

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Apoptotické změny v kryokonzervovaném ejakulátu
hřebců**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Filipa Bubeníčková

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

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Apoptotické změny v kryokonzervovaném ejakulátu hřebců" 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 Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za pomoc a vynaložený čas a energii při zpracování této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Ing. Ondřejovi Šimoníkovi a dalším členům Katedry veterinárních disciplín za konzultace při řešení praktické části diplomové práce.

Apoptotické změny v kryokonzervovaném ejakulátu hřebců

Souhrn

Cílem práce bylo zhodnotit vliv času inkubace, použitých obalů, ředidel a individuality hřebců na výskyt apoptotických spermií v rozmražených inseminačních dávkách (ID).

Ejakulát byl odebrán od 6 starokladrubských hřebců standardním způsobem odběru. Odebrané ejakuláty byly ředěny dvěma typy žloutkocitrátových ředidel (GENT a LAKT) a plněny do 0,5 ml pejet a 5 ml hliníkových tub, ve kterých byly zmrazeny a uchovávány v tekutém dusíku. Po rozmražení (37°C, 30-60 s.) byly ID hodnoceny na přítomnost apoptotických spermií ihned po rozmražení a v časech inkubace 15, 30, 45 a 60 minut po rozmražení s využitím fluorochromů Yo-Pro 1 a propidium jodidu a fluorescenčního mikroskopu.

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v zastoupení apoptotických spermií po rozmražení mezi ID ředěnými různým typem ředidla. V ID mražených v ředidle Gent bylo vyšší množství apoptotických i apoptotických spermií z celkového počtu živých, což naznačuje lepší přežívání spermií v tomto ředidle oproti laktózovému ředidlu. Byl prokázán vliv použitého obalu na přítomnost apoptotických spermií v ID po rozmražení. V 5 ml tubách bylo ihned po rozmražení statisticky významně vyšší průměrné zastoupení apoptotických spermií než v 0,5 ml pejetách. S postupujícím časem inkubace nebyly už rozdíly významné. Naopak procentuální zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých bylo vyšší v 0,5 ml pejetách. Statisticky významný byl však tento rozdíl s 5 ml tubami zaznamenán až po hodinové inkubaci. Zásadní rozdíly byly patrné až při porovnání kombinací použitých ředidel a obalů. Jako nejlepší, s přihlédnutím hlavně k údaji procentuálního zastoupení apoptotických spermií z celkového množství živých, se zdá být použití ředidla Gent a 5 ml tub.

Významný vliv na zastoupení apoptotických spermií v kryokonzervovaných ID měla individualita hřebce. Pro zvýšení kvality produkovaných ID je třeba přistupovat ke každému hřebci individuálně, zvláště u plemen jako je starokladrubský kůň, u kterého vysoký stupeň inbreedingu může významně ovlivnit kvalitu ejakulátu a výslednou úspěšnost reprodukce.

Klíčová slova: hřelec, kryokonzervace, inseminační dávka, apoptóza

Apoptotic changes in frozen-thawed ejaculate in stallions

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of incubation time, types of packaging, extenders and stallion's individuality for the presence of apoptotic sperms after thawing insemination doses (ID).

The semen was collected from six Old Kladrubian stallions by standard collection method. Collected ejaculates were diluted with two extender types (GENT and LAKT) and filled into 0.5 ml straws and 5 ml aluminum tubes in which were frozen and stored in liquid nitrogen. The ID were evaluated for the presence of apoptotic sperm immediately after thawing (37 °C, 30 - 60 sec.) and after incubation 15, 30, 45 and 60 minutes after thawing using fluorochromes Yo-Pro 1, propidium iodide and fluorescence microscopy.

There was a statistically significant difference in the presence of apoptotic sperms in the ID diluted with different types of extender. In the ID frozen in Gent was higher number of apoptotic and apoptotic sperms from the total number of live cells. This results suggest a better survival rate of sperm in the extender Gent compared with lactate extender. It was shown the effect of packaging types for the presence of apoptotic sperms in the ID after thawing. Immediately after thawing there was statistically significantly higher average proportion of apoptotic spermatozoa in 5 ml tubes than in 0.5 ml straws. With incubation time the tests did not demonstrate any significant differences between different types of packaging. However, the percentage of apoptotic sperm cells from the total number of viable cells was higher in 0.5 ml straws. Nevertheless this difference was observed as statistically significant only after 1 hour incubation. When we compared the combination of the extender and the packaging type there were evident relevant differences. The common use of Gent and 5 ml tubes seems to give the best outcome.

The stallion's individuality had significant effect on the presence of apoptotic sperms in cryopreserved ID. To increase the quality of produced ID it must be treated individually to each stallion, especially in case of the Old Kladrubian horse breed. High level of inbreeding can significantly affect semen quality and the success of reproduction.

Keywords: stallion, cryopreservation, insemination dose, apoptosis

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíl práce.....	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Spermatogeneze.....	3
3.1.1 Spermatocytogeneze	3
3.1.2 Spermioogeneze	3
3.2 Apoptóza	4
3.2.1 Apoptóza vs. nekróza	5
3.2.2 Morfologické změny buňky	6
3.2.3 Mitochondrie	6
3.2.4 Faktory – enzymy podílející se na procesu programované buněčné smrti.....	7
3.2.4.1 Kaskáda kaspáz	8
3.2.5 Vnější dráha apoptózy.....	9
3.2.6 Vnitřní dráha apoptózy.....	10
3.2.7 Apoptóza během spermatogeneze.....	11
3.2.8 Apoptóza a plodnost	11
3.3 Výroba inseminační dávky.....	12
3.3.1 Výroba mražené ID.....	12
3.3.1.1 Odběr.....	13
3.3.1.2 Hodnocení.....	13
3.3.1.3 Ředění.....	16
3.3.1.4 Obaly – pejety, tuby	21
3.3.1.5 Mražení ID.....	23
3.3.1.6 Rozmražení ID	23
3.3.1.7 Poškození buněk během mražení	24
3.3.2 Kryokonzervace a apoptóza.....	25
3.3.2.1 Zvýšené množství apoptotických spermií v rozmraženém ejakulátu.....	26
3.3.2.2 Využití Yo-Pro 1 k detekci apoptotických buněk.....	28
4 Materiál a metody.....	29
4.1 Odběr vzorků	29
4.2 Hodnocení ejakulátu.....	29
4.3 Mražení a rozmražení ID.....	29
4.4 Detekce apoptotických spermií	30
4.5 Schéma pokusu.....	30

4.6	Statistická analýza	31
5	Výsledky	32
6	Diskuze	40
6.1	Vliv doby inkubace a použitých ředidel	40
6.2	Vliv použitých objemů obalů	42
6.3	Vliv použité kombinace ředidla a obalu	44
6.4	Vliv individuality hřebce	45
7	Závěr	47
8	Přehled literatury	48
9	Přílohy	65

1 Úvod

Inseminace mraženou inseminační dávkou patří k nejpoužívanějším metodám asistované reprodukce koní. I přesto, že se neustále vylepšují techniky kryokonzervace hřebčího ejakulátu, se vyskytují výrazné rozdíly v úspěšnosti použití této metody. Základem úspěchu je správná příprava inseminační dávky z kvalitního ejakulátu. Existuje velké množství hřebců, jejichž spermie špatně snáší proces mražení a jejichž ejakulát nelze uspokojivě mrazit. Hlavním problémem je variabilita mezi jednotlivými hřebci. Vzhledem k individualitě hřebce je třeba nalézt nejvhodnější ředidlo a metodu kryokonzervace pro produkci kvalitních inseminačních dávek s odpovídající fertilizační schopností po rozmražení. Jedním z testů, který by mohl pomoci s určením vhodnosti typu ředidla a metody kryokonzervace pro konkrétní hřebce a se zlepšením výsledné úspěšnosti inseminace, je test na přítomnost apoptotických spermií v inseminační dávce po rozmražení.

2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že na výskyt apopticky změněných spermií hřebců v rozmražené inseminační dávce má vliv doba inkubace, forma obalu inseminační dávky a individualita hřebce.

3 Literární rešerše

3.1 Spermatogeneze

Vznik a vývoj pohlavních buněk - spermatogeneze probíhá v pravidelných cyklech kontinuálně po dosažení pohlavní dospělosti hřebce (Jelínek a Koudela, 2003; Marvan, 2007). Délka jednoho cyklu je 57 dní (Morel, 2003). Spermatogeneze se dělí na spermatocytogenezi a spermiogenezi.

3.1.1 Spermatocytogeneze

V embryonálním základu gonád se vyskytují gonocyty (prvopohlavní buňky), ze kterých vznikají spermatogonie. Spermatogonie v období pohlavního dospívání vstupují do tří fází spermatocytogeneze - fáze množení (období mitotického dělení), růstu a zrání (meiózy). (Marvan, 2007). Období množení je charakterizováno opakovaným mitotickým dělením původních kmenových buněk A-spermatogonií. Z každé mateřské A-spermatogonie vzniknou dvě nestejně velké dceřiné buňky. Větší dceřiná A-spermatogonie zůstává v latentním stádiu (interfázi) a menší buňka intermediárního typu dá po opakovaném dělení vzniknout B-spermatogoniím (Jelínek a Koudela, 2003). Ve fázi růstu dochází k růstu B-spermatogonií a k jejich dělení na spermatocyty I. řádu (primární spermatocyty). Tyto buňky jsou největšími buňkami v semenotvorných kanálcích a nachází se ve střední vrstvě epitelu. V jejich jádře jsou chromozomy schopné uspořádání do dvojic. Ve fázi zrání dochází k meióze, probíhá první a druhé zrací dělení, kdy dojde k redukci počtu chromozómů na polovinu. V prvním dělení vznikají z primárních spermatocytů sekundární spermatocyty (spermatocyty II. řádu). V druhém meiotickém dělení vznikají ze spermatocytů II. řádu čtyři spermatidy s haploidním počtem chromozómů (Marvan, 2007). Během spermatogeneze se jednotlivá stádia posunují k lumenu semenotvorného kanálku. Vzhledem k tomu, že každý cyklus začíná asi o čtvrtinu délky cyklu později než cyklus předcházející, se v semenotvorných kanálcích nacházejí čtyři buněčné generace nad sebou (Jelínek a Koudela, 2003).

3.1.2 Spermiogeneze

Období metamorfózy (spermiogeneze, spermiogenezise) je charakterizováno přeměnou kulaté spermatidy ve zralou spermii schopnou aktivně proniknout do vajíčka a vnést do něho otcovské geny (Marvan, 2007). Spermiogeneze probíhá ve výběžcích Sertoliho

buněk a její fáze jsou označovány jako Golgiho stádium, stádium akrozomové čepičky, stádium kaudální manžety a stádium zrání. Dochází postupně k několika změnám. Jádro spermatidy se prodlouží, oploští a posune se k apikálnímu pólu buňky. V centru Golgiho komplexu spermatidy se formuje akrozomální váček, obsahující akrozomální zrno. Akrozomální váček se zvětšuje, oplošťuje a přikládá na povrch jádra. Postupně se v něm hromadí hydrolytické enzymy (hyaluronidáza, akrozin, proakrozin, kyselá fosfatáza, proteináza a jiné) a přeměňuje se v akrozom. Při zadním konci akrozomu se vytváří nukleární prstenec, pod nímž se organizují mikrotubuly do válcovitého útvaru-kaudální manžety. Dochází k prodlužování buňky a přesunu obou centriol k zadnímu pólu jádra, kde dávají vznik krčku a osovému vláknu spermie. Distální centriol je lokomočním centrem bičíku spermie. Mitochondrie vytvoří spirálovitě stočené vlákno, tzv. mitochondriální pochvu. Spermie se uvolní z výběžků podpůrných buněk a je kryta cytoplazmatickou membránou. Postupuje přes lumen semenotvorného kanálku do vývodných cest. Postup spermie do ocasu nadvarlete, kde se nepohyblivé spermie ukládají a dozrávají, trvá v průměru 12 dní (Jelínek a Koudela, 2003, Marvan, 2007).

Enzymy akrozómu slouží k proniknutí spermie obaly vajíčka, centrioly jsou nepostradatelné k zahájení buněčného dělení oplozeného vajíčka, bičík umožňuje pohyb a energii zabezpečují mitochondrie spojovací části bičíku. Hlavička obsahuje jádro s otcovským genetickým materiálem (Marvan, 2007).

3.2 Apoptóza

Apoptóza je naprogramovaný mechanismus buněčné smrti. Je životně důležitá pro mnoho eukaryotických buněk, protože reguluje jejich počet a odstraňuje zbytečné buňky, které ohrožují přežívání. Dochází při ní ke správnému odstranění buněk, které jsou stárnoucí, nepotřebné nebo vadné a směřují ke smrti (Martelli et al., 2001; Said et al., 2010).

Programovaná buněčná smrt je zásadní fyziologický proces ve vývoji živočichů a rostlin, důležitý pro normální vývoj a udržení homeostázy (Vaux et Korsmeyer, 1999; Alberts et al., 2008). Buněčná smrt se také uplatňuje v dospělých organismech, jako regulační mechanismus buněčného dělení (Alberts et al., 2008). Apoptóza je komplementární k mitóze a tyto dva fenomény udržují rovnováhu, růst nebo involuci tkání (Hengartner, 2000). Funguje jako kontrola kvality buněčného cyklu a vývoje, eliminuje buňky abnormální, nefunkční nebo potenciálně nebezpečné (Alberts et al., 2008).

Pokud je narušena její regulace, může vést k různým onemocněním, jako jsou rakovina, autoimunitní nebo neurodegenerativní choroby (Desagher et Martinou, 2000). Živočišné buňky jsou schopny rozpoznat poškození svých organel a pokud je poškození rozsáhlé, dokáží zabít sami sebe apoptózou. To je velmi důležité, pokud dojde k poškození DNA a genetická informace tak může obsahovat mutace spouštějící rakovinné bujení. Buňka má různé možnosti, jak rozpoznat chybovou DNA a pokud ji nedokáže opravit, často vstupuje do apoptózy a usmrtí se (Alberts et al., 2008).

Umírající buňky, které projdou do finální fáze apoptózy mají na svém povrchu molekuly jako je fosfatidylserin. Fosfatidylserin se běžně nalézá na cytosolového povrchu plazmatické membrány, ale je šířen v průběhu apoptózy na extracelulární povrch. Tyto molekuly označí buňku pro fagocytózu buňkami mající odpovídající receptory (například makrofágy) (Said et al., 2010). Buňky jsou tak rychle odklizeny a nedojde k zánětlivé reakci a poškození okolí (Li et al., 2003; Martin et al., 2004; Vandivier et al., 2006; Alberts et al., 2008). Naopak po traumatu umírají buňky nekrotickou, při které dochází k vyjití obsahu buněk do okolí a vzniku zánětu (Alberts et al., 2008).

3.2.1 Apoptóza vs. nekróza

Termín apoptóza je využíván jako synonymum k programované buněčné smrti (Desagher et Martinou, 2000). Nicméně originálně byl používán k popisu morfologických charakteristik určitého typu buněčné smrti, která je opakem nekrotické (Kerr et al., 1972). Během nekrotické se buňka zvětšuje, její mitochondrie rozšiřují, ostatní organely rozpouští a plazmatická membrána praskne, uvolní cytoplasmatický materiál, což často vyvolává zánětlivou reakci. Naopak během apoptózy se cytoplasma smršťuje, chromatin kondenzuje a organely si zachovávají svou integritu. Plazmatická membrána se zvlíní a vystavuje fosfatidylserin na vnější straně. Plazmatická membrána nepraskne, jako prevence vyjití celulárních komponent do extracelulárního prostoru. Apoptotické buňky se rozpadnou na membránové váčky - apoptotická tělíska, která jsou rozpoznána a odstraněna fagocytózou, což zabrání zánětu (Desagher et Martinou, 2000).

Apoptická buněčná smrt byla poprvé popsána před více než 30 lety (Kerr et al., 1972) a byla odlišena od nekrotické výlučně na základě morfologických kritérií, jako je kondenzace chromatinu a tvorba apoptotických tělísek. Následně se ukázalo, že apoptóza se rovněž vyznačuje řadou biochemických změn, které se vyskytují v několika organelách včetně jádra (Martelli et al., 2001). Biochemické markery apoptózy zahrnují aktivaci endonukleáz,

degradaci DNA na oligonukleosomální fragmenty a aktivaci cysteinových proteáz nazývaných kaspázy (Desagher et Martinou, 2000).

3.2.2 Morfologické změny buňky

Během apoptózy dochází k charakteristickým morfologickým a biochemickým změnám (Alberts et al., 2008). U somatických buněk je charakterizovaná počátečním smrštěním buněk, což vede k rozpojení mezibuněčných kontaktů (Caselles et al., 2014). Buňky získají kulatý tvar a jejich organely se více koncentrují v cytoplazmě. V jádře dochází ke kondenzaci chromatinu (v mnoha případech přijímá nápadný srpcovitý nebo půlměsícovitý tvar) (Earnshaw, 1995; Caselles et al., 2014) a specifické nukleázy přesně rozštěpí DNA (Caselles et al., 2014). Na konci tohoto procesu, zatímco probíhá štěpení DNA, dojde k fragmentaci jádra (rozpadne se jaderný obal). Povrch buňky se obvykle zvlí a může dojít k rozpadu na mnoho malých intaktních útvarů obalených membránou, nazývaných apoptotická tělíška (Alberts et al., 2008; Caselles et al., 2014).

Hlavní rozdíl mezi apoptózou spermií a somatických buněk vychází z kompartmentace spermií, kdy je jádro fyzicky oddělené od mitochondrií a chromatin je kondenzovaný, což zabraňuje štěpení DNA indukované pomocí kaspáz (Aitken et al., 2011).

Důležitými změnami prochází plasmatická membrána apoptotických buněk. Negativně nabitý fosfolipid fosfatidylserin je za normálních okolností uložen ve vnitřní vrstvě lipidové dvouvrstvy plasmatické membrány (Alberts et al., 2008; Caselles et al., 2014). Translokace fosfatidylserinu od vnitřního k vnějšímu povrchu plasmatické membrány slouží jako hlavní marker apoptózy pro sousední buňky a makrofágy k fagocytóze umírajících buněk (Schultz et Harrington, 2003; Alberts et al., 2008; Munoz-Pinedo, 2012). Na fosfatidylserinu dependentní pohlcení apoptotických buněk brání produkci signálních proteinů vyvolávajících zánět (cytokiny) fagocytujícími buňkami (Alberts et al., 2008).

Fosfatidylserin na povrchu membrány může být zviditelněn značeným proteinem Annexinem V, který se k němu specificky váže (Alberts et al., 2008). Této vlastnosti je využíváno v mnoha studiích zaměřených na detekci různých markerů apoptózy, u hřebců například Freitas-Dell'Aqua et al. (2013) a Monteiro et al. (2013).

3.2.3 Mitochondrie

Mitochondrie prodělávají během apoptózy významné změny jak strukturální tak funkční. Mitochondrie hrají hlavní roli při spouštění apoptózy živočišných buněk pomocí

mnoha stimulů (Susin et al., 1998; Desagher et Martinou, 2000). Integrují signály smrti pomocí proteinů rodiny Bcl-2 a koordinují kaspázovou aktivaci pomocí uvolňování cytochromu c (Desagher et Martinou, 2000). Proteiny jako je cytochrom c jsou obvykle uvolňovány z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytosolu, což je výsledkem propustnosti vnější mitochondriální membrány (Desagher et Martinou, 2000; Alberts et al., 2008).

Hlavní funkcí mitochondrií je dodávat buněčnou energii, ale druhou zásadní funkcí je regulace buněčné smrti (Ott et al., 2007). Kromě toho, tato subcelulární struktura je hlavním zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS), které vznikají hlavně na komplexech I a III dýchacího řetězce. Mitochondriemi generované ROS hrají důležitou roli v uvolňování cytochromu c a dalších proapoptických proteinů, které mohou vyvolat aktivaci kaspáz a apoptózu (Ortega-Ferrusola et al., 2008). V této souvislosti, byly mitochondrie spermií identifikovány jako nejcitlivější na kryokonzervaci (Peña et al., 2003) a aktivní kaspázy byly identifikovány v psích, býčích a hřebčích spermiích po rozmražení (Peña et al., 2006; Martin et al., 2007; Ortega-Ferrusola et al., 2008).

Mitochondrie se zdají být nejcitlivější buněčná struktura k chlazení a zpětnému zahřátí, proto výzkum na ochranu mitochondrií v průběhu chlazení a rozmražení může být vhodným přístupem ke zvýšení kvality koňského zmraženého spermatu (Ortega-Ferrusola et al., 2008).

3.2.4 Faktory – enzymy podílející se na procesu programované buněčné smrti

Základními komponenty procesu smrti apoptózou jsou proteiny Bcl-2, Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor) a kaspázy (Desagher et Martinou, 2000). Kaspázy jsou syntetizovány jako nečinné proenzymy, které po proteolytické aktivaci získají schopnost štěpit klíčové intracelulární substráty (Budihardjo et al., 1999), vedoucí k morfologickým a biochemickým změnám spojených s apoptózou (Desagher et Martinou, 2000).

Apoptóza ve většině buněk závisí na permeabilizaci vnější mitochondriální membrány (Martinou et Green, 2001). Mezimembránový prostor mitochondrií obsahuje mnoho proteinů (př. cytochrom c a Smac/Diablo), které, pokud jsou uvolněny do cytosolu, aktivují proteázy kaspáz (Green, 2005).

Proapoptické a antiapoptické proteiny rodiny Bcl-2 kontrolují permeabilizaci mitochondriální membrány (Desagher et Martinou, 2000; Cory et Adams, 2002). Proteiny pro přežití jsou například Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 a Bcl-w (Keeble et Gilmore, 2007).

Proapoptotické proteiny jsou Bax, Bak a Bok (Desagher et Martinou, 2000; Keeble et Gilmore, 2007). Další proteiny jako Bid a Bad jsou nezbytné pro interakce mezi ostatními proteiny rodiny Bcl-2. Regulují aktivitu pro- i proti- apoptotických proteinů (Kelekar et Thompson, 1998; Wei et al., 2001; Bouillet et Strasser, 2002). Základní mechanismus jak proteiny Bcl-2 regulují apoptózu je pravděpodobně kontrola uvolňování cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrií (Desagher et Martinou, 2000). Současný model iniciace apoptózy naznačuje, že rozhodnutí o buněčné smrti je závislé na interakci mezi členy rodiny proteinů Bcl-2 (Keeble et Gilmore, 2007).

Mitochondriální cytochrom c je nezbytný pro aktivaci kaspáz společně s dATP a Apaf-1. Cytochrom c se v cytosolu naváže s Apaf-1, v přítomnosti ATP nebo dATP a tento komplex aktivuje prokaspázu 9. Aktivovaná kaspáza 9 může změnit a aktivovat další kaspázy (Desagher et Martinou, 2000).

Kromě cytochromu c je mnoho dalších proteinů upoutáno do intermembránového prostoru mitochondrií, jako apoptózu indukující faktor (AIF) (Susin et al., 1998), a jsou uvolňovány během apoptózy. Nicméně se zdá, že pouze cytochrom c je esenciální pro programovanou buněčnou smrt (Li et al., 2000). Aktivace kaspáz a buněčná smrt bezprostředně následuje permeabilizaci mitochondriální membrány (Valentijn et al., 2003).

3.2.4.1 Kaskáda kaspáz

Intracelulární mechanismus zodpovědný za apoptózu je shodný u všech živočišných buněk. Je závislý na rodině proteáz, které mají ve svém aktivním místě cystein a štěpí cílové proteiny kyselinou asparagovou (Alberts et al., 2008). Nazývají se kaspázy (cysteinyl-aspartát-specifické proteázy) (Said et al., 2010). Jsou syntetizovány buňkou v neaktivních prekursorech - prokaspázách, které jsou typicky aktivovány proteolytickým štěpením. Rozštípání prokaspáz závisí na jedné či dvou specifických asparagových kyselinách a je katalyzováno jinou (již aktivovanou) kaspázou. Jakmile je aktivována, kaspáza rozštípne a tím aktivuje další prokaspázu, což vede k zesílení proteolytické kaskády (Alberts et al., 2008).

Prokaspázy, které se uplatňují na začátku apoptózy jsou tzv. iniciační, když jsou aktivované, dále rozštípnu a aktivují další vlnu kaspáz, které aktivují další prokaspázy, nebo jiné specifické cílové proteiny v buňce. Mezi spoustou cílových proteinů jsou například jaderná lamina. Dalším cílem jsou proteiny, které normálně drží DNA-degradující enzym v inaktivní formě, jejich odbourání uvolní endonukleázu k rozštípání DNA v jádře. Dalšími cíli

jsou proteiny cytoskeletu, proteiny udržující sousední buňky u sebe, tím se apoptotická buňka snadno oddělí a může být lehce pohlcena (Alberts et al., 2008).

Apoptotické iniciátory jsou kaspázy - 2, 8, 9 a 10, které aktivují efektorové kaspázy (3, 6 a 7), které vedou ke štěpení různých substrátů a k ukončení procesu apoptózy. Aktivace kaspázy 3 rozhoduje o osudu buňky v apoptotické kaskádě, kdy už se buňka nemůže vrátit zpět do normálního stavu (Said et al., 2010). Kaspáza 3 je považována za nejvýznamnější efektorovou kaspázu a její aktivace značí v apoptóze „bod, odkud není návratu“ (Earnshaw et al., 1999).

Kaspázová aktivita je využívána ve studiích jako důkaz probíhající apoptózy (Monteiro et al., 2013; Freitas-Dell'Aqua et al. 2013; Gallardo Bolaños et al., 2012; 2014; Caselles et al., 2014). U hřebčích spermií byly detekovány kaspázy 3, 7 a 9. Hlavním místem kaspáz je střední oddíl spermie a v menší míře byly zjištěny v bičíku a akrozómu spermií hřebců (Ortega-Ferrusola et al., 2008).

Stejně tak byla kaspáza 9 identifikována ve studii u skotu (Martin et al., 2007). Také byly zjištěny kaspázy 3 a 7 v beraním spermatu (Martin et al., 2007). U lidí byly aktivovány v důsledku kryokonzervace kaspázy 1, 3, 8 a 9 (Weng et al., 2002; Paasch et al, 2004a; 2004b; 2005; Wünderlich et al., 2006).

Dvě nejlépe pochopené dráhy jak buňka aktivuje kaskádu vedoucí k apoptóze jsou nazvány vnitřní a vnější dráha. Každá využívá své vlastní iniciační prokaspázy. Kaspázová kaskáda je destruktivní a ireversibilní proces, jakmile buňka překročí kritický bod, už není cesty zpět (Alberts et al., 2008).

3.2.5 Vnější dráha apoptózy

Extracelulární signální proteiny se přichytí na specifické receptory na povrchu buňky, které fungují jako spoušť pro vnější dráhu apoptózy. Receptory patří k rodině TNF (tumor necrosis faktor). Obsahují v sobě receptor pro TNF a Fas receptor (Alberts et al., 2008). Fas receptor se vyskytuje u <10% spermií ve zdravém ejakulátu a >50% spermií v oligozoospermatickém ejakulátu mužů (Sakkas et al., 1999b), což naznačuje, že existuje možná spojitost mezi kvalitou spermií a přítomností receptoru Fas (Said et al., 2010). Fas receptor hraje důležitou úlohu při aktivaci efektorových kaspáz (Medema et al., 1998; Thornberry et Lazebník, 1998, Hetz et al., 2005).

Na povrchu cílových buněk je aktivován Fas receptor pomocí Fas ligandů na povrchu cytotoxických lymfocytů. Když jsou aktivovány navázáním Fas ligandů, domény na

cytosolovém konci Fas receptoru navážou intracelulární adaptorové proteiny, které přibráním iniciátorových prokaspáz (8, 10 nebo obou) vytvoří komplex DISC (death-inducing signaling komplex). Po aktivaci v DISCU dojde k aktivaci dalších prokaspáz a ke spuštění apoptózy (Alberts et al., 2008).

3.2.6 Vnitřní dráha apoptózy

Buňky mohou také vyvolat apoptózu zevnitř buňky, většinou jako odpověď na poškození či jiné stresy, jako je narušení DNA nebo nedostatek kyslíku či živin (Alberts et al., 2008). Vnitřní dráha v odpověď na stimuly vyvolávající apoptózu spustí uvolnění různých proteinů z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu buňky (Schultz and Harrington, 2003; Alberts et al., 2008). Mezi nejznámější proteiny patří cytochrom c, který zprostředkovává aktivaci kaspázy 9 (Schultz and Harrington, 2003), spouští kaskádu aktivace kaspáz, včetně kaspázy 3, která podněcuje buněčnou smrt (Caselles et al., 2014).

Cytochrom c se po uvolnění do cytosolu váže na prokaspázy-aktivující protein Apafl, což způsobí, že se Apafl změní na kulovitý heptamer zvaný apoptosome. Proteiny Apafl v apoptosomu pak navážou prokaspázové proteiny (prokaspáza 9), které se aktivují v apoptosomu, stejně jako se prokaspázy 8 a 10 aktivují v DISC komplexu. Aktivované kaspázy 9 pak aktivují další kaspázy kaskády a spustí apoptózu (Alberts et al., 2008).

Vnitřní dráha apoptózy je přísně regulována, aby buňky zabíjely samy sebe, jen když je to nezbytné. Hlavní roli v této regulaci hrají proteiny rodiny Bcl-2. Bcl-2 proteiny regulují vnitřní dráhu apoptózy hlavně kontrolou uvolňování cytochromu c a ostatních mitochondriálních mezimembránových proteinů do cytosolu. Pro a proti apoptotické Bcl-2 proteiny se mohou navázat k sobě navzájem v různých kombinacích a inhibovat tak svoji funkci. Na rovnováze mezi těmito dvěma třídami Bcl-2 proteinů závisí, zda bude buňka žít, či zemře vnitřní dráhou apoptózy (Alberts et al., 2008).

V některých buňkách vnější apoptotická dráha zapojuje vnitřní dráhu pro posílení kaspázové kaskády k zabití buňky. Protein Bid je spojením mezi oběma drahami. Když receptory aktivují vnější dráhu, iniciační kaspázy (8) rozštípou Bid, tím vznikají zkrácené formy Bid nazvané tBid. tBid se přesouvají do mitochondrií, kde inhibují antiapoptotické Bcl-2 proteiny a spouští agregaci proapoptotických proteinů pro uvolnění cytochromu c a dalších proteinů z intermembránového prostoru, čímž posilují signály vedoucí k programované buněčné smrti (Alberts et al., 2008).

3.2.7 Apoptóza během spermatogeneze

Apoptóza během spermatogeneze je fyziologický jev, který se podílí na udržování homeostázy ve varlatech odstraňováním přebytku a abnormálních zárodečných buněk (Guo et al., 2000; Johnson et al., 2008). Může se stát, že abnormální buňky označené pro apoptózu projdou varlaty a dostanou se do ejakulátu (Sakkas et al., 1999a; 1999b; 2004) a ten tak obsahuje zvýšené procento abnormálních a apoptotických spermií a apoptotických tělísek (Caselles et al., 2014). Markery apoptózy mají spojení se sníženou fertilitou jak u lidí (Shukla et al., 2011; Caballero et al., 2012) tak i u zvířat, například u hřebců (Caselles et al., 2014) a býků (Dogan et al., 2012).

Apoptóza hraje důležitou roli nejen při zachování poměru zárodečných a Sertoliho buněk, ale také v odstraňování vadných zárodečných buněk, což je stěžejní pro zachování kvalitní produkce spermií (Shukla et al., 2011). Pokud jsou varlata vystavena škodlivým vlivům jako například tepelnému stresu či zánětu šourku, v ejakulátu se zvýší množství spermií s apoptotickými markery a vadnou morfologií (Sinha Hikim et al., 2003; Chen et al., 2004; Wu et al., 2009).

3.2.8 Apoptóza a plodnost

Spermie s typickými znaky pro apoptózu byly identifikovány u mnoha druhů savců - u býků (Anzar et al., 2002), hřebců (Ortega-Ferrusola et al., 2009a), psů (Sokolowska et al., 2009), beranů (Garcia Vazquez et al., 2012) i lidí (Aziz et al., 2007). Četné studie prokázaly vztah mezi markery apoptózy a mužskou neplodností (Brugnon et al., 2006; Moustafa et al., 2004; Said et al., 2004; Zedan et al., 2009). Bylo prokázáno, že externalizace fosfatidylserinu a fragmentace DNA se vyskytují častěji u spermií, které byly pozitivní na aktivní kaspázu 3 (Weng et al., 2002). Byly zjištěny korelace mezi markery apoptózy jako je například vysoká aktivita kaspáz, translokace fosfatidylserinu nebo fragmentace DNA s morfologicky abnormálními a nezralými spermii (Sakkas et al. 2004; Aziz et al. 2007), s nízkou pohyblivostí (Paasch et al., 2004c; Chen et al., 2006), s nízkou životaschopností (Anzar et al., 2002) a nízkou in vitro fertilizační schopností a počtem zabřeznutí (Sun et al., 1997; Host et al., 2000; Fatehi et al., 2006).

Bylo také zjištěno, že zvýšené markery apoptózy negativně korelují se schopností penetrace oocyty. Vzorke spermatu se sníženou penetrační schopností obsahovaly spermie s vyššími koncentracemi apoptotických markerů, ve srovnání se vzorky spermatu s dobrou penetrační schopností (Grunewald et al., 2008).

Apoptóza je v korelaci se sníženou fertilitou spermií a s neplodností. Optimalizace technik přípravy ejakulátu, koncentrace kryoprotektantu a zmrazovací a rozmrazovací protokoly by měly minimalizovat indukci apoptózy během kryokonzervace spermií, což by mělo vyústit ve vyšší úspěšnost asistované reprodukce. Před zmražením by měly být vzorky spermatu zpracovány tak, aby došlo ke zvýšení kvality spermatu po mražení (Said et al., 2010).

3.3 Výroba inseminační dávky

Inseminační dávky (ID) se vyrábí chlazené nebo mražené, podle toho zda je sperma určeno k okamžitému použití nebo k uložení či časově náročné přepravě (Graham, 2011).

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

3.3.1 Výroba mražené ID

Kryokonzervace umožňuje dlouhodobé uchovávání spermií od vynikajících hřebců a také rozeslání spermatu po celém světě (Morel, 2003; Brinsko et al., 2011). Avšak inseminace mraženým spermatem dosahuje nižšího procenta zabřeznutí než při použití čerstvého nebo chlazeného (Brinsko et al., 2011).

Před samotným mražením je důležité vyhodnocení kvality ejakulátu, protože ne každý lze mrazit. Hřebci vykazují vysoký stupeň individuality, co se mražení a přežívání spermií týče. Odhaduje se, že přibližně 20 % hřebců produkuje sperma, které se mrazí dobře, 60 % spermatu se mrazí přijatelně a 20 % špatně (Sieme, 2011a).

K dispozici je mnoho protokolů pro úspěšnou kryokonzervaci hřebčího spermatu lišící se mezi jednotlivými laboratořemi v počtu specifických komponent přidávaných během procesu. Základní kroky společné pro téměř všechny techniky kryokonzervace jsou: odběr ejakulátu a jeho zhodnocení, naředění spermatu vhodným ředidlem, odstranění většiny semenné plazmy centrifugací, resuspenzace spermií v ředidle s kryoprotektantem, balení

ředěného semene do pejet, zmrazení v parách tekutého dusíku a skladování v tekutém dusíku při teplotě -196°C (Loomis, 2011).

3.3.1.1 Odběr

Odběr ejakulátu probíhá v reprodukčních centrech od hřebců, kteří prošli výběrem a vyhovují předepsaným zdravotním podmínkám (Rob a Herčík, 1987). Odběr se provádí do různých typů umělých vagín (Brinsko et al., 2011). Může být frakcionovaný do zkráceného typu umělé pochvy, tzv. otevřeného typu, nebo odběr celého ejakulátu do uzavřeného systému se zabudovaným sběračem spermatu (Rob a Herčík, 1987). Při použití umělé pochvy se nechá hřelec skákat na fantom nebo na klidnou klisnu (Pycock, 1997).

Nejčastěji se provádí frakcionovaný odběr ejakulátu, ke kterému se používá zkrácený model umělé pochvy (př. Krakovský nebo Missouri). Tento způsob odběru zvyšuje koncentraci spermií a také snižuje podíl semenné plazmy v ejakulátu a tím se snižuje její negativní vliv na životaschopnost spermií. Sperma je tak koncentrováno bez potřeby centrifugace a často má frakcionovaný odběr pozitivní vliv na kontaminaci semene bakteriemi, močí nebo krví. (Brinsko et al., 2011). Odebraná vysoce koncentrovaná frakce může být okamžitě naředěna ředidlem (Loomis, 2011).

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

3.3.1.2 Hodnocení

Základní testy zahrnují stanovení objemu, koncentrace, pohyblivosti, morfologie a pH. Průběžně se provádí test dlouhověkosti, bakteriologický, cytologický a hypoosmotický test (HOS test) a barvení živých a mrtvých spermií (Baumber-Skaife, 2011).

3.3.1.2.1 Makroskopické hodnocení

Objem ejakulátu – stanovuje se měřením v kalibrované zkumavce, kalibrovaných odměrných válcích nebo vážením na laboratorních digitálních vahách (Věžník, 2000). Normální objem ejakulátu hřebce je v závislosti na plemeni 30-250 ml (Morel, 2003).

Barva, konzistence a pach - závisí na hustotě, která je určena koncentrací spermií, na složení semenné plazmy a přítomnosti fyziologických (epitelové buňky) nebo patologických (moč, krev) složek (Sieme, 2009). Barva je mléčně až šedavě bílá, konzistence vodnatá (Gamčík a Kozumplík, 1992) a sperma má být pachově neutrální (Sieme, 2009).

3.3.1.2.2 Mikroskopické hodnocení

Před mikroskopickým hodnocením se vzorek naředí vhodným ředidlem nejlépe do 2 minut po odběru (Morel, 2003).

Koncentrace - hustota spermií představuje počet spermií na jednotku objemu a udává se například v milionech na mililitr (Sieme, 2009). K výpočtu se používá spektrofotometr nebo hemocytometr. Ke klinickému využití se používají přístroje s fluorescenční technikou (Baumber-Skaife, 2011). Pro použití spermatu k inseminaci je potřeba 100×10^6 životaschopných spermií v 1 ml (Morel, 2003).

Motilita - je základním testem pro stanovení kvality a lze z ní posoudit potenciální fertilitu hřebce (Baumber-Skaife, 2011). Motilita je vyjádřena v procentech progresivně pohyblivých spermií (Sieme, 2009). Subjektivně se posuzuje žádoucí progresivní pohyb vpřed pomocí světelného mikroskopu (Morel, 2003). Dobrý hřelec by měl mít okamžitou progresivní motilitu nad 60 % (Sieme, 2009). Objektivní metodou hodnocení motility spermií je počítačová metoda CASA (Computer Assisted Semen Analysis) (Baumber-Skaife, 2011). Pro zmrazení spermatu je vhodná minimální motilita 50-60 % (Samper a Morris, 1998). Po rozmražení je považována za přijatelnou motilita nad 35 % (Vidament, 2005).

Procento živých a mrtvých spermií - se stanovuje vitálními barvicími testy (Věžník, 2000). Barvení spermií nigrosinem-eosinem umožňuje rozlišení mrtvých od živých buněk (Morel, 2003). Membrána slabých nebo mrtvých spermií propouští barvivo, jež je obarví fialově, životaschopné spermie zůstávají neobarvené (Baumber-Skaife, 2011). Poměr mrtvých a živých spermií přijatelný pro inseminace je 4:6 (60 % živých spermií) (Morel, 2003).

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

2011). Sperma obsahující minimálně 65 % normálních spermií je vhodné pro inseminaci (Morel, 2003).

pH spermatu - acidita/alkalita se stanovuje na pH metrech (Věžník, 2000; Morel, 2003). Normální pH hřebčího spermatu se pohybuje mezi 7,2-7,7 (Baumber-Skaife, 2011).

Životaschopnost - hodnocení motility v různých časových intervalech při skladování při teplotě 5 °C, 22 °C nebo 37-38 °C. Chlazené sperma (5°C) by mělo zachovat přijatelnou pohyblivost (nad 30 %) po dobu nejméně 24 hodin, ideálně 48 (Baumber-Skaife, 2011).

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

HOS test – hypo-osmotic swelling test - v hypoosmotickém prostředí se spermie difúzí tekutiny z okolí zvětšují, aby se vytvořil rovnovážný stav mezi kapalinou uvnitř spermií a extracelulární tekutinou (Sieme, 2009). Spermii s neporušenou funkční membránou se bičík stočí, s poškozenou membránou zůstane bičík rovný. Mikroskopicky se hodnotí minimálně 100 buněk a určí se procento spermií s typicky svinutým bičíkem (Baumber-Skaife, 2011). Výsledky HOS testu mohou predikovat úspěšnost kryokonzervace (Vidament et al., 1998; Baumber-Skaife, 2011).

Mikrobiologické vyšetření ejakulátu - laboratorní mykologické vyšetření musí být provedeno nejpozději do 3 hodin a bakteriologické nejpozději do 6 hodin po odběru vzorků. Mikrobiologické vyšetření se provádí v laboratoři SVÚ (Státní veterinární ústav) (Věžník a kol., 2004). Bakterie lze identifikovat pomocí kultivace na agarové plotně buď ze vzorku spermatu, nebo výtěru z genitálu (Morel, 2003).

Cytologické vyšetření - při vyšetření semene v hemocytometru mohou být ve vzorku zjištěny erytrocyty (značící problém jako je krvácení) a leukocyty (poukazují na možnost infekce) (Morel, 2003).

Pokročilé testy spermií - podrobnější hodnocení spermií jako je určení schopnosti kapacitace, akrozomální integrity, mitochondriální aktivity a chromatinové integrity (Baumber-Skaife, 2011) a také detekce markerů apoptózy (Anzar et al., 2002). Ve většině metod se využívá fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie. Kombinace všech testů umožňuje spolehlivě identifikovat subfertilní hřebce (Baumber-Skaife, 2011).

3.3.1.2.3 Parametry hřebčího ejakulátu

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

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

Tabulka 3.1: Ukazatele nativního ejakulátu

3.3.1.3 Ředění

V ideálním případě by mělo dojít k naředění spermatu predehřátým ředidlem během 2-5 minut po odběru (Brinsko et al., 2011), např. základním ředidlem s odtučněným sušeným mlékem a glukózou (Kenney) nebo chemicky definovaným médiem, jako je INRA 96 (IMV, Francie) (Loomis, 2011). Sperma se obvykle zředí v minimálním poměru 1:1 nebo na předem stanovenou konečnou koncentraci 50 až 100 milionů spermií v 1 ml (Loomis, 2011). Zvýšení

koncentrace spermatu a snížení koncentrace semenné plazmy se zajišťuje odběrem spermatické frakce ejakulátu nebo odstředováním (Brinsko et al., 2011).

3.3.1.3.1 Naředění po odstředění

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

Koncentrovaná suspenze spermií se po odstranění semenné plazmy ředí na požadovanou konečnou koncentraci (Loomis, 2006; 2011; Graham, 2011). K mražení je nejčastěji používána obdoba ředidel pro chlazené sperma s přidáním kryoprotektantu, např. glycerolu (Morel, 2003).

3.3.1.3.2 Ředidla používaná k výrobě mražené ID

Ředidla s dobrými výsledky pro mražení ID musí obsahovat energetické a proteinové zdroje pro metabolismus spermií, lipoproteiny (např. mléko, vaječný žloutek nebo jejich kombinaci) stabilizující membránu při změnách teploty, antibiotika k inhibici růstu a množení bakterií, pufrů k vyvážení pH a osmotického tlaku, elektrolyty, antioxidanty a kryoprotektanty (Barbas a Mascarenhas, 2009; Loomis, 2011; Sieme, 2011b; Brinsko et al., 2011).

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

Podle výzkumu Sampera a Morrise (1998) se používá nejčastěji ředidlo laktózová EDTA, jako další INRA 82 s různými koncentracemi vaječného žloutku a glycerolu a v omezené míře se používá ředidlo na bázi sacharóza-vaječný žloutek (modifikovaný

Kenney), například komerčně dostupné INRAFreeze (IMV, Francie) a Gent (Minitube, Německo).

Ve studiích Scherzer et al. (2009) a Salazar et al. (2011) zaznamenali po rozmražení lepší parametry hřebčích ID s ředidlem s vyšším množstvím vaječného žloutku bez přidání mléčných komponent v porovnání s ředidly na bázi mléka. Předpokládá se, že cholesterol vaječného žloutku dokáže během mražení lépe stabilizovat a chránit buněčnou membránu spermií. Naopak Morillo Rodríguez et al. (2011) doporučují ve své práci ředidlo na bázi odstředěného mléka, oproti ředidlu Gent s vaječným žloutkem. V případě této studie lze lepší výsledky po rozmražení hřebčích inseminačních dávek v mléčném ředidle oproti žloutkovému vysvětlit sníženým obsahem kryoprotektantu glycerolu, který částečně nahradili dimethylformamidem, čímž pravděpodobně dosáhli snížení toxického vlivu glycerolu na spermií. Ve studii Ecot et al. (2001) autoři zaznamenali lepší fertilitu hřebčího ejakulátu zmrazeného v INRA 82 (ředidlo s odstředěným mlékem, vaječným žloutkem a glycerolem doplněným o cukry a elektrolyty) v porovnání s Kenneyho ředidlem obsahujícím vaječný žloutek a glycerol.

Gutiérrez-Cepeda et al. (2012) porovnávali vliv ředidel pro mražení hřebčích spermií na DNA fragmentaci po rozmražení. V této práci poskytovalo lepších výsledků ochrany DNA spermií ředidlo InraFreeze oproti ředidlu Gent a Botu-Crio, avšak až po inkubaci 6 hodin po rozmražení, do té doby nebyly mezi ředidly zaznamenány významné rozdíly v ochraně hřebčích spermií. Ředidla Gent a Botu-Crio shodně obsahují celý vaječný žloutek, oproti InraFreeze, kde je obsažena pouze sterilizovaná žloutková plazma, což by mohlo mít vliv na možnou přítomnost kryoprotektivních antagonistů v celém vaječném žloutku (Pillet et al., 2011).

3.3.1.3.3 Kryoprotektanty

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

Kryoprotektanty neprostupné membránou jsou cukry, aminokyseliny, různé proteiny (lipoproteiny, včetně vaječných, mléčných a séra) a další makromolekuly (např. methylcelulóza, polyvinylalkohol a polyvinylpyrrolidon) (Sieme, 2011b; Graham, 2011). Interakce těchto látek se složkami plazmatické membrány přispívá k její stabilizaci a především tyto kryoprotektanty vytváří hyperosmotické prostředí, které indukuje dehydrataci

buněk (Graham, 2011). Neprostupující látky dehydratují buňky, což umožňuje jejich rychlé zchlazení bez letálního poškození (McGann, 1978; Graham, 2011).

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

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

Ve studii Álvarez et al. (2014) zkoumali motilitu (CASA), viabilitu (eosin/nigrosin), akrozomální integritu (fázový kontrast, imerzní mikroskop) a stav membrány (HOS test) po rozmražení ID s různými kryoprotektanty přidanými do ředidla INRA96. Po rozmražení byla pozorována vyšší celková i progresivní motilita s kryoprotektanty GD (Glycerol 2,5% a Dimethylformamid 2,5%) a DMF (Dimethylformamid 5%) než u ostatních kryoprotektiv (Acetal 5%, Glycerol 2,5% a Acetal 2,5%, Dimethylformamid 2,5% a Acetal 2,5%). Viabilita po rozmražení byla také lepší s kryoprotektantem DMF a také s G (Glycerol 5%). Podle všech testovaných kritérií byly nejlepší ID s kryoprotektanty GD a DMF nebo G, které měly srovnatelné výsledky.

3.3.1.3.4 Vliv mražení a ředidel s kryoprotektanty na spermie

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

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

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

Rozpuštěné látky (soli, cukry, bílkoviny nebo jiné molekuly) v rozpouštědle se pohybují z místa o vyšší koncentraci do místa s nižší koncentrací, dokud nedosáhnou rovnováhy (Graham, 2011). Především propustné kryoprotektanty (např. glycerol) prostupují membránou výrazně pomaleji než rozpouštědlo (voda) (Amann, 1999; Meryman, 2007). Přidá-li se glycerol do semene, bude se voda přesunovat z každé buňky, aby naředila glycerol, mnohem rychleji než se bude glycerol dostávat do buňky a buňka se přechodně scvrkne. Glycerol pomalou difúzí do buňky dosáhne rovnováhy na obou stranách membrány, vyrovná se i množství vody a buňka se vrátí do původní velikosti. Na druhé straně, pokud buňky obsahují kryoprotektant a zředí se roztokem bez kryoprotektantu (ředidlo nebo tekutina pohlavního ústrojí klisny), voda bude pronikat do buněk ve snaze naředit koncentraci kryoprotektantu rychleji, než bude kryoprotektant unikat z buňky, a v důsledku toho bude buňka bobtnat (Hammersted et al., 1990; Amann, 1999; Meryman, 2007). Kryoprotektant pomalou difúzí dosáhne rovnováhy a pokud buňka nepraskla, získá svůj původní objem.

Schopnost buněk odolávat prasknutí závisí na propustnosti membrány vůči kryoprotektantu a vodě (buňka bude bobtnat méně s kryoprotektanty, které difundují přes membránu rychleji) (Graham, 2011). Záleží rovněž na toleranci k změnám osmotického tlaku a na velikosti a tvaru buňky (Hammersted et al., 1990; Meryman, 2007).

3.3.1.4 Obaly – pejetý, tuby

Zpočátku bylo sperma mraženo a uskladňováno v peletách (Merkt et al., 1975). Používání pelet se neprokázalo jako dobrý způsob ukládání hřebčích inseminačních dávek, jak je vidět ze studií Pace a Sullivan (1975) a Klug et al. (1975) při hodnocení procenta zabřeznutí. Později se ukládalo do hliníkových tub (Love et al., 1989) a 1 ml, 2,5 ml, 4 ml a 5 ml pejet (Martin, 1979; Loomis et al., 1983).

Nejvyužívanějším obalem jsou dnes polypropylenové nebo polyvinylchloridové trubičky - pejetý, díky snadné identifikaci a skladování (Amann, 1998). V koňské reprodukci se používají 0,5 ml, výjimečně 0,25 ml pejetý, jejichž poměr povrch / objem umožňuje rovnoměrné chlazení, zmrazení a rozmrazení (Love et al., 1989; Sieme, 2011a).

Ve studii Nascimento et al. (2008) porovnávali u hřebčích kryokonzervovaných dávek pejetý o objemu 0,25 ml nebo 0,5 ml. Ze všech klíčových vlastností hodnocených v tomto experimentu po rozmrazení, pouze křivočará rychlost (VCL) byla odlišná mezi vzorky uloženými v 0,5 ml a 0,25 ml pejetých. VCL byla vyšší v 0,25 ml pejetých. Na základě experimentu lze říci, že charakteristiky po rozmrazení nejsou závislé na objemu pejetý, ale na dostupnosti kryokonzervačních látek jednotlivým buňkám dávky. Stejně objemy porovnávali u hřebců Clulow et al. (2008) a došli ke shodnému závěru, že rozdílné objemy neměly efekt na celkovou a progresivní motilitu, morfologii ani stav akrozómu. Nicméně Maziero et al. (2013) zjistili při porovnání mražení hřebčích dávek v pejetých o objemu 0,25 ml a 0,5 ml všechny parametry lepší v objemu 0,5 ml při hodnocení po rozmrazení pomocí CASA.

Lorenzoni et al. (2011) porovnávali úspěšnost mražení hřebčích spermií v ředidlech INRA82 a Nagasa a ve dvou typech obalů 0,5 ml pejetých a 2 ml kryotubách. V odlišných typech obalů nebyly zaznamenány žádné rozdíly v testovaných charakteristikách po rozmrazení. Ani mezi kombinacemi ředidla a obalu nebyla zjištěna žádná interakce a vliv na motilitu. Avšak Kneissl (1993) zaznamenali lepší výsledky po rozmrazení u semene uloženého v 0,5 ml pejetých v porovnání se 4 ml makrotubami.

Naopak ve studii Saragusty et al. (2007), kde bylo hřebčí sperma mraženo v 0,5 ml pejetých a 12 ml skleněných tubách, byly ve větším objemu po rozmrazení zjištěny

signifikantně lepší parametry (motilita, viabilita, HOS test) než v klasických plastových pejetách.

Córdova et al. (2013) porovnávali u kanců pejety o objemu 5 ml a 0,5 ml. Mražené vzorky byly hodnoceny ihned po rozmražení a po 5 hodinách inkubace při 15 °C. Ihned po rozmražení nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi vzorky mraženými v rozdílných objemech (motilita, schopnost oplození při IVF). Bez ohledu na objem pejety, se po 5 hod inkubace všechny parametry významně snížily. Nicméně spermie v 5 ml objemu vykazovaly ve všech parametrech lepší hodnoty než v pejetě o objemu 0,5 ml.

Pro mražení beraního semene bylo zjištěno, že objem 0,5 ml zlepšuje motilitu po rozmražení v porovnání s pejetami o objemu 0,25 ml. Autoři předpokládají, že je to z důvodu rozdílnosti povrchu pejet, která vede k pomalejšímu mražení větší pejety, což je pro beraní spermie přínosné (Maxwell et al., 1995).

Při hodnocení procenta zabřeznutí po inseminaci kryokonzervovanou hřebčí dávkou dosahují nejlepší výsledky (49-76%) dávky mražené v pejetách o objemu 0,5 ml (Sieme et al., 2003; Vidament, 2005; Barbacini et al., 2008), ale podobných výsledků bylo dosaženo i s hliníkovými makrotubami o objemu 4 ml (56%) (Müller, 1987). Love et al. (1989) porovnávali úspěšnost inseminace kryokonzervovanými dávkami v 4 ml plastových pejetách a 10-12 ml hliníkových tubách u hřebců. Procento zabřeznutí nebylo signifikantně rozdílné.

Použití makrotub k inseminaci je jednodušší, protože celý objem ID je v jedné tubě, na rozdíl od nutnosti použít k inseminaci větší množství pejet. Inseminační dávky uložené v makrotubách jsou výhodné kvůli snížení rizika kontaminace a eliminaci záměny nebo ztráty pejet. Při uskladnění genetického mraženého materiálu v kryobankách by mohlo použití makrotub zredukovat uskladňovací náklady a prostor. ID ve větších tubách mohou být také lépe označené a identifikovatelné. Pokud je potřeba dávky vyjmout z tekutého dusíku, může vlivem vzrůstající teploty dojít k poškození buněk uložených v pejetách rychle po vytažení mimo kontejner vlivem rekrystalizace. Semeno uložené ve velkoobjemovém obalu se ohřeje na rizikovou teplotu -100°C při pokojové teplotě za déle než 2 minuty po odebrání z tekutého dusíku, což poskytuje dostatek času na identifikaci či přesun dávky (Saragusty et al., 2007). U 5 ml obalů vlivem velkého poměru objem/povrch dochází k pomalému přenosu tepla od povrchu ke středu, což ovlivňuje rychlost změny teploty buněk uprostřed dávky a to může mít vliv na homeostázu a citlivost spermií (Córdova et al., 2013).

K plnění pejet se používají automatizovaná nebo poloautomatizovaná plnicí zařízení využívající k jejich naplnění podtlak a zároveň je i automaticky utěsňují. Každá dávka musí

být jasně označena: jméno a identifikační číslo hřebce, jméno nebo registrační číslo reprodukčního centra a datum odběru (Sieme, 2011a; Brinsko et al., 2011).

3.3.1.5 Mražení ID

K mražení ID se používají páry kapalného dusíku v aktivně nebo pasivně kontrolovaném mrazícím přístroji. Balené sperma je horizontálně umístěno do dusíkatých par ve stanovené výšce (1-4 cm) nad hladinou kapalného dusíku (Loomis, 2011; Brinsko et al., 2011). Kontrolovaná rychlost mražení buněk a aktivní ovládání rychlosti chlazení v průběhu různých fází ochlazovací křivky vede k optimalizaci buněčného přežití (Loomis, 2011).

Jestliže proces mražení spermií nepoškodí, následným skladováním v kapalném dusíku není ovlivněna jejich integrita, jelikož metabolická aktivita při této teplotě je zanedbatelná. Buňky jsou při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve stavu anabiózy s maximálním omezením všech životních funkcí (Brinsko et al., 2011). Pejety jsou ponořeny do kapalného dusíku ve speciálních tancích. 5 ml pejety jsou zaváděny do tanků přímo, 0,5 ml pejety se umísťují do plastových goblet, které jsou zavěšeny na jednotlivých závěsech (Obrázek 3.1) (Brinsko et al., 2011).



Obrázek 3.1: Kontejner s kapalným dusíkem (<http://kone-jansky.cz/nabidka-sluzeb>)

3.3.1.6 Rozmražení ID

Většinou se ID rozmrazují ve vodní lázni při teplotě $37\text{-}39\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Graham, 2011). Teplota rozmrazování je obecně dána velikostí pejety. 0,5 ml pejety lze rozmrazit ve vodní lázni o

teplotě 37 °C za 30 sekund (Sieme, 2011a; Brinsko et al., 2011; Lorenzoni et al., 2011). Vždy je bezpečné rozmrazení při 37 °C, protože nedojde k poškození spermií, i když jsou pejety ponechány v lázni nad stanovený čas (Loomis, 2011). Někteří autoři preferují rozmrazování při 40 °C po dobu 15 s, nebo 38 °C po dobu 30 s (Sieme, 2011a), jiní doporučují rozmrazení 0,5 ml pejety při teplotě 46 °C po dobu 20 s. (Brinsko et al., 2011).

Velkoobjemové pejety 4-5 ml se rozmrazují po dobu 40-42 sekund při teplotě lázně 50 °C (Brinsko et al., 2011). Córdova et al. (2013) rozmrazovali kančí ID v 5 ml pejetách po dobu 40 sekund a teplotě 42°C. Lorenzoni et al. (2011) rozmrazovali tuby o objemu 2 ml při teplotě 50°C po dobu 100 sekund. Hřebčí ID uložené ve velkoobjemových tubách ve studii Saragusty et al. (2007) rozmrazovali při teplotě 37°C po dobu 1 minuty po 90 s při pokojové teplotě (22-23°C).

3.3.1.6.1 Hodnocení ID po rozmrazení

Z každého zmraženého ejakulátu je vybrána jedna pejeta, která je rozmrazena a hodnocena. Rozmražené sperma se naředí na koncentraci 20-30 mil / ml a inkubuje v 37 °C po dobu 30 minut a poté je vyhodnocena motilita (Loomis, 2011).

Po rozmrazení je hodnocena koncentrace spermií. U zmražené ID určené ke komerčnímu využití musí deklarovaný objem obsahovat minimálně 200 mil. progresivně pohyblivých spermií a nejméně 30 % spermií po 30 minutách inkubace při 37 °C by mělo být progresivně pohyblivých (Loomis, 2011). Minimální hodnoty motility se mezi jednotlivými centry liší, pohybují se v rozmezí 25-40 %, nejčastěji 30-35 % (Sieme, 2011a).

3.3.1.7 Poškození buněk během mražení

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

osmotické změny v průběhu přidávání a odstraňování kryoprotektantu (Hammersted et al., 1990; Amann, 1999; Meryman, 2007).

U většiny buněk je příčinou smrti během mražení a rozmrazování tvorba intracelulárního ledu a poškození membrány (Hammersted et al., 1990; Meryman, 2007). Rychlost chlazení ovlivňuje míru zamrznutí a hypertonické změny v nezamrzlých kanálcích, které probíhají před vitifikací (Graham, 2011). Pokud jsou buňky chlazeny příliš rychle, intracelulární voda nemá dostatek času opustit buňku a dojde k vytvoření intracelulárního ledu (Amann, 1999). Na druhé straně, je-li teplota snižována příliš pomalu, mohou být buňky vystaveny nadměrným hypertonickým podmínkám příliš dlouho, než dojde k vitifikaci (Graham, 2011).

3.3.2 Kryokonzervace a apoptóza

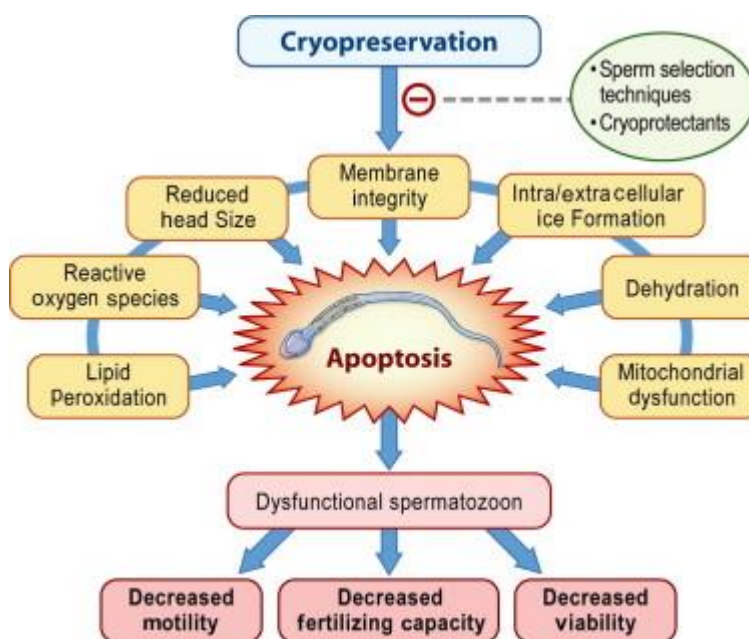
Kryokonzervace indukuje buněčnou smrt a poškození přeživších buněk v samičím pohlavní ústrojí nebo in vitro (Watson, 2000; Ortega-Ferrusola et al., 2008; Caselles et al., 2014). Smrt spermií apoptózou v důsledku kryokonzervace byla popsána například u hřebce (Ortega-Ferrusola et al., 2008), skotu (Martin et al., 2004) a lidského semene (Said et al., 2010).

Toxicita nerovnoměrné distribuce kryoprotektantů (př. glycerolu) a osmotický stres způsobený dehydratací spolu s fázovými přechody v plasmatické membráně, oxidačním stresem, předčasným stárnutím a fenoménem apoptózy byly uznány jako hlavní faktory vysvětlující sníženou životnost kryokonzervovaných spermií (Obrázek 3.2) (Gao et al., 1993; Martin et al., 2004; 2007; Morris et al., 2007; Ortega-Ferrusola et al., 2008; Said et al., 2010). Všechny tyto faktory vedou ke snížení životnosti zmražených spermií v samičím reprodukčním ústrojí. Tato skutečnost je obzvláště problematická u druhů, jako jsou koně, kteří mají dlouhé období říje, vyžadující pečlivou diagnózu načasování ovulace a oplodnění (Ortega-Ferrusola et al., 2008).

Studie u lidských spermií a skotu (Duru et al., 2001; Martin et al., 2004; 2007; Paasch et al., 2004a; 2004b; 2005; Wünderlich et al., 2006) ukazují, že zmrazování/rozmrazování vyvolává jev podobný apoptóze, který může vysvětlit sníženou životnost přežívající populace spermií. Identifikace buněčných a molekulárních mechanismů zodpovědných za sníženou životnost a jejich kontrola bude mít obrovský dopad na odvětví koňské reprodukce. Mražené/rozmražené spermie se zvýšenou dobou životnosti v samičím pohlavním ústrojí by

snížily požadavky na pracovní sílu (časté ultrazvukové vyšetření klisny) spojené s umělým oplodněním mraženou ID (Ortega-Ferrusola et al., 2008).

U jedinců stejného druhu a mezi druhy existují velké rozdíly v mrazitelnosti spermatu (Giraud et al., 2000; Nuñez-Martinez et al., 2007). U hřebců jsou výrazné rozdíly v mrazitelnosti a přežitelnosti vzhledem k jejich individualitě. Standardizovat protokol pro kryokonzervaci hřebčího spermatu je tedy složitým úkolem vyžadujícím další výzkumy (Caselles et al., 2014).



Obrázek 3.2: Schéma škodlivých účinků kryokonzervace na integritu spermií a souvisejících událostí, které vedou k apoptóze a poklesu funkce spermií. Využití vhodných technik odběru spermií a kryoprotekce by měly vést k minimalizaci těchto nepříznivých účinků (Said et al., 2010).

3.3.2.1 Zvýšené množství apoptotických spermií v rozmraženém ejakulátu

Studie ukázaly, že markery pro apoptózu se zvyšují u spermií po kryokonzervaci a rozmražování. Kryokonzervace zvýšila projevy apoptózy včetně potenciálu mitochondriální membrány, aktivace kaspáz, permeability membrány a externalizaci fosfatidylserinu (Martin et al., 2004).

Změna v tekutosti mitochondriální membrány, která vzniká při kryokonzervaci, vede ke zvýšení jejího potenciálu a uvolnění ROS. Následně ROS způsobují poškození DNA ve spermiích (Said et al., 2010). Bylo popsáno, že produkce ROS lidskými spermii a semennými leukocyty se zvýšila po ochlazení na 4 ° C (Wang et al., 1997). Tím pádem kryokonzervované vzorky obsahující leukocyty mohou být náchylnější k fragmentaci DNA (Said et al., 2010). Kromě toho, proces kryokonzervace vede ke snížení antioxidační aktivity spermií a ty jsou pak více citlivé na poškození indukovaná ROS (Lasso et al., 1994).

Po kryokonzervaci dochází vlivem ROS k nárůstu spermií s peroxidací lipidů, s narušenou membránovou integritou, potenciálem mitochondriální membrány a s kaspázovou aktivitou (Ortega-Ferrusola et al., 2009a; Gallardo Bolaños et al., 2012), což všechno indikuje probíhající apoptózu. Byla zjištěna vysoká negativní korelace mezi množstvím spermií s peroxidací lipidů a spermii s intaktní membránou a také se spermii s vysokým membránovým potenciálem mitochondrií. Peroxidace lipidů také významně korelovala s kaspázovou aktivitou (Ortega-Ferrusola et al., 2009a). Aktivní kaspázy 3,7,9 byly detekovány u hřebčích spermií (Ortega-Ferrusola et al., 2008) což naznačuje spuštění vnitřní dráhy apoptózy vlivem kryokonzervace.

Kaspázová aktivita byla již dříve popsána u čerstvého lidského a býčího spermatu (Weng a kol., 2002; Martin et al., 2004; 2007). Nicméně, procento spermií s kaspázovou aktivitou bylo mnohem vyšší ve studii Ortega-Ferrusola et al. (2008) u hřebců. To lze vysvětlit pomocí dvou hypotéz – první je, že koňské spermie indukují imunologickou odpověď v děloze klisny po inseminaci a proto je možné, že většina spermií má být fagocytována a tak může být apoptotický mechanismus zapojený do přitažlivosti fagocytů, k odstranění ejakulátu z genitálií klisny. Apoptóza může být tedy fyziologický mechanismus odstraňování spermií v samičích pohlavních cestách, protože u hřebce jsou procenta apoptotických spermií vysoká (Ortega-Ferrusola et al., 2008; 2009a). Druhé vysvětlení může být ve vztahu k mikrobiální flóře ejakulátu (Ortega-Ferrusola et al., 2008). Studie u lidských spermií prokázaly, že přítomnost bakterií indukuje jejich apoptózu (Villegas, 2005). Hřebčí ejakulát obsahuje bohaté mikrobiální populace. Výsledek studie Ortega-Ferrusola et al. (2009b) naznačuje, že mikrobiální flóra hraje důležitou roli v apoptotickém poškození, které vzniká v průběhu konzervace. Autoři zde kladou důraz na hygienické zacházení, výběr antibiotik a možné odstranění bakterií před mražením (Ortega-Ferrusola et al., 2009b).

Srovnání čerstvého proti zmraženému ejakulátu ukázalo, že kryokonzervace významně zvyšuje procento spermií s aktivovanými kaspázami z 21% na 47%. Koncentrace aktivovaných kaspáz je u lidských spermií v pozitivní korelaci s rostoucí koncentrací

glycerolu od 7% do 14% (Grunewald et al., 2005). Předpokládá se, že glycerol může přispívat k aktivaci kaspáz přímo přes toxické účinky na mitochondrie během kryokonzervace spermií (Wünderlich et al., 2006).

Ve studii Caselles et al., 2014 zjistili, že hřebčí ejakuláty s vyšším množstvím apoptotických tělísek (a vyšší aktivitou kaspázy 3) byly více citlivé k poškození a stresu během procesu mražení a rozmrazování a vykazovaly sníženou motilitu a viabilitu oproti semenům s nižším procentem apoptotických tělísek. Spermie s nižší pohyblivostí jsou náchylnější k poškození mrazem a v důsledku toho mají nižší fertilizační schopnost (Borges et al., 2007).

3.3.2.2 Využití Yo-Pro 1 k detekci apoptotických buněk

Zvýšená propustnost membrány je znakem časně apoptózy jak u somatických buněk, tak u spermií (Peña et al., 2005; Ortega-Ferrusola et al., 2008). Toto zvýšení propustnosti je spojeno se skutečností, že apoptotické buňky začínají uvolňovat signály pro jejich vyhledání fagocyty. Jedněmi signály jsou nukleotidy ATP a UTP, jejichž uvolnění je závislé na propustnosti membrány (Elliott et al., 2009), stejnými kanály se dostává Yo-Pro 1 do buňky (Gallardo Bolaños et al., 2012).

Testy, které jsou schopné detekovat apoptotické spermie, mohou identifikovat vadné spermie v počátečních fázích poškození, a proto mohou lépe vypovídat o celkové kvalitě spermatu (Anzar et al., 2002). Použití Yo-Pro 1 je považováno za jednoduchou, rychlou, levnou a opakovatelnou metodu pro detekci apoptózy v somatických buňkách (Idziorek et al., 1995) a spermiích (Martin et al., 2004) a je běžně používán v laboratořích pro detekci časněho poškození spermií (Peña et al., 2005; Nuñez-Martinez et al., 2007; Ortega Ferrusola et al., 2009).

4 Materiál a metody

4.1 Odběr vzorků

Ejakulát byl odebrán od 6 starokladrubských hřebců v ERC s.r.o., Mnětice (CZ 53790026). Odběry probíhaly v období od listopadu 2014 do ledna 2015. Před odběrem za účelem výroby inseminačních dávek byli hřebci několikrát odebíráni, dokud nebyla ustálena spermatogeneze. Odběr probíhal standardním způsobem pomocí fantomu a umělé pochvy zkráceného typu, umožňující zachytit pouze spermatickou frakci ejakulátu.

4.2 Hodnocení ejakulátu

Ihned po odběru následovalo laboratorní hodnocení. Odebraný ejakulát v kalibrované baňce byl zvážen na laboratorních vahách (Electronic Precision Scale, RS 232 Minitübe, Německo) pro stanovení objemu. Pro zhodnocení motility byla umístěna kapka ejakulátu na podložní sklíčko umístěné na výhřevné destičce mikroskopu (Leica DM1000, Leica Microsystems). Subjektivně se stanovilo procentuální zastoupení motilních spermií pomocí fázového kontrastu. Koncentrace semene byla stanovena fotometricky (SDM 6, Minitübe, Německo). Dále byly zpracovány pouze vzorky splňující kritéria pro výrobu kryokonzervované inseminační dávky.

4.3 Mražení a rozmražení ID

Po hodnocení následovalo předředění ejakulátů a centrifugace (650 x g/15 min). Po odstředění byl odebraný supernatant rozdělen na dvě skupiny a ředěn ředidlem Gent – žloutkové ředidlo s glycerolem a antibiotiky (Minitübe, Německo) nebo laktózovým ředidlem (laktóza, destilovaná voda, 4,4% glycerolu, vaječný žloutek, citrát sodný, hydrogen uhličitán sodný, antibiotika, EDTA) na konečnou koncentraci minimálně 250×10^6 progresivních spermií v inseminační dávce (ID). Naředěné semeno se dále manuálně plnilo do dvou typů obalů – plastových pejet o objemu 0,5 ml nebo hliníkových tub o objemu 5 ml. Po dvouhodinové ekvilibraci při teplotě 5°C, byly dávky přesunuty do polystyrenového boxu a zmrazeny v horizontální poloze v parách tekutého dusíku. Po 15 minutách v parách tekutého dusíku byly ID uloženy v tanku s tekutým dusíkem. Před samotným pokusem se pejety a tuby rozmrazovaly ve vodní lázni o teplotě 37°C po dobu 30 - 60 sekund.

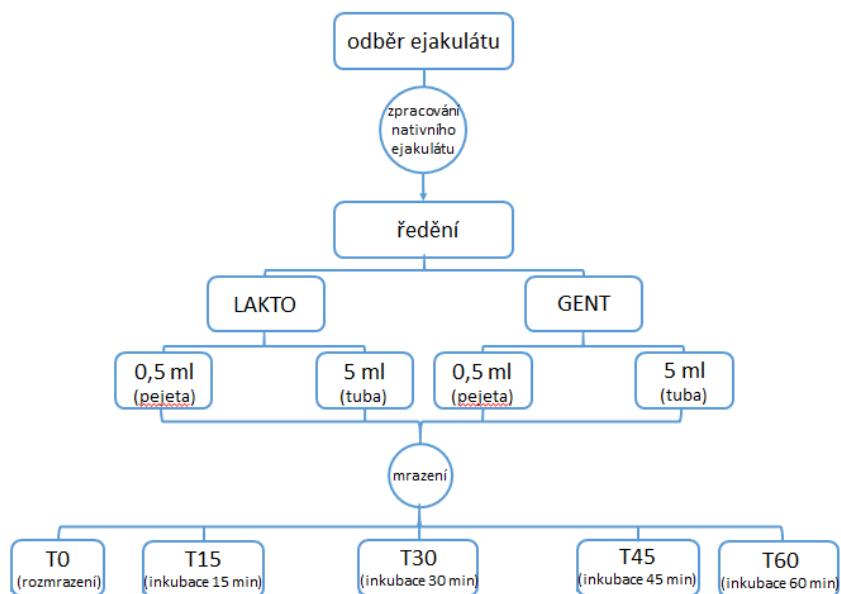
4.4 Detekce apoptotických spermií

Po rozmražení byly dávky ponechány ve vodní lázni o teplotě 37°C a v příslušných inkubačních časech bylo odebráno potřebné množství semene a dále zpracovávalo. ID se vždy hodnotily v čase 0 – ihned po rozmražení, a následně po 15, 30, 45 a 60 minutách od rozmražení. Před přidáním fluorochromů se odebraný vzorek dostatečně naředil Tyrodovým roztokem modifikovaným pro spermie (Sp-TALP) (114 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,34 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 10 mM laktát sodný, 2,0 mM CaCl₂ x 2H₂O, 0,5 mM MgCl₂ x 6H₂O, 10 mM HEPES, redestilovaná Milli-Q voda) na výsledný objem 50 µl. Po jemném promíchání se do naředěného vzorku přidaly 3 µl 25 µM Yo-Pro 1 (Y.P.1; Life Technologies, Grand Island, USA) a 2,5 µl 0,3 % roztoku formaldehydu pro fixaci buněk. Následovala inkubace 20 minut v temnu na vyhřevné desce o teplotě 37°C, po jejímž uplynutí bylo přidáno 0,75 µl 500µg/ml propidium jodidu (PI; Sigma-Aldrich, Saint Luis, MO). Po homogenizaci po dobu 1 minuty, byly umístěny 3 µl suspenze na podložní sklo a promíchány s 3 µl Vectashield/DAPI (Vector Labs, Burlingame, USA). Po překrytí krycím sklíčkem a zamontování laku následovalo hodnocení na fluorescenčním mikroskopu (Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japan).

Byly vyhodnocovány 2 kategorie spermií při vlnové délce 500-530 nm pomocí fluorescenčního mikroskopu. Hodnotilo se minimálně 100 spermií na vzorek. Spermie apoptotické (Y.P.1 pozitivní) emitují zelenou nebo žlutou barvu. Během raných fází apoptózy dochází ke změně propustnosti membrány, která tak selektivně umožňuje vstup některých DNA vázajících molekul. Vlivem poškození procesem kryokonzervace je zpočátku membrána propustná pro Y.P.1, nikoli však pro PI. Mrtvé/nekrotické spermie, jejichž membrána je plně propustná pro PI, jsou červeně zbarvené. Intaktní (živé) buňky nepropouští ani jeden fluorochrom a zůstávají tak neobarvené, zvýrazněné pomocí DAPI vázající se na chromatin všech buněk.

4.5 Schéma pokusu

Naředěním dvěma odlišnými ředidly a plněním do dvou typů obalů vznikly 4 skupiny vzorků - kombinace ředidlo/obal, které byly zmrazeny a hodnoceny po rozmražení v různých časech inkubace (Obrázek 4.1).



Obrázek 4.1: Schématické znázornění postupu

4.6 Statistická analýza

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu Statistica (ver. 10, StatSoft, CZ). Pro vyhodnocení zastoupení jednotlivých kategorií spermií v ejakulátu byly použity vhodné statistické metody. Po zhodnocení normálního rozdělení a homogenity rozptylů (Shapiro-Wilkův a Levenův test) byla použita vhodná analýza rozptylu – jednofaktorová a vícefaktorová ANOVA. Data byla hodnocena na hladině významnosti $p < 0,05$.

5 Výsledky

Tabulka 1: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v ředidlech GENT a LAKT.

ředidlo	t0	t15	t30	t45	t60
GENT (N=115)	4,2 ± 0,2 ^{1,a}	3,2 ± 0,2 ^a	3,1 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,2 ^{2,a}	3,0 ± 0,2 ^{2,a}
LAKT (N=128)	2,0 ± 0,2 ^{1,b}	1,7 ± 0,2 ^b	1,3 ± 0,2 ^{2,b}	1,3 ± 0,2 ^{2,b}	1,5 ± 0,2 ^b

^{1,2}rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

^{a,b}rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

U inseminačních dávek kryokonzervovaných v ředidle GENT došlo s vzrůstajícím časem inkubace k poklesu výskytu apoptotických spermií (Tabulka 1), statisticky významný byl rozdíl pozorován mezi časem t0 a t45 a t0 a t60 (p<0,05). V laktózovém ředidle (LAKT) byl významný pokles procenta apoptotických spermií zaznamenán mezi časem t0 a t30 a t0 a t45 (p<0,05). Výskyt apoptotických spermií nebyl v dalších případech ovlivněn dobou inkubace (p>0,05). Průměrné zastoupení apoptotických spermií se signifikantně liší mezi použitými ředidly ve všech časech inkubace (p<0,05).

Tabulka 2: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií v použitých ředidlech GENT a LAKT.

ředidlo	t0	t15	t30	t45	t60
GENT (N=115)	29,6 ± 2,4 ¹	30,2 ± 2,4 ^{1,2}	38,3 ± 2,4 ^a	38,5 ± 2,4 ^{2,3}	42,5 ± 2,4 ³
LAKT (N=128)	20,2 ± 2,3 ¹	22,0 ± 2,3 ^{1,2}	25,1 ± 2,3 ^b	30,4 ± 2,3 ^{2,3}	33,8 ± 2,3 ³

^{1,2}rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

^{a,b}rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Jak udává tabulka 2, v inseminačních dávkách s ředidlem GENT byl pozorován statisticky významný rozdíl v zastoupení apoptotických spermií z celkového množství živých spermií mezi časem t0 a t45 a t0 a t60 a také mezi časy t15 a t60 (p<0,05). Stejně tak v laktózovém ředidle došlo během doby inkubace k nárůstu procentuálního zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých. Byl pozorován statisticky významný rozdíl mezi časem t0 a t45 a t0 a t60 a také mezi časy t15 a t60 (p<0,05). Průměrný výskyt apoptotických spermií z celkového počtu živých se signifikantně liší v závislosti na použitém ředidle v inkubačním čase t30 (p<0,05), v ostatních časech nebyly mezi ředidly pozorovány významné rozdíly (p>0,05).

Tabulka 3: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách v závislosti na objemu obalu – 0,5 ml a 5 ml.

obal	t0	t15	t30	t45	t60
0,5 ml (N=126)	2,4 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2
5 ml (N=117)	3,6 ± 0,2 ^{1,b}	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,2 ²	2,4 ± 0,2 ²

^{1,2}rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

^{a,b}rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Z tabulky 3 je zřejmé, že u inseminačních dávek kryokonzervovaných v 5 ml tubách byl pozorován statisticky významný pokles apoptotických spermií mezi časem t0 a t45 a t0 a t60 (p<0,05). U dávek zmražených v 0,5 ml pejetách nebyl zaznamenán statisticky významný vliv doby inkubace na zastoupení apoptotických spermií (p>0,05). Průměrné procento apoptotických spermií se signifikantně liší mezi použitými obaly pouze ihned po rozmražení t0 (p<0,05), se vzrůstající dobou inkubace nebyly zaznamenány významné rozdíly (p>0,05).

Tabulka 4: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií v závislosti na objemu obalu – 0,5 ml a 5 ml.

obal	t0	t15	t30	t45	t60
0,5 ml (N=126)	26,6 ± 2,4 ¹	28,4 ± 2,4 ^{1,2}	31,9 ± 2,3 ^{1,2,3}	38,6 ± 2,3 ^{2,3}	43,3 ± 2,3 ^{4,a}
5 ml (N=117)	22,5 ± 2,4	23,1 ± 2,4	30,8 ± 2,4	29,5 ± 2,4	32,1 ± 2,4 ^b

^{1,2}rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

^{a,b}rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Průměrné procentuální zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií v 0,5 ml pejetách během doby inkubace vzrůstá (Tabulka 4). Signifikantně se liší množství apoptotických spermií z živých v čase t0 a t45 a t0 a t60. Po hodině inkubace (t60) se signifikantně zvýšil výskyt apoptotických spermií z celkového počtu živých v porovnání s hodnotami v časech t15, t30 a t45 (p<0,05). V 5 ml tubách nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly mezi různými časy inkubace (p>0,05). Mezi použitými obaly byl významný rozdíl v zastoupení apoptotických spermií z celkového množství živých po hodinové inkubaci (t60) (p<0,05).

Tabulka 5: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách v závislosti na ředidle a objemu obalu.

Ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
GENT 5 ml (N=47)	6,7 ± 0,3 ^{1,a}	5,4 ± 0,3 ^a	5,3 ± 0,3 ^a	4,6 ± 0,3 ^{2,a}	4,5 ± 0,3 ^{2,a}
LAKT 5 ml (N=70)	1,5 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,3 ^b	1,0 ± 0,3 ^b	0,9 ± 0,3 ^b	1,0 ± 0,3 ^b
LAKT 0,5 ml (N=58)	2,4 ± 0,3 ^b	2,4 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^b	2,0 ± 0,3 ^b
GENT 0,5 ml (N=68)	2,4 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^b	1,8 ± 0,3 ^b	2,0 ± 0,3 ^b

^{1,2}rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

^{a,b}rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Vliv použitých ředidel a obalů vybraných pro kryokonzervaci hřebčích inseminačních dávek na průměrný výskyt apoptotických spermií shrnuje tabulka 5. Procento apoptotických spermií v ředidle GENT v 5 ml tubě se signifikantně liší v čase inkubace t0 a t45 a t0 a t60 (p<0,05). U ostatních kombinací objemů a ředidel nebyl zaznamenán v množství apoptotických spermií mezi časy inkubace žádný statisticky významný rozdíl (p>0,05). V inseminačních dávkách kryokonzervovaných s ředidlem GENT v 5 ml tubách bylo pozorováno procento apoptotických spermií statisticky významně vyšší v porovnání s ostatními hodnocenými variantami ve všech časech inkubace (p<0,05).

Tabulka 6: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií v závislosti na ředidle a objemu obalu.

ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
GENT 5 ml (N=47)	35,0 ± 3,7 ^a	36,0 ± 3,7 ^a	48,2 ± 3,7 ^a	41,0 ± 3,7 ^a	42,9 ± 3,7
LAKT 5 ml (N=70)	14,1 ± 3,0 ^b	14,5 ± 3,0 ^b	19,1 ± 3,0 ^b	21,8 ± 3,0 ^b	24,8 ± 3,0 ^a
LAKT 0,5 ml (N=58)	27,6 ± 3,3 ¹	31,1 ± 3,3	32,2 ± 3,3	40,7 ± 3,3 ^{a,c}	44,6 ± 3,3 ^{2,b}
GENT 0,5 ml (N=68)	25,8 ± 3,1 ¹	26,2 ± 3,1 ^{1,2}	31,6 ± 3,1	36,9 ± 3,1	42,2 ± 3,1 ^{3,b}

^{1,2}rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

^{a,b}rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Průměrné množství apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií ve vyrobených inseminačních dávkách během inkubace vzrůstalo u všech typů použitých ředidel a obalů (Tabulka 6). Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán při použití laktózového ředidla a 0,5 ml pejet mezi časem t0 a t60 a u ředidla GENT a 0,5 ml pejet mezi časem t0 a

t60 a také mezi časem t15 a t60 ($p < 0,05$). Ihned po rozmražení (t0), v časech t15, t30 i t45 byl v inseminačních dávkách pozorován významný rozdíl v zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých mezi ředidly GENT a LAKT při použití 5 ml tub ($p < 0,05$). V čase t45 byl také zaznamenán rozdíl mezi objemy 5 ml a 0,5 ml v laktózovém ředidle ($p < 0,05$). Po hodinové inkubaci (t60) byly zaznamenány signifikantní rozdíly v zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých mezi kombinací LAKT 5 ml a LAKT 0,5 ml a LAKT 5 ml a GENT 0,5 ml ($p < 0,05$).

Tabulka 7: Průměrné zastoupení apoptotických spermií u jednotlivých hřebců v závislosti na použitém ředidle.

Hřelec	Ředidlo	t0	t15	t30	t45	t60
Siglavi	GENT (N=25)	4,9 ± 0,5 ^a	4,2 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,5	2,8 ± 0,5 ^a
	LAKT (N=25)	2,4 ± 0,5 ^{a,b,d}	2,3 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,5
Favory Albuza	GENT (N=20)	2,7 ± 0,6 ^{a,b,d}	2,2 ± 0,6	2,3 ± 0,6	1,9 ± 0,6	3,0 ± 0,6
	LAKT (N=24)	2,1 ± 0,5 ^{a,b,d}	2,0 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,5
Aversa	GENT (N=25)	2,8 ± 0,5 ^{a,b,d}	2,5 ± 0,5	2,8 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,3 ± 0,5
	LAKT (N=27)	1,0 ± 0,5 ^b	0,8 ± 0,5 ^b	0,9 ± 0,5	0,8 ± 0,5	0,9 ± 0,5 ^a
Santalina	GENT (N=13)	3,3 ± 0,7	2,8 ± 0,7	2,4 ± 0,7	1,9 ± 0,7	2,5 ± 0,7
	LAKT (N=17)	1,3 ± 0,6 ^b	1,0 ± 0,6	0,7 ± 0,6 ^a	0,4 ± 0,6	0,6 ± 0,6 ^a
Manida	GENT (N=16)	6,9 ± 0,6 ^{a,c,d}	4,1 ± 0,6	4,1 ± 0,6 ^b	3,5 ± 0,6	4,7 ± 0,6 ^b
	LAKT (N=15)	2,6 ± 0,6	1,9 ± 0,6	1,9 ± 0,6	1,3 ± 0,6	2,6 ± 0,6
Sacramoso Mantova	GENT (N=16)	5,0 ± 0,6 ^{a,c,d}	3,4 ± 0,6	3,7 ± 0,6	3,8 ± 0,6	3,1 ± 0,6
	LAKT (N=20)	2,6 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,7 ± 0,6

^{a,b,c,d} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$)

Z tabulky 7 je patrné, že u jednotlivých hřebců nebylo množství apoptotických spermií ovlivněno dobou inkubace ($p > 0,05$). Avšak při porovnání všech hodnocených hřebců v jednotlivých časech inkubace byl prokázán vliv individuality hřebce ($p < 0,05$) kromě času t45.

Tabulka 8: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií u jednotlivých hřebců v závislosti na použitém ředidle.

hřelec	Ředidlo	t0	t15	t30	t45	t60
Siglavi	GENT (N=25)	24,9 ± 4,7	25,8 ± 4,7	25,6 ± 4,7 ^a	28,2 ± 4,7 ^{a,c}	35,4 ± 4,7
	LAKT (N=25)	17,3 ± 4,7	24,3 ± 4,7	21,0 ± 4,7 ^a	25,6 ± 4,7 ^{a,c}	25,1 ± 4,7 ^{a,d}
Favory Albuza	GENT (N=20)	15,4 ± 5,2 ^a	17,0 ± 5,2	19,8 ± 5,2 ^a	21,6 ± 5,2 ^a	33,3 ± 5,2 ^{a,c,d}
	LAKT (N=24)	14,9 ± 4,8 ^a	17,3 ± 4,8	15,4 ± 4,8 ^{a,b}	20,4 ± 4,8 ^a	29,4 ± 4,8 ^{a,d}
Aversa	GENT (N=25)	20,8 ± 4,7	24,6 ± 4,7	32,0 ± 4,7	25,9 ± 4,7 ^{a,c}	34,3 ± 4,7
	LAKT (N=27)	9,4 ± 4,5 ^a	11,6 ± 4,5 ^a	13,6 ± 4,5 ^{a,b}	16,7 ± 4,5 ^a	13,7 ± 4,5 ^a
Santalina	GENT (N=13)	37,9 ± 6,5	36,0 ± 6,5	55,1 ± 6,5 ^{a,c}	52,3 ± 6,5	48,3 ± 6,5
	LAKT (N=17)	23,9 ± 5,7	21,3 ± 5,7	33,8 ± 5,7	27,5 ± 5,7 ^{a,c}	31,4 ± 5,7 ^{a,c,d}
Manida	GENT (N=16)	49,3 ± 5,8 ^b	47,0 ± 5,8 ^b	62,9 ± 5,7 ^{c,d}	62,8 ± 5,7 ^{b,c}	66,5 ± 5,7 ^{b,c,d}
	LAKT (N=15)	30,3 ± 6,0	27,8 ± 6,0	42,4 ± 6,0	43,2 ± 6,0	56,1 ± 6,0 ^d
Sacramoso Mantova	GENT (N=16)	41,8 ± 5,8	40,7 ± 5,8	51,3 ± 5,8 ^{a,c,d}	58,9 ± 5,8 ^c	47,7 ± 5,8
	LAKT (N=20)	34,0 ± 5,2	35,1 ± 5,2	36,6 ± 5,2	59,5 ± 5,2 ^{b,c}	62,2 ± 5,2 ^{c,d}

^{a,b,c,d} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Z tabulky 8 je zřejmé, že u jednotlivých hřebců nebylo množství apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií ovlivněno dobou inkubace (p>0,05). Avšak při porovnání všech hodnocených hřebců v jednotlivých časech inkubace byl prokázán vliv individuality hřebce (p<0,05).

Tabulka 9: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách v závislosti na hřebci a objemu obalu.

hřelec	obal	t0	t15	t30	t45	t60
Siglavi	0,5 ml (N=26)	2,8 ± 0,5	2,6 ± 0,5	1,6 ± 0,5	1,7 ± 0,5	2,0 ± 0,5
	5 ml (N=24)	4,6 ± 0,5 ^a	4,0 ± 0,5	3,1 ± 0,5	3,1 ± 0,5	2,0 ± 0,5
Favory Albuza	0,5 ml (N=24)	1,9 ± 0,5	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,5
	5 ml (N=20)	2,9 ± 0,6	2,5 ± 0,6	2,2 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,9 ± 0,6
Aversa	0,5 ml (N=27)	1,4 ± 0,5 ^b	1,0 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,0 ± 0,5	1,3 ± 0,5
	5 ml (N=25)	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,5	2,4 ± 0,5	2,4 ± 0,5	1,9 ± 0,5
Santalina	0,5 ml (N=15)	2,0 ± 0,7	1,5 ± 0,7	1,3 ± 0,7	1,0 ± 0,7	1,2 ± 0,7
	5 ml (N=15)	2,3 ± 0,7	2,1 ± 0,7	1,6 ± 0,7	1,0 ± 0,7	1,7 ± 0,7
Manida	0,5 ml (N=14)	4,3 ± 0,7	3,0 ± 0,7	3,2 ± 0,7	3,1 ± 0,7	4,1 ± 0,7
	5 ml (N=17)	5,3 ± 0,6 ^{a,c}	3,1 ± 0,6	3,0 ± 0,6	1,9 ± 0,6	3,2 ± 0,6
Sacramoso Mantova	0,5 ml (N=20)	3,2 ± 0,6	2,7 ± 0,6	1,9 ± 0,6	2,3 ± 0,6	2,5 ± 0,6
	5 ml (N=16)	4,3 ± 0,7	2,7 ± 0,7	3,9 ± 0,7	3,6 ± 0,7	3,3 ± 0,7

^{a,b,c} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$)

Jak vyplývá z tabulky 9, u jednotlivých hřebců nebylo množství apoptotických spermií ovlivněno dobou inkubace ($p > 0,05$). Signifikantní rozdíl v průměrném množství apoptotických spermií mezi hřebci a obaly byl zaznamenán pouze v inkubačním čase t0 mezi hřebcem Aversou v 0,5 ml pejetě a hřebci Manidou a Siglavim v 5 ml tubě ($p < 0,05$). V ostatních časech nebyly zaznamenány mezi jednotlivými hřebci a typy použitých obalů žádné statisticky významné rozdíly procentuálního zastoupení apoptotických spermií ($p > 0,05$).

Tabulka 10: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých v závislosti na hřebci a objemu použitého obalu.

hřelec	Obal	t0	t15	t30	t45	t60
Siglavi	0,5 ml (N=26)	21,8 ± 4,6	26,8 ± 4,6	24,5 ± 4,6 ^a	31,5 ± 4,6 ^{a,d}	37,3 ± 4,6 ^{a,c}
	5 ml (N=24)	20,3 ± 4,8	23,2 ± 4,8	22,0 ± 4,8 ^a	21,8 ± 4,8 ^{a,d}	22,5 ± 4,8 ^a
Favory Albuza	0,5 ml (N=24)	16,3 ± 4,8	18,4 ± 4,8	18,8 ± 4,8 ^a	21,8 ± 4,8 ^{a,d}	34,0 ± 4,8 ^{a,c}
	5 ml (N=20)	13,6 ± 5,3	15,6 ± 5,3	15,8 ± 5,3 ^a	19,8 ± 5,3 ^a	27,7 ± 5,3 ^a
Aversa	0,5 ml (N=27)	16,7 ± 4,5	17,8 ± 4,5	20,9 ± 4,5 ^a	21,4 ± 4,5 ^a	27,7 ± 4,5 ^a
	5 ml (N=25)	13,0 ± 4,7	17,8 ± 4,7	24,2 ± 4,7 ^a	20,9 ± 4,7 ^a	19,2 ± 4,7 ^a
Santalina	0,5 ml (N=15)	32,0 ± 6,1	26,2 ± 6,1	41,2 ± 6,1	48,9 ± 6,1	40,6 ± 6,1 ^{a,c}
	5 ml (N=15)	28,0 ± 6,1	29,2 ± 6,1	44,9 ± 6,1	27,6 ± 6,1 ^{a,d}	36,8 ± 6,1 ^{a,c}
Manida	0,5 ml (N=14)	48,8 ± 6,3	48,0 ± 6,3	64,7 ± 6,1 ^b	66,9 ± 6,1 ^{b,c,d}	76,8 ± 6,1 ^{b,c}
	5 ml (N=17)	32,9 ± 5,7	29,2 ± 5,7	43,2 ± 5,7	41,8 ± 5,7	48,2 ± 5,7
Sacramoso Mantova	0,5 ml (N=20)	39,1 ± 5,3	44,8 ± 5,3	40,3 ± 5,3	62,3 ± 5,3 ^{c,d}	60,0 ± 5,3 ^c
	5 ml (N=16)	35,5 ± 5,9	28,7 ± 5,9	46,7 ± 5,9	55,4 ± 5,9 ^d	50,4 ± 5,9

^{a,b,c,d} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$)

Jak je patrné z tabulky 10, u jednotlivých hřebců nebylo množství apoptotických spermií z celkového počtu živých ovlivněno dobou inkubace ($p > 0,05$). Ihned po rozmražení v čase t0 ani po inkubaci 15 minut (t15) nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly v počtu apoptotických spermií z živých mezi jednotlivými hřebci a typy obalů ($p > 0,05$). Při porovnání všech hodnocených hřebců v časech inkubace t30, t45 a t60 byl prokázán vliv individuality hřebce na výskyt apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií ($p < 0,05$).

Byl prokázán vliv individuality hřebců na přítomnost apoptotických spermií, jak je patrné z tabulek 11-22 v příloze. Procentuální zastoupení apoptotických spermií bylo signifikantně vyšší ($p < 0,05$) v inseminačních dávkách v ředidle GENT a 5 ml tubě než ve všech ostatních kombinacích ředidlo/obal u většiny hřebců ihned po rozmražení. U hřebce Sacramoso Mantova byl signifikantní rozdíl v zastoupení apoptotických spermií zaznamenán pouze

s kombinací LAKT 5 ml a u hřebce Favory Albuza s GENT 0,5 ml. Nejméně apoptotických spermií bylo zaznamenáno v dávkách ředěných laktózovým ředidlem a uložených v 5 ml tubě u 5 hřebců ze 6. V inseminačních dávkách uložených v pejetách se u jednotlivých hřebců vyskytovaly relativně obdobné hodnoty apoptotických spermií a také u většiny hřebců vykazovaly v čase největší stabilitu.

Zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií v kryokonzervovaných inseminačních dávkách lépe u jednotlivých hřebců odpovídá realitě, protože u některých hřebců se vyskytovalo v inseminačních dávkách po rozmražení velmi malé množství apoptotických spermií z důvodu vysokého procenta mrtvých spermií (data nejsou součástí této práce).

Nejvíce apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií se nacházelo v inseminačních dávkách kryokonzervovaných v ředidle GENT a 5 ml tubě u všech hřebců, kromě hřebce Favory Albuza, u kterého bylo nejvyšší průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých v inseminačních dávkách ředěných ředidlem LAKT a uložených v 0,5 ml pejetě. Nejméně apoptotických spermií z živých bylo v kombinaci 5 ml tuby a ředidla LAKT. Spermie s časem inkubace umíraly, takže byl zaznamenán nárůst průměrného zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých. U některých hřebců byly zaznamenány stabilní hodnoty apoptotických spermií z živých spermií v ředidle GENT a 0,5 ml pejetě mezi časy t_0 až t_{30} (Siglavi, tabulka 12; Favory Albuza, tabulka 14; Manida, tabulka 20; Sacramoso Mantova, tabulka 22). Stabilní hodnoty v čase byly u hřebců Siglavi a Manida zaznamenány také v kombinaci GENT a 5 ml tuba anebo v případě hřebců Aversa, Manida a Sacramoso Mantova v ředidle LAKT a 0,5 ml pejeta (tabulka 16, 20, 22).

6 Diskuze

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že na výskyt apoptoticky změněných spermií hřebců v rozmražené inseminační dávce má vliv doba inkubace, forma obalu inseminační dávky a individualita hřebce.

Pro detekci apoptotických spermií v kryokonzervovaných inseminačních dávkách hřebců jsou využívány různé fluorochromy, například Annexin-V společně s propidium jodidem (PI) pro zviditelnění translokace fosfatidylserinu na membráně spermie (Gallardo Bolaños et al., 2012; Monteiro et al., 2013; Franco et al., 2014; Caselles et al., 2014) nebo Yo-Pro 1 (Y.P.1) v kombinaci s ethidium homodimerem (Eth) značící časné apoptotické změny cytoplazmatické membrány (Ortega-Ferrusola et al., 2008; 2009; Morillo Rodríguez et al., 2011; Gallardo Bolaños et al., 2012). Shodně jako v naší studii použili k detekci apoptotických změn Y.P.1 a PI v experimentu Yeste et al. (2015) u hřebčích a Martin et al. (2004) u býčích spermií. K detekci probíhající apoptózy po rozmražení je také často využívána aktivita kaspáz, u hřebců konkrétně kaspázy 3, 7 a 9 (Ortega-Ferrusola et al., 2008; Gallardo Bolaños et al., 2012; Monteiro et al., 2013; Caselles et al., 2014).

6.1 Vliv doby inkubace a použitých ředidel

Zastoupení apoptotických spermií v kryokonzervovaných inseminačních dávkách (ID) ředěných ředidlem Gent bylo v době rozmražení až do 60 minut po rozmražení dvojnásobně vyšší než v laktózovém ředidle (Tabulka 1). V obou ředidlech došlo během času inkubace ke snížení procenta apoptotických spermií. Tento pokles byl v ředidle Gent signifikantní mezi zastoupením apoptotických spermií ihned po rozmražení a hodnotami po inkubaci 45 a 60 minut po rozmražení. V laktózovém ředidle byl významný pokles apoptotických spermií zaznamenán mezi časem 0 ihned po rozmražení a časy inkubace 30 a 45 minut. Jelikož se v našem pokusu často vyskytovaly ID vykazující po rozmražení velmi vysoké procento mrtvých spermií a v těchto dávkách bylo zastoupení apoptotických spermií nízké, lépe vypovídá o kvalitě kryokonzervovaných inseminačních dávek výpočet zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých. Tento údaj také udává v ředidle Gent vyšší procentuální zastoupení než v laktózovém ředidle (Tabulka 2), ve kterém bylo více mrtvých spermií než v inseminačních dávkách ředěných ředidlem Gent (nepublikované výsledky).

Podobných hodnot apoptotických spermií jako v naší studii zaznamenali u hřebčích kryokonzervovaných inseminačních dávek ředěných ředidlem Gent Franco et al. (2014).

Absolutní hodnoty procentuálního zastoupení apoptotických spermií byly v této studii nižší než v našem experimentu, což je možné vysvětlit použitím jiných chemikálií a také využití jiné metody detekce - průtokové cytometrie, která je využívána ve většině studií jako přesná a objektivní metoda při použití fluorescenčního barvení buněk.

Vyšších hodnot apoptotických spermií v ředidle Gent v porovnání s výsledky uvedenými v této diplomové práci zaznamenali Morillo Rodríguez et al. (2011), kteří porovnávali vliv různých ředidel na kryokonzervované spermie andaluských hřebců. Použili ředidlo Gent, INRA 96 a ředidlo Cáceres. Cáceres je ředidlo na bázi odstředěného mléka s přidaným kryoprotektantem dimethylformamidem (1,5%) v kombinaci se sníženým obsahem glycerolu (1,5%), čímž se snižuje jeho toxický vliv (Fahy, 2010). Ukázalo se, že v ředidle Cáceres měly spermie po rozmražení lepší motilitu, než v ostatních dvou typech ředidel. Také procento spermií s intaktní membránou bylo významně vyšší u vzorků zmrazených v ředidle Cáceres, zatímco mezi ředidly INRA 96 a Gent se nelišilo. Procento apoptotických spermií nebylo mezi ředidly významně rozdílné. V ID s ředidlem Cáceres dosahovalo zastoupení apoptotických spermií průměrně 12,3%, s ředidlem Gent 9,8% a v ID ředěných pomocí INRA 96 12,6%. Shodně jako v naší studii zaznamenali vysoké zastoupení apoptotických spermií u ID s největším množstvím živých spermií. Přepočtené zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií z publikovaných výsledků studie Morillo Rodríguez et al. (2011) odpovídá našim výsledkům průměrného procentuálního zastoupení apoptotických spermií z živých v ředidle Gent. Zatímco Morillo Rodríguez et al. (2011) zaznamenali ve své práci nejlepších výsledků s mléčným ředidlem, naopak v naší práci bylo v laktózovém ředidle dosaženo horších výsledků po rozmražení, pravděpodobně vlivem vyššího množství glycerolu (4,4%).

Stejně tak ve studii Yeste et al. (2015), kde byly inseminační dávky teplokrevných hřebců mrazeny v ředidle INRA-Freeze v 0,5 ml pejetách dosáhli po rozmražení vyšších hodnot apoptotických spermií než v naší studii, ale s přihlédnutím na počet mrtvých spermií v dávce průměrné zastoupení apoptotických spermií z živých bylo mírně vyšší než v našem pokusu, což může být způsobeno jiným typem použitého ředidla či plemenem hřebců. Pro detekci apoptotických spermií u dobře a špatně mrazitelných ejakulátů také použili fluorochromy Yo-Pro 1 a propidium jodid. Dobře mrazitelný ejakulát má, jak předpokládají autoři studie, stabilnější membránu, proto vydrží déle nepropouštět PI, takže shodně jako v této diplomové práci zaznamenali vyšší procentuální zastoupení apoptotických spermií u více motilních a viabilních vzorků (Yeste et al., 2015).

Vliv času inkubace na přítomnost apoptotických spermií v ejakulátu hřebců po rozmražení byl publikován ve studii Yeste et al. (2015). Ejakuláty byly hodnoceny na přítomnost apoptotických spermií po odběru čerstvé, ihned po rozmražení a následně po hodinové inkubaci. Byl prokázán vliv kryokonzervace na zastoupení apoptotických spermií v ejakulátu, kdy po rozmražení bylo procento apoptotických spermií výrazně vyšší než v čerstvém semeni. Vliv hodinové inkubace se lišil mezi dobře a špatně mrazitelnými ejakuláty. U dobře mrazitelných ejakulátů shodně jako v této diplomové práci zaznamenali Yeste et al. (2015) se současným nárůstem mrtvých spermií pokles průměrného zastoupení apoptotických spermií, u ejakulátů špatně snázejících mražení naopak došlo po hodinové inkubaci k nárůstu množství apoptotických spermií.

Z výsledků naší studie vyplývá, že i přes vyšší zastoupení apoptoticky změněných spermií v kryokonzervovaných dávkách s ředidlem Gent, poskytuje toto ředidlo lepší ochranu při mražení hřebčích spermií než ředidlo laktózové.

6.2 Vliv použitých objemů obalů

Při porovnání vlivu různých objemů obalů na kvalitu hřebčích kryokonzervovaných inseminačních dávek bylo zaznamenáno více apoptotických spermií v 5 ml hliníkových tubách. Statisticky významně vyšší bylo procentuální zastoupení apoptotických spermií v ID v 5 ml tubách pouze ihned po rozmražení, v ostatních časech inkubace se od ID v 0,5 ml pejetách významně nelišilo. Během času inkubace docházelo u ID v 5 ml tubách k poklesu průměrného zastoupení apoptotických spermií (Tabulka 3). Statisticky významný byl tento rozdíl mezi hodnotami apoptotických spermií ihned po rozmražení a po 45 a 60 minutách inkubace. V 0,5 ml pejetách se během inkubace množství apoptotických spermií významně nelišilo a vykazovalo stabilnější hodnoty. Více apoptotických spermií z celkového počtu živých bylo zaznamenáno v 0,5 ml pejetách (Tabulka 4), ale tento rozdíl byl signifikantní pouze až po hodinové inkubaci. V pejetách došlo během inkubace k významnému nárůstu procentuálního zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých. V aluminiových tubách bylo zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých stabilnější a nárůst nebyl statisticky významný.

Pejety o objemu 0,5 ml jsou dnes doporučovány ke kryokonzervaci hřebčích spermií. Hypotéza proč konzervovat sperma do 0,5 ml pejet je, že poskytují rovnoměrnější zmražení a rozmražení vzhledem k poměru povrchu a objemu (Crockett et al., 2000; Sieme, 2011a). Pejety, díky velkému poměru povrch/objem, zajišťují rychlé zmražení celého obsahu

s minimálními výkyvy teplot během mražení. Malá plocha na průřezu umožňuje rychlý přenos tepla mezi obsahem a okolím (Bielas et al., 2003). Po rozmražení byly zaznamenány vyhovující parametry motility hřebčího ejakulátu uloženého v 0,5 ml pejetách například ve studiích Nascimento et al. (2008) a Maziero et al. (2013).

Ve studiích porovnávajících 0,5 ml pejety s objemnějšími obaly nebyl většinou zaznamenán rozdílný vliv na parametry motility hřebčích ejakulátů po rozmražení. Lorenzoni et al. (2011) porovnávali s 0,5 ml pejetami 2 ml tuby, Crockett et al. (2000) nezaznamenali rozdíl s ID mraženými v 2,5 ml pejetách a také Samper (1995) udává podobné procentuální zastoupení motilních spermií po rozmražení ID v pejetách o objemu 0,5 ml, 2,5 ml a 5 ml.

V dřívější studii Kneissl (1993) zaznamenal lepší výsledky po rozmražení u semene uloženého v 0,5 ml pejetách v porovnání se 4 ml makrotubami. Naopak Saragusty et al. (2007) doporučují pro hřebce využití velkoobjemových tub (12 ml skleněné tuby). Ve větších objemech ID autoři této práce zaznamenali po rozmražení lepší parametry (motilita, viabilita, HOS test) než v klasických plastových pejetách (0,5 ml). V této studii však používali jiné techniky mražení (multitermální gradient) než při komerční výrobě ID.

Ve studii Bielas et al. (2003) porovnávali vliv obalů na parametry po rozmražení kančích ejakulátů – použili 0,2 ml pelety, 5 ml pejety a 2 ml ploché pejety. Nejlepší kvality po rozmražení dosahovaly ID, které byly mrazeny ve formě pelet anebo baleny do 2 ml plochých pejet. Také při porovnání mražení kančích ID v 5 ml a 0,25 ml pejetách byly ve větších ID zaznamenány nižší hodnoty motility a viability, ale rozdíl nebyl signifikantně významný (Dai et al., 2009). Ve studii Córdova et al. (2002) také nebyl pozorován významný rozdíl v kvalitě kančích inseminačních dávek mražených v 0,5 ml nebo 5 ml pejetách (Córdova et al., 2002). Podobného výsledku bylo dosaženo ve studii Strzeżek et al. (2015) u psích ID. Po rozmražení nebyly zaznamenány významné rozdíly v celkové motilitě ID balených do 0,25 ml pejet nebo 5 ml aluminiových tub, avšak vyšší progresivní motilitu a rychlost vykazovaly spermie uložené v 0,25 ml pejetách (Strzeżek et al., 2015).

Použití makrotub k inseminaci snižuje ztráty spermatu během přípravy ID a je také jednodušší, protože celý objem ID je v jedné tubě, na rozdíl od nutnosti použít k inseminaci většího počtu pejet (Gacitua a Arav, 2005; Saragusty et al., 2007). Inseminační dávky uložené v makrotubách jsou výhodné kvůli snížení rizika kontaminace a eliminaci záměny nebo ztráty pejet. Inseminační dávky ve větších tubách mohou být také lépe označené, identifikovatelné a manipulovatelné (Saragusty et al., 2007). Nicméně zmrazování a rozmrazování velkých objemů může být problematické s ohledem na přenos tepla, který ovlivní nerovnoměrně rychlé mražení velkého objemu a rekrystalizaci během rozmrazování (Karlsson a Toner,

1996; Gacitua a Arav, 2005). Hliníkové tuby jsou ploché a mají velkou plochu povrchu, přenos tepla je tedy rychlý. Do tub se také vejde větší množství semene, ale mohou se vyskytovat rozdílné rychlosti zmrazování a rozmrazování v okrajových a centrálních částech tuby (Strzeżek et al., 2015), což může indukovat akrozomální a membránové poškození, které může být použitím nízkoobjemové pejety eliminováno (Karlsson a Toner, 1996; Gacitua a Arav, 2005; Córdova et al., 2013).

Při hodnocení procenta zabřeznutí po inseminaci kryokonzervovanou hřebčí dávkou dosahují nejlepších výsledků (49-76%) dávky mražené v pejetách o objemu 0,5 ml (Barbacini et al., 2008; Sieme et al., 2003; Vidament, 2005), ale podobných výsledků bylo dosaženo i s hliníkovými makrotubami o objemu 4 ml (56%) (Müller, 1987). Love et al. (1989) porovnávali úspěšnost inseminace kryokonzervovanými dávkami v 4 ml plastových pejetách a 10-12 ml hliníkových tubách u hřebců. Procento zabřeznutí nebylo signifikantně rozdílné.

Procentuální zastoupení apoptotických spermií uvedené v této diplomové práci není výrazně rozdílné mezi typy použitých obalů, kromě hodnocení ihned po rozmražení. Po rozmražení bylo více apoptotických spermií zaznamenáno v 5 ml tubách, ve kterých bylo také více živých spermií než v 0,5 ml pejetách (nepublikované výsledky). Z námi zjištěných výsledků lze označit za vhodnější pro kryokonzervaci hřebčích spermií 5 ml tuby.

6.3 Vliv použité kombinace ředidla a obalu

Při studiu efektu použitého ředidla a objemu obalu na zastoupení apoptotických spermií v kryokonzervovaných inseminačních dávkách po rozmražení bylo nalezeno signifikantně nejvíce apoptotických i apoptotických spermií z celkového počtu živých v ID ředěných ředidlem Gent a uložených v 5 ml tubách (Tabulka 5, Tabulka 6). Inseminační dávky s laktózovým ředidlem uchované v 5 ml tubách obsahovaly nejméně jak apoptotických, tak apoptotických spermií z živých. U všech kombinací ředidla a obalu byl pozorován v jednotlivých časech inkubace pokles apoptotických spermií, statisticky významné bylo toto snížení pozorováno v ID ředěných ředidlem Gent v 5 ml tubách mezi hodnotami ihned po rozmražení a po 45 a 60 minutách. Množství apoptotických spermií z celkového počtu živých v průběhu inkubace narůstalo, významný rozdíl byl zaznamenán u inseminačních dávek balených v 0,5 ml pejetách.

Ortega-Ferrusola et. al. (2008) studovali specifické apoptotické parametry během hlavních kroků kryokonzervace (u čerstvého spermatu, po odstředění a po rozmražení). Výsledkem jejich práce bylo zjištění, že s narůstajícím množstvím manipulace s ejakulátem

stoupá procentuální zastoupení apoptotických spermií se současným poklesem živých spermií. Stejně jako v naší studii použili ředidlo Gent a 0,5 ml pejety, ale zaznamenali vyšší zastoupení apoptotických spermií než v našem případě, což mohlo být způsobeno použitím rozdílných chemikálií (ethidium homodimer místo PI), nízkým počtem testovaných vzorků (n=18) a odlišným plemenem (andaluský kůň) (Ortega-Ferrusola et al., 2008). Vyšší zastoupení apoptotických spermií než v této diplomové práci zaznamenali po rozmražení inseminačních dávek andaluských hřebců ředěných ředidlem Gent v 0,5 ml pejetách také García et al. (2009). Autoři této studie hodnotili vliv centrifugace po rozmražení. Odstraněním populace mrtvých spermií centrifugací došlo k významnému zlepšení všech parametrů semene po rozmražení (García et al., 2009).

Z výsledků této diplomové práce je patrné, že kombinace ředidla Gent a 5 ml aluminiových tub poskytovala nejlepší ochranu hřebčím spermiím během procesu kryokonzervace.

6.4 Vliv individuality hřebce

V této diplomové práci jsme potvrdili významný vliv individuality hřebce na procentuální zastoupení apoptotických spermií v kryokonzervovaných dávkách po rozmražení (Tabulka 7). Všichni hřebci měli ihned po rozmražení více apoptotických spermií v ředidle Gent (2,7% - 6,9%) než v laktózovém ředidle (1,0%-2,6%). Vliv inkubace byl u každého hřebce rozdílný. V množství apoptotických spermií z celkového počtu živých byly také zaznamenány velké individuální rozdíly. Vyšší zastoupení u všech hřebců bylo po rozmražení zaznamenáno v ředidle Gent (15,4%-49,3%) v porovnání s laktózovým ředidlem (9,4%-34,0%).

Jedním ze zásadních problémů kryokonzervace u koní je vysoká individuální variabilita v přežívání spermií po rozmražení mezi jednotlivými hřebci. Často je tato variabilita připisována faktu, že hřebci nejsou do reprodukce vybíráni na základě kvality ejakulátu, ale podle původu a fenotypu (Ortega-Ferrusola et al., 2009).

Morillo Rodríguez et al. (2011) ve své studii porovnávali 3 typy ředidel a v ředidle Gent zaznamenali největší variabilitu motility po rozmražení mezi hřebci od 7,5% do 52%. Tato skutečnost naznačuje, že je třeba upravit protokoly pro každého konkrétního hřebce.

Také vliv použitých objemů obalů byl individuální mezi hřebci (Tabulka 9). Apoptotických spermií bylo zaznamenáno více v 5 ml tubách, ale procento apoptotických spermií z celkového počtu živých bylo v aluminiových tubách nižší (Tabulka 10).

Hřebci vykazují vysokou variabilitu mrazitelnosti ejakulátu, z některých studií vyplývá, že 20-50% hřebců vykazuje nedostatečnou odolnost spermií na proces mražení (Tischner, 1979; Müller, 1987; Vidament et al., 1997). Ve studiích zkoumajících různé kombinace ředidel pro mražení hřebčích spermií byla vždy zaznamenána vysoká variabilita mezi jednotlivými hřebci (Tischner, 1979; Müller, 1987; Amann a Pickett, 1987; Vidament et al., 1997; Loomis, 2001; Loomis a Graham, 2008; Scherzer et al., 2009).

Caselles et al. (2014) ve svém výzkumu zaznamenali velké rozdíly mezi jednotlivými hřebci v množství apoptotických tělísek. Byla nalezena signifikantní korelace mezi množstvím apoptotických tělísek a aktivitou kaspázy 3 v čerstvém semeni. Množství apoptotických tělísek v čerstvém ejakulátu mělo vliv na jeho mrazitelnost. Po zmražení/rozmražení došlo k poklesu motility a viability spermií. Studie ukázala vysokou negativní korelaci mezi množstvím apoptotických tělísek před zmražením a parametry po rozmražení u jednotlivých hřebců (Caselles et al., 2014).

V naší práci bylo použito 6 starokladrubských hřebců, mezi nimiž byla zaznamenána vysoká variabilita v zastoupení apoptotických a živých spermií v reakci na proces kryokonzervace a použití jednotlivých typů ředidel a obalů. Jak uvádí ve své práci Vostrá Vydrová a kol. (2016) současná populace starokladrubských koní v ČR je málo početná a je odvozena z nízkého počtu předků, což vede k nárůstu koeficientu inbreedingu a klesání genetické diverzity v populaci tohoto plemene. Zvyšování koeficientu inbreedingu může nést nežádoucí inbrední depresi, která se projevuje u vlastností spojených s fitness a reprodukcí. Vysoký koeficient inbreedingu u starokladrubských hřebců může negativně ovlivňovat kvalitu a odolnost ejakulátu.

7 Závěr

Byla potvrzena hypotéza, že na výskyt apoptoticky změněných spermií hřebců v rozmražené inseminační dávce má vliv doba inkubace, forma obalu inseminační dávky a individualita hřebce.

- V hřebčích inseminačních dávkách s ředidlem Gent bylo zaznamenáno signifikantně vyšší zastoupení apoptotických spermií než s laktózovým ředidlem.
- Statisticky významně vyšší množství apoptotických spermií bylo zaznamenáno v inseminačních dávkách kryokonzervovaných v 5 ml aluminiových tubách.
- Časem inkubace procentuální zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách klesá.
- V ředidle Gent byl statisticky významný rozdíl mezi hodnotami apoptotických spermií ihned po rozmražení a v časech 45 a 60 minut po rozmražení. V laktózovém ředidle byl signifikantní rozdíl zaznamenán mezi časem inkubace 0 a časy 30 a 45 minut po rozmražení.
- Signifikantní pokles apoptotických spermií byl zaznamenán v inseminačních dávkách uložených v 5 ml tubách mezi hodnotami ihned po rozmražení a v 45 a 60 minutách po rozmražení. V 0,5 ml pejetách nebyla změna zastoupení apoptotických spermií s dobou inkubace statisticky významná.
- Byl prokázán vliv individuality hřebce na zastoupení apoptotických spermií v kryokonzervovaných inseminačních dávkách po rozmražení.
- Nejvhodnější pro všechny testované starokladrubské hřebce pro výrobu kryokonzervované inseminační dávky je kombinace ředidla Gent a 5 ml hliníkových tub.

8 Přehled literatury

Aitken, R. J., Findlay, J. K., Hutt, K. J., Kerr, J. B. 2011. Apoptosis in the germ line. *Reproduction*. 141. p. 139–150.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. Garland science. Taylor & Francis Group, LLC. NewYork. USA. p. 1691. ISBN: 978-0-8153-4106.

Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., Luño, V. 2014. Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96 extender. *Cryobiology*. 69. p. 144–148.

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

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

Anzar, M., He, L., Buhr, M. M., Kroetsch, T. G., Pauls, K. P. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*. 66. p. 354–360.

Aziz, N., Said, T., Paasch, U., Agarwal, A. 2007. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction*. 22. p. 1413–1419.

Barbacini, S., Necchi, D., Postinger, G., Parmeggiani, F., Squires, E. L. 2008. What to expect when barren mares are inseminated with frozen-thawed semen. In: *Proceedings of the 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. p. 274–275.

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

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

Bielas, W., Dubiel, A., Nizanski, W. 2003. Effects of cryopreservation methods, packaging systems and the thermoresistance test on the post-thaw quality of boar semen. *Medycyna weterynaryjna* JNA. 59.2. p. 172-175.

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

Borges, E. Jr., Rossi, L. M., Locambo de Freitas, C. V., Guilherme, P., Bonetti, T. C., Iaconelli, A., Pasqualotto, F. F. 2007. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 87. p. 316–320.

Bouillet, P., Strasser, A. 2002. BH3-only proteins – evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *Journal of Cell Science*. 115. 8. p. 1567–1574.

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

Brugnon, F., Van Assche, E., Verheyen, G., Sion, B., Boucher, D., Pouly, J. L., Janny, L., Devroey, P., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. 2006. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human Reproduction*. 21. p. 685–693.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell & Developmental Biology*. 15. p. 269–290.

- Caballero, I., Parrilla, I., Alminana, C., del Olmo, D., Roca, J., Martinez, E. A., Vazquez, J. M. 2012. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals*. 47. 3. p. 12–21.
- Caselles, A. B., Miro-Moran, A., Morillo Rodriguez, A., Gallardo Bolaños, J. M., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Peña, F. J., Tapia, J. A., Aparicio, I. M. 2014. Identification of Apoptotic Bodies in Equine Semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 49. 2. p. 254-262.
- 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. p. 298–308.
- Córdova, A., Pérez-Gutiérrez, J. F., Lleó, B., García-Artiga, C., Alvarez, A., Drobchak, V., Martín-Rillo, S. 2002. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology*. 57. 8. p. 2119–2128.
- Córdova, A., Hernández-Gil, R., Córdova-Jiménez, C. A., Cardilli, D. J., de Sousa Oliveira, K., Pérez-Gutiérrez, J. F. 2013. Effects of post-thaw incubation on motility, acrosomal integrity and in vitro fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved in 0.5 and 5 ml straws. *Reproductive biology*. 13. p. 166–168.
- Cory, S., Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. 2. p. 647–656.
- Crockett, E. C., Graham, J. K., Bruemmer, J. E., Squires, E. L. 2000. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: Preliminary results. *Theriogenology*. 55. 3. p. 793-803.
- Dai, J. J., Wu, C. F., Zhang, D. F., Yin, F. Z., Zhang, T. Y., Liu, D., Wu, H. L., Li, L. L., Yang, S. T., Wang, L. 2009. Some Factors Affecting Freezing of Boar Semen in 5 ml Maxi-straws. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 22. 4. p. 507-515.

- Demick, D. S., Voss, J. L., Pickett, B. W. 1976. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *Journal of Animal Science*. 43. p. 633–637.
- Desagher, S., Martinou, J. C. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Cell Biology*. 10. p. 369-377.
- Dogan, S., Mason, M. C., Govindaraju, A., Belser, L., Kaya, A., Stokes, J., Rowe, D., Memili, E. 2012. Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm. *Journal of Reproduction and Development*. 59. p. 18–26.
- Duru, N. K., Morshedi, M. S., Schuffner, A., Oehninger, S. 2001. Cryopreservation–thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *Journal of Andrology*. 22. p. 646–651.
- Earnshaw, W. C. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Current Biology*. 7. 337–343.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*. 68. p. 383–424.
- Ecot, P., Arnaud, G., Moy, A., Daels, P., Magistrini, M., Vidament, M. 2001. Comparison of fertility and post-thaw semen criteria of stallion semen frozen in two different extenders. *Animal Reproduction Science*. 68. p. 356–358.
- Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A. 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 461. p. 282–286.
- Fahy, G. M. 2010. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*. 60. p. 45–53.
- Fatehi, A. N., Bevers, M. M., Schoevers, E., Roelen, B. A., Colenbrander, B., Gadella, B. M. 2006. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology*. 27. p. 176–188.

Franco, J. S. V., Chaveiro, A., Moreira da Silva, F. 2014. Effect of Freezing Rates and Supplementation of α -Tocopherol in the Freezing Extender in Equine Sperm Cryosurvival. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34. p. 992–997.

Freitas-Dell'Aqua, C. P., Monteiro, G. A., Dell'Aqua Jr., J. A., Papa, F. O. 2013. The Effects of Refrigeration Temperature and Storage Time on Apoptotic Markers in Equine Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33. 1. p. 27–30.

Gacitua, H., Arav, A. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*. 63. 3. p. 931–938.

Gallardo Bolaños, J. M., Miró Morán, Á., Balao da Silva, C. M., Morillo Rodríguez, A., Plaza Dávila, M., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Peña, F. J. 2012. Autophagy and Apoptosis Have a Role in the Survival or Death of Stallion Spermatozoa during Conservation in Refrigeration. *PLoS ONE*. 7. 1.

Gallardo Bolaños, J. M., Balao da Silva, C., Martin Munoz, P., Plaza Da'vila, M., Ezquerra, J., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Pena, F. J. 2014. Caspase Activation, Hydrogen Peroxide Production and Akt Dephosphorylation Occur During Stallion Sperm Senescence. *Reproduction in Domestic Animals*. 49. p. 657-664.

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

Gao, D. Y., Ashworth, E., Watson, P. F., Mazur, P., Critser, J. K. 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*. 49. p. 112–123.

García, B. M., Morrell, J. M., C. Ortega-Ferrusola, C., González-Fernández, L., Tapia, J. A., Rodriguez-Martínez, H., Peña, F. J. 2009. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 114. 1–3. p. 193–202.

- Garcia Vazquez, S., Aragon Martinez, A., Flores-Alonso, J. C. 2012. Confocal microscopy and image analysis indicates a region-specific relation between active caspases and cytoplasm in ejaculated and epididymal sperm. *PLoS ONE*. 7. p. 35477.
- Giraud, M. N., Motta, C., Boucher, D., Grizard, G. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction*. 15. p. 2160–2164.
- Graham, J. K. 2011. Principles of Cryopreservation. In: McKinnon, A. O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 2959-2963. ISBN: 9780813819716.
- Green, D. R. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*. 121. p. 671–674.
- Grunewald, S., Paasch, U., Wuendrich, K., Glander, H. J. 2005. Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. *Archives of andrology*. 51. p. 449–460.
- Grunewald, S., Said, T. M., Paasch, U., Glander, H. J., Agarwal, A. 2008. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Journal of Andrology*. 31. p. 325–330.
- Guo, C. X., Tang, T. S., Liu, Y. X. 2000. Germ cell apoptosis and regulation in testis. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 31. p. 299–304.
- Gutiérrez-Cepeda, L., Fernández, A., Crespo, F., Ramírez, M. A., Gosálvez, J., Serres, C. 2012. The effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed equine sperm DNA. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 54. 72.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11. p. 73–88.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407. p. 770–776.

Hetz, C. A., Torres, V., Quest, A. F. 2005. Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochemistry. Cell Biology*. 83. p. 579–588.

Host, E., Lindenberg, S., Smidt – Jensen, S. 2000. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 79. p. 189–193.

Chen, C. H., Lee, S. S., Chen, D. C., Chien, H. H., Chen, I. C., Chu, Y. N., Liu, J. Y., Chen, W. H., Wu, G. J. 2004. Apoptosis and kinematic of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Journal of Andrology*. 25. p. 348–353.

Chen, Z., Hauser, R., Trbovich, A. M. Shifren, J. L., Dorer, D. J., Godfrey-Bailey, L., Singh, N. P. 2006. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *Journal of Andrology*. 27. p. 112–120.

Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., Ameisen, J. C. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal of Immunological Methods*. 185. p. 249–258.

Jelínek, P., Koudela, K. (eds.). 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 414 s. ISBN: 8071576441.

Johnson, L., Thompson, D. L. Jr., Varner, D. D. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*. 105. p. 23–51.

Karlsson, O. M., Toner, M. 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 17. p. 243–256.

Keeble, J. A., Gilmore, A. P. 2007. Apoptosis commitment – translating survival signals into decisions on mitochondria. *Cell Research*. 17. 12. p. 976-984.

Kelekar, A., Thompson, C. B. 1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 8. p. 324–330.

- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26. p. 239–257.
- Klug, E., Treu, H., Hillmann, H., Heinze, H. 1975. Results of insemination of mares with fresh and frozen stallion semen. *Journal of reproduction and fertility*. 23. 107–110.
- Kneissl S. 1993. Cryopreservation of stallion semen. The influence of semen collection techniques, centrifugation, packaging forms, and methods of freezing on motility and plasma membrane integrity of spermatozoa. DVM Thesis. Veterinary University. Hannover.
- Lasso, J. L., Noiles, E. E., Alvarez, J. G. Storey, B. T. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology*. 15. p. 255–265.
- Li, K., Li, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Spencer, E., Chen, Z. J., Wang, X., Williams, R. S. 2000. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell*. 101. p. 389–399.
- Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P., Flavell, R. A. 2003. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*. 302. p. 1560–1563.
- Loomis, P. R. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci*. 68. p. 191–200.
- Loomis, P. R. 2006. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics: Equine Practise*. 22. p. 663-676.
- Loomis, P. R. 2011. Basic Principles and Techniques for semen Freezing. XVII Congresso Internazionale SIVE. USA.
- Loomis, P. R., Amann, R. P., Squires, E. L., Pickett, B. W. 1983. Fertility of unfrozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packed in straws. *Animal Science Journal*. 56. p. 687–693.

Loomis, P. R., Graham, J. K. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and their response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*. 105. p. 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. p. 962.

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

Love, C. C., Loch, W. L., Bristol, F., Garcia, M. C., Kenney, R. M. 1989. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. *Theriogenology*. 31. p. 613–622.

Martelli, A. M., Zweyer, M., Ochs, R. L., Tazzari, P. L., Tabellini, G., Narducci, P., Bortul, R. 2001. Nuclear apoptotic changes: an overview. *Journal of Cellular Biochemistry*. 84. 4. 634–646.

Martin, J. C., Klug, E., Guntzel, A. R. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of reproduction and fertility*. 27. p. 47–51.

Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R. 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*. 71. p. 28–37.

Martin, G., Cagnon, N., Sabido, O., Sion, B., Grizard, G., Durand, P., Levy, R. 2007. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Human Reproduction*. 22. p. 380–388.

Martinou, J. C., Green, D. R. 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2. p. 63–67.

Marvan, F. (ed.). 2007. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze. Nakladatelství Brázda. Praha. 303 s. ISBN: 9788021316584.

- Maxwell, W. M. C., Landers, A. J., Evans, G. 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and mintubes. *Theriogenology*. 43. p. 1201–1210.
- Maziero, R. R. D., Nascimento, G. P., 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. p. 165-168.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology* . 247. p. 125–142.
- McGann, L. E. 1978. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*. 15. p. 382–390.
- Medema, J. P., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E. 1998. Bcl-xL acts downstream of caspase-8 activation by the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 273. p. 3388–3393.
- 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. p. 105–106.
- Meryman, H. T. 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion*. 47. p. 935–945.
- Monteiro, G. A., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Guasti, P. N., Dell'Aqua Jr., J. A., Alvarenga, M. A., Landim, F. C., Papa, F. O. 2013. Comparison of Apoptotic Cells Between Cryopreserved Ejaculated Sperm and Epididymal Sperm in Stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33. 7. p. 552–556.
- Moran, D. M., Jasko, D. J., Squires, E. L., Amann, R. P. 1992. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 38. p. 999–1012.

- Morel, M. C. G. D. 2003. *Equine Reproductive Physiology Breeding and Stud Management*. 2nd Edition. CABI Publishing. United Kingdom. p. 374. ISBN: 0851996434.
- Morillo Rodríguez, A., Ortega Ferrusola, C., Macías García, B., Morrell, J. M., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Peña, F. J. 2011. Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. *Animal Reproduction Science*. 127. 1–2. p. 78–83.
- Morris, G. J., Faszler, K., Green, J. E., Draper, D., Grout, B. W., Fonseca, F. 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*. 68. p. 804–812.
- Moustafa, M. H., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J. Jr., Agarwal, A. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*. 19. p. 129–138.
- Müller, Z. 1987. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *Journal of reproduction and fertility*. 35. p. 121.
- Munoz-Pinedo, C. 2012. Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 738. p. 124–143.
- 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. p. 351–358.
- Núñez-Martínez, I., Moran, J. M., Peña, F. J. 2007. Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Journal of Andrology*. 30. p. 182–189.

Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela-Fernández, E., Gallardo-Boloños, J. M., Muriel, A., González-Fernández, L., Tapia, J. A., Peña, F. J. 2008. Detection of “Apoptosis-Like” Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm. *Journal of Andrology*. 29. 2. p. 213-221.

Ortega-Ferrusola, C., Garcia, B. M., Gallardo-Bolaños, J. M., Gonzalez-Fernandez L., Rodriguez-Martinez, H., Tapia, J. A., Peña, F. J. 2009a. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 114. p. 393–403.

Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Morrell, J. M., Salazar Sandoval, C., Macías García, B., Rodríguez-Martinez, H., Tapia, J. A., Peña, F. J. 2009b. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*. 138. p. 55-63.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell dead. *Apoptosis*. 12. p. 913–922.

Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A., Glander, H. J. 2004a. Activation patterns in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 81. p. 802–809.

Paasch, U., Sharma, R. K., Gupta, A. K., Grunewald, S., Mascha, E. J., Thomas, A. J., Glander, H. J., Agarwal, A. 2004b. Cryopreservation and thawing is associated with varying extents of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 71. p. 1828–1837.

Paasch, U., Grunewald, S., Dathe, S., Glander, H. J. 2004c. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1030. p. 403–409.

Paasch, U., Grunewald, S., Wuendrich, K., Jope, T., Glander, H. J. 2005. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*. 7. p. 61–69.

- Pace, M., Sullivan, J. J. 1975. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen semen. *Journal of reproduction and fertility*. 23. 115–121.
- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., Martínez Rodríguez, H. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*. 60. p. 677–689.
- Peña, F. J., Saravia, F., Garcia-Herreros, M., Nuñez-Martínez, I., Tapia, J. A., Johannisson, A. 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology*. 26. p. 716–723.
- Peña, F. J., Nuñez-Martínez, I., Morán, J. M. 2006. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reproduction in Domestic Animals*. 41. 2. p. 21–29.
- Pickett, B. W. 1993. Seminal extenders and cooled semen. In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (eds). *Equine Reproduction*. Philadelphia. Lea & Febiger. p. 746–754.
- Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*. 75. 1. p. 105-114.
- Pycock, J. F. 1997. *Veterinární problematika reprodukce a chovu koní*. Manson Publishing Ltd. Medicus veterinarius. Česká republika. 208 s. ISBN: 8090222455.
- Rob O., Herčík J. 1987. *Inseminace I*. Státní pedagogické nakladatelství Praha. Vysoká škola zemědělská v Praze. 114 s. ISBN: 1711487.
- Said, T. M., Gaglani, A., Agarwal, A. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*. 21. p. 456–462.
- Said, T. M., Paasch, U., Glander, H. J., Agarwal, A. 2004. Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction*. 10. p. 39–51.

- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P. G., Bianchi, U. 1999a. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*. 4. p. 31–37.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., St John, J. C. 1999b. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Experimental Cell Research*. 251. p. 350–355.
- Sakkas, D., Seli, E., Manicardi, G. C., Nijs, M., Ombelet, W., Bizzaro, D. 2004. The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? *Human Fertility (Cambridge)*. 7. p. 99–103.
- Salazar, J. L., Teague, S. R., Love, C. C., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varne, D. D. 2011. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*. 76. 3. p. 409–418.
- Samper, J. C. 1995. Stallion semen cryopreservation: Male factors affecting pregnancy rates. *Theriogenology*. p. 160-165.
- Samper, J. C., Morris, C. A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 49. p. 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. p. 610-615.
- Shukla, K. K., Mahdi, A. A., Rajender, S. 2011. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*. 4. p. 746–754.
- Scherzer, J., Fayrer-Hosken, R. A., Aceves, M., Hurley, D. J., Ray, L. E., Jones, L., Heusner, G. L. 2009. Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. *Australian Veterinary Journal*. 87. 7. 275-279.
- Schultz, D. R., Harrington, W. J. Jr. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 32. p. 345–369.

- Sieme, H. 2011a. Freezing Semen. In: McKinnon, A. O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 2972-2982. ISBN: 9780813819716.
- Sieme, H. 2011b. Semen Extenders for Frozen Semen. In: McKinnon, A. O. (ed.). *Equine Reproduction*. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 2964-2971. ISBN: 9780813819716.
- Sieme, H. in Samper, J. C. (ed.). 2009. *Equine breeding management and artificial insemination*. 2nd ed. Saunders Elsevier. USA. 310 p. ISBN: 978416052340.
- Sieme, H., Schäfer T., Stout, T. A. E., Klug, E., Waberski, D. 2003. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology*. 60. 1153–1164.
- Sinha Hikim, A. P., Lue, Y., Diaz-Romero, M., Yen, P. H., Wang, C., Swerdloff, R. S. 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 85. p. 175–182.
- Sokolowska, A., Garcia, B. M., Fernandez, L. G, Ortega-Ferrusola, C., Tapia, J. A., Peña, F. J. 2009. Activated caspases are present in frozen-thawed canine sperm and may be related to post thaw sperm quality. *Zygote*. 17. p. 297–305.
- Strzeżek, R., Polakiewicz, P., Kordan, W. 2015. The effect of two packaging systems on the post-thaw characteristics of canine sperm. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 18. 2. p. 249–254.
- Sun, J. G., Jurisicova, A., Casper, R. F. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 56. p. 602–607.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Kroemer, G. 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1366. p. 151-165.

- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281. p. 1312–1316.
- Tischner, M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of reproduction and fertility*. 27. p. 53–59.
- Valentijn, A. J., Metcalfe, A. D., Kott, J., Streuli, C. H., Gilmore, A. P. 2003. Spatial and temporal changes in Bax subcellular localization during anoikis. *Journal of Cell Biology*. 162. p. 599–612.
- Vandivier, R. W., Henson, P. M., Douglas, I. S. 2006. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*. 129. p. 1673–1682.
- Vaux, D. L., Korsmeyer, S. J. 1999. Cell death in development. *Cell*. 96. p. 245–254.
- Věžník, Z. (ed.). 2000. Hodnocení semene pro asistovanou reprodukci a výběr plemeníků-Striktní analýza spermatické morfologie SASMO. Výzkumný ústav veterinárního lékařství. Brno. 141 s.
- Vidament, M., Dupere, A. M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., Palmer, E. 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*. 48. p. 907–919.
- Vidament, M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal reproduction science*. 89. p. 115-136.
- Villegas, J., Schulz, M., Soto, L., Sanchez, R. 2005. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis*. 10. 1. p. 105-110.
- Vostrá Vydrová, H., Vostrý, L., Hofmanová, B., Kroupa, E., Zavadilová, L. 2016. Pedigree analysis of the endangered population Old Kladruber horses. *Livestock Science*. 185. p. 17-23.

- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J., Loughlin, K. R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 49. p. 921–925.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60–61. p. 481–492.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292. p. 727–730.
- Weng, S. L., Taylor, S. L., Morshedi, M., Schuffner, A., Duran, E. H., Beebe, S., Oehninger, S. 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction*. 8. p. 948–991.
- Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., Critser, J. K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 48. p. 146–156.
- Wu, G. J., Chang, F. W., Lee, S. S., Cheng, Y. Y., Chen, C. H., Chen, I. C. 2009. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertility and Sterility*. 91. p. 831–837.
- Wünderlich, K., Paasch, U., Leicht, M., Glander, H. J. 2006. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation—an immunoblot study. *Cell Tissue Banking*. 7. p. 81–90.
- Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J. 2015. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*. 3. 2. p. 395-407.
- Zedan, H., El-Mekhlafi, A. W., El-Noweihi, A. M., Abd El-Azim, N. E., Mostafa, T. 2009. Soluble Fas and gonadal hormones in infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility*. 91. p. 420–424.

9 Přílohy

Tabulka 11: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách u hřebce Siglavi v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Siglavi	GENT 5 ml (N=9)	8,6 ± 0,7 ^{1,a}	8,1 ± 0,7 ^a	6,9 ± 0,7 ^a	6,8 ± 0,7 ^a	3,8 ± 0,7 ²
	LAKT 5 ml (N=15)	2,1 ± 0,6 ^b	1,5 ± 0,6 ^b	0,9 ± 0,6 ^b	0,9 ± 0,6 ^b	0,9 ± 0,6
	LAKT 0,5 ml (N=10)	2,8 ± 0,7 ^b	3,6 ± 0,7 ^b	1,9 ± 0,7 ^b	1,8 ± 0,7 ^b	1,6 ± 0,7
	GENT 0,5 ml (N=16)	2,8 ± 0,5 ^b	2,0 ± 0,5 ^b	1,4 ± 0,5 ^b	1,7 ± 0,5 ^b	2,3 ± 0,5

^{1,2} rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Tabulka 12: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií u hřebce Siglavi v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Siglavi	GENT 5 ml	30,3 ± 7,5	31,8 ± 7,5	30,4 ± 7,5	30,1 ± 7,5	25,8 ± 7,5
	LAKT 5 ml	14,3 ± 5,8	18,0 ± 5,8	17,0 ± 5,8	16,9 ± 5,8	20,6 ± 5,8
	LAKT 0,5 ml	21,8 ± 7,1	33,9 ± 7,1	27,0 ± 7,1	38,6 ± 7,1	31,9 ± 7,1
	GENT 0,5 ml	21,9 ± 5,6	22,5 ± 5,6	22,9 ± 5,6	27,1 ± 5,6	40,7 ± 5,6

Tabulka 13: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách u hřebce Favory Albuza v závislosti na ředidle a objemu obalu.

Hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Favory Albuza	GENT 5 ml (N=7)	5,3 ± 0,8 ^a	3,9 ± 0,8	4,4 ± 0,8	3,5 ± 0,8	6,0 ± 0,8 ^a
	LAKT 5 ml (N=13)	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,6	1,0 ± 0,6	1,4 ± 0,6	1,1 ± 0,6 ^b
	LAKT 0,5 ml (N=11)	2,6 ± 0,6	2,1 ± 0,6	1,8 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,0 ± 0,6 ^b
	GENT 0,5 ml (N=13)	1,2 ± 0,6 ^b	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,6	1,3 ± 0,6 ^b

^{a,b} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Tabulka 14: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií u hřebce Favory Albuza v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Favory Albuza	GENT 5 ml	18,2 ± 8,5	21,6 ± 8,5	26,6 ± 8,5	30,0 ± 8,5	41,3 ± 8,5
	LAKT 5 ml	11,2 ± 6,2	12,3 ± 6,2	10,0 ± 6,2	14,3 ± 6,2	20,4 ± 6,2
	LAKT 0,5 ml	19,3 ± 6,8	23,1 ± 6,8	21,8 ± 6,8	27,5 ± 6,8	40,0 ± 6,8
	GENT 0,5 ml	13,8 ± 6,2	14,5 ± 6,2	16,2 ± 6,2	17,0 ± 6,2	28,9 ± 6,2

Tabulka 15: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách u hřebce Aversa v závislosti na ředidle a objemu obalu.

Hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Aversa	GENT 5 ml (N=10)	4,6 ± 0,7 ^a	4,6 ± 0,7 ^a	4,7 ± 0,7 ^a	5,0 ± 0,7 ^a	3,5 ± 0,7 ^a
	LAKT 5 ml (N=15)	1,0 ± 0,6 ^b	0,8 ± 0,6 ^b	0,9 ± 0,6 ^b	0,6 ± 0,6 ^b	0,7 ± 0,6 ^b
	LAKT 0,5 ml (N=12)	1,1 ± 0,6 ^b	0,8 ± 0,6 ^b	0,8 ± 0,6 ^b	1,0 ± 0,6 ^b	1,0 ± 0,6 ^b
	GENT 0,5 ml (N=15)	1,6 ± 0,6 ^b	1,1 ± 0,6 ^b	1,5 ± 0,6 ^b	0,9 ± 0,6 ^b	1,5 ± 0,6

^{a,b} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Tabulka 16: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií u hřebce Aversa v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Aversa	GENT 5 ml	23,7 ± 7,1	29,3 ± 7,1	42,5 ± 7,1 ¹	35,1 ± 7,1	33,3 ± 7,1
	LAKT 5 ml	5,8 ± 5,8	10,2 ± 5,8	12,0 ± 5,8 ²	11,4 ± 5,8	9,8 ± 5,8
	LAKT 0,5 ml	14,0 ± 6,5	13,3 ± 6,5	15,6 ± 6,5	23,4 ± 6,5	18,6 ± 6,5
	GENT 0,5 ml	18,8 ± 5,8	21,4 ± 5,8	25,0 ± 5,8	19,7 ± 5,8	34,9 ± 5,8

^{1,2}rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Tabulka 17: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách u hřebce Santalina v závislosti na ředidle a objemu obalu.

Hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Santalina	GENT 5 ml (N=6)	4,3 ± 0,9 ^a	4,6 ± 0,9 ^a	3,4 ± 0,9 ^a	2,4 ± 0,9	3,9 ± 0,9 ^a
	LAKT 5 ml (N=9)	1,1 ± 0,7 ^b	0,4 ± 0,7 ^b	0,5 ± 0,7 ^b	0,1 ± 0,7	0,2 ± 0,7 ^b
	LAKT 0,5 ml (N=8)	1,7 ± 0,8 ^b	1,6 ± 0,8 ^b	0,9 ± 0,8 ^b	0,6 ± 0,8	1,0 ± 0,8 ^b
	GENT 0,5 ml (N=7)	2,5 ± 0,8	1,3 ± 0,8 ^b	1,7 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,3 ± 0,8 ^b

^{a,b} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Tabulka 18: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií u hřebce Santalina v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Santalina	GENT 5 ml	44,3 ± 9,2	51,0 ± 9,2	66,6 ± 9,2	52,3 ± 9,2	58,7 ± 9,2
	LAKT 5 ml	17,1 ± 7,5	14,6 ± 7,5	30,4 ± 7,5	11,1 ± 7,5	22,2 ± 7,5
	LAKT 0,5 ml	31,6 ± 7,9	28,9 ± 7,9	37,7 ± 7,9	45,9 ± 7,9	41,7 ± 7,9
	GENT 0,5 ml	32,5 ± 8,5	23,1 ± 8,5	45,3 ± 8,5	52,4 ± 8,5	39,4 ± 8,5

Tabulka 19: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách u hřebce Manida v závislosti na ředidle a objemu obalu.

Hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Manida	GENT 5 ml (N=8)	9,3 ± 0,8 ^{1,a}	5,7 ± 0,8 ^a	5,6 ± 0,8 ^a	3,2 ± 0,8 ²	5,0 ± 0,8 ²
	LAKT 5 ml (N=9)	1,7 ± 0,7 ^b	0,7 ± 0,7 ^b	0,8 ± 0,7 ^b	0,7 ± 0,7	1,6 ± 0,7
	LAKT 0,5 ml (N=6)	4,1 ± 0,9 ^b	3,7 ± 0,9	3,7 ± 0,9	2,1 ± 0,9	3,8 ± 0,9
	GENT 0,5 ml (N=8)	4,4 ± 0,8 ^b	2,5 ± 0,8	2,8 ± 0,7	3,8 ± 0,7	4,4 ± 0,7

^{1,2} rozdílné indexy v řádku označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

^{a,b} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly (p<0,05)

Tabulka 20: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií u hřebce Manida v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřelec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Manida	GENT 5 ml	51,6 ± 7,9	48,9 ± 7,9	65,7 ± 7,9	48,3 ± 7,9	56,2 ± 7,9
	LAKT 5 ml	16,4 ± 7,5	11,7 ± 7,5	23,3 ± 7,5	36,1 ± 7,5	41,2 ± 7,5
	LAKT 0,5 ml	51,1 ± 9,2	51,9 ± 9,2	71,1 ± 9,2	53,8 ± 9,2	78,5 ± 9,2
	GENT 0,5 ml	47,1 ± 7,9	45,1 ± 7,9	60,4 ± 7,5	75,7 ± 7,5	75,6 ± 7,5

Tabulka 21: Průměrné zastoupení apoptotických spermií v inseminačních dávkách u hřebce Sacramoso Mantova v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřebec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Sacramoso Mantova	GENT 5 ml (N=7)	7,5 ± 0,8 ^a	4,8 ± 0,8	6,2 ± 0,8 ^a	5,7 ± 0,8	5,2 ± 0,8
	LAKT 5 ml (N=9)	1,8 ± 0,7 ^b	1,0 ± 0,7	2,1 ± 0,7	1,9 ± 0,7	1,8 ± 0,7
	LAKT 0,5 ml (N=11)	3,2 ± 0,6	3,0 ± 0,6	2,1 ± 0,6	2,3 ± 0,6	3,4 ± 0,6
	GENT 0,5 ml (N=9)	3,2 ± 0,7	2,2 ± 0,7	1,8 ± 0,7 ^b	2,4 ± 0,7	1,4 ± 0,7

^{a,b} rozdílné indexy ve sloupci označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$)

Tabulka 22: Průměrné zastoupení apoptotických spermií z celkového počtu živých spermií u hřebce Sacramoso Mantova v závislosti na ředidle a objemu obalu.

hřebec	ředidlo/obal	t0	t15	t30	t45	t60
Sacramoso Mantova	GENT 5 ml	47,1 ± 8,5	37,6 ± 8,5	64,9 ± 8,5	56,4 ± 8,5	51,7 ± 8,5
	LAKT 5 ml	26,4 ± 7,5	21,8 ± 7,5	32,5 ± 7,5	54,6 ± 7,5	49,4 ± 7,5
	LAKT 0,5 ml	40,3 ± 6,8	46,1 ± 6,8	40,0 ± 6,8	63,6 ± 6,8	72,7 ± 6,8
	GENT 0,5 ml	37,6 ± 7,5	43,2 ± 7,5	40,8 ± 7,5	60,8 ± 7,5	44,5 ± 7,5