

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Zpracování ejakulátu hřebců k výrobě inseminačních
dávek
Bakalářská práce**

**Magda Fejfarová
Chov koní**

Ing. Martina Janošíková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Zpracování ejakulátu hřebců k výrobě 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 28.04.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martině Janošíkové, Ph.D. za odborné vedení, důležité rady a připomínky k této bakalářské práci. Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu při mých studiích.

Zpracování ejakulátu hřebců k výrobě inseminačních dávek

Souhrn

Inseminace přináší chovatelům značné benefity, proto je nezbytné respektovat při výrobě ID veškeré požadavky na jejich kvalitu. Ejakulát hřebců, složený z buněčné a nebuněčné frakce prochází při výrobě ID několika procesy. Semenná plazma, obsahující specifické proteiny poskytuje spermatickým buňkám jistou ochranu, na druhou stranu způsobuje komplikace při mrazení ID. Aby se zabránilo nežádoucím vlivům, je třeba semennou plazmu před samotným procesem kryokonzervace oddělit. Do takto připraveného ejakulátu, který prošel primární makroskopickou, mikroskopickou kontrolou a kontrolou koncentrace (CASA) se v závislosti na způsobu konzervace (krátkodobá, dlouhodobá) přidávají ředidla obsahující pufrы, cukry, aminokyseliny, mastné kyseliny, antibiotika, antioxidanty a látky zabráňující poškození spermatických buněk v procesu chlazení a mrazení-kryoprotektanty. S ohledem na jejich prostupnost buněčnou membránou se dělí na penetrující a nepenetrující. Mezi nepenetrující patří sacharidy, proteiny a AMK, které stabilizují koncentrace látek v intracelulárním prostoru a díky osmotickému tlaku zabráňují tvorbě extracelulárního ledu. Oproti tomu penetrující kryoprotektanty (glycerol, DMS, DMA, DMSO, EG aj.) mění seskupení membránových lipidů a proteinů ovlivňující fluiditu plazmatické membrány. Tím zabráňují vzniku intracelulárního ledu a chrání tak buňky v procesu kryokonzervace. Nevyhnutelné nebo náhlé úhyny úspěšných plemenných hřebců vedou ke stále se zdokonalujícímu procesu kryokonzervace epididymálních spermií. Spermie jsou izolovány z kaudy epididymu retrográdním výplachem nebo metodou float-up, která se však ukazuje jako méně účinná. Správně nařaděné epididymální spermie se zpracovávají jako ID standardním způsobem. Výhody umělé inseminace jsou nesporné. Protože se mění životní prostředí i životní styl nejen lidí, ale i hospodářských zvířat, je téma uchování plodnosti a oplození schopných ID dynamickým tématem budoucnosti.

Klíčová slova: hřelec, ejakulát, inseminační dávka, reprodukce koní, konzervace spermatu

Processing of stallion ejaculate for the production of insemination doses

Summary

Insemination brings significant benefits to breeders, so it is essential to respect all quality requirements when producing IDs. The ejaculate of stallions, composed of cellular and non-cellular fractions, undergoes several processes during the production of ID. The seminal plasma, containing specific proteins, provides some protection for the sperm cells, but on the other hand causes complications when freezing the ID. To avoid undesirable effects, the seminal plasma must be separated before the cryopreservation process. Depending on the method of preservation (short-term, long-term), diluents containing buffers, sugars, amino acids, fatty acids, antibiotics, antioxidants and substances preventing damage to sperm cells in the cooling and freezing process-cryoprotectants-are added to the ejaculate thus prepared, which has undergone primary macroscopic, microscopic and concentration control (CASA). Depending on their permeability through the cell membrane, they are divided into penetrating and non-penetrating. The non-penetrating ones include carbohydrates, proteins and AMK, which stabilize the concentrations of substances in the intracellular space and prevent the formation of extracellular ice due to osmotic pressure. In contrast, penetrating cryoprotectants (glycerol, DMS, DMA, DMSO, EG, etc.) alter the clustering of membrane lipids and proteins affecting plasma membrane fluidity. This prevents the formation of intracellular ice and thus protects cells in the process of cryopreservation. Inevitable or sudden deaths of successful breeding stallions lead to an ever-improving process of cryopreservation of epididymal spermatozoa. Spermatozoa are isolated from the cauda epididymis by retrograde lavage or by the float-up method, which, however, is proving to be less effective. Properly diluted epididymal spermatozoa are processed as ID in the standard manner. The advantages of artificial insemination are numerous. As the environment and lifestyles of not only humans but also livestock are changing, the topic of fertility preservation and fertile IDs is a dynamic issue for the future.

Keywords: stallion, ejaculate, insemination dose, equine reproduction, semen preservation

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Inseminační dávka (ID)	10
3.1.1	Benefity ID	10
3.1.2	Požadavky na ID	10
3.1.3	Skladování a označování ID	11
3.2	Složení ejakulátu	11
3.2.1	Spermatické buňky	11
3.2.2	Semenná plazma (SP)	13
3.3	Sekrety přídatných pohlavních žláz	13
3.3.1	Sekrety ampule chámovodu	13
3.3.2	Sekrety předstojných žláz (prostaty)	13
3.3.3	Sekrety bulboretrálních žláz (Cowperovy)	14
3.3.4	Sekrety měchýřkovitých žláz (semenných váčků)	14
3.4	Nadvarle	14
3.4.1	Výměšky nadvarlat	14
3.5	Frakce ejakulátu	15
3.6	Proteiny semenné plazmy	15
3.6.1	Vliv proteinů semenné plazmy na kryokonzervaci	16
3.7	Hodnocení kvality hřebčího ejakulátu	17
3.7.1	Makroskopické posouzení	17
3.7.2	Mikroskopické posouzení	19
3.7.3	Metody morfologického vyšetření spermíí	19
3.7.4	Casa	20
3.8	Zpracování ID	21
3.9	Metody selekce spermíí	22
3.9.1	Jednovrstevná koloidní centrifugace (SLC)	22
3.9.2	Swim-up metoda (SU)	22
3.9.3	Sexace spermíí	23
3.10	Ředění spermatu	23
3.10.1	Komponenty ředidel	24
3.11	Komerčně dostupná ředidla	29
3.11.1	Komerčně dostupná ředidla pro krátkodobou konzervaci	29
3.11.2	Komerčně dostupná ředidla pro dlouhodobou konzervaci	30

3.12	Čerstvá ID	31
3.13	Chlazená ID.....	31
3.13.1	Chlazení ID	31
3.14	Mrazená ID.....	32
3.14.1	Kryokonzervace ID	33
3.15	Epididymiální spermie	35
3.15.1	Přeprava nadvarlete	35
3.15.2	Způsoby odběru epididymiálních spermií.....	36
3.15.3	Ředění epididymálních spermií	38
3.15.4	Kryokonzervace epididymálních spermií	39
4	Závěr	40
5	Literatura	41

1 Úvod

Jedním z hlavních cílů v chovu koní je dosáhnout co největšího počtu hříbat od hodnotných rodičů v co nejkratším časovém horizontu (Morris 2004). Hodnota sportovních koní je určována na základě jejich rodokmenu, sportovních výsledků, konstituce a temperamentu (Leeb et al. 2005, Varner et al. 2015, Kowalczyk et al. 2019). V Evropě je hodnota koně odvozována zejména z jeho sportovní a chovné výkonnosti, kdy úspěšní rodiče často produkují kvalitní potomstvo s výbornými předpoklady pro jezdecký sport (Kowalczyk et al. 2019).

Umělá inseminace se tak stala důležitým nástrojem v reprodukci koní, který významně přispívá k získávání kvalitnějšího potomstva po špičkových světových plemenicích, kteří by byli pro chovatele nedostupní. Díky inseminačním dávkám je tak umožněn transport spermatu plemeníka po celém světě (Pagl et al. 2006).

Zásadním faktorem, který determinuje úspěšnost zabřeznutí klisny, je zpracování ejakulátu pro umělou inseminaci (Jasko et al. 1992). S cílem dosáhnout co největší úspěšnosti zabřezávání, byly vyvinuty standardizované postupy pro výrobu inseminačních dávek hřebců, jimiž se tato práce zabývá.

2 Cíl práce

Cílem této práce je na základě dostupných vědeckých zdrojů, sestavit ucelený literární přehled o zpracování a uchování inseminačních dávek hřebců.

3 Literární rešerše

3.1 Inseminační dávka (ID)

Inseminační dávka je složená z jednotlivých komponent, které jsou ručně vkládány do samičího reprodukčního traktu během procesu umělé inseminace (Agca & Critser 2006). Zajištění vhodného množství viabilních a motilních spermií v inseminační dávce je zásadním faktorem ovlivňujícím pravděpodobnost zabřeznutí, nehledě na specifický způsob provádění inseminace (Gahne et al. 1998). Ideální inseminační dávka pro použití v čerstvém, chlazeném nebo kryokonzervovaném stavu by měla být koncipována tak, aby maximalizovala počet spermií na ml, dosáhla maximálního celkového počtu progresivně pohyblivých spermií, minimalizovala nutný objem k připuštění klisny, nezhoršovala funkci ani životnost spermií a minimalizovala množství semenné plazmy (Roach et al. 2016).

3.1.1 Benefit ID

Inseminační dávka přináší mnoho potenciálních benefitů. Jeden z primárních důvodů pro aplikaci inseminační dávky spočívá v prevenci pohlavně přenosných nemocí, neboť spektrum těchto chorob je šířeno pomocí spermatu. Kompetence v prevenci pohlavně přenosných chorob následně vyústila v rozvoj umělé inseminace (Parkinson & Morrell 2019). Například EHV-3, *Taylorella equigenitalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*. EAV (virus arteritidy koní) může být přítomen v pohlavním ústrojí hřebců, kteří poté mohou přenášet virus na klisny během páření. S výjimkou EHV-3 jsou hřebci obvykle asymptomatickými přenašeči infekce při připouštění klisen (Blanchard et al. 1992).

Zvýšená frekvence březosti, díky pokročilým postupům v reprodukční biologii, přispívá ke zlepšení reprodukční úspěšnosti. Využití těchto reprodukčních biotechnologií umožňuje zvýšení procenta březích klisen po první inseminaci. Umělá inseminace eliminuje přirozené bariéry, které brání pohybu spermií a dosahuje tak vyššího procenta zabřezávání oproti přirozenému připouštění (Allahbadia 2017). Dalším přínosem může být volba světových plemenů a dosažení optimalizace v produkci kvalitních mláďat (Bromfield 2018).

3.1.2 Požadavky na ID

V minulosti, přibližně v období 70. let 20. století, byla pro dosažení nejvyšších počtů březosti doporučena inseminační dávka 500×10^6 progresivně pohyblivých spermií (PMS) při inseminaci čerstvým spermatem za podmínek, které nebyly zcela optimální (Brinsko 2006). Minimální standardy spermatu na ID hřebců byly zkoumány v kontextu hlavních omezujících faktorů, tj. technik konzervace, objemu spermatu, frekvence, načasování a použité metody umělé inseminace – minimální hodnota čerstvého ejakulátu nesmí být snížena pod 300×10^6 PMS (Sieme et al. 2001, Lyle & Ferrer 2005).

Inseminační dávka může být ve formě čerstvého spermatu, které je po odběru aplikováno jako inseminační dávka nebo z chlazeného spermatu, které je obohaceno o mléčná nebo žloutková ředidla pro zamezení teplotního šoku (Brinsko 2006). Takto připravené dávky se obvykle skladují při teplotě 4–5 °C a jejich použitelnost je 48–72 hodin (Clulow & Gibb 2022).

Rozšíření inseminace chlazenými dávkami bylo v posledních desetiletích výrazně zvýšeno ve všech zemích, avšak fertilita je často nižší než při použití čerstvé dávky (Kareskoski et al. 2019).

Při použití zmrazeného spermatu hřebců je dávka spermatu stanovena na celkový počet 800×10^6 PMS s motilitou po rozmrazení nejméně 35 % (Sieme et al. 2001) nebo minimálně 30 % (Brinsko 2006). Koncentrace spermií hřebců při procesu kryokonzervace se obvykle pohybuje v rozmezí 200 až 300 milionů spermií/ml (Morse-Wolfe et al. 2023).

3.1.3 Skladování a označování ID

Skladování krátkodobě nebo dlouhodobě konzervovaných spermií hřebců je nezbytné z důvodů jejich využití při umělé inseminaci či intracytoplazmatické injekci spermií (ICSI) (Hammerstedt & Roy 1993).

Při neúčelném skladování spermií následuje postupný zánik buněk. Zánik je možný zpomalit či zabránit teplotní metabolickou restrikcí, chlazením nebo kryokonzervací, v závislosti na požadované délce skladování. V situaci, kdy má být umělá inseminace provedena během několika hodin, jsou spermie obvykle ponechány při okolní teplotě. Pokud je zapotřebí zachovat životnost spermií po delší dobu, jsou spermie buď chlazeny až na 72 hodin, nebo se kryokonzervují na dobu neurčitou (Gibb & Aitken 2016).

Způsob přepravy může významně ovlivnit kvalitu inseminační dávky. Pro transport se využívají rozmanité typy nádob, jako jsou sáčky Whirl-Pak, injekční stříkačky bez latexu/gumy, kónické zkumavky nebo zkumavky se šroubovacím uzávěrem (Kelley 2024). Nejvíce populárními se staly jednorázové, cenově dostupné boxy vyrobené z polystyrenu (Katila et al. 2011). Zásadním požadavkem je nepropustnost skladovacího zařízení během přepravy (Price et al. 2008). Většina komerčních chlazených přepravních kontejnerů představuje pasivní chladicí zařízení, kde je nezbytné přidání ledových cihel do izolovaného kontejneru. Identifikační označení by mělo obsahovat dokumentaci s informacemi o hřebci, datu a času odběru, a také číslo stanice (Kelley 2024).

3.2 Složení ejakulátu

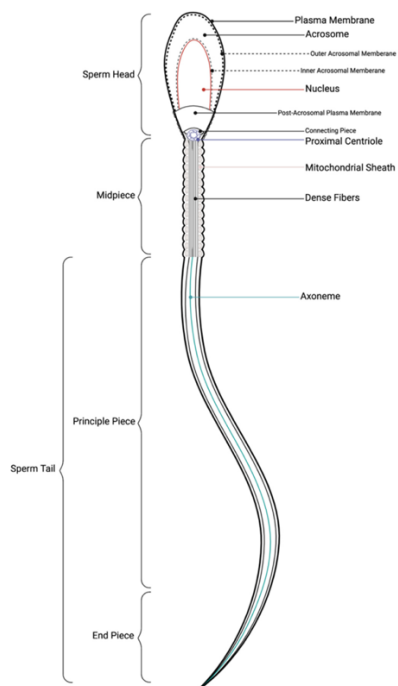
Ejakulát je složen ze dvou základních komponent: spermatických buněk a semenné plazmy. Semenná plazma je syntetizována v přídatných pohlavních žlázách a vývodech, zatímco spermatické buňky prochází procesem spermatogeneze v semenotvorných kanálcích varlat (Tanga et al. 2021). Objem ejakulátu u hřebců vykazuje značnou variabilitu mezi jednotlivci, přičemž většinová část z nich produkuje kolem 100 ml ejakulátu. U některých jedinců může tento objem dosáhnout až 250 ml (Morel 2008).

3.2.1 Spermatické buňky

Významná úloha v přenosu otcovské genetické informace a v aktivaci oocyty po fertilizaci je zastávána spermiemi, které jsou diferencovanými haploidními pohlavními buňkami samčích organismů (Gibb & Aitken 2016).

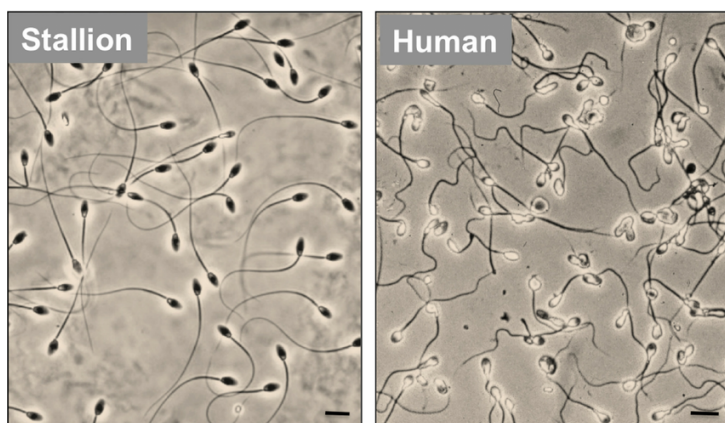
Samčí gameta (viz. Obrázek 1) se skládá ze tří hlavních částí: hlavičky, středního článku a ocásku (Varner et al. 2015). Hlavička spermie je obklopena plazmatickou membránou a

obsahuje akrozomální oddíl s enzymy, které pomáhají při oplození. Jádro, nacházející se v hlavičce spermie, je obklopeno jaderným obalem a obsahuje genom samce. Hlavička je spojena se střední částí pomocí spojovacího článku. Střední část se skládá z proximálního centriolu, mitochondriálního obalu a vnitřní husté struktury vláken. Bičík směřuje distálně a je rovněž pokrytý plazmatickou membránou, která obklopuje strukturní axoném (Orsolini et al. 2021).



Obrázek 1: Anatomie hřebčí spermie: plazmatická membrána, akrozom, jádro, proximální centriol, mitochondriální obal, bičík (Orsolini et al. 2021).

Délka spermií hřebců dosahuje okolo 60 mikrometrů (Pesch & Bergmann 2006). Charakteristiky hlavy spermie hřebce jsou taxonomicky unikátní (viz. Obrázek 2) a zahrnují asymetrickou hlavu, ocas paraxiálně zasunutý a malý akrozom (López & De Souza 1991). Mezi další charakteristické znaky patří ještě abaxiální připojení středního dílu a malá velikost hlavičky (Ball 2016).



Obrázek 2: Srovnání morfologie spermií hřebce a člověka (Aitken 2013).

3.2.2 Semenná plazma (SP)

Semenná plazma, přirozené mikroprostředí spermií, obsahuje různorodé komponenty, zvláště proteiny, které jsou esenciální pro přežitelnost a fertilizaci spermií (Bubenickova et al. 2020). Semenná plazma disponuje specifickými koncentracemi sacharidů, lipidů, elektrolytů a minerálních látek, které mají zásadní význam pro optimální fungování migrujících gamet (Kareskoski & Katila 2008). Produkce semenné plazmy je zajišťována přídatnými pohlavními žlázami, které hrají klíčovou roli v procesech reprodukce. Rozdíly ve výskytu, rozměrech a tvarech žláz jsou pozorovány u domestikovaných savců.

U koní jsou všechny přídatné pohlavní žlázy přítomny v párech (ampule chámovodu, měchýřkovité žlázy a bulbouretrální žlázy) nebo v lalůčcích (prostata) (Samper 2008). Až 98 % celkového ejakulátu u hřebců je tvořeno semennou plazmou, která je uvolňována během ejakulace a plní podstatnou funkci v reprodukci, především jako transportní médium. Kromě toho je využívána jako zdroj energie, antioxidantů, enzymů a minerálních látek. Zahrnuje mikro a makroprvky, které mají vliv na kvalitu spermií. Mikro a makroprvky, obsažené v semenné plazmě, jsou využívány k udržení funkční integrity spermií vlivem vápníku a fosforu, vápník má příznivý vliv na pohyblivost spermií a vyšší koncentrace hořčíku, než je v krevní plazmě, přispívá k aktivitě semenných enzymů. Při nedostatku hořčíku bývá pozorována předčasná ejakulace (Tirpák et al. 2021).

3.3 Sekrety přídatných pohlavních žláz

3.3.1 Sekrety ampule chámovodu

Distální části chámovodu, které se zvětšují, jsou označovány jako ampule. U plně pohlavně vyvinutých koní dosahuje průměr 15 až 20 mm, zatímco délka činí kolem 20 až 25 cm (Little & Holyoak 1992). Ampule nejen uvolňují antioxidanty, které přispívají k udržení integrity chemického složení a slouží ještě jako ochrana před oxidativním stresem (Morel 2008), ale také produkují množství proteinů (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005).

3.3.2 Sekrety předstojných žláz (prostata)

Dvoulaločnatá žláza, umístěná podél pánevní močové trubice a kaudálně k vezikulárním žlázám, vzniká jako vývod embryonální urogenitální dutiny (Samper 2008). Prostatický sekret je přenášen do močové trubice skrze mnoho jemných prostatických kanálků v zadní stěně močové trubice, přičemž prostřednictvím tohoto sekretu je upravováno prostředí v pochvě samice (Knobbe et al. 2012).

Prostata u hřebců je ovlivňována pohlavními hormony, přičemž cirkulující testosteron je přeměňován na lokálně aktivnější dihydrotestosteron prostřednictvím enzymu 5 α -reduktázy, což podporuje růst prostatického epitelu. Velikost prostaty je tak ovlivněna hladinou testosteronu v krvi; u zvířat před dosažením puberty a u kastrátů bývá obvykle mnohem menší než u intaktních jedinců. Ultrazvukovým vyšetřením je pozorovatelná dobře definovaná prostata u hřebců, která se skládá z homogenního stromatu průpletem malých až středně velkých dutin naplněných prostatickou tekutinou. Velikost těchto tekutinou naplněných

prostorů se zvětšuje během sexuální stimulace (Knobbe et al. 2012). Sekrety jsou zásadité a zahrnují rozsáhlé množství proteinů, citrátové kyseliny a zinku (Morel 2008).

3.3.3 Sekrety bulbouretrálních žláz (Cowperovy)

Na kaudálním konci pánevní močové trubice jsou lokalizovány bulbouretrální žlázy (Samper 2008), které mají vejčitý tvar a měří přibližně 3 až 4 centimetry na délku a 2 až 3 centimetry na šířku a jsou obklopeny svalovinou. Většina prespermatické tekutiny je produkována těmito žlázami, ale mohou nadále vytvářet a přispívat tekutinou během všech fází ejakulace (Little & Holyoak 1992). Vodnatá tekutina v prespermatické frakci, vytvářena těmito žlázami, je uvolňována před ejakulací ke smytí zbytkové moči (Pozor 2022).

3.3.4 Sekrety měchýřkovitých žláz (semenných váčků)

Semenné váčky, známé též jako vezikulární žlázy, jsou umístěny dorzálně od močového měchýře a laterálně od ampulí, jsou rozprostřeny kraniolaterálně do kaudální části břišní dutiny (Varner et al. 2000). Někdy mohou být expandovány až do oblasti kraniální a přesahovat okraj pánve. Rozšíření a prodloužení vezikulárních žláz je vyvoláno sexuální stimulací, čímž mohou dosahovat délky až 12-20 cm a průměru 5 cm. Distální konce žláz se sbíhají a procházejí pod prostatou paralelně s ampulami směrem k jejich zakončení v močové trubici. Sekrety měchýřkovitých žláz jsou tvořeny koloidní frakcí spermatu (Samper 2008). V měchýřkovitých žlázách jsou také syntetizovány proteiny ze skupiny CRISP (Töpfer-Petersen et al. 2005).

3.4 Nadvarle

V nadvarleli hřebce se nacházejí morfologicky normální a životaschopné maturované spermie (Vieira et al. 2013).

Nadvarle je rozčleněno na tři části: hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). V hlavě nadvarlete se nachází třináct až patnáct vývodných kanálků, které vycházejí z varlat a sbíhají se do jednoho kanálku, tj. nadvarletního kanálku. Nadvarletní kanálek je následně veden hlavou, tělem a ocasem nadvarlete. Proces zrání spermií probíhá v nadvarleti hřebce, kde nadvarle zahrnuje stočenou trubici umístěnou na zadní straně varlat (Lehmann et al. 2022). Během průchodu spermií nadvarletem dochází k jejich maturaci a následnému získání oplozovací schopnosti (Johnson et al. 1980, Amann et al. 1993). Metabolická činnost spermií se zvyšuje po ejakulaci se smísením se semennou plazmou (Mann & Lutwak-Mann 1981). Ocas nadvarlete slouží jako prostředí pro udržení zralých spermií v klidovém stavu.

3.4.1 Výměšky nadvarlat

Epididymální sekret je tvořen tekutinou z *rete testis* (sít' kanálků na zadní straně varlete), který je přepravován eferentními kanálky v proximální části nadvarlete, sekrecí a absorpcí z nadvarlete, proteolytickou aktivitou existujících proteinů v tekutině a určitou mírou metabolické aktivity spermií (Sostaric et al. 2008).

Kvalitativní a kvantitativní charakterizace proteinů přítomných a vylučovaných do lumen různých oblastí nadvarlete hřebce byla provedena pomocí dvourozměrné elektroforézy. Tímto

proteomickým přístupem bylo identifikováno 201 proteinů v lumen a 117 z nich bylo vylučováno epitelem v různých částech orgánu. Osmnáct z těchto proteinů bylo zodpovědných za 92,6 % celkové sekreční aktivity nadvarlete, zatímco laktoferin byl utvářen 41,2 % a klusterinem 24,8 % (Fouchécourt et al. 2000).

3.5 Frakce ejakulátu

Ejakulát hřebce lze rozdělit do prespermatické, spermatické a postspermatické frakce (Heiskanen et al. 1994, Oliveira et al. 2020). Rozdílnost ejakulátu je způsobena odlišným obsahem tekutin z přídatných pohlavních žláz a koncentrací spermií v různých frakcích (Akçay et al. 2006).

Ejakulace u hřebce je zahajována prespermatickou a vodní frakcí, která neobsahuje spermie, ale zahrnuje látky jako glycerofosfocholín (GPC), ergothionein a citrát. Tato tekutina je produkována prostatou a bulbouretrálními žlázami (Stelletta et al. 2021). První část ejakulátu, má za úkol čištění močové trubice a poskytování lubrikace (Segabinazzi et al. 2018).

Druhá frakce, bohatá na spermie, vychází z ocasu nadvarlete, deferenčních kanálků a ampulí chámovodu (Segabinazzi et al. 2018). Terminální frakci tvoří tekutina obsahující gel se zbylými spermii v močové trubici (Segabinazzi et al. 2018).

Během ejakulace u koní je pozorováno rozdělení spermatu do 6–9 spermatických frakcí. Frakcionová ejakulace uskutečňuje rozsáhlý objem spermatu a umožňuje rozlišení a identifikaci různých spermatických frakcí (Morelli et al. 2021).

3.6 Proteiny semenné plazmy

Všechny fyziologické modifikace spermií jsou zprostředkovány proteiny semenné plazmy (Fiala-Rechsteiner et al. 2023). Přeměna povrchu spermií, probíhající během průchodu spermií samčím genitálním traktem a pokračující při ejakulaci, je uskutečňována pomocí sekrečních proteinů semenné plazmy, které jsou hlavně získávány z nadvarlete a přídatných pohlavních žláz. Proteiny hřebčí semenné plazmy jsou rozděleny do tří hlavních kategorií: proteiny nesoucí dva nebo čtyři moduly fibronektinu typu II (známé jako proteiny typu Fn-2), sekreční proteiny bohaté na cystein (CRISP) a spermadhesiny. V modulaci kapacity spermií se uplatňují proteiny FN-2, které jsou zásadní pro tento proces. Proteiny CRISP jsou zapojeny do fúze spermií a oocytů, vrozené obranné funkce hostitele a blokády iontových kanálů. Spermadhesiny, specifické pro druhy kopytníků, projevují své vazebné vlastnosti na uhlohydrátech a *zona pellucida*, což naznačuje jejich úlohu při rozpoznávání gamet. Proteiny semenného typu Fn-2 jsou u hřebce zaznamenány jako nejhojněji zastoupené složky (Töpfer-Petersen et al. 2005). Proteiny typu Fn-2 jsou rozprostřeny podél kompletního pohlavního ústrojí hřebců (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Množství proteinů v hřebčí semenné plazmě je relativně nízké (10 mg/ml) ve srovnání s jinými savci, kteří vykazují obsah bílkovin přibližně v rozmezí 20–60 mg/ml (Von Fellenberg et al. 1985).

Mezi hlavní proteiny semenné plazmy hřebců jsou zařazeny proteiny (označené jako HSP-1 až HSP-8) s nízkou molekulovou hmotností v rozmezí 14–30 kDa (Calvete a kol. 1994). Během ejakulace jsou všechny tyto proteiny, s výjimkou HSP-4, povrchově vázány na spermie.

HSP-1 a HSP-2 (neboli SP-1 a SP-2) jsou dominantními proteiny v semenné plazmě, tvořící 70–80 % celkového proteinu (Calvete a kol. 1994). Číselné hodnoty byly přiděleny v závislosti na pozici genu na chromozomu, podle které jsou dané proteiny prepisovány (Calvete et al. 1994, Töpfer-Petersen et al. 2005).

Ve všech frakcích spermatu jsou identifikovány proteiny semenné plazmy HSP-1, HSP-2 a HSP-4. U hřebců jsou pozorovány významné rozdíly v množství HSP-2 mezi frakcemi. Nejvyšší koncentrace jsou zaznamenány ve frakci bohaté na spermie (Kareskoski et al. 2005).

3.6.1 Vliv proteinů semenné plazmy na kryokonzervaci

Velké množství proteinů semenné plazmy interaguje s membránou spermie během ejakulace, což vyvolává biochemické a strukturální změny, jež přispívají k funkci spermií a interakci gamet. Nicméně role většiny těchto proteinů zůstává neobjasněná (Guasti et al. 2020). Životaschopnost spermií uložených v semenné plazmě není udržena dlouho, což je způsobeno přítomností několika proteinů, včetně klusterinu a hřebčího seminálního plazmatického proteinu HSP-1 (Guasti et al. 2020). Přítomnost semenné plazmy může vyvolat předčasnou kapacitaci a následnou buněčnou smrt (Love et al. 2005, Akcay et al. 2006, Arruda et al. 2008).

Bylo zjištěno několik složek, které mohou v určitém rozsahu vázat tyto proteiny, což umožňuje spermiím zůstat ferilitními během *in vitro* skladování v přítomnosti seminální plazmy. Jsou to globulární proteiny obsažené v organických tekutinách, především v mléce (Bergeron et al. 2007, Plante et al. 2015) a vaječném žloutku (Bergeron & Manjunath 2006). Během kryokonzervace je semenná plazma ze spermatu obvykle eliminována, přičemž zůstává pouze 0–5 % původního objemu semenné plazmy (Moore et al. 2005).

Na základě vědeckých studií bylo prokázáno, že kryokonzervace spermií je ovlivňována proteiny semenné plazmy hřebců. Dle studie Amann & Pickett (1987) bylo zaznamenáno, že odstranění semenné plazmy je nezbytné pro úspěšnou kryokonzervaci. Podle studie Moore et al. (2005) bylo zjištěno, že semenná plazma měla poměrně malý vliv, bez ohledu na to, zda byl tento vliv pozitivní nebo negativní, na motilitu nebo životaschopnost kryokonzervovaných spermií u hřebců, pokud byla spermie zmrazena ihned po zpracování. Když byly spermie vystaveny vysokým hladinám semenné plazmy (20 % objemových) po neúměrně dlouhou dobu před zmrazením, semenná plazma se pro proces kryopřežití hřebčích spermií ukázala jako nepříznivá. V rámci další studie Al-Essawe et al. (2018) bylo zkoumáno zvýšení kvality kryokonzervovaného spermatu u hřebců s prokazatelně horší mrazitelností. Bylo zjištěno, že přidání semenné plazmy po rozmrazení mělo signifikantní pozitivní vliv na kvalitu spermatu u těchto jedinců. Proces kryopřežití a kapacitní změny v důsledku zmrazování a rozmrazování mohou být prospěšně ovlivněny proteiny obsaženými v seminální plazmě, jak bylo prezentováno ve studii Oliveira et al. (2020). Bylo zaznamenáno, že přidání frakcí proteinů semenné plazmy významně zlepšilo motilitu a životaschopnost spermií po rozmrazení (Bubenickova et al. 2020). Kaseiny, které jsou globulárními bílkovinami v mléce, jsou součástí mnoha ředidel spermatu a dokážou vázat klusterin, HSP-1 a epididymální protein vázající spermie, což má za následek stabilizaci membrán spermií a snížení předčasné kapacitace během skladování *in vitro*. Je to patrně důvod, proč řada výzkumníků nenastihuje žádné negativní účinky škodlivého včlenění semenné plazmy, když je sperma hřebců výrazně zředěno pomocí ředidel s obsahem mléka (Griffin et al. 2022).

3.7 Hodnocení kvality hřebčího ejakulátu

Cílem spermatologické evaluace je systematicky analyzovat, zda kvantitativní a kvalitativní parametry ejakulátu odpovídají minimálním standardům specifikovaným pro biologické složení ejakulátu hřebců. Minimální standardní požadavky na ejakuláty hřebců určených pro umělou inseminaci jsou publikovány na webových stránkách Světové federace chovatelů sportovních koní (WBFSH) (Samper 2009). Hodnocení ejakulátu hřebců je určeno pro diagnostiku sterility, výrobu čerstvých, chlazených nebo zmrazených dávek a kontrolu kvality zmrazené pejetý. Makroskopické-fyzikální a světelné mikroskopické vyšetření ejakulátu hřebců je základem analýzy (Pesch et al. 2006). V současné době probíhá hodnocení ejakulátu hřebců od makroskopického posouzení až po analýzu proteinů spermií (Egyptien et al. 2023). I přesto, že byly vytvořeny systémy počítačové analýzy spermií (CASA), mají konvenční metody širší odbornou akceptaci a jsou rozsáhleji uplatňovány, zahrnují makroskopické a mikroskopické hodnocení ejakulátu laboratorním technikem (Dias et al. 2019).

3.7.1 Makroskopické posouzení

Makroskopické hodnocení je prováděno analýzou chemických a fyzikálních parametrů ejakulátu, jako je konzistence, barva, objem a pH (Krausz & Farnetani 2023). V rámci standardního laboratorního postupu je ještě prováděno zkoumání zápachu ejakulátu. Makroskopický charakter ejakulátu je determinován jeho hustotou, odvozenou z koncentrace spermií, složením semenné plazmy nebo přítomností moči, hnisu a krve (Samper 2009). Zahájení makroskopické analýzy ejakulátu by mělo být zahájeno vyšetřením procesem zkapalňování, optimálně do 30 minut až 1 hodiny po provedení odběru (Dias et al. 2019).

Objem spermatu

Objem ejakulátu je ovlivněn druhem, plemenem, věkem a prostředím jedince. Mezi faktory, které ovlivňují množství ejakulátu jsou: výživa, podmínky ustájení, kondice, roční období a četnost odběru ejakulátu (Samper 2009). Sportovní disciplína a soutěžní úroveň hřebce také významně ovlivňuje celkový objem včetně koncentrace spermií a celkový počet progresivně pohyblivých spermií.

Hřebci, kteří závodí v parkurovém skákání mají vyšší celkové objemy ejakulátu než nesoutěžící hřebci a drezúrní hřebci. Mladší hřebci ve věku 2-4 roky mají nižší celkové objemy oproti hřebcům ve věku 5-9 let a 10-14 let (Wilson et al. 2019).

Objem ejakulátu vypovídá o celkovém fungování přídatných pohlavních žláz (Dias et al. 2019) a je určován bez přítomnosti gelu, kdy zahrnuje pouze hlavní část, tj. frakci bohatou na spermii (bez prespermatické frakce a postspermatické frakce). Objem ejakulátu je zaznamenáván ve sterilním odměrném válci, který je předem zahřát na 38°C. Celkový objem ejakulátu se pohybuje v rozmezí 60-120 ml, přičemž objem bez gelu je stanoven na 30-100 ml (Samper 2009). Objemné množství ejakulátu u hřebců představuje signifikantní komplikaci při zpracování spermií pro umělou inseminaci (Morrell et al. 2009).

Objem ejakulátu, spolu s koncentrací spermií, jsou zásadním prvkem pro stanovení celkového počtu spermií. Přesné stanovení koncentrace přímo ovlivňuje množství a kvalitu

vyrobených ID a tím i množství připuštěných klisen. Nesprávně změřená koncentrace spermií může ovlivnit reprodukční úspěšnost hřebce (Love 2012).

Konzistence a hustota

Optimální ejakulát by měl vykazovat homogenitu a prezentovat neprůhledný charakter, což naznačuje vysokou koncentraci spermií. Naopak průhledný ejakulát signalizuje snížený počet spermií. Lze tedy konstatovat, že viskozita a vizuální aspekty ejakulátu jsou ovlivněny počtem spermií (Tandle 2017). S ubývajícím počtem spermií dochází k variabilitě koncentrace, projevující se od krémové, mléčné, syrovátkové až po vodnatou barvu ejakulátu. Tato variabilita může být způsobena sníženou spermatogenezí (oligozoospermie) nebo nepřítomností spermií (azoospermie) (Samper 2009).

Barva

Barva ejakulátu u hřebců je stanovena jako bělavá až bělavě šedá (Samper 2009). Přítomnost odchylky od normativní barevnosti může být indikátorem patologického stavu v oblasti pohlavního ústrojí. Červená barva ejakulátu je rozpoznávána jako známka čerstvé krve, hnědá barva signalizuje přítomnost staré krve, znečištění nebo kontaminaci, a žlutá barva v případě urospermie. Barva je posuzována proti přirozenému světlu co nejdříve po odběru. V případě detekce barevné abnormality by vzorek měl být zcela vyloučen z dalších analýz (Tandle 2017).

Cizí příměsiny

V ejakulátu by měla být prokázána absence nežádoucích prvků, včetně chlupů, purulentních látek, moči, hemoglobinu, výkalů a podestýlky. Přítomnost růžově-načervenalé pigmentace je důsledek přítomnosti krve, která může být způsobena poraněním žaludu, močové trubice nebo patologickým stavem vnitřních genitálií. Detekce lubrikantu v ejakulátu lze vykládat jako nadměrnou aplikaci lubrikantu (Tandle 2017).

Pach

Ejakulát hřebců bývá běžně pachově neutrální. Přitom je důležité vyloučit možné zápachy moči, příznaky rozkladu a ejakuláty charakterizované druhově specifickým zápachem výkalů (Samper 2009).

pH

Další analýza, která nesmí být opomenuta při celkovém hodnocení reprodukčního výkonu hřebce, je vyhodnocení ukazatele pH ejakulátu, jenž reflektuje kyselost nebo zásaditost ejakulátu (McCue 2014). Fyziologické pH by mělo být stanoveno co nejdříve po odběru vzorku, neboť prodloužená inkubace vzorku může vést k poklesu hodnoty pH. Standardní rozmezí fyziologického pH surového hřebčího ejakulátu se pohybuje mezi 7,2 a 7,7. Hodnota pH ejakulátu může být ovlivňována reprodukční sezónou hřebce, koncentrací spermií a frekvencí ejakulací (McCue 2021).

3.7.2 Mikroskopické posouzení

Světelná mikroskopie převážně poskytuje odhad fertility hřebců, zaměřený na motilitu a morfologické odchylky spermií, které jsou předpokládány jako hlavní indikátory reprodukční úspěšnosti (Pesch et al. 2006). Posouzení ejakulátu je subjektivní a posuzuje se 100 až 200 spermií (Merkies et al. 2000).

Analýza motility spermií

Analýza motility zahrnuje jak celkovou, tak progresivní motilitu spermií. Celková motilita zahrnuje procento spermií, které jsou aktivně pohybující se, zatímco progresivní motilita zahrnuje pouze spermie, které jsou aktivně pohybující se vpřed nebo po velkých kruzích. Pro dosažení důvěryhodné analýzy motility spermií je nezbytné, aby všechny materiály, které přicházejí do kontaktu s ejakulátem, byly udržovány v čistém, suchém stavu a zahřáty na teplotu 38 °C. Pro hodnocení pohyblivosti spermií pod mikroskopem je třeba, aby bylo provedeno standardní zředění na koncentraci 25×10^6 a aby byl změřen objem ejakulátu. Na podložní skličko je kápnuta malá kapka (6-10 μ l), a následně podrobena mikroskopickému vyšetření (Ball 2016). U syrového ejakulátu zdravého hřebce by měla být celková motilita nad 70 % a progresivní motilita nad 50–60 % (Vidament 2005).

Posouzení koncentrace spermií

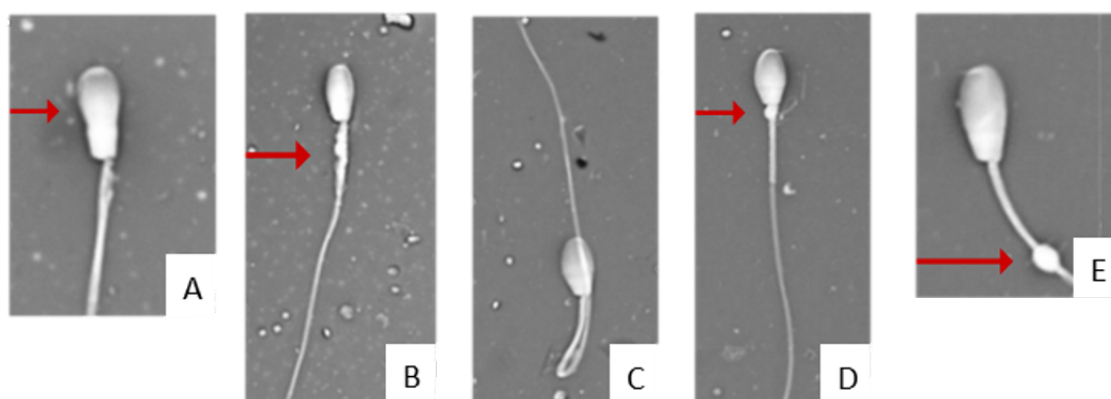
Koncentrace spermií je vyjádřena jako počet spermií na mililitr. K posouzení koncentrace spermií může být využito několik metod. Mezi tyto metody patří počítání spermií pomocí hemocytometru, spektrofotometru, elektronického čítače částic, průtokové ph-cytometrie a obrazového čítače částic. Metoda s hemocytometrem je považována za jednu z metod s nižšími náklady, ale je známa svojí časovou náročností. Spektrofotometrická metoda umožňuje úsporu času a poskytuje dostatečnou přesnost. Pro získání celkového objemu spermií se vynásobí objem ejakulátu bez gelu a koncentrace spermií na mililitr (Ball 2016).

3.7.3 Metody morfologického vyšetření spermií

Morfologické vyšetření spermií je považováno za jedno z nejpřesnějších měřítek při analýze reprodukčního zdraví hřebce (Card 2005). Významný vliv na hodnocení morfologie spermií hřebců je vykazován zvolenou metodou a posuzovatelem, přičemž mohou být pozorovány drobné odchylky a rozdíly mezi zvolenou metodou a posuzovatelem (Brito et al. 2011). Struktura spermií se často zkoumá pomocí světelného mikroskopu s 1000násobným zvětšením. Je nezbytné vyhodnotit alespoň 100 spermií na identifikaci morfologických odchylek a zaznamenat charakter a četnost každé abnormality (Varner 2008). Existuje několik morfologických schémat, jež jsou využívána při identifikaci morfologických abnormalit spermií. V minulosti bylo prováděno klasifikování morfologických abnormalit podle jejich vzniku jako primární, sekundární a terciální. Primární abnormality (viz. Obrázek 3) ukazovaly na vývojové odchylky v semenném epitelu jako následek abnormální spermatogeneze, sekundární abnormality jsou ty, které vznikly po výstupu spermatických buněk z varlete, a terciální abnormality bičků byly určeny jako následek nedostatečné manipulace s ejakulátem během odběru nebo následného zpracování (Kaya et al. 2014).

Primární defekt je způsoben testikulárním původem a zahrnuje jaderné vakuoly a další specifické anomálie (Card 2005). Ve vylučovacích kanálcích vznikají sekundární abnormality (Varner 2008), jako příklad sekundárního defektu jsou prezentovány proximální kapénky (Card 2005). Terciální abnormality se formují *in vitro* v reakci na nesprávné postupy při odběru ejakulátu (Varner 2008).

Blom (1977) rozlišuje dvě morfologické kategorie abnormalit spermií. Primární se projevují v průběhu spermatogeneze, čímž je ilustrován nesprávný průběh spermatogeneze, zatímco sekundární jsou lokalizované ve vylučovacích kanálcích, což je spojeno narušením zrání spermií. Primárně-sekundární klasifikační systém představuje jednu z převládajících metod v oblasti morfologické analýzy (Card 2005).



Obrázek 3: Příklady morfologických abnormalit hřebčích spermií:

A: abnormalita hlavičky spermie, B: abnormalita střední části, C: abnormalita bičíku, D a E: přítomnost cytoplazmatických kapek (Brito 2007).

3.7.4 Casa

Počítačem podporovaná analýza spermií (CASA – Computer Assisted Semen Analysis) je v aktuální době efektivně implementována u hospodářských zvířat (van der Horst 2020). Inovativní automatizovaný systém vyvinutý k poskytování přesných a významných informací o koncentraci spermií, jejich životaschopnosti, dynamice a morfologii (Amann & Katz 2004). Vedle hodnocení koncentrace spermií a pohyblivosti spermií (procentuální a kinematická seskupení) je ve specializovaných systémech CASA automatizovaná analýza morfologie spermií, životaschopnost spermií a fragmentace spermií (van der Horst 2020).

Systémy Casa bývají složeny z videokamery, fázově kontrastního mikroskopu, který je synchronizován s počítačem obsahujícím specializovaný software pro získávání obrazu a analýzu dat (Egeberg et al. 2013, Sethi et al. 2021). Většina systémů založených na mikroskopii pracuje na principu získávání série po sobě jdoucích snímků pohybujících se spermií v nehybném poli. CASA je vybavena sofistikovaným softwarem, který pořizuje sekvence snímků pro identifikaci individuálních spermií, často na základě morfologie hlav spermií spíše než ocasů, a sleduje jejich postup v zorném poli. To zahrnuje identifikaci téže buňky v každém snímku na základě její pozice a extrapolaci této pozice odhadem pravděpodobnosti, že se buňka přesune pouze o určitou maximální vzdálenost mezi jednotlivými obrazy (Sethi et al. 2021).

S pomocí CASA, analyzující pohyby hlavičky spermií, bylo dosaženo vyšší přesnosti a spolehlivosti hodnocení pohyblivosti spermií, přinášející více informací než klasické subjektivní hodnocení motility (Verstegen et al. 2002).

Při zkoumání pohyblivosti za pomoci technologie CASA musí být zohledněny různé faktory, jako jsou technické aspekty, optická konfigurace, nastavení softwaru, podmínky snímání, počet zkoumaných polí, koncentrace a ředění vzorku a charakteristika analytického prostoru, které mohou ovlivňovat výsledky (Contri et al. 2010).

S cílem minimalizovat odchylku bylo podniknuto úsilí o sjednocení postupů hodnocení motility spermií (CASA) napříč různými druhy (Amann & Katz 2004).

3.8 Zpracování ID

Zpracování ejakulátu, ať už je určeno k inseminaci jako čerstvá, chlazená nebo jako zmrazená inseminační dávka, podléhá variabilnímu zpracování se záminkou zachovat reprodukční potenciál inseminační dávky (Samper 2009).

Pro způsob zpracování je rozhodující plánovaná doba uchování inseminační dávky. Dávky, určené k okamžitému použití do 48 hodin po odběru, stačí pouze přefiltrovat od nečistot a následně použít buď u jedné klisny, nebo je možné je naředit a použít u více klisen (Aurich 2012). Při dlouhodobém skladování hřebčího spermatu jsou nezbytné metody, jež snižují poškození a maximalizují životaschopnost, přežití a fertilitu spermií (Loomis 2006).

Mnoho metod zpracování vyžaduje separaci spermií od seminální plazmy. Techniky separace ejakulátu jsou používány z několika důvodů. Jeden z nich je zvýšení koncentrace spermií a odstranění seminální plazmy před chlazením nebo zmrazením spermatu. Dalším důvodem je separace spermií od seminální plazmy a selekce obohacené populace životaschopných spermií z ejakulátu (Loomis 2006). Pro dlouhodobé uchování je nezbytné 80-95 % semenné plazmy odstranit. Toto odstranění se obvykle provádí pomocí centrifugace (Loomis 2011) při síle 600 g po dobu 10 minut (Consuegra et al. 2018).

Podle studií byla přítomnost seminální plazmy prokázána jako škodlivá pro pohyblivost a membránovou integritu spermií hřebců a doporučuje se její odstranění centrifugací (Love et al. 2005, Akcay et al. 2006, Arruda et al. 2008). Vysoký obsah (více než 20 %) seminální plazmy je nepříznivý pro udržení pohyblivosti spermií během dlouhodobého skladování (Pruitt et al. 1993). Bylo zjištěno, že přítomnost malého podílu hřebčí semenné plazmy (0,6-20 %) je prospěšné jak pro parametry spermií, tak pro fertilitu spermií (Jasko et al. 1992, Moore et al. 2005). Jestliže má být sperma skladováno déle než 24 h, neměly by dávky obsahovat více než 10 % semenné plazmy (Pruitt et al. 1993, Todd et al. 2001).

3.9 Metody selekce spermií

Mezi metody selekce spermií patří metody swim-up a jednovrstevná koloidní centrifugace (Morrell et al. 2017).

3.9.1 Jednovrstevná koloidní centrifugace (SLC)

Optimalizace kvality spermií u různých druhů, včetně hřebců, beranů a oslů, je dosahována pomocí metody nazývané Single Layer Colloidal Centrifugation (SLC). Kvalita spermií hřebců může být tímto způsobem posilována v různých situacích a pro různé účely v chovu koní (Morrell & Nunes 2018). SLC jsou poskytovány vysoce kvalitní spermie se zvýšeným počtem pohyblivých a membránově neporušených spermií. Oproti tomu byl zaznamenán výrazný úbytek spermií během centrifugace (Gloria et al. 2016).

Bylo doloženo, že kvalita spermatu hřebců je dlouhodobě zvyšována (Morrell & Nunes 2018), včetně zdokonalování morfologie spermií v ejakulátech nízké kvality (Šterbenc et al. 2019). V kontextu této techniky není pozorováno zlepšení kvality spermií u všech hřebců, a zároveň je sledována významná ztráta spermií. Standardní míra výtěžnosti při centrifugaci se pohybuje mezi 30 % a 40 %, avšak může být též podstatně nižší (Edmond et al. 2012). Aby byla zajištěna optimální účinnost této techniky, je nezbytné, aby byla testována na daném hřebci před odesláním spermatu k inseminaci. To zahrnuje nejen sledování míry výtěžnosti, ale též analýzu morfologického profilu spermií po použití centrifugace (Kelley 2024).

Studie Crockett et al. (2001) ukázala, že odstředění a následné zmrazení spermatu, které prošlo předchozím chlazením po dobu 6-24 hodin, mělo negativní vliv na pohyblivost spermií po rozmrazení. Výzkum naznačuje, že zachování optimální fertility může být dosaženo při odstředění spermatu při pokojové teplotě před ochlazením. Další vědecké studie Backman et al. (2004) a Melo et al. (2005) naznačují, že předchozí chlazení spermatu po dobu 18–24 hodin před centrifugací a následným zmrazením neprojevovalo žádné nepříznivé vlivy na motilitu nebo fertilitu spermií po rozmrazení.

3.9.2 Swim-up metoda (SU)

Metoda swim-up je v in vitro prostředí využívána k oddělení pohyblivých spermií od nepohyblivých, přičemž princip této metody spočívá v migraci spermií do kultivačního média (Volpes et al. 2016). SU je založena na přirozené progresivní pohyblivosti spermií, při níž spermie proplavávají médiem směrem nahoru po dobu 30 až 60 minut (Henkel & Schill 2003). Při metodě SU dochází k akumulaci nejvyšší koncentrace pohyblivých spermií v horní frakci, zatímco ve spodní frakci jsou uchovány spermie s nízkou nebo žádnou pohyblivostí. Spermie v horní frakci prokazují zvýšenou pohyblivost, vyšší průměrnou rychlost a vyšší podíl normální morfologie (Magdanz et al. 2019).

Bohužel, míra výtěžnosti spermií SU je nízká, což naznačuje, že SU je použitelným testem pouze pro vzorky s vysokou koncentrací nebo pro metody, jako je intracytoplazmatická

injekce spermií (ICSI), které nevyžadují významný počet spermií v konečné vybrané frakci (Henkel & Schill 2003, Sieme et al. 2003)

3.9.3 Sexace spermií

Selekce spermií na základě přítomnosti chromozomu X nebo Y je prováděna u mnoha druhů. Význam sexace spermií je zvláště patrný u koní, kde mohou fenotypy samičího nebo samčího pohlaví považovat za vhodnější pro sportovní nebo pro produkční výsledky (Aurich & Schneider 2014). Při výběru jednoho nebo druhého pohlaví, jsou fyziologické rozdíly mezi spermiemi nesoucí chromozom X a Y klíčovými. Spermie chromozomu X a Y jsou z hlediska funkčnosti oplodnění v podstatě rovnocenné, nicméně existují mezi nimi významné rozdíly.

Spermie X u hospodářských zvířat disponují o 3-4,2 % více genetického materiálu než spermie Y. Tudíž princip třídění pohlaví prostřednictvím průtokové cytometrie je založen na základě tohoto rozdílu mezi spermiemi X a Y (Hendriksen et al. 1996). Pro separaci spermií nesoucí chromozomy X a Y se nejčastěji využívá průtoková cytometrie. Třídění podle pohlaví pomocí průtokové cytometrie je prováděno s využitím fluorescenčního barvení Hoescht 33342, přičemž jsou jednotlivé spermie kategorizovány na základě rozdílů v hmotnosti pohlavních chromozomů (Rath & Johnson 2008, Samper et al. 2012, Garner et al. 2013). Při separaci spermií nesoucích chromozomy X a Y u různých druhů byla selekce pohlaví prostřednictvím průtokové cytometrie úspěšná (Garner et al. 2013). V případě koní byla technologie určení pohlaví využita k produkci živých hříbat, u kterých bylo pohlaví stanoveno s přesností přesahující 90 % (Buchanan 2000, Samper et al. 2012, Rath et al. 2013, Aurich & Schneider 2014).

3.10 Ředění spermatu

Čerstvý ejakulát je možný pro umělou inseminaci využít pouze po omezený čas. Ejakulát však lze udržet prostřednictvím specifických ředidel, určených pro inseminaci (Katila 1997). Ředění ejakulátu je využíváno nejen u hřebců, ale i u široké škály dalších druhů. Ředěním je umožněno preciznější posouzení kvality ejakulátu a zvýšení jeho životaschopnosti. Především je to nezbytná část v kontextu uchování spermatu hřebců, kde je implementováno v procesech chlazení a zmrazování (Hayden et al. 2015). Dalším významným cílem při ředění ejakulátu je snížení objemového podílu seminální plazmy ve skladované inseminační dávce (Pruitt et al. 1993).

Ředidla poskytují ochranu před škodlivými vlivy, jako je mrazový a osmotický šok, oxidační stres a poškození buněk ledovými krystalky. Dále udržují vlastnosti spermií, včetně jejich morfologie, pohyblivosti a životaschopnosti, a integrity membrán, akrozomů a DNA. Z tohoto důvodu musí ředidla obsahovat příznivé pH, ochranu proti ochlazení a mrazovému šoku a antioxidační aktivitu, s cílem zlepšit kvalitu pro oplodnění (Bustani & Baiee 2021).

Typická ředidla jsou sestavena z fyziologických solí, živin, pufovacích látek, ochranných látek a látek, které inhibují mikrobiální růst spermií například antibiotika a antimykotika. Obvykle se pohybují v rozmezí pH 6,7-7,2 a osmolality 300-360 mOsm kg⁻¹ (Katila 1997). Do ředidel spermatu se obvykle přidávají pufovací sloučeniny, jako je hydrogenuhličitan sodný (NaHCO₃) a 2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonátová

kyselina (HEPES), pro udržení stabilního pH (Pickett et al. 1976). Cukry, jako je glukóza, laktóza a fruktóza, slouží jako zdroje energie pro spermie (Katila 1997). Zvýšení motility spermií během skladování spermatu je ovlivněno cukry, jako je glukóza (Hernández-Avilés et al. 2020). Mezi ochranné látky patří proteiny a lipidy (z mléčných a vaječných žloutků) a také antioxidační látky (Pickett et al. 1976). Spermie jsou chráněny před teplotními změnami, především chladovým šokem, za účasti vaječného žloutku, mléka a mléčných výrobků (Pickett 2021).

Rovnováha mezi intra – a extracelulárním prostředím je udržována spermii prostřednictvím iontové výměny a transportu vody přes plazmatickou membránu, tedy aktivním a pasivním transportem vody (Swegen et al. 2015). Osmotický tlak je udržován správným poměrem elektrolytů a neelektrolytů v ředidlech, přičemž puřovací činidla v ředidlech přispívají k prodloužení motility spermií (Pickett 2021). Přidáváním osmoticky aktivních látek, jako jsou ionty, cukry a polyoly, je regulován osmotický tlak. Ionty, jako je NaCl a KCl, jsou nahrazeny v ředidle spermatu pro udržení osmotického tlaku. Kromě cukrů, jako je glukóza, se do ředidla mohou přidávat i aminokyseliny, například histidin a karnitin, jež mohou sloužit jako zdroje energie pro spermie (Swegen et al. 2015).

3.10.1 Komponenty ředidel

Spermie většiny druhů savců jsou energeticky závislé na glykolýze (Storey 2008). Pohyb spermií, který je umožněn bičíkem spermií, vyžaduje energii. Enzymy a reakce, které jsou zapojeny do tohoto procesu, jsou umístěny v hlavním článku ocasu spermií. Pro probíhání glykolýzy je nezbytné, aby glukóza byla vstřebána do cytoplazmy. Cukr může být transportován prostřednictvím pasivního i aktivního proteinem zprostředkovaného transportu (Bucci et al. 2010). Jako substrát pro glykolýzu jsou poskytovány jednoduché cukry, jako je glukóza nebo fruktóza, zatímco pyruvát a laktát jsou považovány za základní zdroje pro produkci energie v mitochondriích (Swegen et al. 2015). Cukry ovlivňují osmotický tlak dehydratující se buňky, snižují množství intracelulární vody dostupné pro potenciální tvorbu ledu. Vyjma toho jsou cukry zdrojem energie pro spermie během inkubace a chrání plazmatickou membránu během zmrazování a rozmrazování přímou interakcí s buněčnou membránou (Alvarenga et al. 2016).

Glukóza a fruktóza jsou dva nejčastěji se vyskytující monosacharidy v semenné plazmě savců (Setchell et al. 1994). Glukóza byla diagnostikována jako převažující glykosylovatelný cukr v semenné plazmě hřebců (Morel et al. 1999). Zhoršení pohyblivosti spermií hřebců při kryokonzervaci je pozorováno v důsledku nepřítomnosti glukózy v ředidle na bázi mléka, zatímco koncentrace glukózy dosahující až 40 mM je spojována s optimálním uchováním kinetických vlastností a simultánním zachováním integrity plazmatické membrány a akrozomu (Hernández-Avilés et al. 2020).

Antioxidanty jsou látky, které mohou zpomalit, zabránit nebo eliminovat oxidační poškození biomolekul, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (Khlebnikov et al. 2007). Antioxidační schopnosti aminokyselin mohou přispívat k ochraně spermatických buněk před chladovým šokem v průběhu ekvibrace a během procesu zmrazování (Sangeeta et al. 2015). Specifické aminokyseliny, jako je glutamin, prolin, histidin a glycin, mohou být aplikovány do

ředidel spermií k posílení motility a životaschopnosti spermií hřebců po rozmrazení (Trimeche, et al. 1999). Například glutamin prokazuje zlepšení pohyblivosti spermií hřebců (Renard et al. 1996, Khlifaoui et al. 2005). Prolin, potlačuje oxidaci lipidů a projevuje schopnost pronikat do spermií, čímž brání tvorbě ledových krystalů uvnitř buněk. Alanin, neesenciální aminokyselina, ovlivňuje pohyblivost a životaschopnost spermií při vyšších koncentracích (Koskinen et al. 1989).

Lipidy jsou významnou součástí buněčné membrány spermií, kde jejich složení ovlivňuje různé biologické funkce. Úspěšnost přežití spermií během procesů kryokonzervace a chladového šoku je spojena s lipidy v membráně. Vzhledem k tomu, že kryokonzervace a chladový šok nejsou přirozenými procesy pro spermie, mohou ovlivňovat lipidovou strukturu a tím i celkovou odolnost spermií. Jelikož spermatické buňky nejsou přirozeně adaptovány na tyto změny a podléhají stresovým faktorům (Mandal et al. 2014). Přidávání mastných kyselin je zdůvodněno jejich schopností ovlivňovat membránové vlastnosti a celkovou kryorezistenci spermií hřebců, a to z hlediska jejich životaschopnosti a pohyblivosti po rozmrazení. Složení mastných kyselin je úzce spojeno s tekutostí membrán, a tak přídavek specifických mastných kyselin do ředidla může modifikovat vlastnosti membrány a celkovou odolnost spermií hřebců vůči mrazu (Macías García et al. 2011).

Podle výsledků studie Ricker et al. (2006) jsou čistá lipidová ředidla schopna ochránit membrány během procesu kryokonzervace. Jejich schopnost udržet životaschopnost, motilitu a fertilitu spermií se ukázala jako srovnatelná s tradičními ředidly na bázi vaječného žloutku.

Poškození spermií v důsledku lipidového fázového přechodu může být zmírněno přidáním lipoproteinů s nízkou hustotou ve formě vaječného žloutku nebo mléka do ředidla (Pace & Graham 1974). V technologii chlazeného spermatu dominují ředidla postavená na odstředěném mléku (Batellier et al. 2001). Mezi základní složky, na kterých jsou založena komerčně dostupná zmrazovací ředidla pro hřebce, je vaječný žloutek, který se využívá jako kryoprotektant pro sperma u různých druhů savců, včetně hřebců (Gonzalez-Castro et al. 2019, Hernández-Avilés et al. 2023). Komerční ředidla pro zmrazování spermatu hřebců zahrnují kryoprotektanty, jako jsou odstředěné mléko, vaječný žloutek a glycerol v koncentraci 2-5 % (Heitland et al. 1996, Martin et al. 1979, Sieme et al. 2016). Variabilita v účinku kryoprotektiva a vhodného dávkování se projevuje jak mezi různými plemeny, tak i u jednotlivých hřebců v rámci konkrétního plemene (Soni et al. 2019).

Mléko a mléčné výrobky jsou složeny především z lipoproteinů a fosfolipidů, zatímco kasein a laktoferin jsou považovány za hlavní bílkovinné frakce. Mléčné sloučeniny jsou schopny chránit spermie prostřednictvím antioxidačního působení a předchází změnám ve struktuře membránovým lipidům (Manjunath et al. 2002). Struktura mléka zahrnuje látky, které mohou mít prospěšné, ale i negativní účinky na spermie. Specifické frakce mléka, jako například α -laktoglobulin, mohou negativně ovlivnit pohyblivost spermií, naopak β -laktoglobulin a nativní fosfokaseinát jsou pro spermie přínosné (Batellier et al. 1997). Z některých nežádoucích vlivů mléka byla vytvořena ředidla s chemicky definovaným složením. Tyto speciální ředidla byla navržena s úmyslem eliminovat potenciální negativní dopady spojené s konkrétními složkami mléka (Aurich 2008, Pagl et al. 2006).

Vaječný žloutek je zdrojem fosfolipidů a lipoproteinů, jež přispívají k udržování strukturální a funkční integrity membrány spermatických buněk, a tím zvyšují životaschopnost spermií po rozmrazení (Hernández-Avilés et al. 2023). Jednou z hlavních složek vaječného žloutku jsou lipoproteiny o nízké hustotě, které jsou dobře známy jako hlavní aktivní složky vaječného žloutku (Amirat et al. 2004, Bencharif et al. 2008). Jako možnou alternativu vaječného žloutku lze využít liposomy, především ty, které obsahují nenasycené lipidy (Röpke et al. 2011, Pillet et al. 2012). Zároveň se zkoumají komplexy cyklodextrinu a cholesterolu jako potenciální substituty vaječného žloutku v mrazících ředidlech (Blommaert et al. 2016, Moraes et al. 2015). Standardně se využívá vaječný žloutek v koncentraci 20 % (Alvarenga et al. 2016).

Doplňování ředidel o sloučeniny živočišného původu spojuje rizika biologické integrity s možnou mikrobiologickou zátěží spermatu. Ředidla jsou proto doplňována sloučeninami, které projevují schopnost potlačit mikrobiologický růst, hlavně při dlouhodobém skladování při zvýšených teplotách (Müller 2019). Proto jsou v ředidlech spermatu obsažena antibiotika pro kontrolu bakteriálních populací, jež by mohla být i přítomna v ejakulovaném spermatu (Hernández-Avilés et al. 2019).

Výzkum a diskuze týkající se role antibiotik v ředidlech pro sperma hřebců jsou trvale předmětem zkoumání. Kdy s narůstajícím ohrožením antimikrobiální rezistence se klade důraz na zkoumání přístupů, jako je použití antibiotik v dávkách spermií pro umělou inseminaci.

Antimikrobiální látky či jejich směsi jsou pravidelně začleňovány do ředidel spermatu jako preventivní opatření při přípravě spermií pro umělou inseminaci (Zabala et al. 2024). V ředidlech spermatu jsou často využívány antimikrobiální látky, mezi ně patří β -laktamy (peniciliny, cefalosporiny), které ovlivňují syntézu bakteriální buněčné stěny a vedou k lýze a buněčné smrti. Dále se uvádějí aminoglykosidy (gentamicin, streptomycin, amikacin), makrolidy (tylosin, spektinomycin) a linkosamidy (linkomycin), jež inhibují syntézu bakteriálních proteinů (Spinosa et al. 2006).

Podle studie Price et al. (2008) bylo zjištěno, že přidavek gentamicinu v malém množství (250 $\mu\text{g/ml}$) vedl k potlačení růstu bakterií a zlepšení pohyblivosti, rychlosti a životaschopnosti spermií ve spermatu hřebců skladovaném při teplotě 15 °C až 96 hodin, ve srovnání s kontrolním vzorkem, který nebyl obohacen žádnou antibakteriální látkou. Studie Ramires Neto et al. (2015) uvádí, že kombinace penicilinu a gentamicinu (1 000 IU-1 000 mg/ml) v BotuSemen (ředidlo na bázi odstředěného mléka) vedla k nižší bakteriální zátěži v spermatu hřebců po zchlazení ve srovnání s INRA 96, komerčním ředidlem obsahujícím penicilin (105 μg), streptomycin (38 μg) a amfotericin B (0,315 μg). V rámci studie Zabala et al. (2024) byly posuzovány tři techniky zpracování koňského spermatu (jednoduchá centrifugace, jednovrstvá koloidní centrifugace a filtrace) s ohledem na jejich vliv na kvalitu a mikrobiální zátěž, jak bezprostředně po zpracování, tak po 48hodinovém chlazení. Nebyly zjištěny významné rozdíly v kvalitě spermatu bezprostředně po zpracování mezi těmito technikami, s výjimkou vyššího indexu přímosti u filtrovaných a koloidně centrifugovaných vzorků. Po 48 hodinách chlazení se významně zvýšila pouze linearita a index oscilace u koloidně centrifugovaných vzorků. Analýza mikrobiální zátěže neodhalila žádné významné rozdíly mezi protokoly po ochlazení a menší rozdíly mezi některými protokoly a hodnotami surového spermatu. Hodnocené metody tedy udržely kvalitu spermatu a snížily mikrobiální zátěž ve stejném rozsahu jako tradiční protokol obsahující antibiotika. Avšak k potvrzení těchto zjištění je třeba dalších studií.

Během skladování spermií vznikají metabolity z kontaminujících bakterií, jež mohou ovlivnit pH ředidla a následně metabolismus a pohyblivost spermií (Yániz et al. 2011). Pro zabránění těmto změnám by měly být využívány zwitteriontové pufrů, které odolávají změnám pH během chlazení (Rasul et al. 2000). Z tohoto důvodu jsou do složení komerčních ředidel spermatu zahrnuty pH pufrů a látky odstraňující metabolity, jejichž úkolem je stabilizovat a neutralizovat účinky metabolismu spermií (Morel et al. 1999, Rasul et al. 2000, Aurich 2011). Pufrů, jako je hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), citrát sodný a HEPES, byly začleněny do komerčních ředidel s funkčním rozsahem pH pro hřebčí sperma (Aurich 2011). Pufrům je přisuzována role v omezení vlivu hromadění CO_2 a sekundárně hromadění kyseliny mléčné z OXPHOS, resp. Glykolýzy (Clulow & Gibb 2022).

Kryoprotektanty

Kryoprotektanty, označované též jako CPA (Cryoprotective agents), jsou rozděleny do dvou kategorií: penetrující a nepenetrující (McGann 1978). Penetrující kryoprotektanty pronikají membránou spermií a působí jak intracelulárně, tak extracelulárně, zatímco nepenetrující kryoprotektanty mají pouze extracelulární účinky (Swain & Smith 2010).

Použitím obou těchto tříd CPA společně se zvyšuje šance buněk na přežití a zároveň se reguluje obsah buněčné vody, čímž se minimalizuje riziko intracelulárního zmrazení (McGann 1978). Za pomoci kryoprotektantů je zajištěn spermiím odlišný stupeň ochrany před kryokonzervací (McKinnon et al. 2011). Komerčně mrazicí ředidla jsou obvykle složena z kombinace penetrujících a nepenetrujících kryoprotektantů, přičemž každý z nich má specifickou úlohu, jež přispívá k přežití spermií během zmrazování a rozmrazování ID (Prien & Iacovides 2016).

Penetrující kryoprotektanty

Při kryokonzervaci je nezbytné chránit intracelulární struktury a biomolekuly pomocí specifických ochranných látek, které mají schopnost proniknout buněčnou membránou. Prostupné kryoprotektanty se často profilují jako malé neiontové molekuly (Squires et al. 2004). Penetrující CPA jsou obecně účinnější, než nepenetrující CPA kvůli jejich vlivu na buněčné vlastnosti. Nahrazují vodu uvnitř buňky, což dehydratuje buňku a inhibuje tvorbu intracelulárního ledu, zvětšují objem nezmrzlých kanálků mezi krystaly extracelulárního ledu, čímž se zvětší prostor pro buňky a snižují koncentraci solí v nezamrzlém roztoku (Meryman 2007).

Glycerol byl obvykle používán jako hlavní kryoprotektant, avšak jeho toxicita mohla být zodpovědná za rozdíly ve zmrazitelnosti a fertilitě spermií hřebců. S cílem minimalizovat toxicitu glycerolu byla zkoumána alternativní kryoprotektiva, jako například dimethylformamid (DMF) (Soni et al. 2019) a ethylenglykol (Squires et al. 2004). Zřejmě je toxicita glycerolu spojena s osmotickými a neosmotickými účinky (Macías García et al. 2012). Nicméně je zjištěno, že někteří hřebci jsou na glycerol přecitlivělí, zatímco jiní ho dobře tolerují (Prien & Iacovides 2016).

Kryoprotektanty s nižší molekulovou hmotností, jako je již zmíněný dimethylformamid a methylformamid, nebo kombinace různých propustných kryoprotektantů jsou poskytovány

podobnou nebo dokonce vyšší mírou kryopřežití po rozmrazení díky jejich schopnosti rychle procházet membránou, čímž se snižuje osmotické poškození membrány (Squires et al. 2004, Alvarenga et al. 2005, Álvarez et al. 2014, Wu et al. 2015).

Hřebci, jejichž sperma má nízkou odolnost vůči kryokonzervaci, vykazuje výrazné zlepšení v pohyblivosti a fertilitě spermií při použití ředidel s obsahem dimethylformamidu a methylformamidu ve srovnání s ředidly obsahujícími glycerol (Alvarenga et al. 2016). Existuje spojitost mezi rychlostí chlazení a koncentrací různých kryoprotektantů (glycerol, ethylenglykol, dimethylformamid, propylenglykol a dimethylsulfoxid). Spermie jsou schopny přežít expozici 1,5 M koncentraci těchto kryoprotektantů před zmrazením. Nejvyšší míry kryoživotnosti jsou dosaženy při použití 500 mM dimethylformamidu, 250 mM glycerolu a 500 mM ethylenglykolu (Oldenhof et al. 2017).

Přestože jejich přidání vyvolává osmotický stres kvůli rychlejšímu pronikání vody přes buněčnou membránu než permeace kryoprotektiva, následným důsledkem je počáteční osmotická nerovnováha a kontrakce buněk. Dochází k postupnému přílivu vody a kryoprotektiva, až je dosaženo rovnoměrné distribuce uvnitř i vně buňky (Sieme et al. 2016).

Nepenetrující kryoprotektanty

Nepenetrujícími kryoprotektanty jsou vysokomolekulárními CPA, zahrnují se sem monosacharidy, disacharidy, trisacharidy, ale i běžná aditiva, jako je citrát vaječného žloutku, albumin, polyethylenglykol a polyvinylpyrrolidon (Santo et al. 2012).

Transportním médiem pro přenos gamet je semenná plazma, která je zároveň podporou pohyblivosti a přežívání spermií poskytováním energie ve formě jednoduchých cukrů (Morel et al. 1999). Z tohoto důvodu jsou začleňovány do složení ředidel nepenetrující kryoprotektanty, jako jsou jednoduché cukry, které minimalizují osmotický stres, vyvolávají dehydrataci buněk a snižují tvorbu ledových krystalků při zmrazování (Holt 2000) zejména pokud jsou používány v kombinaci s penetrujícími kryoprotektanty (Amann & Pickett 1987, Aisen et al. 2002, Moore et al. 2006). Jedná se o glukózu, fruktózu, manózu, pyruvát, laktózu, rafinózu (Webb & Arns 2006, Parkinson & Morell 2011) trehalózu a sacharózu (Amann & Pickett 1987, Aisen et al. 2002, Moore et al. 2006). Kde zabezpečují substráty pro tvorbu ATP, substráty mohou vykazovat kryoprotektivní účinek (Arns et al. 1987).

Mezi osmoticky aktivní molekuly patří disacharidy (např. sacharóza, trehalóza), zatímco osmoticky neaktivní sloučeniny zahrnují polysacharidy (jako je hydroxyethyl škrob, maltodextrin) a proteiny (např. albumin, polyvinylpyrrolidon) (Oldenhof et al. 2013). Sacharóza a trehalóza jsou nejčastěji používané disacharidy pro ochranu spermií před nízkými teplotami, neboť vykazují schopnost regulovat extracelulární a intracelulární osmotický tlak při zmrazování (PAN et al. 2017).

3.11 Komerčně dostupná ředidla

Vyvinula se celá řada různých chladicích ředidel pro koně (viz. Tabulka 1) a ředidel pro kryokonzervaci (viz. Tabulka 2) (Aurich 2008). Komerční ředidla používaná pro procesy chlazení a zmrazování spermatu se odlišují v obsahu látek, osmolaritě a schopnosti působit jako kryoprotektanty (Samper 2011).

3.11.1 Komerčně dostupná ředidla pro krátkodobou konzervaci

Tabulka 1: Ředidla a komponenty ředidel pro krátkodobou konzervaci spermatu (Neuhauser et al. 2019).

Ředidla pro chlazené sperma	
Ředidlo	Komponenty
INRA 96	Nativní fosfokaseináty
	Cukry (glukóza, laktóza)
	Soli (Hankovy soli, CaCl ₂ , KCl, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, Na ₂ HPO ₄)
	Pufry (NaHCO ₃ , HEPES)
	Penicilin, gentamicin
	Amfotericin B
BotuSemen	Sušené odstředěné mléko
	Cukry
	Aminokyseliny
	Konzervační látky
	Penicilin, gentamicin
Equi Plus	Sušené odstředěné mléko
	Cukry
	Pufry
	Gentamicin
Gent	Odstředěné mléko
	Cukry
	Pufry
	Vaječný žloutek
	Gentamicin

Ředidlo INRA 96 je dlouhodobě považováno za nejlepší a nejčastěji využívané (LeFrappier et al. 2010, Novello et al. 2020).

3.11.2 Komerčně dostupná ředidla pro dlouhodobou konzervaci

Tabulka 2: Ředidla a komponenty ředidel pro dlouhodobou konzervaci spermatu (Neuhauser et al. 2019).

Ředidla pro mražené sperma	
Ředidlo	Komponenty
INRA Freeze	Micelární mléčná bílkovina (<i>Bos bovis</i>)
	Plazma vaječného žloutku
	Cukry
	Soli
	Pufry
	Penicilin, gentamicin
	Amfotericin B
	Glycerol (2,5 %)
BotuCrio	Vaječný žloutek
	Cukry (99 ± 6,1 mM glukózy)
	Aminokyseliny
	Konzervační látky
	Gentamicin
	Pomocné látky
	Methylformamid (4 %) + glycerol (1 %)
EquiPlus Freeze	Sušené odstředěné mléko
	Vaječný žloutek
	Cukry
	Pufry
	Gentamicin sulfát
	Glycerol (3 %)
Gent Freeze	Odtučněné mléko
	Vaječný žloutek
	Cukry
	Pufry
	Gentamicin sulfát
	Glycerol (5 %)

V rámci obchodního tajemství výrobců je přesné chemické složení látek v ředidle utajováno (Rečková et al. 2022).

3.12 Čerstvá ID

Čerstvé sperma je standardně zpracováno s použitím 500×10^6 spermií/ml s progresivní pohyblivostí, přičemž je objemový poměr 1:1 (sperma: ředidlo) a udržován je objem menší než 60 ml (Love et al. 2002, Varner et al. 1989). K tomu je například využíváno ředidlo, jako je INRA96 nebo BotuSemen (Pasch 2024).

Po zpracování by mělo být sperma inseminováno do klisny, nejlépe v rámci prvních 12 hodin. V případě, že mezi zpracováním a inseminací nastane prodleva, dávka spermatu je uchovávána na tmavém místě při pokojové teplotě až do doby použití (Love et al. 2002, Varner et al. 1989). V situaci, kdy se vyskytne prodleva přesahující 12 hodin od zpracování spermatu, je doporučeno provést ochlazení a následné uchování v chlazeném stavu (4 °C) až do doby použití (Kelley 2024). Neboť metabolismus spermií při tělesné teplotě je velmi aktivní a generuje značné množství odpadních produktů, jako je například kyselina mléčná a volné kyslíkové radikály. Kyselina mléčná zvyšuje kyselost, což snižuje aktivitu enzymů, zatímco volné kyslíkové radikály vyvolávají peroxidaci lipidů, a to může způsobit průnik membrán a poruchu enzymatické aktivity (Graham et al. 2011).

3.13 Chlazená ID

V procesu přípravy chlazeného spermatu je nezbytné provést odstředění s cílem odstranit semennou plazmu, dosáhnout požadované koncentrace spermií (Pickett et al. 1975, Moore et al. 2005), což přináší snížení objemu inseminační dávky a zároveň zvyšuje počet inseminovaných spermií do klisny (Roach et al. 2016). Ředění spermatu pro chlazenou dávku se provádí v rozsahu 5-20 % semenné plazmy (Jasko et al. 1992). Koncentrace spermií, pohybující se v intervalu 25×10^6 - 50×10^6 spermií/ml (Varner et al. 1987), objem menší než 50 ml (Loomis 1993) a přítomnost 1×10^9 progresivně pohyblivých spermií v konečné dávce (Brinsko 2006).

3.13.1 Chlazení ID

Standardním postupem chlazené ID je postupné snižování teploty naředěného spermatu s cílem dosáhnout konečné teploty 4 °C až 10 °C (Katila et al. 2011). Chlazení a následné skladování spermií, umožňuje udržet fertilitu spermií až po dobu 72 hodin, je docíleno zejména snížením metabolické aktivity spermií až o 93 %. Snížení metabolické aktivity spermií, má za výsledek úsporu energie spermií. Tím je dosaženo redukce počtu metabolických produktů do ředidla, kde jsou spermie uchovávány. Při snížení tělesné teploty na 4 °C je metabolismus snížen na pouhých 7 % oproti normální tělesné teplotě. Nižší teploty v rozmezí od 0 °C do 2 °C jsou pro životaschopnost spermií nepříznivé, zatímco teploty nad 10 °C nemusí být dostatečně inhibiční pro metabolické procesy spermií (Graham et al. 2011).

Rychlost ochlazování spermatu během fázového přechodu membrány spermií z tekutého do gelového stavu (tj. mezi 9 °C a 19 °C) má zásadní vliv na životaschopnost spermií. V optimálním případě by se měla pohybovat okolo $-0,05$ °C/min (Moran et al. 1992, Graham et al. 2011).

V reakci na ochlazení spermií na 4–6 °C během klasického chlazeného skladování se může projevit degradace membrány spermií či výskyt chladového šoku, což v konečném důsledku způsobuje snížení životaschopnosti spermií (Graham et al. 2011). Chladový šok se objevuje při rychlém ochlazení spermií s rychlostí nad 0,3 °C za minutu a charakterizuje se sníženou a abnormální pohyblivostí spermií, poklesem integrity akrozomu a narušením metabolických funkcí spermií (Aurich 2005). Dochází k nevratnému poškození membrány spermií v důsledku změn tekutosti a distribuce fosfolipidů (Gadella et al. 2001).

Standardní postup zchlazení spermatu na 4 °C je schopen zachovat dobrou úroveň fertility spermatu většiny hřebců po dobu 48 až 72 hodin (Heiskanen et al. 1994, Katila et al. 2011, Graham et al. 2011).

V porovnání s kryokonzervovanými ID prokazuje chlazené sperma hřebce větší efektivitu, což se projevuje jak v zlepšené fertilitě spermií, tak v nižších nákladech pro chovatele (Clulow & Gibb 2022).

3.14 Mrazená ID

Výrazné množství semenné plazmy vede k nižší pohyblivosti spermií po rozmrazení. Tudíž částečné odstranění semenné plazmy je nezbytné pro úspěšnou kryokonzervaci a udržení životaschopnosti spermií po rozmrazení (Pickett et al. 1975, Moore et al. 2005). Při zmrazování hřebčího spermatu je obvykle dosahována koncentrace 200 milionů buněk na ml, s rozsahem mezi 100 a 400 miliony/ml (McKinnon et al. 2011). Přidávání ředidla by mělo probíhat pozvolna při současném pravidelném jemném míchání, dokud není dosaženo požadovaného objemu (McKinnon et al. 2011). Rychlý přírůstek a následné odstranění kryoprotektantů projevuje škodlivý dopad na životaschopnost a pohyblivost spermií hřebců (Ball & Vo 2001). Pro stanovení objemu nezbytného k dosažení uvedené koncentrace jsou vykonávány různé výpočty (Ecot & et al. 2005).

Stanovení odhadu počtu 0,5 ml pejet potřebných k jednomu zmrazení probíhá způsobem, kdy se celkový počet spermií (vypočtený před naředěním) násobí odhadovaným celkovým objemem na ml (požadovaná koncentrace), následně se výsledek dělí odhadovaným celkovým objemem. Poté je sperma vloženo a skladováno v 0,5 ml pejetách, dále lze celkový objem zdvojnásobit a určit potřebný počet pejet. Výpočet pouze předpokládá odhad, skutečný počet spermií by měl být stanoven pomocí Nucleocounteru (ChemoMetec) nebo hemocytometru po počáteční resuspenzi v mrazicím ředidle. Následné plnění pejet probíhá ručně nebo s podporou poloautomatického systému. V průběhu plnění je nutné zajistit úplné nasycení bavlněné zátky spermatem, přičemž do brčka je vložena vzduchová bublina o délce 0,5-1,0 cm pro následnou expanzi během rozmrazování. Po naplnění se každé brčko uzavírá prostřednictvím tepelného těsnění, skleněné kuličky nebo těsnicího prášku, aby se zacelil otevřený konec brčka. Vzduchová bublina je poté přemístěna do středu brčka pomocí švihnutí nebo rychlého jednorázového protřepání a brčka jsou následně rovnoměrně rozložena na stojan ve vodorovné orientaci pro optimální ochlazení a zmrazování (Pasch 2024).

Kryokonzervace spermií je dnes často prováděna v plastových pejetách s objemem 0,25 nebo 0,5 ml (Sieme & Oldenhof 2015).

3.14.1 Kryokonzervace ID

Kryokonzervace, jako postup extrémního snížení metabolické aktivity spermií, a následné ponoření naředěných spermií do tekutého dusíku při teplotě $-196,4^{\circ}\text{C}$ poskytuje možnost jejich skladování po neomezeně dlouhou dobu (Pariz et al. 2020). Kryokonzervace zůstává preferovanou technologií pro dlouhodobé uchování samčích gamet (Peña et al. 2011). Pro dosažení ideální kryokonzervace se vyžaduje použití kryoprotektiv s minimálními cytotoxickými účinky (Davidson et al. 2014) a striktní dodržení specifické rychlosti chlazení pro dosažení maximálního přežití spermií (Mazur 1963). Během postupů kryokonzervace a rozmrazování jsou spermie vystavovány řadě potenciálně nežádoucích stresů, jež jsou nejvýrazněji projevovány ve formě snížené pohyblivosti po rozmrazení (Brinsko 2006), dále jsou spermie konfrontovány s toxicitou kryoprotektantů (Macías García et al. 2012), hyperosmotickým šokem, a při rozmrazování poté zažívají hypoosmotický šok (García et al. 2012; Cole & Meyers 2011). Koncentrace a typ kryoprotektantů ovlivňují úspěšnost kryokonzervace (Leibo et al. 1999, Salamon & Maxwell 2000, Watson & Holt 2001, Fernández-Santos et al. 2006).

Mrazení ID

Zmrazování probíhá ve dvou fázích: v první fázi je sperma chlazeno z pokojové teploty na 5°C rychlostí $3\text{--}5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, přičemž optimální čas závisí na konkrétním složení použitého ředidla (Alvarenga et al. 2016). V druhé fázi následuje zmrazení s rychlostí $10\text{--}60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ až na teplotu -80°C . Dávky jsou poté ponořeny do kapalného dusíku ($-196,4^{\circ}\text{C}$) k dlouhodobému skladování (Sieme & Oldenhof 2015).

V případě dostupnosti programovatelného mrazicího zařízení lze toto zařízení nakonfigurovat tak, aby následovalo specifikovanou křivku zmrazování. Při manuálním postupu je stojan s pejety umístěn do chladničky po dobu 20 minut, následně je po dobu 20 minut ponechán ve výšce 3 cm nad parami kapalného dusíku, a nakonec je ponořen do nádrže s kapalným dusíkem (Pasch 2024).

Rychlost ochlazování je těsně spjata s membránovými charakteristikami konkrétního buněčného typu a individuálně se mění v závislosti na specifických vlastnostech buněčné membrány (Benson et al. 2012). Zmrazováním může být způsobeno hromadění škodlivých reaktivních forem kyslíku. Úroveň kryotolerance spermií hřebců koreluje s množstvím produkovaných ROS v mitochondriích (Yeste et al. 2015). Rovnoměrné zmrazování spermatu v pejetách, známé též jako konvenční zmrazování, obvykle zahrnuje využití různých rychlostí chlazení v různých teplotních režimech (Sieme & Oldenhof 2015).

Buňky spermatu čelí stresu způsobenému nízkými teplotami a osmotickou nerovnováhou. S poklesem teploty může dojít k nevratným změnám, přičemž osmotický stres během kryokonzervace vzniká zejména v důsledku tvorby extracelulárního ledu. Během tvorby extracelulárního ledu dochází ke zvýšení koncentrace rozpuštěných látek v nezmrazené extracelulární frakci, což vede k dehydrataci buněk (Mazur 2004, Meryman 2007). Dehydrace buněk v průběhu zmrazování vychází z transportu vody z buňky, který slouží k udržení rovnováhy mezi intracelulární a extracelulární koncentrací rozpuštěných látek. Tento jev, je spojený s nízkými rychlostmi chlazení. Při rychlém ochlazování je omezen čas na únik vody z

buňky, což udržuje vyšší intracelulární obsah vody a následně vede k vytváření intracelulárního ledu (Mazur 1963).

Jednotlivé laboratoře využívají svou unikátní metodu zmrazování, což způsobuje výrazné rozdíly v počtu spermií obsažených v jedné pejetě (Miller 2008). Špatná mrazicí schopnost je přisuzována přibližně polovině všech hřebců, což se odráží v produkci spermatu s omezenou tolerancí v procesu kryokonzervace (Šichtař et al. 2019).

Rozmrazování ID

Rozmrazování kryokonzervovaných inseminačních dávek se řadí mezi primární determinanty degradace kvality spermií. Centrálním aspektem ovlivňujícím kvalitu spermií hřebců je oxidační poškození způsobené reaktivními formami kyslíku. Spermie jsou výrazně přecitlivělé k oxidačnímu stresu vzhledem k omezené cytoplazmě a sníženému obsahu intracelulárních antioxidantů (Kawai et al. 2017).

Rozmrazování je prováděno v závislosti na použité metodě zmrazování a typu ředidla. Pejety o objemu 0,5 ml jsou buď rozmrazovány při teplotě 37 °C po dobu 30 s nebo při teplotě 46 °C po dobu 20 s, a to v předem ohřáté vodní lázni. Po rozmrazení jsou pejety ihned vyjímány a pečlivě osušeny, následně s nimi je prováděno jemné cvrknutí nebo jsou lehce protřepány za účelem přesunu vzduchové bubliny k utěsněnému konci pejety (Pasch 2024).

Hodnocení kvality ID po rozmrazení

Posuzování kvality ID po rozmrazení je založeno na pohyblivosti, životnosti a morfologii spermií. Životnost rozmrazených spermií je měřena při 37 °C, 20 °C nebo 5 °C. Hodnocení morfologie spermií je považováno za nejdůležitější indikátor kvality. Posuzování motility je spíše subjektivním měřítkem kvality a méně přesným prediktorem fertility oproti hodnocení morfologie spermií (Samper 2009).

Možnost subjektivního pozorování celkové a progresivní pohyblivosti po rozmrazení je možné pomocí malé kapky, která zůstala v inseminační pipetě, za použití mikroskopu na zahřátém sklíčku s krycím sklíčkem. Vzorek, kvůli malému objemu a potenciální kontaminaci hlenem z reprodukčního traktu klisny, nemusí být reprezentativní pro celou dávku. Komplexnější analýza spermatu po rozmrazení by měla být provedena s objektivním hodnocením celkové a progresivní pohyblivosti, testem neporušenosti membrán, morfologickým hodnocením, testem neporušenosti akrozomu a konformitou celkového počtu spermií na pejetu. Přitom je třeba vzít v úvahu, že nejspolehlivějším testem fertility je přípouštěcí zkouška (Love 2018).

Nejsou stanoveny žádné standardizované parametry pro dávky zmrazeného spermatu hřebců. V minulosti byly obecné průmyslové směrnice formulovány s doporučením minimálně 250 milionů progresivně pohyblivých morfologicky normálních spermií v jedné dávce (Metcalf 2007). Minimální požadavky pro komerční použití inseminační dávky vyžadují obsah 30-35 % spermií s progresivní pohyblivostí a celkovým počtem přesahujícím 600 milionů (Samper 2009). Aktivita spermií po rozmrazení je u různých hřebců, a i mezi různými ejakuláty téhož hřebce značně variabilní (Brinsko 2006).

Přídavek semenné plazmy po rozmrazení prokazuje pozitivní vliv na kvalitu spermatu hřebců s nízkou mrazicí schopností, zejména v oblastech pohyblivosti, integrity plazmatické membrány a akrozomu (Šichtař et al. 2019).

3.15 Epididymiální spermie

Spermie z nadvarlat hřebců jsou označovány jako epididymální spermie (Lehmann et al. 2022). Spermie získávané z *cauda epididymis*, vykazující oplodňovací schopnost a používané pro umělou inseminaci (Olaciregui et al. 2014). Význam získávání a kryokonzervace epididymálních spermií spočívá v možnosti uchovat genetický materiál cenných zemřelých hřebců (Monteiro et al. 2011) obzvláště při neočekávaném uhynutí hřebce nebo v případech, kdy je nutná kastrace pro udržení zdravotního stavu hřebce (Lehmann et al. 2022).

Odebírání epididymiálních spermií může být realizováno prostřednictvím perkutánní aspirace spermií (PESA) u anestetizovaných a stojících hřebců nebo po chirurgickém odstranění (Cary et al. 2004, Bruemmer 2006). Celková anestezie, bez použití lokálního anestetika, je nezbytná, jinak se projeví spermicidní účinek intra-testikulárního podání lidokainu (Falomo et al. 2016).

Po chirurgickém odstranění by mělo být každé varle a přidružené nadvarle opláchnuto sterilním fyziologickým roztokem a umístěno do čisté nádoby, například do rektálního pouzdra nebo plastového sáčku. Po kastraci zůstávají spermie životaschopné, dokud nejsou ovlivněny rozkladem tkáně (Bruemmer 2006, Muradás et al. 2006). Epididymiální spermie savců mohou být uchovávány nějaký čas v nadvarlatech uhynulých zvířat, avšak kvalita spermií se zhoršuje s rozpadem těla a s postmortálním intervalem (Songsasen et al. 1998).

3.15.1 Přeprava nadvarlete

Důležitým hlediskem při dosahování co největší úspěšnosti maximálního výtěžku spermií z nadvarlete je třeba věnovat pozornost balení a přepravě nadvarlat, což může výrazně přispět k záchraně životaschopných spermií. Po chirurgickém odstranění varlat a nadvarlat jsou umístěna do pasivního chladicího zařízení, vyhrazeného pro přepravu chlazeného spermatu. Následně jsou expedována buď do reprodukčního referenčního centra, které specializuje na odběr a zmrazení epididymálního spermatu, nebo jsou podrobena zpracování odborným lékařem v adekvátním zařízení (Bruemmer 2006).

Je nezbytné provést určení, jak dlouho mohou být spermie skladovány v nadvarletí před kryokonzervací a za jakých teplotních podmínek, než svou schopnost oplodnit oocyt ztratí (Vieira et al. 2013).

Hřebčí epididymální spermie umístěné v nadvarletí jsou schopny přežít při přepravě až 96 hodin při teplotě 4 °C, aniž by došlo ke ztrátě zachování jejich schopnosti oplodnění (Vieira et al. 2021). Ovlivnění úspěšného uchování epididymálních spermií je determinováno kombinací teploty skladování, rychlosti chlazení, hygienické kontroly a chemického složení ředidla (Barbas & Mascarenhas 2009).

3.15.2 Způsoby odběru epididymiálních spermií

Odebírání epididymiálních spermií z nadvarlat, jejich kvalitní uchování a schopnost oplodnění jsou výrazně podmíněny rychlostí a teplotou odběru varlat od okamžiku úhynu zvířete nebo chirurgické kastrace (Lehmann et al. 2022).

Po příjezdu do příslušného laboratorního zařízení by mělo být každé nadvarle separováno od varlete. Poté je izolován ocas nadvarlete a chámovod a následně lze spermie odebrat (Bruemmer 2006). Získávání epididymiálních spermií je u hřebců nejčastěji realizováno buď retrográdním výplachem nebo metodou float-up (Roels et al. 2014). Metoda retrográdního výplachu je obecně spojována s vyšší výtěžností spermií ve srovnání s metodou float-up (Roels et al. 2014). Preferovanou metodou pro odběr epididymiálních spermií u koní je retrográdní výplach ocasu nadvarlete, a to s ohledem na předpokládanou vyšší výtěžnost a nižší kontaminaci krve než při použití metody float-up (Podico & Canisso 2022).

Dodatečně nebyly registrovány žádné významné odchylky při porovnání spermií pocházejících z levého nebo pravého nadvarlete (Contri et al. 2012).

Retrográdní výplach

Pro získání spermií z nadvarlat hřebců je využívána metoda retrográdního výplachu (viz. Obrázek 4), při níž je nadvarle proplachováno roztokem, aby byly extrahovány spermatické buňky (Podico & Canisso 2022).

Technika retrográdního výplachu je prováděna s využitím komerčního ředidla nebo čírého modifikovaného Tyrodeova média. Tubuly chámovodu a ocas nadvarlete jsou odděleny od fascie, obvykle se pracuje distálně od chámovodu směrem k nadvarleti. Poté je na injekční stříkačku obsahující výplachové médium připojena buď tupá jehla o průměru 16 mm, nebo ohněm leštěná skleněná pipeta (fire-polished glass pipette). Jehla nebo pipeta jsou zavedeny do lumenu předem podvázaného chámovodu, zatímco ocas nadvarlete je umístěn v kádince. Nejdistanější konec kaudálního nadvarlete (ideálně místo předchozího spojení s tělem) je naříznuto pro možnost odebrání spermií. Propláchnutí může vyžadovat určitý tlak, je nutné dbát na to, aby tkáň nesjela z konce jehly nebo pipety. Počet spermií získaných na jednom páru nadvarlat se pohybuje mezi 15 až 25 miliardami (Bruemmer 2006).

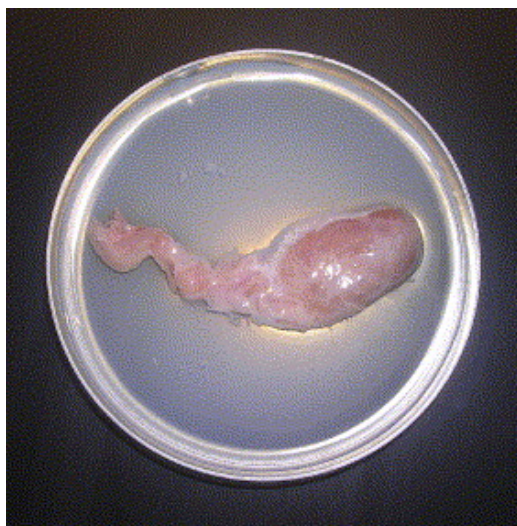


Obrázek 4: Metoda retrográdního výplachu (Bruemmer 2006).

Float-up metoda

Metoda float-up je považována za alternativu při získávání epididymálních spermií (viz. Obrázek 5). Tato metoda je uplatňována při diagnostice poškození části úseku chámovodu v důsledku kastrace, odběru nebo při zjišťování přítomnosti srůstů či nádorů v této oblasti. Metoda float-up je rovněž využívána po provedení retrográdního výplachu, a to v situacích, kdy je zaznamenána nízká výtěžnost spermatických buněk nebo kdy není možné provést retrográdní výplach (Podico & Canisso 2022). Při metodě float-up je *cauda epididymidis* (ocas nadvarlete) a proximální část *ductus deferens* (blízká část chámovodu) naříznuta na 12 až 15 místech. Poté je nadvarle suspendováno v ředidle po dobu 10 minut, a spermie tak mohou volně vplout do ředidla (Bruemmer 2006). Při metodě float-up se běžně odebírá 4 až 5 miliard spermatických buněk z jednoho páru nadvarlat (Cary et al. 2004).

V porovnání s retrográdním výplachem je metodě float-up připisována delší doba trvání a způsobuje vysokou kontaminaci krve (Podico & Canisso 2022).



Obrázek 5: Metoda Float-up (Bruemmer 2006).

Ve studii Martinez-Pastor et al. (2006) bylo provedeno srovnání technik retrográdního výplachu a float-up metody pro extrakci spermií z nadvarlete, přičemž bylo zaznamenáno dosažení vyššího počtu spermií při retrográdním výplachu. Kromě toho ve vzorku, získaném touto technikou, nebyly zjištěny žádné jiné buněčné typy, což představuje důležitý prvek této metody.

Studie Talluri et al. (2023) zkoumala dva různé postupy získání spermií z nadvarlat hřebců a jejich zmrazitelnost s použitím různých kryoprotektantů. Šest nadvarlat od tří hřebců bylo odebráno po rutinní kastraci. V experimentu bylo nadvarle téhož hřebce zpracováno jinou metodou pro získání spermií a kryokonzervována s 5% glycerolem nebo 5% DMF. Retrográdní metoda proplachování nadvarlat prokázala vyšší koncentraci spermií ve srovnání s metodou floatingu. Kvalitativní parametry spermatu byly lépe obnoveny při použití 5% DMF než 5% glycerolu. Celkově lze konstatovat, že retrográdní metoda zvýšila koncentraci spermií, a 5% DMF jako kryoprotektant zajistil přijatelnou zmrazitelnost spermií z nadvarlat hřebců.

3.15.3 Ředění epididymálních spermií

Spermie, jež se vyvíjejí ve varleti, jsou ponechány v klidovém stavu v epididymální tekutině, dokud nejsou uvolněny při ejakulaci. Zředění epididymální tekutiny, která obklopuje spermie, a to buď semennou plazmou nebo ředidlem, umožňuje spuštění pohyblivosti a metabolismu spermií (Turner & Reich 1985).

Po odběru následuje stanovení koncentrace získaných spermií pomocí hemacytometru při použití kryokonzervačního média nebo měření spektrofotometricky po odběru do čirého média typu Tyrodova. Epididymální spermie jsou následně zředěny na koncentraci 200×10^6 spermatických buněk/ml nebo 400×10^6 spermatických buněk/ml (Marks et al. 1994) v kryokonzervačním ředidle a zmrazí se pomocí standardních metod.

Typ použitého ředidla je závislý na historii daného hřebce. Nejvhodnější typ mrazicího ředidla pro uchování kryokonzervovaných epididymálních spermií je stejný jako pro ejakulované sperme daného hřebce (Bruemmer et al. 2002). Avšak v případě, že sperma daného hřebce nebylo předtím zmrazeno, je vhodné rozdělit vzorek na polovinu, přičemž každá polovina bude zmrazena v jednom z nejběžnějších a komerčně dostupných ředidel EZ-Freezin MFR5 nebo EZ-Freezin LE (Bruemmer 2006). Další vhodným ředidlem, v případě, kdy nejsou k dispozici žádné údaje o zmrazitelnosti spermatu konkrétního hřebce, může být ředidlo BotuCrio, protože epididymální sperma zmrazené v tomto ředidle vykazuje vyšší celkovou a progresivní pohyblivost po rozmrazení než epididymální sperma zmrazené v ředidlech INRA-82 nebo EDTA-Lactose (Melo et al. 2008).

Vzorek může být obohacen také semennou plazmou, přičemž obvyklé množství se pohybuje od 0,5 ml na 1,6 miliardy spermií (Bruemmer 2002) až do 5 % celkového objemu (Stout et al. 2000, Cary et al. 2004).

Od jednoho hřebce se obvykle získává 5 až 25 ID, které obsahují 800×10^6 spermií na dávku (Bruemmer 2006).

Vědecká studie Falomo et al. (2016) měla za cíl zhodnotit účinnost kryokonzervace epididymálních spermií z hřebců, kteří podstoupili orchiektomii, buď bezprostředně po zákroku nebo po 24hodinovém skladování varlat při 4 °C. Dvě různá ředidla, Palmer a EGG TECH, byla zkoumána pro jejich vliv na parametry motility spermií před a po kryokonzervaci. Šest hřebců bylo zařazeno do studie a podstoupilo kastraci v celkové anestezii. Parametry motility ukázaly lepší výsledky u čerstvého spermatu ve srovnání se zmrazeným spermatem. Ředidlo EGG TECH vykazovalo tendenci zlepšovat procento progresivně pohyblivých spermií ve zmrazeném a rozmrazeném stavu epididymálních spermií ve srovnání s modifikovaným Palmerem. Závěrem studie bylo, že zpracování epididymálních spermií je možné až 24 hodin po kastraci, a obě používaná ředidla jsou vhodná pro uchování epididymálních spermií.

Ve vědeckém experimentu Miró et al. (2020) byla zkoumána schopnost dvou komerčních ředidel, Kenney a Gent, udržet spermie nadvarlete hřebce při teplotě 4 °C po dobu až 96 hodin. Pro tento účel byly odebrány vzorky epididymálního spermatu od 10 hřebců, rozděleny do dvou skupin (nařaděné v Kenney nebo Gent ředidlu) a následně skladovány při 4 °C po dobu 96 hodin. Mezi ředidly Kenney a Gent nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly, a to ani v oblasti životaschopnosti, ani v celkové a progresivní pohyblivosti po celou dobu skladování. Skutečně byla motilita a životaschopnost spermií úspěšně udržována ve vzorcích skladovaných při 4 °C, s hodnotami pohybujícími se v rozmezí od 70 % do 80 %.

3.15.4 Kryokonzervace epididymálních spermií

Pro kryokonzervaci hřebčích epididymálních spermií jsou využívány standardní zmrazovací techniky, přičemž schopnost epididymálních spermií odolat kryodestrukci odpovídá odpovídající schopnosti ejakulovaných spermií. Nicméně, při rozhodování o vhodné metodě a podmínkách skladování u každého hřebce je nezbytné brát v úvahu individuální rozdíly ve zmrazitelnosti (Gloria et al. 2016).

Výsledky studie Weiss et al. (2008) ukázaly, že po rozmrazení nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi celkovou a progresivní pohyblivostí epididymálního spermatu ve srovnání s ejakulovaným spermatem. Po rozmrazení epididymálních spermií se nepozorují žádné rozdíly mezi celkovou a progresivní pohyblivostí epididymálního spermatu oproti čerstvému epididymálnímu spermatu (Gloria et al. 2016).

Studie Olivieri et al. (2023) ukazuje, že semenná plazma může zvyšovat pohyblivost zmrazených a rozmrazených epididymálních spermií koní. Cílem bylo posoudit účinek inkubace spermií s různými koncentracemi SP. Zkoumáno bylo 40 hřebců plemene Silla Argentino. Sperma bylo kryokonzervováno a následně rozmrazeno. Inkubace s rostoucí koncentrací SP snížila pohyblivost spermií, ale zlepšila některé parametry. Nebyl zjištěn významný vliv na morfologii ani funkci membrán spermií. Výsledky naznačují, že suplementace SP po rozmrazení nemá jednoznačně pozitivní účinky.

4 Závěr

Cílem výroby inseminačních dávek je zajistit distribuci spermatu kvalitních plemenů po celém světě. Celý proces zpracování ejakulátu, od počátečního hodnocení kvality, přes ředění, plnění do pejet, chlazení, mrazení až po rozmrazování, významně ovlivňuje výslednou viabilitu a motilitu spermií v inseminační dávce, a tím i míru úspěšného zabřezávání klisen.

Reprodukce koní představuje dynamickou a neustále se rozvíjející oblast výzkumu, kde dochází k neustálému pokroku ve vývoji metod zpracování hřebčího ejakulátu. Cílem je nejen zvýšení efektivity chovu, ale také integrace moderních technologií.

5 Literatura

- Agca Y, Critser JK. 2006. Assisted Reproductive Technologies and Genetic Modifications in Rats. *The Laboratory Rat*:165-189. Elsevier.
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* **57**:1801-1808.
- Aitken RJ. 2013. Human spermatozoa: revelations on the road to conception. *F1000Prime Reports* **5**.
- Akçay E, Reilas T, Andersson M, Katila T. 2006. Effect of Seminal Plasma Fractions on Stallion Sperm Survival after Cooled Storage. *Journal of Veterinary Medicine Series A* **53**:481-485.
- Al-Essawe EM, Wallgren M, Wulf M, Aurich C, Macías-García B, Sjunnesson Y, Morrell JM. 2018. Seminal plasma added before cryopreservation affects stallion sperm binding to bovine oocytes. *Cryobiology* **85**.
- Allahbadia GN. 2017. Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* **67**:385-392.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science* **89**:105-113.
- Alvarenga MA, Papa FO, Ramires Neto C. 2016. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **32**:521-530.
- Álvarez C, Gil L, González N, Olaciregui M. 2014. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Cryobiology* **69**:105-113.
- Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DN. 1993. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reproduction, Fertility and Development* **5**:361-382.
- Amann RP, Katz DF. 2004. Andrology Lab Corner*: Reflections on CASA After 25 Years. *Journal of Andrology* **25**:317-325.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **7**:145-173.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* **61**:895-907.
- Arns, M J, et al. 1987. Use of different nonglycolysable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37 degrees C and 5 degrees C in a bovine serum albumin medium. *Journal of reproduction and fertility*. **35**:135-141.
- Arruda RP, Andrade AFC, Raphael CF, Peres KR, Nascimento J, Martins SMMK, Bianconi LL. 2008. Effects of addition of seminal plasma on lifespan of frozen-thawed equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **107**:307-308.

- Aurich C, Schneider J. 2014. Sex determination in horses—Current status and future perspectives. *Animal Reproduction Science* **146**:34-41.
- Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **89**:65-75.
- Aurich C. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* **107**:268-275.
- Aurich C. 2011. Semen extenders for cooled semen (Europe):1336-1340.
- Aurich JE. 2012. Artificial Insemination in Horses—More than a Century of Practice and Research. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**:458-463.
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, Squires EL. 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen¹. *Journal of Animal Science* **82**:690-694.
- Ball BA, Vo A. 2001. Osmotic Tolerance of Equine Spermatozoa and the Effects of Soluble Cryoprotectants on Equine Sperm Motility, Viability, and Mitochondrial Membrane Potential. *Journal of Andrology* **22**:1061-1069.
- Ball BA. 2016. *Animal andrology: theories and applications*. PJ Chenoweth and SP Lorton. CABI, UK, 2014. 584 pages. A\$216. ISBN 9781780643168. *Australian Veterinary Journal* **94**:254-296.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* **10**:49-62.
- Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E. 1997. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* **48**:391-410.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* **68**:181-190.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme. 2008. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* **70**:1478-1488.
- Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* **78**:1682-1699.
- Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. 2007. Milk Caseins Decrease the Binding of the Major Bovine Seminal Plasma Proteins to Sperm and Prevent Lipid Loss from the Sperm Membrane During Sperm Storage¹. *Biology of Reproduction* **77**:120-126.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development* **73**:1338-1344.
- Blanchard TL, Kenney RM, Timoney PJ. 1992. Venereal Disease. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **8**:191-203.

- Blom E. 1977. Sperm Morphology with Reference to Bull infertility First All-India Symposium on Animal Reproduction. Ludhiana:61-81.
- Blommaert D, Franck T, Donnay I, Lejeune J-P, Detilleux J, Serteyn D. 2016. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Cryobiology* **72**:27-32.
- Brinsko SP. 2006. Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology* **66**:543-550.
- Brito LFC, Greene LM, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. 2011. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology* **76**:745-750.
- Brito LFC. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* **6**:249-264.
- Bromfield JJ. 2018. Review: The potential of seminal fluid mediated paternal–maternal communication to optimise pregnancy success. *Animal* **12**:s104-s109.
- Bruemmer JE. 2006. Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **22**:677-682.
- Bruemmer, J. E, Reger, H., Zibinski, Squires. 2002. Effect of storage at 5° C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. 405-407 in .
- Bubenickova F, Postlerova P, Simonik O, Sirohi J, Sichtar J. 2020. Effect of Seminal Plasma Protein Fractions on Stallion Sperm Cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Bucci D, Isani G, Spinaci M, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Galeati G. 2010. Comparative Immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in Boar, Stallion and Dog Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:315-322.
- Buchanan BR. 2000. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology* **53**:1333-1344.
- Bustani GS, Baiee FH. 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*:1220-1233.
- Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, Töpfer-Petersen E. 1994. Isolation and Biochemical Characterization of Stallion Seminal-plasma Proteins. *Reproduction in Domestic Animals* **29**:411-426.
- Card C. 2005. Cellular associations and the differential spermogram: Making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* **64**:558-567.
- Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Fahning ML. 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J*:45:35–41.
- Clulow J, Gibb Z. 2022. Liquid storage of stallion spermatozoa – Past, present and future. *Animal Reproduction Science* **247**.
- Cole JA, Meyers SA. 2011. Osmotic Stress Stimulates Phosphorylation and Cellular Expression of Heat Shock Proteins in Rhesus Macaque Sperm. *Journal of Andrology* **32**:402-410.

- Consuegra C, Crespo F, Bottrel M, Ortiz I, Dorado J, Diaz-Jimenez M, Pereira B, Hidalgo M. 2018. Stallion sperm freezing with sucrose extenders: A strategy to avoid permeable cryoprotectants. *Animal Reproduction Science* **191**:85-91
- Contri A, Gloria A, Robbe D, De Amicis I, Carluccio A. 2012. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology* **77**:166-173.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* **74**:424-435.
- Crockett EC, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL. 2001. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: Preliminary results. *Theriogenology* **55**:793-803.
- Davidson AF, Benson JD, Higgins AZ. 2014. Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. *Theoretical Biology and Medical Modelling* **11**:13.
- Dias TR, Cho C-L, Agarwal A. 2019. Sperm Assessment: Traditional Approaches and Their Indicative Value. *In Vitro Fertilization* **2019**:249-263. Springer International Publishing, Cham.
- Ecot, et al. 2005. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. *Anim Reprod Sci* **89**:245.
- Edmond AJ, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Teague SR, Varner DD. 2012. Effect of centrifugal fractionation protocols on quality and recovery rate of equine sperm. *Theriogenology* **77**:959-966.
- Egeberg DL, Kjaerulff S, Hansen C, Petersen JH, Glensbjerg M, Skakkebaek NE, Jørgensen N, Almstrup K. 2013. Image cytometer method for automated assessment of human spermatozoa concentration. *Andrology* **1**:615-623.
- Egyptien S, Deleuze S, Ledeck J, Ponthier J. 2023. Sperm Quality Assessment in Stallions: How to Choose Relevant Assays to Answer Clinical Questions. *Animals* **13**:14.
- Ekhlesi-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E. 2005. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**:45-57.
- Falomo ME, Rossi M, Mantovani R. 2016. Collection, storage and freezability of equine epididymal spermatozoa. *Italian Journal of Animal Science* **15**:386-389.
- Fernández-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. 2006. Influence of Various Permeating Cryoprotectants on Freezability of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Spermatozoa: Effects of Concentration and Temperature of Addition. *Journal of Andrology* **27**:734-745.
- Fiala-Rechsteiner S, Bueno VLC, Barros E, López CJR, Vidigal PMP, Ramos HJO, Bastos HBA, Mattos RC. 2023. Proteomic profile of stallion seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science* **125**:125.

- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux J-L. 2000. Stallion Epididymal Fluid Proteome: Qualitative and Quantitative Characterization; Secretion and Dynamic Changes of Major Proteins. *Biology of Reproduction* **62**:1790-1803.
- Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68**:249-265.
- Gahne S, Gõnheim A, Malmgren L. 1998. Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* **49**:1071-1074.
- García BM, Moran AM, Fernández LG, Ferrusola CO, Rodriguez AM, Bolaños JMG. 2012.. *Journal of Andrology* **33**.
- Garner DL, Evans KM, Seidel GE. 2013. Sex-Sorting Sperm Using Flow Cytometry/Cell Sorting. 279-295 in *Spermatogenesis*, 1st edition.. Humana Press, Totowa, NJ.
- Gibb Z, Aitken RJ. 2016. Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science* **43**:S29-S36.
- Gloria A, Carluccio A, Petrizzi L, Noto F, Contri A. 2016. Characteristics of frozen epididymal spermatozoa from stallions that died 12 to 36 hours after colic surgery. *Theriogenology* **85**:345-350.
- Gloria A, Carluccio A, Wegher L, Robbe D, Befacchia G, Contri A. 2016. Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **7**:30.
- Gonzalez-Castro RA, Trentin JM, Carnevale EM, Graham JK. 2019. Effects of extender, cryoprotectants and thawing protocol on motility of frozen-thawed stallion sperm that were refrozen for intracytoplasmic sperm injection doses. *Theriogenology* **136**:36-42.
- Graham J, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, McKinnon AO. 2011. Principles of cooled semen. 1330-1336 in *Equine Reproduction*, 2nd edition. Wiley-Blackwell.
- Griffin RA, Swegen A, Baker MA, Ogle RA, Smith N, Aitken RJ, Skerrett-Byrne DA, Fair S, Gibb Z. 2022. Proteomic analysis of spermatozoa reveals caseins play a pivotal role in preventing short-term periods of subfertility in stallions. *Biology of Reproduction* **106**:741-755.
- Guasti PN, Souza FF, Scott C, Papa PM, Camargo LS, Schmith RA, Monteiro GA, Hartwig FP. 2020. Equine seminal plasma and sperm membrane: functional proteomic assessment. *Theriogenology* **156**:70-81.
- Hammerstedt RH, Roy H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: A review of the effect on design of storage preservation systems. *Reproduction, fertility and development* **5**:675-690.
- Hayden SS, Blanchard TL, Brinsko SP, Varner DD, Hinrichs K, Love CC. 2015. The “dilution effect” in stallion sperm. *Theriogenology* **83**:772-777.

- Heiskanen M-L, Hilden L, Hyypä S, Kangasniemi A, Pirhonen A, Mäenpää PH. 1994. Freezability and Fertility Results with Uncentrifuged Stallion Semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* **35**:377-382.
- Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. 1996. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* **28**:47-53.
- Hendriksen PJ, Welch GR, Grootegoed JA, Van der Lende T, Johnson LA. 1996. Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X – and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. *Mol Reprod Dev.* **45**:342-350.
- Henkel RR, Schill W-B. 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**:108.
- Hernández-Avilés C, Love CC, Serafini R, Ramírez-Agámez L, Friedrich M, Ghosh S, Teague SR, LaCaze KA, Brinsko SP, Varner DD. 2020. Document details - Effects of glucose concentration in semen extender and storage temperature on stallion sperm quality following long-term cooled storage. *Theriogenology* **147**:1-9.
- Hernández-Avilés C, Love CC, Serafini R, Teague SR, Varner. 2019. Supplemental Antibiotics in a Commercial Extender for Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **80**:33-35.
- Hernández-Avilés C, Ramírez-Agámez L, Varner DD, Love CC. 2023. Effects of egg yolk level, penetrating cryoprotectant, and pre-freeze cooling rate, on the post-thaw quality of stallion sperm. *Animal Reproduction Science* **248**.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **62**:3-22.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* **37**:1241-1252.
- Jasko DJ, Martin JM, Squires EL. 1992. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology* **37**:1233-1239.
- Johnson L, Amann RP, Pickett BW. 1980. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* **41**:1190-1196.
- Kareskoski et al. 2005. Proteins in fractionated stallion seminal plasma. *Reproduction in Domestic Animals* **2006**:354.
- Kareskoski M, Katila T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science* **107**:249-256.
- Kareskoski M, Venhoranta H, Virtala A-M, Katila T. 2019. Analysis of factors affecting the pregnancy rate of mares after inseminations with cooled transported stallion semen. *Theriogenology* **127**:7-14.

- Katila T, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, McKinnon AO. 2011. Containers for equine transported semen. 1330-1336 in *Equine Reproduction*, 2nd edition. Wiley-Blackwell.
- Katila T. 1997. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* **48**:1217-1227.
- Kawai GKV et al. 2017. Susceptibility of Stallion Spermatozoa to Different Oxidative Challenges: Role of Seminal Plasma. *Journal of Equine Veterinary Science* **55**:76-83.
- Kaya A, Birler S, Enwall L, Memili E. 2014. Determinants of sperm morphology. *Animal andrology: theories and applications*:34-56. CABI, UK.
- Kelley DE. 2024. Processing stallion semen for on-farm use and cooled transport. *Equine Veterinary Education* **36**:51-56.
- Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. 2007. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem* **15**:1749-1770.
- Khelifaoui M, Battut I, Bruyas JF, Chatagnon G, Trimeche A, Tainturier D. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology* **63**:138-149.
- Knobbe M, Levine D, Habecker P, Getman L, Beech J, Turner R. 2012. Prostatic Masses in Geldings: Two Cases. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**:628-633.
- Koskinen E, Junnila M, Katila T, Soini H. 1989. A Preliminary Study on the Use of Betaine as a Cryoprotective Agent in Deep Freezing of Stallion Semen. *Journal of Veterinary Medicine Series A* **36**:110-114.
- Kowalczyk A, Czerniawska-Piątkowska E, Kuczaj M. 2019. Factors Influencing the Popularity of Artificial Insemination of Mares in Europe. *Animals* **9**:460.
- Krausz C, Farnetani G. 2023. *Clinical Interpretation of Semen Analysis*. Practical Clinical Andrology:173-184. Springer International Publishing, Cham.
- Leeb T, Sieme H, Töpfer-Petersen E. 2005. Genetic markers for stallion fertility—lessons from humans and mice. *Animal Reproduction Science* **89**:21-29.
- LeFrappier L, Walston L, Whisnant CS. 2010. Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. *Journal of Equine Veterinary Science* **30**:200-204.
- Lehmann AE, Anskiene L, Sabeckiene J, Sutkeviciene N. 2022. Efficiency of Ringer B. Braun solution on stallion epididymal sperm motility and viability compared to the commercial extender within 72 hours of storage. *Acta Veterinaria Brno* **91**:355-361.
- Leibo, Trummer, Meacham. 1999. Sperm freezing--species specific. *Fertility and sterility* **72**:747-748.
- Little TV, Holyoak GR. 1992. Reproductive Anatomy and Physiology of the Stallion. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **8**:1-29.

- Loomis P. 2011. Basic Principles and Techniques for Semen Freezing. XVII SIVE International Congress: 1-5
- Loomis PR. 2006. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* **22**:663-676.
- Loomis, P R. 1993. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners. USA.
- López ML, De Souza W. 1991. Distribution of filipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. *Molecular Reproduction and Development* **28**:158-168.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* **63**:1584-1591.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology* **57**:1135-1142.
- Love CC. 2012. Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**:464-466.
- Love CC. 2018. Sperm quality assays: How good are they? The horse perspective. *Animal Reproduction Science* **194**:63-70.
- Lyle SK, Ferrer MS. 2005. Low-dose insemination—Why, when and how. *Theriogenology* **64**:572-579.
- Macías García B et al. 2012. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology* **77**:1280-1289.
- Macías García B, González Fernández L, Ortega Ferrusola C, Morillo Rodríguez A, Gallardo Bolaños JM, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. 2011. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* **75**:811-818.
- Magdanz V, Boryshpolets S, Ridzewski C, Eckel B, Reinhardt K, Kues WA. 2019. The motility-based swim-up technique separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length. *PLOS ONE* **14**:1.
- Mandal R, Badyakar D, Chakrabarty J. 2014. Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. *Advances in Andrology* **2014**:1-9.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. 2002. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk1. *Biology of Reproduction* **67**:1250-1258.
- Mann T, Lutwak-Mann C. 1981. Male Reproductive Function and Semen. 1981 in *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin.

- Marks, L. S, Dupuis, Mickelsen. 1994. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **204**:1639-1640.
- Martin JC, Klug E, Günzel AR. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement* **27**:47-51.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraiez P, Paz P de, Anel L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* **65**:471-485.
- Mazur P. 1963. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of General Physiology* **47**:347-369.
- Mazur P. 2004. Principles of cryobiology. 29-92 in *Life in the frozen state*, 1st edition. CRC Press.
- McCue PM. 2014. Evaluation of pH and Osmolarity of Semen. John Wiley & Sons, Inc.:399-400.
- McCue PM. 2021. Evaluation of pH and Osmolarity of Semen. John Wiley & Sons, Inc.:521-522.
- McGann LE. 1978. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology* **15**:382-390.
- McKinnon, Angus O, Squires. 2011. *Equine reproduction*, 2nd edition. John Wiley.
- Melo CM, Papa FO, Fioratti EG, Villaverde AISB, Avanzi BR, Monteiro G, Dell'Aqua JA, Pasquini DF, Alvarenga MA. 2008. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science* **107**:331.
- Melo, C. M, et. al. 2005. Effects of cooling stallion semen for 24 h before freezing on fertility rates. *Animal reproduction science* **89**:250-252.
- Merkies K, Chenier T, Plante C, Buhr MM. 2000. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology* **54**:1215-1224.
- Meryman HT. 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* **47**:935-945.
- Metcalf ES. 2007. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* **68**:423-428.
- Miller CD. 2008. Optimizing the use of frozen–thawed equine semen. *Theriogenology* **70**:463-468.
- Miró J, Morató R, Vilagran I, Taberner E, Bonet S, Yeste M. 2020. Preservation of Epididymal Stallion Sperm in Liquid and Frozen States: Effects of Seminal Plasma on Sperm Function and Fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* **88**.
- Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua JA, Melo CM, Maziero RRD, Avanzi BR, Alvarenga MA, Guasti PN. 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science* **127**:197-201.

- Moore AI, Squires EL, Bruemmer JE, Graham JK. 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **26**:215-218.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* **63**:2372-2381.
- Moraes EA, Matos WCG, Graham JK, Ferrari WD. 2015. Cholesterol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* **158**:19-24.
- Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. 1992. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* **38**:999-1012.
- Morel, D M, C G. 1999. *Equine Artificial Insemination*. Wallingford.
- Morel, M.C.G.D. 2008. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. CAB International. Cambridge. 378 p. ISBN: 978-1-84593-450-7.
- Morelli MAC, Ostuni A, Giangaspero B, Cecchini S, Carluccio A, Boni R. 2021. Relationships between Seminal Plasma Metabolites, Semen Characteristics and Sperm Kinetics in Donkey (*Equus asinus*). *Animals* **11**.
- Morrell JM, Johannisson A, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez. 2009. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology* **72**:879-884.
- Morrell JM, Kumaresan A, Johannisson A. 2017. Practical implications of sperm selection techniques for improving reproduction. *Animal Reproduction* **14**:572-580.
- Morrell JM, Nunes MM. 2018. Practical guide to single layer centrifugation of stallion semen. *Equine Veterinary Education* **30**:392-398.
- Morris LHA. 2004. Low dose insemination in the mare: an update. *Animal Reproduction Science* **82-83**:625-632.
- Morse-Wolfe B, Bleach E, Kershaw C. 2023. An Investigation of Equine Sperm Quality Following Cryopreservation at Low Sperm Concentration and Repeated Freeze-Thawing. *Journal of Equine Veterinary Science* **120**.
- Müller Y. 2019. Effects of substituting sodium chloride and omitting antibiotics in stallion semen diluents for prolonged storage at elevated temperatures. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Muradás et al. 2006. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Arch Vet Sci* **11**:69-74.
- Neuhauser S, Bollwein H, Siuda M, Handler J. 2019. Comparison of the Effects of Five Semen Extenders on the Quality of Frozen-Thawed Equine Epididymal Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* **79**:1-8.

- Novello G, Podico G, Segabinazzi LGTM, Lima FS, Canisso IF. 2020. Stallion Semen Cooling Using Native Phosphocaseinate-based Extender and Sodium Caseinate Cholesterol-loaded Cyclodextrin-based Extender. *Journal of Equine Veterinary Science* **92**.
- Olaciregui M, Gil L, Montón A, Luño V, Jerez RA, Martí JI. 2014. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* **68**:91-95.
- Oldenhof H, Bigalk J, Hettel C, de Oliveira Barros L, Sydykov B, Bajcsy AC, Sieme H, Wolkers WF. 2017. Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. *Biopreservation and Biobanking* **15**:422-431.
- Oldenhof H, Gojowsky M, Wang S, Henke S, Yu C, Rohn K, Wolkers WF, Sieme H. 2013. Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm. *Biology of Reproduction* **88**:68.
- Oliveira SN, Andrade LRP, Silva LFMC, Araujo EAB, Rayashi RM, Segabinazzi LGTM, Alvarenga MA, Dell'Aqua CPF, Dell'Aqua JA, Papa FO. 2020. Fractionated semen collection as a tool to rescue fertility in stallions with seminal vesiculitis. *Theriogenology* **157**:110-120.
- Olivieri GEA, Neild DM, Plaza JP, Bianchi CP, Bruno SL, Miragaya MH. 2023. Effect of post-thaw addition of seminal plasma to cryopreserved epididymal equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **125**.
- Orsolini MF, Meyers SA, Dini P. 2021. An Update on Semen Physiology, Technologies, and Selection Techniques for the Advancement of In Vitro Equine Embryo Production: Section I. *Animals* **11**.
- Pace MM, Graham EF. 1974. Components in Egg Yolk which Protect Bovine Spermatozoa during Freezing. *Journal of Animal Science* **39**:1144-1149.
- Pagl R, Aurich JE, 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**:1115-1122.
- PAN C-ying, YU S, ZHANG P-fei, WANG B, ZHU Z-dong, LIU Y-ying, ZENG W-xian. 2017. Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of Integrative Agriculture* **16**:1120-1129.
- Pariz JR, Monteiro RAC, Hallak J. 2020. Long-term sperm cryopreservation does not affect post-thaw survival rates. *JBRA Assisted Reproduction* **24**:3-8.
- Parkinson TJ, Morell JM. 2011. Artificial insemination: current and future trends. *Artificial insemination in farm animals* **1**:1-14.
- Parkinson TJ, Morrell JM. 2019. Artificial Insemination. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*:746-777. Elsevier.
- Pasch L. 2024. Stallion semen cryopreservation: Frozen semen preparation, handling and breeding. *Equine Veterinary Education*.

- Peña FJ, Macías García B, Samper JC, Aparicio IM, Tapia JA, Ortega Ferrusola C. 2011. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* **76**:1177-1186.
- Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* **37**:597-612.
- Pesch S, Bostedt H, Failing K, Bergmann M. 2006. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Animal Reproduction Science* **91**:285-298.
- Pickett BW, Faulkner LC, Seidel GE, Berndtson WE, Voss JL. 1976. Reproductive Physiology of the Stallion. IV. Seminal and Behavioral Characteristics. *Journal of Animal Science* **43**:617-625.
- Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE. 1975. Effect of Centrifugation and Seminal Plasma on Motility and Fertility of Stallion and Bull Spermatozoa. *Fertility and Sterility* **26**:167-174.
- Pickett BW. 2021. Extenders. *Animal reproduction systems:1*. Colorado State University.
- Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* **77**:268-279.
- Plante G, Lusignan M-F, Lafleur M, Manjunath P. 2015. Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reproductive Biology and Endocrinology* **13**:92.
- Podico G, Canisso IF. 2022. Retrograde Flushing Followed by Slicing Float-Up as an Approach to Optimize Epididymal Sperm Recovery for the Purpose of Cryopreservation in Equids. *Animals* **12**.
- Pozor M. 2022. Seminal Vesiculitis. *Comparative Veterinary Anatomy*:825-833. Elsevier.
- Price S, Aurich J, Davies-Morel M, Aurich C. 2008. Effects of Oxygen Exposure and Gentamicin on Stallion Semen Stored at 5 and 15°C. *Reproduction in Domestic Animals* **43**:261-266.
- Prien S, Iacovides S. 2016. Cryoprotectants & cryopreservation of equine semen: A review of industry cryoprotectants and the effects of cryopreservation on equine semen membranes.. *Dairy Vet. Anim Res* **3**:1-3.
- Pruitt, J. A, Arns MJ, Pool KC. 1993. Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following invitro culture (37°C) and cold-storage (5°C). *Theriogenology* **39**:291.
- Ramires Neto C, Sancler da Silva YFR, Resende HL, Guasti PN, Monteiro GA, Papa PM, Dell'aqua Júnior JA, Puoli Filho JNP, Alvarenga MA, Papa FO. 2015. Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **35**:277-282.

- Rasul Z, Anzar M, Jalali S, Ahmad N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **59**:31-41.
- Rath D, Barcikowski S, Graaf SD, Garrels W. 2013. Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction* **145**:R15-R30.
- Rath D, Johnson LA. 2008. Application and Commercialization of Flow Cytometrically Sex-Sorted Semen. *Reproduction in Domestic Animals* **43**:338-346.
- Rečková Z, Filipčík R, Soušková K, Kopec T, Hošek M, Pešan V. 2022. The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Animal Bioscience* **35**:670-676.
- Renard P, Grizard G, Griveau J-F, Sion B, Boucher D, Le Lannou D. 1996. Improvement of Motility and Fertilization Potential of Postthaw Human Sperm Using Glutamine. *Cryobiology* **33**:311-319.
- Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH. 2006. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biology of Reproduction* **74**:359-365.
- Roach J, Schnobrich M, Ellerbrock R, Feijo L, Bradecamp E, Alvarenga MA, Kline K, Canisso I. 2016. Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen. *Veterinary Record* **178**:241.
- Roels K, Leemans B, Ververs C, Govaere J, Hoogewijs M, Van Soom A. 2014. Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* **83(6)**:321-325. Belgium.
- Röpke T, Oldenhof H, Leiding C, Sieme H, Bollwein H, Wolkers WF. 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology* **76**:1465-1472.
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* **62**:77-111.
- Samper JC, Morris L, Plough TA. 2012. The Use of Sex-Sorted Stallion Semen in Embryo Transfer Programs. *Journal of Equine Veterinary Science* **32**:387-389.
- Samper JC. 2008. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Elsevier Health Sciences **2009**:336.
- Samper JC. 2009. *Equine breeding management and artificial insemination* issue 2. Elsevier.
- Samper JC. 2011. Breeding with cooled transported semen. *Equine Reproduction*:1316-1322.
- Sangeeta S, Arangasamy A, Kulkarni S, Selvaraju S. 2015. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* **161**:82-88.
- Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. 2012. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology* **2012**:1-12.

- Segabinazzi LG, Silva LF, Okada C, Medrado F, Papa F, Alvarenga MA. 2018. Plugged Ampullae in a Donkey Stallion (*Equus asinus*). *Journal of Equine Veterinary Science* **63**:24-26.
- Sethi M, Shah N, Kumar P, Gupta V, Rohilla A, Bhatia N, Kumar N, Bhakat M, Mohanty TK. 2021. CASA (Computer Assisted Semen Analysis): As a tool for bull fertility analysis. *Indian Farmer* **8**(4): 293-299.
- Setchell BP, Brooks DE, Knobil E. 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of male reproductive tract. *Physiology of reproduction*:797-836.
- Sieme H, Martinsson G, Rauterberg. 2003. Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reproduction in Domestic Animals* **38**:134-140.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science* **169**:2-5.
- Sieme H, Oldenhof H. 2015. Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* **77**:277-287. Springer New York, New York, NY.
- Sieme H, Töpfer-Petersen E, Bader H, Petzold R, Merkt H. 2001. A.I.-sperm of the stallion: evaluation criteria and minimal standards – a survey. *Pferdeheilkunde Equine Medicine* **17**:145-154.
- Songsasen N, Tong J, Libo SP. 1998. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death (Article). *Journal of Experimental Zoology* **280**:189-196.
- Soni Y, Talluri TR, Kumar A, Ravi SK, Mehta JS, Tripathi BN. 2019. Effects of different concentration and combinations of cryoprotectants on sperm quality, functional integrity in three Indian horse breeds. *Cryobiology* **86**:52-57.
- Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE. 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science* **107**:237-248.
- Spinosa HS, Gorniak SL, Bernardi MM. 2006. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Guanabara Koogan.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* **62**:1056-1065.
- Stelletta C, Alberti S, Cil B, Tekin K, Tirpan MB, Arganaraz M, Akcay E, Daskin. 2021. Use of biochemical and protein profiles of seminal plasma to prediction of semen quality and fertility in stallions. *Polish Journal of Veterinary Sciences*:10.
- Storey BT. 2008. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:427-437.

- Stout, E. TA, Morris, A. LH, Li, X., Allen, W.R. 2000. The effect of seminal plasma on the motility and cryopreservability of horse epididymal sperm. *European Equine Gamete Group (eegg)*,:5.
- Swain JE, Smith GD. 2010. Cryoprotectants. *Fertility Cryopreservation*:24-38. Cambridge University Press.
- Swegen A, Curry BJ, Gibb Z, Lambourne SR, Smith ND, Aitken RJ. 2015. Investigation of the stallion sperm proteome by mass spectrometry. *Reproduction* **149**:235-244.
- Šichtař J, Bubeničková F, Sirohi J, Šimoník O. 2019. How to Increase Post-Thaw Semen Quality in Poor Freezing Stallions: Preliminary Results of the Promising Role of Seminal Plasma Added after Thawing. *Animals* **9**.
- Šterbenc N, Morrell JM, Kosec M, Rath D, Klein S, Klinc P. 2019. Single layer colloid centrifugation technique improves motility, viability and chromatin integrity of ram spermatozoa after thawing. *Cryobiology* **86**:77-83.
- Talluri TR, Jhamb D, Paul N, Singh J, Dedar RK, Mehta SC, Legha RA, Pal Y. 2023. Effect of Isolation Protocols and Cryoprotectants on Freezing of Stallion Epididymal Spermatozoa. *Cryoletters* **44**:134-141.
- Tandle MK. 2017. *Veterinary Andrology and Artificial Insemination in Domestic Animals*. New India Publishing Agency – Nipa.
- Tanga BM, Qamar AY, Raza S, Bang S, Fang X, Yoon K, Cho J. 2021. Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment — A review. *Animal Bioscience* **34**:1253-1270.
- Tiplady, C. A, L. H, Morris, W. R, Allen. 2002. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments:225-228.
- Tirpák F et al. 2021. Composition of Stallion Seminal Plasma and Its Impact on Oxidative Stress Markers and Spermatozoa Quality. *Life* **11**.
- Todd P, Arns, Chenoweth. 2001. Influence of seminal plasma and processing on cold-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci* **68**:335-336.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* **89**:159-170.
- Trimeche, A, Yvon JM, Vidament M, Palmer E, Magistrini M. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* **52**:181-191.
- Turner TT, Reich GW. 1985. Cauda Epididymidal Sperm Motility: A Comparison Among Five Species. *Biology of Reproduction* **32**:120-128.
- Van der Horst G. 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal Reproduction Science* **2020**:11.

- Varner DD, Blanchard TL, Brinsko SP, Love CC, Taylor TS, Johnson L. 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Animal Reproduction Science* **60-61**:493-509.
- Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. 1987. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* **28**:709-723.
- Varner DD, Blanchard TL, Meyers PJ, Meyers SA. 1989. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology* **32**:515-525.
- Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. 2015. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal* **47**:16-24.
- Varner DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* **70**:448-462.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* **57**:149-179.
- Vidament M. 2005. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science* **89**:115-136.
- Vieira LA, Gadea J, García-Vázquez FA, Avilés-López K, Matás C. 2013. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science* **136**:280-288.
- Vieira LA, Matás C, Torrecillas A, Saez F, Gadea J. 2021. Seminal plasma components from fertile stallions involved in the epididymal sperm freezability. *Andrology* **9**:728-743.
- Volpes A, Sammartano F, Rizzari S, Gullo S, Marino A, Allegra A. 2016. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **33**:765-770.
- Von Fellenberg R, Zweifel H-R, Grünig G, Pellegrini A. 1985. Proteinase Inhibitors of Horse Seminal Plasma. A High Molecular Mass, Acid-Soluble Proteinase Inhibitor. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **366**:705-712.
- Watson P, Holt WV. 2001. Cryobanking the genetic resource: Wildlife conservation for the future? CRC Press.
- Webb GW, Arns MJ. 2006. Effect of pyruvate and lactate on motility of cold stored stallion spermatozoa challenged by hydrogen peroxide. *Journal of Equine Veterinary Science* **26**:406-411.
- Weiss RR, Muradas PR, Graneman LC, Meira C. 2008. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. *Animal Reproduction Science* **107**:356.
- Wilson M, Williams J, Montrose VT, Williams J. 2019. Variance in Stallion Semen Quality among Equestrian Sporting Disciplines and Competition Levels. *Animals* **9**:9(8).
- Wu Z, Zheng X, Luo Y, Huo F, Dong H, Zhang G. 2015. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science* **163**:75-81.

- Yániz JL, Mateos JA, Santolaria P. 2011. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. *Small Ruminant Research* **95**:54-60.
- Yeste M, Estrada E, Rocha LG, Marín H, Rodríguez-Gil JE, Miró J. 2015. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology* **3**:395-407.
- Zabala SM et al. 2024. Strategies to Reduce the Use of Antibiotics in Fresh and Chilled Equine Semen. *Animals* **14**:179.