovídající teplotu, tlak a být vhodně lubrikována. Správného tlaku je dosaženo napuštěním vody nebo vzduchu. Optimální teplota vody těsně před odběrem je 48 °C. V případě, že hřebec neejakuluje, je možné ji zvýšit až na 50 °C (Pycock, 1997, Brinsko et al., 2011). Všechny pomůcky, které přicházejí do styku se semenem při odběru ejakulátu, musí být z nespermicidního materiálu (Brinsko et al., 2011). Při použití umělé pochvy existují dvě metody odběru ejakulátu, buďto se nechá hřebec skákat na fantom nebo na klidnou klisnu (Pycock, 1997).

Ihned po odběru musí být sperma rychle transportováno do laboratoře, aby se minimalizovalo poškození spermií světlem, šokem z chladu či nadměrného tepla. Všechny materiály, které s ním přicházejí do styku, musí být předehté na teplotu těla 37-38°C. Pokud nebylo sperma přefiltrováno při odběru, mělo by být přelito přes filtr pro odstranění gelu a cizích nečistot. Následně se stanoví a zaznamená objem, barva a koncentrace spermií. Pro zachování maximální životnosti spermií musí být sperma během několika minut po odběru naředěno vhodným ředidlem. Počáteční naředění použitým ředidlem 1:1 až 1:2 je dostačující, pokud sperma nebude skladováno déle než 1 až 2 hodiny před inseminací. Po naředění se mikroskopicky stanovuje motilita a procento pohyblivých spermií (Brinsko et al., 2011).

Náhlá smrt, zranění, kastrace, závažné akutní onemocnění nebo jakákoli jiná událost mohou předčasně ukončit reprodukční život hřebce. V tomto případě existuje možnost zachování genetické hodnoty zvířete odebráním varlat s nadvarlaty. Po odstranění nadvarlete spermie zůstávají životaschopné do počátku rozkladu tkáně. Odebrané spermie z hlavy nadvarlete mají stejnou oplozovací schopnost jako ejakulované sperma po skladování v 5 °C po dobu 24 hodin (Bruemmer, 2006; Monteiro et al., 2011).

## 3.2 Hodnocení spermatu

Hodnocení semene se provádí před každou reprodukční sezónou, pro zařazení hřebce do inseminace, při podezření na problémy s plodností, pro určení odolnosti spermií k chlazení případně mražení a po odběru semene určeného k přepravě a inseminaci. Základní testy zahrnují stanovení objemu, koncentrace, pohyblivosti, morfologie a pH. Průběžně se provádí test dlouhověkosti, bakteriologický, cytologický a hypoosmotický test a barvení živých a mrtvých spermií. Pokročilé testy se provádějí pomocí fluorescence (akrozomální integrita, schopnost kapacity, DNA integrita) (Baumber-Skaife, 2011).

V současné době neexistuje jedna jediná zkouška, která by spolehlivě předpovídala plodnost hřebce a vzhledem ke složitosti spermie je nepravděpodobné, že by ji někdy jeden test mohl určit. Schopnost spermie oplodnit vajíčko je závislá nejen na mnoha jejích vlastnostech a funkcích, ale i na vnějších faktorech jako je semenná plazma, zona pellucida, prostředí samičího pohlavního traktu a také na plodnosti klisny. Cílem je získat několik základních testů, které společně analyzují nejdůležitější aspekty spermatu. Proto je důležité vědět, jaké jsou normální hodnoty a jejich tolerovatelné rozmezí (Baumber-Skaife, 2011).

Před hodnocením je důležité odstranění gelové frakce ejakulátu. Nejčastěji se využívá filtrace, kdy se odstraní gel a případné nečistoty. Podstatné pro práci se spermatem, jak při odběru, tak při následném hodnocení, je udržování teploty přibližně 38 °C. Všechny pomůcky, sklíčka, stolek mikroskopu atd. musí být předem nahřány, aby se předešlo chybám ve výsledcích hodnocení. Vzhled, motilita, koncentrace a morfologie spermií by se měly ideálně posuzovat u každého odebraného vzorku (Morel, 2003).

### 3.2.1 Makroskopické hodnocení

#### Objem ejakulátu

Objem ejakulátu je závislý na plemenné příslušnosti, věku a prostředí. Environmentální faktory, které ovlivňují objem semene, jsou například krmení, ustájení, způsob a četnost odběru ejakulátu (Sieme et al., 2004). Také závisí na ročním období, kdy mimo reprodukční sezónu je objem odebraného semene nižší (Janett et al., 2003). Je dán i množstvím semenné plazmy z přídatných pohlavních žláz. Objem by se měl stanovovat bez gelové frakce ejakulátu (Sieme, 2009).

Objem se stanoví měřením v kalibrované zkumavce nebo kalibrovaných odměrných válcích nebo vážením na laboratorních digitálních vahách (Věžník, 2000). Nádoba na měření musí být důkladně vyčištěná, aby nedošlo ke změnám kvality spermatu. Vážení spermatu

probíhá v nádobách o známé hmotnosti za předpokladu, že 1 ml spermatu váží 1 gram. Stanovení objemu a koncentrace musí být provedeno co nejrychleji, aby mohlo být sperma naředěno (Baumber-Skaife, 2011).

Normální objem ejakulátu hřebce je 30-250 ml (Morel, 2003). Menší objem než 30 ml se pro inseminaci nepoužívá (Gamčík a Kozumplík, 1992). Správné měření objemu a koncentrace spermií je důležité pro stanovení celkového počtu spermií v ejakulátu a určující pro stanovení množství inseminačních dávek, které lze z tohoto ejakulátu vyrobit (Sieme, 2009).

### **Barva, konzistence a pach**

Makroskopický vzhled ejakulátu závisí na hustotě, která je určena koncentrací spermií, na složení semenné plazmy a přítomnosti fyziologických (epitelové buňky) nebo patologických (moč, krev) složek (Sieme, 2009). Barva je mléčně až šedavě bílá v závislosti na koncentraci spermií, konzistence vodnatá (Gamčík a Kozumplík, 1992). Sperma o nižší koncentraci má barvu šedavou, s vyšší koncentrací má krémovější vzhled. Nažloutlé sperma páchnoucí po moči indikuje přítomnost moči v ejakulátu. Ejakulát červené nebo růžové barvy je s příměsí krve (Baumber-Skaife, 2011). Pokud se ve vzorku ejakulátu vyskytne příměs krve, moči nebo přítomnost sraženiny, musí být takový vzorek vyřazen a vyšetřen zdravotní stav hřebce (Morel, 2003). Rutinně se také posuzuje zápach spermatu. Hřebčí sperma má být pachově neutrální. Vzorek, který je cítit močí, hnilobou či po fekáliích, musí být zlikvidován (Sieme, 2009).

### **3.2.2 Mikroskopické hodnocení**

Před mikroskopickým hodnocením se vzorek naředí vhodným ředidlem pro doplnění energie spermiím, aby nedošlo k chybným výsledkům při stanovování životnosti spermií, a k zabránění aglutinace, což by zhoršilo posuzování motility. Naředění by mělo proběhnout nejlépe do 2 minut po odběru. Pro první naředění se používá stejné ředidlo jako při přípravě inseminační dávky. Nejčastěji se používají ředidla na bázi odstředěného mléka. Ředí se na základě koncentrace spermií (Morel, 2003).

### **Koncentrace**

Koncentrace neboli hustota spermií představuje počet spermií na jednotku objemu a udává se například v milionech na mililitr (Sieme, 2009). K výpočtu se používá spektrofotometr nebo hemocytometr. Ke klinickému využití se používají přístroje

s fluorescenční technikou (Baumber-Skaife, 2011). Počet spermií na hemocytometru se počítá pomocí počítací mřížky a koncentrace se dopočte podle známého poměru ředění. Pro použití spektrofotometru se vzorek spermatu ředí 1:30 opticky jasným ředidlem (např. 10% formalínem a 0,9% fyziologickým roztokem). Spektrofotometr pak určí množství světla procházejícího vzorkem, ze kterého vypočítá koncentraci spermií. Normální koncentrace je  $30-600 \times 10^6$  spermií v 1 ml neředěného spermatu. Pro použití spermatu k inseminaci je potřeba  $100 \times 10^6$  životaschopných spermií v 1 ml. Vzorky s koncentrací  $100-200 \times 10^6$  jsou považovány za vhodné pro inseminaci (Morel, 2003).

### **Motilita**

Vyhodnocení motility spermií je základním testem pro stanovení jejich kvality a lze z ní posoudit potenciální fertilitu hřebce. Pro zařazení do chovu se doporučuje pro hřebce alespoň miliardu progresivně se pohybujících spermií. Motilita také určuje, zda je vhodné pro daného hřebce chlazení nebo mražení spermatu. Avšak ani dobrá motilita nezaručuje plodnost.

Sperma se hodnotí po naředění, protože neředěné spermie mají tendenci aglutinovat (Baumber-Skaife, 2011). Aglutinace je shlukování spermií, nejčastěji jejich hlaviček, nebo připojení k cizí částici ve vzorku. Stupeň aglutinace (nízká, střední, vysoká) by měl být zaznamenán (Sieme, 2009). Před analýzou se sperma ředí nejčastěji základním mléčným ředidlem s glukózou na koncentraci  $25-50 \times 10^6$  / ml. (Baumber-Skaife, 2011).

Co nejdříve po odběru se nanese kapka (2-5  $\mu$ l) ejakulátu na předehráté podložní sklíčko a umístí na vyhřívaný (37-40 °C) stolek světelného mikroskopu, jímž se hodnotí (Morel, 2003; Sieme, 2009). Motilita je velmi ovlivňována podmínkami prostředí, je proto důležité zabránit nadměrnému teplu, chladu, nevhodnému pH a znečištění podložního a krycího sklíčka (Baumber-Skaife, 2011).

Motilita je vyjádřena v procentech progresivně pohyblivých spermií (Sieme, 2009) nebo se hodnotí na stupnici 0-5 (stupeň 0 velmi špatný, 5 vynikající ejakulát). Posuzuje se žádoucí progresivní pohyb vpřed a abnormální pohyby jako je pohyb na místě, kruhový, kolébavý nebo zpětný. Hodnotitelé stanoví podíl spermií s pohybem vpřed (Morel, 2003). Dobrý hřebec by měl mít okamžitou progresivní motilitu nad 60 %. Vizuální mikroskopická metoda je levná, jednoduchá, a pokud je prováděna zkušeným technikem i přesná (Sieme, 2009). Méně subjektivní je počítačová metoda CASA (Baumber-Skaife, 2011).

Pro zmrazení spermatu je vhodná minimální motilita 50-60 % (Samper a Morris, 1998). Po rozmražení je považována za přijatelnou motilita nad 35 % (Vidament, 2005).

### **Procento živých a mrtvých spermií**

Stanovuje se vitálními barvicími testy (Věžník, 2000). Barvení spermií nigrosinem-eosinem umožňuje rozlišení mrtvých od živých buněk (Morel, 2003). Živé a mrtvé spermie mají rozdílnou afinitu k barvivům. Membrána slabých nebo mrtvých spermií propouští barvivo, jež je obarví fialově, zatímco u životaschopných spermií nikoliv a zůstávají tudíž neobarvené (Baumber-Skaife, 2011). Posuzuje se 200 buněk pod imerzním objektivem při zvětšení  $1\,000\times$  (Věžník, 2000).

Poměr mrtvých a živých spermií přijatelný pro inseminace je 4:6 (60 % živých spermií). Může být použit i vzorek s nižším procentem živých spermií, pokud má vysoký celkový počet spermií a naředí se méně, aby byl splněn minimální počet živých spermií v jedné dávce (Morel, 2003).

### **Morfologický obraz**

Morfologie spermií se zkoumá pod imerzním objektivem při zvětšení  $100\times$  na vysušených obarvených nátěrech spermatu. Hodnotí se minimálně 100-200 spermií (Baumber-Skaife, 2011).

Abnormality mohou být klasifikovány jako primární (porucha spermatogeneze a procesu zrání spermie), sekundární (poškození spermií při zrání v nadvarleti a během průchodu vývodnými cestami) a terciární (nevhodné zacházení při a po ejakulaci) (Morel, 2003). Primární poruchy jsou nejzávažnější, vznikají v průběhu spermatogeneze ve varlatech (Sieme, 2009) a obvykle je charakterizují spermie se dvěma hlavami, dvěma ocasy, se zakrnělým nebo stočeným ocasem či bez něj. Poškození vzniklá při ejakulaci jsou charakteristická různými abnormalitami ocasu, oddělením hlavičky a ocasu, poškození po ejakulaci se pak projevují ztrátou akrozómu nebo protržením hlavičky spermie (Morel, 2003). Některé vady způsobují časnou embryonální smrt nebo úplně zabrání oplodnění (např. vady akrozómu brání vazbě na zonu pellucidu a následnému oplodnění vajíčka), další drobnější vady (např. vady ocasu spermie) změní pohyblivost spermií, takže jí zamezí dostat se k vajíčku. Je vhodné zaznamenat typy vyskytujících se vad a jejich četnost pro lokalizaci problému hřebce (Sieme, 2009). Pokud se na jedné spermii vyskytuje více než jedna abnormalita, znamená to závažné narušení spermatogeneze, příp. předpoklad snížené plodnosti (Love, 2002).

Sperma obsahující 65 % nebo více morfologicky normálních spermií je vhodné pro inseminaci (Morel, 2003).

## **pH spermatu**

Koncentrace vodíkových iontů – acidita/alkalita se stanovuje na pH metrech (Věžník, 2000; Morel, 2003). Kyselé pH má spermicidní účinek (Morel, 2003). Abnormálně vysoké pH může indikovat přítomnost moči nebo infekci vnitřního pohlavního ústrojí (Baumber-Skaife, 2011). pH kolem 7,8 signalizuje, že nebyl odebrán celý ejakulát, protože první vodnatá frakce má pH 8,1-8,8 a ovlivňuje tak celkové pH semene (Gamčík a Kozumplík, 1992).

Normální pH hřebčího spermatu se pohybuje mezi 7,2-7,7 (Baumber-Skaife, 2011). Morel (2003) uvádí přijatelné pH v rozmezí od 6,9 do 7,8, přičemž ideální je 7,3-7,7. Vliv na pH má roční období, frekvence ejakulace a koncentrace spermií (Baumber-Skaife, 2011).

## **Životaschopnost**

Hodnocení motility v různých časových intervalech se využívá jako ukazatele životaschopnosti. Hodnotí se pohyblivost při skladování při teplotě 5 °C, 22 °C nebo 37-38 °C. Pokud motilita není menší než 45 % po 3 hodinách a 10 % po 8 hodinách při teplotě 22 °C, pak může být sperma považováno za vhodné k inseminaci. Standardní dávka při skladování při 5 °C by měla mít za 24 hodin  $500 \times 10^6$  progresivně se pohybujících spermií. Sperma by mělo zachovat přijatelnou pohyblivost (nad 30 %) po dobu nejméně 24 hodin, ideálně 48. Životnost spermií ovlivňuje správné naředění, druh ředidla a také způsob přepravy. Může být zlepšena odstředěním a odstraněním semenné plazmy (Baumber-Skaife, 2011).

## **Test dlouhověkosti**

Chlazené skladované sperma nebo sperma mražené a rozmražené může být posuzováno v různých časových intervalech a za různých podmínek skladování (5 °C, 37 °C – test termorezistence). U zmraženého-rozmraženého spermatu se hodnotí motilita při 1 °C, dokud neustane pohyb (Tischner, 1979), při teplotě 4 °C po dobu 5 dní (Müller, 1987), při 38 °C 3 hodiny (Bittmar a Kosiniak, 1992). Při inkubaci 38 °C se po 2 hodinách očekává motilita minimálně 15 % (Sieme, 2009).

Při testu dlouhověkosti probíhá inkubace krátkodobě konzervovaného spermatu v tmavém prostředí při pokojové teplotě a v pravidelných intervalech se určuje motilita spermií až na hranici 10 % progresivně se pohybujících spermií. Dlouhověkost je pak počet hodin, za něž sperma dosáhlo tohoto poklesu. Dnes se více využívá chlazené sperma, a tak test dlouhověkosti probíhá při teplotě 5 °C, kdy se určí vhodnost spermatu daného hřebce

k chlazení a přepravování a také odolnost k vlivům prostředí. Pro test se sperma naředí na koncentraci  $40-50 \times 10^6$  / ml a zchladí na 5 °C. Uchovává se v nádobě určené pro přepravu po dobu nejméně 24 hodin. Testy motility se provádějí po zahřátí po 6, 12, 24 a 48 hodinách (Baumber-Skaife, 2011).

### **HOS test – hypo-osmotic swelling test**

Integritu cytoplazmatické membrány spermii lze posoudit na základě analýzy spermie HOS testem. V tomto testu se charakterizuje membránová integrita testováním osmoregulační schopnosti buněk (Sieme, 2009). Pokud jsou buňky v hypo nebo hypertonickém prostředí, mohou se deformovat nebo zmenšovat, resp. v důsledku nedostatku nebo nadbytku vody může dojít k osmotické nerovnováze (Baumber-Skaife, 2011). V hypoosmotickém prostředí nastane morfologická změna a spermie se zvětšují, aby se vytvořil rovnovážný stav mezi kapalinou uvnitř spermií a extracelulární tekutinou (Sieme, 2009).

Vzorek neředitelného spermatu se smísí při teplotě 37 °C na dobu 60 min. s hypoosmotickým roztokem sacharózy (Baumber-Skaife, 2011). Optimální hypoosmotické médium vyvine dostatečný osmotický stres, aby došlo k pozorovatelnému nárůstu objemu spermie, ale zároveň tak malý, že nedojde k lýze spermatické membrány (Sieme, 2009). Buňky s neporušenou funkční membránou zvětšováním vyrovnávají vnitřní osmotický tlak a jejich bičík se stočí. Spermii s poškozenou membránou zůstane bičík rovný. Mikroskopicky se hodnotí minimálně 100 spermií a určí se procento spermií s typicky svinutým bičíkem (Baumber-Skaife, 2011). Výsledky HOS testu mohou predikovat úspěšnost kryokonzervace (Vidament et al., 1998; Baumber-Skaife, 2011).

### **Mikrobiologické vyšetření ejakulátu**

Semen ořezce obsahuje řadu nepatogenních přirozeně se vyskytujících bakterií, ale do semene se mohou dostat i patogeny, které mohou způsobit infekci pohlavního traktu samice a ovlivnit plodnost (Baumber-Skaife, 2011). Stupeň kontaminace semene je ukazatelem úrovně hygienických podmínek chovu a způsobu odběru ejakulátu (Věžník a kol., 2004). Zbytečné mytí penisu mýdly může narušit fyziologickou mikroflóru penisu a podpořit růst patogenních mikroorganismů (Baumber-Skaife, 2011).

Odběr vzorku semene 1-1,5 cm<sup>3</sup> se provádí přímo ze sběrače ejakulátu pomocí sterilní pipety do sterilní zkumavky s gumovou zátkou (Věžník a kol., 2004). Při odběru vzorku ejakulátu pro mikrobiologické vyšetření nesmí dojít ke kontaminaci sběrné nádoby bakteriemi z vnějšího zdroje (Baumber-Skaife, 2011). Laboratorní mykologické vyšetření musí být

provedeno nejpozději do 3 hodin a bakteriologické nejpozději do 6 hodin po odběru vzorků. Mikrobiologické vyšetření se provádí v laboratoři SVÚ (Státní veterinární ústav) (Věžník a kol., 2004). Izolace a identifikace patogenů zabrání přenosu infekce při inseminaci. Bakterie lze identifikovat pomocí kultivace na agarové plotně buď ze vzorku spermatu, nebo výtěru z genitálu (Morel, 2003). Pro umělé oplodnění může být infikované sperma léčeno antibiotiky přítomnými v ředidle (Baumber-Skaife, 2011).

### **Cytologické vyšetření**

Při vyšetření semene v hemocytometru mohou být ve vzorku zjištěny erytrocyty a leukocyty. Počet leukocytů větší než  $1\,500\text{ ml}^{-1}$  svědčí o problému, např. infekci, zvláště je-li zároveň vysoké pH (Morel, 2003). Zvýšený počet neutrofilů (6 a více v zorném poli) svědčí o infekci (Baumber-Skaife, 2011). Takový vzorek není vhodný k inseminaci. Koncentrace erytrocytů nad  $500\text{ ml}^{-1}$  značí problém jako je krvácení, poranění a rovněž vylučuje vzorek z využití k inseminaci (Morel, 2003).

### **Pokročilé testy spermií**

Dnes je k dispozici moderní technika, která umožňuje podrobnější hodnocení spermií jako je určení schopnosti kapacity, akrozomální integrity, mitochondriální aktivity a chromatinové integrity. Ve většině metod se využívá fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie. Kombinace všech testů umožňuje spolehlivě identifikovat subfertilní hřebce (Baumber-Skaife, 2011).

### **Test mražení**

Při hodnocení hřebce v laboratořích, zda je jeho ejakulát vhodný k výrobě mražených inseminačních dávek, se nejdříve odebere několik vzorků (obvykle 3-5 ejakulátů). Kvalita spermií (morfologie a motilita) a jejich produkce se hodnotí z každého ejakulátu k určení, kdy je kvalita maximální a produkce spermií stabilizovaná. Jakmile se tohoto dosáhne, je dána hřebci 1-2 dny sexuální pauza a následně se provádí test mražení.

Test mražení zahrnuje rozdělení ejakulátu na několik dávek a každá se zpracuje pomocí jiného protokolu. Protokoly se liší v použitých ředidlech a v rychlosti chlazení/mražení. Pejety z každého protokolu jsou rozmrazeny a vyhodnocuje se motilita po rozmrazení a kombinace ředidlo/rychlost chlazení, ta, která poskytuje nejlepší kvalitu, se pak používá ke zpracování ejakulátu. Pokud je kvalita po rozmrazení shodná mezi dvěma nebo více protokoly, provádí se k potvrzení přesnosti druhý nebo třetí test mražení. Nedosáhne-li ani



jeden ze základních protokolů požadovaného výsledku v kvalitě po rozmražení, může se využít několik modifikací základních protokolů ve snaze vyrobit komerčně přijatelné dávky spermatu (Loomis, 2011a).

### 3.2.3 Parametry hřebčího ejakulátu

Základní ukazatele nativního ejakulátu jsou uvedeny v tabulce 3.1 dle publikací různých autorů.

Tabulka 3.1: *Ukazatele nativního ejakulátu*

|                                | <b>Ukazatele nativního semene podle Věžníka a kol. (2004)</b> | <b>Ukazatele nativního semene podle Loudy a kol. (2001)</b> | <b>Ukazatele nativního semene podle Morela (2003)</b> |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Objem                          | > 20 ml                                                       | 50-200 cm <sup>3</sup><br>(výjimečně až 600)                | 30-250 ml                                             |
| Barva                          | -                                                             | bílá až šedavě bílá                                         | -                                                     |
| Konzistence                    | -                                                             | vodnatá                                                     | -                                                     |
| pH                             | 7,2                                                           | 6,7-7,5                                                     | 6,9-7,8                                               |
| Aktivita spermií               | > 60 %                                                        | 60-80 %                                                     | Min. 40 %<br>progresivně se<br>pohybujících spermií   |
| Koncentrace spermií            | > 50 000 mm <sup>3</sup>                                      | 0,1-0,3 × 10 <sup>6</sup> / mm <sup>3</sup>                 | 30-600 × 10 <sup>6</sup> / ml                         |
| Procento patologických spermií | < 40 %                                                        | < 30-35 %                                                   | Min. 40-50 %<br>fyziologicky<br>normálních spermií    |
| Procento primárních změn       | < 15 %                                                        | < 10 %                                                      | -                                                     |

### 3.3 Výroba inseminační dávky (ID)

Po hodnocení je sperma schváleno pro použití k inseminaci (Morel, 2003). Úspěšná umělá inseminace zahrnuje depozici dostatečného množství spermií do rozmnožovacího ústrojí klisny ve vhodném čase (Samper, 2011). Sperma může být použito čtyřmi způsoby: zaprvé neředěné k okamžitému oplodnění, za druhé se může naředit a použít k okamžitému oplodnění několika klisen (Morel, 2003), za třetí, pokud má být použito za 12 a více hodin, musí být pomalu ochlazeno a udržováno při teplotě 4-8 °C (Morel, 2003; Samper, 2011). Čtvrtou možností je sperma, které má být skladováno déle než 72 hodin. V takovém případě je doporučeno mražení ID a udržování v tekutém dusíku až do doby použití, tj. několik týdnů nebo let od odběru (Samper, 2011).

Pokud se sperma použije hned po odběru k inseminaci, stačí jej přefiltrovat pro odstranění gelu a nečistot (Brinsko, 2011a; Samper, 2011) a není nutné jeho ředění. Pro delší skladování nebo převoz se vzorek semene přefiltruje a naředí (Brinsko, 2011a).

Při výrobě ID se sperma konzervuje chlazením nebo mražením. Hlavním důvodem konzervace je prodloužení životnosti semene pro přepravu a následnou inseminaci (Graham, 2011).

Použití chlazeného/mraženého spermatu má mnoho nesporných výhod, např. umožňuje jeho účinnou antimikrobiální léčbu a celkovou analýzu semene před odesláním, snížení nákladů a stresu klisny při přepravě, zvýšení počtu klisen, které je jeden hřebec schopen připustit a vybírání pouze geneticky kvalitních hřebců. Mezi nevýhody patří nižší procento zabřezávání klisen semenem některých hřebců a také špatná odolnost semene některých hřebců při zchlazování a přepravě (Pickett, 1993). Proto je důležité pečlivé zacházení s hřebcem a spermatem a následná odborná inseminace klisny (Graham, 2011).

#### 3.3.1 Předředění

Zpracování spermatu musí proběhnout v takovém čase, aby nedošlo k poškození spermií a ty zůstaly životaschopné (Samper, 2011). Bez ohledu na techniku konzervace, která se použije, musí být během několika minut po odběru sperma naředěno vhodným ředidlem (Brinsko et al., 2011; Samper, 2011), např. základním ředidlem s odtučněným sušeným mlékem a glukózou (Kenney) nebo chemicky definovaným médiem, jako je INRA 96 (IMV, Francie) (Loomis, 2011a).

V ideálním případě by mělo dojít k naředění spermatu předeřtým ředidlem během 2-5 minut po odběru (Brinsko et al., 2011; Samper, 2011). Sperma se obvykle zředí v minimálním

poměru 1:1 nebo na předem stanovenou konečnou koncentraci 50 až 100 milionů spermií v 1 ml (Loomis, 2011a). Pokud je nutné jej uchovávat 2 - 4 hodiny a více, je obvykle nutné větší ředění (Brinsko et al., 2011).

Správné ředidlo tlumí změny pH nativního ejakulátu, udržuje osmolaritu, poskytuje energetické a proteinové zdroje pro metabolismus spermií, stabilizuje membránu při změnách teploty, snižuje škodlivé účinky semenné plazmy, udržuje antibakteriální ochranu pomocí antibiotik a udržuje integritu chromatinu (Samper, 2011). Je důležité, aby ředidla, která budou smíchána se semenem, byla izotermická (35-37 °C) k prevenci vzniku tepelného šoku, který může mít za následek nevratné snížení progresivní motility a poškození membrány, a tím snížení fertilizační schopnosti (Loomis, 2011a; Samper, 2011).

Sperma může být konzervováno na různě dlouhou dobu, nicméně proces a technika zpracování musí zajistit očekávanou životnost ejakulátu. Naředěné čerstvé sperma může být uchováváno při teplotě 20 °C, aniž by ztratilo oplozovací schopnost po dobu několika hodin, pokud se zabrání expozici přímému slunečnímu záření (Samper, 2011).

Předředění předchází centrifugaci. Po odběru a hodnocení se ejakulát smíchá s vhodným odstředivým médiem (Graham, 2011b; Brinsko et al., 2011). První ředění čerstvého spermatu se provádí buď ředidly s kombinací sůl/cukr (např. glukóza-ethylendiamintetraacetát [EDTA], nebo citrát-EDTA) nebo ředidly s odstředěným mlékem a cukrem (např. Kenney, EZ-Mixin [Animal Reproduction Systems, Chino, CA], INRA 82 [Francie]) (Sieme, 2011b). Funkcí odstředivých ředidel je zachování pohyblivosti a ochrana spermií během centrifugace, aby se minimalizovalo poškození buněk (Brinsko et al., 2011; Graham, 2011b; Sieme, 2011b). Poměr ředění je buď 1:1 nebo na koncentraci 50 milionů spermií / ml (Sieme, 2011b).

### **3.3.2 Odběr spermatické frakce, ejakulát bez potřeby centrifugace**

Ve snaze získat koncentrované sperma bez centrifugace byla v Polsku vyvinuta technika, která umožňuje sběr pouze na sperma bohaté frakce z ejakulátu (Loomis, 2011a). Jde o frakcionovaný odběr ejakulátu, ke kterému se používá zkrácený Krakovský model umělé pochvy nebo také zkrácený Missouri model. Zkrácený otevřený typ vagíny umožňuje kontrolu žaludu penisu. Tento způsob odběru zvyšuje koncentraci spermií a také snižuje podíl semenné plazmy (SP) v ejakulátu a tím se snižuje její negativní vliv na životaschopnost spermií. Sperma je tak koncentrováno bez potřeby centrifugace a často má frakcionovaný odběr pozitivní vliv na kontaminaci semene bakteriemi, močí nebo krví. (Brinsko et al., 2011).

Touto technikou vysoce koncentrovaná (300-500 mil / ml), na spermie bohatá frakce, může být okamžitě naředěna ředidlem. Avšak i takto vysoce koncentrované semeno lépe přežívá kryokonzervaci, je-li odstředěním odstraněna SP (Loomis, 2011a).

### 3.3.3 Centrifugace

Zvýšení koncentrace spermatu a snížení koncentrace SP se zajišťuje sběrem první části ejakulátu nebo odstředováním (Brinsko et al., 2011). Ačkoliv SP obsahuje látky, které stimulují a chrání spermie, může její složení u některých hřebců negativně ovlivňovat motilitu a fertilitu spermatu před a během chlazení a skladování při 5 °C (Aurich, 2011; Alvarenga et al., 2012). Z tohoto důvodu je odstředění vhodné k minimalizaci potenciálních škodlivých účinků SP a zvýšení kvality, životaschopnosti a koncentrace spermií (Sieme, 2011b; Alvarenga et al., 2012).

Moore et al. (2005) prokázal škodlivý vliv SP na hřebčí spermie během kryokonzervace. Pro zachování dlouhověkosti spermií je však důležité ponechání 5-20 % SP v suspenzi po odstředění (Loomis, 2006; Aurich, 2011; Brinsko et al., 2011; Brinsko, 2011b; Sieme, 2011b).

Čas a síla (frekvence otáček) odstředování musí být nastaveny tak, aby se maximalizoval výnos spermií při plném zachování životaschopnosti (Brinsko et al., 2011). Úspěch centrifugace závisí na síle (350-700 g) a délce odstředování (10-15 min.). Odstředování s nižší silou (600 g na 10 min.) ve srovnání s vysokou silou (1 000 g nebo 2 000 g po dobu 2 min.) zajišťuje lepší kvalitu spermatu bez potřeby použít tlumicí centrifugační médium (Weiss et al., 2004).

Běžně je předem naředěné sperma umístěno do 50 ml centrifugačních zkumavek s konickým nebo kulatým dnem a spermie jsou odstředěny nízkorychlostní centrifugací (300-400 g × 10-15 min.). Po odstranění většiny supernatantu je výsledkem této techniky 70-75 % použitelných spermií při zachování 5-10 % SP (Loomis, 2006; 2011).

Hlavním problémem centrifugace je ztráta přibližně 25 % spermií. Pro použití větší síly centrifugace s minimalizováním ztrát byla zavedena tzv. *cushion* odstředovací technika (s tlumícím médiem) (Aurich, 2011; Alvarenga et al., 2012), při které použitá tlumicí tekutina o relativně vysoké denzitě umožňuje zvýšení síly a času odstředování a tím zlepšuje využití spermií bez poklesu životaschopnosti (Brinsko et al., 2011).

Centrifugační tlumicí média jsou husté přípravky inertního iodixanolu, které se v malém objemu umístí před centrifugací na dno zkumavky pod naředěné sperma (Loomis, 2011a;

Sieme, 2011b), které pak může být centrifugováno po delší dobu (25-30 min) při mnohem vyšší síle (1 000 g), což přináší větší výnos spermií pro výrobu inseminační dávky. Při použití tlumené centrifugační techniky jsou nepoškozené spermie koncentrované v tenké vrstvě na povrchu tlumící látky. Výťažnost je 90-95 % spermií (Loomis, 2011a). Tato technika může být použita s ředidlem INRA 96 v kombinaci s médiem na bázi iodixanolu (Aurich, 2011).

Iodixanolvá média (60 % hm. / obj. iodixanolu ve vodě [Optiprep z Norska, Eqcellsire Component B z Francie, CushionFluid z Německa]) nemají vliv na kvalitu spermatu po odstředění. Použití média s vysokou viskozitou může mít za následek snížení sedimentace spermií během odstředování (Sieme, 2011b). Vysokorychlostní centrifugace s tlumícím médiem nemá negativní vliv na fertilitu pleménika (Ecot et al., 2005).

### **3.3.4 Alternativní způsoby odstranění SP**

Odstranění SP z hřebčího spermatu pro kryokonzervaci se nejčastěji uskutečňuje centrifugací, která však může způsobit mechanické poškození spermií. Novou metodou odstranění SP je filtrace přes syntetickou hydrofilní membránu (Sperm Filter; Botupharma, Botucatu, Brazílie) (Alvarenga et al., 2012; Neto et al., 2013). Filtr s jemnými póry (2 µm) umožní průchod ředidlu a semenné plazmě, zatímco spermie zachytí (Loomis, 2011a; Alvarenga et al., 2012). Filtraci může být před dokončením přerušena pro zachování určitého množství SP. Spermie jsou pak spláchnuty z filtru ředidlem před provedením konečného ředění. Tato technika může být jednoduchou alternativou u hřebců, jejichž spermie jsou náchylné k poškození při centrifugaci (Loomis, 2011a). Při porovnání centrifugace (o síle 600 g na 10 minut) a filtrace nebyly po mražení ID patrné žádné rozdíly v membránové integritě spermií, ale filtrace zajišťuje významně menší ztrátu spermií než centrifugační technika (Neto et al., 2013).

Technika centrifugace zajistí odstranění SP, ale nedochází k výběru vysoce kvalitních spermií z ejakulátu, který obsahuje směs různě kvalitních spermií (Sieme et al., 2003). Separační techniky oddělí spermie od ostatních buněk nacházejících se v ejakulátu a nečistot v SP a tím dojde ke zlepšení viability spermatických buněk ve vzorku (Loomis, 2006).

Techniky pro výběr morfologicky funkčních spermií byly porovnány ve studii Sieme et al. (2003). S centrifugací byly srovnány tyto způsoby separace spermií: migrace spermií (Swim up metoda); centrifugace s hustým médiem – Percoll (Pharmacia, Uppsala, Švédsko); a filtrace přes skelnou vatu, filtrace přes Sephadex (Sigma, Deisenhofen, Německo) nebo Leucosorb (Leucocyteadsorption-membrane-type-B; Pall Biosupport, Dreieich, Německo).

Tyto metody by mohly poskytnout ID o vyšší kvalitě než s klasickou centrifugací, kdy v peletě zůstávají poškozené spermie a dochází často ke ztrátě životaschopných spermií. I když ve studii byly zaznamenány rozdílné ztráty spermií, bylo zjištěno zvýšení procentuálního množství progresivně pohyblivých spermií a snížení procenta spermií s abnormalitami hlaviček, k čemuž došlo pravděpodobně eliminací spermií nižší kvality. Filtrace přes skelnou vatu s Sephadexem a filtrace přes Leucosorb vedla ke zvýšení motility, membránové integrity a životaschopnosti spermií po skladování v 5 °C po dobu 48 hod. v porovnání s kontrolním centrifugovaným ředěným spermatem (Sieme et al., 2003).

### 3.3.5 Ředění

Sperma se nejdříve zředí primárním ředidlem před centrifugací a následně finálním ředidlem určeným k výrobě chlazené ID nebo ředidlem s kryoprotektantem k výrobě mražené ID (Sieme, 2011b).

#### 3.3.5.1 Vliv chlazení a ředidel na buněčnou membránu spermie

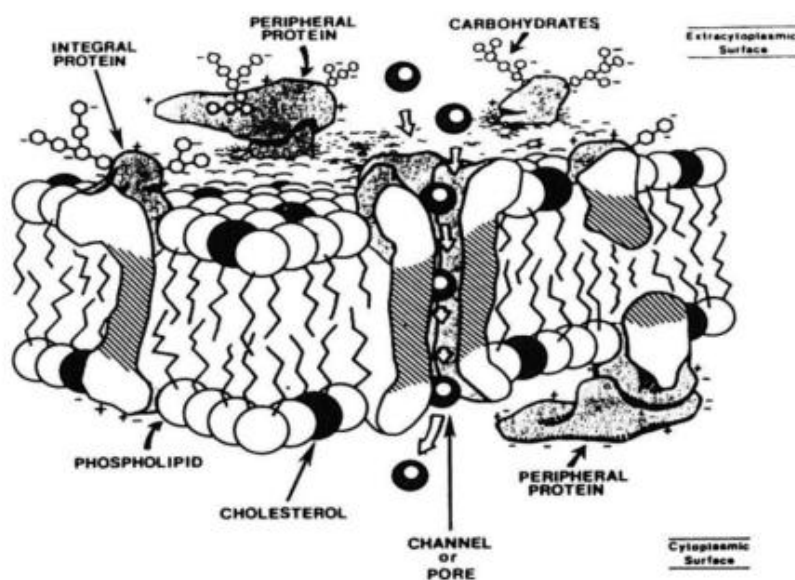
Pro pochopení jak může být sperma chlazeno a proč se používají daná ředidla s jejich jednotlivými komponenty, musíme vědět, co se stane, když jsou buňky chlazeny, jaké probíhají změny v buněčném metabolismu, na membráně a jak tyto změny v konečném důsledku ovlivní přežití buněk (Graham, 2011a).

**Buněčná membrána** se skládá z dvojvrstvy fosfolipidů, kde hydrofilní části směřují zevně membrány a hydrofóbní řetězce mastných kyselin směřují do středu membrány. U hřebčích spermií obsahuje membrána cholin (fosfatidylcholin), serin, ethanolamin a inositol a také proteiny pro zvýšení komplexnosti membrány (Parks a Lynch, 1992). Fosfatidylcholin je rovnoměrně zastoupen jak ve vnější, tak vnitřní vrstvě fosfolipidů, ale ostatní fosfolipidy, jako je například fosfatidylserin, se nacházejí hlavně na vnitřní straně membrány. Vlivem poškození teplotním šokem nebo jiným způsobem těžkého poškození membrány během chlazení, v případě změn na membráně jako je kapacitace a akrozomální reakce, může dojít k obrácení vnější a vnitřní vrstvy fosfolipidů (Quinn, 1989; Flesch et al., 2001). Mastné kyseliny přítomné ve spermatické membráně se skládají z 14-22 atomů uhlíku a obsahují 0-6 nenasycených vazeb (Parks a Lynch, 1992). Kyselé mastné řetězce určují, zda je membrána při určité teplotě v tekuté nebo gelové fázi (Quinn, 1989).

Důležitou složkou jsou **proteiny**, které tvoří až 50 % její hmotnosti. Mohou být integrální (nezbytné pro konstrukci a funkci membrány) nebo periferní (volně na povrchu

membrány, mohou být odstraněny) (Amann a Graham, 1993; Loomis, 2011b). Proteiny slouží jako kanály přes membránu, ukotvují cytoskelet a pomáhají absorbovat bílkoviny SP a z okolního prostředí (Hammerstedt et al., 1990).

Hlavními lipidy membrány jsou fosfolipidy a **cholesterol** (Obrázek 3.1). Poměr fosfolipidů a cholesterolu a další membránové vlastnosti spermie se liší mezi jednotlivými druhy zvířat a tyto rozdíly ovlivňují míru citlivosti spermií k chladovému šoku (Loomis, 2011b). Cholesterol se sdružuje s kyselými mastnými řetězci a vyplňuje mezery uvnitř membrány. V lipidové části membrány přispívá k její stabilizaci při tělesné teplotě. Během kapacitace bílkoviny samičího reprodukčního traktu odstraní cholesterol z membrány spermie, ta se tím stává méně stabilní a je schopná se spojit s vnější akrozomální membránou a spustit akrozomální reakci (Langlais a Roberts, 1985).



Obrázek 3.1: *Membrána spermie (Amann a Pickett, 1987)*

Po ochlazení buňky lipidy přecházejí z tekuté fáze do stavu gelu nebo pevného stavu. Každý řetězec přechází z tekuté fáze při jiné teplotě, což je způsobeno jeho rozdílnou délkou a počtem nenasycených vazeb v řetězci mastných kyselin. Je uváděno, že u hřebce tento přechod mezi fázemi probíhá mezi 19 °C a 8 °C (Moran et al., 1992). Při ochlazování se začnou lipidy shlukovat uvnitř membrány, uvolní tím vazbu s proteiny v membráně, které se začnou sdružovat mezi sebou a tím mění funkční vlastnosti membrány. Se snižující teplotou klesá podíl kapaliny v membráně až do gelového stavu. Vzhledem k výrazné přestavbě lipidů

i proteinů je změněna funkce membrány a může být narušena i po ohřátí, kdy vazby mezi proteiny a lipidy nebudou správně obnoveny (Hammerstedt et al., 1990).

Cholesterol při klesající teplotě snižuje soudržné síly mezi sousedními mastnými kyselinami a mezi fosfolipidy a tím se snaží zachovat v membráně větší množství tekutiny. Pokud je dostatek cholesterolu v membráně, snižuje se teplota, při které nastává fázový přechod (kapalina – gel) a cholesterol může dokonce fázový přechod úplně eliminovat (Graham, 2011a).

V důsledku ochlazení může dojít ke změně či porušení buněčných struktur nebo změně funkčnosti buňky. Přímé škody na cytoplazmatické membráně vyvolané rychlým chlazením z 20 °C na 5 °C indukuje zčásti její nevratné poškození ztrátou membránových lipidů a následné ztrátě intracelulárních iontů a molekul. Dojde ke snížení buněčného metabolismu a nakonec k abnormálnímu kruhovému plavání a rychlé ztrátě motility spermií (Watson, 1981a). Tento jev se nazývá chladový šok, při němž dochází k rychlému poklesu životnosti spermie (Watson, 1981b). Mnohá poškození membrány jsou přímým důsledkem náhlého fázového přechodu, kdy dochází k přestavbě lipidů a bílkovin, což může vést ke změnám v normální membránové struktuře a funkčnosti při 5 °C nebo při zahřátí na 38 °C (Hammerstedt et al., 1990).

Nepřímé škody se projeví až po zahřátí, kdy buňka brzy zahyne. Při zahřátí ne všechny lipidy a proteiny obnoví původní interakce, což může vést k problémům v membránové struktuře a funkčnosti a nakonec až k brzké buněčné smrti. Zchlazené semeno s přidaným ředidlem vykazuje menší membránové poškození než bez ředidla. Důvodem je, že lipidové a lipoproteinové látky obsažené v ředidle a řízená rychlost ochlazování minimalizují poškození membrány. Chlazením se zvyšuje celková délka života spermie, ale i přes použití nejlepší techniky, dochází během chlazení k poškození, které zapříčiní kratší životnost spermií po ohřátí, než je tomu u čerstvého spermatu (Graham, 2011a).

Spermie mají vysoce zhuštěný chromatin a v průběhu spermatogeneze ztratily většinu buněčných organel. Z tohoto důvodu mají omezenou kapacitu pro syntézu bílkovin a opravy buněčných struktur a po odběru relativně krátkou životnost. Metabolismus spermie je anaerobní (glykolýza) a aerobní (cyklus kyseliny trikarboxylové), neboli buněčné dýchání. Dýchání převádí monosacharidy na ATP, které je využito pro pohyb spermie. Metabolické odpadní produkty jako je kyselina mléčná a volné kyslíkové radikály (peroxid vodíku) mohou nenávratně poškodit buňku. Volné radikály vyvolají peroxidaci lipidů, což vede ke ztrátě buněčné integrity, motility a viability (Pace a Graham, 1974). Produkce kyseliny mléčné



může snížit pH kultivačního média, které snižuje buněčnou enzymální aktivitu, což má za následek ztrátu produkce ATP a nakonec smrt buňky (Graham, 2011a).

Snížit produkci volných kyslíkových radikálů a kyseliny mléčné je možné dvěma způsoby. Prvním je naředění spermatu v ředidle, které neobsahuje kyslík a tím donutit buňky využívat anaerobní dýchání. Ředidlo bez kyslíku je například Caprogen (LIC, Hamilton, Nový Zéland), které je nasyceno plynným dusíkem pro odstranění veškerého kyslíku. V něm je možné udržovat spermie bez jakéhokoliv vlivu na ně po dobu 3-6 dnů při pokojové teplotě. Toto ředidlo je hojně využíváno na Novém Zélandu pro uchovávání býčích spermií (Verberckmoes et al., 2005).

Dalším způsobem jak snížit metabolismus spermií je chlazení. Pokud jsou spermie ve vhodném ředidle nebo v uzavřeném kontejneru, aerobní metabolismus rychle spotřebuje kyslík a buňka musí využívat anaerobního metabolismu, jediným výsledným produktem je kyselina mléčná. Při poklesu teploty dochází ke snížení pohybu metabolických enzymů a ke snížení metabolických nároků buněk (Graham, 2011a). Pokud se snižuje teplota semene z tělesné teploty (38 °C) na teplotu 5 °C, celkový metabolismus buněk poklesne přibližně na 7 %. Buňky produkují méně kyseliny mléčné a zpomalí se peroxidace lipidů, což zlepšuje životnost spermií. Při nízké teplotě se také omezí činnost membránových pórů a membránových transportérů. Z tohoto důvodu klesne schopnost buňky přijímat energetické substráty a vylučovat odpadní produkty metabolismu. To nemusí znamenat problém, protože metabolismus je na nízké úrovni. Pokud ale teplota ovlivňuje více jedno než druhé (transport nebo metabolismus), mohou nastat problémy buď v zachování dostatečného množství ATP v buňce nebo při odstraňování odpadních produktů. Takový problém se pravděpodobně projeví až po delší době skladování. Sperma hřebce skladované při nízkých teplotách nad 2 °C po dobu 48 hodin má vyšší procento pohyblivých spermií (Moran et al., 1992). Při teplotách 0 °C-2 °C není membrána schopna zachovat příjem monosacharidů nezbytných pro buněčný metabolismus anebo se metabolismus buňky sníží natolik, že buňka není schopna života (Graham, 2011a).

### 3.3.5.2 Vliv mražení a ředidel s kryoprotektanty na spermie

Zmrzne-li čistá voda, vytváří všechny molekuly krystalickou strukturu. Pokud jsou v roztoku soli a cukry, v bodu mrazu dojde ke krystalizaci čisté vody a vzniklé krystaly jsou od sebe navzájem odděleny kanály nezamrzlé vody obsahující všechny soli a cukry. K tomu, aby buňka přežila kryokonzervaci, musí být v těchto nezamrzlých kanálech. Buňky, které v těchto kanálech nejsou a jsou zachyceny ledovými krystaly, zemřou (Amann, 1999).

Při klesající teplotě je stále více vody z nezamrzlých kanálků odebráno do rostoucích ledových krystalů a zbývající nezamrzlá tekutina se stává hypertonická (Hammersted et al., 1990). Pokud teplota dále klesá, zbývající tekutina v nezamrzlých kanálkách vitrifikuje. Ve vitrifikovaném stádiu v  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  neustává pohyb molekul, ale dojde v podstatě k zastavení metabolismu buněk a ty v tomto stavu mohou zůstat životaschopné po mnoho let.

Přidáním rozpuštěných látek do vody se snižuje teplota bodu mrazu. Zatímco čistá voda mrzne při  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fyziologický roztok zamrzá při  $-0,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Přidáním více látek se teplota zamrznutí dále snižuje. Pokud je přidána kapalina, např. kryoprotektant ethylenglykol, glycerol nebo methylformamid, bod tuhnutí se také snižuje, protože tyto látky zůstávají nezmražené i při nízkých teplotách, a tak zvětšují objem nezamrzlých kanálků mezi ledovými krystaly. Tyto látky jsou propustné přes membránu, ale jejich osmotické vlivy jsou přechodné – působí pouze při přidání nebo odebrání z roztoku. Takovéto sloučeniny zvýší celkový objem nezamrzlých kanálků a snižují koncentraci solí, čímž omezují jejich škodlivé účinky (Graham, 2011b).

Rozpuštěné látky (soli, cukry, bílkoviny nebo jiné molekuly) v rozpouštědle (nejčastěji voda) se pohybují z místa o vyšší koncentraci do místa s nižší koncentrací, dokud nedosáhnou rovnováhy. Některé kryoprotektanty (ethylenglykol, glycerol, methylformamid atd.) jsou kapaliny, které figuruji v roztoku jako rozpuštěné látky nebo jako rozpouštědlo. Je mnoho látek a rozpouštědel, které mohou proniknout přes semipermeabilní membránu a jiné nemohou (Graham, 2011b). Především propustné kryoprotektanty (např. glycerol), prostupují membránou výrazně pomaleji než rozpouštědlo (voda) (Amann, 1999; Meryman, 2007). Přidá-li se glycerol do semene, bude se voda přesunovat z každé buňky, aby naředila glycerol, mnohem rychleji než se bude glycerol dostávat do buňky, a buňka se přechodně scvrkne. Glycerol pomalou difúzí do buňky dosáhne rovnováhy na obou stranách membrány, vyrovná se i množství vody a buňka se vrátí do původní velikosti. Na druhé straně, pokud buňky obsahují kryoprotektant (glycerol) a zředí se roztokem bez kryoprotektantu (ředidlo nebo tekutina pohlavního ústrojí klisny), voda bude pronikat do buněk ve snaze naředit koncentraci kryoprotektantu rychleji, než bude kryoprotektant unikat z buňky, a v důsledku toho bude buňka bobtnat (Hammersted et al., 1990; Amann, 1999; Meryman, 2007). Kryoprotektant pomalou difúzí dosáhne rovnováhy a pokud buňka nepraskla, získá svůj původní objem. Schopnost buněk odolávat prasknutí závisí na propustnosti membrány vůči kryoprotektantu a vodě (buňka bude bobtnat méně s kryoprotektanty, které difundují přes membránu rychleji) (Graham, 2011b). Záleží rovněž na toleranci k změnám osmotického tlaku a na velikosti a tvaru buňky (Hammersted et al., 1990; Meryman, 2007).

## Poškození buněk během mražení

Poměrně vysoké procento spermií utrpí během zmrazování ireverzibilní poškození. Funkční poruchy jsou zapříčiněny odchylkami ve vlastnostech membránových lipidů, narušením cytoskeletu a změnami jaderné skladby, což je důsledek citlivosti spermií na změny teploty, vliv osmotických a oxidačních stresorů a vnitřních toxických vlastností přidaných kryoprotektantů (Brinsko et al., 2011). Poškození buněk během mražení a rozmrazování nastává kolem teploty 0 °C, která vyvolává chladový šok, extracelulární a hlavně intracelulární tvorbu ledu (Mazur, 1984). Poškození spermií může způsobit i dehydratace vlivem zmrznutí tekutiny okolo buněk včetně zvýšené koncentrace solí a narušení membrány v důsledku bobtnání a smršťování (Hammersted et al., 1990) a také osmotické změny v průběhu přidávání a odstraňování kryoprotektantu (Hammersted et al., 1990; Amann, 1999; Meryman, 2007).

U většiny buněk je příčinou smrti během mražení a rozmrazování tvorba intracelulárního ledu a poškození membrány (Hammersted et al., 1990; Meryman, 2007). Vzhledem k nízkému množství aktivní vody uvnitř spermie (cca 15 %) není tvorba intracelulárního ledu hlavním problémem spermie (Morris et al., 2007). Jakmile nezamrzlé kanálky vitrifikují, už k žádnému významnému poškození nedojde. Proto není problém spermie skladovat v -196 °C (Graham, 2011b). Nicméně změny, které nastanou v extracelulárním médiu a buňkách mezi -15 °C a -60 °C, mohou vyvolat poškození buněk (Hammersted et al., 1990). Rychlost chlazení v tomto rozmezí ovlivňuje míru zamrznutí a hypertonické změny v nezamrzlých kanálcích, které probíhají před vitrifikací (Graham, 2011b). Pokud jsou buňky chlazeny příliš rychle, intracelulární voda nemá dostatek času opustit buňku a dojde k vytvoření intracelulárního ledu (Amann, 1999). Na druhé straně, je-li teplota snižována příliš pomalu, mohou být buňky vystaveny nadměrným hypertonickým podmínkám příliš dlouho, než dojde k vitrifikaci (Graham, 2011b).

K malé změně objemu buňky dochází, jsou-li buňky zchlazeny z teploty místnosti na několik stupňů pod nulou, výraznější změny pak souvisejí se změnami v membráně a přestavbou membránových komponent. Extracelulární roztok začíná mrznout, voda se mění v led a buňky vystavené hypertonickému prostředí se smršťují (Graham, 2011b). Při zmenšování buněk dochází k deformaci membrány, která může vést až k jejímu poškození (Hammersted et al., 1990).

### 3.3.6 Typy ředidel

Ředidlo samotné a zpracování spermatu může mít významný vliv na výsledek konzervace spermatu. Po skladování ID musí být zachována motilita, integrita membrány, mitochondrií a chromatinu (Aurich, 2011). To by nebylo možné bez přidání ředidla, které musí splňovat určité požadavky: osmolarita stejná nebo mírně vyšší než má sperma (300-400 mOsm / l), obsahuje komponenty na stabilizaci pH (6,7-7,2) a kontrolu růstu mikroorganismů, složky, které chrání sperma před chladem a snadno dostupný zdroj energie (metabolizovatelný substrát). Dále také obsahuje látky stabilizující membránu a metabolické funkce spermií a komponenty neutralizující produkty metabolismu. Žádná ze složek ředidla nesmí ovlivňovat výsledky hodnocení spermatu (Aurich, 2011; Brinsko, 2011b).

Jako ochranné složky, které pomáhají spermiím přežít mimo reprodukční trakt, obsahují ředidla komponenty, např. lipoproteiny a fosfolipidy (z vaječného žloutku, mléka, odstředěného mléka, smetany a sojových výrobků), zabraňující vzniku chladového šoku stabilizací buněčné membrány při ředění chlazeného hřebčího spermatu (Graham, 2011a; Brinsko et al., 2011).

Ředidla musí obsahovat metabolizovatelné substráty, cukry jako je například glukóza, které poskytují bohatý zdroj energie pro spermie (Brinsko et al., 2011).

Mikroorganismy mohou negativně ovlivnit životnost spermií během skladování (Aurich a Spengler, 2007). Kontaminaci spermatu během odběru se nelze zcela vyhnout, ale ředidla musí být sterilní. Bakterie v ředidle mohou pocházet z mléka, žloutku nebo z kontaminace během výroby ředidla či při manipulaci s ním. Sterilita všech komponent ředidla by měla být pečlivě hlídána během výroby a skladování. Výrobci běžně testují bakteriální kontaminaci svých produktů. Manipulace s ředidlem má velký význam. Po otevření a zahřátí na teplotu těla by nemělo být skladováno po dlouhou dobu, ale nejlépe použito okamžitě (Aurich, 2011).

Do většiny ředidel jsou přidávána antibiotika pro zpomalení nebo zabránění růstu a množení bakteriálních organismů (Varner et al., 1998; Brinsko et al., 2011). Používaná antibiotika jsou například amikacin, Penicilin G, polymyxin B, ticarcillin, Timentin a gentamicin (Aurich, 2011; Brinsko et al., 2011; Samper, 2011). Kombinace penicilinu a gentamicinu efektivně inhibuje růst mnoha mikroorganismů nacházejících se ve spermatu a má nízké spermatotoxické účinky (Aurich, 2011). Brinsko et al. (2011) uvádí, že kombinace penicilinu a amikacinu nebo Timentinu v mléčném ředidle mohou optimalizovat dlouhodobou motilitu spermií a zároveň poskytovat dobrou širokospektrální antibakteriální aktivitu.

Samper (2011) doporučuje nepoužívat polymyxin B, protože má škodlivý vliv na motilitu spermií.

Konečná koncentrace antibiotik v ředidle je důležitá, aby nedošlo k žádnému negativnímu účinku na životaschopnost a funkčnost spermií (Aurich, 2011; Brinsko et al., 2011). Maximální tolerovaná hladina antibiotik je dána složením ředidla (Aurich, 2011). Gentamicin v koncentraci 1 mg / ml neměl negativní vliv na sperma v Kenneyho ředidle (Varner et al., 1998), ale měl nepříznivý vliv na dlouhověkost spermií v jiném mléčném ředidle – EquiPro (Minitube of America, Verona, WI). Po snížení koncentrace gentamicinu na stále účinnou hladinu 250 µg / ml nebyly zjištěny žádné škodlivé účinky na kvalitu semene (Aurich a Spengler, 2007).

Antibiotika mohou být účinná pouze při teplotě vyšší než 15 °C, svou funkci plní po naředění a během chlazení pouze asi 3-6 hodin. Po dosažení skladovací teploty (4-8 °C) nemají téměř žádný efekt. Růst a množení bakterií jsou při teplotě 5 °C velmi nízké. Je tedy zřejmé, že mnoho antibiotik nezabíjí bakterie, ale pouze je inhibuje. Přímému působení přítomných bakterií nebo jejich toxinů se proto nelze vyhnout i za přítomnosti antibiotik (Aurich a Spengler, 2007). Je tedy velmi důležité dodržovat během odběru a zpracování optimální hygienická opatření, aby se bakteriální kontaminace minimalizovala (Aurich, 2011). Bakteriální flóra hřebce a vliv jednotlivých antibiotik na spermie se může lišit mezi hřebci (Samper, 2011).

V případech, kdy skladovací teplota překročí 10-12 °C, mohou být zapotřebí antimykotika pro eliminaci kvasinek a plísní (Brinsko et al., 2011).

Osmotický tlak a pH musí být přizpůsobeny tak, aby se maximalizovalo přežití spermií (Brinsko et al., 2011). Osmolarita spermatu je přibližně 300 mOsm / l, u ředidla se může pohybovat mezi 250-400 mOsm / l. Pro dlouhověkost hřebčího spermatu je vhodná mírná hyperosmolarita kolem 350 mOsm / l (Aurich, 2011).

pH 6,6 až 7,2 může optimalizovat pohyblivost spermií a zároveň zamezit předčasné kapacitaci spermií (Aurich, 2011; Brinsko et al., 2011). Pufry přidávané do ředidla jsou hlavně hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ ), citrát sodný a HEPES (2-hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonová kyselina). Nejlepší pufrovací schopnosti má hydrogenuhličitan sodný, který udržuje pH 6,8-7,2, pak HEPES (pH 7-8) a citrát sodný (pH okolo 8). Pufrovací schopnost mají také mléčné komponenty ředidla (Aurich, 2011).

Ředidla by měla být schopna neutralizovat metabolické látky, které mohou vést k poškození spermií během skladování (Aurich, 2011). Ředění spermatu s ředidlem na bázi mléka vede samo o sobě ke zvýšení antioxidační schopnosti naředěného semene vzhledem

k pozitivní interakci mezi SP a ředidlem (Kankofer et al., 2005). Použití antioxidantů jako je kyselina askorbová nebo pyruvát, může zachovat kvalitu chlazeného spermatu během skladování (Bruemmer et al., 2002).

Různá ředidla jsou komerčně dostupná, některá mohou být snadno připravena v laboratořích reprodukčních center (Brinsko, 2011a; Brinsko et al., 2011). Používají se hlavně dva typy ředidel: mléčná a žloutková. Zatím nebylo prokázáno, zda má lepší vliv na životaschopnost a plodnost spermií ředidlo s vaječným žloutkem nebo mlékem. Ředidla obsahující mléko a nějaký cukr jsou častěji používána na celém světě, než ředidla s vaječným žloutkem (Brinsko et al., 2011).

### 3.3.6.1 Mléčná ředidla

Dnešní ředidla pro hřebce mohou obsahovat mléko, ideálně odstředěné mléko se sníženým obsahem tuku nebo sušené odstředěné mléko (Brinsko, 2011a; Brinsko et al., 2011; Sieme, 2011b). Dřívější ředidla obsahovala protein želatiny, ale dnes se již nepoužívají (Sieme, 2011b). Dále obsahují zdroj energie (např. glukózu) a antibiotika k zamezení množení bakterií. Při použití gentamicinu nebo amikacinu se přidává pufr hydrogenuhličitan sodný (8,4%) pro úpravu pH. Ředidlo se následně doplní sterilní deionizovanou vodou (ne fyziologickým roztokem). pH ředidla by mělo být v rozmezí 6,7-7,2 (Brinsko, 2011a). Složení typického mléčného ředidla – odtučněná mléčná sušina 2,4 g, glukóza 4,9 g, amikacin 100 mg, hydrogenuhličitan sodný (8,4%) 2 ml, sterilizovaná deionizovaná voda 92 ml (Brinsko, 2011a). Konkrétní složení některých mléčných ředidel je uvedeno v tabulce 3.2.

Některé komponenty mléka jsou pro přežití spermií prospěšné, jiné zničující (Batellier et al., 1997). Na životaschopnost spermií působí kladně například mléčný komponent nativní fosfokaseinát, který může být použit do ředidla místo sušeného odtučněného mléka (Batellier et al., 1997; Brinsko et al., 2011). Bylo zjištěno, že nativní fosfokaseinát nebo kasein v ředidle byly lepší pro zachování motility spermií po zchlazení semene na 24-48 hodin než odtučněné sušené mléko. Další výhodou je nepřítomnost pevných částic, které se obvykle v sušeném odstředěném mléce vyskytují, a tím zlepšení mikroskopického pozorování pohyblivosti spermií (Brinsko et al., 2011).

Ředidlo s odtučněným sušeným mlékem a glukózou (NFDSMG), pojmenované po vynálezci Dr. Robertu M. Kenney, je dostupné v mnoha provedeních (např. E-Z Mixin [Animal Reproduction Systems, Chino, CA]). Použití ředidel NFDSMG se doporučuje jak pro

skladování hřebčího spermatu, tak pro mikroskopické hodnocení spermií (Sieme, 2011b). **Kenneyho ředidlo** je nejčastěji doporučované ředidlo pro hřebce (Samper, 2011).

Ředidla vycházející z původního receptu podle Kenney et al. (1975) obsahující sušené odstředěné odtučněné mléko a glukózu (NFDSMG) jsou levná, snadno vyrobitelná a mohou být uložena zmražená (Aurich, 2011). Komerčně dostupná ředidla na základě Kenneyho ředidla se dodávají v práškové podobě a musí být naředěna daným objemem redestilované vody (Brinsko, 2011b). Hlavní rozdíly mezi těmito ředidly jsou v druzích obsažených antimikrobiálních látek nebo přidání dalších cukrů, např. sacharózy (Brinsko, 2011b; Samper, 2011).

Ředidlo NFDSMG zachovává lepší motilitu spermií než odstředěné mléko, ale v udržení fertility se od sebe významně neliší (Brinsko et al., 2011). Všechna mléčná ředidla lze použít jak pro centrifugaci, tak i pro skladování po 24-48 hodin při teplotě 4-6 °C se zachováním motility, membránové integrity a fertility (Aurich, 2011).

Pokud je nutné odstředování a skladování chlazeného spermatu, Padilla a Foote (1991) uvádějí lepší kvalitu spermií s použitím Kenneyho ředidla doplněným o Tyrode medium (KMT), který je ve směsi v poměru 35 % Tyrode medium + 65 % Kenney.

Dalším ředidlem hojně používaným v Evropě je INRA 82, které obsahuje odtučněné mléko (Sieme, 2011b). **INRA 82**, ředidlo z Francie, se liší od NFDSMG obsahem cukrů, kdy vedle glukózy, laktózy a rafinózy obsahuje další cukry, a také větším množstvím přidávaných pufovacích látek – HEPES, citrát draselný a citrát sodný. Jedinou mléčnou složkou tohoto ředidla je nativní fosfokaseinát (Aurich, 2011).

Ředidlem vhodným k výrobě inseminační dávky je i **INRA 96** vyvinuté francouzskými pracovníky. Ředidlo INRA 96 s definovaným a stálým složením se stalo jedním z nejpopulárnějších ředidel pro koně (Brinsko et al., 2011) a je komerčně dostupné po celém světě. Jde o vyvážený solný roztok obohacený o fosfokaseinát a je dobře snášeno spermii mnoha hřebců (Brinsko et al., 2011; Samper, 2011). INRA 96 obsahuje Hankovy soli, HEPES, glukózu, laktózu a nativní fosfokaseinát z mléka, který je zdrojem bílkovin a chrání membránu spermie proti chladu. Ostatní mléčné složky byly z tohoto ředidla vyloučeny pro svou potenciální škodlivost (Brinsko et al., 2011; Aurich, 2011). Avšak antibiotická úroveň není pro některé hřebce dostačující (Brinsko, 2011b; Brinsko et al., 2011), proto je vhodné doplnit toto ředidlo o Timentin (1 mg / l), který pomáhá kontrolovat růst bakterií bez narušení osmolarity nebo pH (Brinsko, 2011b).

V Německu bylo vyvinuto další ředidlo s mléčnou bílkovinou podobné INRA 96 – ředidlo **EquiPro** (Pagl et al., 2006). Přesné složení nebylo zveřejněno (Brinsko, 2011b), ale je

známo, že obsahuje definované kaseináty, syrovátkové bílkoviny a větší množství cukrů namísto odstředěného sušeného mléka. V porovnání s Kenneyho ředidlem mělo lepší výsledky při chlazení a skladování spermatu po dobu 48 hodin (Pagl et al., 2006).

Tabulka 3.2: *Složení některých mléčných ředidel*

|                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NFDSMG – ředidlo Kenney</b><br>(Kenney et al., 1975)                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- odtučněné sušené mléko (NFDSM) 2.4 g</li> <li>- glukóza 4.9 g</li> <li>- gentamicin 100.0 mg</li> <li>- NaHCO<sub>3</sub> (8,4%) 2.0 ml</li> <li>- deionizovaná voda 92.0 ml</li> </ul>                    |
| <b>E-Z Mixin</b><br>(Province et al., 1985)                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- odtučněné sušené mléko 2.4 g</li> <li>- glukóza 4.9 g</li> <li>- NaHCO<sub>3</sub> (7,5%) 2.0 ml</li> <li>- polymyxin B (50 mg / ml) 2.0 ml</li> <li>- destilovaná voda 92.0 ml</li> </ul>                 |
| <b>Modifikované Kenneyho ředidlo</b><br>(Brinsko et al., 2011)             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- nízkotučné sušené mléko (24 g)</li> <li>- glukóza (26,5 g), sacharóza (40 g)</li> <li>- 907 ml vody</li> <li>- Penicilin G (1 000 000 IU), amikacin (1 g)</li> <li>- pufr pH 6,8-6,9</li> </ul>            |
| <b>Ředidlo na bázi odstředěného mléka</b><br>(Brinsko et al., 2011)        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml odstředěného mléka – zahřáté na teplotu 92-95 °C po dobu 10 min.</li> <li>- polymyxin B (1 000 000 IU)</li> </ul>                                                                                   |
| <b>Smetanovo-želatinové ředidlo</b><br>(Brinsko et al., 2011)              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,3 g nearomatizované želatiny rozpuštěné v 10 ml sterilní deionizované vody</li> <li>- 90 ml smetany</li> <li>- Penicilin G (1 000 000 IU), streptomycin (100 000 µg), polymyxin B (20 000 IU)</li> </ul> |
| <b>Modifikované smetanovo-želatinové ředidlo</b><br>(Brinsko et al., 2011) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 litr smetany</li> <li>- 6 g želatiny rozpuštěné v 40 ml 5% dextrózy</li> <li>- Penicilin G (1 000 000 IU) nebo amikacin (0,5 g)</li> </ul>                                                               |



Ve studii LeFrappera et al., 2010 bylo použito 6 komerčně dostupných ředidel. Ředidlo EZ Mixin, které obsahuje glukózu, odtučněné sušené mléko a v této studii antibiotika amikacin a Penicilin G. Kenneyho ředidlo (NASCO, Fort Atkinson, WI) obsahující odtučněné sušené mléko a glukózu a antibiotickou ochranu zajišťuje amikacin a Penicilin G. Ředidlo Universal (NASCO, Fort Atkinson, WI) obsahuje také sušené netučné mléko s dvěma cukry, glukózou a sacharózou a byla použita stejná antibiotika jako u předchozích. Ředidla EquiPro a EquiPro CellGuard (Minitube of America, Verona, WI) obsahují definované kaseináty a syrovátkové bílkoviny s cukry sacharózou a glukózou. U obou bylo použito antibiotikum gentamicin (LeFrappier et al., 2010). Posledním použitým ředidlem bylo INRA 96 (IMV, Maple Grove, MN) s obsahem nativního fosfokaseinátu, glukózy a laktózy (Aurich, 2005) a antibiotik penicilinu, gentamicinu a fungicidu amfotericinu B. Každý odebraný ejakulát byl rozdělen a naředěn v uvedených ředidlech, zchlazen a skladován při teplotě 4 °C. Pomocí počítače byla hodnocena motilita (celková a progresivní) ihned po odběru, a dále za 24, 48 a 72 hodin. Sperma ředěné ředidly INRA 96, EquiPro a EquiPro Cell Guard si zachovalo většinu motility v průběhu 72 hodin. Celková i progresivní motilita během skladování podle očekávání poklesla, ale u všech sledovaných ředidel v přijatelném rozsahu za 24 hod. po odběru, což je doporučená doba pro inseminaci chlazenou inseminační dávkou (LeFrappier et al., 2010).

### 3.3.6.2 Žloutková ředidla

Pro minimalizování škod vznikajících na membráně spermií během chlazení může být do semene hřebce přidána řada látek (Graham, 2011a). Velmi užitečný je vaječný žloutek, který zabraňuje vzniku chladového šoku buněk (Phillips a Lardy, 1940). Během chlazení jsou pro buňky ze žloutku podstatné látky jako je LDL – *low density lipoprotein* (nizkodenzitní lipoprotein – cholesterol navázaný na bílkovinu) (Pace a Graham, 1974; Watson, 1976) a fosfolipidové části lipoproteinů (Kampschmidt et al., 1953; Watson, 1976; Parks et al., 1981). Mechanismus, jak lipoproteiny a fosfolipidy ovlivňují spermie, není znám, ale tyto přidané látky nezasahují do membrány (Foulkes, 1977) a mohou být odstraněny omytím buněk (Watson, 1976; Quinn et al. 1980). Komponenty vaječného žloutku, zdá se, stabilizují membrány spermií a tím neutralizují škodlivé vlivy během ředění a chlazení (Aurich, 2011).

Ředidla obsahující vaječný žloutek poskytují srovnatelné výsledky jako mléčná ředidla, ale jsou složitější na zpracování, což často vede k horší kvalitě semene nebo ke zhoršení

fertility (Malmgren et al., 1994). Na bázi vaječného žloutku je například glycinové-žloutkové ředidlo Dimitropoulos – ředidlo D11 (Wöckener a Colenbrander, 1993).

Složení žloutkového ředidla: 1 000 ml bidestilované vody, 30 g glukózy, 20 g laktózy, 100 g vinanu sodnodraselného, 200 ml žloutku, 60 ml 10% kyseliny paraaminobenzoové, příměs antibiotik penicilinu, streptomycinu a gentamicinu (Věžník a kol., 2000).

V poslední době byla vyvinuta ředidla snažící se eliminovat možný negativní vliv biologických látek, které mohou být obsaženy v mléce nebo vaječném žloutku. Náhrada vaječného žloutku v ředidle sojovým lecitinem byla provedena s omezeným úspěchem. K dispozici je ředidlo pro hřebce na bázi sóji – AndroMed E (Minitube, Německo). Kvalita chlazeného spermatu zpracovaného s AndroMed E je nižší než s použitím mléčného ředidla, pokud doba skladování přesáhne 24 hodin (Aurich et al., 2007).

### **3.3.7 Ředidla používaná k výrobě mražené ID**

Ředidla s dobrými výsledky pro mražení ID musí obsahovat zdroj energie a lipoproteinů (např. mléko, vaječný žloutek nebo jejich kombinaci) pro ochranu během rychlého ochlazování, antibiotika k inhibici růstu a množení bakterií, pufrů k vyvážení pH a osmotického tlaku, elektrolyty, antioxidanty a kryoprotektanty (Barbas a Mascarenhas, 2009; Loomis, 2011a; Sieme, 2011b; Brinsko et al., 2011).

Cukry jako glukóza, sacharóza, manóza, laktóza, samostatně nebo v kombinaci dodávají spermiím energii, působí jako kryoprotektivní činitelé nepronikající membránou spermie a jsou hlavní rozpuštěnou látkou poskytující osmotickou rovnováhu roztoku. Lipidy a lipoproteiny především z vaječného žloutku se těsně spojují s povrchem plazmatické membrány a mohou podpořit ochranu spermií při mražení a rozmrazování (Loomis, 2011a). Různé kryoprotektanty (glycerol, methylformamid, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid (DMSO), ethylenglykol a propylenglykol) mohou být použity jednotlivě, nebo v kombinaci (Brinsko et al., 2011; Loomis, 2011a).

Kromě zdroje energie, proteinů a ochranných látek jsou do ředidla k mražení přidány další důležité látky (Sieme, 2011b). Trimeche et al., (1999) udává optimální koncentraci aminokyselin v ředidle 30-50 mM. Ve vyšších koncentracích (120-160 mM) snižují motilitu po rozmrazení. Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) se často přidává do ředidla pro hřebce jako chelatační činidlo na vázání vápenatých iontů, jimž zabraňuje vstupu do spermie a její poškození během chladového šoku (Sieme, 2011b).

Množství základních látek v jednotlivých ředidlech je velmi variabilní a optimální úroveň jedné složky může záviset na obsahu jiné příměsi, proto je důkladné pochopení

kryokonzervačního procesu a reakcí spermií na zmrazování a rozmrazování velmi důležité pro rozvoj nebo progresivní změnu ředidel. Je také třeba si uvědomit, že motilita neznamena nutně plodnost (Barbas a Mascarenhas, 2009; Loomis, 2011a). U každého nového ředidla, které má přijatelnou motilitu po rozmrazení, má-li být přijato do komerčních protokolů, musí být prokázána také dobrá oplozovací schopnost (Loomis, 2011a).

K dispozici jsou různá ředidla vhodná ke kryokonzervaci hřebčího spermatu, ale není prokázáno, zda je jedno výrazně lepší než druhé (Sieme, 2011b; Brinsko et al., 2011). Celosvětově se dnes používají dva až tři typy (Sieme, 2011b). Podle výzkumu Sampera a Morrise (1998) se používá nejčastěji ředidlo laktózová EDTA, jako další INRA 82 s různými koncentracemi vaječného žloutku a glycerolu a v omezené míře se používá ředidlo na bázi sacharóza-vaječný žloutek (modifikovaný Kenney). U spermatu ředěného INRA 82 je uváděna lepší pohyblivost po rozmrazení než u spermatu ředěného v laktóza-glukóza-EDTA ředidle (Heitland et al., 1996). Záměna glukóza-EDTA za ředidlo Kenney v modifikaci laktóza-glukóza-EDTA zvýší pohyblivost spermií po rozmrazení (Schembri, 2003).

Při zmrazení spermatu s ředidlem Kenney místo INRA 82 byla motilita spermií po rozmrazení vyšší, ale podíl neporušených akrozómů byl nižší stejně jako procento zabřeznutí (Kenney 38 %, INRA 82 63 %) (Ecot et al., 2001). Snížená fertilita může být způsobena obsahem bikarbonátu v ředidle Kenney (Vidament, 2005), který může vyvolat předčasnou kapacitaci spermií (Sieme, 2011b).

Ředidla pro mražení inseminační dávky nebo jejich kombinace s centrifugačním médiem jsou často komerčně dostupná a chráněná patentem jako tzv. „ready to use“ tekutiny, např. E-Z Freezin-„LE“ (laktóza-EDTA) a E-Z Freezin-„MFR5“ (Animal Reproduction Systems, Chino, CA), Ghent (Minitube, Německo), EqcellSire A+B (IMV, Francie), BotuCrio (Botupharma, Brazílie), INRAFreeze (IMV, Francie), a EquiPro CryoGard (Minitube, Německo). Komerční ředidla jsou sterilní, standardizované kvality, zatímco individuálně připravovaná se v tomto aspektu značně liší. Doporučuje se preferovat komerčně dostupná ředidla při přísném dodržování pracovního postupu, aby nedošlo ke kontaminaci anebo chybě při rozpouštění sušených přípravků, což může vést ke snížení kvality naředěného spermatu. S využitím ředidel „ready to use“ je možné se těmito problémům vyhnout (Sieme, 2011b).

### 3.3.7.1 Kryoprotektanty

Kryoprotektanty se většinou dělí do dvou skupin dle schopnosti prostupovat buněčnou membránou, na ty pro které je plazmatická membrána buněk nepropustná a ty pro které je propustná (Sieme, 2011b; Graham, 2011b).

Kryoprotektanty neprostupné membránou jsou cukry (včetně laktózy, rafinózy, sacharózy, manózy a trehalózy), aminokyseliny, různé proteiny (lipoproteiny, včetně vaječných, mléčných a séra) a další makromolekuly (např. methylcelulóza, polyvinylalkohol a polyvinylpyrrolidon) (Sieme, 2011b; Graham, 2011b). Interakce těchto látek se složkami plazmatické membrány přispívá k její stabilizaci a především tyto kryoprotektanty vytváří hyperosmotické prostředí, které indukuje dehydrataci buněk (Graham, 2011b). Je předpoklad, že neprostupující látky dehydratují buňky, což umožňuje jejich rychlé zchlazení bez letálního poškození (McGann, 1978; Graham, 2011b).

Kryoprotektanty propustné membránou jako ethylenglykol, glycerol, propylenglykol, DMSO (dimethylsulfoxid) a různé amidy (např. dimethylformamid, methylformamid) jsou obecně účinnější než první skupina kryoprotektantů (Sieme, 2011b; Graham, 2011b). Kryoprotekce látek prostupujících membránou spočívá ve snížení teploty, při níž jsou buňky vystaveny kritické koncentraci solí (Sieme, 2011b). Prakticky nahrazují vodu uvnitř buňky. Dehydratace buňky zabrání tvorbě intracelulárního ledu (Meryman, 2007). Zvýšením objemu nezamrzlých kanálků v extracelulárních ledových krystalech dochází ke zvětšení dostupného prostoru pro buňky a zároveň ke snížení koncentrace solí (Amann, 1999).

Vysoké koncentrace kryoprotektantů při přidávání a odstraňování mohou kriticky ovlivňovat osmotický tlak a tím být pro spermie toxické (Woods et al., 2004; Amann a Pickett, 1987). Je-li překročen maximální osmotický tlak, buněčné smršťování v důsledku dehydratace způsobené koncentrací kryoprotektantu a následné bobtnání při jeho odstraňování může vést k poškození buněk (Sieme, 2011b). Jelikož jeho molekuly pronikají membránou pomaleji než voda, dojde k přechodné změně osmotického tlaku, což může vést k poškození buňky. Spermie lidské a býčí zvládají tyto změny relativně dobře, na rozdíl od hřebčích a drůbežích. Z tohoto důvodu je důležité vyrovnat množství kryoprotektantu tak, aby dostatečně ochránilo spermie a zároveň pro ně bylo ještě tolerovatelné (Graham, 2011b). Demick et al. (1976) poukázal na škodlivé účinky glycerolu na hřebčí spermie, které jsou citlivé na změny osmotického tlaku vyvolané přidáním nebo odebráním glycerolu. Ředidla pro kryokonzervaci pro býky obsahují běžně 7-8 % glycerolu, pro hřebce pouze 4-5 % (Graham, 2011b).

#### 3.3.7.1.1 KRYOPROTEKTANTY NA BÁZI LIPIDŮ

Cytoplazmatická membrána spermie jako hlavní fyzická bariéra od vnějšího prostředí je místem nejčastějšího poškození během mražení. Vady na membráně mohou vzniknout její destabilizací v důsledku přeskupení lipidů, ztrátou membránových lipidů či jejich peroxidací v důsledku tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS).

Nejčastějšími lipidy v ředidlech určených k mražení ejakulátu jsou lipidy vaječného žloutku a v menší míře obsažené i v mléce. Předpokládaný mechanismus ochrany spermie během mražení a zahřívání spočívá ve vytvoření vratné vazby mezi lipidy v SP a fúzí lipozómů s plazmatickou membránou.

Vaječný žloutek a mléko jako látky živočišného původu nemají jednotné složení a představují potenciální riziko kontaminace spermatu. Je snaha nahradit živočišné složky a vytvořit tak chemicky definovaná ředidla s optimálním složením splňující požadavky na biologickou bezpečnost (Sieme, 2011b).

#### **Mléko a mléčné komponenty**

Pro krátkodobé i dlouhodobé uchování spermií se používá odstředěné nebo neodstředěné mléko společně s glycerolem. Používají se například ředidla NFDSMG dostupná v mnoha provedeních, ředidlo INRA 82, INRA 96 nebo EquiPro (Sieme, 2011b).

Mléko je variabilní médium a jeho mechanismus účinku na spermie není zcela znám. Některé jeho složky mohou být pro spermie škodlivé. Mléko a mléčné komponenty se však výrazně uplatňují v prevenci chladového šoku během chlazení spermií před mražením. Spekuluje se, že to zajišťují mléčné lipidy a lipoproteiny navázáním na plazmatickou membránu spermie, čímž zajistí její stabilizaci v průběhu chlazení a mražení. Tomu však oponuje skutečnost, že efektivita odstředěného mléka (bez lipidů) je stejná jako plnotučného mléka (Sieme, 2011b).

Ve srovnání se standardními ředidly zachovává pohyblivost a plodnost spermií po dobu 3 dnů nejlépe mléčný nativní fosfokaseinát (NPPC) (Batellier et al., 1998). Bylo prokázáno, že ochranný účinek na spermie hřebce má také mléčný protein  $\beta$ -laktoglobulin, jehož optimální koncentrace je 45 g / l pro skladování při teplotě 4 °C a 15g / l při teplotě 15 °C (koncentrace  $\beta$ -laktoglobulinu v kravském mléce je 2,7 g / l). Nicméně ochrana spermií  $\beta$ -laktoglobulinem je nižší než jakou poskytuje NPPC. Není zcela jasné, jak kasein chrání spermie, ale předpokládá se, že mléko (homogenizované i odstředěné) obsahuje faktory, které jsou schopné ovlivnit proteiny vázající pro skladování spermií potencionálně škodlivé lipidy v SP (HSP-proteiny hřebčí semenné plazmy). Pravděpodobný hlavní mechanismus ochrany

spermií mlékem je tudíž dán interakcí bílkovin semenné plazmy s kaseinem. Kromě toho přidání laktózy do ředidla s kaseinem zlepšuje jeho účinnost při mražení (Sieme, 2011b). Zdá se, že laktóza se také zapojuje do ochrany spermií, ale pokud byl použit filtrát mléka obsahující pouze laktózu a minerální látky, nebyla ochrana spermatu během skladování dostatečná (Pagl et al., 2006). Laktóza je rovněž součástí ředidel k mražení s vaječným žloutkem. Je zřejmé, že laktóza zlepšuje účinnost ředidla, ale nedostačuje k ochraně spermií samostatně (Sieme, 2011b).

Ředidla obsahující mléčný kasein jsou k dispozici pod názvem INRAFreeze (IMV, Francie) (Sieme, 2011b).

### **Vaječný žloutek**

Vaječný žloutek se v ředidlech používá v koncentracích o rozmezí 2-25 %. Ve žloutku jsou obsaženy lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), které jsou pravděpodobně zodpovědné za ochranu spermie. Vzhledem k neprůhlednosti vaječného žloutku není vhodný k ředění pro mikroskopické hodnocení spermatu. Ředidlo s vaječným žloutkem se z důvodu projasnění roztoku doporučuje centrifugovat (Sieme, 2011b). K rozpuštění lipidů a lipoproteinů vaječného žloutku a tím zvýšení jejich interakce s membránou spermie mohou být přidány detergenty, např. Equex STM (delta-amino-sodný laurylsulfát; Minitube, Německo) (Amann a Pickett, 1987).

Předpokládá se, že se LDL z vaječného žloutku naváže na membránu spermie a tím ji stabilizuje. Kromě toho se spekuluje, že fosfolipidy přítomné v LDL chrání spermie vytvořením ochranného filmu na jejich povrchu, nebo nahrazením membránových fosfolipidů ze semenné plazmy, které jsou ztraceny nebo poškozeny v průběhu kryokonzervace. Další hypotézou je, že LDL konkuruje škodlivým peptidům SP ve vazbě na membránu spermie a tím ji chrání (Sieme, 2011b).

Parametry motility spermií jsou lepší, pokud se použije jiný než kuřecí vaječný žloutek, např. je-li sperma zmrazeno v laktózovém ředidle EDTA s doplněním kachního vaječného žloutku, který obsahuje vyšší množství bílkovin, lipidů a cholesterolu (Clulow et al., 2007).

### **Fosfatidylcholin**

Proces mražení a tání vyvolává rozsáhlé přeskupování membránových lipidů, fosfatidylcholinu z vaječného žloutku nebo sóji se připojí k membráně spermií a přestože nejsou do membrány zabudované, ochrání ji před poškozením. Ve srovnání s ředidlem obsahujícím vaječný žloutek (INRA 82) sojový i vaječný fosfatidylcholin uchovávají životaschopnost a

pohyblivost u rozmražených spermií stejně dobře. Spermie kryokonzervované v ředidle se sojovým fosfatidylcholinem vykazují stejnou schopnost oplodnění jako spermie zmražené v INRA 82. Použití médií se sojovým fosfatidylcholinem místo vaječného žloutku snižuje riziko mikrobiální kontaminace (Sieme, 2011b).

Náhrada vaječného žloutku sojovým lecitem v ředidle se úspěšně využívá pro kryokonzervaci spermatu skotu (Aires et al., 2003). Modifikace tohoto ředidla určená pro koně Andromed-E neobsahuje žádné složky živočišného původu, což je důležité hlavně z hlediska hygienických požadavků na ID určené pro export (Sieme, 2011b).

#### 3.3.7.1.2 GLYCEROL

Prvním a dodnes nejpoužívanějším kryoprotektantem především u skotu je glycerol (Sieme, 2011b). Přestože se předpokládá, že je pro koňské sperma toxický, je nadále v malé koncentraci využíván z důvodu nedostatku látek s podobnými ochrannými vlastnostmi (Morel, 2003).

Doporučená koncentrace glycerolu se mezi jednotlivými laboratoři liší, přičemž optimum dosud není stanoveno (Sieme, 2011b). Jeho částečná toxicita je dána vlivem osmotického stresu na spermie, neboť glycerol prostupuje membránou nejpomaleji ze všech kryoprotektantů (Gilmore et al., 1995). Pace a Sullivan (1975) a Demick et al. (1976) uvádějí, že glycerol má negativní vliv na plodnost chlazeného čerstvého spermatu koňovitých.

Při oplodnění klisen spermatem mraženým v INRA 82 s různou koncentrací glycerolu (0 %; 2,2 %; 3,5 %; 4,8 %) byla zjištěná následující plodnost: 13/15 (86 %), 8/15 (53 %), 8/15 (53 %), 2/15 (13 %), dle uvedeného pořadí. Čili čím vyšší koncentrace glycerolu tím nižší fertilita (Vidament et al., 2009). Je tedy nezbytné nalézt kompromis mezi kryokonzervačním a negativním vlivem glycerolu na spermie a výslednou plodnost. Doporučená koncentrace glycerolu by neměla překročit rozmezí 2,5-3,5 % (Sieme, 2011b).

#### 3.3.7.1.3 AMIDY

Glycerol je používán jako univerzální kryoprotektant, přestože jsou známy i další, např. dimethylsulfoxid, ethylenglykol, methylformamid, dimethylformamid, které mohou mít stejné nebo i lepší výsledky (Alvarenga et al., 2005). Ideální kryoprotektant musí mít nízkou molekulovou hmotnost, výbornou rozpustnost ve vodě a minimální toxicitu. Všechny amidy mají ve srovnání s glycerolem menší molekulovou hmotnost a při mražení mohou způsobit menší osmotické poškození (Sieme, 2011b).

Ve studii Pasquini et al. (2008) bylo odebráno sperma od hřebců, kteří měli špatnou odolnost spermií vůči mražení. Sperma bylo odstředěno v mléčném ředidle (BotuSemen [Botupharma, Brazílie]) a pejeta byla následně resuspendována ředidly INRA 82, laktóza-EDTA nebo BotuCrio (které obsahuje směs kryoprotektantů) a dále zpracováno podle protokolu doporučeného pro každé ředidlo. Po rozmražení byla motilita vyšší u ředidla BotuCrio než u INRA 82 a laktóza-EDTA (Pasquini et al., 2008).

Vidament et al. (2002) udává, že počty zabřeznutí s mraženým spermatem doplněným o 2 % glycerolu, 3 % glycerolu nebo 2 % dimethylformamidu nebyly statisticky rozdílné (46 %, 58 %, 50 %). Jindy bylo naopak pozorováno významné zlepšení plodnosti spermatu zmrazeného s dimethylformamidem ve srovnání s glycerolem (Medeiros et al., 2002). Z důvodu rozdílných výsledků zmíněných studií je proto potřeba dalších rozsáhlých testů potvrzujících správnost výměny glycerolu za amidy v kryokonzervaci hřebčích spermií (Sieme, 2011b).

#### 3.3.7.1.4 CHOLESTEROL

U jednotlivých živočišných druhů je poměr cholesterolu a fosfolipidů v membráně odlišný. Membrány obsahující více cholesterolu jsou méně náchylné na poškození během chlazení a mražení. Má-li se předejít poškození spermie, je nezbytné udržet membránu v tekutém stavu i při nízkých teplotách, což lze přidáním cholesterolu (Sieme, 2011b).

Cholesterol může být snadno začleněn do membrány použitím cyklodextrinů. Cyklodextriny (cyklické heptasacharidy) mohou transportovat cholesterol do nebo z membrány po koncentračním spádu. Jako úspěšné bylo popsáno zvýšení membránové stability začleněním cholesterolu s cyklodextriny do ředidla k mražení hřebčího spermatu (Combes et al., 2001).

### 3.3.8 Výroba chlazené inseminační dávky

Chlazené inseminační dávky se v dnešní době používají velmi často (Graham, 2011a). Po odběru je sperma umístěno do inkubátoru při teplotě 37 °C. Následně jsou zaznamenány objem a barva ejakulátu a kromě toho i další charakteristiky jako je koncentrace, pohyblivost a pokud je třeba i morfologie spermií, která se posuzuje z malého množství neředěného spermatu (Samper, 2011). Má-li být ejakulát rozdělen na dávky pro více klisen, je nutné před konečným naředěním určit koncentraci, celkový počet spermií v ejakulátu a životaschopnost. V případě, že má být ejakulát zchlazen pro skladování, je důležitá volba vhodného ředidla a zvážení potřeby odstředování (Brinsko, 2011a). Sperma je nutno naředit



vhodným ředidlem během několika minut po odběru, aby byla zachována maximální životnost spermií (Morel, 2003; Brinsko et al., 2011).

Naředěné sperma od kvalitních hřebců může být uloženo v chlazeném stavu několik hodin i dní před inseminací, aniž by došlo k výraznému zhoršení fertility (Brinsko et al., 2011). Chlazené hřebčí sperma lze dnes běžně uchovávat po dobu 24-48 hodin, po této době se dramaticky sníží pravděpodobnost zabřeznutí. Během chlazení a skladování je životaschopnost spermií ovlivněna koncentrací SP, přítomností ejakulát kontaminujících bakterií, expozicí kyslíku, složením ředidla včetně použitých druhů antibiotik, rychlostí chlazení a teplotou skladování (Aurich, 2011).

Vysoký obsah SP má škodlivý vliv na chlazené sperma (Brinsko, 2011b). Pro maximální přežití spermií se doporučuje naředění spermatu minimálně 1:4 (1 díl spermatu + 4 díly ředidla), aby koncentrace SP byla méně než 20 % a konečná koncentrace spermií zůstala nad  $25 \times 10^6$  spermií v ml (Jasko et al., 1991; Loomis, 2006; Brinsko et al., 2011). Někteří hřebci mají významný pokles kvality spermatu při chlazení a skladování déle než 12 hodin. U jejich ejakulátů je vhodné částečné nebo úplné odstranění SP, aby bylo zachováno procento progresivně pohyblivých spermií po skladování (Samper, 2011). Odstředění a částečné odstranění SP může zlepšit pohyblivost spermií, které nesnášejí chlazení a skladování moc dobře (Brinsko et al., 2000).

#### 3.3.8.1 Poměry ředění

Sperma hřebců s dobrou plodností určené k okamžitému použití (eventuálně do 6 hodin po odběru) nemusí být chlazeno a převážně se ředí ředidlem v poměru 1:1 až 1:3 v závislosti na koncentraci a objemu (Brinsko, 2011a; Samper, 2011). Poměr ředění se různí dle koncentrace nativního ejakulátu a celkového počtu progresivně se pohybujících spermií (Morel, 2003; Samper, 2011). Sperma obsahující 100 miliónů spermií by mělo být ředěno v poměru 1:3. Při zvýšení počtu o každých 50 miliónů spermií v ml se poměr ředění zvýší o 1. Pokud koncentrace ejakulátu dosáhne 450-500 miliónů spermií v ml, je možné ředit až v poměru 1:10. Naředěné sperma bude mít výslednou koncentraci 25-50 miliónů spermií v mililitru, která maximalizuje míru jejich přežití in vitro (Brinsko et al., 2011; Samper, 2011). Inseminace zředěným spermatem obsahující  $100 \times 10^6$  progresivně pohyblivých spermií poskytuje velmi dobré výsledky, ale běžně je doporučena koncentrace  $500 \times 10^6$  spermií (Morel, 2003).

### 3.3.8.2 Chlazení

Rychlé zchlazování spermií z tělesné teploty na 5 °C má za následek chladový šok, proto je důležité provádět chlazení optimálním postupem (Graham, 2011a). Hřebčí spermie tolerují rychlé zchlazení na laboratorní teplotu 19 °C - 20 °C (Graham, 2011a; Katila, 2011; Samper, 2011). Nejvíce jsou citlivé na chladový šok mezi 19 °C až 8 °C (Moran et al., 1992), během této citlivé fáze by měly být pro dosažení maximální životaschopnosti chlazeny rychlostí  $\leq -0,1$  °C / min., nejlépe  $-0,05$  °C / min. (Graham, 2011a; Brinsko et al., 2011; Katila, 2011; Samper, 2011). Po dosažení 8 °C mohou být spermie bez škodlivého efektu chlazeny rychle na výsledných 5 °C (Douglas-Hamilton et al., 1984; Moran et al., 1992). Chlazení může probíhat rychleji u spermatu ředěného ředidlem obsahujícím vaječný žloutek než u semene ředěného odtučněným mlékem (Graham, 2011a). Příliš rychlé chlazení může vést k ireverzibilním změnám ve struktuře membrány oddělením lipidů a proteinů (Douglas-Hamilton et al., 1984). Lipoproteiny z vaječného žloutku nebo mléka pomáhají stabilizovat membránu, a tak umožňují adaptaci spermií na nízké teploty (Varner et al., 1988).

Přepravní kontejnery jsou konstruovány na pomalé chlazení spermatu. V Equitainerech I, II je počáteční rychlost chlazení  $-0,3$  °C / min., což neovlivní fertilizační schopnost spermií (Douglas-Hamilton et al., 1984; Brinsko et al., 2011). V jiných nádobách může být rychlost chlazení vyšší, ale pokud nepřesáhne  $-1$  °C / min., nebo naopak nebude pod  $-0,001$  °C / min., nemusí bezpodmínečně dojít ke snížení pohyblivosti při skladování 24 hod. (Douglas-Hamilton et al., 1984).

### 3.3.8.3 Teplota uchovávání

Optimální teplota skladování závisí na době, po kterou bude sperma skladováno, a také na druhu použitého ředidla (Province et al., 1985).

Po naředění musí být sperma okamžitě odstraněno z inkubátoru (37 °C). Pokud by bylo udržováno při této teplotě, dojde do několika hodin k úmrtí spermií. Skladováním semene při pokojové teplotě se sníží plodnost za 12-24 hodin (Brinsko et al., 2011).

Spermie se pomalu ochlazují a poté skladují při teplotě 4-8 °C (Brinsko et al., 2011; Samper, 2011), což je pro hřebčí sperma optimální teplota skladování po dobu 48 hod. (Douglas-Hamilton et al., 1984; Varner et al., 1988; Moran et al., 1992). Při vyšších teplotách není dostatečně utlumen metabolismus buňky a při teplotách 0-2 °C dochází k úmrtí buňky buď sníženou produkcí ATP anebo porušenou rovnováhou mezi metabolismem a schopností transportovat živiny a odpadní látky přes membránu (Graham, 2011a).

Vliv teploty byl demonstrován ve studiích Batelliera et al., (1998) a Katily (2011). Sperma uchovávané při teplotě 15 °C v aerobním prostředí po dobu 24 hodin a naředěné ředidlem INRA 96 mělo lepší výsledky oplodnění než sperma skladované při teplotě 4 °C za anaerobních podmínek a ředěné Kenneyho ředidlem (Batellier et al., 1998). Stejnou účinnost ředidla INRA 96 při 24 hodinovém skladování v 15 °C jako ve 4 °C prokázala studie Katily (2011).

#### 3.3.8.4 Skladování a přeprava

Inseminační dávka může být zchlazena a uchovávána v lednici reprodukčního centra do doby expedice, nebo může být zchlazena v přepravních kontejnerech k tomu určených. Komerčně dostupné systémy pro skladování a přepravu inseminační dávky jsou Equitainer I, II, Equitainer Clipper (Obrázek 3.2), Equine Express a Equine Semen Transporter (Brinsko et al., 2011; Samper, 2011). Před vložením do přepravní nádoby jsou inseminační dávky uloženy do plastických sáčků, nebo plastických stříkaček. Na obalu musí být uvedeny identifikační údaje hřebce a datum odběru. Další informace jsou pak uvedeny na průvodním formuláři (Brinsko et al., 2011). Většina hřebců ejakuluje více spermií, než je nutné k dosažení maximální plodnosti. Proto většina zásilek obsahuje 1 nebo 2 ID s konečnou koncentrací  $20\text{--}50 \times 10^6$  spermií v ml (Samper, 2011).



Obrázek 3.2: Equitainer I,II; Equitainer Clipper (<http://www.equitainer.com/Equine/>)

Doba přepravy v USA je obvykle 12-24 hodin, ale může být prodloužena i na více než 48 hodin u hřebců s dobrou kvalitou spermatu a tolerancí k chlazení (Katila, 2011). V ČR se dbá na co nejkratší dobu přepravy, aby inseminace proběhla v den odběru.

Přepravní kontejnery musí zajistit ochlazení ID požadovanou rychlostí, vydržet hrubé zacházení a být schopny udržet teplotu dávky i v extrémních venkovních teplotách. Přepravní nádoba by měla uchovat teplotu 4-6 °C nebo alespoň pod 10 °C po dobu 24 hodin, nejlépe 48 hodin (Katila, 2011). Udržování inseminační dávky při stabilní teplotě limituje dobu přepravy (Morel, 2003).

Rychlost chlazení závisí na velikosti, struktuře a materiálu nádoby, na chladicí kapalině a také na počáteční teplotě a objemu dávky spermatu. K dosažení vynikajících výsledků uvádějí výrobci přepravních kontejnerů informace o optimálním objemu přepravovaného spermatu (Katila, 2011). Např. Equitainer zajišťuje postupný pokles teploty o -0,3 °C za minutu až na teplotu 4-5 °C a je schopen udržet inseminační dávky při této teplotě po dobu 24-48 hodin (Morel, 2003).

Je tedy zřejmé, že nejenom v důsledku vývoje ředidel, ale také přepravních kontejnerů, je zajištěno široké využití chlazeného spermatu s dobrými výsledky i při delším skladování a přepravě (Katila, 2011).

### **3.3.9 Výroba mražené inseminační dávky**

Kryokonzervace je proces, který umožňuje skladování semene pod bodem mrazu (Brinsko et al., 2011). První zabřeznutí klisny po inseminaci zmraženým spermatem bylo publikováno v roce 1957, avšak až ke konci 80. let 20. století se začalo mražené hřebčí sperma široce používat (Loomis, 2011a). Běžně se pro kryokonzervaci využívá kapalný dusík o teplotě -196 °C (Brinsko et al., 2011).

Kryokonzervace se provádí u mnoha druhů zvířat s rozdílnými úspěchy. Spermie některých druhů lze mrazit lépe než ostatní, především kvůli rozdílnému chemickému složení spermatu, které má vliv nejen na propustnost membrány pro vodu a kryoprotektant, ale také na její stav při různých teplotách. Dalšími rozdíly může být tolerance spermatu na změnu osmotického tlaku a velikost a tvar buněk (Graham, 2011b).

Kryokonzervace umožňuje dlouhodobé uchovávání spermií od vynikajících hřebců a také rozeslání spermatu po celém světě (Morel, 2003; Brinsko et al., 2011). Sperma se mrazí především pro vývoz a pro vytvoření genové rezervy spermatu od dobrých hřebců v případě jejich kastrace, nemoci nebo smrti (Sieme, 2011a). Majitelé klisny mají možnost vybírat hřebce z celého světa a dokonce i ty, kteří již zemřeli a jejichž sperma bylo zmrazeno a uchováno. Avšak inseminace mraženým spermatem má nižší procento zabřeznutí než při použití čerstvého nebo chlazeného (Brinsko et al., 2011).

Sperma ke kryokonzervaci se od hřebců odebírá obvykle mimo reprodukční sezónu, což může zapříčinit nižší kvalitu ejakulátu (Barbas a Mascarenhas, 2009). Před samotným mražením je důležité vyhodnocení kvality spermatu, protože ne každé lze mrazit (Sieme, 2011a). Rovněž jsou velmi důležité pracovní postupy a průběžné kontroly jeho kvality při procesu mražení. Při mražení, rozmrazování a následné inseminaci je sperma vystaveno obrovskému stresu, který ohrožuje jeho oplozovací schopnost. Progresivní motilita, fyziologický metabolismus, přítomnost akrozomálních enzymů a neporušená funkčnost buněčné membrány jsou důležité vlastnosti, které musí být zachovány po kryokonzervaci (Brinsko et al., 2011). Hřebci vykazují vysoký stupeň individuality, co se mražení a přežívání spermií týče. Odhaduje se, že přibližně 20 % hřebců produkuje sperma, které se mrazí dobře, 60 % spermatu se mrazí přijatelně a 20 % špatně (Sieme, 2011a).

Je-li motilita před mražením pod 50 % (13/21 reprodukčních center v USA požaduje >50 %, 8/21 vyžaduje >60 % pohyblivých spermií), sperma je vyřazeno z kryokonzervace (Samper a Morris, 1998). Pro predikci dobrého výsledku mražení může být použit HOS test čerstvého ejakulátu (Vidament et al., 1998). Ejakulát vhodný pro kryokonzervaci má koncentraci  $\geq 200$  miliónů spermií v ml, progresivní motilitu nad 50 % a podíl morfologicky normálních spermií nad 70 % (Sieme, 2011a).

K dispozici je mnoho protokolů pro úspěšnou kryokonzervaci hřebčího spermatu lišící se mezi jednotlivými laboratořemi v počtu specifických komponentů přidávaných během procesu. Několik základních kroků však mají téměř všechny mrazící techniky společné: naředění spermatu vhodným ředidlem, odstranění většiny SP centrifugací, resuspenzace spermií v mrazícím ředidle (obsahujícím směs solí, cukrů, antibiotik, proteinů, zdroje lipidů z vaječného žloutku či mléka a kryoprotektivní složky, např. glycerol), balení ředěného semene do pejet, zmražení v parách tekutého dusíku a skladování při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  v tekutém dusíku (Loomis, 2011a).

#### 3.3.9.1 Naředění po odstředění

Hřebčí sperma má v porovnání s býčím relativně nízkou koncentraci spermií. Z tohoto důvodu je nezbytné spermie před finálním ředěním koncentrovat, aby bylo možné adekvátní naředění, balení do nízkoobjemových pejet a poskytnutí dostatečného objemu pro inseminaci. Nejběžnější metodou koncentrace spermií a odstranění semenné plazmy je centrifugace (Loomis, 2011a).

Koncentrovaná suspenze spermií se po odstranění SP ředí na požadovanou konečnou koncentraci (Loomis, 2006; 2011; Graham, 2011b). K mražení je nejčastěji používána obdoba

ředidel pro chlazené sperma s přidáním kryoprotektantu, např. glycerolu. Důležitá je volba vhodného kryoprotektantu, který oddálí tvorbu ledových krystalů a zabrání poškození buněk (Morel, 2003).

Po naředění se spermie vyrovnáváním osmotického tlaku začnou rychle zmenšovat. V závislosti na druhu a teplotě použitého kryoprotektantu trvá přibližně 1 minutu, než pronikne do buňky a dosáhne rovnováhy vně a uvnitř buňky, vyrovná se množství vody na obou stranách membrány a buňka získá svoji původní velikost (Graham, 2011b).

Postupy a ředidla pro kryokonzervaci se liší podle mrazitelnosti ejakulátu jednotlivých hřebců a jeho reakcemi na tato ředidla (Brinsko et al., 2011). Cílem je produkovat co možná nejvyšší množství zmrazené spermy od co největšího procenta hřebců (Loomis, 2011a).

### 3.3.9.2 Mražení ID

K mražení ID se nejčastěji používají páry kapalného dusíku v aktivně nebo pasivně kontrolovaném mrazícím přístroji (Loomis, 2011a; Brinsko et al., 2011). Balené sperma je horizontálně umístěno do dusíkatých par ve stanovené výšce (1–4 cm) nad hladinou kapalného dusíku (Loomis, 2011a; Brinsko et al., 2011). Výškou nad kapalinou může být ovlivněna počáteční teplota a také tvar a průběh křivky zchlazování. Proces chlazení postupuje stabilní rychlostí, dokud pejetý nedosáhne teploty dusíkatých par. Kontrolovaná rychlost mražení buněk a aktivní ovládání rychlosti chlazení v průběhu různých fází ochlazovací křivky vede k optimalizaci buněčného přežití. Kritickou částí křivky je teplota, při níž zamrzá voda v suspenzi ( $-5$  až  $-10$  °C) a dochází k uvolnění tepla z exotermické reakce. Teplo může způsobit tání malých ledových krystalků a následnou rekrystalizaci ve větší, potenciálně škodlivé, ledové krystaly. Většina protokolů kontrolovaného mražení doporučuje v tomto teplotním rozmezí rychlé mražení ve snaze minimalizovat možná poškození (Loomis, 2011a).

Některá kryokonzervační ředidla mají lepší účinek na životnost spermií po rozmrazení, je-li ředěné sperma nejprve pomalu ochlazené na  $5$  °C po dobu 1–3 hodin, naopak jiná (laktózové EDTA ředidlo) účinně ochrání spermie, pokud jsou zmrazeny přímo z pokojové teploty (Graham, 2011b; Brinsko et al., 2011).

### 3.3.9.3 Rychlost mražení

Pro vytvoření co nejlepších podmínek k přežití buněk existuje optimální rychlost ochlazování, která je různá pro jednotlivé druhy buněk a rozdílná pro stejné druhy buněk v jednotlivých ředidlech (Graham, 2011b). Obecně se u hřebčího spermatu doporučuje nejdříve pomalé zchlazení z pokojové teploty na  $5$  °C ( $-0,1$  °C / min.) za anaerobních

podmínek. Spermie zvládají rychlejší chlazení v rozmezí 37 °C až 20 °C s následným pomalým chlazením až na 5 °C k udržení životaschopnosti a minimalizování účinku chladového šoku, k čemuž může přispět i přidání kryoprotektantu (např. vaječný žloutek) do chladicího média. Složení ředidla k mražení má vliv na délku chlazení před samotným mražením. Přenos spermatu do mrazničky nebo k parám tekutého dusíku musí proběhnout bez výkyvu teploty (Sieme, 2011a).

Rychlost mražení má velký vliv na sperma hřebce (Sieme, 2011a). V závislosti na použitém ředidle funguje dobře rychlost mražení mezi -10 °C / min. až -60 °C / min. (Graham, 2011b), Devireddy et al. (2002) uvádí toto rozmezí -20 °C / min. až -100 °C / min. Nejvhodnější způsob mražení je v parách tekutého dusíku v blízkosti hladiny. Rychlost mražení závisí na výšce pejet od hladiny. Čím jsou výše, tím je rychlost mražení pomalejší. Při doporučené vzdálenosti 2,5-5 cm se sperma mrazí rychlostí -45 až -60 °C / min. a doba skladování v parách dusíku je 20 minut (Sieme, 2011a).

Jakmile teplota roztoku dosáhne přibližně -60 °C až -80 °C (v závislosti na rozpouštědle, použitém kryoprotektantu a jeho koncentraci), dojde k vitrifikaci a buněčný metabolismus ustane. Za tohoto stavu jsou spermie v podstatě inertní a mohou tak být skladovány v kapalném dusíku na dlouhou dobu bez výrazných následků (Foote, 1978). Pejety, které dosáhly teploty -120 °C, se zabalí do plastových goblet a uskladní ponořené do kapalného dusíku (-196 °C) až do použití (Loomis, 2011a).

#### 3.3.9.4 Uchovávání mražené ID

K balení naředěného ejakulátu pro kryokonzervaci se dnes nejvíce používají polypropylenové nebo polyvinylchloridové trubičky (pejety), které se snadno identifikují a skladují. Tyto pejety se vyrábí o objemu 0,25 ml, 0,5 ml až 5 ml (Kneissl, 1993; Loomis, 2006; Brinsko et al., 2011). Obsah pejet o objemu 0,5 ml může být mražen homogenně s lepšími výsledky po rozmrazení než u velkých pejet o objemu 4 nebo 5 ml (Kneissl, 1993; Brinsko et al., 2011). K plnění pejet se používají automatizovaná nebo poloaumatizovaná plnicí zařízení využívající k jejich naplnění podtlak a zároveň je i automaticky utěsňují. Každá dávka musí být jasně označena: jméno a identifikační číslo hřebce, jméno nebo registrační číslo reprodukčního centra a datum odběru (Sieme, 2011a; Brinsko et al., 2011).

Pejety musí být hermeticky uzavřeny před zahájením mražení. Uvnitř v prostoru pejety musí být přítomen vzduch, aby bylo umožněno rozpínání kapaliny. Před zahájením mražení se vzduchová bublina v utěsněné pejetě třesením přesune do středu kapaliny (Brinsko et al., 2011). Pejety jsou ponořeny do kapalného dusíku (-196 °C) ve speciálních tancích. 5 ml

pejety jsou zaváděny do tanků přímo, 0,5 ml pejety se umísťují do plastových nádob, které jsou zavěšeny na háky (Obrázek 3.3) (Brinsko et al., 2011).



Obrázek 3.3: Kontejner s kapalným dusíkem (<http://kone-jansky.cz/nabidka-sluzeb>)

Z každého cyklu mražení je třeba odebrat kontrolní pejetu, ve které se po zahřátí na 37 °C po dobu 10-15 minut hodnotí motilita spermií. Záznam o výsledcích kontroly po rozmražení společně s formulářem o mražení doprovázejí sperma při přepravě nebo uskladnění (Brinsko et al., 2011).

Skladované pejety o objemu 0,5 ml a 0,25 ml jsou velmi citlivé na změny tepla, proto je důležité s nimi manipulovat opatrně (Graham, 2011b). Čas, kdy se z tekutého dusíku dostanou do teplejšího prostředí, např. při přesunu z jedné nádoby do jiné, by měl být co nejvíce omezený, neboť ohřátí dávky vlivem expozice vyšším teplotám může způsobit nenapravitelné škody (Foote, 1978).

Jestliže proces mražení spermie nepoškodí, následným skladováním v kapalném dusíku není ovlivněna jejich integrita, jelikož metabolická aktivita při této teplotě je zanedbatelná. Pokud spermie příznivě zvládnou zmražení a rozmražení, je možné jejich skladování za teploty -196 °C se zachováním funkčnosti po staletí. Buňky jsou při této teplotě ve stavu vegetativního spánku s maximálním omezením všech životních funkcí (Brinsko et al., 2011).

#### 3.3.9.5 Koncentrace spermií v mražené ID

Konečná koncentrace spermií se může pohybovat od (20) 100 miliónů spermií / ml až 1,6 miliard spermií / ml v závislosti na velikosti pejety (Leipold et al., 1998; Brinsko et al., 2011). Předpokládá se, že přežití spermií je lepší při nižší koncentraci spermií v důsledku



snazší dostupnosti kryokonzervačních látek z okolního prostředí. Ačkoliv vysoká koncentrace může snížit inseminační dávku na 1-2 pejety, v případě většího ředění ( $100 \times 10^6$  spermií v ml) byla po rozmrazení zjištěna lepší pohyblivost (Sieme, 2011a). Leipold et al. (1998) však uvádí lepší zabřezávání při použití spermií zmražených ve vysoce koncentrovaných dávkách ( $1\,600 \times 10^6$  v ml na rozdíl od  $400 \times 10^6$  spermií v ml).

Kryokonzervaci mohou přežít pouze buňky, které jsou v nezamrzlých kanálcích, jejichž objem limituje počet buněk, které mohou být účinně zachovány v určitém objemu rozpouštědla. Nelze tedy dát miliardu spermií do 0,5 ml rozpouštědla a očekávat, že všechny buňky přežijí. Horní hranice koncentrace spermií s maximálním přežitím buněk je 400-800 miliónů spermií v mililitru (Graham, 2011b; Brinsko et al., 2011).

V 5 ml pejetě je obvykle 600-800 miliónů spermií, 0,5 ml pejety jich obsahují méně, obvykle 50-100 miliónů. Adekvátní ID zahrnuje více než jednu pejetu (často 6-8) (Brinsko et al., 2011).

#### 3.3.9.6 Rozmrazení ID

Optimální rychlost zahřátí mražené ID je závislá na rychlosti chlazení. Buňky, které byly chlazeny rychle, je třeba i rychle ohřát a naopak ochlazované pomalu je nutno i pomalu zahřívát. Většinou se vzorky rozmrazují, resp. středně rychle ohřívají, ve vodní lázni při teplotě 37-39 °C (Graham, 2011b).

Teplota rozmrazování je obecně dána i velikostí pejety, např. 0,5 ml pejetu lze rozmrazit ve vodní lázni o teplotě 37 °C za 30 sekund (Sieme, 2011a; Brinsko et al., 2011). K pravděpodobnému zlepšení pohyblivosti spermií dojde při rozmrazování pejet o objemu 0,5 ml ve vodní lázni s teplotou 75 °C po dobu 7 sekund, po kterém následuje druhé ponoření do vodní lázně o 35 °C na 10-30 s. (Sieme, 2011a; Brinsko et al., 2011). Tato technika je popisována jako dobrá, ale nepraktická z důvodu nesnadného udržení stabilní teploty vodní lázně 75 °C a nepřesnosti v dodržení přesného času, neboť i 1-2 sekundy při vysoké teplotě mohou mít pro spermie letální účinek. Vždy je bezpečné rozmrazení při 37 °C, protože k poškození spermií nedojde, i když jsou pejety ponechány v lázni nad stanovený čas (Loomis, 2011a). Někteří autoři preferují rozmrazování při 40 °C po dobu 15 s., nebo 38 °C po dobu 30 s. (Sieme, 2011a), jiní doporučují rozmrazení 0,5 ml pejety při teplotě 46 °C po dobu 20 s. Čas ponoření musí být důsledně měřen, aby nedošlo k přehřátí pejety (Brinsko et al., 2011). Velkoobjemové pejety 4-5 ml se rozmrazují v čase 40-42 sekund při teplotě lázně 50 °C (Brinsko et al., 2011). Po rozmrazení se pejety osuší celulózou nebo obdobným materiálem (Sieme, 2011a).

Zahříváním pejet během rozmrazování taje led, k buňkám se vrací voda a dojde ke snížení koncentrace solí v roztoku. Spermie se rehydratují a získávají svůj původní objem. Jsou-li před inseminací nebo v reprodukčním traktu klisny buňky naředěny roztokem, který neobsahuje kryoprotektant, začínají bobtnat. Spermie jsou plné kryoprotektantu a skrze cytoplazmatickou membránu se do buněk rychle dostává voda. Pokud je struktura membrány neporušená, nedojde k prasknutí, a kryoprotektant během 60 sekund opouští buňku, a ta se vrací do normálu (Graham, 2011b).

#### 3.3.9.7 Hodnocení ID po rozmrazení

Z každého zmrazeného ejakulátu je vybrána jedna pejeta, která je rozmrazena a hodnocena. Rozmražené sperma se naředí na koncentraci 20-30 mil / ml a inkubuje v 37 °C po dobu 30 min. a poté je vyhodnocena motilita (Loomis, 2011a), což ve většině reprodukčních center zajišťuje CASA přístroj (Samper a Morris, 1998). Pomocí tepelného zátěžového testu, tj. 30 min. inkubace, jsou identifikovány spermie s latentním poškozením, které nemusí být zřejmé hned po rozmrazení. Vedle hodnocení motility se každý ejakulát kultivuje k vyloučení přítomnosti patogenů (Loomis, 2011a).

K hodnocení koncentrace spermií existují různé přístroje, např. NucleoCounter SP-100 (Chemometec, Dánsko). U zmrazené ID určené ke komerčnímu využití musí deklarovaný objem obsahovat minimálně 200 mil. progresivně pohyblivých spermií po rozmrazení a nejméně 30 % spermií po 30 minutách inkubace při 37 °C by mělo být progresivně pohyblivých (Loomis, 2011a). Minimální hodnoty motility se mezi jednotlivými centry liší, pohybují se v rozmezí 25-40 %, nejčastěji 30-35 % (Sieme, 2011a).

## 4 Závěr

Inseminace je velmi důležitý a stále se rozvíjející nástroj umělé reprodukce koní. Zajišťuje hlavně větší flexibilitu než přirozená plemenitba a mnoho dalších nesporných výhod. Z hlediska úspěšnosti zabřezávání klisen je výhodnější používat chlazené sperma. Pokud to není možné, je nutné použít sperma mražené.

Inseminace chlazenou inseminační dávkou je dnes nejpoužívanějším způsobem reprodukce koní, postup její výroby je již řadu let zavedený a funguje s dobrými výsledky po celém světě. Všechny protokoly výroby chlazené ID zahrnují odběr ejakulátu, hodnocení, ředění, chlazení a rychlou přepravu dávky ke klisně. Všechna používaná ředidla zajišťují dobré zachování spermií, i když v některých studiích byly mezi nimi zaznamenány určité rozdíly, je pouze na zkušenostech a volbě jednotlivých laboratoří reprodukčních center, kterému ředidlu dají přednost.

Postup výroby mražené ID je komplikovanější, jelikož hřebčí spermie jsou velmi náchylné a citlivé vůči vnějším vlivům a chladovému šoku. Vlivem tvorby intracelulárního ledu, krystalizace extracelulární tekutiny a hyperosmolarity působící na buňky dochází často k poškození membrány a k zániku spermií. Je proto nutné postup kryokonzervace a následného rozmražení ID neustále zefektivňovat, zkoumat možnosti kryoprotekce a různé koncentrace kryoprotektivních látek, aby se dosahovalo srovnatelných výsledků jak s chlazeným, tak s mraženým semenem. Pro zachování co největšího počtu buněk je vhodné použít ředidla chemicky definovaná a stálá, zakoupená a připravená k použití a precizně dodržet protokol přípravy ID k danému ředidlu.

Pro úspěšnost umělé reprodukce je nutná pečlivá příprava inseminačních dávek, vhodné zacházení s nimi a následně odborné provedení všech kroků inseminace odpovědnými pracovníky.

## 5 Použitá literatura

Aires, V.A., Hinsch, K.D., Müller-Schlösser, F., Bogner, K., Müller-Schlösser, S., Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60. p. 269–279.

Aitken, R.J., Baker, M.A. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, fertility, and development*. 16. p. 581–588.

Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Landim-Alvarenga, F.C., Medeiros, A.S.L. 2005. Amides as cryoprotectant for freezing stallion semen: A review. *Animal reproduction science*. 89. p. 105–113.

Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Carmo, M.T., Kievitsbosch, T., Castro Chaves, M.M.B., Neto, C.R. 2012. Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32. p. 424-429.

Amann, R.P. 1999. Cryopreservation of sperm. In: Knobil, E., Neill, J.D. (eds). *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1. New York. Academic Press. p. 773–783.

Amann, R.P., Pickett, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. In: Loomis, P.R. 2011. *Response of Spermatozoa to Cooling and Theory of Cell Damage*. XVII Congresso Internazionale SIVE. USA.

Amann, R.P., Graham, J.K. 1993. Spermatozoal Function. In: McKinnon, A.O., Voss J.L. (eds). *Equine Reproduction*. Philadelphia. Lea & Febiger. p. 715–745.

Aurich, C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal reproduction science*. 89. p. 65–75.

Aurich, C. 2011. Semen Extenders for Cooled Semen (Europe). In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 1336-1340. ISBN: 9780813819716.

Aurich, C., Spergser, J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-storage of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 67. p. 912–918.

Aurich, C., Seeber, P., Mueller-Schloesser, F. 2007. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 42. p. 445–448.

Barbas, J.P., Mascarenhas, C.R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*. 10. p. 49–62.

Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J., Palmer, E. 1997. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 48. p. 391–410.

Batellier, F., Duchamp, G., Vidament, M., Arnaud, G., Palmer, E., Magistrini, M. 1998. Delayed insemination is successful with a new extended for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. *Theriogenology*. 50. p. 229–236.

Baumber-Skaife, J. 2011. Evaluation of Semen. In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 1278-1291. ISBN: 9780813819716.

Bittmar, A., Kosiniak, K. 1992. The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing. *Archivum veterinarium Polonicum*. 32. p. 17.

Brinsko, S.P. 2011a. Semen Collection Techniques and Insemination Procedures. In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 1268-1277. ISBN: 9780813819716.

Brinsko, S.P. 2011b. Semen Extenders for Cooled Semen (North America). In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 1341-1343. ISBN: 9780813819716.

- Brinsko, S.P., Crockett, E.C., Squires, E.L. 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*. 54. p. 129–136.
- Brinsko, S.P., Blanchard, T.L., Varner, D.D., Schumacher, J., Love, Ch.C., Hinrichs, K., Hartman, D. 2011. *Manual of equine reproduction*. 3rd ed. Mosby elsevier. p. 325. ISBN: 9780323064828.
- Bruemmer, J.E. 2006. Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. 22. p. 677-682.
- Bruemmer, J.E., Coy, R.C., Squires, E.L., Graham, J.K. 2002. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *Journal of Animal Science*. 80. p. 12–18.
- Clulow, J.R., Maxwell, W.M.C., Evans, G., Morris, L.H.A. 2007. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*. 85. p. 232–235.
- Cochran, J.D., Amann, R.P., Squires, E.L., Pickett, B.W. 1984. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*. 22. p. 25–38.
- Combes, G.B., Varner, D.D., Schroeder, F., Burghardt, R.C., Blanchard, T.L. 2001. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of reproduction and fertility*. 56. p. 127–132.
- Demick, D.S., Voss, J.L., Pickett, B.W. 1976. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *Journal of Animal Science*. 43. p. 633–637.
- Denver, L.A., Dermody, T.S. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Annals of Internal Medicine*. 151. p. 886–895.

Devireddy, R.V., Swandlund, D.J., Olin, T., Vincente, W., Troedsson, M.H.T., Bischof, J.C., Roberts, K.P. 2002. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biology of Reproduction*. 66. p. 222–231.

Douglas-Hamilton, D.H., Osol, R., Osol, G., Driscoll, D., Noble, H. 1984. Afield study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology*. 22. p. 291–304.

Ecot, P., Decuadro-Hansen, G., Delhomme, G., Vidament, M. 2005. Evaluation of cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Animal reproduction science*. 89. p. 245–248.

Ecot, P., Arnaud, G., Moy, A., Daels, P., Magistrini, M., Vidament, M. 2001. Comparison of fertility and post-thaw semen criteria of stallion semen frozen in two different extenders. *Animal reproduction science*. 68. p. 356–358.

Flesch, F.M., Brouwers, J.F., Nieverstein, P.F., Verkleij, A.J., van Golde, L.M., Colenbrander, B., Gadella, B.M. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*. 114. p. 3543–3555.

Foote, R.H. 1978. Maintenance of fertility of spermatozoa at -196°C. In: The National Research Council. (Ed). *The Integrity of Frozen Spermatozoa*. Washington, DC. National Academy of Sciences. p. 144–162.

Foulkes, J.A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. 49. p. 277–284.

Gamčík, P., Kozumplík, J. 1992. *Andrologia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Priroda. Bratislava. 293 s. ISBN: 8007005401.

Gavella, M., Lipovac, V. 1992. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Archives of Andrology*. 28. p. 135–141.

Gilmore, J.A., McGann, L.E., Liu, J., Gao, D.Y., Peter, A.T., Kleinhans, F.W., Critser, J.K. 1995. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 53. p. 985–995.

Graham, J.K. 2011a. Principles of Cooled Semen. In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 1308-1315. ISBN: 9780813819716.

Graham, J.K. 2011b. Principles of Cryopreservation. In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 2959-2963. ISBN: 9780813819716.

Hammerstedt, R.H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect and design of storage preservation systems. *Reproduction, fertility, and development*. 5. p. 675–690.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11. p. 73–88.

Heitland, A.V., Jasko, D.J., Squires, E.L., Graham, J.K., Pickett, B.W., Hamilton, C. 1996. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*. 28. p. 47–53.

Janett, F., Thun, R., Niederer, K., et al. 2003. Seasonal changes of semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*. 60. p. 453.

Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E., Squires, E.L. 1991. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*. 35. p. 1059–1067.

Quinn, P.J. 1989. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 21. p. 3–19.



Quinn, P.J., Chow, P.Y.W., White, I.G. 1980. Evidence that phospholipid protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of reproduction and fertility*. 60. p. 403–407.

Kampschmidt, R.F., Mayer, D.T., Herman, H.A. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *Journal of Dairy Science*. 36. p. 733–742.

Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J.E., Aurich, C.. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology*. 63. p. 1354–1365.

Katila, T. 2011. Containers for Transport of Equine Semen. In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 1330-1335. ISBN: 9780813819716.

Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper, W.L., Morse, G.W. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. p. 327.

Kneissl, S. 1993. Cryopreservation of stallion semen. The influence of semen collection techniques, centrifugation, packaging forms, and methods of freezing on motility and plasma membrane integrity of spermatozoa. DVM Thesis. Veterinary University. Hannover.

Knop, K., Hoffmann, N., Rath, D., Sieme, H. 2005. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability. *Animal reproduction science*. 89. p. 294–297.

Langlais, J., Roberts, K.D. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian sperm. *Gamete Research*. 12. p.183–224.

Leipold, S.D., Graham, J.K., Squires, E.L., McCue, P.M., Brinsko, S.P., Vanderwall, D.K. 1998. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*. 49. p. 1537–1543.

Loomis, P.R. 2006. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. Veterinary Clinics: Equine Practise. 22. p. 663-676.

Loomis, P.R. 2011a. Basic Principles and Techniques for semen Freezing. XVII Congresso Internazionale SIVE. USA.

Loomis, P.R. 2011b. Response of Spermatozoa to Cooling and Theory of Cell Damage. XVII Congresso Internazionale SIVE. USA.

Louda, F. a kol. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. ČZU v Praze. 225 s. ISBN: 8021307021.

Love, C.C. 2002. Stallion semen evaluation and interpretation. Proc Society for Theriogenology. Colorado Springs. CO. p. 93-102.

LeFrappier, L., Walston, L., Whisnant, C.S. 2010. Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. Journal of Equine Veterinary Science. 30. p. 200–204.

Malmgren, L., Op den Kamp, B., Wöckener, A., Boyle, M., Colenbrander, B. 1994. Motility, velocity and acrosome integrity of equine spermatozoa stored under different conditions. Reproduction in Domestic Animals. 29. p. 469–476.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology . 247. p. 125–142.

McGann, L.E. 1978. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology. 15. p. 382–390.

Medeiros, A.S.L., Gomes, G.M., Carmo, M.T., Papa, F.O., Alvarenga, M.A. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. Theriogenology. 58. p. 273–276.

- Meryman, H.T. 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 47. p. 935–945.
- Mogielnicka-Brzozowska, M., Kordan, W. 2011. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 14. p. 489-499.
- Monteiro, G.A., Papa, F.O., Zahn, F.S., Dellaqua Jr., J.A., Melo, C.M., Maziero, R.R.D., B.R. Avanzi, B.R., Alvarenga, M.A., Guasti, P.N. 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 127. p. 197-201.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 63. p. 2372–2381.
- Moran, D.M., Jasko, D.J., Squires, E.L., Amann, R.P. 1992. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 38. p. 999–1012.
- Morel, M.C.G.D. 2003. *Equine Reproductive Physiology Breeding and Stud Management*. 2nd Edition. CABI Publishing. United Kingdom. p. 374. ISBN: 0851996434.
- Morrell, J.M. 2012. Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32. p. 436-440.
- Morris, G.J., Faszer, K., Green, J.E., Draper, D., Grout, B.W., Fonseca, F. 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*. 68. p. 804–812.
- Müller, Z. 1987. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *Journal of reproduction and fertility*. 35. p. 121.
- Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, M.G., et al. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze/thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 59. p. 1693.

Neto, C.R., Monteiro, G.A., Soares, R.F., Pedrazzi, C., Dell'aqua Jr., J.A., Papa, F.O., Castro Chaves, M.M., Alvarenga, M.A. 2013. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*. 79. p. 1120–1123.

Pace, M.M., Graham, E.F. 1974. Components of egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal of Animal Science*. 39. p. 1144–1149.

Pace, M.M., Sullivan, J.J. 1975. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen semen. *Journal of reproduction and fertility*. 23. p. 115–121.

Padilla, A.W., Foote, R.H. 1991. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *Journal of Animal Science*. 69. p. 3308–3313.

Pagl, R., Aurich, J.E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M., Aurich, C. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology*. 66. p. 115–122.

Parks, J.P., Lynch, D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. 29. p. 255–266.

Parks, J.E., Meacham, T.N., Saacke, R.G. 1981. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effects of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4°C and 37°C. *Biology of Reproduction*. 24. p. 399–404.

Pasquini, D.F., Ferreira, H.N., Papa, F.O., Dell Aqua, J.A. Jr, Alvarenga, M.A. 2008. Effects of three cryopreservation systems on longevity of stallion sperm after thawing. *Reproduction, Fertility and Development*. 20. p. 123–124.

Phillips, P.H., Lardy, H.A. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *Journal of Dairy Science*. 23. p. 399–404.

Pickett, B.W. 1993. Seminal extenders and cooled semen. In: McKinnon, A.O., Voss, J.L. (eds). *Equine Reproduction*. Philadelphia. Lea & Febiger. p. 746–754.

Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., LeVern, Y., Kerboeuf, D., Vidament, M., Magistrini, M. 2008. Freezing of stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Science and Technology*. 88. p. 257–265.

Province, C.A., Squires, E.L., Pickett, B.W., Amann, R.P. 1985. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*. 23. p. 925–934.

Pycock, J.F. 1997. Veterinární problematika reprodukce a chovu koní. Manson Publishing Ltd. Medicus veterinarius. Česká republika. 208 s. ISBN: 8090222455.

Rob O., Herčík J. 1987. Inseminace I. Státní pedagogické nakladatelství Praha. Vysoká škola zemědělská v Praze. 114 s. ISBN: 1711487.

Roser, J.F. 2011. Endocrine–Paracrine–Autocrine Regulation of Reproductive Function in the Stallion. In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 996-1014. ISBN: 9780813819716.

Samper, J.C. (ed.). 2009. *Equine breeding management and artificial insemination*. 2nd ed.. Saunders Elsevier. USA. p. 310. ISBN: 978416052340.

Samper, J.C. 2011. Breeding with Cooled Transported Semen. In: McKinnon, A.O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 1. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 1316-1322. ISBN: 9780813819716.

Samper, J.C., Morris, C.A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 49. p. 895–903.

Schembri, M.A., Major, D.A., Suttie, J.J., Maxwell, W.M., Evans, G. 2003. Modification of standard freezing media to limit capacitation and maximise motility of frozen-thawed equine spermatozoa. *Australian Veterinary Journal*. 81. p. 748–751.

Sieme, H. 2007. Current status of cryopreservation of stallion spermatozoa. In: Proceedings of the SIVE 13th Congresso Nazionale Multisala. 26.–28. January 2007. Bologna. Italy. p. 68–69.

Sieme, H. in Samper, J.C. (ed.). 2009. Equine breeding management and artificial insemination. 2nd ed. Saunders Elsevier. USA. p. 310 . ISBN: 978416052340.

Sieme, H. 2011a. Freezing Semen. In: McKinnon, A.O. (ed.). Equine Reproduction. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 2972-2982. ISBN: 9780813819716.

Sieme, H. 2011b. Semen Extenders for Frozen Semen. In: McKinnon, A.O. (ed.). Equine Reproduction. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 2964-2971. ISBN: 9780813819716.

Sieme, H., Katila, T., Klug, E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. Theriogenology. 61. p. 769.

Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R., Klug, E. 2003. Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. Reproduction in Domestic Animals. 38. p. 134–140.

Thomson, C.H., Thompson, D.L., Kincaid, L.A., Nadal, M.R. 1996. Prolactin involvement with increase in seminal volume after sexual stimulation in stallions. Journal of Animal Science. 74. p. 2468–2472.

Tischner, M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. Journal of reproduction and fertility. 27. p. 53–59.

Trimeche, A., Yvon, J.M., Vidament, M., Palmer, E., Magistrini, M. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. Theriogenology. 52. p. 181–191.

Varner, D.D., Vaughan, S.D., Johnson, L. 1991. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *American Journal of Veterinary Research*. 52. p. 224.

Varner, D.D., Blanchard, T.L., Love, C.L., Garcia, M.C., Kenney, R.M. 1988. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*. 29. p. 1043–1054.

Varner, D.D., Scanlan, C.M., Thompson, J.A., Brumbaugh, G.W., Blanchard, T.L., Carlton, T.M., Johnson, L. 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extender. *Theriogenology*. 50. p. 559–573.

Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., de Kruir, A. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*. 63. p. 912–922.

Věžník, Z. (ed.). 2000. Hodnocení semene pro asistovanou reprodukci a výběr plemeníků-Striktní analýza spermatické morfologie SASMO. Výzkumný ústav veterinárního lékařství. Brno. 141 s.

Věžník, Z. Švecová, D. Zajícová, A. Přinosilová P. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy. Brno. 197 s. ISBN: 8086895017.

Vidament, M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal reproduction science*. 89. p. 115-136.

Vidament, M., Cognard, E., Yvon, J.M. 1998. Evaluation of stallion semen before and after freezing. *Reproduction in Domestic Animals*. 33. p. 271.

Vidament, M., Vincent, P., Martin, F.X., Magistrini, M., Blesbois, E. 2009. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal reproduction science*. 112. p. 22-35.

- Vidament, M., Daire, C., Yvon, J.M., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., Ecot, P. 2002. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*. 58. p. 249–251.
- Watson, P.F. 1976. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *Journal of Thermal Biology*. 1. p. 137–141.
- Watson, P.F. 1981a. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G.J., Clark, A. (eds). *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. New York: Academic Press. p. 189–218.
- Watson, P.F. 1981b. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5-degrees-C by egg yolk lipoprotein. *Journal of reproduction and fertility*. 62. p. 483–492.
- Weiss, S., Janett, F., Burger, D., Thun, R. 2004. The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 146. p. 285–293.
- Wöckener, A., Colenbrander, B. 1993. Liquid storage and freezing of semen from New Forest and Welsh Pony stallions. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*. 100. p. 125–126.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 48. p. 146–156.