

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv vybraných obalů kryokonzervovaného ejakulátu
hřebců na motilitu spermií**

Diplomová práce

Autor práce: Anežka Nehasilová

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

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 8. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu, Ing. Jiřímu Šichtařovi, PhD., za vedení mé práce, cenné rady a podporu, kterých se mi od něj po celou dobu dostávalo. Dále pak Ing. Ondřeji Šimoníkovi za užitečné rady a konzultace a v neposlední řadě své rodině a nejbližším za podporu, pochopení a trpělivost.

Vliv vybraných obalů kryokonzervovaného ejakulátu hřebců na motilitu spermií

Souhrn

Umělá inseminace kryokonzervovaným ejakulátem je jednou z nejrozšířenějších metod reprodukce koní. Oplozovací schopnost kryokonzervovaného ejakulátu je ovlivněna mnoha faktory. Mezi ty nejzákladnější lze zařadit věk, plemeno a individualitu hřebce, techniku kryokonzervace, typ použitého obalu a objem inseminační dávky (ID). Drtivá většina kryokonzervovaného ejakulátu je uchovávána v 0,5 ml pejetách. Alternativou však mohou být i vysokoobjemové ID.

Cílem práce je ověřit hypotézu, že hřebčí ejakulát kryokonzervovaný do 0,5 ml pejet vykazuje kvalitnější vlastnosti v porovnání s kryokonzervací do 5 ml aluminiových tub.

Hřebci plemene starokladrubský kůň byli odebíráni v Equinním reprodukčním centru Pardubice – Mnětice. Odebrané semeno bylo naředěno komerčním ředidlem GENT a plněno do 0,5 ml plastových pejet a 5 ml aluminiových makrotub. Kryokonzervované ID byly uchovávány v tekutém dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dávky byly rozmrazovány ve vodní lázni o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 – 60 s. Motilita spermií byla po rozmrazení snímána v průběhu hodinové inkubace a hodnocena objektivně pomocí CASA systému. Mezi automaticky měřené parametry patřily celková a progresivní motilita a další kinematické parametry přesněji charakterizující pohyb jednotlivých spermií. Data byla statisticky vyhodnocena na hladině významnosti $P < 0,01$.

Nativní vzorky ejakulátu vykazovaly lepší hodnoty motility spermií než ejakulát po rozmrazení. Ihned po rozmrazení se celková a progresivní motilita spermií mezi jednotlivými obaly nelišila, signifikantně lepších výsledků dosahovaly kinematické parametry motility ve vzorcích ejakulátu kryokonzervovaných v 0,5 ml pejetách. S prodlužující se dobou inkubace se hodnoty všech parametrů motility spermií postupně zhoršovaly. Poklesy jednotlivých parametrů motility spermií byly zřetelné ve vzorcích kryokonzervovaných v 0,5 ml pejetách především v první polovině inkubace, v 5 ml makrotubách spíše v polovině druhé. Obecně lze říci, že hodnoty celkové a progresivní motility se však mezi jednotlivými obaly nelišily, nicméně jednotlivé kinematické parametry dosahovaly signifikantně lepších výsledků v 0,5 ml pejetách. Kolísání mezi jednotlivými parametry a hřebci bylo ihned po rozmrazení znatelné především v hodnotách celkové a progresivní motility.

Kryokonzervovaný ejakulát starokladrubských hřebců vykazoval obecně lepší hodnoty motility spermií v 0,5 ml pejetách oproti 5 ml aluminiovým makrotubám.

Klíčová slova: hřebec, inseminační dávka, kryokonzervace, motilita

Influence of chosen package of cryopreserved stallion's ejaculate on sperm motility

Summary

Artificial insemination of cryopreserved semen is one of the most widespread method of equine reproduction. The fertilising capacity of cryopreserved semen is influenced by several factors including age, breed and individuality of the stallion, freezing technique, type of packaging and volume of the insemination dose (ID). Most of the cryopreserved semen is stored in 0,5 ml straws. However, there are alternatives that use higher volumes.

The aim of this study is to verify the hypothesis, that the semen cryopreserved in 0,5 ml straws offered better quality than the semen cryopreserved in 5 ml aluminium tubes.

The semen was collected from the Old Kladruber stallions in Equine reproduction centre Pardubice – Mnětice. Collected semen was diluted with the commercial diluent GENT and filled to the 0,5 ml plastic straws and 5 ml aluminium makrotubes. Frozen ID were stored in liquid nitrogen (-196 °C). The samples were thawed in a water bath at 37 °C within 30 – 60 s. The sperm motility was observed after thawing during one hour incubation and assessed objectively with CASA. Among the automatically evaluated parameters belonged: the total and progressive motility and another kinematic parameters that define the movement of individual spermatozoa. The data was statistically analysed and differences were assumed to be significantly different if $P < 0,01$.

Native semen samples offered better values of sperm motility than semen after thawing. Immediately after thawing, the total and progressive motility did not differ between the individual packages, significantly better results of kinematic parameters of motility were reached in the samples cryopreserved in 0,5 ml straws. All of the parameters of motility progressively worsened during the incubation. The parameters of samples cryopreserved in 0,5 ml straws dropped obviously especially in the first half of incubation, while the samples stored in 5 ml macrotubes rather in the second half of incubation. In general, the values of total and progressive motility, did not differ between the individual packages, however the outcome of kinematic parameters reached significantly better results in 0,5 ml straws. Fluctuations between parameters and stallions were obvious after thawing particularly noticeable were values of total and progressive motility.

Cryopreserved semen of Old Kladruber stallions offered generally better values of spermatozoa motility in 0,5 ml straws than in 5 ml aluminium macrotubes.

Keywords: stallion, insemination dose, cryopreservation, motility

Obsah

1 ÚVOD	1
2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Fyziologie spermie	3
3.1.1 Reprodukční soustava hřebce	3
3.1.2 Neurohumorální řízení reprodukce	4
3.1.3 Spermatogeneze	7
3.1.4 Nadvarlata, přídatné pohlavní žlázy, ejakulace, semenná plazma	10
3.1.4.1 Nadvarlata.....	10
3.1.4.2 Přídatné pohlavní žlázy	11
3.1.4.3 Ejakulace	11
3.1.4.4 Semenná plazma	12
3.1.5 Metabolismus spermií, dýchání, motilita	12
3.1.5.1 Metabolismus a dýchání spermií	12
3.1.5.2 Motilita	14
3.1.5.2.1 Aktivace motility.....	15
3.2 Odběr a hodnocení ejakulátu	17
3.2.1 Odběr ejakulátu.....	17
3.2.2 Hodnocení nativního ejakulátu	18
3.3 Výroba a rozmrazení kryokonzervované ID	21
3.3.1 Výroba kryokonzervované ID	21
3.3.1.1 Ředění nativního ejakulátu	21
3.3.1.2 Plnění naředěného ejakulátu do ID	22
3.3.1.3 Kryokonzervace	22
3.3.2 Rozmrazení ID	24
3.3.3 Obaly kryokonzervovaných ID.....	25
3.4 Kvalita ejakulátu po rozmrazení	26
3.4.1 Hodnocení motility.....	27
3.4.1.1 CASA	27
3.4.1.1.1 Princip fungování CASA systému.....	28
3.4.1.1.2 Faktory ovlivňující interpretaci výsledků CASA systému.....	29
3.4.1.1.2.1 Použitý systém a jeho nastavení.....	29
3.4.1.1.2.2 Manipulace se vzorkem – koncentrace, komůrky, ředidla.....	29

3.4.1.1.3	Výstupy z CASA systému.....	30
3.4.2	Faktory ovlivňující motilitu.....	32
4	MATERIÁL A METODY	34
5	VÝSLEDKY	36
6	DISKUZE	54
7	ZÁVĚR.....	60
8	SEZNAM LITERATURY	61
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68

1 ÚVOD

Umělá inseminace kryokonzervovaným ejakulátem je jednou z nejrozšířenějších metod reprodukce koní. Oplozovací schopnost kryokonzervovaného ejakulátu je ovlivněna mnoha faktory, například technikou kryokonzervace semene, obalem a objemem inseminační dávky (ID) či managementem reprodukce. I přes stálé zlepšování techniky mrazení ejakulátu existuje značné procento hřebců, jejichž ejakulát nelze uspokojivě mrazit a po rozmrazení nedosahuje dostatečných kvalit. Velkou roli zde hraje variabilita jednotlivých hřebců i jejich ejakulátů, a tedy individuální schopnost spermií tolerovat proces kryokonzervace.

Cílem všech kryokonzervačních metod je zvýšit efektivitu kryokonzervace a vyprodukovat fertilní ID. Problémy s kryotolerancí ejakulátů těchto hůře mrazitelných hřebců by mohlo být možné vyřešit nalezením vhodného kryokonzervačního ředidla či metody mrazení. Drtivá většina kryokonzervovaného ejakulátu je uchovávána v 0,5 ml pejetách. Nízkoobjemové pejety však nejsou jedinou možností, jak uchovávat kryokonzervovaný ejakulát hřebců. Určité studie poukazují na to, že mrazení semene do vysokoobjemových ID minimalizuje poškození spermatických buněk díky zpomalení rekrystalizace při procesu mrazení a rozmrazování.

Celková a progresivní motilita, čili pohyblivost spermií, je jedním z nejdůležitějších kvalitativních ukazatelů nativního i kryokonzervovaného ejakulátu a často je považována za indikátor kvality a fertility daného ejakulátu.

2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Cílem práce je ověřit hypotézu, že hřebčí ejakulát kryokonzervovaný do 0,5 ml pejet vykazuje kvalitnější vlastnosti v porovnání s kryokonzervací do 5 ml aluminiových tub.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Fyziologie spermie

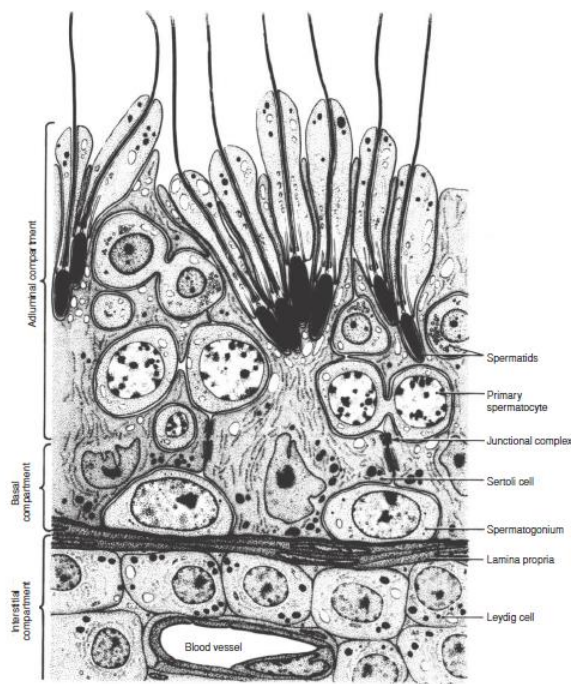
3.1.1 Reprodukční soustava hřebce

Reprodukční soustava hřebce zajišťuje tři základní funkce – tvorbu pohlavních buněk, neboli gamet, produkci pohlavních hormonů a uskutečnění pohlavního styku. Skládá se z vnitřních a vnějších pohlavních orgánů. Mezi vnitřní jsou řazeny varlata a nadvarlata, dále pak chámovody a přídatné pohlavní žlázy (ampule chámovodu, prostata, bulbourethrální žlázy a semenné vaky). Mezi vnější se řadí penis a šourek (Parkinson, 2001c).

Varlata, pohlavní žlázy hřebce, mají dvě klíčové funkce – produkci spermií, samčích pohlavních gamet, a sekreci hormonů nutných pro normální funkci nadvarlat a přídatných pohlavních žláz a pro udržení charakteristického pohlavního chování samců (Amann, 2011b).

Varlata mají vejčitý, ze stran mírně zploštělý tvar. Velikostí se pohybují mezi 80 a 140 mm na délku a 50 – 80 mm na šířku. Hmotnost varlat závisí na věku hřebce a aktuálním ročním období (vliv připouštěcí sezóny), pohybuje se okolo 225 g. Varlata jsou uložena v šourku horizontálně, ocas nadvarlete směřuje kaudálně (Amann, 2011a).

Povrch varlete je pokrytý tenkou serózní blankou (tunica vaginalis), pod níž se nachází pevné pouzdro – tunica albuginea, ze které vybíhají do varlete vazivové přepážky rozdělující parenchym varlete na 100 – 300 lalůček. Každý lalůček obsahuje 2 – 4 stočené semenotvorné kanálky (obr. 1) začínající slepě a sbíhající se do společného vývodu varlete – rete testis. Semenotvorné kanálky (tubuli seminiferi) jsou vystlány zárodečným spermatogenním epitelem nasedajícím na bazální membránu – lamina propria. Zárodečný epitel obsahuje dva typy buněk – Sertoliho podpůrné a spermatogenní. Spermatogenní buňky reprezentují jednotlivá vývojová stadia spermií – počínaje spermatogoniemi u bazální membrány a spermiemi, které se uvolňují do rete testis a jsou odváděny do nadvarlete, konče. Prostor mezi semenotvornými kanálky vyplňuje intersticiální řídké vazivo obsahující Leydigovy buňky (Amann, 2011a).



Obr. 1 Semenotvorný kanálek (Amann, 2011a)

3.1.2 Neurohumorální řízení reprodukce

Pohlavní aktivita hřebce je řízena neurohumorálně. Do jejího řízení jsou zapojeny hierarchicky uspořádané struktury mozkové kůry, retikulární formace, limbického systému, hypothalamu a hypofýzy (Morel, 2003).

Do hormonálního řízení reprodukce hřebce jsou zapojeny struktury mozku (epifýza, hypothalamus a hypofýza) i vlastní samčí pohlavní žlázy – varlata. Epifýza neboli šišinka, produkuje hormon melatonin, jehož hladina je závislá na střídání světla a tmy a nejvyšších koncentrací dosahuje za tmy. Melatonin ovlivňuje cirkadiánní i celoroční rytmy, tedy i nástup pohlavní aktivity v jarních měsících. Hypothalamus produkuje liberiny (např. GnRH = Gonadotropine – Releasing Hormon) a statiny, které řídí uvolňování hormonů z adenohipofýzy. GnRH má vliv na sekreci LH (luteinizační hormon) a FSH (folikulostimulační hormon) (Roser, 2008). Z hypothalamu jsou dále uvolňovány peptidové hormony kisspeptiny, které ovlivňují reprodukční funkce i nástup puberty (Hameed et al., 2011). Na řízení reprodukčních funkcí se podílí i hypofýza, podvěsek mozkový. Její přední lalok, adenohipofýza, produkuje gonadotropní hormony LH a FSH (Parkinson, 2001c). Gonadotropiny ovlivňují nesčetné množství reprodukčních funkcí a u hřebce je jejich sekrece,

stejně jako sekrece GnRH, pulzační (Ball, 2014). LH řídí produkci testosteronu Leydigovými buňkami ve varlatech (Garner a Hafez, 2000). FSH je důležitý pro zahájení spermatogeneze v pubertě (Morel, 2003), LH spermatogenezi udržuje během celého života hřebce (Parkinson, 2001c).

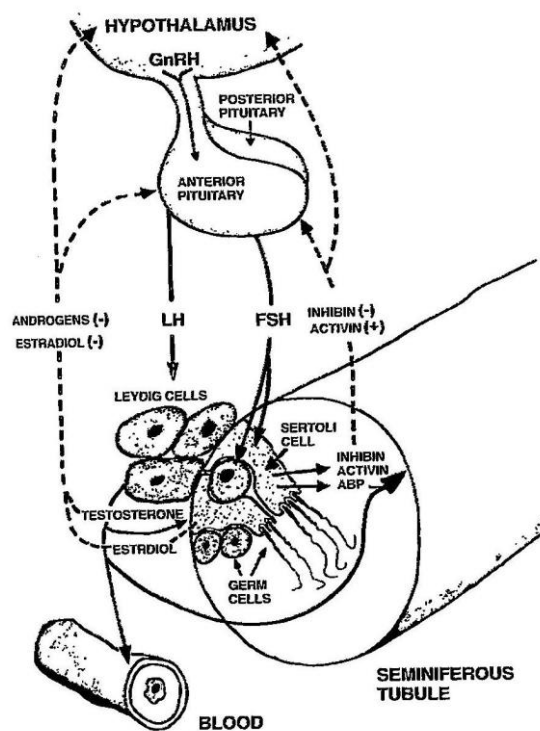
Hlavním samčím pohlavním hormonem je testosteron produkovaný vlastními pohlavními žlázami – varlaty. Tento steroidní hormon vzniká z cholesterolu při procesu steroidogeneze. Cholesterol je nejprve přeměněn v mitochondriích na pregnenolon, který je transportován do hladkého endoplazmatického retikula, kde je postupně přeměněn na testosteron (Parkinson, 2001c). Jeho sekrece je řízena nadřazenými hormony z hypothalamu a hypofýzy (Amann, 2011b). Steroidní hormony obecně regulují činnost semenotvorných kanálků a přídatných pohlavních žláz (Parkinson, 2001c). Testosteron se podílí na řízení spermatogeneze, je zodpovědný za diferenciaci pohlaví u samců a sestup varlat do šourku. V době pohlavního dospívání zodpovídá za růst a funkci genitálií a přídatných pohlavních žláz. Ovlivňuje vývoj samčích sekundárních znaků a samčí pohlavní chování. Taktéž udržuje aktivitu přídatných pohlavních žláz. Koncentrace testosteronu je v průměru 410 – 460ng/g parenchymu (Amann, 2011b).

V intersticiální tkáni varlete se nacházejí Leydigovy buňky, jejichž hlavním úkolem je biosyntéza steroidních hormonů, především testosteronu. Tento typ buněk je řízen LH z adenohipofýzy (Johnson et al., 2011).

V semenotvorném epitelu kanálku varlat se nacházejí Sertoliho podpurné buňky zajišťující výživu spermií. Tyto buňky jsou regulovány FSH a mají mnoho funkcí. Veškeré funkce však nejsou zcela známé. Především chrání a vyživují spermatické buňky, fagocytují nepotřebné zbytky vyvíjejících se spermií, představují bariéru mezi krevním oběhem a semenotvornými kanálky, produkují tekutinu a proteiny důležité pro vývoj zárodečných buněk a dopravují je skrz semenotvorné kanálky do rete testis. Čím více Sertoliho buněk varlata obsahují, tím více spermií je ve varlatech tvořeno (Amann, 2011b). Mezi další důležité funkce Sertoliho buněk patří produkce hormonů – ABP (androgen binding protein) a inhibinu (Parkinson, 2001c). ABP, androgeny vázající protein, zvyšuje koncentraci androgenů v semenotvorných kanálcích. Inhibin je krví transportován do adenohipofýzy a tlumí sekreci FSH negativní zpětnou vazbou (Ball, 2014). Sertoliho buňky produkují také anti – Müllerian hormon (AMH). Tento glykoprotein je poprvé produkovan již ve varlatech plodu a je zodpovědný za regresi Müllerových vývodů. Sekrece AMH Sertoliho buňkami pokračuje i postnatálně a může být důležitý při regulaci diferencování Leydigových buněk a produkci testosteronu (Ball, 2014).

Reprodukce hřebce je od puberty regulována pomocí chemických posílů neboli hormonů (obr. 2). Na jaře a v létě vzrůstá libido hřebce a varlata se zvětšují. Zvyšuje se produkce spermií i koncentrace hormonů v krevní plazmě (Amann, 2011b). Tato sezónnost je zapříčiněna zvyšující se pohlavní aktivitou hřebce, která je fyziologicky řízena délkou světelného dne. Prodlužující se délka dne způsobuje snížení sekrece hormonu melatoninu z epifyzy. Koncentrace melatoninu má přímý vliv na produkci kisspeptinů a ty na sekreci GnRH hypothalamem (Roser, 2008).

Sekrece GnRH hypothalamem ovlivňuje sekreci gonadotropních hormonů LH a FSH z adenohypofýzy (Parkinson, 2001c). LH ovlivňuje produkci testosteronu. Nízká hladina testosteronu stimuluje sekreci LH negativní zpětnou vazbou přes hypothalamo – hypofyzární osu (Garner a Hafez, 2000).



Obr. 2 Hormonální řízení reprodukce hřebce (Garner a Hafez, 2000)

3.1.3 Spermatogeneze

Vznik spermií čili spermatogeneze (obr. 3) je proces buněčného dělení a formování spermií z primordiálních zárodečných buněk (PGC – primordial germ cell). Spermie jsou gamety s haploidním počtem chromozomů (n) tvořené ve varlatech za podpory Sertolihova a Leydigových buněk a hormonů (Garner a Hafez, 2000). Spermie se začínají vytvářet ve varlatech hřebce od 1 roku věku (Hafez a Hafez, 2000). Tento chronologický proces mitotických a meiotického dělení probíhá ve stočených semenotvorných kanálcích varlete (Johnson et al., 2011).

Délka spermatogeneze není závislá na ročním období a u hřebce trvá přibližně 57 dní (4, 7 cyklu). Každá další generace buněk se vyvine za 12, 2 dnů (Amann, 2011b).

Vývoj samčích gamet začíná u bazální membrány (lamina propria) semenotvorného kanálku, kde se nachází nejmladší zárodečné buňky. 4 – 5 generací vyvíjejících se buněk postupuje směrem do lumen kanálku, kam jsou posléze uvolněny zralé spermie (Johnson et al., 2011).

Pro fyziologický průběh spermatogeneze je třeba ve varlatech hřebce teplota okolo 33 °C (Amann, 2011b).

Amann (2011) dělí spermatogenezi do 3 fází:

- **Spermatocytogeneze** (19, 4 dne)

Spermatocytogeneze zahrnuje stadium množení a růstu. Během množení buněk vzniká několika mitotickými děleními z původní kmenové buňky, spermatogonie, primární spermatocyt. V období růstu primární spermatocyty zvětšují svůj objem.

Spermatogonie se diferencují z prvopohlavních buněk, gonocytů, v průběhu druhého měsíce březosti. V období dospělosti jsou spermatogonie umístěny u bazálních membrán semenotvorných kanálků.

Spermatogonie se mitoticky dělí ve dvě dceřiné spermatogonie. Jedna zůstává na původním místě v blízkosti lamina propria, druhá se dále několikrát mitoticky dělí až do stadia primárního spermatocytu (Johnson et al., 2011).

- **Meióza** – zrací dělení (19, 4 dne)

Meióza zahrnuje dvě po sobě jdoucí zrací dělení, při kterých je počet chromozomů zredukován na polovinu a dochází k rekombinaci genetických vloh (Johnson et al., 2011).

Prvním redukčním dělením vznikají z primárních spermatocytů s diploidní ($2n$) sadou chromozomů haploidní (n) sekundární spermatocyty a z nich druhým ekvačním dělením spermatidy (n) (Amann, 2011b).

Z jednoho primárního spermatocytu vznikají po meiotickém dělení čtyři spermatidy (Johnson et al., 2011).

- **Spermiogeneze (18, 6 dne)**

Spermiogeneze zahrnuje morfologickou přeměnu kulovité spermatidy ve spermii tvořenou hlavičkou a ocasem. Tato metamorfóza probíhá ve výbězcích Sertoliho buněk (Johnson et al., 2011). Dochází ke kondenzaci jádra, vytvoření akrozomu a bičíku a ztrátě většiny cytoplazmy a některých organel. Odvržená cytoplazma je fagocytována Sertoliho buňkami. Takto utvořená buňka se již dále nedělí. Nezralé spermie se vyznačuje perzistující protoplasmatickou kapkou (Garner a Hafez, 2000).

Johnson et al. (2011) dále rozdělují spermiogenezi na čtyři části – golgiho, akrozomální, prodlužovací a maturační:

- Golgiho fáze

Golgiho aparát vytváří několik membránových váčků, které se spojují v jeden akrozomální váček přiléhající k jádru. Tento váček se poté mění v akrozom.

Centrioly migrují k jaderné membráně a začíná se tvořit bičíková axonema.

- Akrozomální fáze

Kolem jádra, které je stále kulaté se rozprostírá akrozom, který se zplošťuje a rozšiřuje. Vzniká tzv. akrozomální čepička. Golgiho aparát se přemísťuje na opačnou stranu buňky směrem od jádra. Bičík je zřejmější a vyčnívá dále z buňky.

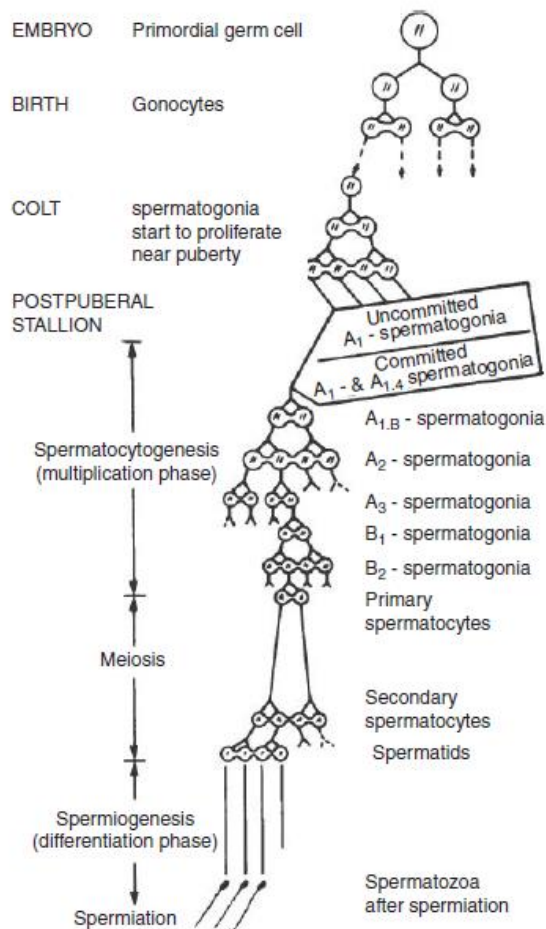
- Prodlužovací fáze

Čepička se dále rozšiřuje kolem jádra, které se prodlužuje. Jádro je ve spodní části obklopeno manžetou z mikrotubulů. Dochází k prodlužování celé cytoplazmy. Jeden z centriolů dále vyrůstá a vytváří bičík (flagellum).

- Maturační fáze

Manžeta migruje kaudálně, načež je odvržena a tato zbylá část cytoplazmy je fagocytována Sertoliho buňkami. Spermie, kterým zůstává cytoplazmatická kapka, nejsou považovány za zralé. Mitochondrie se hromadí okolo proximálního úseku bičíku a vytvářejí ztlustělou část zvanou střední segment.

Následně je zralá spermie uvolněna do lumen tubulu.



Obr. 3 Spermatogeneze (Amann, 2011b)

Spermie opouštějící varlata jsou nepohyblivé a bez schopnosti oplození samičího oocyty. Nejprve musí projít posttranslačními mechanismy, jejichž výsledkem je jejich pohyblivost a oplozeníschopnost. Nadvarlata jsou důležitá pro získání oplozeníschopnosti, přídatné pohlavní žlázy pro získání progresivního pohybu spermii. Tyto dynamické změny jsou prováděny postupně díky neustále se měnícímu prostředí, kterým spermie během zrání procházejí (Gadella, 2014).

3.1.4 Nadvarlata, přídatné pohlavní žlázy, ejakulace, semenná plazma

3.1.4.1 Nadvarlata

Nadvarlata jsou přímým pokračováním varlat a skládají se ze tří částí. Jsou jimi cauda (hlava), corpus (tělo) a cauda (ocas) nadvarlete. Varlata jsou s nadvarlaty spojeny pomocí ductuli efferentes, vývodných kanálků varlete (Burns, 2007).

Funkce nadvarlat je závislá na koncentraci androgenů v krvi. Pokud je tato koncentrace nízká, funkce nadvarlat je snižena (Parkinson, 2001c). Amann (2011) udává, že většina funkcí nadvarlat nebyla doposud u hřebců dopodrobna zkoumána. Nicméně z dat dostupných a v kombinaci s výsledky jiných druhů je možné tyto funkce odvodit.

Spermie opouštějící varle nejsou oplozeníschopné. Tuto schopnost získávají až procesem zrání spermií při průchodu nadvarletem, který zahrnuje získání oplozeníschopnosti a přímého pohybu, jakožto i změny ve struktuře plazmatické membrány a metabolismu spermií (Gadella, 2014). Nadbytečná cytoplazma, většina tekutiny, proteinů a ostatních složek přicházejících se spermiemi z varlat je resorbována ve vývodných kanálcích varlete a v hlavě nadvarlete, aby mohla být poté nahrazena sekrety z nadvarlat (Burns, 2007). Za tyto změny jsou zodpovědné enzymy a další proteiny z nadvarletní tekutiny. Složení těchto sekretů obklopujících spermie je v různých částech nadvarlat rozličné (Amann, 2011b). Mezi hlavní složky sekretu nadvarlat jsou řazeny albumin, antibakteriální bílkovina laktoferin a další (Roser, 2011).

Pohyb spermií skrz nadvarle je zajišťován peristaltickými stahy hladké svaloviny stěny nadvarlete. Doba potřebná k průchodu spermií skrz hlavu a tělo nadvarlete není nijak ovlivněna ejakulací a u hřebců trvá v průměru 4, 1 dne. Hlavními zónami skladování oplozeníschopných spermií jsou u hřebce ocas nadvarlete a chámovod. Doba strávená spermiemi v ocasu nadvarlete je závislá na procesu ejakulace (2 – 10 dní) (Amann, 2011b). Průchod spermií nadvarletem tedy trvá v průměru 5 – 14 dnů (Roser, 2011). Ocas nadvarlat dospělého hřebce ve věku 5 – 16 let obsahují okolo 54 miliard spermií, což je 61 % z celkového počtu odcházejícího odvodným systémem (Amann, 2011b).

3.1.4.2 Přídavné pohlavní žlázy

Mezi přídavné pohlavní žlázy jsou u hřebců řazeny ampule chámovodu, prostata, bulbouretrální žlázy a semenné vāčky (Parkinson, 2001c).

Správná funkce přídavných pohlavních žláz je závislá na koncentraci testosteronu v periferní krvi. Přídavné pohlavní žlázy vytvářejí většinu ejakulační tekutiny. Spermie z ocasu nadvarlete a chámovodu jsou nepohyblivé, dokud nejsou smíchány se sekrety přídavných pohlavních žláz během ejakulace. Sekrety z přídavných pohlavních žláz nejsou nezbytné pro oplození schopnost spermií, již spermie z ocasu nadvarlete mají oplozovací schopnost (Amann, 2011b).

3.1.4.3 Ejakulace

Doba strávená spermiemi v ocasu nadvarlete je závislá na procesu ejakulace. Průchod spermií ocasem nadvarlete tak může být zkrácen na 2 – 3 dny u pohlavně aktivního hřebce oproti 10 dnům u hřebce při sexuální pauze. Spermie jsou produkovány nepřetržitě, bez ohledu na frekvenci ejakulace (Amann, 2011b).

Během ejakulace jsou spermie transportovány do chámovodu pomocí stahů hladké svaloviny. Tyto stahy jsou řízeny ze sympatiku autonomní nervové soustavy (Burns, 2007).

Hafez a Hafez (2000) dělí ejakulaci na dvě fáze – poluci spermií a ejakulaci semene:

- Poluce spermatu

Spermie z nadvarlat a chámovodů jsou jakožto i sekrety ze semenných vāček a prostaty transportovány pomocí kontrakcí hladké svaloviny do zadní části močové trubice (Hafez a Hafez, 2000). Poluce je způsobena impulsy ze sympatiku (Amann, 2011b).

- Vlastní ejakulace spermatu

Tato fáze je aktivována transportem semene do prostatické části močové trubice. Aferentní impulzy stimulují sakrální a lumbální nervy erekčního centra, díky kterým dochází k přerušovaným kontrakcím perineálních svalů (Hafez a Hafez, 2000). Sperma je ejakulováno z močové trubice v několika silných vlnách pod vlivem parasympatiku (Amann, 2011b).

Počet ejakulačních vln kolísá od 5 do 10, v průměru dochází k ejakulaci v 8 vlnách. Na počátku je semeno ejakulováno pod velkým tlakem, který se v průběhu ejakulace snižuje. První tři vlny v sobě obsahují 80 % z celkového počtu ejakulovaných spermií. Skutečný výron semene zahrnuje pouze 24 % z celkového trvání ejakulace. Zbytek jsou intervaly mezi jednotlivými výrony semene (Hafez a Hafez, 2000).

Ejakulaci je možné rozdělit do 3 – 4 frakcí. První, prespermatická frakce je pravděpodobně tvořena výměškami bulbouretrálních žláz a prostaty a neobsahuje spermie. Druhá, spermatická frakce má mléčný vzhled a je bohatá na spermie, obsahuje tedy výměšky nadvarlat a ampulí chámovodů. Třetí frakce, pocházející ze semenných váčků, má želatinózní charakter a obsahuje jen malé množství spermií, které zbyly v močové trubici. Poslední frakce je vodnatá směs výměšků přídatných pohlavních žláz a neobsahuje již žádné spermie (Amann a Graham, 2011).

3.1.4.4 Semenná plazma

Semenná plazma obsahuje sekrety přídatných pohlavních žláz a nadvarlat. Její funkcí je transport spermií i jejich ochrana. Svým složením poskytuje spermiím vhodné prostředí pro aktivaci motility a oplození schopnosti. Obsahuje nesčetné množství proteinů, aminokyselin, tuků, enzymů a dalších látek (Garner a Hafez, 2000).

3.1.5 Metabolismus spermií, dýchání, motilita

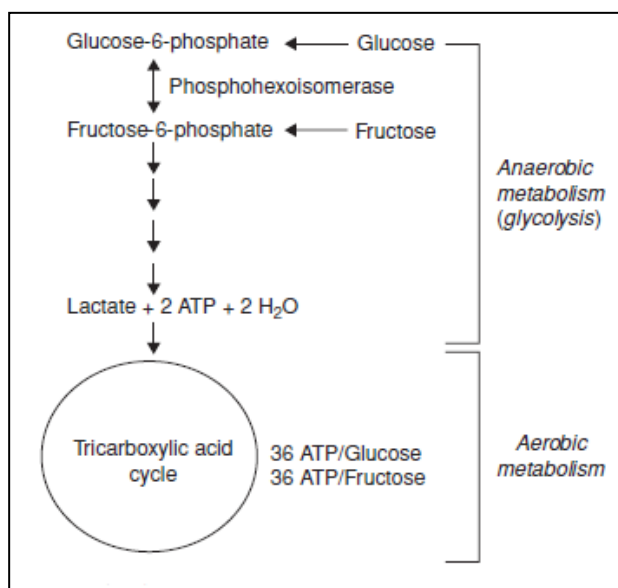
3.1.5.1 Metabolismus a dýchání spermií

Spermie nemají schopnost se dělit a jejich biosyntéza je velmi omezená. Téměř veškeré složky potřebné pro metabolismus a správné fungování spermií jsou tedy syntetizovány během spermatogeneze. Po biochemické stránce se skládají z nukleových kyselin, bílkovin, tuků a enzymů. Mitochondriální pouzdro spermie na spojovací části bičíku je bohaté na fosfolipidy. (Garner a Hafez, 2000). Spermie obsahují enzymy anaerobní

glykolýzy, β -oxidace mastných kyselin, Krebsova cyklu a dýchacího řetězce, díky nimž štěpí složité látky na jednodušší a tím získávají potřebnou energii (Varner a Johnson, 2011).

Spermie využívají pro vytváření potřebné energie exogenní i endogenní substráty. Většina energie (90 %) je získávána metabolizováním exogenních substrátů a to zejména monosacharidů – glukózy a fruktózy. Spermie hřebců mají, ve srovnání se spermii ostatních druhů hospodářských zvířat, omezenou schopnost využívat fruktózu. Tento fakt může být zapříčiněn možnou absencí transportního proteinu u hřebčích spermii (Amann a Graham, 2011). Glukóza je tedy považována za hlavní zdroj energie spermii (Varner a Johnson, 2011). Spermie nedokážou také metabolizovat sorbitol, hlavní složku semenné plazmy. Mezi další exogenní substráty využívané spermii patří kyselina mléčná, glycerol, mastné kyseliny a aminokyseliny. Metabolismus endogenních substrátů se na výrobě energie podílí pouze z 10 %. Mezi tyto substráty se řadí například fosfolipidy, které jsou oxidovány v mitochondriích. Spermie postrádají enzymy pro využití glykogenu jako zdroje energie, zásoby energie tedy u spermii chybí (Amann a Graham, 2011)

Obecně platí, že metabolismus spermii (obr. 4) probíhá aerobní i anaerobní cestou (Garner a Hafez, 2000). Spermie hřebců využívají převážně metabolismus aerobní (Amann a Graham, 2011). Anaerobní glykolýzou dochází k přeměně glukosy či fruktosy na pyruvát. Pyruvát je dále využíván v Krebsově cyklu a jeho produkty vstupují do dýchacího řetězce. Díky těmto aerobním procesům odehrávajících se v mitochondriích spojovací části bičíku spermii je získávána energie, která se ukládá ve formě ATP – adenosintrifosfát (Garner a Hafez, 2000). Energetický výtěžek z anaerobní glykolýzy jedné molekuly glukózy činí dvě molekuly ATP, zatímco výtěžek z aerobního štěpení je několikanásobně vyšší. Buňka tak získává dalších 34 molekul ATP (Varner a Johnson, 2011).



Obr. 4 Metabolismus (Amann a Graham, 2011)

Spermie využívají energii k zahájení katabolických procesů jako je například glykolýza, k pohybu a udržení iontové rovnováhy. Mezi hlavní faktory ovlivňující metabolismus a motilitu spermií se řadí pH, které by se mělo pohybovat v rozmezí 6, 2 – 7, 8 (Amann a Graham, 2011).

3.1.5.2 Motilita

Pohyb spermie umožňuje distální část bičíku bez mitochondrií. Mikrotubuly obsažené v ocasu spermie se po sobě vzájemně posouvají, což vede k ohybu ocasu. Pohyb mikrotubulů je proces využívající energii uloženou v ATP. Tato energie je produkována aerobně mitochondriemi spojovací části bičíku a/nebo anaerobní glykolýzou přímo v ocasu spermie (Gadella, 2014). Pohyb bičíku je tedy výsledkem interakce mezi mikrotubuly, ATP a dyneinem. Dynein je protein hydrolyzující ATP na ADP (adenisindifosfát) a Pi (inorganic phosphate). Dynein se v bičíku váže na mikrotubuly uspořádané v axonemách a jejich aktivita následně způsobuje vlnivý pohyb bičíku (Garner a Hafez, 2000).

Motilitu spermií ovlivňuje několik extracelulárních iontů. Mezi sloučeniny stimulující spermie se řadí PO_4^- a $\text{Na}_2\text{CO}_3^{2-}$ a nízké koncentrace K^+ či Mg^{2+} . Mezi ionty, které inhibují motilitu a metabolismus spermií, patří H^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} a vysoké koncentrace Mg^{2+} (Amann a Graham, 2011).

3.1.5.2.1 Aktivace motility

Varner a Johnson (2011) uvádí, že regulace pohyblivosti spermií závisí na třech kritických faktorech:

- Potlačení pohyblivosti v rezervoáru spermií (v ocasu nadvarlete a chámovodu)
- Aktivace motility při ejakulaci
- Hyperaktivace ve vejcovodu (kapacitace spermií)

Potlačená motilita je nejspíše důsledkem kyselého pH v prostředí nadvarlete. Sekrety z ocasu nadvarlete také neobsahují měřitelné množství bikarbonátu (HCO_3^-), který je znám jako jeden z hlavních aktivátorů motility spermií.

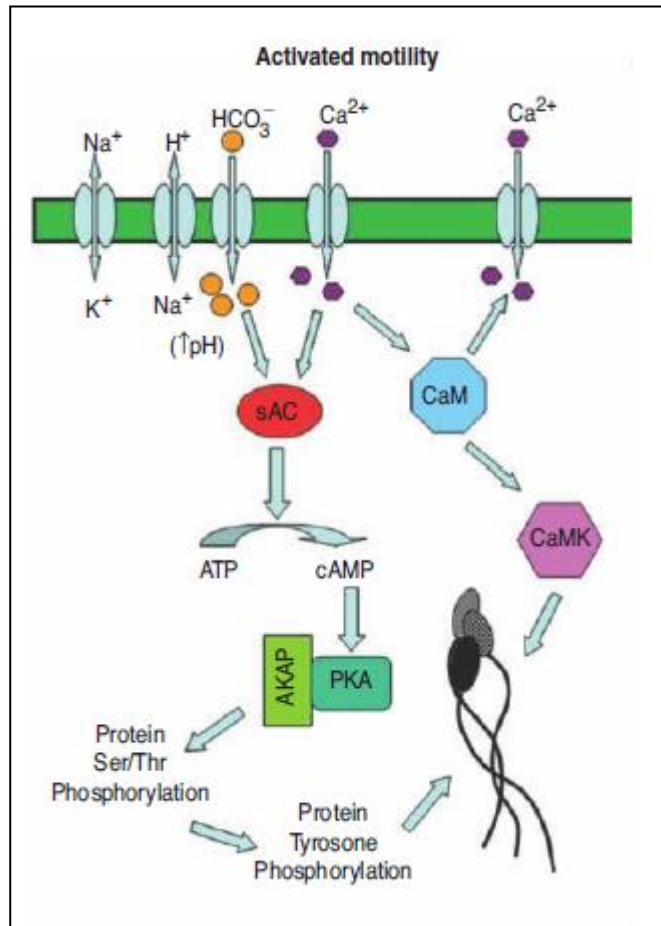
Spermie jsou při ejakulaci smíchány se semennou plazmou z přídatných pohlavních žláz, která obsahuje hydrogenuhličitan v poměrně vysokých koncentracích, což zapříčiňuje aktivaci pohyblivosti spermií. Ta se vyznačuje mírnou amplitudou a symetrickými pohyby bičíku vedoucí k pohybu kupředu. Aktivovaná motilita je považována za nezbytnou pro proniknutí spermií do vejcovodu.

Aktivace motility spermií probíhá přes signální dráhy (obr. 5). Hlavními signálními sloučeninami jsou hydrogenuhličitan HCO_3^- , vápenaté ionty Ca^{2+} a cAMP (cyklický adenosin monofosfát). Transmembránový přechod HCO_3^- do cytoplazmy spermií zapříčiňuje zvýšení intracelulárního pH, což vede k regulaci cAMP. Regulace intracelulárního pH a motility spermie závisí taktéž na Na, K – ATPázové aktivitě a na transmembránové výměně kationtů Na^+ a K^+ . Aktivita Na,K – ATPáz je důležitá pro vznik sodíkového gradientu, který je nutný pro transport iontů přes membránu. Tento gradient umožňuje přes přenašeče sodíkových a draslíkových iontů přenášet pomocí spřažených přenašečů Na^+ ionty do buňky a H^+ ionty do extracelulárního prostoru. Tato výměna iontů je pro aktivaci pohybu spermie nezbytná. Na aktivaci motility spermií se podílí i vápenaté ionty Ca^{2+} , pro které se otevrou transmembránové kanály po zvýšení intracelulárního pH.

Do signální dráhy aktivace pohybu spermií jsou také zapojeny proteinkinázy PKA závislé na koncentraci cAMP (cAMP – dependent protein kinase A).

sAC (rozpuštěná adenylylcykláza, soluble adenylyl cyclase) je enzym, který katalyzuje syntézu intracelulární cAMP. sAC se nachází v bičíku spermií a je taktéž nutná pro aktivaci motility. Adenylylcykláza je stimulována přímo ionty HCO_3^- nebo Ca^{2+} . Následně dochází k fosforylaci PKA, což vede k fosforylaci bičíkových proteinů, jež jsou pro aktivaci motility velmi důležité.

Vápenaté ionty zároveň regulují aktivitu dyneinu skrz přímou kontrolu centrálního páru mikrotubulů v axonemě. Zde je velmi důležitá přítomnost proteinu kalmodulinu (CaM), který na sebe dokáže vázat vápník a přes kalmodulin kinázu II (CaMK) reguluje funkce dyneinu a tedy i aktivaci pohybu bičíku spermie (Varner a Johnson, 2011).



Obr. 5 Aktivace motility (Varner a Johnson, 2011)

3.2 Odběr a hodnocení ejakulátu

Odběr a následné hodnocení ejakulátu je nezbytné pro posouzení jeho kvality. Posuzovány jsou jednotlivé parametry ejakulátu a jeho vhodnost pro výrobu inseminačních dávek (ID). Cílem je zhodnotit, zdali odebíraný ejakulát dosahuje dostatečných kvalit a oplozeníschopnosti (Parkinson, 2001b). Posouzení ejakulátu rovněž umožňuje kontrolu kvality semene z hlediska jeho bakteriální kontaminace, čímž lze předejít šíření pohlavně přenosných chorob (Brinsko et al., 2011).

3.2.1 Odběr ejakulátu

Ejakulát je od hřebců možné odebírat od věku 24 měsíců (Ax et al., 2000a). Hřelec je odebírán na fantom či atrapu. Pro zjednodušení odběru i lepší stimulaci hřebce je předvedena klisna v říji (Parkinson, 2001b). Hřebci je třeba postupně vytvořit na odběry návyk (Morel, 2003). Odběr je prováděn nejčastěji každý druhý den (pondělí – středa – pátek). Pokud je ejakulát odebírán denně, po několika dnech je doporučena 2 – 3 denní pauza. (Ax et al., 2000a). Odebírána je pouze spermatická frakce – takzvaný frakciováný odběr. V případě zachycení celého objemu semene musí být semenná plazma odstraněna centrifugací (Hafez, 2000). Ejakulát se pro mrazení odebírá většinou mimo období připouštěcí sezóny od října do konce ledna (Sieme, 2011).

Ejakulát je možné odebírat od hřebců několika způsoby – do umělé vagíny (artificiel vagina – AV) či do kondomu, manuální stimulací penisu hřebce, navozením ejakulace farmakologicky nebo odběrem epididymálního semene (Brinsko, 2011). Při odběru do kondomu je však kvalita ejakulátu snížena případnými nečistotami z kondomu i penisu hřebce. Z tohoto důvodu je ejakulát odebírán přednostně pomocí umělé vagíny (Ax et al., 2000a).

První umělá vagína pro odběr hřebců byla vyrobena v Rusku na počátku 20. století. Ačkoliv existuje mnoho rozličných modelů (Cambridge, Colorado, Missouri, Nishikawa – Japanese, Hannover...), všechny jsou ale založeny na stejném principu. Umělá vagína svými vlastnostmi (teplota, tlak) imituje přirozené prostředí pochvy klisny (Morel, 2003). Tlak na penis hřebce je zajištěn dofouknutím vzduchu před vlastním odběrem (Parkinson, 2001b). Mezistěna je naplněna vodou o teplotě 44 – 48 °C, tedy lehce nad teplotou těla. Během odběru pak teplota dosahuje 44 °C z důvodu zabránění chladovému šoku. Umělé vagíny pro odběr

hřebců dosahují celkové délky okolo 50 cm a váhy 10 kg. Konec umělé vagíny je opatřen jednorázovým sběračem (Morel, 2003). Veškeré části umělé vagíny, které přijdou do kontaktu s ejakulátem, musí být z nespermicidního materiálu. Před odběrem je umělá vagína vymazána nespermicidním lubrikantem (Brinsko et al., 2011). Penis hřebce je nutné omýt teplou vodou s mýdlem, aby nedošlo ke kontaminaci ejakulátu smegmatem, chlupy a dalšími nečistotami (Ax et al., 2000a).

Po vzeskoku je ztopořený penis hřebce odkloněn do umělé vagíny (Parkinson, 2001b). Po odběru musí být sběrač držěn tak, aby nedošlo ke znečištění spermatu a ihned přemístěn do laboratoře, aby mohl být ejakulát zhodnocen co nejdříve (Curry, 2007). Během transportu je nutné se vyvarovat nadměrným otřesům ejakulátu a zajistit jeho ochranu před světelným a chladovým šokem (Brinsko, 2011).

3.2.2 Hodnocení nativního ejakulátu

Hodnocení nativního ejakulátu by mělo probíhat co nejdříve po jeho odběru. Ejakulát je posuzován makroskopicky (vzhled, objem, cizí přímíseniny apod.) i mikroskopicky (motilita, koncentrace apod.). Odebraný nativní ejakulát musí být do několika minut naředěn pro maximalizaci životaschopnosti spermií (Brinsko et al., 2011).

Nejčastěji posuzované parametry a prováděné testy (obr. 6):

- Vzhled a barva ejakulátu – Ejakulát by měl být mléčně bílý, bez známek krve, moči či sraženin a přímísenin (Morel, 2003).
- Objem – Objem ejakulátu kolísá dle individuality hřebce i mezi jednotlivými odběry, pohybuje se mezi 30 a 250 ml (Morel, 2003).
- pH – pH ejakulátu hřebců se pohybuje v rozmezí 7, 2 – 7, 7. Může být ovlivněno ročním obdobím, frekvencí ejakulace a koncentrací spermií v ejakulátu. Pokud je počet spermií v ejakulátu nízký, pH se zvyšuje (Baumber – Skaife, 2011).
- Motilita – Motilita může být hodnocena subjektivně pod světelným mikroskopem či objektivně pomocí CASA systému (Morel, 2003).
- Koncentrace – Koncentrace spermií v ejakulátu je hodnocena hemocytometrem spektrofotometrem či pomocí CASA systému. Koncentrace se pohybuje okolo 30 – 600 x 10⁶/ml. V praxi jsou pro umělou inseminaci akceptovány ejakuláty s koncentrací 100 – 200 x 10⁶/ml (Morel, 2003).

- Morfologie – Hodnoceno je % abnormálních spermií ve vzorku. Abnormality jsou děleny na primární, vzniklé v průběhu spermatogeneze a zrání, sekundární, vzniklé při ejakulaci a terciální, vznikající nevhodným zacházením s již ejakulovaným semenem. Mezi další abnormality se řadí nedozrálé spermie s protoplazmatickou kapkou na bičíku (Morel, 2003). Morfologie je hodnocena pod mikroskopem při stonásobném zvětšení za použití olejové imerze. Hodnoceno je minimálně 100 – 200 buněk (Baumber – Skaife, 2011). Vysoké % poškozených spermií vzniká například při tepelném stresu. Je nutné poznamenat, že morfologické abnormality mají velmi úzký vztah k plodnosti (Ax et al., 2000b).
- % stanovení živých a mrtvých spermií barvením – Integrita plazmatické membrány determinuje schopnost živých buněk nepropouštět barvivo. Kapka ejakulátu je smíchána s kapkou červeného barviva eosin (obarví mrtvé spermie) a kapkou tmavě fialového barviva nigrosin (podklad). Preparát je hodnocen pod mikroskopem pomocí imerzního oleje, hodnoceno je minimálně 100 buněk. Živé buňky zůstávají neobarvené, mrtvé spermie s porušenou plazmatickou membránou se zbarví do růžova (Baumber – Skaife, 2011).
- HOS test (hypoosmotic swelling test) – HOS test hodnotí integritu a propustnost membrány spermie. Vzorek nativního ejakulátu (100 µl) je inkubován 60 minut při teplotě 37 °C v 1 ml sacharózového hypoosmotického roztoku o osmolaritě 100 mOsm. Hodnoceno je minimálně 100 buněčných elementů s klasifikací HOS+ (funkční membrána, stočený bičík, živá buňka) nebo HOS- (nefunkční membrána, rovný bičík, mrtvá buňka) (Baumber – Skaife, 2011).
- Cytologie – Přítomnost krevních buněk, leukocytů či erytrocytů, které by mohly negativně ovlivňovat kvalitu ejakulátu (Morel, 2003).
- Bakteriologie – Přítomnost patogenních i nepatogenních (většina) agens. Vzorek semene je pro zjištění bakterií nanesen na agar. Po nárůstu kolonií jsou identifikovány například patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae* (Morel, 2003).

Table 20.3. The acceptable range for a normal stallion's semen parameters.	
Parameter	Acceptable range
Volume of sperm produced	30–250 ml
Sperm concentration	30–600 × 10 ⁶ ml ⁻¹
Morphology	Minimum 40–50% physiologically normal
Live : dead ratio	6.0 : 4.0
Motility	Minimum 40% progressively motile sperm
Longevity at room temperature	45% alive after 3 h 10% alive after 8 h
pH	6.9–7.8
White blood cells	< 1500 m ⁻¹
Red blood cells	< 500 ml ⁻¹

Obr. 6 Parametry normálního ejakulátu hřebců (Morel, 2003)

Je velmi důležité, aby po celou dobu manipulace i při hodnocení byla udržována teplota všech materiálů, které přijdou s ejakulátem do kontaktu, tedy i ředidel, okolo teploty těla = 37 – 38 °C (Brinsko et al., 2011). Spermie jsou velmi náchylné na chladový šok a pokud nejsou nástroje, destička mikroskopu apod. předehřáté na požadovanou teplotu, mohou být výsledky vážně ovlivněny (Morel, 2003).

3.3 Výroba a rozmrazení kryokonzervované ID

3.3.1 Výroba kryokonzervované ID

Metoda kryokonzervace umožňuje dlouhodobě uchovávat ejakulát pro účely umělé inseminace. Po zmrazení si spermie uchovávají oplozeníschopnost po velmi dlouhou dobu, jelikož dochází k zastavení jejich metabolismu (Curry, 2007). Obecně lze říci, že mražené semeno má horší oplozovací schopnost než chlazené či nativní. Pokud už kvalita nativního ejakulátu u hřebců nevykazuje dobré vlastnosti, pak nemá smysl ho vůbec mrazit (Brinsko et al., 2011). Úspěšné mrazící protokoly zahrnující odběr ejakulátu, ředění s přidáním kryoprotektantů, ekvilibraci, následné mrazení, uskladnění a rozmrazení jsou používány od 50. let 20. století. Nicméně stále se hledají nové postupy, jak stávající protokoly vylepšit a zvýšit tak fertilizační schopnost kryokonzervovaného ejakulátu (Curry, 2007). Pokud je odebrán celý objem ejakulátu, nejen jeho spermatická frakce, je po základním zhodnocení ejakulát naředěn centrifugačním ředidlem, které slouží jako ochrana při centrifugaci. Poté je centrifugován na 400 – 600g po 8 – 15 minut (Sieme, 2011). Po centrifugaci je odebrán supernatant a zbývající suspenze se spermiemi je naředěna v kryokonzervačním ředidle obsahujícím kryoprotektanty (Curry, 2007).

3.3.1.1 Ředění nativního ejakulátu

Maximální stupeň ředění je odvozen od minimálního počtu spermií a objemu inseminační dávky potřebné pro zabřeznutí (Parkinson, 2001a). Ejakulát je ředěn na finální koncentraci 40 – 400 x 10⁶ spermií/ml (Clulow et al., 2008). Existuje mnoho rozličných ředidel, na všechny jsou však kladeny stejné základní požadavky. Ředidlo musí udržovat správnou osmolaritu, pH a koncentraci iontů, poskytovat energii, obsahovat antimikrobiální složky, kryoprotektanty apod. Obecně musí ředidlo minimálně zachovávat oplození schopnost spermií, lépe ji ještě zvyšovat. Většina ředidel je lehce hyperosmotická z důvodu dehydratace spermatických buněk v průběhu mrazení. pH je udržováno přidáním pufrací složky, například sloučeniny Tris či HEPES (Curry, 2007). Energetická složka je zajištěna přítomností jednoduchých cukrů, jako je glukóza, fruktóza, mannóza či arabinóza (Parkinson,

2001a). Semenná plazma je mikrobiálně sterilní, je zde však riziko kontaminace během odběru a zpracování ejakulátu. Z tohoto důvodu se do ředidel přidávají antibiotika, například penicilin nebo streptomycin v koncentracích netoxických pro spermie (Curry, 2007). Prakticky všechna ředidla pro kryokonzervovaný ejakulát obsahují buď vaječný žloutek nebo odstředěné mléko, popřípadě kombinaci obou těchto základních ingrediencí (Hafez, 2000). Mnoho ředidel ejakulátu hospodářských zvířat je v současné době dostupné komerčně (Brinsko et al., 2011).

3.3.1.2 Plnění naředěného ejakulátu do ID

Po naředění je ejakulát plněn do předem připravených obalů (Curry, 2007). Jednotlivé inseminační dávky musí být vždy řádně označeny – jménem hřebce, číslem registru, datem výroby a identifikačním kódem dané laboratoře a země. Natisknout lze i identifikační čárový kód. Před mrazením musí být dávky vždy hermeticky uzavřeny (Brinsko et al., 2011).

Po naplnění a uzavření inseminačních dávek následuje ekvilibrace, neboli pomalé zchlazení v průběhu 1 – 2 hodin již naředěného ejakulátu před samotným mrazením na 5 °C, je velmi důležitá z hlediska citlivosti spermií savců na teplotní šok. Zchlazování probíhá postupně rychlostí okolo -0,25 stupňů/min. 0,5 ml pejety jsou poté zavěšeny horizontálně asi 5 cm nad hladinu do par tekutého dusíku na 7 minut a následně ponořeny vertikálně do tekutého dusíku. Teplota před ponořením pejet do dusíku je přibližně -120 °C. Popřípadě je možné použít mrazák s automatickou kontrolou mrazení a lineárním zchlazovacím programem (Curry, 2007). Kryokonzervované ID jsou skladovány v kontejneru s tekutým dusíkem. 0,5 ml pejety v plastových gobletách, velkoobjemové dávky většinou přímo ponořené v tekutém dusíku (Brinsko et al., 2011).

3.3.1.3 Kryokonzervace

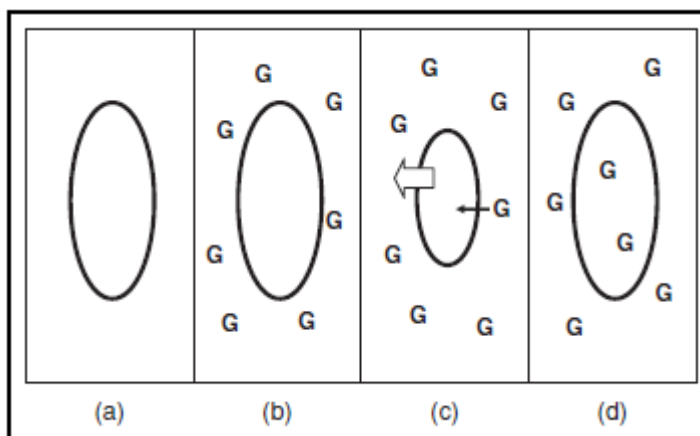
V průběhu mrazení a rozmrazování ejakulátu může dojít v podstatě ke dvěma kritickým momentům – k tvorbě nitrobuněčného ledu (při rychlém zchlazování) a vzniku tzv. „solution effect“ (při zchlazování pomalém). „Solution effect“ začíná v průběhu mrazení spermatu, při kterém dochází k vytlačování vody ze spermie, tedy k její dehydrataci, čímž se

zvyšuje koncentrace solí. Pokud je průběh mrazení příliš rychlý, voda nestačí spermii opustit a tvoří se intracelulární ledové krystaly ničící buněčné struktury. Z těchto důvodů jsou součástí kryokonzervačních ředidel látky s kryoprotektivními účinky, tzv. kryoprotektanty. Přidáním kryoprotektantů (například glycerol, DMSO – dimethyl sulfoxid apod.) do mrazicího média má za následek možnost mrazení při nižších teplotách. Toto pravděpodobně zpomaluje dehydrataci buňky a z toho vyplývající škodlivý „solution effect“, načež buňky mohou být chlazeny pomaleji jako prevence proti tvorbě ledových krystalů (Hafez, 2000).

Kryoprotektanty jsou tedy veškeré látky přidávané do kryokonzervačního média za účelem zlepšení přežitelnosti buněk v průběhu mrazení. Kryoprotektanty je možné rozdělit na dvě základní skupiny – permeabilní a nepermeabilní přes plazmatickou membránu. Nepermeabilní zahrnují cukry (laktóza, sacharóza, LDL = low – density lipoprotein apod.), lipoproteiny (vejce, mléko, sérum) a další makromolekuly (methyl, celulóza, polyvinylalkohol apod.). Tyto molekuly interagují s plazmatickou membránou s cílem stabilizovat ji. Jejich hlavním efektem je však vytvořit hyperosmotické prostředí, které zapříčiní dehydrataci spermatických buněk (Graham, 2011). Přítomnost mléčného žloutku v ředidle se ukázalo jako protektivum proti chladovému šoku – vaječný žloutek totiž obsahuje LDL, který přilne na plazmatickou membránu, čímž ji mechanicky chrání před poškozením (Curry, 2007). Permeabilní kryoprotektanty, jako například glycerol, ethylenglykol, DMSO apod. jsou svým mechanismem působení efektivnější. Penetrují přes plazmatickou membránu a nahrazují vodu uvnitř buňky. Takto dehydratované buňky a jejich kompartmenty mají tendenci potlačovat tvorbu intracelulárních ledových krystalů. Permeabilní kryoprotektanty rovněž zvyšují objem nezamrzlých kanálů mezi extracelulárními ledovými krystaly a tím zvětšují prostor dostupný pro buňky. Taktéž snižují koncentraci solí v rozmraženém roztoku (Graham, 2011).

Molekuly permeabilních kryoprotektantů penetrují přes membránu mnohem pomaleji než voda. V důsledku tohoto dochází ke změnám velikosti buněk, což může mít ničivé dopady. Spermie některých druhů jsou tolerantní k těmto změnám osmotického tlaku, hřebčí však nikoliv. Z tohoto důvodu musí být množství přidávaného kryoprotektantu kompromisem mezi požadovaným minimálním množstvím pro správné mrazení bez poškození buněk a mezi množstvím, které buňky tolerují (Graham, 2011). Glycerol jako permeabilní kryoprotektant byl objeven v roce 1949 (Polge et al., 1949). Spermie hřebců jsou však na glycerol citlivé, proto musí být přidáván těsně před mrazením a pouze v pro spermie netoxických koncentracích (Hafez, 2000). Glycerol by měl tedy tvořit asi 4 – 5 % z kryokonzervačního

média (Brinsko et al., 2011, Graham, 2011). Většina obecných kryokonzervačních protokolů pro sperma savců udává větší rozpětí a to 0,5 – 1,5 M, což je přibližně 4 – 10 % (Curry, 2007). V okamžiku, kdy je přidán glycerol do suspenze spermií, začne voda prostupovat plazmatickou membránou do extracelulárního prostoru, aby vyrovnala vyšší koncentraci glycerolu vně buněk (Obr. 7). Glycerol následně pomalu difunduje do buněk (a s ním i voda) a buňky nabývají opět svůj původní objem (Graham, 2011).



Obr. 7 Difúze vody a glycerolu (Graham, 2011)

Pokud je buňka v izotonickém prostředí (a) přemístěna do prostředí obsahující glycerol (G) v koncentraci požadované pro kryokonzervaci (b), voda bude difundovat z buňky rychleji (velká šipka) než glycerol do buňky (malá šipka) a buňka se bude zmenšovat (c). Když začne glycerol pomalu pronikat do buňky, voda se začne díky osmotickému tlaku taktéž navracet a buňka nabyde zpět svého původního objemu (d).

3.3.2 Rozmrazení ID

Inseminační dávky (ID) je nutné rozmrazovat rychle. Pomalý proces by zapříčinil rekrystalizaci intracelulárního ledu, což by mohlo způsobit poškození membrán (Parkinson, 2001a). Při rozmrazování ledové krystalky tají a voda se navrácí zpět do buněk, čímž se snižuje koncentrace solí v roztoku. Buňky tímto procesem rehydratace nabývá svého původního objemu (Graham, 2011).

Obecný protokol pro rozmrazení 0, 5 ml pejet zahrnuje rozmrazení ve vodní lázni o teplotě 37 °C po 30 sekund, 5 ml makrotuby jsou rozmrazovány 40 – 42 sekund při teplotě 50 °C (Brinsko et al., 2011, Sieme, 2011). Výhoda 0,5 ml pejet oproti vysokoobjemovým ID

tkví v možnosti rychlého a uniformního rozmrazení celé ID, jelikož se teplá voda dostane ihned k celému povrchu pejety (Parkinson, 2001a).

3.3.3 Obaly kryokonzervovaných ID

Původně byl ejakulát skladován v peletách, poté v aluminiových tubách či plastových pejetách (Merkt et al., 1975). Postupně se přešlo k mrazení především v 0,5 ml či 0,25 ml pejetách. Alternativou k tomuto maloobjemovému obalu se využívalo mrazení ejakulátu ve větších objemech, například ve 4 – 5 ml pejetách (Samper et al., 1998), 12 ml skleněných tubách (Zirkler et al., 2005) či 2, 3 nebo 6 ml cryovials/kryonádobách (Kozink et al., 2006). Dále pak ve 25 ml aluminiových makrotubách (Tischner, 1979), popřípadě v 15 ml sáčcích (Green et al., 2006). Nyní je semeno v drtivé většině případů uchováváno v 0,5 ml pejetách. 0,5 ml pejety obsahují pouze 50 – 100 x 10⁶ spermií. Z tohoto důvodu musí být k inseminaci použito 6 – 8 těchto pejet (Brinsko et al., 2011).

Mrazení spermatu ve velkoobjemových dávkách má nesporně mnoho výhod. Za tu jistě nejdůležitější je považována minimalizace poškození buněk při mrazení semene do obalů s větším objemem. Ejakulát po rozmrazení vykazuje vyšší hodnoty progresivní motility (Saragusty et al., 2007). Dále se jedná například o výhodu použití jen jedné dávky pro umělou inseminaci, čímž se snižuje riziko kontaminace či znehodnocení některé z 0,5 ml pejet, tedy se výrazně zjednodušuje inseminace. Mezi další výhody patří jednodušší uchovávání větších dávek i manipulace s nimi. Jednodušší manipulace je ceněna například při identifikaci dávek vyjímaných z kontejneru s tekutým dusíkem, kdy jsou vzorky vystaveny vyšším teplotám. Při použití 0,5 ml pejet riskujeme poškození buněk v důsledku rekrystalizace po opětovném vrácení dávky do kontejneru, zatímco vzorky zamražené do větších obalů dosahují při pokojové teplotě teploty -100 °C až po 2 minutách po vytažení z tekutého dusíku. Toto tedy poskytuje výhodu při manipulaci s jednotlivými dávkami a jejich identifikaci, čili větší prostor pro rozhodnutí, zdali danou dávku rozmrazit či vrátit zpět do tekutého dusíku.

Ejakulát kryokonzervovaný v 0,5 ml pejetách a 2 ml kryotubách vykazuje po rozmrazení stejnou úroveň motility i stejné množství morfologických defektů. Naproti tomu však u klisen inseminovaných semenem uchovávaným v kryotubách došlo k úspěšnému zabřeznutí v 50 % (3/6) oproti pouze 16,66 % (1/6) u klisen inseminovaných semenem skladovaným v 0,5 ml pejetách (Lorenzoni et al., 2011). Při srovnání kvality kryokonzervovaného ejakulátu zamraženého do 0,5 ml pejet a 12 ml skleněných tub

vykazoval ejakulát uchovávaný ve skleněných tubách vyšší hodnoty PMOT, vyšší viabilitu i vyšší integritu plazmatické membrány spermií (Saragusty et al., 2007).

Na druhou stranu však někteří autoři uvádějí, že vysokoobjemové dávky vykazují horší parametry ejakulátu po rozmrazení než dávky zamražené v 0,5 ml pejetách, ve kterých probíhá proces mrazení a rozmrazování mnohem více uniformě díky většímu povrchu (Loomis a Clark, 1998). Při srovnání kvality kryokonzervovaného ejakulátu zamraženého do 0,5 ml pejet a 3,6 ml kryotub vykazoval ejakulát uchovávaný v kryotubách horší parametry motility spermií. Obal však neměl vliv na integritu membrány spermií (Kozink et al., 2006).

Efekt obalu však neměl vliv při srovnání procenta klisen, které zabřezly po inseminaci ejakulátem kryokonzervovaným v ID o objemech 0,5 ml, 2 ml a 12 ml. Klisny zabřezly ve 42 – 45 % případů, přičemž rozdíly mezi jednotlivými objemy ID byly bezvýznamné (Sieme, et al., 2004). Při srovnání kvality ejakulátu mraženého do 0,5 ml a 0,25 ml pejet neměl objem ID žádný vliv na integritu ani funkčnost plazmatické a akrozomální membrány spermií (Nascimento et al., 2008)

3.4 Kvalita ejakulátu po rozmrazení

Obecně lze říci, že se procesem mrazení a rozmrazování fertilita ejakulátu snižuje. Kvalita kryokonzervovaného ejakulátu po rozmrazení je tedy oproti nativnímu či chlazenému ejakulátu nižší (Hafez, 2000). Velký vliv na změny v kvalitě ejakulátu má i samotné prostředí. Kvalita semene se zlepšuje během prvních měsíců po nástupu puberty a snižuje se ve stáří. Vliv má taktéž podvýživa či krmivo obsahující toxické látky, jejichž přítomnost může narušovat vývoj varlat i samotnou spermatogenezi. Dále mohou kvalitu ejakulátu ovlivnit délka světelného dne, frekvence ejakulace, stupeň sexuální připravenosti, typ odběru a v neposlední řadě kryokonzervace (Foote, 1978). Kvalita rozmraženého semene je ovlivněna především individualitou hřebce a mrazitelností jeho ejakulátu (Loomis a Graham, 2008). Kvalita ejakulátu kolísá i mezi jednotlivými ejakuláty a odběry u jednoho hřebce (Najjar, 2013).

Po rozmrazení jsou hodnoceny jak kvantitativní, tak i kvalitativní parametry ejakulátu. Hodnocení je možné provádět metodami subjektivními nebo objektivními s využitím CASA systému či flow cytometru (Graham, 2011). Kvantitativně lze zhodnotit koncentraci spermií v rozmraženém ejakulátu za pomoci hemocytometru či spektrofotometru. Kvalitativní zhodnocení ejakulátu je zaměřeno především na motilitu, viabilitu a morfologii. Dále lze

hodnotit například integritu DNA v hlavičce spermie, akrozomální reakci či schopnost kapacity spermií. Tyto metody nejsou v praxi téměř využívané, nacházejí však uplatnění ve výzkumu modifikací stávajících kryoprotokolů, jelikož lze díky nim komplexněji posoudit kvalitu ejakulátu (Colenbrander a Stout, 2011).

3.4.1 Hodnocení motility

Hodnocení motility je považováno za jeden z nejdůležitějších kvalitativních parametrů ejakulátu po rozmrazení. Motilita je všeobecně považována za ukazatel viability spermií v daném vzorku (Hodder a Liu, 2011). Na druhou stranu je nutné si uvědomit, že motilita jako parametr sám o sobě je však pokládána za velmi slabý indikátor předpovědi fertility daného ejakulátu hřebce (Parkinson, 2001a).

Po rozmrazení by měl vzorek obsahovat ideálně 35 a více % progresivně motilních spermií. Pohyblivost může být ovlivněna mnoha rozličnými faktory (Colenbrander a Stout, 2011).

3.4.1.1 CASA

CASA (computer – assisted sperm analysis) neboli počítačem řízená analýza spermií je systém využívaný pro hodnocení motility (Katila, 2001). Systém nám poskytuje mnoho kinematických parametrů popisujících pohyb a rychlost spermií (Ball, 2014). Mezi další kvalitativní a kvantitativní parametry, které lze měřit CASA systémem, lze zařadit například morfologii či koncentraci ejakulátu (Katila, 2001).

Dřívější subjektivní hodnocení parametrů ejakulátu bylo ovlivněno mnoha faktory, díky kterým nebylo možné srovnávat tyto výsledky mezi jednotlivými technikami a laboratořemi. Odhadované parametry motility se lišily o 30 – 60 % ve stejném vzorku ejakulátu. Díky těmto odchylkám byl kladen důraz na vyvinutí objektivní metody pro hodnocení kvality ejakulátu. Záznam dat z CASA systému umožňuje jednoduše srovnat výsledky se standardními hodnotami (Verstegen et al., 2002). Na rozdíl od dřívějšího subjektivního stanovování motility odhadem pomocí mikroskopu CASA systém hodnotí motilitu objektivně a každou spermatickou buňku individuálně (Katila, 2001).

CASA systém se začal vyvíjet před více než čtyřiceti lety. Od roku 1974 byl využíván první primitivní CASA systém, který se skládal pouze z kamery, myši a monitoru a dokázal analyzovat pouze méně než 30 spermií na 4 – 8 snímcích (Amann a Waberski, 2014). Roku 1985 byla představena první plně automatizovaná CASA (Katz et al., 1985). Dnes evidujeme více než 12 CASA systémů používaných pro hodnocení ejakulátu v mnoha andrologických laboratořích i centrech humánní reprodukce (Amann a Waberski, 2014).

Nevýhodou systému CASA je vyšší pořizovací cena vybavení, dále nutnost kontroly kvality a standardizace měření. Příslušenství zahrnuje mikroskop, video kameru, počítač a software analyzující pohyb (Baumber – Skaife, 2011). I přes tuto nepatrnou nevýhodu nabízí systém rychlé a automatizované metody analýzy spermií s vysokým stupněm opakovatelnosti (Baumber – Skaife, 2011). Získaná data jsou objektivnější. Obzvláště v případě celkové a progresivní motility (Lorton, 2014). Je však nutné poznamenat, že výsledky získané z různých typů CASA systémů nemohou být vzájemně srovnávány díky odlišnému nastavení (Baumber – Skaife, 2011).

3.4.1.1.1 Princip fungování CASA systému

CASA systém identifikuje pomocí softwaru jednotlivé objekty dle intenzity pixelů na snímaných polích a poté rekonstruuje jejich trajektorie (Verstegen et al., 2002). Snímek z mikroskopu je poslán skrz kameru do počítače, kde je převeden do digitální podoby. Počítač vyobrazí spermie jako bílé hlavičky na tmavém pozadí díky použití objektivu s fázovým kontrastem. Hlavičky spermií jsou identifikovány pomocí velikosti v pixelech. Rozpětí velikosti hlavičky je druhově specifické, příslušné maximum a minimum jsou zadány do počítače, který identifikuje každý objekt v tomto rozpětí jako hlavičku spermie. Krom velikosti využívá software také jas objektů pro odlišení spermií od nečistot. Všechny pohyblivé objekty nacházející se v rozpětí zadané minimální a maximální velikosti jsou pokládány za spermie a jejich trajektorie jsou sledovány systémem (Baumber – Skaife, 2011). Na získaných trajektoriích je založeno hodnocení pohybu spermií (Amann a Waberski, 2014).

Identifikace spermie probíhá přes detekci těžiště přes algoritmus. Identifikována je osa x a y (detekce hran) a osa z (autofokus). Pravděpodobnost výskytu spermie na dalším snímku je dána kružnicí kolem hlavičky spermie – tzv. maximální prostorový posun spermie (Amann a Waberski, 2014).

3.4.1.1.2 Faktory ovlivňující interpretaci výsledků CASA systému

Výstupy CASA systému jsou ovlivněny mnoha činiteli vznikajícími před i v průběhu analýzy. Ať už se jedná o přípravu vzorku, mrazení a rozmrazování, použité ředící médium, koncentraci vzorku, hloubku komůrky, teplotu pomůcek, čas uplynulý mezi vzorkováním a analýzou, vybavení počítače či nastavení systému – threshold (Amann a Waberski, 2014). Spolehlivost a přesnost výsledků závisí taktéž na zkušenostech laborantů. Jedná se tedy o semiautomatický systém (Baumber – Skaife, 2011).

3.4.1.1.2.1 Použitý systém a jeho nastavení

Rekonstruovaná trajektorie může být značně ovlivněna počtem získaných snímků za sekundu. Tento počet analyzovaných snímků za sekundu (frame rate, FPS = frames per second) je závislý na typu použité kamery. Dříve se využívaly i nižší frekvence 15 či 30 Hz (Verstegen et al., 2002), nyní je nejčastěji využívána frekvence 60 FPS, čili se snímá 60 snímků za sekundu. Při použití vyššího FPS je zrekonstruovaná trajektorie spermie přesnější, tudíž i její kinetické parametry jsou zpracovány precizněji. Frame rate je tedy nutné standardizovat i za účelem pozdějšího porovnávání výsledků (Baumber – Skaife, 2011).

Moderní CASA systémy dokážou automaticky zhodnotit mnoho polí a získat vyobrazení 500 – 2000 i více spermií při 50 – 60 FPS (Amann a Waberski, 2014). Je doporučováno analyzovat parametry pro >300 buněk ve vzorku obsažených v několika rozličných polích. I v tomto případě platí, že výsledky analýzy mohou být ovlivněny selektivním vybíráním kvalitních polí laborantem (Baumber – Skaife, 2011).

3.4.1.1.2.2 Manipulace se vzorkem – koncentrace, komůrky, ředidla

Hodnocení probíhá ve speciálních vzorkovacích komůrkách pod mikroskopem po naředění ejakulátu na požadovanou koncentraci (Amann a Waberski, 2014). Maximální koncentrace spermií pro snímání CASA systémem by měla být 50×10^6 spermií/ml, doporučené je však ejakulát naředit na 25×10^6 spermií/ml (Katila, 2001). Při nesprávném

poměru ředění a vysoké koncentraci spermií v ejakulátu dochází ke zkreslení výsledků analýzy a trajektorie spermií jsou interpretovány chybně. Spermie nemohou být správně detekovány, pokud se jejich trajektorie během snímání kříží či pokud dochází mezi spermii ke kolizím (Baumber – Skaife, 2011).

Na přirozený pohyb spermií má vliv i použitá vzorkovací komůrka, především její hloubka. Standardně se používají komůrky o hloubce 10 či 20 μm . Hloubka snižuje pravděpodobnost úniku spermií ze zaostřené ohniskové roviny (osa z) při použití příliš hluboké komůrky (Lorton, 2014). Při hloubce $<10 \mu\text{m}$ dochází k omezení pohybu spermií (po ose z) či k nežádoucím interakcím se stěnami komůrky (Verstegen et al., 2002). Používáním těchto speciálních komůrek, jako je například Leya® (Lorton, 2014) či Makler®, lze eliminovat variabilitu výsledků parametrů motility vznikající při přípravě sklíček s kapkou ejakulátu hodnocených subjektivně standardním způsobem (Baumber – Skaife, 2011). Důvodem nepřesností v měření mohou být také neodborné zacházení s komůrkou či její čištění (Verstegen et al., 2002).

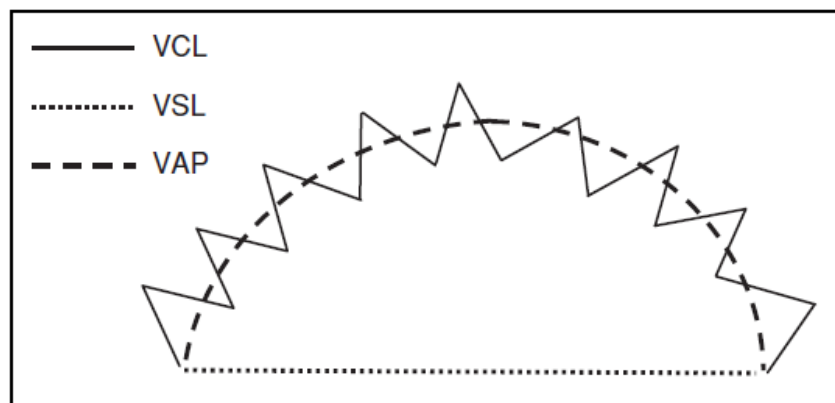
Taktéž ředící médium může negativně ovlivnit výstupní hodnoty analýzy. Použité ředidlo by nemělo obsahovat částice stejné velikosti jako je hlavička spermie, jak je tomu například u žlutkových či mléčných ředidel. Pokud analyzovaná suspenze obsahuje tyto částice, systém je nemusí správně rozpoznat. V tomto případě mohou být pokládány za nemotilní spermie, čímž se snižuje naměřená motilita ejakulátu (Baumber – Skaife, 2011). Tento problém je mnohými CASA systémy řešen použitím fluorescence k označení DNA v hlavičce spermie (Colenbrander a Stout, 2011).

3.4.1.1.3 Výstupy z CASA systému

Mezi hlavní výstupy z CASA systému patří nejen celková (TMOT) a progresivní motilita (PMOT). Mezi další kinematické parametry motility popisující specifické charakteristiky pohybu spermií jsou řazeny například VCL, VSL, VAP (obr. 8), ALH a BCF (Quintero – Moreno et al., 2003).

- **TMOT** (total sperm motility, %) je definována jako procentuální podíl spermií pohybujících vyšší než minimální rychlostí definovanou v nastavení CASA systému. Obvykle se jedná o hranici 20 $\mu\text{m/s}$. Spermie pohybující se rychlostí $<20 \mu\text{m/s}$ jsou považovány za statické objekty (Baumber – Skaife, 2011).

- **PMOT** (progressive motility, %) je závislá na nastavení parametrů VAP (min. 50 $\mu\text{m/s}$) a STR (75 %) v CASA systému. Hodnota progresivní motility je závislá na nastavení těchto parametrů, výsledky se tedy při odlišném nastavení mezi jednotlivými laboratořemi liší a nelze je mezi sebou porovnávat (Baumber – Skaife, 2011).
- **VCL** (curvilinear velocity, křivočará rychlost, $\mu\text{m/s}$) udává rychlost pohybu spermie na celé trajektorii (point – to – point) za jednotku času (Quintero – Moreno et al., 2003). Tato hodnota je tedy z naměřených rychlostí spermie nejvyšší (Baumber – Skaife, 2011).
- **VSL** (straight line velocity, přímočará rychlost, $\mu\text{m/s}$) je odvozená od přímé dráhy mezi prvním a posledním bodem měřené trajektorie pohybu spermie (Verstegen et al., 2002). Jedná se tedy o nejnižší hodnotu popisované rychlosti spermie (Baumber – Skaife, 2011).
- **VAP** (average pathway velocity, průměrná rychlost, $\mu\text{m/s}$) udává průměrnou rychlost spermie v průběhu analýzy. VAP je měřena na dráze vzniklé napřímením skutečné trajektorie spermie (Baumber – Skaife, 2011).



Obr. 8 Schematické znázornění rychlostních parametrů měřených CASA systémem (Baumber – Skaife, 2011)

- **ALH** (amplitude of lateral head displacement, amplituda laterálního vybočení hlavičky, μm) je vypočítána jako šíře oscilace hlavičky od napřímené trajektorie spermie, odvozeno z VCL a VAP (Quintero – Moreno et al., 2003).
- **BCF** (beat cross frequency, frequency of head displacement, frekvence křížení, Hz) je frekvence, se kterou hlavička spermie protíná průměrnou dráhu, čili kolikrát je

skutečná dráha překřížena napřímenou průměrnou dráhou (Quintero – Moreno et al., 2003).

Parametry charakteru pohybu popisující tvar trajektorie (Quintero – Moreno et al., 2003):

- **STR** (straightness, přímost, %) – přímost průměrné dráhy je poměr VSL/VAP v procentech a udává podobnost dráhy spermie přímce (Quintero – Moreno et al., 2003).
- **LIN** (linearity, linearita, %) – linearita skutečné dráhy je průměrnou hodnotou poměru VSL/VCL uváděná v procentech (Baumber – Skaife, 2011).
- **WOB** (wobble, kmitání, %) udává stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřímené trajektorie, tedy poměr VAP/VCL v procentech (Quintero – Moreno et al., 2003).

Na závěr je nutné podotknout, že přesnost analýzy je závislá na konkrétním nastavení CASA systému a algoritmů pro rozpoznání motilních spermií od nepohyblivých částic. Proto nelze porovnávat výsledky pro tentýž vzorek hodnocený systémy s rozličným nastavením (Colenbrander a Stout, 2011).

3.4.2 Faktory ovlivňující motilitu

Faktory ovlivňující motilitu mohou být rozličného původu. Ať se jedná o faktory fyziologické či patologické, exogenní či endogenní nebo chyby v managementu odběru a zpracování semene, je nutné jim věnovat patřičnou pozornost a pokud možno se negativním vlivům vyvarovat. Veškeré tyto faktory musí být brány v úvahu při identifikaci důvodu sníženého počtu pohyblivých spermií (asthenozoospermie) či úplné absence motility (azoospermie) v ejakulátu (Hodder a Liu, 2011).

Mezi endogenní faktory jsou řazeny například věk hřebce, sezónnost či kvalita zrání spermií, mezi exogenní pak spadají především chyby v managementu reprodukce, například kvalita ředícího či kryokonzervačního média – jeho osmolarita, pH a teplota, případně toxicita látek použitých v příliš vysokých koncentracích (Ax et al., 2000b). Kvalita pohybu spermií může být dále ovlivněna použitým lubrikantem v průběhu odběru ejakulátu, popřípadě aplikací hormonální léčby (Hodder a Liu, 2011). Buňky mohou být poničeny i změnami

teplot v průběhu mrazení či rozmrazování inseminačních dávek a to hlavně v rozmezí teplot od -15 do -60 °C (Graham, 2011).

Výsledná motilita může být ovlivněna i časovým intervalem mezi rozmrazením a hodnocením ejakulátu, jelikož spermie potřebují určitou dobu, aby se vyrovnaly se změnami osmotického tlaku po rozmrazení. Změny v objemu hlavičky spermie v průběhu tohoto vyrovnávání tlaků motilitu přechodně snižuje. Pohyblivost spermií se zvyšuje během prvních 5 – 10 minut po rozmrazení. Tento fenomén je důvodem k počáteční několika minutové rozplavbě před hodnocením ejakulátu. Následně se procento motilních spermií snižuje, jak buňky poškozené kryokonzervací postupně odumírají (Colenbrander a Stout, 2011).

Obecně lze říci, že ejakulát získaný od peripubertálních hřebců vykazuje ve srovnání s ejakuláty pohlavně dospělých hřebců sníženou motilitu, navíc byla zjištěna i nižší koncentrace a zvýšené procento morfologicky změněných spermií. Taktéž ejakulát odebraný po delší sexuální pauze často vykazuje vyšší koncentrace spermií. Spermie z tohoto prvního ejakulátu mají většinou sníženou motilitu ve srovnání s ejakuláty odebranými později, kdy je hřelec již odebírán pravidelně. Tento typicky vyšší počet spermií a snížená motilita jsou výsledkem dlouhodobějšího skladování spermií v ocasu nadvarlete a chámovodu. Za patologické faktory jsou považovány záněty varlat či šourku zvyšující lokální teplotu, čímž může být narušen normální průběh spermatogeneze. Poškození může vyústit až v degeneraci varlat (Hodder a Liu, 2011).

Výsledky motility mohou být ovlivněny taktéž samostatných hodnocením – ať už se jedná o hodnocení subjektivní pod mikroskopem či o hodnocení objektivní pomocí CASA systému (Graham, 2011).

4 MATERIÁL A METODY

ODBĚR EJAKULÁTU

Hřebci plemene starokladrubský kůň ($n = 6$) byli ustájeni a odebíráni v Equinním reprodukčním centru Pardubice – Mnětice. Pro stabilizaci extragonadálních rezerv byly provedeny 2 – 3 odběry od každého hřebce. Následně byla odebírána výhradně spermatická frakce ejakulátu za použití otevřeného typu umělé vagíny, a to 3x (pondělí – středa – pátek). Z každého odběru bylo od každého hřebce vyrobeno minimálně 3 x 0,5 ml pejety a 2 x 5 ml aluminiové makrotuby (schéma pokusu Obr. 9). Odebrané semeno bylo ihned podrobeno subjektivnímu hodnocení. Pro kryokonzervaci byly použity pouze ejakuláty o celkové motilitě $> 60 \%$.

KRYOKONZERVACE A ROZMRAZENÍ

Po odběru a analýze byla spermatická frakce předředěna a centrifugována 650 x g/15 min. Takto připravené sperma byly ředěno komerčním ředidlem GENT (Minitübe, Německo) na výslednou koncentraci 250×10^6 progresivně motilních spermií/ID. Touto suspenzí byly plněny 0,5 ml plastové pejety a 5 ml aluminiové makrotuby. Ekvilibrace semene probíhala 2 hodiny při 5 °C. Následně byly ID vloženy do polystyrenového boxu (Animal Reproduction systems, Chino CA, USA). Zde byly ponechány v horizontální poloze v parách tekutého dusíku 4 cm nad hladinou po dobu 15 minut. Poté byly ponořeny přímo do tekutého dusíku, kde byly skladovány do rozmrazení. Dávky byly rozmrazovány ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 30 – 60 s.

HODNOCENÍ MOTILITY

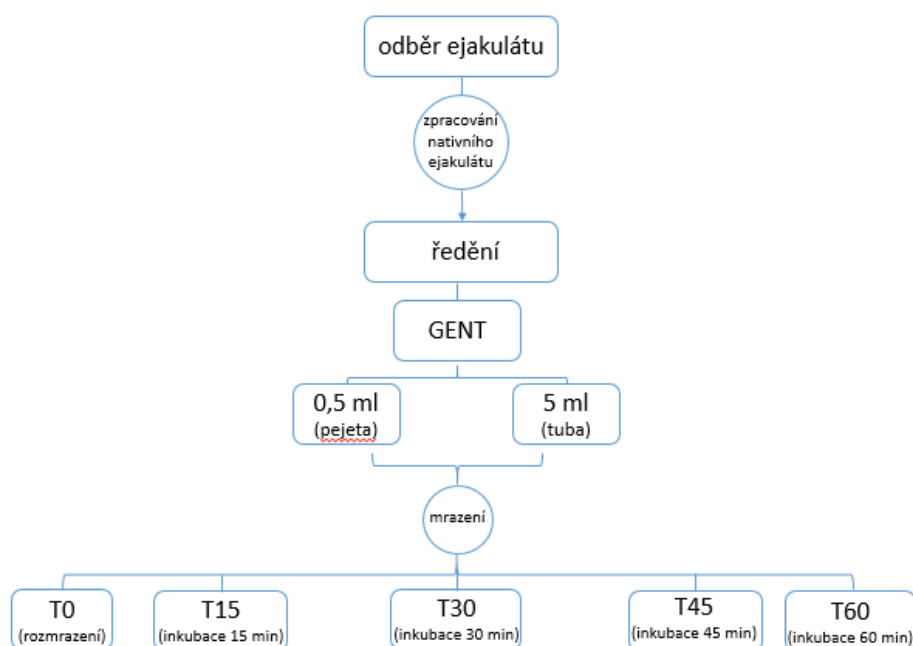
Rozmražené vzorky byly inkubovány ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Před zahájením pokusu se vzorky inkubovaly 5 min kvůli stabilizaci pohybu spermií a T0 je tedy čas 5 min po rozmrazení. Motilita byla u jednotlivých vzorků snímána v časech T0, 15, 30, 45 a 60 min. Ze vzorku byl vždy odebrán požadovaný objem ejakulátu a naředěn potřebným množstvím ředícího média SpermTALP (Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate, redestilovaná H₂O, NaCl, KCl, NaH₂PO₄·H₂O, Na laktát, CaCl₂·2H₂O, MgCl₂·6H₂O, Hepes, NaHCO₃, BSA, Na pyruvát, Gentamicin) na finální koncentraci 20×10^6 spz./ml. Motilita spermií byla hodnocena pomocí CASA systému (NIS Elements, ver. 4.30, Laboratory Imaging, Praha, ČR). Hodnocení každého vzorku bylo provedeno analýzou 41 digitalizovaných snímků, které

byly pořízeny v časové smyčce 0,66 s, kamerou s frekvencí 60 snímků/s (DMK 23UM021, Imaging Source, Brémy, Německo). Vzorek suspenze o objemu 4 μm byl přenesen na temperovanou (37 °C) počítačí komůrku Makler® counting chambre (Sefi Medical Instruments Ltd.) o hloubce 10 μm . Pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem, vybaveným výhřevným stolcem (Eclipse E600, Nikon, Tokio, Japonsko), bylo hodnoceno vždy 6 polí při stonásobném zvětšení.

Za motilní byly považovány ty spermie, které splnily podmínku $VAP > 15 \mu\text{m/s}$, za progresivně motilní ty, jejichž $VAP > 15 \mu\text{m/s}$ a $STR > 30 \%$ (Waite et al., 2008, Ponthier et al., 2014). Mezi automaticky měřené parametry motility patřily celková motilita (TMOT, %), progresivní motilita (PMOT, %), průměrná rychlost na napřímené dráze (VAP, $\mu\text{m/s}$), křivočará rychlost na skutečné dráze (VCL, $\mu\text{m/s}$), přímočará rychlost na přímé dráze (VSL, $\mu\text{m/s}$) a přímot napřímené dráhy (straightness, STR, %).

STATISTICKÉ ANALÝZY

Data byla statisticky vyhodnocena v programu Statistica (ver. 10, StatSoft, ČR). Každému statistickému testu předcházela test homogenity rozptylu a normálního rozdělení. Dle výsledků těchto testů byly vybrány konkrétní statistické metody, parametrické (studentův t – test a analýza rozptylu ANOVA) či neparametrické (Mann – Whitneyův a Kruskal – Wallisův test). Testy byly hodnoceny na hladině významnosti $P < 0,01$.



Obr. 9 Schéma pokusu

5 VÝSLEDKY

Změny celkové a progresivní motility a vybraných kinetických parametrů blíže charakterizujících motilitu spermií v nativních vzorcích ejakulátu a po rozmrazení v časech inkubace T0, 15, 30, 45 a 60 minut

Kinetické parametry blíže charakterizující motilitu nativních a rozmražených vzorků ejakulátu (TMOT, PMOT, VCL, VAP, VSL, STR) jsou zaznamenány v Tabulce 1. Hodnoty celkové (TMOT) i progresivní (PMOT) motility jsou nejvyšší v nativních vzorcích ejakulátu a po rozmrazení se v průběhu inkubace postupně snižují. Signifikantní pokles je zřetelný v hodnotách TMOT mezi nativním ejakulátem a všemi časy inkubace po rozmrazení a dále mezi časy inkubace T0 a T60 ($P < 0,01$) a u PMOT mezi nativním ejakulátem a všemi časy inkubace po rozmrazení a dále mezi časy T0 a T45 a dále T0 a T60 ($P < 0,01$). Rychlostní parametry spermií (VCL, VAP, VSL) byly nejvyšší v nativních vzorcích ejakulátu a po rozmrazení se v průběhu inkubace postupně snižovaly. Signifikantní rozdíly jsou zřetelné v poklesech křivočaré rychlosti (VCL) mezi nativním ejakulátem a všemi časy inkubace po rozmrazení a dále mezi všemi časy inkubace navzájem krom T45 a T60 ($P < 0,01$). Hodnoty se u průměrné rychlosti (VAP) a přímočaré rychlosti (VSL) signifikantně snižují vždy oproti předchozím časům inkubace i nativnímu ejakulátu: $\text{nativ} > T0 > T15 > T30 > T45 > T60$ ($P < 0,01$). Hodnota parametru STR (přímota) signifikantně kolísá mezi nativním ejakulátem a všemi časy inkubace, mezi časy T0 a T15, T0 a T45, T15 a T30, T30 a T45 ($P < 0,01$).

Tabulka 1

Změny vybraných parametrů blíže charakterizujících motilitu spermií v nativních vzorcích ejakulátu a po rozmrazení v časech inkubace T0, 15, 30, 45 a 60 minut

	TMOT (%)	PMOT (%)	VCL (μm/s)	VAP (μm/s)	VSL (μm/s)	STR (%)
Nativ	70,3 ± 3,8 ¹	53,4 ± 3,6 ¹	178,4 ± 0,7 ¹	98,1 ± 0,4 ¹	73,6 ± 0,4 ¹	72,8 ± 0,2 ¹
T0	30,0 ± 1,3 ²	24,4 ± 1,1 ²	131,7 ± 0,4 ²	73,5 ± 0,2 ²	65,8 ± 0,2 ²	87,5 ± 0,1 ²
T15	27,7 ± 1,3 ²³	22,4 ± 1,1 ²³	124,1 ± 0,4 ³	68,9 ± 0,2 ³	62,0 ± 0,2 ³	88,2 ± 0,1 ³
T30	26,9 ± 1,3 ²³	21,5 ± 1,1 ²³	121,7 ± 0,4 ⁴	66,8 ± 0,2 ⁴	59,6 ± 0,2 ⁴	87,5 ± 0,1 ²
T45	24,1 ± 1,3 ²³	18,9 ± 1,1 ³	117,4 ± 0,5 ⁵	64,9 ± 0,3 ⁵	58,1 ± 0,3 ⁵	88,2 ± 0,1 ³
T60	23,2 ± 1,3 ³	17,9 ± 1,1 ³	115,5 ± 0,4 ⁵	63,1 ± 0,3 ⁶	56,4 ± 0,3 ⁶	88,0 ± 0,1 ²³

¹²³⁴⁵⁶Hodnoty s různými indexy ve sloupcích se liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

TMOT (%) celková motilita, PMOT (%) progresivní motilita, VCL (μm/s) křivočará rychlost, VAP (μm/s) průměrná rychlost, VSL (μm/s) přímočará rychlost, STR (%) přímot

Srovnání vybraných parametrů popisujících motilitu a kinetiku spermií v jednotlivých obalech (0,5 pejety a 5 ml aluminiové makrotuby) mezi nativními vzorky ejakulátu a vzorky v čase inkubace T0 ihned po rozmrazení

Vybrané parametry blíže charakterizující motilitu rozmražených vzorků ejakulátu v jednotlivých obalech v čase inkubace T0 (TMOT, PMOT, VCL, VAP, VSL, STR) ve srovnání s parametry nativního ejakulátu jsou zaznamenány v Tabulce 2. Změny vybraných parametrů mezi jednotlivými časy inkubace po rozmrazení budou popsány v grafech dále. V čase inkubace T0 ihned po rozmrazení se hodnoty parametrů TMOT a PMOT liší v závislosti na použitém obalu. 5 ml makrotuby vykazují hodnoty lehce vyšší oproti 0,5 ml pejetám. Kinetické parametry popisující rychlosti spermií (VCL, VAP, VSL) byly v čase T0 ihned po rozmrazení signifikantně vyšší ve vzorcích mražených do 0,5 ml pejet oproti 5 ml makrotubám ($P < 0,01$). Hodnota parametru STR nabývala v čase T0 ihned po rozmrazení signifikantně vyšších hodnot ve vzorcích mražených do 5 ml makrotub ($P < 0,01$). Parametry TMOT a PMOT se signifikantně liší mezi hodnotami nativního ejakulátu a oběma hodnotami v čase T0 po rozmrazení v jednotlivých obalech ($P < 0,01$). U kinetických parametrů VCL, VAP, VSL a STR lze pozorovat signifikantní rozdíly jak mezi hodnotami nativních vzorků a oběma hodnotami v čase T0 po rozmrazení v jednotlivých obalech, tak mezi hodnotami po rozmrazení v jednotlivých obalech navzájem ($P < 0,01$).

Tabulka 2

Srovnání vybraných parametrů popisujících motilitu a kinetiku spermií v jednotlivých obalech (0,5 pejety a 5 ml makrotuby) mezi nativními vzorky ejakulátu a vzorky v čase inkubace T0 ihned po rozmrazení

	Nativ	T0	
		0,5 ml pejety	5 ml makrotuby
TMOT (%)	70,3 ± 3,8 ¹	28,9 ± 2,0 ²	31,6 ± 2,3 ²
PMOT (%)	53,4 ± 3,6 ¹	23,1 ± 1,7 ²	26,1 ± 2,0 ²
VCL (μm/s)	178,4 ± 0,7 ¹	137,0 ± 0,5 ²	119,4 ± 0,7 ³
VAP (μm/s)	98,1 ± 0,4 ¹	75,8 ± 0,3 ²	68,0 ± 0,4 ³
VSL (μm/s)	73,6 ± 0,4 ¹	66,8 ± 0,3 ²	63,4 ± 0,4 ³
STR (%)	72,8 ± 0,2 ¹	85,5 ± 0,1 ²	92,0 ± 0,2 ³

¹²³Hodnoty s různými indexy v řádcích se liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

TMOT (%) celková motilita, PMOT (%) progresivní motilita, VCL (μm/s) křivočará rychlost, VAP (μm/s) průměrná rychlost, VSL (μm/s) přímočará rychlost, STR (%) přímot

Změny vybraných parametrů motility spermií ve vzorcích ejakulátu v jednotlivých obalech (0,5 ml pejetý a 5 ml aluminiové makrotuby) po rozmrazení v časech inkubace T0 – T60

Rozdíly v hodnotách parametrů motility ve všech časech inkubace po rozmrazení mezi jednotlivými obaly jsou uvedeny v Grafech 1 – 6. Hodnoty parametrů TMOT (Graf 1) i PMOT (Graf 2) se po rozmrazení v průběhu inkubace postupně snižují. 5 ml makrotuby vykazují vyšší hodnoty ve všech časech inkubace pro parametr TMOT i PMOT.

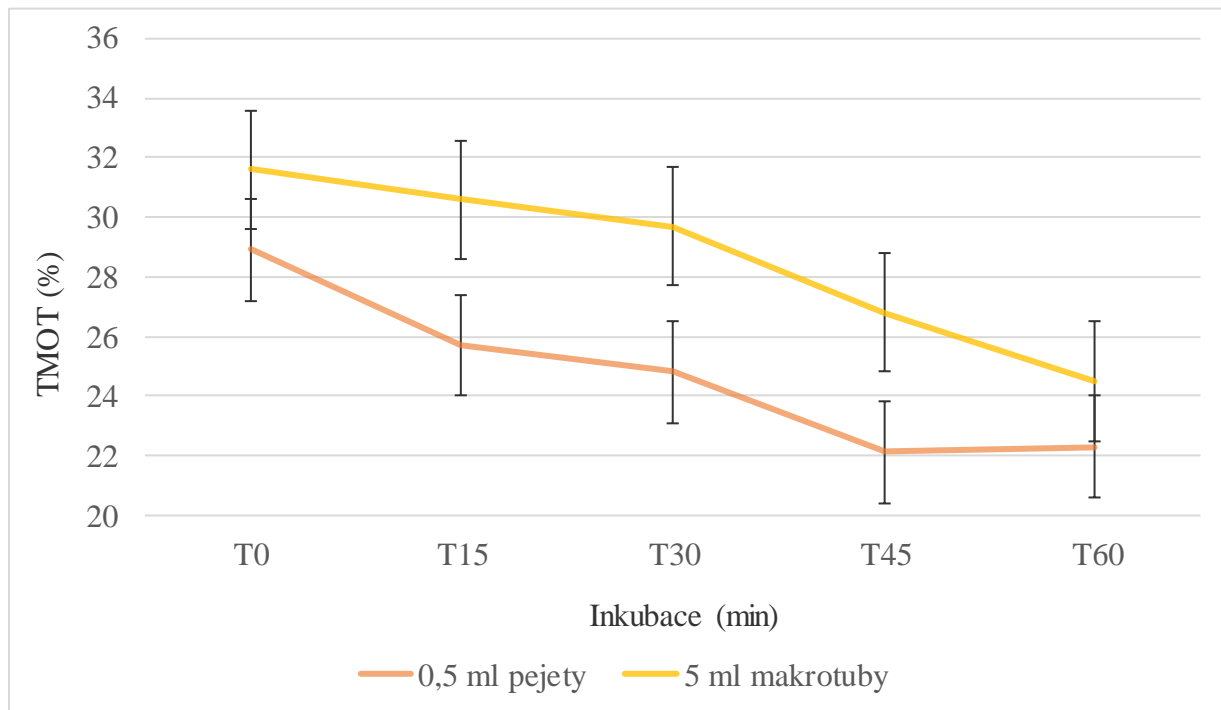
Rychlostní parametry VCL (Graf 3) a VAP (Graf 4) nabývají signifikantně vyšších hodnot ve vzorcích mražených do 0,5 ml pejetý oproti vzorkům mraženým do 5 ml makrotub a to ve všech časech inkubace po rozmrazení ($P < 0,01$). Signifikantní pokles hodnoty VCL v průběhu inkubace je zřetelný v 0,5 ml pejetých mezi všemi časy krom T45 a T60, v 5 ml makrotubách mezi všemi časy krom T0 a T15, T15 a T30 ($P < 0,01$). Signifikantní pokles VAP v průběhu inkubace je zřetelný v 0,5 ml pejetých mezi všemi časy krom T30 a T45, v 5 ml makrotubách mezi všemi časy krom T0 a T15, T15 a T30 ($P < 0,01$).

Rychlostní parametr VSL (Graf 5) nabývá signifikantně vyšších hodnot v 0,5 ml pejetých v časech T0 a T60, v časech inkubace T15, T30 a T45 není rozdíl rychlostí VSL mezi jednotlivými obaly signifikantní ($P < 0,01$). Křivky hodnot VSL v jednotlivých obalech se mezi časy T15 a T30 prolínají (vyšší hodnota parametru VSL v časech inkubace T15 a T30 u vzorků mražených do 5 ml makrotub oproti vzorkům mražených do 0,5 ml pejetý). Signifikantní pokles hodnoty VSL v průběhu inkubace je zřetelný v 0,5 ml pejetých ve všech časech krom T45 a T60, v 5 ml makrotubách krom T0 a T15, T15 a T30 ($P < 0,01$).

Parametr STR (Graf 6) nabývá signifikantně vyšších hodnot ve vzorcích mražených do 5 ml makrotub oproti vzorkům mraženým do 0,5 ml pejetý a to ve všech časech inkubace po rozmrazení ($P < 0,01$). Signifikantní změny hodnoty STR v průběhu inkubace jsou zřetelné pouze u vzorků mražených do 0,5 ml pejetý a to mezi časy T0 a T15, T45, T60, dále T15 a T45 a taktéž T30 a T45, T60 ($P < 0,01$). Zde hodnota parametru v průběhu inkubace kolísá, obecně je zřetelný mírně stoupající trend. U vzorků mražených do 5 ml makrotub není pozorováno žádné signifikantní kolísání hodnot ($P < 0,01$).

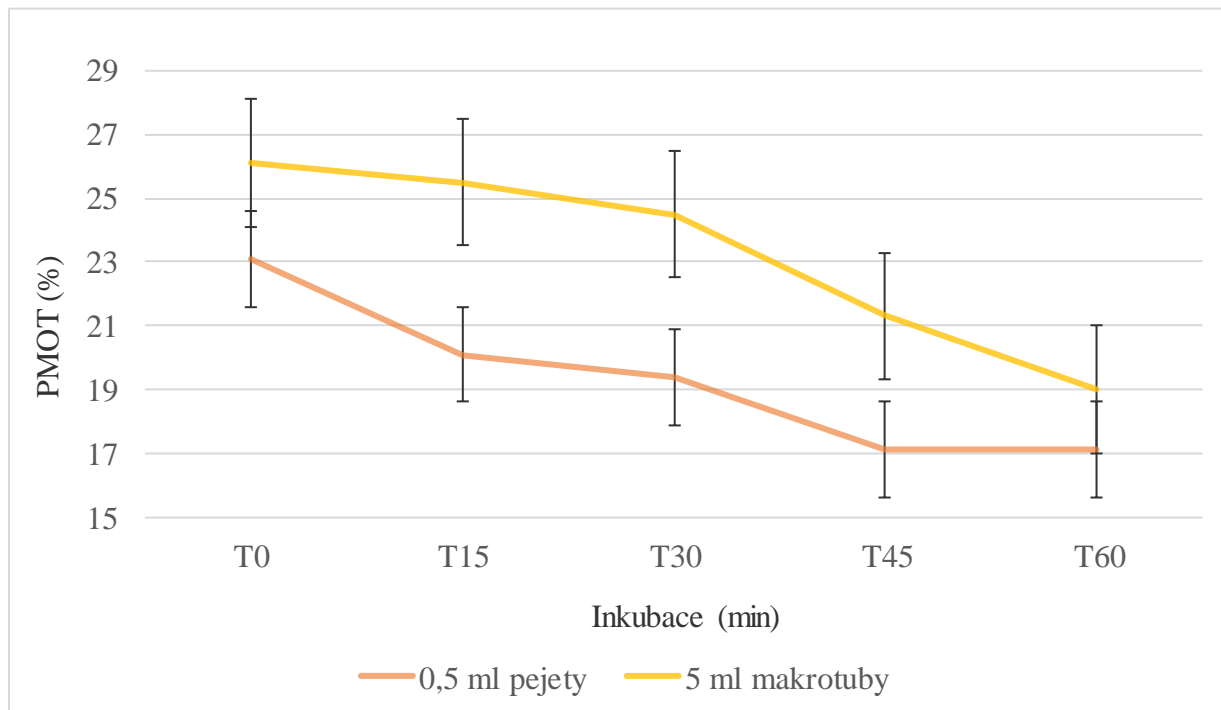
Graf 1

Změny hodnot parametru TMOT (%) v 0,5 ml pejetách a 5 ml makrotubách ve vzorcích po rozmrazení po dobu 60 minutové inkubace



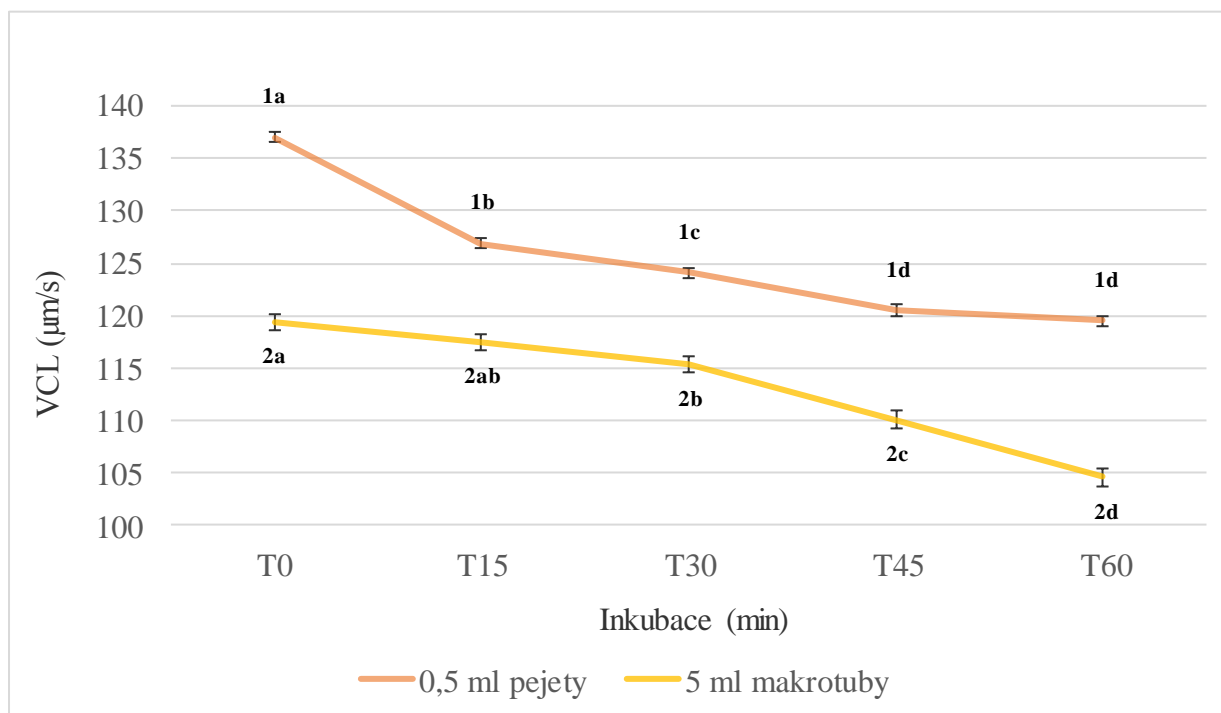
Graf 2

Změny hodnot parametru PMOT (%) v 0,5 ml pejetých a 5 ml makrotubách ve vzorcích po rozmrazení po dobu 60 minutové inkubace



Graf 3

Změny hodnot parametru VCL ($\mu\text{m/s}$) v 0,5 ml pejetých a 5 ml makrotubách ve vzorcích po rozmrazení po dobu 60 minutové inkubace

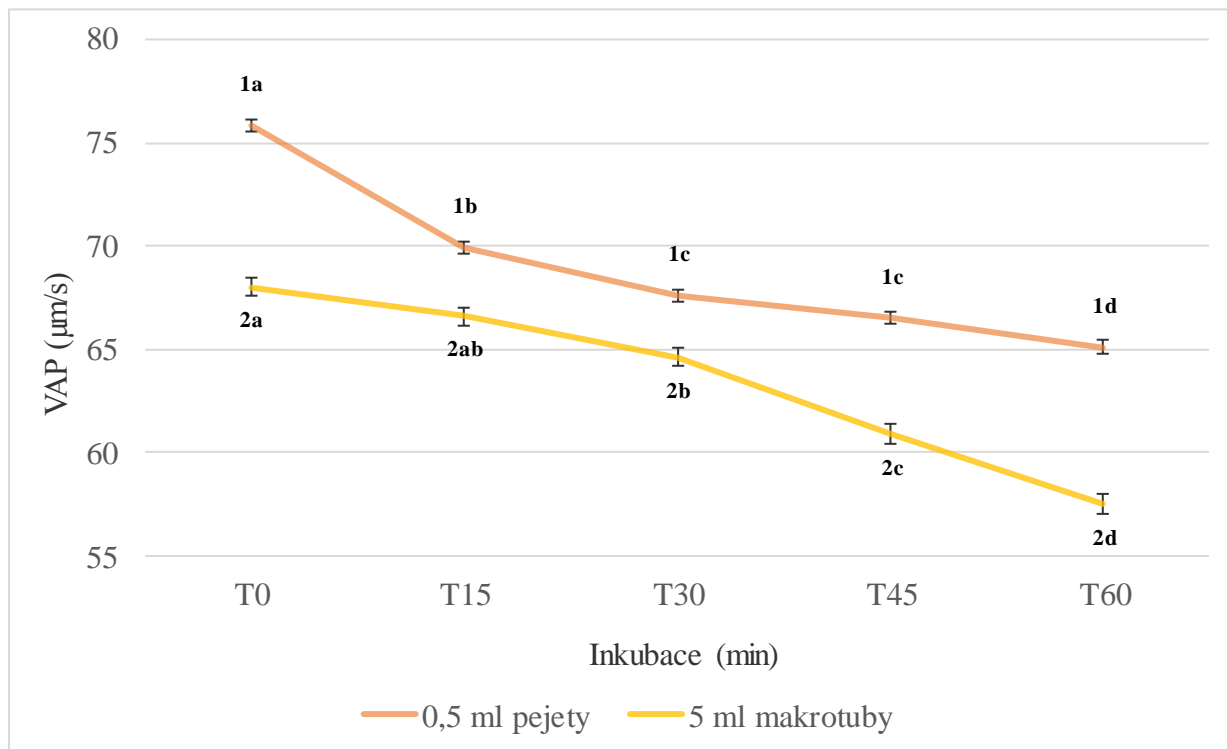


¹²Hodnoty s různými indexy mezi křivkami představujícími obaly se v jednotlivých časech inkubace liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abcd}Hodnoty s různými indexy mezi časy inkubace v rámci jednoho obalu se liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 4

Změny hodnot parametru VAP ($\mu\text{m/s}$) v 0,5 ml pejetých a 5 ml makrotubách ve vzorcích po rozmrazení po dobu 60 minutové inkubace

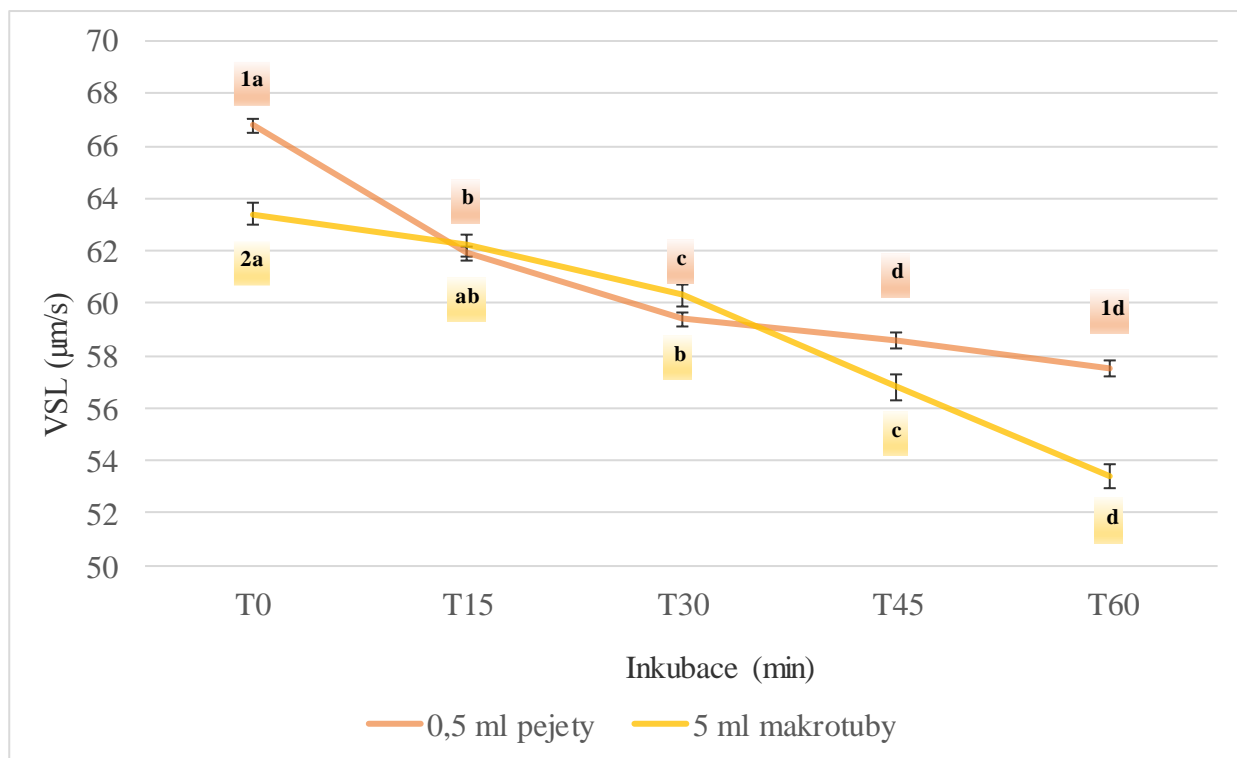


¹²Hodnoty s různými indexy mezi křivkami představujícími obaly se v jednotlivých časech inkubace liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abcd}Hodnoty s různými indexy mezi časy inkubace v rámci jednoho obalu se liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 5

Změny hodnot parametru VSL ($\mu\text{m/s}$) v 0,5 ml pejetách a 5 ml makrotubách ve vzorcích po rozmrazení po dobu 60 minutové inkubace

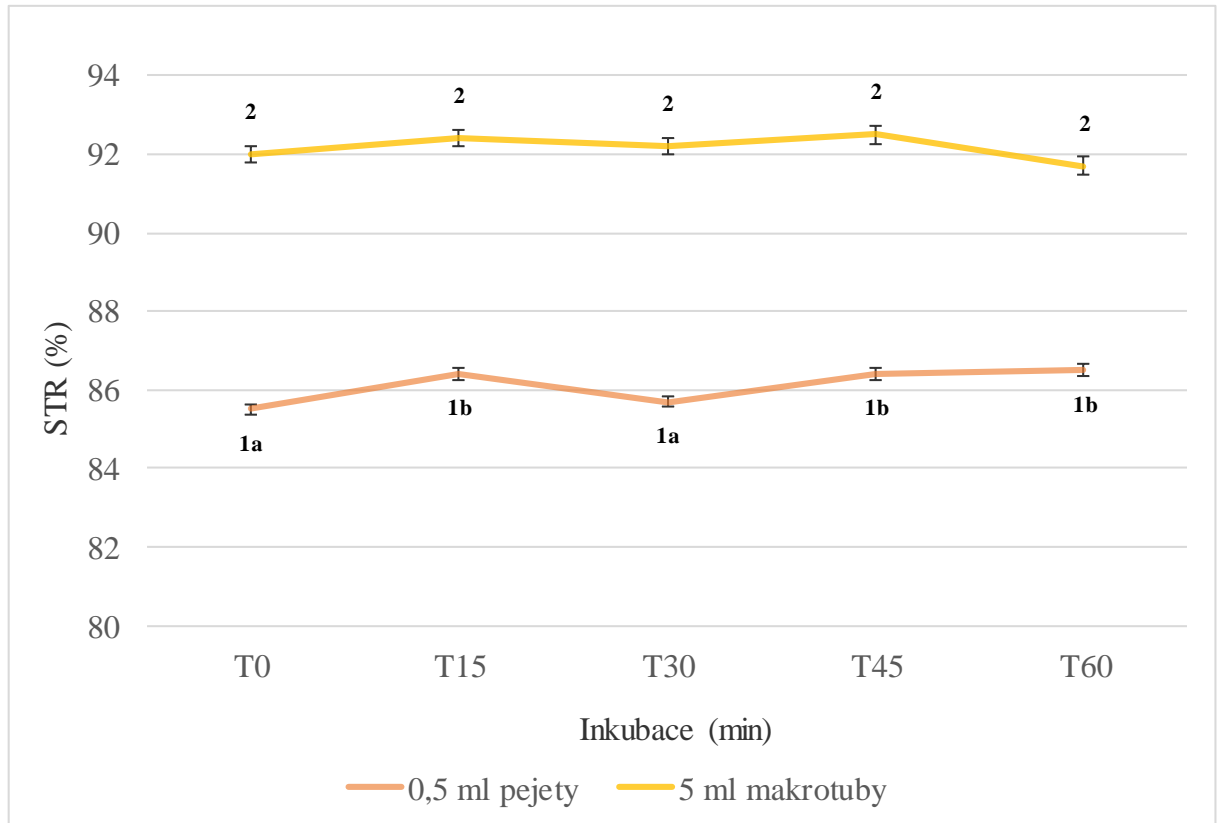


¹²Hodnoty s různými indexy mezi křivkami představujícími obaly se v jednotlivých časech inkubace liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abcd}Hodnoty s různými indexy mezi časy inkubace v rámci jednoho obalu se liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 6

Změny hodnot parametru STR (%) v 0,5 ml pejetých a 5 ml makrotubách ve vzorcích po rozmrazení po dobu 60 minutové inkubace



¹²Hodnoty s různými indexy mezi křivkami představujícími obaly se v jednotlivých časech inkubace liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{ab}Hodnoty s různými indexy mezi časy inkubace v rámci jednoho obalu se liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Individualita hřebců v čase T0 ihned po rozmrazení dle jednotlivých obalů (0,5 ml pejetý a 5 ml makrotuby)

Individualita hřebců v čase T0 ihned po rozmrazení dle použitých obalů je znázorněna pro jednotlivé parametry v Grafech 7 – 12.

Hodnoty parametru TMOT (Graf 7) a PMOT (Graf 8) se v 0,5 ml pejetých signifikantně liší mezi hřebcem Favory Albuza a všemi ostatními hřebci ($P < 0,01$) a dále mezi hřebcem Sacramoso Mantova a všemi ostatními hřebci krom Manidy ($P < 0,01$). V 5 ml makrotubách se signifikantní rozdíl objevuje pro parametr TMOT i PMOT mezi hřebci Aversa a Manida, Aversa a Sacramoso Mantova, Siglavi a Manida, Siglavi a Sacramoso Mantova, Favory Albuza a Manida, Favory Albuza a Sacramoso Mantova, Favory Albuza a Santalina ($P < 0,01$).

Pro rychlostní parametr VCL (Graf 9) nacházíme v 0,5 ml pejetých signifikantní rozdíly mezi hřebcem Favory Albuza a všemi ostatními hřebci ($P < 0,01$), dále pak mezi Siglavim a všemi hřebci krom hřebce Sacramoso Mantova ($P < 0,01$). V 5 ml makrotubách je signifikantní rozdíl zřejmý mezi hřebci Aversa a Favory Albuza, Aversa a Manida, Aversa a Siglavi, Favory Albuza a Manida, Favory Albuza a Siglavi, Manida a Santalina, Santalina a Siglavi ($P < 0,01$).

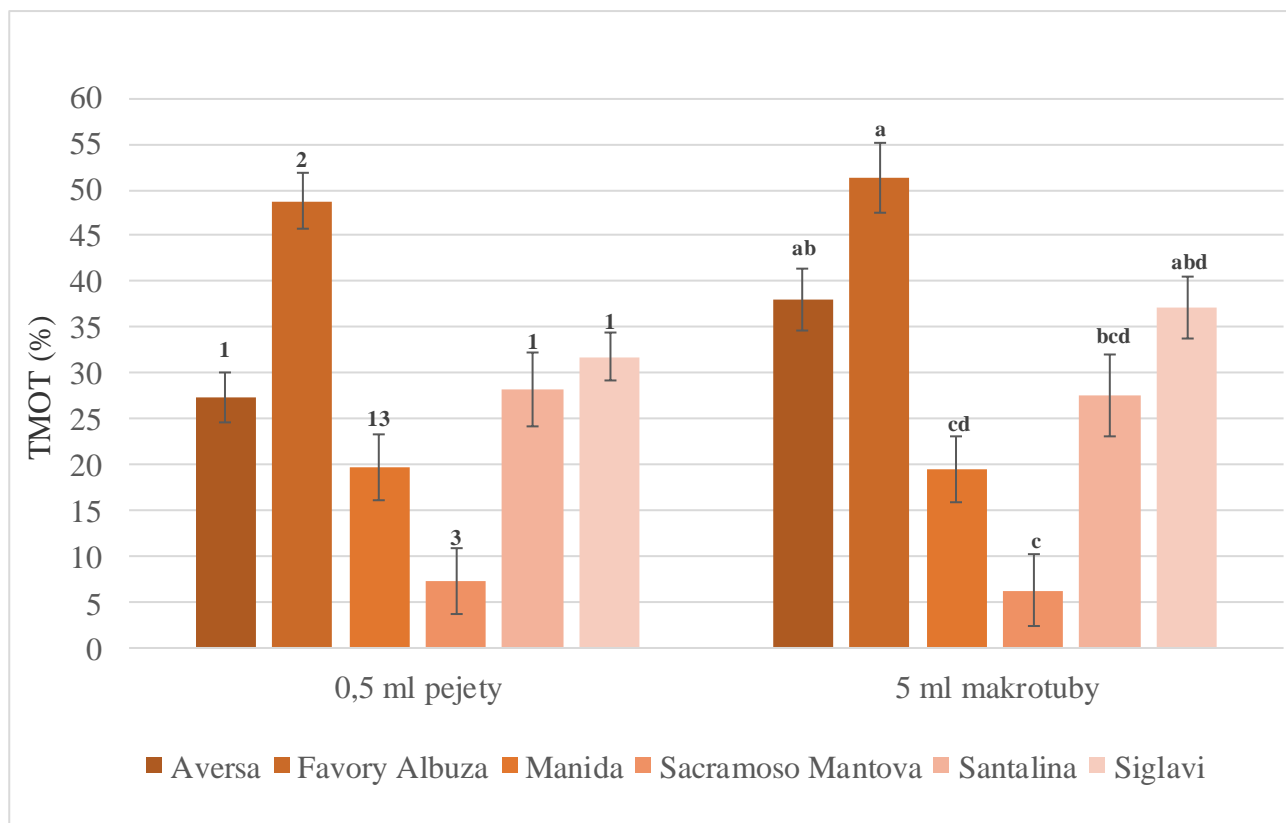
Rychlostní parametr VAP (Graf 10) se v 0,5 ml pejetých signifikantně liší mezi hřebcem Favory Albuza a všemi ostatními hřebci ($P < 0,01$), dále pak mezi hřebcem Siglavi a hřebci Aversa a Manida ($P < 0,01$). V 5 ml makrotubách je pak signifikantní rozdíl znát mezi Siglavim a všemi ostatními hřebci krom Manidy ($P < 0,01$), dále mezi hřebci Aversa a Favory Albuza, Aversa a Manida, Manida a Santalina ($P < 0,01$).

Pro rychlostní parametr VSL (Graf 11) nacházíme v 0,5 ml pejetých signifikantní rozdíly mezi hřebcem Favory Albuza a všemi ostatními hřebci krom hřebce Sacramoso Mantova ($P < 0,01$) a dále mezi hřebci Aversa a Siglavi ($P < 0,01$). V 5 ml makrotubách je signifikantní rozdíl patrný mezi hřebcem Siglavi a všemi ostatními hřebci ($P < 0,01$) a dále mezi hřebci Aversa a Favory Albuza, Aversa a Manida, Manida a Santalina ($P < 0,01$).

Parametr STR (Graf 12) se v 0,5 ml pejetých signifikantně liší mezi hřebcem Favory Albuza a všemi ostatními hřebci ($P < 0,01$) a dále mezi hřebcem Siglavi a hřebci Aversa, Manida a Santalina ($P < 0,01$) a hřebcem Manida a hřebci Aversa a Sacramoso Mantova ($P < 0,01$). V 5 ml makrotubách je signifikantní rozdíl pozorován pouze mezi hřebci Aversa a Favory Albuza ($P < 0,01$).

Graf 7

Znázornění individuality hřebců pro parametr TMOT v čase T0 ihned po rozmrazení dle jednotlivých obalů (0,5 ml a 5 ml)

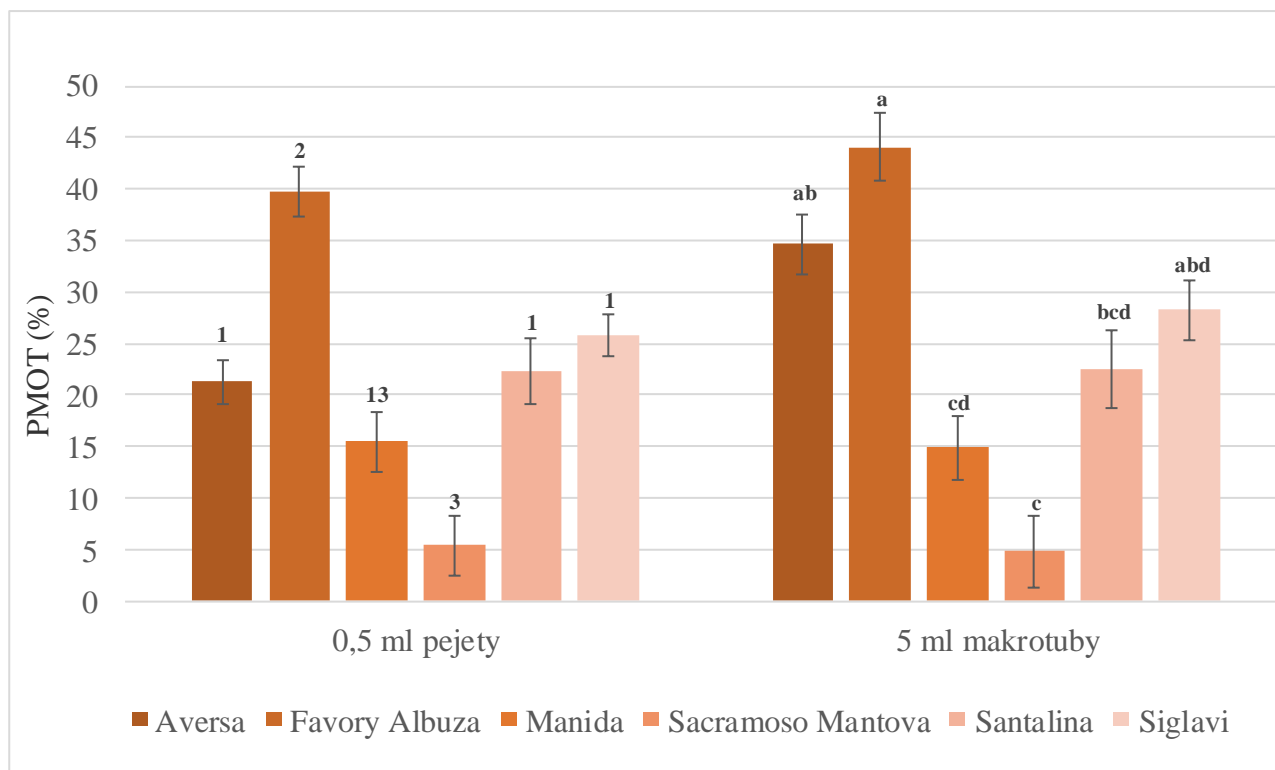


¹²³Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 0,5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abcd}Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 8

Znázornění individuality hřebců pro parametr PMOT v čase T0 ihned po rozmrazení dle jednotlivých obalů (0,5 ml a 5 ml)

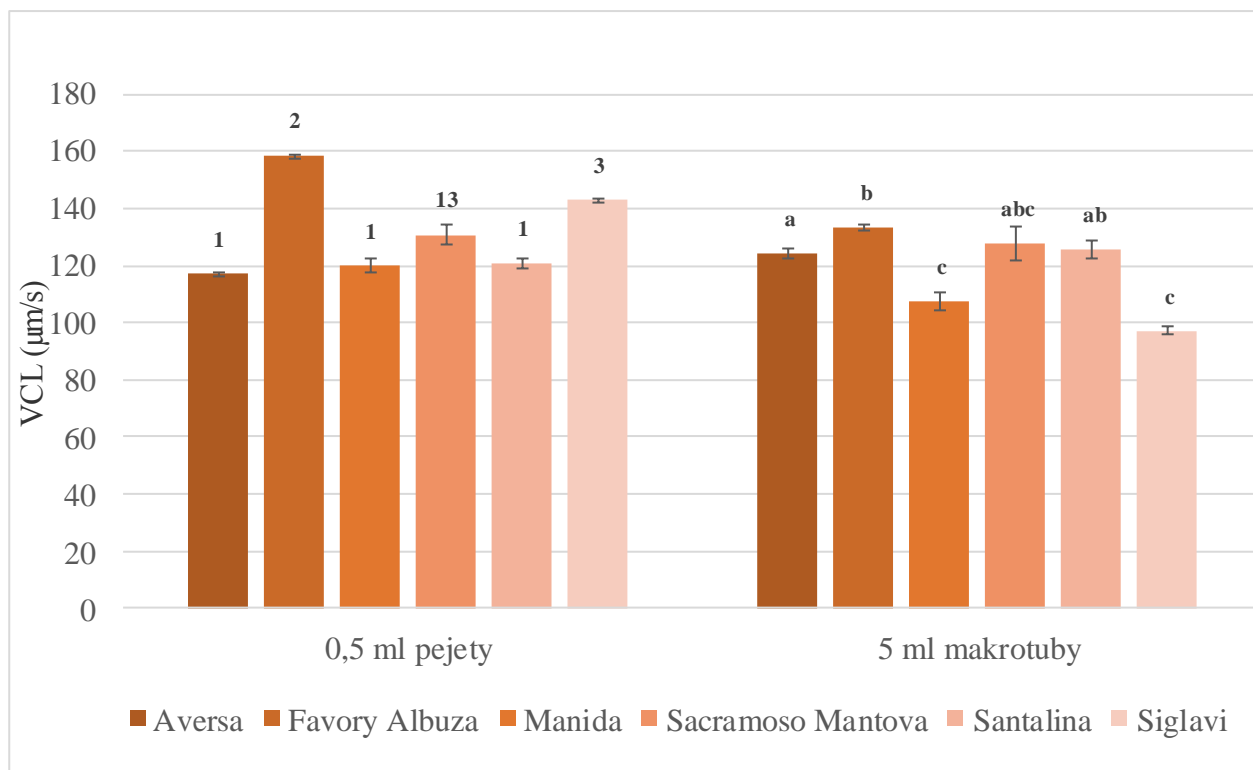


¹²³Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 0,5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abcd}Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 9

Znázornění individuality hřebců pro parametr VCL v čase T0 ihned po rozmrazení dle jednotlivých obalů (0,5 ml a 5 ml)

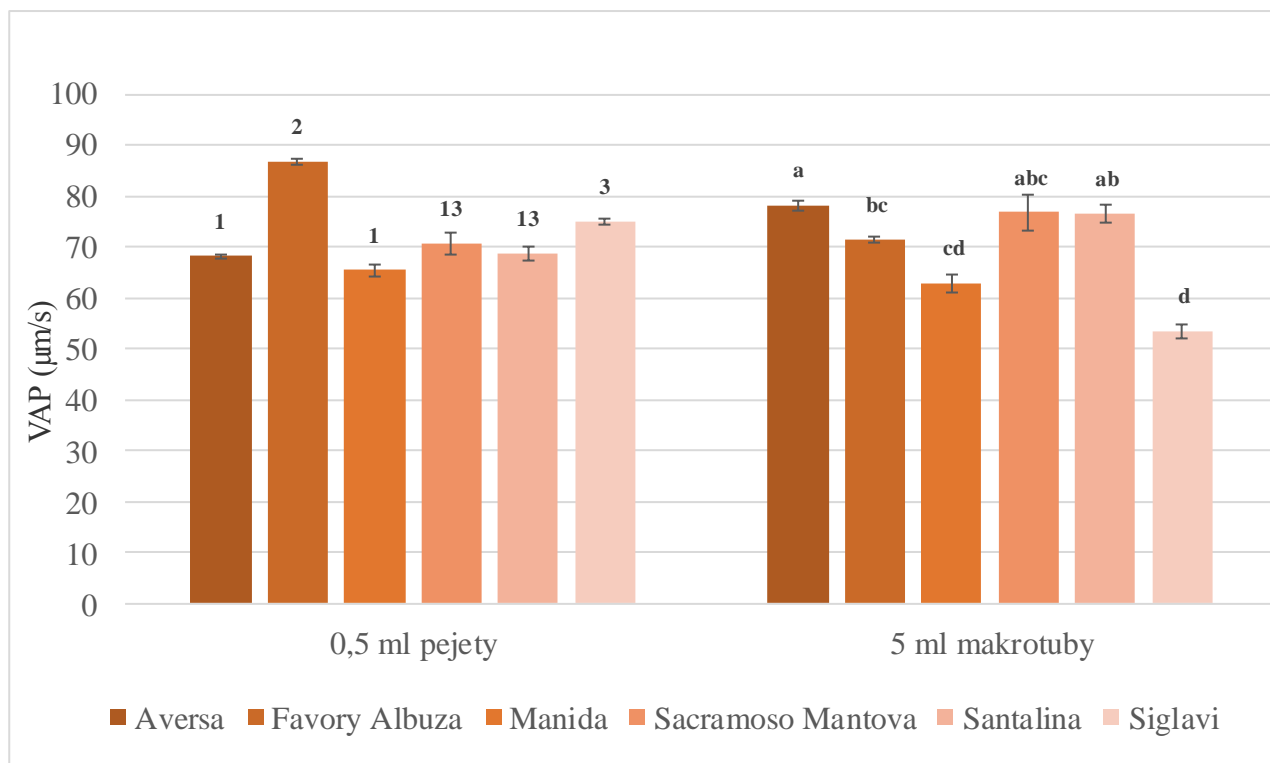


¹²³Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 0,5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abc}Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 10

Znázornění individuality hřebců pro parametr VAP v čase T0 ihned po rozmrazení dle jednotlivých obalů (0,5 ml a 5 ml)

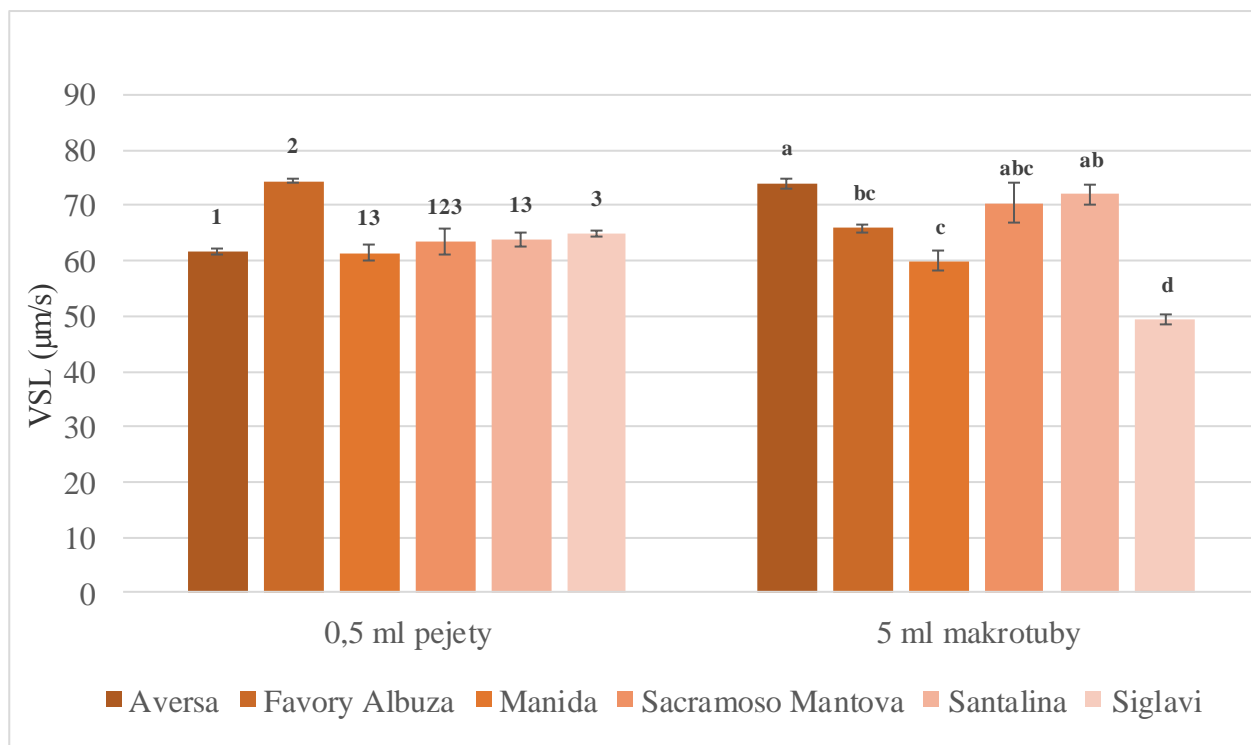


¹²³Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 0,5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abcd}Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 11

Znázornění individuality hřebců pro parametr VSL v čase T0 ihned po rozmrazení dle jednotlivých obalů (0,5 ml a 5 ml)



¹²³Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 0,5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{abcd}Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

Graf 12

Znázornění individuality hřebců pro parametr STR v čase T0 ihned po rozmrazení dle jednotlivých obalů (0,5 ml a 5 ml)



¹²³⁴⁵Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 0,5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

^{ab}Hodnoty s různými indexy se pro parametry vzorků s objemem 5 ml liší na hladině významnosti $P < 0,01$.

6 DISKUZE

Oplozovací schopnost kryokonzervovaného ejakulátu je ovlivněna mnoha faktory. Mezi nejzákladnější lze zařadit věk, plemeno a individualitu hřebce i jeho jednotlivých ejakulátů, techniku kryokonzervace semene, obal a objem ID a management reprodukce hřebce i klisny (Lorenzoni et al., 2011). Populace plemene starokladrubský kůň je málo početná, čili dochází k inbreedingu (páření blízké příbuzných jedinců). Zvyšování koeficientu inbreedingu vede k nežádoucí inbreední depresi. Ta se negativně projevuje ve spojení s reprodukcí i celkovou fitness jedinců a hrozí pokles genetické variability v rámci celého plemene (Jakubec et al., 2009).

Procentuální vyjádření celkové a progresivní motility je jedním z nejčastěji využívaných parametrů indikujících kvalitu ejakulátu a to i navzdory její nízké vypovídající hodnotě o oplozeníschopnosti konkrétního ejakulátu. Záleží také na konkrétní metodě zhodnocení motility. Subjektivní hodnocení umožňuje pouze odhadnout procentuální vyjádření celkové a progresivní motility s tendencí k nadhodnocování těchto parametrů. Jako limitující faktor se zde projevuje lidská variabilita. Takto pořízené výsledky se liší nejen mezi jednotlivými laboratořemi, ale i mezi individuálními laboranty. Naopak objektivní zhodnocení kvality ejakulátu, které je možné provést například pomocí CASA systému, je nesporně přesnější a má mnohem větší vypovídající hodnotu. Motilita sama o sobě se však ani v tomto případě nedá považovat za přesný indikátor fertility. Použitím systému CASA je možné získat mnoho dalších kinematických parametrů poskytujících přesné informace o charakteru pohybu jednotlivých spermií (Ortega – Ferrusola, 2009).

Změny vybraných parametrů motility spermií v nativních vzorcích ejakulátu a po rozmrazení v časech inkubace T0 – T60

Kryokonzervovaný ejakulát Starokladrubských hřebců vykazuje ihned po rozmrazení zhoršené hodnoty všech parametrů oproti hodnotám ejakulátu nativního. Celková i progresivní motilita a kinematické parametry spermií (VCL, VAP a VSL) se s postupující dobou inkubace snižují. Parametr STR podléhá spíše opačnému trendu a jeho hodnota se s prodlužující dobou inkubace zvyšuje, čili dochází k postupnému napřimování průměrné dráhy spermie, která se svým tvarem postupně více a více podobá přímce.

Hodnota parametru TMOT v nativním ejakulátu Starokladrubských hřebců byla nižší (70,3 %) oproti hodnotě TMOT 78,7 % v nativním ejakulátu hřebců dle autorů Lorenzoni et al. (2011). Důvodem tohoto rozdílu mezi oběma hodnotami by mohl být fakt, že Lorenzoni et al. (2011) hodnotili motilitu ejakulátu subjektivně, nikoliv objektivně CASA systémem jak tomu bylo v našem experimentu. Taktéž TMOT nabývá v našem experimentu ihned po rozmrazení nižší hodnoty (30,0 %) oproti hodnotám udávaným těmito autory (43,3 %). Tato hodnota může být taktéž ovlivněna faktem, že semeno Strokkladrubských hřebců bylo ředěno kryokonzervačním ředidlem na bázi vaječného žloutku (Gent) oproti žloutkovo – mléčnému ředidlu (INRA) použitého autory Lorenzoni et al. (2011).

Naměřené parametry motility ihned po rozmrazení uvedené v této diplomové práci (TMOT, PMOT, VCL a VSL) jsou až na PMOT nižší v porovnání s hodnotami naměřenými autory Nascimento et al. (2008), což vyplývá z odlišného nastavení CASA systému. Rozdíl v nastavení se týkal snímkové frekvence/s. Pro náš experiment byla použita kamera s FPS 60 Hz oproti 80 Hz v experimentu autorů Nascimento et al. (2008). Nastavení se taktéž lišilo minimální hodnotou pro vyřídění motilních a progresivně motilních spermií. Spermie byly v našem experimentu považovány za motilní, pokud splnily podmínku $VAP > 15 \mu\text{m/s}$ a za progresivně motilní pokud $VAP > 15 \mu\text{m/s}$ a $STR > 30 \%$. Naproti tomu autoři Nascimento et al. (2008) považují za motilní spermie pokud $VAP > 20 \mu\text{m/s}$ a progresivně motilní pokud $VAP > 70 \mu\text{m/s}$, což by mohlo být hlavním důvodem naměření vyšších hodnot kinematických parametrů. Rozdíl může být způsoben také nižší koncentrací ID v našem experimentu (20×10^6 spz./ml) oproti koncentraci 100×10^6 spz./ml (Nascimento et al., 2008).

Porovnání vybraných parametrů motility v jednotlivých obalech (0,5 pejety a 5 ml makrotuby) mezi nativními vzorky ejakulátu a vzorky ihned po rozmrazení (T0)

Existuje několik studií týkajících se kvality ejakulátu hřebců kryokonzervovaného do ID různých objemů a obalů. V současnosti je drtivá většina ejakulátu hřebců kryokonzervovaná v 0,5 ml pejetách (Saragusty et al., 2007). Nízkoobjemové pejety však nejsou jedinou alternativou jak dlouhodobě uchovat mražený ejakulát hřebců. Bylo popsáno mnoho kryokonzervačních protokolů, které se zabývají různými obaly a objemy ID (Nascimento et al., 2008) a nabízí se tedy mnoho variant ID, do nichž je možné ejakulát zamrazit. Například autoři Nascimento et al. (2008) porovnávali kvalitu kryokonzervovaného ejakulátu hřebců v 0,25 ml a 0,5 ml pejetách ihned po rozmrazení. Objem pejety však téměř

neměl vliv na parametry motility, pouze parametr VCL byl signifikantně vyšší v 0,5 ml pejetách. Taktéž autoři Maziero et al. (2013) porovnávali kvalitu ejakulátu v těchto obalech ihned po rozmrazení. Došli však k závěru, že parametry motility po rozmrazení jsou signifikantně vyšší v 0,5 ml pejetách oproti hodnotám v 0,25 ml pejetách.

Dále je možné mrazit ejakulát hřebců do vysokoobjemových dávek (2 ml kryotuby, 2,5 ml pejety, 5 ml pejety, 12 ml skleněné tuby apod.). Mezi základní výhody mrazení ejakulátu hřebců do ID s větším objemem patří například jednodušší manipulace s dávkou, nižší poškození buněk v průběhu kryokonzervace i rozmrazování, nižší počet ID potřebných pro inseminaci a tedy i větší homogenita celé ID apod. (Salazar et al., 2001). Jelikož jsou výhody mrazení semene do obalů s většími objemy nesporné, náš experiment byl zaměřen na kryokonzervaci ejakulátu do 5 ml aluminiových tub. Výsledky kvality ejakulátu byly po rozmrazení hodnoceny objektivně a porovnány s hodnotami ejakulátu kryokonzervovaného v 0,5 ml pejetách. O výsledcích mrazení ejakulátu do vysokoobjemových dávek existují pouze omezené informace, o kvalitě ejakulátu hřebců kryokonzervovaného v 5 ml aluminiových makrotubách informace chybí.

Při porovnání výsledků parametrů motility nativního ejakulátu a ejakulátu ihned po rozmrazení v závislosti na obalu (0,5 ml pejety a 5 ml makrotuby) nebyla nalezena 100% shoda mezi všemi parametry. Je zajímavé, že hodnoty TMOT a PMOT byly ihned po rozmrazení v čase inkubace T0 vyšší v 5 ml makrotubách (TMOT 31,6 %, PMOT 26,1 %) oproti hodnotám těchto parametrů v 0,5 ml pejetách (TMOT 28,9 %, PMOT 23,1 %), nikoli však průkazně. Mohlo by se tedy na první pohled zdát, že je lepší mrazit ejakulát hřebců do 5 ml makrotub. V případě zaměření se na přesnější vyjádření pohybu spermií však bylo zjištěno, že kinematické parametry VCL, VAP, VSL a STR vykazují v čase T0 ihned po rozmrazení signifikantně lepší výsledky v 0,5 ml pejetách oproti 5 ml makrotubám. Po podrobnějším zkoumání výsledků je tedy zřejmé, že kryokonzervovaný ejakulát vykazuje ihned po rozmrazení lepší výsledky v 0,5 ml pejetách.

Lorenzoni et al. (2011) porovnávali TMOT ejakulátu kryokonzervovaného v 0,5 ml pejetách a 2 ml kryotubách. Ač se jedná o jiný typ vysokoobjemové ID, autoři došli ke stejnému závěru. TMOT byla mírně vyšší ve 2 ml kryotubách (41,9 %) oproti 0,5 ml pejetám (40 %), opět nesignifikantně. V této studii byla však motilita hodnocena subjektivně pod mikroskopem a autoři se dále nezabývali dalšími parametry motility. Subjektivně byla hodnocena i PMOT autory Saragusty et al. (2007), kteří se zabývali kryokonzervací ejakulátu hřebců do 0,5 ml pejet a 12 ml skleněných kryotub. PMOT byla v čase inkubace T0 ihned

po rozmrazení vyšší ve vysokoobjemových ID, tedy ve 12 ml kryotubách (50 %) oproti 0,5 ml pejetám (37 %).

Heitland et al. (1996) se zaměřili nejen na základní parametry TMOT a PMOT, ale taktéž na kinematický parametr VCL a to v 0,5 ml a 2,5 ml pejetách. Parametry byly hodnoceny v čase T0 ihned po rozmrazení pomocí systému CASA a vyšší byly prokazatelně v 0,5 ml pejetách (TMOT 45 %, PMOT 38 %, VCL 109 $\mu\text{m/s}$) oproti 2,5 ml pejetám (TMOT 40 %, PMOT 31 %, VCL 99 $\mu\text{m/s}$). Hodnoty parametrů z experimentu autorů Heitland et al. (1996) v 0,5 ml pejetách se neshodují s našimi hodnotami naměřenými v 0,5 ml pejetách. Důvodem by mohlo být rozdílné nastavení CASA systému, jelikož Heitland et al. (1996) použili nižší snímkovou frekvenci/s (30 Hz).

Změny vybraných parametrů motility v 0,5 ml pejetách a 5 ml aluminiových makrotubách v časech inkubace T0 – T60 po rozmrazení

Hodnoty parametrů motility (TMOT, PMOT, VCL, VAP, VSL, STR) se v průběhu inkubace postupně zhoršují. Tento klesající trend je znatelný v 0,5 ml pejetách i 5 ml makrotubách. Parametry TMOT a PMOT dosahovaly vyšších hodnot v 5 ml tubách a to v průběhu celé doby inkubace T0 – T60. Rozdíly oproti hodnotám v 0,5 ml pejetách však nejsou signifikantní. Kinematické parametry motility VCL, VAP a VSL byly po celou dobu inkubace signifikantně vyšší ve vzorcích mražených do 0,5 ml pejet, taktéž parametr STR vykazoval signifikantně lepší hodnoty v 0,5 ml pejetách.

TMOT v 5 ml tubách klesla v průběhu inkubace o 7,1 %, v 0,5 ml pejetách o 6,6 %, PMOT klesla v 5 ml tubách o 7,1 %, v 0,5 ml pejetách o 6 %. Clulow et al. (2008) se taktéž zabývali změnami TMOT a PMOT v průběhu inkubace ve vzorcích ejakulátu kryokonzervovaných do 0,5 ml a 0,25 ml pejet. Motilita byla hodnocena ihned po rozmrazení a následně v intervalu hodiny v průběhu příštích tří hodin. Klesající trend byl zřejmý, i když byla motilita hodnocena pouze subjektivně pod mikroskopem, nikoliv CASA systémem. Pravděpodobně díky tomuto Clulow et al. (2008) prezentují výsledky motility vyšší ihned po rozmrazení i po hodinové inkubaci. Kuisma et al. (2006) hodnotili změnu parametru PMOT v průběhu inkubace v 0,5 ml, 2,5 ml a 5 ml pejetách. PMOT byla hodnocena ihned po rozmrazení a následně v průběhu příštích tří hodin, vždy však pouze subjektivně. Během postupující doby inkubace vykazoval parametr PMOT taktéž klesající trend.

Individualita hřebců v 0,5 ml pejetách a 5 ml aluminiových makrotubách v čase inkubace T0

Úspěch kryokonzervace ejakulátu hřebců nezáleží pouze na věku či plemeni hřebce, ale taktéž na samotné individualitě hřebce i každého jeho ejakulátu (Loomis a Graham, 2008). Sieme (2011) uvádí, že dle procentuální PMOT nasnímané po rozmrazení je možné hřebce rozdělit na dobře či hůře mrazitelné. Odhadem asi 20 % hřebců produkuje ejakulát s dobrou mrazitelností (PMOT > 40 %), 60 % s přijatelnou (PMOT 20 – 40 %) a 20 % s nedostatečnou (PMOT < 20 %). Dle autorů Loomis a Graham (2008) jsou pro kryokonzervaci vhodné hřebci, jejichž minimálně čtvrtina zamrazených ejakulátů vykazuje po rozmrazení PMOT \geq 30 % i po 30 minutové inkubaci při 37 °C.

Tato individualita se projevila i mezi ejakuláty Starokladrubských hřebců. Nejlepší parametry ejakulátu vykazoval hřelec Favory Albuza a to v 0,5 ml pejetách i 5 ml makrotubách, nejhůře se naopak projevily ejakuláty hřebce Sacramoso Mantova. Kolísání mezi jednotlivými parametry a hřebci bylo znatelné v čase inkubace T0 především v hodnotách parametrů TMOT (0,5 ml pejety 7,2 – 48,8 %, 5 ml tuby 6,3 – 51,3 %) a PMOT (0,5 ml pejety 5,4 – 39,8 %, 5 ml tuby 4,8 – 44,1 %). Kolísání v rámci kinematických parametrů VCL, VAP, VSL a STR nebylo tak markantní.

Lorenzoni et al. (2011) se zabývali individualitou ejakulátu hřebců kryokonzervovaného do 0,5 ml pejet a 2 ml kryotub. Hodnocena byla TMOT a to pouze subjektivně, proto jsou zde hodnoty mírně vyšší. TMOT kolísala v 0,5 ml pejetách mezi hodnotami 28,3 – 55 % a ve 2 ml kryotubách mezi hodnotami 30 – 55,6 %. Taktéž Clulow et al. (2008), kteří hodnotili kvalitu ejakulátu kryokonzervovaného do 0,25 ml a 5 ml pejet, zmiňují značnou variabilitu mezi ejakuláty hřebců a to nejen v parametrech TMOT a PMOT, ale i z hlediska morfologických defektů spermií.

Rozmezí naměřených hodnot kinematických parametrů mezi ejakuláty jednotlivých Starokladrubských hřebců kryokonzervovaných v 0,5 ml pejetách je značné (VCL 116,9 – 158,2 $\mu\text{m/s}$, VAP 65,4 – 86,7 $\mu\text{m/s}$, VSL 61,5 – 74,5 $\mu\text{m/s}$). Ortega – Ferrusola et al. (2009) hodnotili kinematické parametry ejakulátu kryokonzervovaného v 0,5 ml pejetách ihned po rozmrazení také pomocí CASA systému. Naměřené nižší hodnoty všech parametrů (VCL 40,8 – 62,1 $\mu\text{m/s}$, VAP 20,7 – 36,8 $\mu\text{m/s}$, VSL 14,7 – 29,5 $\mu\text{m/s}$) je možné vysvětlit rozdílným nastavením CASA systému a použité kamery, centrifugací odebraného ejakulátu či vyšší koncentrací vzorků ejakulátu při snímání motility spermií.

Navzdory názorům, že ejakulát hřebců kryokonzervovaný do vysokoobjemových ID dosahuje po rozmrazení lepších vlastností, vykazoval kryokonzervovaný ejakulát Starokladrubských hřebců, po objektivním zhodnocení motility jako takové i jejích kinematických parametrů, lepší hodnoty v 0,5 ml pejetách oproti 5 ml aluminiovým makrotubám.

Motilita a její kinematické parametry by měly být ve studiích zabývajících se ovlivněním kvality ejakulátu hodnoceny ideálně objektivně pomocí CASA systému.

7 ZÁVĚR

V závislosti na našich objektivně naměřených výsledcích motility spermií vyšlo najevo, že ejakulát Starokladrubských hřebců je lepší kryokonzervovat do 0,5 ml pejet než do 5 ml aluminiových makrotub. Tedy hypotéza, že hřebčí ejakulát kryokonzervovaný do 0,5 ml pejet vykazuje kvalitnější vlastnosti v porovnání s kryokonzervací ejakulátu do 5 ml aluminiových tub, byla potvrzena.

Nativní vzorky ejakulátu vykazovaly lepší hodnoty než ejakulát po rozmrazení a to ve všech parametrech. S prodlužující se dobou inkubace se hodnoty všech parametrů postupně zhoršovaly. Celková a progresivní motilita stanovená jak ihned po rozmrazení, tak v průběhu hodinové inkubace nevykazovala mezi zvolenými typy obalů rozdíly, ovšem v 5 ml makrotubách bylo dosaženo vyšších hodnot motility. Naopak kinematické parametry motility spermií dosahovaly obecně signifikantně vyšších hodnot v 0,5 ml pejetách. Po zaměření se na kinematické parametry přesněji charakterizující pohyb spermií se tedy ukázalo, že ejakulát kryokonzervovaný v 0,5 ml pejetách vykazuje po rozmrazení lepší výsledky než ejakulát v 5 ml tubách.

Individuální schopnost tolerance procesu kryokonzervace a rozmrazování se projevila i mezi ejakuláty Starokladrubských hřebců. Kolísání mezi jednotlivými parametry a hřebci bylo ihned po rozmrazení znatelné především v hodnotách celkové a progresivní motility, kolísání v rámci kinematických parametrů motility spermií nebylo tak markantní. Úspěch kryokonzervace ejakulátu hřebců nezáleží tedy pouze na věku či plemeni hřebce, ale také na samotné individualitě hřebce i každého jeho ejakulátu.

Správně vyladěný proces kryokonzervace může zlepšit oblast umělé inseminace. To by mohlo vést k využívání genotypově i fenotypově zajímavých jedinců v plemenitbě, u kterých je nutné klasickou metodu kryokonzervace modifikovat.

8 SEZNAM LITERATURY

Amann, R. P. 2011a. Functional Anatomy of the Adult Male. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 867 – 880. ISBN: 9780813819716.

Amann, R. P. 2011b. Physiology and Endocrinology. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 881 – 908. ISBN: 9780813819716.

Amann, R. P., Graham, J. K. 2011. Spermatozoal Function. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 1053 – 1084. ISBN: 9780813819716.

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

Ax, R. L., Dally, M. R., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C. C., Varner, D. D., Hafez, B., Bellin, M. E. 2000a. Artificial Insemination. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 376 – 389. ISBN: 0683305778.

Ax, R. L., Dally, M. R., Didion, B. A., Lenz, R. W., Love, C. C., Varner, D. D., Hafez, B., Bellin, M. E. 2000b. Semen Evaluation. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 365 – 375. ISBN: 0683305778.

Ball, B. A. 2014. Applied Andrology in Horses. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (eds.). Animal Andrology – Theories and Applications. CAB International. UK. 254 – 296. ISBN: 9781780643168.

Baumber – Skaife, J. 2011. Evaluation of Semen. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 1278 – 1291. ISBN: 9780813819716.

Brinsko, S. P. 2011. Semen Collection Techniques and Insemination Procedures. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 1268 – 1277. ISBN: 9780813819716.

Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, Ch. C., Hinrichs, K., Hartman, D. 2011. Manual of equine reproduction. 3rd. ed. Mosby Elsevier. Missouri. p. 325. ISBN: 9780323064828.

Burns, T. 2007. The Epididymis. In: Samper, J. C., Pycock, J. F., McKinnon, A. O. (eds.). Current Therapy in Equine Reproduction. Saunders – Elsevier. USA. 171 – 173. ISBN: 9780721602523.

Clulow, J. R., Mansfield, L. J., Morris, L. H. A., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science. 108 (3 – 4). 298 – 308.

Colenbrander, B., Stout, T. A. E. 2011. Techniques for Evaluating Frozen Semen. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 2994 – 3004. ISBN: 9780813819716.

Curry, M. R.. 2007. Cryopreservation of Mammalian Semen. In: Day, J. G., Stacey, G. N. (eds.). Methods in Molecular Biology, vol. 368: Cryopreservation and Freeze – Drying Protocols. 2nd ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 303 – 311. ISBN: 9781597453622.

Foote, R. H. 1978. Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bull, rams, boars and stallions. Journal of Animal Science. 47 (Suppl 2). 1 – 11.

Gadella, B. M. 2014. Sperm Preparation for Fertilization. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (eds.). Animal Andrology – Theories and Applications. CAB International. UK/USA. 57 – 75. ISBN: 9781780643168.

- Garner, D. L., Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 96 – 109. ISBN: 0683305778.
- Graham, J. K. 2011. Principles of Cryopreservation. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 2959 – 2963. ISBN: 9780813819716.
- Green, J. E., FASTER, K., Draper, D., Morris, G. J., Grout, B. W. 2006. Field preservation of large volumes of equine semen under field conditions: potential for genetic conservation. *Cryobiology*. 53 (3). 378.
- Hafez, E. S. E. 2000. Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 431 – 442. ISBN: 0683305778.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. Horses. In: Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 192 – 217. ISBN: 0683305778.
- Hameed, S., Jayasena, C. N., Dhillon, W. S. 2011. Kisspeptin and fertility. *Journal of Endocrinology*. 208 (2011). 97 – 105.
- Heitland, A. V., Jasko, D. J., Squires, E. L., Graham, J. K., Pickett, B. W., Hamilton, C. 1996. Factors affecting motion characteristics of frozen – thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*. 28 (1). 47 – 53.
- Hodder, A. D. J., Liu, I. K. M. 2011. Spermatozoal Motility. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 1292 – 1296. ISBN: 9780813819716.
- Jakubec, V., Vostrý, L., Schlote, W., Majzlík, I., Mach, K. 2009. Selection in the genetic resource: genetic variation of the linear described type traits in the Old Kladrub horse. *Archiv Tierzucht*. 52 (4). 343 – 355.

- Johnson, L., Griffin, C. E., Martin, M. T. 2011. Spermatogenesis. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 1026 - 1052. ISBN: 9780813819716.
- Katila, T. 2001. In Vitro Evaluation of Frozen – Thawed Stallion Semen: A Review. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 42 (2). 199 – 217.
- Katz, D. F., Davis, R. O., Delandmeter, B. A., Overstreet, J. W. 1985. Real – time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. *Computer Methods Programs Biomed*. 21 (3). 173 – 182.
- Kozink, D. M., Rubio, C., Pinto, C. R. 2006. Cryopreservation of stallion spermatozoa in polypropilene cryovial vials. *Animal Reproduction Science*. 94 (1 – 4). 96 – 98.
- Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E., Katila, T. 2006. Fertility of frozen – thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 48:14.
- Loomis, R. P., Clark, J. S. 1998. Motion characteristics of frozen – thawed equine spermatozoa packed in 0,5 ml straws in various concentration. Society for Theriogenology. Proceedings for annual Meeting, Baltimore. p. 142.
- Loomis, P. R., Graham, J. K. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*. 105 (1 – 2). 119 – 128.
- Lorenzoni, S. L. G., Arruda, N. S., Rodrigues, J. L. 2011. Cryopreservation of equine semen loaded in cryovials. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39 (2): 962.
- Lorton, S. P. 2014. Evaluation of Semen in the Andrology Laboratory. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (eds.). *Animal Andrology – Theories and Applications*. CAB International. UK. 100 – 135. ISBN: 9781780643168.

- Maziero, R. R. D., Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Hartwig, F. P., Lisboa, F. P., Martin, I., Papa, F. O. 2013. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33 (3). 165 – 168.
- Merkt, H., Klug, E., Krause, D., Bader, H. 1975. Results of long – term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *Journal of Reproduction and Fertility*. 23 (Suppl.). 105 – 106.
- Morel, M. C. G. D. 2003. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 2nd ed. CAB International. UK/USA. p. 374. ISBN: 0851996434.
- Najjar, A., Said, S. B., Chetoui, C., Ezzaouia, M., Mrad, M. B. 2013. Factors influencing the sperm motility and viability parameters of post – thawed semen of tunisian arab stallions. *Journal of Animal Science Advances*. 3 (4). 187 – 192.
- Nascimento, J., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Alonso, M. A., Celeghini, E. C. C., Arruda, R. P. 2008. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 28 (6). 351 – 358.
- Ortega – Ferrusola, C., García, B. M., Rama, V. S., Gallardo – Bolaños, J. M., González – Fernández, L., Tapia, J. A., Rodríguez – Martínez, H., Peña, F. J. 2009. Identification of sperm subpopulation in stallion ejaculates: Changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (3). 419 – 423.
- Parkinson, T. 2001a. Artificial insemination. In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (eds.). *Arthur’s Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. Saunders – Elsevier. USA. 751 – 780. ISBN: 9780702025563.
- Parkinson, T. 2001b. Fertility and infertility in male animals. In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (eds.). *Arthur’s Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. Saunders – Elsevier. USA. 695 – 750. ISBN: 9780702025563.

- Parkinson, T. 2001c. Reproduction in Male Animals. In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (eds.). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. Saunders – Elsevier. USA. 673 – 694. ISBN: 9780702025563.
- Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164. 666.
- Ponthier, J., Franck, T., Parrilla – Hernandez, S., Niesten, A., de la Rebiere, G., Serteyen, D., Deleuze, S. 2014. Concentration, activity and biochemical characterization of myeloperoxidase in fresh and post – thaw equine semen and their implication of freezability. *Reproduction in Domestic Animals*. 49 (2). 285 – 291.
- Quintero – Moreno, A., Miró, J., Rigau, A. T., Rodríguez – Gil, J. E. 2003. Identification of sperm subpopulation with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59 (9). 1973 – 1990.
- Roser, J. F. 2008. Regulation of testicular function in stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science*. 107 (2008). 179 – 196.
- Roser, J. F. 2011. Endocrine – Paracrine – Autocrine Regulation of Reproductive Function in the Stallion. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 996 – 1014. ISBN: 9780813819716.
- Samper, J. C., Morris, C. A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 49 (5). 895 – 903.
- Saragusty, J., Gacitua, H., Pettit, M. T., Arav, A. 2007. Directional Freezing of Equine Semen in Large Volumes. *Reproduction in domestic Animals*. 42 (6). 610 – 615.
- Sieme, H., Bonk, A., Hamann, H., Klug, E., Katila, T. 2004. Effects of different insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*. 62 (5). 915 – 928.

Sieme, H. 2011. Freezing Semen. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 2972 – 2982. ISBN: 9780813819716.

Tischner, M. 1979. Evaluation of deep – frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 27. 53 – 59.

Varner, D. D., Johnson, L. 2011. From a Sperm's Eye view: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 909 – 990. ISBN: 9780813819716.

Verstegen, J., Iguer – Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57 (1). 149 – 179.

Waite, J. A., Love, C. C., Brinsko, S. P., Teague, S. R., Salazar Jr., J. L., Mancill, S. S., Varner, D. D. 2008. Factors impacting equine semen recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology*. 70 (4). 704 – 714.

Zirkler, H., Gerbes, K., Klug, E., Sieme, H., 2005. Cryopreservation of stallion semen collected from good and poor freezers using a directional freezing device (Harmony CryoCare – Multi thermal Gradient 516). *Animal Reproduction Science*. 89 (1 – 4). 291 – 294.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABP = androgen binding protein

ADP = adenosinmonofosfát

ALH = amplitude of lateral head displacement (laterální výkyv hlavičky)

AMH = anti – Müllerian hormon

ATP = adenosintrifosfát

AV = artificiél vagina

BCF = beat cross frequency (frekvence křížení)

cAMP = cykliský adenosin monofosfát

CASA = computer – assisted sperm analysis (počítačem řízená analýza spermií)

DMSO = dimethyl sulfoxid

DSP = daily spermatozoal production (denní produkce spermií)

FPS = frames per second (počet snímků za sekundu)

FSH = folikulostimulační hormon

GnRH = gonadotropin – releasing hormon

HOS = hypoosmotic swelling test

ID = insemination dose (inseminační dávka)

LDL = low – density lipoprotein

LH = luteinizační hormon

LIN = linearity (linearita)

PGC = primordial germ cell

Pi = inorganic phosphate

PKA = cAMP – dependent protein kinase A

PMOT = progressive motility (progresivní motilita)

sAC = soluble adenylyl cyclase (rozpustná adenylylcykláza)

STR = straightness (přímost)

TMOT = total sperm motility (celková motilita)

VAP = average pathway velocity (průměrná rychlost)

VCL = curvilinear velocity (křivočará rychlost)

VSL = straight line velocity (přímočará rychlost)

WOB = wobble (kmitání)