

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Vliv přídatku semenné plazmy na kvalitu rozmrazených  
hřebčích epididymálních spermií**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Barbora Dvořáková**

**Obor studia: Reprodukční biotechnologie**

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

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

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

V Praze dne 10. 4. 2018

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jířímu Šichtařovi Ph.D. za zodpovědné vedení mé práce a cenné odborné rady udílené v průběhu celých dvou let. Dále Ing. Filipě Bubeníčkové za podnětné komentáře k psanému textu.

# Vliv přídatku semenné plazmy na kvalitu rozmrazených hřebčích epididymálních spermií

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že přidavek semenné plazmy do rozmrazených epididymálních spermií hřebců zlepší jejich přežitelnost.

Epididymální spermie byly získány po kastraci pěti hřebců ( $n = 5$ ) a následně mrazeny se dvěma kryokonzervačními ředidly L-EDTA (A) a INRA82 (B). Po rozmrazení byly dávky ( $n = 44$ ) rozděleny na tři části a do jednotlivých alikvot byl přidán fyziologický roztok (K), semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) nebo semenná plazma hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S). U každého z těchto vzorků bylo ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) hodnoceno procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, motilita a kinematické parametry spermií. Statistické zhodnocení dat bylo provedeno pomocí Studentova t-testu a analýzy rozptylu na hladině významnosti  $P < 0,05$ .

Procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány bylo průkazně vyšší u ředidla A, zatímco motilita a kinematické parametry spermií byl průkazně vyšší u ředidla B ( $P < 0,05$ ).

Efekt obou ředidel na hodnocené parametry rozmrazených epididymálních spermií byl srovnatelný u všech zkoumaných hřebců ( $P > 0,05$ ), a to i přes to, že mezi jednotlivými hodnotami naměřenými u těchto hřebců byly významné rozdíly ( $P < 0,05$ ).

Z dalších výsledků je pak patrné, že přidavek různých druhů semenné plazmy nemá vliv na procentuální zastoupení živých spermií ani spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány ( $P > 0,05$ ), má ale signifikantně pozitivní vliv na jejich motilitu ( $P < 0,05$ ). Předpoklad, že hřebec s lépe mrazitelným ejakulátem poskytne kvalitnější semennou plazmu, ale prokázán nebyl.

Závěrem lze říci, že obě testovaná ředidla poskytovala stabilní hodnoty testovaných parametrů po rozmrazení spermií, tudíž lze obě doporučit. Stejně tak lze doporučit přidavek semenné plazmy do rozmrazených epididymálních hřebčích spermií, neboť má prokazatelně pozitivní účinky na jejich motilitu. Na původu semenné plazmy přitom pravděpodobně zásadně nezáleží.

**Klíčová slova:** semenná plazma, spermie, hřebec, kvalita

# Influence of seminal plasma on quality of frozen-thawed stallion epididymal sperms

## Summary

The aim of this study was to prove the hypothesis, that adding seminal plasma into frozen-thawed epididymal sperms of stallions will improve their survival.

Epididymal sperms were obtained by a surgical castration of five stallions ( $n = 5$ ) and then frozen with two cryoprotectants L-EDTA (A) and INRA82 (B). The insemination doses ( $n = 44$ ) were divided into three groups after thawing where different agents were added in individual aliquots: the physiological salt solution (K), seminal plasma from stallion with standard freezing ejaculate (SP) and seminal plasma from the stallion with extremely well freezing ejaculate (S). In each of these samples the percent of live sperms and sperms with intact integrity of plasmatic membrane, motility and kinematics parameters of sperms immediately after thawing (T0) and after thirty minutes of incubation (T30) were evaluated. For statistical evaluation Student t-test and ANOVA with level of importance  $P < 0,05$  were used.

The percentage representation of live sperms and sperms with intact integrity of plasmatic membrane was significantly better with extender A, while motility and kinematics parameters of sperms were significantly higher with extender B ( $P < 0,05$ ).

The effect of both extenders on evaluated parameters was similar in epididymal sperms from each of the evaluated stallions ( $P > 0,05$ ), despite significant differences measured amongst different stallions ( $P < 0,05$ ).

The results showed that seminal plasma has no influence on the percentage of live sperms, neither on the percentage of sperms with intact integrity of plasmatic membrane ( $P > 0,05$ ) but they confirmed the positive influence on the motility and kinematics parameters of sperms ( $P < 0,05$ ). The difference amongst the seminal plasmas testified in favour of seminal plasma from stallion with standard freezing ejaculate did not prove the premise that the stallion with extremely productive frozen ejaculate had given superior seminal plasma.

In conclusion we can say, that both extenders gave stable values of tested parameters of post-thawed sperms, therefor we can recommend both of them. We can also recommend adding seminal plasma into post-thawed epididymal sperms, because it has significantly positive outcomes on their motility. The origin of seminal plasma seems not to be important.

**Keywords:** seminal plasma, sperm, stallion, quality

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce a hypotéza.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Spermie.....</b>	<b>12</b>
3.1.1	Spermatogeneze .....	12
3.1.2	Anatomie hřebčí spermie .....	14
3.1.3	Procesy v nadvarletí.....	16
<b>3.2</b>	<b>Semenná plazma.....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Přidatné pohlavní žlázy.....	19
<b>3.3</b>	<b>Ejakulace.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Způsob odběru epididymálních spermií .....</b>	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>Kryokonzervace epididymálních spermií .....</b>	<b>23</b>
3.5.1	Obecné vlastnosti ejakulátu .....	23
3.5.2	Vlastní kryokonzervace epididymálních spermií .....	26
3.5.3	Rozmrazení a zhodnocení vzorku.....	28
<b>3.6</b>	<b>Oplozovací schopnost epididymálních spermií .....</b>	<b>28</b>
3.6.1	Ředidlo a kryokonzervační protokol.....	28
3.6.2	Přídavek semenné plazmy .....	30
<b>4</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Design experimentu.....</b>	<b>32</b>
4.1.1	Získ epididymálních spermií .....	32
4.1.2	Kryokonzervační ředidla.....	33
4.1.3	Mrazení a rozmrazení epididymálních spermií .....	33
4.1.4	Semenná plazma .....	33
4.1.5	Analýza rozmrazených vzorků .....	34
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Vliv kryokonzervačního ředidla .....</b>	<b>37</b>
5.1.1	Procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány.....	37
5.1.2	Motilita.....	38
<b>5.2</b>	<b>Vliv kryokonzervačního ředidla u konkrétního hřebce .....</b>	<b>39</b>
5.2.1	Procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány.....	39
5.2.2	Motilita.....	40
<b>5.3</b>	<b>Vliv semenné plazmy.....</b>	<b>41</b>



5.3.1	Procentuální zastoupení živých spermíí a spermíí s neporušenou integritou plazmatické membrány.....	41
5.3.2	Motilita.....	41
<b>5.4</b>	<b>Vliv kryokonzervačních ředidel a semenné plazmy.....</b>	<b>43</b>
5.4.1	Procentuální zastoupení živých spermíí a spermíí s neporušenou integritou plazmatické membrány.....	43
5.4.2	Motilita.....	45
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>48</b>
<b>6.1</b>	<b>Vliv kryokonzervačního ředidla .....</b>	<b>48</b>
<b>6.2</b>	<b>Vliv kryokonzervačního ředidla u konkrétního hřebce .....</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Vliv semenné plazmy.....</b>	<b>51</b>
<b>6.4</b>	<b>Vliv kryokonzervačních ředidel a semenné plazmy.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Zdroje.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>62</b>

# 1 Úvod

Se schopností získat epididymální spermie se objevily možnosti zachovat inseminační dávky nejen samců kastrovaných, ale především samců zraněných nebo dokonce náhle uhynulých. Spermie z nadvarlete přirozeně neprochází samčím pohlavním ústrojím a tím pádem se nikdy nedostanou do kontaktu se semennou plazmou. Semenná plazma ovšem v ejakulátu samce tvoří velice podstatnou část a slouží především jako zdroj energie, dále pak k výplachu vývodných pohlavních cest samce, stejně jako k úpravě pH pochvy samice.

Při procesu kryokonzervace spermií, ať už ejakulovaných nebo epididymálních, je nutné předcházet riziku poškození plazmatické membrány buněk vlivem tvorby ledových krystalků vody. Proto je většina semenné plazmy a nadbytečné tekutiny nahrazena ředidlem s kryoprotektanty. Rozmrazená inseminační dávka pak na rozdíl od čerstvého ejakulátu postrádá velmi podstatný zdroj energie, který spermiím umožňuje přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou.

V této práci bude proto věnována pozornost přidavku semenné plazmy do rozmrazených epididymálních hřebčích spermií, za účelem podpory jejich přežitelnosti, a tedy potenciálního zvýšení úspěšnosti zabřezávání samice. Podle dostupných výzkumů z předchozích let byl zjištěn pozitivní vliv na oplazovací schopnost spermií již při přidavku 20 % semenné plazmy. V této práci bude zkoumán vliv přidavku 33 % semenné plazmy k epididymálním hřebčím spermiím.

## **2 Cíl práce a hypotéza**

Diplomová práce se bude zabývat ověřením hypotézy, že přidavek semenné plazmy do rozmrazených epididymálních spermií zlepší jejich přežitelnost.

### 3 Literární rešerše

Dříve než bude posouzen vliv přídatku semenné plazmy na kvalitu rozmrazených hřebčích epididymálních spermií, je vhodné uvést pro celistvost textu některá fakta. Proto bude následující podkapitola věnována samčí pohlavní buňce – spermii.

#### 3.1 Spermie

Spermie jakožto samčí pohlavní buňka, obsahuje pouze poloviční sadu chromozomů. Jelikož je v práci věnována pozornost hřebčím spermiím, poloviční sadou chromozomů se rozumí 32 (McKinnon et al., 2011). Spermie vzniká ve varlatech v procesu zvaném spermatogeneze. Skládá se z hlavičky, pokryté z vrchu akrozomem a vyplněné jádrem, spojovací části krčku a bičíku, umožňujícího pohyb. Jako každá buňka je a svém povrchu ohraničená plazmatickou membránou (Reece, 2011).

##### 3.1.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces vzniku spermií, během kterého se z kulaté diploidní zárodečné buňky spermatogonie stává haploidní bičíkatá spermie. Tento proces probíhá ve stočených semenotvorných kanálcích varlete a je řízen hypotalamo-hypofyzární osou (Samper, 2008). Spermatogenezi lze podle Reece (2011) rozdělit na dvě části - spermatocytogenezi a spermatohistogenezi. Spermatocytogeneze podle něj zahrnuje fázi množení, růstu a zrání, spermatohistogeneze pak vlastní metamorfózu.

McKinnon (2011) a Samper (2008) ovšem rozdělují spermatogenezi na části tři. První fáze – spermatocytogeneze zahrnuje mitotické dělení spermatogonií, druhá fáze označuje období meiózy a jako poslední nastává spermatogeneze, během které dochází ke zrání a diferenciaci spermatid.

I když proces rozdělují různí autoři rozdílně, probíhá vždy stejným způsobem a na stejném místě – ve stočených semenotvorných kanálcích.

Stočené semenotvorné kanálky jsou hlavní složkou parenchymu varlete. Obsahují několik vrstev zárodečných buněk v různých fázích vývoje, které nasedají na bazální membránu. Vývoj zárodečné buňky ve spermii, probíhá směrem od bazální membrány k lumen semenotvorného kanálku. Jedná se o kontinuální proces, a tudíž je fáze vývoje v každé části semenotvorného kanálku různá (Samper, 2008).

Kromě bazální membrány a čtyř až pěti vrstev semenných buněk, jsou důležitou součástí varlete také Sertoliho buňky. Sertoliho buňky mají kuželovitý tvar a svou základnou nasedají na bazální membránu semenotvorného kanálku. Díky těsným spojům sousedních buněk vytváří krevní varletní bariéru, která zamezuje spermii vstupovat přes bazální membránu do intersticia a současně udržuje stálé prostředí uvnitř kanálku (Reece, 2011). Nazývají se rovněž buňky podpůrné, neboť poskytují semenným buňkám některé proteiny důležité pro vazbu vitamínu A, železa a mědi. Dále vytváří také androgeny vázající protein, zajišťující správné množství testosteronu pro spermatogenezi. Další funkcí Sertoliho buněk je fagocytóza přebytečných částí spermatidy během metamorfózy ve spermii (McKinnon, 2011).

Nedílnou součástí varlete jsou také Leydigovy buňky, vmezeřené v intersticiu mezi jednotlivými stočenými semenotvornými kanálky. Leydigovy buňky vytváří v četných endoplasmatických retikulech cholesterol, který je dále metabolizován na testosteron, nezbytný pro spermatogenezi. Stálou produkci testosteronu zajišťují tyto buňky od puberty až do konce života (McKinnon, 2011).

Vlastní proces spermatogeneze se skládá z několika mitotických a dvou meiotických dělení. Výsledkem je, že z jedné diploidní buňky vzniká velké množství buněk haploidních.

Na počátku je buňka nazývaná spermatogonie, která se mitoticky dělí na dvě dceřiné buňky. Jedna z nich zůstává jako spermatogonie u bazální membrány, druhá postupuje dále do lumen jako spermatogonie A. Spermatogonie A podstupuje další mitotické dělení, na spermatogonie intermediálního typu a posléze na spermatogonie B. Následuje poslední mitotické dělení spermatogonií B, během kterého vznikají primární spermatocyty. Primární spermatocyty tedy stále obsahují diploidní sadu chromozómů. O zmenšení sady chromozómů na polovinu se postará první meiotické dělení, během kterého vznikají sekundární spermatocyty a druhé meiotické dělení, které má za následek vznik spermatid. Ještě před uvolněním ze zárodečného epitelu do lumen semenotvorného kanálku, prodělají spermatidy transformaci ve spermie. Buňka získává protáhlý tvar, kdy z centriolu vzniká nejprve bičíková axonema, později bičík, na povrchu hlavičky vzniká z Golgiho aparátu akrozom a dochází rovněž ke kondenzaci chromatinu. Buňka se zbavuje přebytečné cytoplasmy i organel pomocí Sertoliho buněk, které přebytečný obsah fagocytují. Spermie tedy z původních organel využije pouze jádro, Golgiho aparát, centrioly a mitochondrie. Hotové spermie jsou uvolněny do lumen kanálku a dále pokračují přes varletní síť a odvodné kanálky do nadvarlete (McKinnon, 2011; Samper, 2008).

Tento proces u hřebce trvá 57-58 dní (Samper, 2008) a celkovou produkci hřebčích spermií lze odhadnout na 18-20 x 10<sup>6</sup> spermií na jeden gram varletního parenchymu za den (Johnson et al., 2000).

Proces spermatogeneze podléhá neurohumorálnímu řízení. Na řízení spermatogeneze se podílí tyto orgány: hypotalamus, hypofýza, epifýza, vomeronasální orgán a samozřejmě varle. Jelikož se jedná o provázaný systém, každý orgán ovlivňuje svou sekrecí všechny ostatní. Kromě těchto orgánů mají na hřebčí chování a spermatogenezi vliv také taktilní, sluchové, vizuální a čichové podněty z okolí (Samper, 2008).

Hypotalamus produkuje pulzní sekrecí gonadotropiny uvolňující hormon (GnRH). Na tento hormon reaguje přední lalok hypofýzy produkcí luteinizačního hormonu (LH) a folikulostimulačního hormonu (FSH). FSH působí na Sertoliho buňky, které podněcuje k produkci sloučenin důležitých pro spermatogenezi, jako je například růstový faktor, androgeny vázající protein, estrogenery nebo aktiviny a inhibiny (Samper, 2008). Počet Sertoliho buněk je v pozitivní korelaci s váhou varlete i s počtem zárodečných buněk a s produkcí spermií (Blanchart et Johnosn, 1997).

Luteinizační hormon pak ovlivňuje produkci testosteronu v Leydigových buňkách. Testosteron působí především v pozdní fázi spermatogeneze, utváří sekundární pohlavní znaky a zvyšuje samčí libido. Tento hormon je produkován nejen Leydigovými buňkami, ale také v semenotvorných kanálcích a vývodném kanálku nadvarlete (Samper, 2008).

Nejméně objasněná je funkce vomeronasálního orgánu. Hřebec pomocí něho vnímá feromony přítomné samice a díky propojení vomeronasálního orgánu a hypotalamu, dochází k pozitivní zpětné vazbě a silnějšímu vylučování GnRH a tím i LH a FSH.

Vliv epifýzy spočívá v produkci melatoninu, který vzniká za tmy. U koní jeho přítomnost snižuje tvorbu GnRH, a brzdí tak produkci spermií. Nutno říci, že epifýza má větší vliv na samice, než na samce, neboť hřebci na rozdíl od klisen zachovávají pohlavní aktivitu po celý rok, na podzim a v zimě je ovšem utlumená (Samper, 2008).

Mezi hladinami jednotlivých hormonů působí pozitivní i negativní zpětná vazba a udržuje tak rovnováhu organismu.

### **3.1.2 Anatomie hřebčí spermie**

Hřebčí spermie je stejně jako spermie všech ostatních druhů zvířat vysoce specializovaná buňka, skládající se z hlavičky, krčku, spojovací části bičíku, hlavní části bičíku a koncové části bičíku. Hlavička hřebčí spermie je zploštělá a tvarem připomíná pádlo. Délka hlavičky je 6-7  $\mu\text{m}$ , celá spermie potom měří 60-65  $\mu\text{m}$  (Samper, 2008).

## **Plazmatická membrána**

Plazmatická membrána je dvojvrstva fosfolipidů, která tvoří povrch celé spermie. Kromě hydrofilních fosfátových hlaviček a hydrofobních acylových řetězců obsahuje membrána také cholesterol a proteiny. Proteiny tvoří asi 50 % molární hmotnosti celé membrány a slouží jako receptory, iontové kanály či póry. Jsou vymezené buďto částečně nebo prochází celou membránou (Samper, 2008; Sieme et al., 2015). Cholesterol působí jako stabilizační substance a do membrány se účelně přidává před mražením spermií, neboť zvyšuje odolnost plazmatické membrány během mrazícího procesu (Moore et al., 2005).

Plazmatická membrána, ačkoli pokrývá spermii od hlavičky po bičík, má v různých částech spermie odlišné složení lipidů a proteinů (Samper, 2008). I proto lze plazmatickou membránu spermie rozlišit na akrozomální a postakrozomální část a dále část bičíku, díky které má celá spermie negativní náboj.

Akrozomální část plazmatické membrány je dále možné rozdělit na přední okrajovou část, hlavní část a ekvatoriální segment. V místě ekvatoriálního segmentu splývá plazmatická membrána spermie se zonou pellucidou vajíčka během časného oplození. Postakrozomální část plazmatické membrány se nachází mezi ekvatoriálním segmentem a krčkem (Samper, 2008).

## **Akrozom**

Akrozom je struktura vznikající z Golgiho aparátu. Vyskytuje se na přední části hlavy spermie, a to mezi plazmatickou membránou a membránou jadernou. Samotný akrozom má svou vlastní sadu membrán – vnitřní a vnější akrozomální membránu. Uvnitř akrozomu je směs hydrolytických a glykolytických enzymů, nejznámější z nich jsou: hyaluronidáza proakrozin-akrozin, neuraminidáza, fosfolipázy A a C, či  $\beta$ -galaktosidáza. Tyto enzymy jsou důležité při oplození (Samper, 2008).

## **Jádro**

Jádro spermie stejně jako jádro každé buňky obsahuje genomovou DNA. Ta ale místo histonů obaluje proteiny zvané protaminy. Protaminy jsou nízkomolekulární proteiny bohaté na zbytky aminokyselin cysteinu a argininu. Komplex DNA a protaminů je navíc zpevněn četnými disulfidickými můstky. Takovýto chromatin by u zdravé spermie měl být rezistentní vůči kyselému prostředí. Tato vlastnost se proto využívá při určování plodnosti či neplodnosti hřebce (Dias et al., 2006; Samper, 2008).

## **Krček**

Krček spermie slouží jako propojovací část mezi hlavičkou a bičíkem, kdy hlavice bičíku nasedá do implantační jamky hlavičky spermie. Implantační jamka je u hřebčích spermií často uložena excentricky, což vede k nasazení bičíku mimo středovou osu spermie. Tento jev je u hřebců považován za normální, a tudíž se toleruje, a to i přes to, že takto vyosený bičík může způsobovat cirkulární pohyb spermie (Brito, 2007; Samper, 2008).

Krček jako takový zahrnuje připojovací část, proximální centriol a několik mitochondrií. Připojovací část se kromě hlavice bičíku skládá také ze segmentovaných provazců. Segmentované provazce jsou tvořeny vláknitým proteinem a dále se napojují na hladká vlákna, která tvoří bičík (Brito, 2007).

## **Bičík**

Místo, ve kterém se začínají spiralizovat mitochondrie, označuje začátek spojovací části bičíku. Spojovací část bičíku je charakteristická právě mitochondriální pochvou, dále pak devíti hladkými provazci a jimi obklopeným osovým vláknem. Osově vlákno se skládá z devíti párů mikrotubulů a jednoho páru mikrotubulů uprostřed. Páry mikrotubulů mají krátká dyneinová ramena, kterými se navzájem spojují, což umožňuje pohyb bičíku. Pro ten je zároveň nezbytně důležitá mitochondriální pochva, vytvářející energii ve formě ATP. Mitochondriální pochvu tvoří 50-60 mitochondriálních spirál (Brito, 2007; Samper, 2008).

Hlavní část bičíku je jeho nejdelší součástí. Měří 30–44  $\mu\text{m}$  a skládá se z osového vlákna a hladkých vláken, které namísto mitochondriální pochvy obklopuje pochva vláknitá. Vláknitá pochva nemá schopnost smršťovat se, ale zajišťuje bičíku pružnost, kterou k vykonání pohybu potřebuje (Brito, 2007).

Koncová část bičíku už neobsahuje ani vláknitou pochvu, ani hladká vlákna. Tento krátký závěrečný segment se skládá pouze z osového vlákna obklopeného plazmatickou membránou (Brito, 2007).

### **3.1.3 Procesy v nadvarletí**

Do nadvarlete se uvolněné spermie dostávají přes odvodné kanálky, které se v hlavě nadvarlete spojují v jeden stočený kanálek. Jelikož spermie uvolněné ze zárodečného epitelu nemají schopnost pohybu, jsou do nadvarlete přesunovány pomocí tekutiny ze stočených semenotvorných kanálků a varletní sítě a také pomocí, u hřebců hojně se vyskytujících, hladkosvalových buněk (Reece, 2011).



Spermie postupují přes hlavu a tělo do ocasu nadvarlete, kde zůstává uloženo asi 70 % celkové produkce. Během průchodu nadvarletem, který trvá jeden až dva týdny spermie podle Coopera (2012) a Dacheux et Dacheux (2014) postupně získávají schopnost pohybu vpřed a také schopnost oplozovací. Zisk schopnosti progresivního pohybu vpřed za hlavičkou ovšem nelze přisoudit nadvarleti bez výhrady. Důležitou roli hraje totiž také semenná plazma, se kterou se spermie v nadvarleti zákonitě nepotkají. Na nízkou motilitu epididymálních spermií upozorňuje například Morris et al. (2002) a Neild et al. (2006) dokonce přiznává, že motilita může u spermií z nadvarlete chybět docela.

Na počátku do nadvarlete vstupuje spermie nezralá a neschopná pohybu. Během poslední fáze spermatogeneze ztrácí spermie schopnost transkripce a translace, a tudíž se dále nedělí, veškeré změny, které v nadvarleti prodělává, jsou pouze na úrovni vzniklé spermie a jsou dány především prostředím nadvarlete (Robaire et Hinton, 2001).

Prostředí kanálku nadvarlete se ve svém průběhu značně proměňuje, Domenikoni et al. (2016) dokonce rozlišuje 19 různých segmentů nadvarlete a operuje s myšlenkou, že nadvarle je vlastně série několika orgánů poskládaných vedle sebe. Epitel nadvarlete se skládá z několika druhů buněk. Patří mezi ně především buňky hlavní, které představují 65-80 % celkového epitelu a v různé podobě se vyskytují po celé délce nadvarletního kanálku, dále buňky bazální, buňky imunitního systému nebo buňky pohlcující zbytky cytoplazmy, které se též účastní změn membrán (Robaire et Hinton, 2001). Díky změnám prostředí se hned v přední části nadvarlete zvýší koncentrace spermií z  $10^8$  v 1 ml ve varletní síti na  $10^9$  v 1 ml. Podobně se zvýší i koncentrace proteinů, která vzroste od varletní sítě k distální části hlavy nadvarlete z původních 2-4 mg/ml na 50-60 mg/ml. Většina proteinů je pak u různých druhů zvířat stejná a je produkována nadvarletním epitelem (Dacheux et Dacheux, 2014).

Proteiny mohou být zapojeny do molekulární výměny látek, případně jako nosiče hydrofobních molekul a v neposlední řadě slouží k ochraně povrchu spermií, neboť při vymytí proteinů začnou spermie neprodleně aglutinovat. Hlavními proteiny, produkovány u hřebce na různých místech nadvarletního kanálku jsou proteiny lactoferrin a clusterin. U většiny druhů je nejvíce zastoupen protein clusterin, který u koní tvoří 38,8 % epididymální sekrece a vyskytuje se ve třech izoformách. Hřelec má ovšem nejvyšší množství proteinu lactoferrinu a to celkem 41,2 % (Dacheux et al., 2012).

V nadvarleti prodělává spermie řadu změn. Nejpatrnější morfologickou změnou je posouvání cytoplazmatické kapky po bičíku směrem dolů. Protoplazmatická kapka je typickým znakem nezralé spermie a mizí během průchodu střední části hlavy nadvarlete.

Mezi další procesy, které spermie v nadvarletí podstupuje, patří také změna uspořádání proteinů a lipidů membrány na povrchu spermie (Samper, 2008).

Kromě morfologických změn, dochází u spermie rovněž ke změně aktivity, která se nejprve projevuje nepravidelným a asymetrickým mrskáním bičíku v počátečních částech nadvarlete. To ale postupně, s průchodem nadvarletem, přechází v pravidelné a zcela symetrické vlnění bičíku. K pohybu bičíku je nutný intracelulární cAMP, proto epididymální tekutina obsahuje množství vápenatých a hydrogenuhličitanových iontů, které kontrolují jeho koncentraci. Dále je nezbytná kaskáda po sobě jdoucích fosforylací a defosforylací ramen dyneinu. Vlastní pohyb pak umožňují mikrotubuly, klouzající po celé délce bičíku (Dacheux et Dacheux, 2014).

Již výše bylo zmíněno, že k progresivnímu pohybu vpřed za hlavičkou nejsou epididymální spermie připraveny vždy. Toto tvrzení potvrzuje také studie Neuhauser et al. (2013), ve které byly zkoumány epididymální spermie hřebců. Tyto spermie byly ihned po odběru naředěny ve fyziologickém roztoku a jejich progresivní motilita se v průměru pohybovala kolem 12,65 %. S podobnými výsledky přichází i Sharma et al. (1997), který u mužských epididymálních spermií zjistil progresivní pohyb vpřed jen u 4,5 %.

Tyto studie nevylučují u epididymálních spermií progresivní pohyb vpřed, a ani nevyvrací jejich oplozovací schopnost, upozorňují jen na fakt, že v nadvarletí získává schopnost pohybu vpřed pouze malé procento spermií. Je tedy nasnadě, že semenná plazma má zásluhu na zvýšení procenta progresivně motilních spermií (Neuhauser et al., 2015).

I když v nadvarletí pohyb vpřed nenabyde každá spermie, všechny při průchodu nadvarletem dozrávají. Znamená to řadu výše popsaných změn vedoucích ke schopnosti aktivovat vlastní hyperaktivní pohyb vpřed, spustit kapacitaci, navázat se na zonu pellucidu, splynout s membránou oocyty a vytvořit životaschopné embryo.

### **3.2 Semenná plazma**

Semenná plazma je produktem přídatných pohlavních žláz a spolu se spermii tvoří ejakulát. Množství ejakulátu je u hřebců odlišné podle velikosti jedince, ale také dle ročního období, potažmo délky slunečního dne. Hřebci jsou pohlavně aktivnější na jaře a v létě, tudíž v období, kdy je den delší. Průměrně se objem celého ejakulátu pohybuje kolem 50-200 cm<sup>3</sup>, přičemž semenná plazma tvoří jeho převážnou část, tedy 60-80 % (Higgins, 2012; Morel, 2008).

Funkcí semenné plazmy je hned několik. V první řadě dodává spermii energii, dále chrání spermie před změnami pH a oxidací a také zajišťuje ochranu proti změnám

osmotického tlaku. Semenná plazma upravuje prostředí močové trubice samce a pohlavního ústrojí samice a obecně zvyšuje oplozovací schopnost spermií (Reece, 2011).

### 3.2.1 Přídavné pohlavní žlázy

Mezi přídavné pohlavní žlázy lze u hřebce zařadit ampuli chámovodu, semenné vāčky, prostatu a bulbouretrální žlázy. Každá z těchto žláz produkuje vlastní sekret, který dodává do ejakulátu důležité složky.

**Ampule chámovodu** vzniká rozšířením chámovodu v místě vstupu do močové trubice a z tohoto důvodu se někdy mezi přídavné pohlavní žlázy neřadí. Jedná se o párovou žlázu, jejíž sekret se z převážné části (asi z 80%) uvolňuje hned v první frakci ejakulátu (Weber et Woods, 1993). Tento sekret je bohatý na ergothionin, který působí jako antioxidant a váže na sebe toxické meziprodukty metabolismu spermií (Morel, 2008).

U koní se dále vyskytují **semenné vāčky**, které u jiných druhů zvířat nesou název měchýřkovité žlázy. Jsou to párové žlázy nacházející se po obou stranách močového měchýře. Jejich sekret představuje převážnou část semenné plazmy a je bohatý na kyselinu citronovou a draslík, který slouží jako výživa spermiím (Morel, 2008). Sekret semenných vāček má gelovou konzistenci a uvolňuje se v postpermiové frakci (Weber et Woods, 1993). Velikost i sekrece semenných vāček se mění v závislosti na ročním období a hladině testosteronu. V průběhu sezony mohou nabýt až 20 cm do délky a 5 cm v průměru, v období sexuálního klidu jsou značně menší (Schnorbrich et al., 2016).

Další přídavnou pohlavní žlázou je **žláza předstojná**, jinými slovy také prostata. Je to žláza vyskytující se okolo močové trubice mezi bulbouretrální žlázou a ampulí chámovodu. Prostata hřebce je v poměru s ostatními druhy zvířat největší. Skládá se ze dvou lalůček širokých 25 mm a dlouhých až 8 cm a krčku širokého 10 mm (Schnorbrich et al., 2016). Prostata produkuje alkalický sekret s vysokým obsahem proteinů, kyseliny citronové a zinečnatých iontů. Sekret prostaty neobsahuje žádné cukry a jeho funkcí je upravit prostředí v pochvě samice (Morel, 2008).

**Bulbouretrální žlázy** neboli žlázy Cowperovy, jsou žlázy vyskytující se nejbliže kořeni penisu, po stranách močové trubice. Jedná se o párové žlázy vejčitého tvaru, dlouhé asi 35 mm a vysoké 22 mm (Schnorbrich et al., 2016). Tyto žlázy produkuje zásaditý, hlenovitý sekret, který působí baktericidně a slouží k pročištění močové trubice, kdy upravuje její kyselé pH, a v neposlední řadě také jako lubrikant (Morel, 2008).

Není tedy pochyb, že semenná plazma je důležitou složkou ejakulátu, která svým složením napomáhá spermii proniknout samičím pohlavním ústrojím až do vejcovodu, kde následně dochází k oplození vajíčka.

### 3.3 Ejakulace

Výronu semene, neboli ejakulaci předchází erekce penisu a emise spermií a sekretů přídatných pohlavních žláz do močové trubice. Tento proces lze rozdělit na dvě části první – sexuální vzrušení a druhá - vlastní kopulace (Waheed et al., 2015). Zatímco k erekci může u hřebců docházet běžně i spontánně, k emisi a ejakulaci dochází spontánně jen zřídka (McDonnell, 1992). Je tedy nutná intravaginální stimulace penisu nebo alespoň napodobení podmínek pomocí umělé vaginy.

**Erekce** je v obou případech nutnou podmínkou. Dochází k ní na základě vnějších podnětů, kterými mohou být říjná samice, případně fantom v odběrové místnosti. Podnět k erekci je ovlivňován ze sakrální oblasti parasymptikem. Během erekce dochází k relaxaci cév a nalití kavernózního a houbovitého tělesa pyje a současně k relaxaci zatahovače pyje (McDonnell, 1992).

Pokud dojde k mechanické stimulaci pyje, uvolní se pod vlivem sakrálního reflexu malé množství sekretu z prostaty. Samotné ejakulaci předchází tzv. emise. **Emise** představuje uvolnění spermií a sekretu přídatných pohlavních žláz do močové trubice, doprovázené uzavřením hrdla močového měchýře. Tento reflex je řízen z hrudní a bederní míchy.

K emisi dochází díky kontrakci hladkosvalových buněk nadvarlete, chámovodu, ampule chámovodu, měchýřkovitých žláz, prostaty a bublouretrálních žláz. Uzavření močového měchýře je pak zajištěno kontrakcí hladkosvalových buněk v krčku močového měchýře (McDonnell, 1992).

Emise slouží jako spouštěč vlastní **ejakulace**. Ejakulace je prudký výron semene z močové trubice, řízený symptikem ze sakrální oblasti míchy. Je způsoben rytmickými kontrakcemi hladkosvalových buněk močové trubice a kavernózního tělesa (McDonnell, 1992).

Během kopulace dochází k druhově specifickému počtu přírazů. U hřebce se jedná o sedm až devět kopulačních pohybů, které vedou k reflexu ejakulace a vytlačení odpovídajícího množství ejakulátu. Výron semene u hřebce probíhá v 5-10 frakcích se snižujícím se tlakem, objemem a koncentrací spermií. S každou frakcí dochází k charakteristickým pohybům ocasu hřebce (McDonnell, 1992).

Podle složení lze ejakulát rozdělit na tři části: pre-spermiovou, spermiovou a pospermiovou. Pre-spermiová frakce obsahuje výměšek bulbouretrálních žláz a slouží především k propláchnutí močové trubice. Spermiová frakce pak přirozeně obsahuje nejvíce spermií a jedná se tedy o několik frakcí z varlete, nadvarlete a ampule chámovodu, přičemž na spermie nejbohatší jsou první tři frakce. Poslední část ejakulátu pak zahrnuje sekrety ze semenných váčků a prostaty (Loomis, 2016).

Rua et al. (2016) dokonce uvádí korelaci mezi objemem ejakulátu a chováním hřebce. Uvádí, že objem ejakulátu je vyšší u hřebců, kteří během kopulace řehtají a zakusují se klisně do krku.

Pro přirozenou plemenitbu i sběr ejakulátu na inseminačních stanicích je důležité, aby proces ejakulace probíhal fyziologicky. Ejakulace může z mnoha důvodů selhat, v takovém případě je nutné, uchýlit se k alternativnímu způsobu zisku spermií nebo plemeníka vyřadit.

### **3.4 Způsob odběru epididymálních spermií**

V současnosti se u koní k inseminaci využívají nejčastěji dávky získané ejakulací do umělé vaginy, plněné do klasických pejet nebo aluminiových tub. Může ale nastat situace, kdy je potřeba uchovat sperma epididymální. Jedná se především o zranění, způsobující nemožnost dalšího odběru do umělé vaginy, náhlou smrt nebo indikaci ke kastraci u geneticky cenného hřebce (Heise et al., 2011). Odběr spermií z nadvarlete tak bývá poslední možností, jak genetickou informaci konkrétního zvířete zachovat. V jiných případech se odběr epididymálních spermií nevyužívá. Jestliže je hřebec normálně schopný odběru ejakulovaných spermií, bývá použit právě tento způsob, neboť odebírat spermie z nadvarlete živému sedovanému zvířeti, nebývá zpravidla příliš efektivní (Šichtař et al. Janošíková, 2017).

Ačkoli jsou ejakulované inseminační dávky častější, i epididymální spermie mají svůj význam. Johnson et al. (1980) dokonce vyřkl myšlenku, že by epididymální spermie mohly být odolnější chladovému šoku a tím pádem lépe mrazitelné. Lepší motilitu rozmrazených epididymálních spermií ovšem potvrdil jen jeden výzkum (Volkman et al., 2001), ve většině případů dosahují v tomto parametru lepších hodnot u spermií ejakulovaných (Heise et al., 2011). Nelze ovšem opomenout fakt, že motilita nemusí být u epididymálních, jinak životaschopných spermií, příliš rozvinuta, jak dokládají Morris et al. (2002) a Neild et al. (2006). Ta lze pak stimulovat přidáním semenné plazmy nebo jiného zdroje energie.

Spermie odebrané z nadvarlete se mohou v různých parametrech od ejakulovaných lišit, nicméně oplozovací schopnost u nich bývá zachována i po rozmrazení. Koneckonců i první

narozené hříbě po inseminaci kryokonzervovaným spermatem vzniklo ze spermie odebrané z nadvarlete (Morris et al., 2002).

Laboratornímu způsobu odběru epididymálních spermií předchází chirurgické odstranění varlat, tedy kastrace hřebce. Varlata jsou spolu s nadvarlaty přepravena do laboratoře, kde může proběhnout odběr spermií.

Při kastraci je potřeba dbát na to, aby veterinář neporušil nadvarle ani chámovod, neboť i v něm se vyskytují oplození schopné spermie. Podvázáním chámovodu se předejde zbytečným ztrátám spermií (Roels et al., 2013). Varlata je potřeba omýt fyziologickým roztokem a sterilně uložit. Pro převoz se pak používají polystyrenové boxy s chladícím médiem, podobně jako při převozu chlazených inseminačních dávek. Spermie ovšem zůstávají v nadvarleti životaschopné i po 24 hodinách v pokojové teplotě (Falomo et al., 2016; Roels et al., 2013; Šichtař et Janošíková, 2017), anebo dokonce 96 hodin při teplotě 4 °C (James et al., 2002; Viera et al., 2013).

Jakmile jsou varlata převezena na specializované pracoviště, může začít izolace spermií. K izolaci spermií se běžně užívají dvě základní techniky. U každé z nich, je ovšem ze všeho nejdříve nutné oddělit nadvarle s chámovodem od varlete (Šichtař et Janošíková, 20117).

První z metod je **flotace**. Flotace je poměrně jednoduchá metoda izolace spermií, která nutně nevyžaduje vysokou odbornost. Ocas nadvarlete spolu s chámovodem se na 10-15 místech nařízne skalpelem a umístí do Petriho misky s 5 ml ředidla ohřátého na 37 °C. V případě, že hřbec již dříve působil na inseminační stanici, je vhodné použít osvědčené ředidlo. Během deseti minut vyplavou spermie z nadvarlete i chámovodu ven do ředidla a po odebrání tkáně mohou být zakonzervovány (Cary et al., 2004; Roels et al., 2013).

Druhou metodou je metoda **zpětného výplachu spermií**. Při této metodě se do proximální části chámovodu zavede jednorázová špička nebo jehla napojená na stříkačku s výplachovým médiem. Na úrovni přechodu těla nadvarlete v ocas nadvarlete se provede řez. Opatrným, jemným tlakem na píst stříkačky se médium protlačí nadvarletem a spermie se spolu s ředidlem vyplaví ven (Cary et al., 2004; Roels et al., 2013). Tato technika umožní získat větší množství spermií než metoda flotace (Roels et al., 2013).

Méně účinné, a tedy téměř nevyužívané metody, jsou **elektroejakulace a perkutánní aspirace**. V obou případech musí být hřbec pod sedativy. Perkutánní aspirace se dělá u stojícího hřebce pod lokální anestezii, elektroejakulace pod anestezii celkovou (Falomo et al., 2016). Obě metody vedou k zisku malého počtu spermií, jsou ovšem u jednoho zvířete opakovatelné.

V nadcházející kapitole bude popsán proces mrazení spermií za účelem jejich uchování. Do tohoto procesu zpravidla patří mimo jiné i odstranění přebytečné semenné plazmy, která při procesu mrazení spermiím škodí. Nabízí se tedy možnost uchovat semennou plazmu zvlášť a do rozmrazených inseminačních dávek ji opět přidat, aby spermie nebyly o tuto drahocennou tekutinu připraveny. Neboť semenná plazma může ovlivňovat membránovou integritu, motilitu a oplozovací schopnost hřebčích spermií (Gibb and Aitken, 2016).

Dalším zkoumaným způsobem, jak ponechat v inseminační dávce semennou plasmu, je přimístit její malé množství v kombinaci s ředidlem ještě před zamrazením (Gonzales et al., 2015).

### 3.5 Kryokonzervace epididymálních spermií

Kryokonzervace spermií je osvědčený způsob, jak zachovat spermie oplození schopné po neomezeně dlouhou dobu. Epididymální spermie se sice v čerstvém stavu využít dají, nicméně z praktických důvodů se častěji mrazí. Již bylo řečeno, že se epididymální spermie uchovávají především při náhlém zranění či úmrtí, a je zřejmé, že se tato událost jen těžko synchronizuje s říjí vhodné samice. Proto se epididymální spermie zpravidla zamrazují, a ačkoli v porovnání s ejakulovanými nedosahují příliš dobrých výsledků, oplozovací schopnost si ve většině případů, s ohledem na mrazitelnost hřebce, ponechávají. Morris et al. (2002) uvádí úspěšnost inseminace klisen epididymální inseminační dávkou mezi 17 % a 30 %. Heise et al. (2010) uvádí po inseminaci rozmrazenou epididymální inseminační dávkou poměrně velké rozpětí zabřezávání od 0 % do 67 %.

Proces mrazení epididymálních spermií je totožný s postupem při kryokonzervaci spermií ejakulovaných. Před zamrazením je potřeba zkontrolovat kvalitu získaného vzorku. Ačkoli u epididymálních spermií se hodnotí před kryokonzervací pouze koncentrace spermií, u ejakulovaných spermií se hodnotí celá řada parametrů (Šichtař et Janošíková, 2017).

#### 3.5.1 Obecné vlastnosti ejakulátu

U každého ejakulátu lze hodnotit vlastnosti mikroskopicky a makroskopicky.

Jako první se přistupuje k **makroskopickému** hodnocení, které je možné provést pouhým okem a zahrnuje posouzení objemu, barvy, konzistence, případných příměsí ejakulátu a čichem je zhodnocen zápach.

Objem ejakulátu se může značně lišit v závislosti na velikosti hřebce, jeho vyčerpání či ročním období. Samper (2008) udává průměrný objem celého ejakulátu 60-120 ml. Objem je spolu s koncentrací spermií důležitou informací ke zjištění celkového počtu spermií ve vzorku. Tento údaj je pak nutné před zamrazením znát.

Konzistence je dána počtem spermií ve vzorku a složením semenné plasmy. Může být od krémové až po vodnatou. Příliš vodnatá konzistence ovšem není žádoucí, neboť značí malý nebo žádný výskyt spermií. Neměly by se ale vyskytovat ani žádné sraženiny, vzorek by měl mít rovnoměrnou konzistenci v celém objemu (Samper, 2008).

Barva ejakulátu by měla být mléčně bílá. V případě výskytu červené nebo růžové barvy, nelze vzorek použít, neboť je poškozen příměsí krve. Tento případ se nazývá tzv. hemospermie (Samper, 2008). Ačkoli Turner et al. (2016) prokázali, že příměs krve v ejakulátu do 5 % nemá na fertilitu vliv a klisny zabřezávají se stejnou úspěšností jako u inseminační dávky bez příměsí krve. Příměs krve v ejakulátu nad 50 % už podle nich způsobuje naprostou neplodnost.

Další možnou příměsí v ejakulátu je moč. Ta způsobuje jeho zbarvení do žluta a nazývá se urospermie. I takováto dávka by měla být vyřazena ještě před zamrazením (Samper, 2008). Ellerbrock et al. (2016) ovšem poukazuje na fakt, že urospermii daleko citlivěji než barva, odhalí zvýšené pH. Díky měření pH je pak možné odhalit dysfunkci ejakulace u hřebce daleko dříve. Normální pH se u neředěného hřebčího spermatu pohybuje mezi 7,2 a 7,7 (Dascanio et McCue, 2014).

Zápach ejakulátu se v laboratořích také běžně testuje. Hřebčí ejakulát by měl být bez výrazného zápachu. Zápach ejakulátu může svědčit o příměsí moči, hnisu či například výkalů a nesmí být pro inseminaci, a tudíž ani pro zamrazení využit (Samper, 2008).

Základní **mikroskopické** hodnocení zahrnuje zkoumání koncentrace spermií, jejich aktivity, viability a morfologie.

Koncentraci spermií je možné měřit pomocí hemocytometru nebo Bürkerovy komůrky a mikroskopu. Měření pomocí spektrofotometru nemusí být vždy přesné, protože přístroj může započítat i jiné buňky ve vzorku. Koncentrace hřebčího ejakulátu se běžně udává v rozmezí od 100 do 350 x 10<sup>6</sup> spermií v jednom mililitru. Díky sezónní proměnlivosti objemu a koncentrace ejakulátu a závislosti koncentrace na četnosti odběrů se reálná čísla často pohybují mezi 50 a 150 x 10<sup>6</sup> spermií v jednom mililitru. Podle koncentrace spermií v daném vzorku se rozhodne o ředění a počtu inseminačních dávek, které se z daného vzorku vyrobí.



Měření aktivity probíhá buďto na klasickém světelném mikroskopu odhadem nebo pomocí počítače v programu CASA – computer assisted sperm analysis. Spermie normálně plodného hřebce, by měly vykazovat aktivitu vyšší než 60 % (Samper, 2008).

Hodnocení pomocí programu CASA má značnou výhodu v rychlosti a přesnosti analýzy. Je-li aktivita spermií hodnocena pomocí světelného mikroskopu jsou výsledky oproti objektivnímu počítačovému programu ovlivněny subjektivním vnímáním. Celý systém se skládá z mikroskopu, který je přes videokameru propojen s počítačem se speciálním softwarem. Pokud je v mikroskopu zaostřený, správně naředěný vzorek, počítačový program je schopen označit každou hlavičku spermie a pokud se spermie pohybuje, zaznamená její trajektorii. Z ní pak vyhodnotí několik kritérií. Prvním je VCL neboli skutečná rychlost, jakou se spermie pohybuje. Dalšími parametry jsou VAP, čili hodnota rychlosti na průměrné trase spermie a VSL, progresivní rychlost z bodu A do bodu B. Dále systém hodnotí amplitudu výkyvu hlavičky (ALH) a četnost křížování průměrné dráhy (BCF). Na základě těchto výsledků lze vypočítat další parametry (Mortimer, 2013).

Aktivita spermií úzce souvisí s počtem životaschopných spermií. Metoda hodnocení poměru živých a mrtvých spermií ve vzorku se provádí například pomocí barviv eosin a nigrosin. Metoda je založena na funkčnosti plazmatické membrány spermie. Živá spermie totiž membránou barvivo nepropustí a zůstává na fialovém podkladu bílá. Do mrtvé spermie ovšem přes membránu eosin proniká, a tak se pod mikroskopem zobrazí červeně. Tento test se hodnotí pod světelným mikroskopem s imerzním olejem a kvůli relevantnosti je vhodné počítat nejméně sto spermií v jednom vzorku (Heise et al. 2011; Olaciregui, 2014, Samper, 2008).

Stav membrány spermie lze dále otestovat pomocí takzvaného HOS testu. Neild et al. (2000) dokonce přikládá tomuto testu nejvyšší význam z hlediska korelace s fertilizační schopností spermie. HOS test hodnotí propustnost membrány spermie ve speciálním hypoosmotickém roztoku z citrátu sodného, fruktózy a destilované vody (Goericke-Pesch et Failing, 2013). Do tohoto roztoku se přidá vzorek spermií v poměru 10 : 1, (roztok : spermie) a nechá se inkubovat po dobu 30 minut ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Po inkubaci je vzorek rozetřen na podložní sklíčko a pod světelným mikroskopem s objektivem 400x, zhodnocen nejméně na sto spermií. Spermie, které se zkroutí bičík, reaguje na hypoosmotické prostředí nasátím vody, a tudíž je živá, spermie s rovným bičíkem nevykazuje žádnou reakci na prostředí a je označena jako HOS negativní, tedy s poškozenou integritou plazmatické membrány (Goericke-Pesch et Failing, 2013; Neild et al., 2000).

Pozornost si zaslouží také hodnocení morfologie spermií. Jedná se o způsob zjišťování kvality spermií pomocí světelného mikroskopu. Pod mikroskop se vloží formaldehydem fixovaný a obarvený preparát, na kterém se, při zvětšení 1000x a přes imerzní olej, hodnotí struktura spermie, od velikosti a tvaru hlavičky až po bičík. Může být zhodnocen také akrozom a stav membrány. Morfologických odchylek existuje nespočet, jedná se například o makrocefalie, mikrocefalie, pyriformní tvar hlavičky, zdvojení hlavičky či bičíku, nebo aplazie mitochondriální pochvy (Brito, 2007).

Všechny morfologické vady lze rozdělit na primární, které jsou následkem chybné spermatogeneze, sekundární, tedy vzniklé během zrání v nadvarletí a terciální, do kterých lze zahrnout i změny vzniklé chybným zacházením (Samper, 2008).

Celkový výskyt patologických spermií by neměl překročit hranici 35 %, z toho ovšem nejvýše 10 % patologických změn, které je možné zařadit do kategorie změn primárních. Další dělení rozlišuje změny majoritní a minoritní. Majoritní změny jsou takové, které se přímo pojí s neplodností, jako například zdvojené formy spermií, defekty akrozomu nebo proximální protoplazmatická kapka. Minoritní změny pak nejsou přímo spojeny s neplodností a mezi ty je možné zařadit úzkou hlavičku, abaxiální implantaci bičíku nebo distální protoplazmatickou kapku (Chenoweth, 2005).

Morfologie spermií skvěle odráží i jejich fertilitu, a proto lze toto hodnocení využít k predikci potenciální oplozovací schopnosti inseminační dávky (Brito, 2007).

Další parametry související s fertilitou spermií bývají hodnoceny až po rozmrazení a bude jim věnována pozornost později.

### **3.5.2 Vlastní kryokonzervace epididymálních spermií**

Jakmile je po aspiraci zkontrolována pod mikroskopem přítomnost spermií a jejich koncentrace, je žádoucí přistoupit k vlastní kryokonzervaci.

Nejprve se k aspirovaným spermiím přidá promývací médium a opatrně se s nimi promísí. Poté je celý vzorek centrifugován po dobu 10 minut na 400 g (Cary et al., 2004; Gangrade, 2013) nebo na 600 g (Heise et al., 2010; Monteiro et al., 2011).

Po centrifugaci se vzorek rozdělí na spermie usazené u dna a zbylou tekutinu. Tu představuje především přidané médium, které se po centrifugaci opět odebere. Spermie se poté naředí na požadovanou koncentraci. To se děje pomocí komerčního ředidla. Pokud bylo sperma hřebce již dříve mrazeno, je vhodné použít osvědčené ředidlo. V případě, že s mražením spermií u daného hřebce ještě nebyla učiněna žádná zkušenost, je vhodné rozdělit

dávky na dvě části a použít dvě běžně používaná ředidla. Tak lze předejít možnému neúspěchu alespoň z poloviny (Roels et al., 2013).

Médium pro centrifugaci bývá na bázi odstředěného mléka a zpravidla obsahuje cukry jako glukózu a laktózu, citrát sodný a draselný, penicilin a deionizovanou vodu. Mrazící ředidlo navíc obsahuje žloutek a glycerol (Heise et al., 2010). Existuje ovšem řada komerčních ředidel, jejichž složení má svá specifika. Komerční ředidla se při kryokonzervaci využívají nejčastěji.

Jako kryoprotektant se historicky používá právě glycerol. Ten má sice schopnost vázat vodu, je ovšem také toxický, a proto se v dnešní době snaha, vyvarovat se jeho používání. Toxicita glycerolu může mimo jiné způsobovat denaturaci proteinů a snižovat tak fertilitu spermií. Částečně je jeho toxicita způsobena také osmotickým stresem, neboť glycerol prochází membránou spermií pomaleji než jiné kryoprotektanty (Olaciregui et al., 2014).

V současné době se převážně využívají ředidla na bázi vaječného žloutku. I ta mají svá pro a proti. Množství vaječného žloutku závisí na množství přidané semenné plazmy, před jejichž toxiny vaječný žloutek spermií ochrání. Semenná plasma se ale přidává většinou až po rozmrazení dávky. Hlavní vlastností ředidel na bázi žloutku je ovšem ochrana před chladovým šokem, kterou umožňuje především stavba a komponenty fosfolipidové membrány (Olaciregui et al., 2014).

Odpůrci těchto ředidel přichází s faktem, že složení vaječného žloutku může být značně variabilní, a proto lze těžko zobecňovat jeho účinky při kryokonzervaci. Další nevýhodou je také riziko mikrobiální kontaminace spermií pomocí takového ředidla. V tomto ohledu je ale možné použít pasterizovaný vaječný žloutek (Olaciregui et al., 2014).

Po naředění spermií na správnou koncentraci je vzorek rozdělen do pejet. Velikost pejet u epididymálních spermií je 0,25 mililitrů, případně na 0,5 mililitrů (Cary et al., 2004; Monteiro et al., 2011; 2013). Velikost pejet závisí na množství získaných spermií, na účelu jejich budoucího využití i na subjektivním posouzení technika.

Pejety jsou poté ekvilibrovány při teplotě 4 °C po dobu 20 minut (Monteneiro et al., 2011; 2013) nebo po dobu 60 minut 5 °C (Heise et al., 2010).

V dalším kroku se pejety s inseminačními dávkami na 20 minut uloží do par tekutého dusíku 3,5 cm (Heise et al., 2010) nebo 6 cm (Monteneiro et al., 2011; 2013) nad hladinou.

Nakonec jsou pejety ponořeny do tekutého dusíku o teplotě -196 °C, kde jsou při jeho dostatečné hladině uchovávány po neomezeně dlouhou dobu.

### **3.5.3 Rozmrazení a zhodnocení vzorku**

Dříve než jsou takto zhotovené inseminační dávky určeny ke komerčnímu využití, musí být jejich vzorek zhodnocen také po rozmrazení.

Postupy používané k rozmrazení inseminačních dávek jsou opět mírně rozdílné. Pejety se ovšem vždy rozmrazují ve vodní lázni. Postupy se liší pouze teplotou vodní lázně a dobou, po kterou je pejeta ve vodní lázni ponechána. Heise et al. (2011) využívá pro pejetu o objemu 0,5 mililitrů lázeň o teplotě 37 °C po dobu 30 sekund, Montenegro et al. (2011; 2013) zase 46 °C horkou lázeň pro rozmrazení během 20 sekund. Šichtař et al. (2017) uvádějí rozmezí teploty vodní lázně od 37 °C do 46 °C a délku rozmrazování jedné pejety na 15-20 sekund.

Stejně jako před zamrazením, musí i po rozmrazení splňovat inseminační dávka různé parametry. Nedůležitější je opět zhodnocení koncentrace, aktivity, viability a morfologie spermií. Jelikož během mrazení, i přes veškerou snahu, dochází k poškození spermií, jsou tyto parametry hodnoceny méně přísně než před zamrazením.

## **3.6 Oplozovací schopnost epididymálních spermií**

Ačkoli inseminační dávky mohou být testovány na nejrůznější parametry, je potřeba říci, že se jedná pouze o predikci plodnosti, neboť fertilita je ovlivněna celou řadou faktorů. Fertilitní spermie totiž neznamená pouze spermie živá, morfologicky nezměněná a pohybující se vpřed na hlavičkou, nýbrž také spermie schopná zvládnout průchod samičím reprodukčním traktem, vazbu na zonu pellucidu a její penetraci, splynutí s membránou oocyty a tvorbu životaschopného embrya (Dacheux et al., 2016).

Na fertilitu spermií tedy mohou mít vliv i dílčí kroky v průběhu tvorby inseminační dávky, jako je například ředidlo vybrané ke kryokonzervaci či průběh mrazení a rozmrazování vzorku. V neposlední řadě se na plodnosti podílí také kvalita oocyty klisny, doba a způsob provedení inseminace (Bedford-Guaus, 2007). Nejdůležitějším a nejpřesnějším ukazatelem plodnosti je počet živě narozených hříbat z celkového počtu provedených inseminací (Šichtař et al. (2017)).

### **3.6.1 Ředidlo a kryokonzervační protokol**

Vliv výběru použitého ředidla na kvalitu byl již prokázán u ejakulovaných spermií (Loomis et al. (2008)), u epididymálních spermií lze tedy předpokládat podobné výsledky. Je ovšem potřeba danou problematiku ještě prověřit, neboť výsledky jsou zatím

rozporuplné. Papa et al. (2008) prokázal různé výsledky motility při použití tří různých kryokonzervačních ředidel, zatímco Bruemmer et al. (2002) rozdílů prokázat nedokázali. Nejnovější výzkum, porovnávající čtyři různá ředidla, ukazuje, že s ohledem na motilitu spermií, je nejlépe využitelné ředidlo obsahující definovaný mléčný protein. Takové ředidlo si ve studii vedlo lépe než ředidlo žloutkové, ředidlo na bázi odstředěného mléka i ředidlo obsahující kaseinát (Neuhauser et al., 2017).

Neuhauser et al. (2014) zkoumali vliv způsobu mrazení na fertilitu spermií. Zjistili, že na motilitu nemá způsob mrazení vliv. Má podle nich ovšem vliv na viabilitu. Nejvíce mrtvých spermií mělo na svědomí rychlé mrazení v polystyrenovém boxu s tekutým dusíkem. Jako nejlepší způsob mrazení pak označili mrazení v naprogramovaném mrazícím přístroji.

**Použití ředidlo i způsob kryokonzervace** je jistě důležité správně zvážit. Během kryokonzervace totiž dohází k poškození buněk, neboť jsou vystaveny velkému osmotickému stresu. Osmotický stres ovšem nezpůsobuje jen proces mrazení, ale i přidávání či odebrání ředidel, během kterého se spermie musí vyrovnat se změnami ve složení prostředí. Nejčastěji pak bývají poškozeny buněčné membrány (Sieme et al., 2015).

Hypertonickému prostředí jsou spermie vystaveny, když zamrzá okolní tekutina a zvyšuje se v ní tak koncentrace solí. To vede k dehydrataci buňky, která se snaží podmínky vnitřního a vnějšího prostředí vyrovnat pomocí vody. Toto se děje, pokud k mrazení dochází příliš pomalu. Oproti tomu při příliš rychlém zmrazování se voda nestihne dostat z buňky ven a tvoří uvnitř ledové krystalky, což vede ke smrti buňky (Sieme et al., 2015).

Správnou propustnost membrány pro vodu má zaručit právě vybrané kryoprotektivní ředidlo. Kryoprotektanty totiž zvyšují fluiditu membrány a do jisté míry tak dovedou ovlivnit úspěšnost kryokonzervace. Pozitivní vliv má například přídavek cholesterolu v podobě CLC (cholesterolem obalené cyklodextriny) nebo glycerol (Šichtař et Janošíková, 2017).

V této práci byla k mrazení epididymálních spermií využita dvě ředidla, a to ředidlo INRA82 a L-EDTA.

Ředidlo INRA 82 je na bázi mléka, L-EDTA mléko neobsahuje, obě ředidla se liší i složením antibiotik (Pillet et al., 2008). Všechny složky obou ředidel jsou vypsány v kapitole Metodika.

Již výše byl zmíněn také vliv doby **skladování** nadvarlat s epididymálními spermii za různých tepelných podmínek na jejich fertilitu a úspěšnost zamrazení. Bezpečné skladování nadvarlat bez zásadního poškození spermií bylo prokázáno při 4 °C po dobu 96 hodin (James et al., 2002; Viera et al., 2013).

### 3.6.2 Přídavek semenné plazmy

Epididymální spermie na rozdíl od ejakulovaných nepřichází do kontaktu se semennou plazmou, jejíž pozitivní vlastnosti byly zmíněny výše. Snaha využít semennou plazmu ke zvýšení fertility epididymálních spermií je proto logickým krokem.

Semenná plazma se získává z klasického odběru ejakulátu. Odebraný vzorek je centrifugován na 1000 g po dobu 30 minut při 5 °C (Papa et al., 2008), 15 minut při 600 g (Heise et al., 2010) nebo 10 minut při 500 g (Morrell et al., 2014). Spermie se díky odstředivé síle usadí na dně a poté může být semenná plazma odebrána a zamrazena na -80 °C pro další použití.

Semenná plazma ovlivňuje kvalitu spermatu, její přídavek **před zamrazením** může podle Neuhauser et al. (2015) zvýšit stabilitu plazmatické membrány a zmírnit tak poškození během mrazení. Díky řadě antioxidantů totiž zvyšuje rezistenci proti chladovému šoku i oxidačnímu stresu. Před mrazením přidávali spolu s kryokonzervačním ředidlem semennou plazmu i Gonzales et al. (2015). Oleciregui et al. (2014) varují před toxickým účinkem semenné plazmy během kryokonzervace, který se snaží tlumit přídavkem žloutkového ředidla. Škodlivost semenné plazmy během kryokonzervace vychází z faktu, že kromě minerálních látek, kyseliny citronové a askorbové, cukrů, bílkovin, mnoha enzymů, prostaglandinů, estrogenů a androgenů, je z 97-99 % tvořena vodou, která při mrazení buňku poškozuje. Právě proto se semenná plazma před kryokonzervací ejakulovaných spermií odebírá. Její cílený přídavek k epididymálním spermiím proto musí být v omezeném množství (Morrell et al., 2014). Heise et al. (2011) potvrdili pozitivní vliv semenné plazmy na progresivní motilitu čerstvých epididymálních spermií, vyvrátili ovšem, že by takto působila i po rozmrazení. Zároveň ukazují, že semenná plazma má vliv na snížení výskytu celkových defektů spermie, nemá ale podle nich vliv na viabilitu morfologicky normálních spermií.

Morrell et al. (2014) zastávají názor, že přídavek semenné plazmy před zamrazením způsobuje produkci peroxidu vodíku a poškození chromatinu. Mnohem zajímavější je proto podle nich přídavek semenné plazmy k epididymálním spermiím až po rozmrazení.

Přídavek semenné plazmy **po rozmrazení** ovlivňuje kvalitu spermií, neboť semenná plazma má na spermie vliv aktivační a ochranný, což jim umožňuje bezpečný průchod reprodukčním traktem samice (Neuhauser et al., 2015).

Zatímco Neuhauser et al. (2015) potvrdili, že přídavek semenné plazmy po rozmrazení má pozitivní vliv na motilitu spermií, Morrell et al. (2014) mají ohledně motility rozporuplné

výsledky. Obě studie se ale shodují, že pro dosažení lepších výsledků lze přidávat semennou plazmu jiného jedince stejného druhu.

Neuhauser et al. (2015) potvrdili účinnost přidané semenné plazmy jen při přidání množství odpovídajícímu 20 % i 50 %. Při dalším navýšení semenné plazmy na 80 % již ale nezaznamenali zvyšování motility. Při přídatku 5 % semenné plazmy nepozorovali dokonce žádný rozdíl oproti kontrole bez semenné plazmy, a tedy žádný pozitivní vliv na motilitu, podobně jako Morrell et al. (2014).

Heise et al. (2010) uzavírají, že vystavení epididymálních spermií účinkům semenné plazmy pomáhá zvýšit zabřezávání klisen.

Na základě studie Neuhauser et al. (2015) bylo v naší práci zvoleno množství přidané semenné plazmy na 33 %. Toto číslo je vyšší než nejnižší účinná koncentrace semenné plazmy (20 %) a zároveň nižší než nejvyšší účinná koncentrace semenné plazmy (50 %), kterou udává Neuhauser et al. (2015). Mohlo by tedy být optimální.

## 4 Metodika

### 4.1 Design experimentu

V experimentu byly použity epididymální spermie získané kastrací pěti hřebců ( $n = 5$ ) uchované zmrazením v 0,25 ml pejetách. U každého z hřebců byla použita dvě ředidla. Písmenem A bylo označeno ředidlo L-EDTA, písmenem B ředidlo INRA82. V pokusu byl pak pozorován vliv každého z ředidel na mrazitelnost epididymálních spermií.

Každá pejeta byla po rozmrazení rozdělena na tři části. Jako kontrolní skupina (K) byly označeny vzorky bez přídavku semenné plazmy, v porovnání s nimi byly hodnoceny také vzorky, do kterých byla po rozmrazení přidána semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a semenná plazma hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S). Vzorky jednotlivých skupin byly následně naředěny fyziologickým roztokem na koncentraci  $20 \times 10^6 - 40 \times 10^6$  spermií v ml, odpovídající požadované koncentraci pro měření programem CASA.

Celkem bylo rozmrazeno 44 pejet od pěti různých hřebců, na kterých bylo po rozdělení do skupin (K, SP, S) v čase T0 ihned po rozmrazení a po třiceti minutách inkubace, v čase T30 uskutečněno dohromady 264 měření procentuálního zastoupení živých spermií, spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, motility a kinematických parametrů spermií. Všechna data byla následně vyhodnocena v programu Statistica a porovnána s výsledky dříve uskutečněných studií. Design celého experimentu je dále zobrazen také v tabulce tabulce 1.

#### 4.1.1 Získ epididymálních spermií

Spermie byly získány od pěti různých hřebců při rutinní kastraci v celkové anestezii. Varlata hřebců byla převezena v izolačních boxech (4 °C) do laboratoře, kde od nich byla oddělena nadvarlata, ze kterých byly pomocí kanyly a 20 ml injekční stříkačky naplněné vzduchem získány epididymální spermie. Získané epididymální spermie byly ředěny dvěma různými ředidly bez glycerolu L-EDTA a INRA82 v poměru 1:1. Následně byly centrifugovány při 400 g po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl oddělen supernatant a z pelety bylo 10 $\mu$ l smícháno s 990 $\mu$ l 3% roztoku NaCl. Podle potřeby byly takto získané vzorky ředěny dvěma různými ředidly L-EDTA s glycerolem a INRA82 s glycerolem na požadovanou koncentraci.



#### **4.1.2 Kryokonzervační ředidla**

Pro pokus byly využity dva druhy kryokonzervačních ředidel. Část epididymálních spermií byla vždy naředěna ředidlem L-EDTA (A) a část ředidlem INRA82 (B). Na složení ředidla L-EDTA se podílí deionizovaná voda, mohohydrát laktózy, hydrogenuhličitan sodný, EDTA vaječný žloutek a glycerol. Ředidlo INRA 82 obsahuje destilovanou vodu, monohydrát glukózy, monohydrát laktózy, pentahydrát rafinózy, dihydrát citrátu sodného, monohydrát citrátu draselný, dodecylsulfát sodný, HEPES, odstředěné mléko, vaječný žloutek, glycerol a antibiotika penicilin G a gentamycin.

#### **4.1.3 Mrazení a rozmrazení epididymálních spermií**

Po naředění kryokonzervačními ředidly (L-EDTA, INRA82) na požadovanou koncentraci, byly spermie umístěny do 0,25 ml pejet. Tyto pejety byly chlazeny při 5 °C po dobu 20 minut v chladničce. Dalších 20 minut byly pejety s epididymálními spermii umístěné v parách tekutého dusíku (6 cm nad hladinou) a nakonec byly umístěny přímo do tekutého dusíku, kdy byly uchovány až do rozmrazení.

Rozmrazení probíhalo ve vodní lázni o teplotě 37 °C a trvalo 30 s. Po rozmrazení byly vzorky rozděleny do tří kategorií (K, SP a S).

#### **4.1.4 Semenná plazma**

Po rozmrazení byl ke vzorkům (SP, S) přidáváno 33 % semenné plazmy. Ta byla získána desetiminutovou centrifugací odebraného ejakulátu při 10 000 g. Po centrifugaci byla semenná plazma odpipetována ze získaného vzorku a přenesena do 1,5 ml zkumavek ependorf, ve kterých byla uchována při -80 °C. Před použitím byla semenná plazma rozmrazena ve vodní lázni o teplotě 37 °C.

Semenná plazma použitá v pokusu byla získána od dvou různých hřebců. První z nich byla získána od hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem a je označována písmeny SP. Druhým donorem semenné plazmy byl hřelec s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem, jehož ejakulát vykazoval tyto průměrné hodnoty. Bezprostředně po odběru u něj činil objem spermatické frakce 80 ml, koncentrace spermií byla 800-900 x 10<sup>6</sup>/ml a motilita spermií >95 %. Po rozmrazení se motilita pohybovala od 60 do 70 %. Semenná plazma tohoto hřebce byla označena písmenem S. Kontrolní vzorky, které neobsahovaly semennou plazmu byly značeny písmenem K.

#### **4.1.5 Analýza rozmrazených vzorků**

Po rozmrazení vzorku ve vodní lázni, byly vzorky rozděleny do tří kategorií (K, SP a S). V kategorii kontroly (K) byl vzorek naředěn fyziologickým roztokem o pH 6,8, v kategorii SP byly epididymální spermie hřebců ředěny semennou plazmou od hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem v poměru 2:1 a v kategorii S ve stejném poměru semennou plazmou hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem. Ihned po rozmrazení (T0) byla odebrána část z každé z nich a zhodnocena ve třech testech. Stejný postup byl opakován po třiceti minutách inkubace ve vodní lázni o teplotě 37 °C (T30). Prováděné testy byly následující.

#### **Procentuální zastoupení živých spermií**

K hodnocení procentuálního zastoupení živých spermií byl využit eosin a nigrosin. Na hodinové sklíčko na nahřáté výhřevní destičce bylo pipetou přeneseno 15  $\mu$ l vzorku (K, SP, S) a k němu bylo přidáno stejné množství eosinu. Po jemném promíchání po dobu 20 vteřin bylo přidáno také stejné množství nigrosinu a opět jemně promícháno po stejně dlouhou dobu. Po promíchání byl na podložním sklíčku proveden nátěr, který byl po zaschnutí zhodnocen za použití imerzního oleje pod světelným mikroskopem Nikon Eclipse E100 a objektivem BE Plan 100x/1,25 Oil. Hodnocení zastoupení živých spermií probíhalo v čase T0 a T30 a na jednom sklíčku bylo hodnoceno nejméně sto spermií.

#### **Procentuální zastoupení spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány**

Membránová integrita byla hodnocena pomocí hypoosmotického testu (HOS). Do roztoku o osmolaritě 150 mOSM/kg byl přidáván vzorek semene z každé testované skupiny (K, SP, S). Po třicetiminutové inkubaci ve vodní lázni o teplotě 37 °C byl zhotoven nátěr, který byl následně hodnocen pod světelným mikroskopem Nikon Eclipse Ci a objektivem Nikon Plan 40x/0,65. Na sklíčku bylo hodnoceno nejméně 100 spermií. Toto bylo u všech vzorků provedeno v čase T0 a T30.

Sledována byla reakce membrány spermií na hypoosmotické prostředí, kdy spermie se zkrouceným bičíkem byly hodnoceny jako živé s intaktní plazmatickou membránou (HOS+), spermie s rovným bičíkem jako poškozené či mrtvé (HOS-).

#### **Motilita a kinematické parametry spermií**

K hodnocení motility a kinematických parametrů spermií byl použit program CASA Nis Elements Ar Nikon, verze 4,5 s kamerou Imaginsource, mikroskopem Nikon Eclipse Ci a objektivem Nikon 10x0,25 Ph1 BM, filtr ikon Phase Contrast 0,90 DRY Ph1. Z každého vzorku byly do Maklerovy komůrky na vyhřevné destičce (37 °C) přeneseny 4  $\mu$ l. Ze všech vzorků bylo hodnoceno šest zorných polí. Program následně vyhodnotil tyto parametry: celková motilita (TMOT), progresivní motilita (PMOT), šířka trajektorie hlavičky (ALH), frekvence změny výkyvu hlavičky (BCF), linearita (LIN), přímost (STR), rychlost po průměrné dráze (VAP), rychlost po skutečné dráze (VCL), rychlost po napřímené dráze (VSL) a kmitání (WOB). Všechna měření proběhla v čase T0 a T30.

### **Statistická analýza**

Výsledky získané popsáním měření byly dále vyhodnoceny v programu Statistica (verze 12, StatSoft, CZ), kde byly použity vhodné testy. K ověření normálního rozdělení a homogenity dat byl použit Shapiro-Willkův test a k následné analýze rozptylů jednofaktorová a vícefaktorová ANOVA. Všechna získaná data byla hodnocena na hladině významnosti  $P < 0,05$  a výsledky jsou v tabulkách zobrazeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

Tab. 1: Design experimentu. Rozdělení jedné pejety na tři části, kontrolní (K), s přidavkem semenné plazmy od hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přidavkem semenné plazmy od hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S) a jejich následné využití v průběhu pokusu.

0,25 ml pejeta	80 $\mu$ l (K)	T0	25 $\mu$ l + fyziologický roztok	4 $\mu$ l CASA
				15 $\mu$ l viabilita
			10 $\mu$ l + 100 $\mu$ l HOS	
		T 30	25 $\mu$ l + fyziologický roztok	4 $\mu$ l CASA
				15 $\mu$ l viabilita
			10 $\mu$ l + 100 $\mu$ l HOS	
	80 $\mu$ l + 40 $\mu$ l SP (SP)	T0	25 $\mu$ l + fyziologický roztok	4 $\mu$ l CASA
				15 $\mu$ l viabilita
			10 $\mu$ l + 100 $\mu$ l HOS	
		T30	25 $\mu$ l + fyziologický roztok	4 $\mu$ l CASA
				15 $\mu$ l viabilita
			10 $\mu$ l + 100 $\mu$ l HOS	
80 $\mu$ l + 40 $\mu$ l S (S)	T0	25 $\mu$ l + fyziologický roztok	4 $\mu$ l CASA	
			15 $\mu$ l viabilita	
		10 $\mu$ l + 100 $\mu$ l HOS		
	T30	25 $\mu$ l + fyziologický roztok	4 $\mu$ l CASA	
			15 $\mu$ l viabilita	
		10 $\mu$ l + 100 $\mu$ l HOS		

## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv kryokonzervačního ředidla

Epididymální spermie každého z pěti hřebců ( $n = 5$ ) byly před kryokonzervací naředěny dvěma různými ředidly: L-EDTA (A) a INRA82 (B). Jejich vliv na procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, motilitu spermií a kinematické parametry spermií byl posouzen ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30).

#### 5.1.1 Procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány

Jak je uvedeno v tabulce 2, byl mezi oběma použitými ředidly (A, B) zjištěn statisticky průkazný rozdíl ( $P < 0,05$ ) v procentuálním zastoupení živých spermií v čase T0 i T30. Více živých spermií se objevuje u ředidla L-EDTA (A). U žádného z ředidel ovšem nebyl potvrzen efekt třicetiminutové inkubace ( $P > 0,05$ ). Tedy i po třiceti minutách se vyskytuje podobný poměr živých a mrtvých spermií jako ihned po rozmrazení, ačkoli u ředidla L-EDTA je patrný větší pokles živých spermií oproti ředidlu INRA82. Obě ředidla vykazují životnost spermií pod 50 %.

Podobných výsledků bylo dosaženo i u membránové integrity, kde se více spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány (35,4 % v čase T0) vyskytuje u ředidla L-EDTA (A). Ředidlo INRA82 (B) oproti tomu dosahuje hodnot HOS+ spermií pouze kolem 15 %. U ředidla A byl potvrzen efekt třicetiminutové inkubace, kdy je v čase T30 statisticky průkazný ( $P < 0,05$ ) pokles živých spermií oproti času T0.

Tab. 2: Hodnoty zastoupení živých spermií (viabilita, %) a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány (HOS+, %), ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) u dávek mrazených s ředidlem L-EDTA (A) a INRA82 (B).

		A	B
Viabilita	T0	47,4 ± 18,1 <sup>a</sup>	38,3 ± 13,8 <sup>b</sup>
	T30	41,4 ± 18,6 <sup>a</sup>	34,2 ± 14,0 <sup>b</sup>
HOS+	T0	35,4 ± 22,3 <sup>a,1</sup>	15,8 ± 9,3 <sup>b</sup>
	T30	28,3 ± 17,7 <sup>a,2</sup>	15,4 ± 9,0 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časem T0 a T30 u jednotlivých parametrů ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.2 Motilita

U motility je možné sledovat hned několik parametrů. Nejobecnějším ukazatelem je celková motilita (TMOT), přesnější ukazatel je potom progresivní motilita (PMOT). Jak je patrné z tabulky 3, u obou těchto parametrů motility se při použití ředidla L-EDTA (A) i INRA82 (B) vyskytuje podobný trend. U celkové i progresivní motility existuje statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi oběma ředidly (A, B). U obou parametrů (TMOT, PMOT) byla zaznamenána lepší motilita při použití ředidla INRA82 (B). U ředidla L-EDTA (A) byl u obou parametrů motility prokázán efekt inkubace, tedy statisticky významný ( $P < 0,05$ ) pokles pohyblivosti spermií po třiceti minutách inkubace v lázni o teplotě 37 °C. Ředidlo INRA82 (B) vykazuje i po třiceti minutách inkubace (T30) podobnou motilitu ( $P > 0,05$ ) jako ihned po rozmrazení (T0).

Tab. 3: Hodnoty celkové (TMOT) a progresivní (PMOT) motility (%), ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) u dávek mrazených s ředidlem L-EDTA (A) a INRA82 (B).

		A	B
TMOT	T0	$0,9 \pm 1,2^{a,1}$	$1,9 \pm 2,7^b$
	T30	$0,4 \pm 0,6^{a,2}$	$1,5 \pm 3,8^b$
PMOT	T0	$0,6 \pm 0,9^{a,1}$	$1,7 \pm 2,6^b$
	T30	$0,2 \pm 0,4^{a,2}$	$1,3 \pm 3,5^b$

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časem T0 a T30 u jednotlivých parametrů ( $P < 0,05$ ).

Další kinematické parametry spermií, uvedené v tabulce 4, dosahují vyšších hodnot ve vzorcích ředěných INRA82 (B), kde jsou všechny hodnocené parametry statisticky významně vyšší ( $P < 0,05$ ) než ve vzorcích ředěných L-EDTA (A). Zároveň byl u obou ředidel (A, B) potvrzen efekt třicetiminutové inkubace, u všech parametrů se statisticky významně ( $P < 0,05$ ) liší hodnoty mezi časy T0 a T30.

Tab. 4: Hodnoty ALH, BCF, LIN, STR, WOB, VAP, VCL a VSL ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) u dávek mrazených s ředidlem L-EDTA (A) a INRA82 (B).

		A	B
ALH ( $\mu\text{m}$ )	T0	$0,2 \pm 0,5^{a,1}$	$0,3 \pm 0,6^{b,1}$
	T30	$0,2 \pm 0,4^{a,2}$	$0,2 \pm 0,5^{b,2}$
BCF (Hz)	T0	$6,7 \pm 3,3^{a,1}$	$7,6 \pm 4,1^{b,1}$
	T30	$6,9 \pm 3,4^{a,2}$	$7,4 \pm 3,9^{b,2}$
LIN (%)	T0	$12,1 \pm 11,0^{a,1}$	$16,2 \pm 13,7^{b,1}$
	T30	$12,5 \pm 11,0^{a,2}$	$15,1 \pm 12,8^{b,2}$
STR (%)	T0	$39,6 \pm 23,4^{a,1}$	$47,1 \pm 25,2^{b,1}$
	T30	$40,3 \pm 23,7^{a,2}$	$44,7 \pm 24,8^{b,2}$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	$1,5 \pm 4,7^{a,1}$	$2,3 \pm 8,2^{b,1}$
	T30	$1,2 \pm 3,0^{a,2}$	$2,0 \pm 7,1^{b,2}$
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	$5,1 \pm 11,5^{a,1}$	$6,5 \pm 16,7^{b,1}$
	T30	$4,3 \pm 7,9^{a,2}$	$5,7 \pm 13,7^{b,2}$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	$0,8 \pm 3,7^{a,1}$	$1,6 \pm 7,6^{b,1}$
	T30	$0,6 \pm 2,0^{a,2}$	$1,3 \pm 6,3^{b,2}$
WOB (%)	T0	$27,2 \pm 10,5^{a,1}$	$30,8 \pm 11,6^{b,1}$
	T30	$27,7 \pm 10,5^{a,2}$	$30,2 \pm 10,8^{b,2}$

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časem T0 a T30 u jednotlivých parametrů ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 Vliv kryokonzervačního ředidla u konkrétního hřebce

Kromě obecného vlivu kryokonzervačního ředidla na mrazitelnost epididymálních spermií byla pozorována také interakce epididymálních spermií konkrétního hřebce a vybraného ředidla.

### 5.2.1 Procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány

V tabulce 5, která je uvedena v příloze, je patrné, že procento **živých spermií** je při použití ředidla L-EDTA (A) u čtyř z pěti hřebců srovnatelné s použitím ředidla INRA82 (B), a to jak po rozmrazení (T0), tak po třicetiminutové inkubaci (T30). Ředidlo L-EDTA (A) vykazuje signifikantně ( $P < 0,05$ ) vyšší procento živých spermií než ředidlo INRA82 (B) pouze u epididymálních spermií jednoho z pěti hřebců.

Efekt třicetiminutové inkubace byl prokázán jen u epididymálních spermií dvou z pěti hřebců, a to pouze s ředidlem L-EDTA (A). V čase T30 byl v těchto vzorcích prokázán signifikantně nižší ( $P < 0,05$ ) výskyt živých spermií. U ředidla INRA82 (B) nebyl zaznamenán efekt třicetiminutové inkubace ( $P > 0,05$ ).

Výskyt **spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány** je u většiny hřebců srovnatelný při použití obou ředidel (A, B). Pouze u epididymálních spermií dvou hřebců z pěti se projevuje efekt použitého ředidla a vzorky ředěné ředidlem INRA82 (B) mají signifikantně méně ( $P < 0,05$ ) spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány než vzorky ředěné ředidlem L-EDTA (A). Efekt třicetiminutové inkubace nebyl prokázán u spermií žádného ze zkoumaných vzorků.

### 5.2.2 Motilita

**Celková (TMOT) i progresivní (PMOT) motilita** mají velmi podobný trend, který lze sledovat v tabulce 6 (viz příloha).

Efekt použitého ředidla se projevilo signifikantně ( $P < 0,05$ ) vyššími hodnotami celkové i progresivní motility u vzorků epididymálních spermií ředěných INRA82 (B) oproti vzorkům s ředidlem L-EDTA (A). Tento efekt se projevilo u epididymálních spermií tří hřebců z pěti, pouze u jednoho však v obou časech (T0, T30).

Efekt třicetiminutové inkubace se projevilo u epididymálních spermií čtyř z pěti hřebců. Epididymální spermie tří z pěti hřebců vykazují signifikantní ( $P < 0,05$ ) snížení motility po třicetiminutové inkubaci vzorků s ředidlem L-EDTA (A). Ředidlo INRA82 (B) pak vyazuje signifikantní ( $P < 0,05$ ) snížení motility jen u epididymálních spermií jednoho ze zkoumaných hřebců.

Lze tedy konstatovat, že pokud existuje průkazný rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi ředidly L-EDTA (A) a INRA82 (B), dosahuje vyšších hodnot motility ředidlo INRA82 (B), a že ředidlo L-EDTA (A) vyazuje častěji rozdíl ( $P < 0,05$ ) mezi hodnotami v čase T0 a T30.

Kinematické parametry spermií jsou uvedeny v tabulce 7, kterou lze najít v příloze.

U většiny kinematických parametrů byl prokázán efekt použitého kryokonzervačního ředidla. Ve většině případů dominuje ředidlo INRA82 (B) nad ředidlem L-EDTA (A).

Efekt třicetiminutové inkubace byl rovněž prokázán ve většině zkoumaných vzorků, častěji se ovšem vyskytuje u vzorků ředěných ředidlem L-EDTA (A). Není ale jednoznačné, že hodnoty s třicetiminutovou inkubací klesají. Přibližně v polovině případů totiž hodnoty po inkubaci stoupají oproti hodnotám ihned po rozmrazení. Je zajímavé, že kinematické parametry epididymálních spermií hřebce číslo 2 stoupají s časem s ředidlem INRA82 (B), kdežto s ředidlem L-EDTA (A) s časem klesají. Obrácený trend lze pozorovat u epididymálních spermií hřebce číslo 1.



### 5.3 Vliv semenné plazmy

Hlavním cílem této práce bylo zhodnotit, jakým způsobem ovlivňuje životaschopnost epididymálních spermií přidavek semenné plazmy. Po rozmrazení byly porovnávány hodnoty procentuálního zastoupení živých spermií, spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, hodnoty motility a kinematických parametrů spermií u vzorků bez přídavku semenné plazmy (K), s přídavkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) nebo semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S).

#### 5.3.1 Procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány

U procentuálního zastoupení živých spermií ani u zastoupení spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány nebyl prokázán signifikantní rozdíl ( $P > 0,05$ ) mezi zkoumanými skupinami vzorků (K, SP, S), nicméně absolutní hodnoty jsou nejvyšší u semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelnými spermii (S), což je patrné z tabulky 8.

V žádném ze zkoumaných vzorků nebyl potvrzen efekt třicetiminutové inkubace, nebyl tedy prokázán statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ) mezi časem T0 a časem T30.

Tab. 8: Hodnoty zastoupení živých spermií (viabilita, %) a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány (HOS+, %) ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) bez přídavku semenné plazmy (K) s přídavkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přídavkem semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S).

		K	SP	S
Viabilita	T0	41,0 ± 16,1	42,4 ± 16,6	44,1 ± 17,14
	T30	35,4 ± 17,5	37,7 ± 17,5	40,0 ± 16,3
HOS+	T0	27,2 ± 18	24,5 ± 20,4	25,7 ± 21,3
	T30	24,4 ± 16,6	20,3 ± 15,4	21,0 ± 14,3

#### 5.3.2 Motilita

V tabulce 9 je uveden efekt přidané semenné plazmy na **celkovou i progresivní motilitu** v časech inkubace T0 a T30. V čase T0 dosahuje lepších výsledků motility přídavek semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S) v porovnání se vzorky bez přídavku semenné plazmy (K). V čase T30 oproti vzorkům bez přídavku semenné

plazmy (K), byly zjištěny vyšší hodnoty motility u vzorků s přidavkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP).

Efekt třicetiminutové inkubace se neprojevil pouze u vzorků s přidavkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP). U obou dalších vzorků (K, S) byl prokázán signifikantní ( $P < 0,05$ ) pokles celkové i progresivní motility po třiceti minutách inkubace. U vzorků s přidanou semennou plazmou hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) jsou absolutní hodnoty v čase T30 dokonce vyšší než v čase T0. Lze tedy konstatovat, že SP udrží stabilní hodnoty motility po delší dobu, než zbylá dvě ředidla (K, S).

Tab. 9: Hodnoty celkové (TMOT) a progresivní (PMOT) motility (%) ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) bez přidavku semenné plazmy (K) s přidavkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přidavkem semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S).

		K	SP	S
TMOT	T0	$0,8 \pm 1,2^{a,1}$	$1,6 \pm 2,0$	$1,7 \pm 2,8^{b,1}$
	T30	$0,3 \pm 0,5^{a,2}$	$1,7 \pm 4,5^b$	$0,8 \pm 1,2^2$
PMOT	T0	$0,6 \pm 1,0^{a,1}$	$1,3 \pm 1,7$	$1,6 \pm 2,8^{b,1}$
	T30	$0,2 \pm 0,3^{a,2}$	$1,5 \pm 4,2^b$	$0,6 \pm 1,2^2$

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi některými z ředidel K, SP a S ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časem T0 a T30 u jednotlivých parametrů ( $P < 0,05$ ).

Z hodnot **kinematických parametrů** spermií, uvedených v tabulce 10, lze vyčíst, že byl potvrzen efekt přidavku semenné plazmy do rozmrazených hřebčích epididymálních spermií. V naprosté většině dominují mezi hodnotami kinematických parametrů vzorky s přidanou semennou plazmou hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP). Absolutně nejnižších hodnot dosahují vzorky bez přidavku semenné plazmy (K).

Negativní efekt třicetiminutové inkubace na kinematické parametry spermií byl potvrzen u vzorků bez semenné plazmy (K) a u vzorků se semennou plazmou hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S). U epididymálních spermií s přidavkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) nejenže nebyl pozorován pokles hodnot kinematických parametrů spermií po třiceti minutách inkubace, ale v některých případech byl dokonce pozorován jejich nárůst.

Z výsledků tedy vyplývá, že semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) má vliv na vyšší hodnoty kinematických parametrů spermií a zároveň jako jediná udrží tyto hodnoty srovnatelné i po třicetiminutové inkubaci.

Tab. 10: Hodnoty ALH, BCF, LIN, STR, WOB, VAP, VCL a VSL ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) bez přídatku semenné plazmy (K) s přídatkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přídatkem semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S).

		K	SP	S
ALH ( $\mu\text{m}$ )	T0	$0,2 \pm 0,5^{a,1}$	$0,3 \pm 0,6^b$	$0,3 \pm 0,6^{b,1}$
	T30	$0,2 \pm 0,3^{a,2}$	$0,3 \pm 0,6^b$	$0,2 \pm 0,4^{c,2}$
BCF (Hz)	T0	$6,7 \pm 3,2^a$	$7,4 \pm 3,9^{b,1}$	$7,3 \pm 4,0^{c,1}$
	T30	$6,7 \pm 3,3^a$	$7,7 \pm 4,2^{b,2}$	$7,1 \pm 3,4^{c,2}$
LIN (%)	T0	$12 \pm 10,2^{a,1}$	$16,2 \pm 14,2^{b,1}$	$14,4 \pm 12,8^{c,1}$
	T30	$11,5 \pm 9,7^{a,2}$	$17,0 \pm 14,8^{b,2}$	$13,2 \pm 10,6^{c,2}$
STR (%)	T0	$39,2 \pm 22,6^{a,1}$	$47,2 \pm 26,4^{b,1}$	$43,6 \pm 24,1^{c,1}$
	T30	$38,1 \pm 22,1^{a,2}$	$48,4 \pm 27,0^{b,2}$	$41,8 \pm 22,8^{c,2}$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	$1,5 \pm 5,1^{a,1}$	$2,2 \pm 7,3^{b,1}$	$2,1 \pm 7,4^{b,1}$
	T30	$1,1 \pm 2,8^{a,2}$	$2,4 \pm 8,1^{b,2}$	$1,4 \pm 4,0^{c,2}$
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	$4,9 \pm 12,0^{a,1}$	$6,5 \pm 15,9^b$	$6,0 \pm 14,6^{c,1}$
	T30	$3,9 \pm 7,2^{a,2}$	$6,6 \pm 15,8^b$	$4,6 \pm 8,9^{c,2}$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	$0,8 \pm 4,2^{a,1}$	$1,4 \pm 6,5^{b,1}$	$1,4 \pm 6,9^{b,1}$
	T30	$0,5 \pm 1,9^{a,2}$	$1,6 \pm 7,2^{b,2}$	$0,8 \pm 3,5^{c,2}$
WOB (%)	T0	$27,5 \pm 9,9^a$	$30,0 \pm 12,2^{b,1}$	$29,4 \pm 11,4^{c,1}$
	T30	$27,6 \pm 9,8^a$	$30,6 \pm 12,3^{b,2}$	$28,9 \pm 9,7^{c,2}$

<sup>a,b,c</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi některými z ředidel K, SP a S ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časem T0 a T30 u jednotlivých parametrů ( $P < 0,05$ ).

## 5.4 Vliv kryokonzervačních ředidel a semenné plazmy

Nejkomplexnější výsledky přináší porovnání kombinace dvou kryokonzervačních ředidel

L-EDTA (A) a INRA82 (B) ve vzorcích bez přídatku semenné plazmy (K), s přídatkem 33 % semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přídatkem 33 % semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S).

### 5.4.1 Procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány

Podrobné hodnoty procentuálního zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány je možné najít v tabulce 11.

Pozitivní vliv přidané semenné plazmy na **procentuální zastoupení živých spermií** nebyl potvrzen ani u dávek konzervovaných ředidlem L-EDTA (A) ani u dávek s kryokonzervačním ředidlem INRA82 (B).

Efekt použitého kryokonzervačního ředidla byl patrný pouze u kombinace ředidla L-EDTA (A) a přídatku semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP), a to ihned po rozmrazení (T0). V ostatních případech jsou rozdíly mezi použitými ředidly (A, B) nevýznamné ( $P > 0,05$ ).

U žádné sledované kombinace nebyl prokázán efekt třicetiminutové inkubace.

**U procentuálního zastoupení spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány** nebyl u vzorků ředěných L-EDTA (A) prokázán efekt přidané semenné plazmy v čase T0 ani v čase T30. U vzorků ředěných INRA82 bylo nejvíce spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány v obou časech (T0, T30) prokázáno ve vzorcích bez přidané semenné plazmy (K).

Efekt kryokonzervačního ředidla byl naopak potvrzen ve všech sledovaných skupinách. S použitím ředidla L-EDTA (A) bylo dosaženo lepších výsledků než při použití ředidla INRA82 (B).

Efekt třicetiminutové inkubace u zastoupení spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány prokázán nebyl u žádného ze zkoumaných vzorků.

Tab. 11: Hodnoty zastoupení živých spermií (viabilita, %) a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány (HOS+, %) ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) bez přídatku semenné plazmy (K) s přídatkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přídatkem semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S) u dávek mrazených s ředidlem L-EDTA (A) a INRA82 (B).

			A	B
Viabilita	K	T0	45,8 ± 18,8	37,8 ± 12,2
		T30	39,8 ± 18,9	31,3 ± 15,3
	SP	T0	47,5 ± 17,6 <sup>a</sup>	37,5 ± 14,4 <sup>b</sup>
		T30	40,8 ± 18,8	34,8 ± 13,5
	S	T0	48,9 ± 18,7	39,6 ± 15,1
		T30	43,5 ± 18,7	36,6 ± 13,2
HOS+	K	T0	34,8 ± 20,3 <sup>a</sup>	19,3 ± 10,8 <sup>b,1</sup>
		T30	30,1 ± 19,2 <sup>a</sup>	18,8 ± 11,5 <sup>b, †</sup>
	SP	T0	35,4 ± 22,8 <sup>a</sup>	13,2 ± 7,8 <sup>b,2</sup>
		T30	27,4 ± 18,4 <sup>a</sup>	12,9 ± 5,7 <sup>b, ‡</sup>
	S	T0	36,0 ± 24,7 <sup>a</sup>	14,9 ± 8,2 <sup>b</sup>
		T30	27,5 ± 16,2 <sup>a</sup>	14,1 ± 7,8 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi dvěma ředidly v čase T0 ( $P < 0,05$ )

<sup>†,‡</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi dvěma ředidly v čase T30 ( $P < 0,05$ ).

#### 5.4.2 Motilita

U obou parametrů **motility** (TMOT, PMOT), které jsou zobrazeny v tabulce 12, byl prokázán efekt přidané semenné plazmy. Při použití ředidla L-EDTA (A) byl tento efekt prokázán v čase T0 a potvrdil lepší výsledky semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) nad semennou plazmou od hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S). Při použití ředidla INRA82 (B) byl pozitivní vliv semenné plazmy na celkovou i progresivní motilitu spermií prokázán v obou časech (T0, T30). V čase T0 byly zjištěny nejvyšší hodnoty u vzorku ředěného semennou plazmou hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S), v čase T30 zase u vzorku ředěného semennou plazmou hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP).

Vliv kryokonzervačního ředidla na celkovou i progresivní motilitu spermií byl prokázán rovněž v obou časech (T0, T30), ovšem pouze při současném ředění semennou plazmou hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S). V tomto případě dosahuje lepších výsledků motility ředidlo INRA82 (B) než ředidlo L-EDTA (A).

Negativní efekt třicetiminutové inkubace byl prokázán u vzorků bez semenné plazmy (K) a se semennou plazmou hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S) při současném použití kryokonzervačního ředidla L-EDTA (A) a dále u vzorku ředěného INRA82 (B) s přídavkem semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S). Semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) prokázala s oběma ředidly (A, B) schopnost zachovat srovnatelné hodnoty celkové i progresivní motility ihned po rozmrazení i po třiceti minutách inkubace.

Tab. 12: Hodnoty celkové (TMOT) a progresivní (PMOT) motility (%) ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) bez přídatku semenné plazmy (K) s přídatkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přídatkem semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S) u dávek mrazených s ředidlem L-EDTA (A) a INRA82 (B).

			A	B
TMOT	K	T0	0,9 ± 0,9 <sup>I</sup>	0,8 ± 1,5 <sup>I</sup>
		T30	0,4 ± 0,6 <sup>II</sup>	0,2 ± 0,3 <sup>†</sup>
	SP	T0	1,2 ± 1,7 <sup>I</sup>	1,9 ± 2,2
		T30	0,5 ± 0,9	2,9 ± 6,2
	S	T0	0,5 ± 0,6 <sup>a,2,I</sup>	3,0 ± 3,6 <sup>b,2,I</sup>
		T30	0,2 ± 0,3 <sup>a,II</sup>	1,4 ± 1,6 <sup>b,‡,II</sup>
PMOT	K	T0	0,6 ± 0,7 <sup>I</sup>	0,6 ± 1,2 <sup>I</sup>
		T30	0,2 ± 0,3 <sup>II</sup>	0,1 ± 0,3 <sup>†</sup>
	SP	T0	0,9 ± 1,2 <sup>I</sup>	1,7 ± 2,0
		T30	0,3 ± 0,6	2,6 ± 5,7 <sup>‡</sup>
	S	T0	0,4 ± 0,5 <sup>a,2,I</sup>	2,8 ± 3,6 <sup>b,2,I</sup>
		T30	0,1 ± 0,2 <sup>a,II</sup>	1,1 ± 1,5 <sup>b,II</sup>

<sup>I, II</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi T0 a T30 v rámci jednoho ředidla K, SP, S u jednoho parametru ( $P < 0,05$ ).

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi dvěma ředidly v čase T0 ( $P < 0,05$ )

<sup>a, b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B ( $P < 0,05$ )

<sup>†,‡</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi dvěma ředidly v čase T30 ( $P < 0,05$ ).

Pro **kinematické parametry spermií**, zobrazené v příloze v tabulce 13, platí následující. Jednoznačně byl prokázán pozitivní efekt přídatku semenné plazmy na kinematické parametry epididymálních spermií. Ihned po rozmrazení se v malé míře projevuje i dominance semenné plazmy hřebce s nadprůměrně mrazitelným ejakulátem (S), ve většině případů ale v obou časech suverénně dominuje semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP).

Efekt použitého kryokonzervačního ředidla svědčí ve většině případů pro ředidlo INRA82 (B). To za současného přídatku semenné plazmy (SP, S) dosahuje vyšších hodnot než ředidlo L-EDTA (A) u všech kinematických parametrů spermií. Pouze u vzorků bez přídatku semenné plazmy dosahuje u některých kinematických parametrů spermií lepších hodnot ředidlo L-EDTA (A) než ředidlo INRA82 (B).

Téměř u všech kinematických parametrů spermií byl prokázán efekt třicetiminutové inkubace. U většiny z nich dosahují výsledky po třicetiminutové inkubaci nižších hodnot než ihned po rozmrazení. Při současné kombinaci ředidla INRA82 (B) a semenné plazmy hřebce

s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) často hodnoty v čase T30 převyšují hodnoty naměřené ihned po rozmrazení.

Lze tedy konstatovat, že kombinace ředidla INRA82 (B) a semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) dosahuje nejvyšších hodnot u většiny kinematických parametrů. Zároveň je tato kombinace schopná udržet stálé hodnoty kinematických parametrů i po třiceti minutách inkubace, v některých případech dokonce tyto parametry zvýší.

Výsledné hodnoty by se daly shrnout takto. Ačkoli kryokonzervační ředidlo L-EDTA (A) vykazuje lepší výsledky u procentuálního zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, v celkové a progresivní motilitě i kinematických parametrech spermií jednoznačně dosahuje lepších výsledků ředidlo INRA82 (B). Je tedy možné, že ředidlo A má lepší vliv na přežitelnost spermií, nicméně vyšší procento živých spermií se neodráží v jejich pohyblivosti. Naopak ředidlo B, nevykazuje tak vysoké procento živých spermií, nicméně i s nižším počtem přeživších spermií vykazuje větší motilitu. Znamená to tedy, že při použití ředidla B, je větší počet živých spermií schopen pohybu.

Ředidlo INRA82 (B) také na rozdíl od ředidla L-EDTA (A) dokáže udržet stálou úroveň motility i stálý počet živých spermií.

Co se týče ředidel přidávaných po rozmrazení, mezi nimi dominuje ředidlo SP, tedy semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem. Nebyl tedy prokázán lepší účinek semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem. Přídavek jakékoli semenné plazmy (SP, S) po rozmrazení se ovšem jeví lépe, než nechat vzorek bez zásahu (K).

## 6 Diskuse

Cílem této diplomové práce bylo prokázat pozitivní vliv přídavku semenné plazmy na přežitelnost rozmrazených hřebčích epididymálních spermií. K pokusu byly použity vzorky epididymálních spermií od pěti různých hřebců ( $n = 5$ ), mrazené se dvěma různými kryokonzervačními ředidly L-EDTA (A) a INRA82 (B), ke kterým bylo po rozmrazení přidáno semenné plazmy od hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP), semenné plazmy od hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S) nebo byly ponechány bez přídavku semenné plazmy (K). Kromě vlivu semenné plazmy tak mohl být pozorován i vliv dvou kryokonzervačních ředidel (A, B).

### 6.1 Vliv kryokonzervačního ředidla

Způsob mrazení a druh použitého ředidla bývá poměrně často předmětem odborných studií. Ačkoli autoři používají různý způsob zisku epididymálních spermií a jejich předpřípravy (Melo et al., 2008; Vieira et al., 2013), i různé způsoby mrazení (Melo et al., 2008; Papa et al., 2008; Vieira et al., 2013), pozornost věnují především vlivu kryokonzervačních ředidel na mrazitelnost epididymálních spermií (Tiplady et al., 2002; Melo et al., 2008; Papa et al., 2008; Vieira et al., 2013)

V této práci byl prokázán efekt přidaného kryokonzervačního ředidla na mrazitelnost spermií. Procentuální zastoupení živých spermií a integrity plazmatické membrány spermií byla prokazatelně lepší u vzorků ředěných ředidlem L-EDTA v porovnání s ředidlem INRA82.

Podobné hodnoty zastoupení živých spermií i celkové progresivní motility, jako v naší práci, publikovali Tiplady et al. (2002), ti ovšem k mrazení epididymálních spermií použili jen jedno ředidlo, a sice laktózo-žloutkové ředidlo s glycerolem. V porovnání s publikací Vieira et al. (2013), kteří používali ředidlo L-EDTA, bylo v našem pokusu zjištěno vyšší procento živých spermií ve vzorcích mrazených jak L-EDTA tak INRA82. Ve vzorcích mrazených L-EDTA je rozdíl v čase T0 přibližně 10 %, v čase T30 necelých 20 %. Ve vzorcích ředěných INRA82 jsou výsledky v čase T0 téměř shodné s prací Vieira et al. (2013), v čase T30 už ovšem v naší práci vychází hodnoty přibližně o 10 % vyšší. Shodně s našimi výsledky, byl i v publikaci Vieira et al. (2013) zaznamenán s použitím ředidla L-EDTA pokles viability spermií během třicetiminutové inkubace. Oproti tomu ve vzorcích ředěných INRA82 nebyl zaznamenán tak markantní pokles, tudíž lze říci, že toto ředidlo lépe zachovává životaschopnost spermií po třicetiminutové inkubaci.



Nízký počet spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány zaznamenaný v naší práci, může podle Neild et al. (2000) poukazovat na sníženou oplozovací schopnost spermií. Neild et al. (2000) totiž označují všechny vzorky s výsledkem horším než 40 % spermií s neporušenou integritou membrány jako spermie s pochybnou oplozovací schopností. V našem pokusu je HOS+ spermií v nejlepším případě 35,4 %.

Při hodnocení motility byl rovněž zaznamenán efekt použitých kryokonzervačních ředidel, ovšem s opačným výsledkem. Ředidlo INRA82 u motility i dalších kinematických parametrů spermií dosahuje výrazně vyšších hodnot než ředidlo L-EDTA. Podobné výsledky uvádí i Melo et al. (2008). I v jejich publikaci vykazují epididymální spermie ředěné ředidlem INRA82 vyšší motilitu než epididymální spermie ředěné pomocí L-EDTA. Hodnoty progresivní motility (Melo et al., 2008) jsou navíc podobné těm, které byly zjištěny v naší práci. Opačných výsledků dosáhli ale Papa et al. (2008) kteří zveřejnili práci, kde proti ředidlu INRA82 dosahuje lepších výsledků motility ředidlo L-EDTA. Jejich výsledky celkové i progresivní motility se navíc pohybují ve vyšších číslech. Nutno ovšem podotknout, že jejich metodika obsahuje navíc oproti metodice této práce desetiminutovou inkubaci v ředidle Botu-Semen® před samotnou kryokonzervací. Toto ředidlo by mělo podle výrobce zaručit zvýšenou toleranci spermií proti chladovému šoku a zároveň nenarušit fertilizační schopnost spermií. Je tedy zřejmé, že spermie v publikaci Papa et al. (2008) byly navíc vystaveny dalšímu kryoprotektivu, které napomohlo spermiím vytvořit hyperosmotické prostředí, indukovat tak jejich dehydrataci a stabilizovat membránu před zmrazením (McKinnon et al., 2011). V naší práci byly epididymální spermie vystaveny jen jednomu typu ředidla. To může souviset jak s nižšími hodnotami, tak s rozdílným efektem vybraných ředidel.

Efekt kryokonzervačního ředidla na mrazitelnost epididymálních spermií je dle výše uvedených studií nejednoznačný, tudíž nelze jasně potvrdit dominanci některého z nich. Při konzervaci epididymálních spermií patrně hraje svou úlohu ve vztahu k účinku použitého ředidla, také individualita hřebce, na což upozorňuje Bruemmeer et al. (2002), když apeluje na výběr ředidla právě podle individuality konkrétního hřebce nebo Roels et al. (2013), který radí v případě prvního mrazení spermií konkrétního hřebce použít alespoň dvě různá ředidla a předejít tak případným ztrátám.

## **6.2 Vliv kryokonzervačního ředidla u konkrétního hřebce**

V naší práci nebyl prokázán efekt použitého kryokonzervačního ředidla na procentuální zastoupení živých epididymálních spermií po rozmrazení u jednotlivých hřebců. Pouze

epididymální spermie jednoho z pěti hřebců vykazovaly vyšší zastoupení živých spermií při použití ředidla L-EDTA než při ředění INRA82. Podobně jako u hodnocení procentuálního zastoupení spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, kde se při porovnání obou ředidel statisticky průkazně liší jen hodnoty spermií dvou hřebců z pěti. Ty jsou ovšem zajímavé také z jiného hlediska. Totiž procento spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány u těchto dvou hřebců při použití ředidla L-EDTA překračují v čase T0 hranici 40 % HOS+ spermií, která podle Neild et al. (2000) poukazuje na lepší životaschopnost spermií.

Ostatní autoři se ale při zkoumání vlivu kryokonzervačního ředidla u konkrétního hřebce spíše než na zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány zaměřují na motilitu a kinematické parametry spermií. Heise et al. (2011) uvádí, že se progresivní motilita epididymálních spermií čtyř zkoumaných hřebců před zamrazením značně liší (30 %, 10 %, 75 %, 40 %), po mrazení s ředidlem INRA82 je sice motilita epididymálních spermií mezi jednotlivými hřebci srovnatelná, ale u epididymálních spermií tří ze čtyř zkoumaných hřebců došlo k výraznému poklesu motility oproti hodnotám před zamrazením (10 %, 10 %, 10 %, 5 %). Lze tedy předpokládat, že kdyby byla v pokusu (Heise et al., 2011) použita alespoň dvě různá kryokonzervační ředidla, jak doporučuje Bruemer et al. (2002) či Roels et al. (2013), nemusela by se progresivní motilita po zamrazení tolik snížit. To částečně potvrzuje i náš pokus, kde byl pro celkovou i progresivní motilitu potvrzen efekt použitého ředidla u epididymálních spermií dvou z pěti zkoumaných hřebců v čase T0 i T30. U epididymálních spermií čtyř z pěti hřebců vychází vyšší hodnoty motility při použití ředidla INRA82 v porovnání s L-EDTA, i když signifikantní rozdíl se objevuje jen u epididymálních spermií dvou z pěti hřebců. Výsledky této práce se shodují s výzkumem, který provedl Melo et al. (2008), a ve kterém potvrzuje lepší výsledky motility spermií při použití ředidla INRA82 než L-EDTA. Na druhou stranu v práci Papa et al. (2008) bylo naopak dosaženo lepšího výsledku s ředidlem L-EDTA oproti INRA82

Efekt kryokonzervačního ředidla byl potvrzen i u kinematických parametrů spermií, kde dosahuje lepšího výsledku ředidlo INRA82 oproti L-EDTA. Zvýšení hodnot kinematických parametrů pak znamená větší oplozovací schopnost spermie, jak upozorňují Neuhauser et al. (2015), když definují hlavní rozdíl mezi ejakulovanými a epididymálními spermii.

Nutno ovšem podotknout, že při použití obou ředidel se vyskytují významné rozdíly mezi epididymálními spermii jednotlivých hřebců, a zatímco některé dosahují poměrně vysokých hodnot ve všech zkoumaných parametrech s oběma vybranými ředidly, jiné mají s oběma ředidly hodnoty naopak poměrně nízké. Tyto rozdíly může způsobovat například

individuální kvalita spermií jednotlivých hřebců, jejich tolerance na proces zmrazování nebo i míra interakce epididymálních spermií s anestezíí použitou během kastrace (Morris et al., 2002).

### 6.3 Vliv semenné plazmy

Zatímco v tomto pokusu byl sledován vliv semenné plazmy dvou různých jedinců stejného druhu, většina prací řeší pouze vliv přídatku semenné plazmy stejného živočišného druhu bez ohledu na kvalitu jejího donora. Neuhauser et al. (2013, 2014) dokonce jako donora semenné plazmy využívají hřebce s nízkou kvalitou spermií, přesto se v jejich publikaci hodnoty progresivní motility epididymálních spermií po rozmrazení pohybují okolo 12 %, což je více, než vychází v našem pokusu. Neuhauser et al. (2013, 2014) ale přidávali po rozmrazení 80 % semenné plazmy, na rozdíl od našich 33 %. Lepší vliv 80 % přidané semenné plazmy na oplozovací schopnost epididymálních spermií ale Neuhauser et al. (2015) v následné studii vyvrátili, když publikovali, že se motilita spermií u vzorků s přídatkem 80 % semenné plazmy oproti těm s 50 % semenné plazmy dále nezvyšuje, zároveň ale potvrdili že přídatek 50 % semenné plazmy má na motilitu lepší vliv než přídatek 20 % semenné plazmy. V naší práci byl na základě této studie použit přídatek 33 % semenné plazmy. Záměrem bylo zjistit, zda je přídatek 50 % semenné plazmy účinnější nebo srovnatelný s přídatkem 33 % semenné plazmy. Hodnoty motility epididymálních spermií s přídatkem 50 % semenné plazmy ale v publikaci Neuhauser et al. (2015) dosahují vyšších hodnot než epididymální spermie s 33 % semenné plazmy v naší práci.

Způsob mrazení má pak podle Neuhauser et al. (2014) vliv pouze na viabilitu nikoliv na motilitu epididymálních spermií. Za různé výsledky tak, kromě již zmíněné koncentrace semenné plazmy, mohou patrně různá použitá ředidla či různá kvalita spermií zkoumaných hřebců.

Morrell et al. (2014) i Neuhauser et al. (2015) zkoumali u hřebců rozdíl mezi přídatkem vlastní semenné plazmy a semenné plazmy jiného hřebce, přičemž nebyl pozorován signifikantní rozdíl. Podobně ani v naší práci nebyl pozorován efekt přídatku semenné plazmy (SP, S) na celkovou a progresivní motilitu ani v procentuální zastoupení živých spermií a zastoupení spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány. Pouze u kinematických parametrů motility (ALH, BCF, LIN, STR, VAP, VCL, VSL, WOB) byl ve většině případů mezi semennými plazmami (SP, S) zjištěn statisticky významný rozdíl. U těchto hodnot ovšem navzdory všem očekáváním dominuje semenná plazma (SP) od hřebce

s průměrně mrazitelným ejakulátem. I zde jsou ale hodnoty nižší oproti závěrům studie Neuhauser et al. (2014).

Ačkoliv u hodnot celkové a progresivní motility (TMOT, PMOT) statisticky průkazný rozdíl mezi jednotlivými plazmami (SP, S) prokázán nebyl, byl prokázán lepší vliv semenné plazmy (SP, S) na motilitu spermií oproti kontrolnímu vzorku (K). Nutno ovšem dodat, že se hodnoty obou parametrů (TMOT, PMOT) pohybují oproti jiným studiím (Morrell et al., 2014; Neuhauser et al., 2013, 2014, 2015; Papa et al., 2008) výrazně níže. Motilita epididymálních spermií ovšem není nejdůležitějším ukazatelem jejich oplozovací schopnosti, v tomto ohledu hraje důležitou roli především procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, a hlavně jejich koncentrace (Dacheux et al., 2016; Šichtař et al., 2017)

U procentuálního zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány ale pozitivní vliv semenné plazmy (SP, S) oproti kontrolnímu vzorku (K) prokázán nebyl. Tento fakt je možné vysvětlit tvrzením, že semenná plazma nemá vliv na viabilitu u morfologicky normálních spermií (Heise et al., 2011). Je tedy možné, že se jedná právě o tento případ, což by prokázalo hodnocení morfologie, které by mohlo být přínosným doplňkem k podobně strukturovanému experimentu

U parametrů motility byl prokázán pozitivní účinek semenné plazmy, u procentuálního zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány se neprokázal. Stejně tak nebyl prokázán rozdíl mezi semennou plazmou hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelnými spermiemi (S) a hřebce s průměrně mrazitelnými spermiemi (SP), tak jako již dříve nebyl prokázán vliv přídatku vlastní semenné plazmy oproti semenné plazmě jiného hřebce (Morrell et al., 2014, Neuhauser et al. 2015). Bylo by tedy vhodné jako předmět dalšího zkoumání zařadit problematiku složení semenné plazmy a jeho vlivu na přežitelnost spermií. Pak by bylo možné lépe porozumět možnostem přídatku semenné plazmy do epididymálních hřebčích spermií. Zatím se jeví, že původ semenné plazmy, ani mrazitelnost spermií hřebce, od kterého plazma pochází, nejsou ukazatele, podle kterých by bylo možné odhadnout kvalitu vlastní semenné plazmy.

#### **6.4 Vliv kryokonzervačních ředidel a semenné plazmy**

Na závěr byl také hodnocen efekt kombinace kryokonzervačního ředidla (A, B) a po rozmrazení přidané semenné plazmy (K, SP, S).

Zatímco v hodnotách zastoupení živých spermií nebyly zjištěny žádné zásadní rozdíly mezi použitými ředidly, hodnoty získané z procentuálního zastoupení spermií s neporušenou

integritou plazmatické membrány svědčí ve prospěch ředidla L-EDTA. Efekt semenné plazmy u zastoupení živých spermií potvrzen nebyl, u zastoupení spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány byl potvrzen pouze při ředění ředidlem INRA82. Procento živých spermií se v našem pokusu pohybuje od 40 do 50 % při ředění L-EDTA a přibližně o 10 % méně s ředidlem INRA82. Spermie s neporušenou integritou plazmatické membrány se s oběma ředidly pohybují pod hodnotou 40 %, kterou Neild et al. (2000) označují jako hranici pro predikci oplození schopnosti spermií. Nutno ovšem dodat, že velmi podobné hodnoty viability jako v naší práci publikovali Neuhauser et al. (2014).

Co se motility spermií týká, objevuje se statisticky významný rozdíl mezi ředidly A a B pouze při současném použití semenné plazmy od hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelnými spermiemi (S). Tato semenná plazma (S) nejlépe interaguje s ředidlem INRA82. U kinematických parametrů motility byl ve všech vzorcích (K, SP, S) prokázán pozitivní efekt ředidla INRA82 oproti L-EDTA a současně při použití obou ředidel pozitivní vliv semenné plazmy (SP, S) oproti kontrolním vzorkům (K).

Je potřeba zmínit, že v dostupných studiích se autoři nezabývají kombinovaným vlivem konkrétního kryokonzervačního ředidla a současně přídatkem semenné plazmy. Existují ovšem studie, které hodnotí jednotlivá ředidla zvlášť a ty byly diskutovány výše.

O pozitivním vlivu semenné plazmy na motilitu a kinematické parametry spermií není podle našich výsledků pochyb, zrovna tak účinky semenné plazmy potvrzují i Neuhauser et al. (2013, 2015). Není ale zatím jasné, zda je semenná plazma univerzální, a má tedy stejné pozitivní účinky na spermie všech hřebců, jak předpokládají Morrell et al. (2014) nebo jsou nároky spermií každého hřebce individuální. V naší práci vychází v kinematických parametrech častěji lépe semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelnými spermiemi (SP) než semenná plazma hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelnými spermiemi (S), nezdá se tedy, že by každá semenná plazma měla stejné vlastnosti. Další nejasnost ohledně účinku semenné plazmy je v jejím použití. Nejčastěji byly testovány dvě varianty přídatku semenné plazmy, a sice přídatek před mrazením (Heise et al., 2011; Gonzales et al., 2010; Olecragui et al., 2014) nebo až po zamrazení (Morrell et al., 2014; Neuhauser et al., 2013; 2014; 2015). Obě metody mají své výhody i nevýhody. Přídatek semenné plazmy před zamrazením je poněkud jednodušší, neboť se tento úkon pouze začlení po pracovního postupu mrazení, oproti tomu přidávat semennou plazmu bezprostředně před inseminací vyžaduje další pracovní krok navíc. Heise et al. (2011) ale publikovali, že přidaná semenná plazma sice zvýší motilitu epididymálních spermií před zamrazením, po rozmrazení podle nich ale není tento nárůst znát

a dávají tak větší přednost přidavku semenné plazmy až po rozmrazení. S tím se ztotožňuje také Neuhauser et al. (2013; 2014; 2015), kteří upozorňují na ochranný vliv semenné plazmy, umožňující spermii bezpečný průchod samičím pohlavním traktem až do vejcovodu. Ve své publikaci (2015) ale jedním dechem dodávají, že záleží také na množství přidané semenné plazmy.

Nad významem semenné plazmy se zamýšlí také Bromfield (2018). Ten ve svém článku sice uznává, že semenná plazma není pro oplození nutná, upozorňuje ale na myšlenku, že přítomnost semenné plazmy během oplození pomáhá upravit prostředí v děloze a pomoci tak implantaci a lepšímu vývoji plodu. Semenná plazma podle něj může pomoci snížit například časnou embryonální mortalitu.

Ohledně efektu kryokonzervačních ředidel L-EDTA a INRA82 na oplozovací schopnost spermií nejsou výsledky jednoznačné. Kromě faktu, že spermie různých hřebců mají s různými ředidly různou mrazitelnost, je zde také fakt, že existuje velké množství používaných komerčních ředidel, jejichž složení není známé. Kromě ředidel L-EDTA a INRA82, která byla použita v této práci, bývá předmětem studií také Botu-Crio®, které vyzdvihuje například Melo et al. (2008) nebo Papa et al. (2008). Olecragui et al. (2014) zase používá pasterizovaný vaječný žloutek a dimetylformamid. Podle výsledků naší práce, dosahuje ředidlo L-EDTA lepších výsledků v počtu živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány, ředidlo INRA82 zase v celkové i progresivní motilitě a kinematických parametrech motility. Důležitou vlastností ředidla INRA82 je fakt, že se u něj neprojevuje negativní efekt třicetiminutové inkubace.

Vhodnost jednoho nebo druhého ředidla by mohly upřesnit například hodnoty zabřezávání, z výsledků, které vyšly z této práce, ale s jistotou není možné upřednostnit ani jedno z nich.

## 7 Závěr

Hypotéza, že přidavek semenné plazmy do rozmrazených epididymálních hřebčích spermií má pozitivní vliv na jejich přežitelnost potvrzena nebyla, neboť výsledky procentuálního zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány nevykazují statisticky významný rozdíl mezi vzorky s přidanou semennou plazmou (SP, S) a vzorky bez semenné plazmy (K).

Byl ovšem prokázán pozitivní vliv semenné plazmy na motilitu epididymálních spermií, kdy ve většině případů byla motilita po přidání semenné plazmy (SP, S) vyšší, než u kontrolního vzorku (K). Dále se také neprokázalo, že by přidavek semenné plazmy od hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelnými spermiemi (S) byl lepší než přidavek semenné plazmy od hřebce s průměrně mrazitelnými spermiemi (SP). Semenná plazma hřebce s průměrně mrazitelnými spermiemi (SP) dokonce dosahovala lepších výsledků častěji než semenná plazma hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelnými spermiemi (S).

Jako další aspekt byl pozorován vliv kryokonzervačního ředidla. Ani zde nejsou výsledky jednoznačné. Pro procentuální zastoupení živých spermií a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány dosahuje lepších výsledků ředidlo L-EDTA (A), pro motilitu a kinematické parametry spermií zase ředidlo INRA82 (B). U ředidla INRA82 (B) se ovšem neprojevuje negativní efekt třicetiminutové inkubace. Zajímavé je, že výsledky všech zkoumaných parametrů vychází pro jednotlivá ředidla podobně u spermií všech hřebců zahrnutých do studie ( $n = 5$ ). I přes to, že hodnoty všech parametrů jsou u hřebců individuální a navzájem se různí, efekt ředidel se u všech projevuje podobným způsobem.

## 8 Zdroje

1. Bedford-Guaus, S.J. 2007. Transported stallion semen an breeding mares with cooled or frozen-thawed semen. *Clinical techniques in equine practise*. 6. 239-248.
2. Blanchart, T.L., Johnson, L. 1997. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell: Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. *Theriogenology*. 47.665-677.
3. Brito, L.F.C. 2007.Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in equine practice*. 6. 249-264.
4. Bromfield, J.J. 2018. Review: The potential of seminal fluid mediated paternal-maternal communication to optimise pregnancy success. *Animal*. 1-6.
5. Bruemmeer, J.E., Reger, H., Zibinski, G., Squires, E.L. 2002. Effect of storage at 5 degrees C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 58. 405-407.
6. Cary, J.A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J.T., Duoos, L., Fahning, M.L., 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet Journal*. 45. 35-41.
7. Chenoweth, P.J. 2005. Genetic sperm defects.*Theriogenology*. 64. 457-468.
8. Cooper, T.G. 2012. *The epididymis, sperm maturation and fertilisation*. Springer-Verlag. Berlin. 2187 p. ISBN: 978-3-642-71473-3.
9. Dacheux, J.L., Dacheux, F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*. 147. 27-42.
10. Dacheux, J.L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Ecroyd, H., Druart, X., Gatti, J.L., Dacheux, F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 58. 197-210.
11. Dacheux, J.L., Dacheux, F., Duart, X. 2016. Epididymal protein markers and fertility. *Animal reproductive science*. 169. 76-87.
12. Dascanio, J.J., McCue, P.M. 2014. *Equine reproductive procedures*. Wiley Blackwell. 560 p. ISBN: 978-0-470-96039-4.
13. Dias, G.M., Retamal, C.A., Tobela, L., Arnholdt, A.C.V., López, M.L. 2006. Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 66. 354-365.



14. Domenikoni, R.T., Souza, A.C.F., Xu, B., Washington, A.M., Hinton, B.T. 2016. Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side?. *Biology of reproduction*. 95. 1-8.
15. Ellerbrock, R., Canisso, I., Feijo, L., Lima, F., Shipley, C., Kline, K. 2016. Diagnosis and effect of urine contamination in cooled-extended stallion semen. *Theriogenology*. 85. 1219-1224.
16. Falomo, M.E., Rossi, M., Mantovani, R. 2016. Collection, storage and freezability of equine epididymal spermatozoa. *Italian journal of animal science*. 3. 386-389.
17. Gangrade, B.K. 2013. Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception. *Clinics*. 68.131-140.
18. Gibb, Z., Aitken, R.J. 2016. Recent developments in stallion semen preservation. *Journal of equine veterinary science*. 43. 29-36.
19. Goericke-Pesch, S., Failing, K. 2013. Retrospective analysis of semen evaluation with special emphasis on the use of hypoosmotic swelling test and acrosomal evaluation using spermac. *Reproduction in domestic animals*. 48. 213-217.
20. Gonzales, M.H., Rodríguez, C., Oropeza, A., Wong, Y.S., Llanos, J., Figueroa, H.G., 2015. Use of seminal plasma in equine epididymal spermatozoa cryopreservation. *RevInv Vet Perú*. 26. 351-356.
21. Heise, A., Kähn, W., Volkmann, D.h., Thompson, P.N., Gerber, D. 2010. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science*. 118. 48-53.
22. Heise, A., Thompson, P.N., Gerber, D. 2011. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal reproduction science*. 123. 192-201.
23. Higgins, G. 2012. *Horse anatomy for Performance*. F & W Media International Ltd. Devon. 156 p. ISBN: 978-1-4463-0096-1.
24. James, A.N., Green, H., Hoffman, S., Landry, A.M., Paccamoni, D., Godke, R.A. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*. 58. 401-404.
25. Johnson, L, Amann, R.P., Pickett, B.W., 1980. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *American journal of veterinary research*. 41. 1190-1196.
26. Johnson, L., Varner, D.D., Roberts, M.E., Smith, T.L., Keillor, G.E., Scrutchfield, W.L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science*. 60-61. 471-480.

27. Loomis, P.R. Collecting a fractionated stallion ejaculate. [online]. Select breeders service. 8. června 2016. [cit. 29-11-2017]. Dostupné z: <<http://info.selectbreeders.com/blog/collecting-a-fractionated-stallion-ejaculate>>
28. Loomis, P.R., Graham, J.K. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*. 105. 119-128.
29. McDonnell, S.M. 1992. Ejaculation, psysiology and dysfuncion. Stallion management. 8. 57-70.
30. McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.L., Varner, D.D. 2011. Equine reproduction. Blackwell Publishing Ltd. Chichester. 3288 p. ISBN: 9780470961872.
31. Melo, C.M., Papa, F.O., Fioratti, E.G., Villaverde, A.I.S.B., Avanzi, B.R., Monteneiro, G., Dell'Aqua Jr., J.A., Pasquini, D.F., Alvarenga, M.A. 2008. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal reproduction science*. 3632. 1-59.
32. Monteneiro, G.A., Papa, F.O., Zahn, F.S., Dallaqua, J.A., Melo, C.M., Maziero, R.R.D., Avanzi, B.R., Alvarenga, M.A., Guasti, P.N. 2011. Cryopreservatioon and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 127. 197-201.
33. Monteneiro, G.A., Guasti, P.N., Rocha, A.S., Martin, I., Sancler-Silva, Y.F.R., Dell'Aqua, C.P.F., Dell'Aqua, J.A., Papa, F.O. 2013. Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *Journal of veterinary science*. 33. 169-173.
34. Mortimer, S.T., 2013. CASA-Pracital aspects. *Journal of andrology*. 21. 515-524.
35. Moore, A., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*. 51. 241-249.
36. Morel, M.C.G.D. 2008. Equine reproductive physiology, breeding and sud management. CAB International. Cambridge. 378 p. ISBN: 978-1-84593-450-7.
37. Morrell, J.M., Georgakas, A., Lundeheim, N., Nash, D., Morel M.C.G.D., Johannisson, A. 2014. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology*. 82. 176-183.
38. Morris, L., Tiplady, C., Allen, W.R. 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology*. 58. 643-646.

39. Neild, D.M., Chaves, M.G. Flores, M., Miragaya, M.H., Gonzales, E., Agüero, A. 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*. 32.351-355.
40. Neild, D., Miragaya, M., Chaves, G., Pinto, M., Alonso, A., Gambarotta, M., Losinno, L., Agüero, A. 2006. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. *Animal reproduction science*. 94. 92-95.
41. Neuhauser, S., Rheinfeld, S., Handler, J. 2013. Motility of fresh and frozen-thawed stallion sperm from three segments of the epididymal cauda and the effect of post-thaw seminal plasma addition on motility. *Journal of equine veterinary science*. 33. 942-949.
42. Neuhauser, S., Rheinfeld, S., Handler, J. 2014. Comparison of the effects of four freezing methods on motility characteristic, morphology, and viability of postthaw stallion epididymal sperm. *Journal of equine veterinary science*. 34. 882-888.
43. Neuhauser, S., Dörfel, S., Handler, J. 2015. Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. *Andrology*. 3. 536-543.
44. Neuhauser, S., Gösele, P., Handler, J. 2017. The effect of four different commercial semen extenders on the motility of stallion epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, DOI: 10.1016/j.jevs.2017.10.015.
45. Olaciregiu, M., Gil, L., Montón, A., Luno, V., Jerez, R.A., Martí, J.I. 2014. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology*. 68. 91-95.
46. Papa, F.O., Melo, C.M., Fioratti, E.G., Dell'Aqua, J.A., Zahn, F.S., Alvarenga, M.A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal reproduction science*. 107. 293-301.
47. Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Vidament, M., Magistrini, M. 2008. Freezing stallion semen in INRA96®- based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy science technology*. 88. 257-265.
48. Reece, W.O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada. Praha. 480 p. ISBN: 978-80-247-3282-4.
49. Robaire, B., Hinton, B.T. 2001. *The epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 577 p. ISBN: 0-306-46684-8.

50. Roels, K., Leemas, B., Ververs, C., Govaere, J., Hoogewijs, M., Van Soom, A. 2013. Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 83. 321-325.
51. Rua, M.A.S., Quirino, C.R., Bartholazzi, A. Jr., Santoro, P.N., Bastos, R., Ribeiro, M.S., Matos, L.F., Vega, W.H.O. 2016. Evaluation of the breeding behavior of brazilian pony stallion. *Animal reproduction science*. 172. 137-142.
52. Samper, J.C. 2008, *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Elsevier Health Sciences. Philadelphia. 336 p. ISBN: 9781437711226.
53. Schnorbrich, M.R., Turner, R.O., Belcher, C.N., Slack, J.A. 2016. Transrectal ultrasonographic characterization of the accessory sex glands, pelvic urethra, and ureters in normal geldings. *Theriogenology*. 85. 186-192.
54. Sharma, R.K., Padron, O.F., Thomas, A.J., Agarwal, A. 1997. Factors associated with the quality before freezing and after thawing of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. *American society for reproductive medicine*. 68. 626-631.
55. Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W.F. 2015. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reproduction in domestic animals*. 50. 20-26.
56. Šichtař, J., Janošíková, M. 2017. Využití epididymálních spermií v asistované reprodukci koní. *Veterinářství*. 2. 104-107.
57. Tiplady, C.A., Morris, L.H.-A., Allen, W.R. 2002. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thawed motility and viability after three treatments. *Theriogenology*. 58. 225-228.
58. Turner, C.E., Walborn, S.R., Blanchard, T.L., Varner, D.D., Brinsko, S.P., LaCaze, K.A., Teague, S.R., Love, C.C. 2016. The effect of two levels of hemospermia on stallion fertility. *Theriogenology*. 86. 1399-1402.
59. Viera, L.A., Gadea, J., Gracia-Vazquez, F.A., Aviles-Lopez, K., Matas, C. 2013. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up 96 h at 4 degrees can be succesfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal reproduction science*. 136. 280-288.
60. Volkmann, D.H., Gerber, D., Erb, H.N., 2001. Comparison between freezability of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal reproduction science*. 68. 315-365.
61. Waheed, M.M, Ghoneim, I.M., Abdou, M.S. 2015. Sexual behavior and Hormonal profiles in arab stallions. *Journal of equine veterinary science*. 35. 499-504.

62. Weber, J.A., Woods, G.L. 1993. Ultrasonographic Measurement of Stallion Accessory Sex Glands and Excurrent Ducts during Seminal Emission and Ejaculation. *Biology of reproduction*. 49. 267-273.

## 9 Přílohy

Tab. 5: Hodnoty zastoupení živých spermií (viabilita, %) a spermií s neporušenou integritou plazmatické membrány (HOS+, %), ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) pro spermie jednotlivých hřebců (n = 5), mražené s ředidlem L-EDTA (A) a INRA 82 (B).

		1		2		3		4		5	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Viabilita	T0	52,3 ± 7,2	53,7 ± 1,5	58,6 ± 7,6 <sup>a</sup>	45,9 ± 8,4 <sup>b</sup>	67,3 ± 2,1 <sup>1</sup>	53,7 ± 4,2	28,9 ± 11,3 <sup>1</sup>	28,6 ± 14,6	48,5 ± 19,8	40,9 ± 10,4
	T30	45,7 ± 4,9	49,7 ± 2,9	54,4 ± 9,9 <sup>a</sup>	40,9 ± 7,6 <sup>b</sup>	54,0 ± 4,4 <sup>2</sup>	53 ± 2,6	20,8 ± 12,2 <sup>2</sup>	23,7 ± 13,2	43,5 ± 17,4	37,6 ± 12,2
HOS+	T0	18,0 ± 1,7	23,0 ± 7,2	45,1 ± 16,3 <sup>a</sup>	17,9 ± 8 <sup>b</sup>	29,7 ± 2,5	14,7 ± 2,5	18,6 ± 15,7	14,3 ± 10,4	43,4 ± 26,0 <sup>a</sup>	14,4 ± 9,8 <sup>b</sup>
	T30	20,0 ± 1,7	15,7 ± 8,1	36,1 ± 13,9 <sup>a</sup>	16,8 ± 5,6 <sup>b</sup>	24,7 ± 8,1	16,3 ± 2,5	16,1 ± 10	10,8 ± 9,5	32,8 ± 22,4 <sup>a</sup>	17,4 ± 9,9 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B u jednoho hřebce (P < 0,05)

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časy T0 a T30 u jednotlivých parametrů (P < 0,05)

Tab. 6: Hodnoty celkové (TMOT) a progresivní (PMOT) motility (%), ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) pro spermie jednotlivých hřebců (n = 5), mražené s ředidlem L-EDTA (A) a INRA 82 (B).

		1		2		3		4		5	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
TMOT	T0	0,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,6 ± 2,0 <sup>b,1</sup>	0,6 ± 0,5	1,5 ± 1,3	1,4 ± 0,5 <sup>a,1</sup>	7,7 ± 6,0 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,4 <sup>1</sup>	1,2 ± 1,2	1,5 ± 1,9	0,9 ± 1,0
	T30	0,2 ± 0,2	1,7 ± 0,8 <sup>2</sup>	0,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,2 ± 6,9 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a,2</sup>	5,6 ± 5,3 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,2 <sup>2</sup>	0,6 ± 0,7	0,6 ± 0,9	1,1 ± 1,3
PMOT	T0	0,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,7 ± 2,3 <sup>b,1</sup>	0,4 ± 0,4	1,4 ± 1,3	1,1 ± 0,4 <sup>a,1</sup>	7,2 ± 5,6 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>1</sup>	0,9 ± 1,0	1,1 ± 1,4 <sup>1</sup>	0,9 ± 1,0
	T30	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2 <sup>2</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,0 ± 6,4 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a,2</sup>	5,4 ± 5,1 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,2 <sup>2</sup>	0,5 ± 0,6	0,4 ± 0,6 <sup>2</sup>	1,0 ± 1,2

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B u jednoho hřebce (P < 0,05)

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časy T0 a T30 u jednotlivých parametrů (P < 0,05)

Tab. 7: Hodnoty ALH, BCF, LIN, STR, WOB, VAP, VCL a VSL, ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) pro spermie jednotlivých hřebců (n = 5), mražené s ředidlem L-EDTA (A) a INRA 82 (B).

		1		2		3		4		5	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ALH ( $\mu\text{m}$ )	T0	0,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 1,3 <sup>b,1</sup>	0,3 $\pm$ 0,5 <sup>a,1</sup>	0,2 $\pm$ 0,5 <sup>b,1</sup>	0,2 $\pm$ 0,5 <sup>a,1</sup>	0,6 $\pm$ 1,1 <sup>b,1</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,5 <sup>b,1</sup>	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>a,1</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
	T30	0,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,6 <sup>b,2</sup>	0,2 $\pm$ 0,5 <sup>a,2</sup>	0,3 $\pm$ 0,7 <sup>b,2</sup>	0,2 $\pm$ 0,2 <sup>a,2</sup>	0,4 $\pm$ 0,6 <sup>b,2</sup>	0,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,3 <sup>2</sup>	0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a,2</sup>	0,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	T0	6,7 $\pm$ 3,2 <sup>a,1</sup>	7,6 $\pm$ 4,4 <sup>b,1</sup>	6,7 $\pm$ 3,3 <sup>a,1</sup>	7,4 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 3,3 <sup>a,1</sup>	8,4 $\pm$ 4,9 <sup>b,1</sup>	6,8 $\pm$ 3,4 <sup>a,1</sup>	7,4 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	6,6 $\pm$ 3,3 <sup>a,1</sup>	7,2 $\pm$ 3,5 <sup>b,1</sup>
	T30	7,6 $\pm$ 3,8 <sup>a,2</sup>	7,0 $\pm$ 4,3 <sup>b,2</sup>	6,6 $\pm$ 3,2 <sup>a,2</sup>	7,4 $\pm$ 4,1 <sup>b</sup>	7,1 $\pm$ 3,4 <sup>a,2</sup>	7,4 $\pm$ 3,8 <sup>b,2</sup>	6,9 $\pm$ 3,2 <sup>a,2</sup>	7,5 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>	7,1 $\pm$ 3,6 <sup>a,2</sup>	6,8 $\pm$ 3,2 <sup>b,2</sup>
LIN (%)	T0	11,7 $\pm$ 9,2 <sup>a,1</sup>	17,0 $\pm$ 15,2 <sup>b,1</sup>	12,0 $\pm$ 10,8 <sup>a,1</sup>	15,0 $\pm$ 12,6 <sup>b,1</sup>	11,1 $\pm$ 10,2 <sup>a,1</sup>	20,1 $\pm$ 15,4 <sup>b,1</sup>	12,3 $\pm$ 11,1 <sup>a</sup>	15,1 $\pm$ 11,6 <sup>b</sup>	12,4 $\pm$ 11,4 <sup>a,1</sup>	13,9 $\pm$ 10,9 <sup>b,1</sup>
	T30	14,6 $\pm$ 11,9 <sup>a,2</sup>	15,0 $\pm$ 13,0 <sup>b,2</sup>	11,6 $\pm$ 10,5 <sup>a,2</sup>	15,5 $\pm$ 13,8 <sup>b,2</sup>	12,4 $\pm$ 9,9 <sup>a,2</sup>	14,9 $\pm$ 11,0 <sup>b,2</sup>	12,4 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>	15,0 $\pm$ 12,3 <sup>b</sup>	13,5 $\pm$ 12,2 <sup>a,2</sup>	11,9 $\pm$ 9,6 <sup>b,2</sup>
STR (%)	T0	39,5 $\pm$ 21,9 <sup>a,1</sup>	49,3 $\pm$ 26,6 <sup>b,1</sup>	38,9 $\pm$ 22,7 <sup>a,1</sup>	44,5 $\pm$ 24,1 <sup>b</sup>	38,3 $\pm$ 23,5 <sup>a,1</sup>	54,3 $\pm$ 26,7 <sup>b,1</sup>	40 $\pm$ 23,9 <sup>a</sup>	45,7 $\pm$ 24,2 <sup>b,1</sup>	40,5 $\pm$ 24,1 <sup>a,1</sup>	43,4 $\pm$ 23,7 <sup>b,1</sup>
	T30	44,4 $\pm$ 24,4 <sup>2</sup>	44,3 $\pm$ 25,7 <sup>2</sup>	38,1 $\pm$ 23,2 <sup>a,2</sup>	44,8 $\pm$ 24,9 <sup>b</sup>	40,9 $\pm$ 21,7 <sup>a,2</sup>	46,0 $\pm$ 24,2 <sup>b,2</sup>	40,5 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	44,7 $\pm$ 24,3 <sup>b,2</sup>	41,8 $\pm$ 25,1 <sup>a,2</sup>	39,4 $\pm$ 23,3 <sup>b,2</sup>
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	1,4 $\pm$ 3,3 <sup>a,1</sup>	5,6 $\pm$ 15,3 <sup>b,1</sup>	1,5 $\pm$ 3,6 <sup>a,1</sup>	1,9 $\pm$ 3,6 <sup>b,1</sup>	1,7 $\pm$ 6,9 <sup>a,1</sup>	6,3 $\pm$ 17,2 <sup>b,1</sup>	1,2 $\pm$ 3,6 <sup>a,1</sup>	1,7 $\pm$ 5,9 <sup>b,1</sup>	1,8 $\pm$ 6,7 <sup>a,1</sup>	1,4 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>
	T30	1,1 $\pm$ 1,54 <sup>a,2</sup>	1,8 $\pm$ 3,9 <sup>b,2</sup>	1,2 $\pm$ 3,3 <sup>a,2</sup>	3,2 $\pm$ 11,4 <sup>b,2</sup>	1,0 $\pm$ 0,7 <sup>a,2</sup>	3,1 $\pm$ 7,3 <sup>b,2</sup>	1,0 $\pm$ 1,4 <sup>a,2</sup>	1,3 $\pm$ 2,7 <sup>b,2</sup>	1,4 $\pm$ 4,2 <sup>2</sup>	1,3 $\pm$ 3,8
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	5,1 $\pm$ 10,0 <sup>a,1</sup>	14,4 $\pm$ 30,8 <sup>b,1</sup>	5,1 $\pm$ 9,1 <sup>a,1</sup>	5,6 $\pm$ 12,9 <sup>b,1</sup>	5,7 $\pm$ 14,4 <sup>a,1</sup>	14,7 $\pm$ 31,6 <sup>b,1</sup>	4,1 $\pm$ 8,1 <sup>a,1</sup>	5,3 $\pm$ 13,6 <sup>b,1</sup>	6,0 $\pm$ 16,6 <sup>a,1</sup>	4,5 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>
	T30	3,5 $\pm$ 3,1 <sup>a,2</sup>	6,0 $\pm$ 11,9 <sup>b,2</sup>	4,4 $\pm$ 8,8 <sup>a,2</sup>	7,8 $\pm$ 20,6 <sup>b,2</sup>	3,8 $\pm$ 3,2 <sup>a,2</sup>	9,0 $\pm$ 16,1 <sup>b,2</sup>	3,9 $\pm$ 4,6 <sup>a,2</sup>	4,3 $\pm$ 6,9 <sup>b,2</sup>	4,7 $\pm$ 10,5 <sup>2</sup>	4,3 $\pm$ 9,1
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	T0	0,7 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	4,5 $\pm$ 14,6 <sup>b,1</sup>	0,7 $\pm$ 2,9 <sup>a,1</sup>	1,2 $\pm$ 5,8 <sup>b,1</sup>	1,1 $\pm$ 6,1 <sup>a,1</sup>	5,3 $\pm$ 16,7 <sup>b,1</sup>	0,6 $\pm$ 2,4 <sup>a,1</sup>	1,0 $\pm$ 4,7 <sup>b,1</sup>	1,1 $\pm$ 5,3 <sup>a,1</sup>	0,8 $\pm$ 4,1 <sup>b</sup>
	T30	0,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 3,1 <sup>b,2</sup>	0,6 $\pm$ 2,2 <sup>a,2</sup>	2,3 $\pm$ 10,2 <sup>b,2</sup>	0,4 $\pm$ 0,5 <sup>a,2</sup>	2,3 $\pm$ 6,9 <sup>b,2</sup>	0,5 $\pm$ 1,0 <sup>a,2</sup>	0,7 $\pm$ 2,1 <sup>b,2</sup>	0,7 $\pm$ 2,8 <sup>2</sup>	0,7 $\pm$ 3,4
WOB (%)	T0	27,2 $\pm$ 8,9 <sup>a,1</sup>	30,7 $\pm$ 12,9 <sup>b</sup>	27,8 $\pm$ 10,7 <sup>a,1</sup>	30,6 $\pm$ 11,0 <sup>b</sup>	25,6 $\pm$ 10,1 <sup>a,1</sup>	34,0 $\pm$ 12,3 <sup>b,1</sup>	27 $\pm$ 10,5 <sup>a,1</sup>	29,8 $\pm$ 10,0 <sup>b,1</sup>	26,9 $\pm$ 10,4 <sup>a,1</sup>	29,1 $\pm$ 9,8 <sup>b,1</sup>
	T30	29,4 $\pm$ 11,5 <sup>a,2</sup>	31,2 $\pm$ 11,6 <sup>b</sup>	27,1 $\pm$ 10,4 <sup>a,2</sup>	30,9 $\pm$ 11,7 <sup>b</sup>	27,7 $\pm$ 9,2 <sup>a,2</sup>	30,1 $\pm$ 9,3 <sup>b,2</sup>	27,5 $\pm$ 9,6 <sup>a,2</sup>	30,1 $\pm$ 10,3 <sup>b,2</sup>	28,4 $\pm$ 11,4 <sup>a,2</sup>	27,6 $\pm$ 9,2 <sup>b,2</sup>

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B u jednoho hřebce (P < 0,05)

<sup>1,2</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi časy T0 a T30 u jednotlivých parametrů (P < 0,05)

Tab. 13: Hodnoty ALH, BCF, LIN, STR, WOB, VAP, VCL a VSL ihned po rozmrazení (T0) a po třiceti minutách inkubace (T30) bez přidavku semenné plazmy (K) s přidavkem semenné plazmy hřebce s průměrně mrazitelným ejakulátem (SP) a s přidavkem semenné plazmy hřebce s nadprůměrně dobře mrazitelným ejakulátem (S) u dávek mrazených s ředidlem L-EDTA (A) a INRA82 (B).

			A	B
ALH ( $\mu\text{m}$ )	K	T0	$0,2 \pm 0,5^{a,1,I}$	$0,2 \pm 0,5^{b,1,II}$
		T30	$0,2 \pm 0,4^{a,\alpha,II}$	$0,2 \pm 0,3^{b,\alpha,II}$
	SP	T0	$0,2 \pm 0,5^{a,1,I}$	$0,3 \pm 0,7^{b,2,I}$
		T30	$0,2 \pm 0,4^{a,\beta,II}$	$0,3 \pm 0,7^{b,\beta,II}$
	S	T0	$0,2 \pm 0,4^{a,2,I}$	$0,3 \pm 0,8^{b,3,I}$
		T30	$0,2 \pm 0,3^{a,\gamma,II}$	$0,2 \pm 0,4^{b,\gamma,II}$
BCF (Hz)	K	T0	$6,5 \pm 3,1^{a,1,I}$	$7,0 \pm 3,3^{b,1,I}$
		T30	$6,7 \pm 3,3^{a,II}$	$6,7 \pm 3,3^{a,II}$
	SP	T0	$6,8 \pm 3,6^{a,2,I}$	$8,1 \pm 4,2^{b,2,I}$
		T30	$6,9 \pm 3,4^{a,\beta,II}$	$8,5 \pm 4,7^{b,\beta,II}$
	S	T0	$6,8 \pm 3,3^{a,2,I}$	$7,9 \pm 4,6^{b,3,I}$
		T30	$7,0 \pm 3,4^{a,\beta,II}$	$7,2 \pm 3,5^{b,\gamma,II}$
LIN (%)	K	T0	$11,0 \pm 10,3^{a,1,I}$	$13,0 \pm 10,1^{b,1,I}$
		T30	$11,3 \pm 10,0^{a,\alpha,II}$	$11,8 \pm 9,2^{b,\alpha,II}$
	SP	T0	$13,1 \pm 12,0^{a,2,I}$	$19,8 \pm 15,6^{b,2}$
		T30	$13,9 \pm 12,3^{a,\beta,II}$	$20,2 \pm 16,3^{b,\beta}$
	S	T0	$12,5 \pm 10,5^{a,3,I}$	$16,9 \pm 15,0^{b,3,I}$
		T30	$12,8 \pm 10,7^{a,\gamma,II}$	$13,7 \pm 10,5^{b,\gamma,II}$
STR (%)	K	T0	$37,1 \pm 22,6^{a,1}$	$41,3 \pm 22,4^{b,1}$
		T30	$37,4 \pm 22,4^{a,\alpha}$	$38,8 \pm 21,7^{b,\alpha}$
	SP	T0	$41,3 \pm 24,6^{a,2,I}$	$54,2 \pm 26,8^{b,2}$
		T30	$43,3 \pm 25,4^{a,\beta,II}$	$53,5 \pm 27,6^{b,\beta}$
	S	T0	$40,8 \pm 22,9^{a,2}$	$47,6 \pm 25,1^{b,3}$
		T30	$41,0 \pm 23,1^{a,\gamma}$	$42,7 \pm 22,5^{b,\gamma}$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	K	T0	$1,4 \pm 5^{1,I}$	$1,6 \pm 5,3^{1,I}$
		T30	$1,1 \pm 3,2^{a,\alpha,II}$	$1,0 \pm 2,3^{b,\alpha,II}$
	SP	T0	$1,7 \pm 5,4^{a,2,I}$	$2,7 \pm 9,0^{b,2,I}$
		T30	$1,3 \pm 3,4^{a,\beta,II}$	$2,4 \pm 10,9^{b,\beta,II}$
	S	T0	$1,4 \pm 3,4^{a,1,I}$	$3,1 \pm 10,6^{b,3,I}$
		T30	$1,1 \pm 2,1^{a,\alpha,II}$	$1,7 \pm 5,3^{b,\gamma,II}$
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	K	T0	$5,0 \pm 12,2^{1,I}$	$4,9 \pm 11,8^{1,I}$
		T30	$4,1 \pm 8,2^{a,\alpha,II}$	$3,7 \pm 6,0^{b,\alpha,II}$
	SP	T0	$5,7 \pm 13,6^{a,2,I}$	$7,4 \pm 18,2^{b,2,I}$
		T30	$4,7 \pm 9,1^{a,\beta,II}$	$8,4 \pm 20,2^{b,\beta,II}$
	S	T0	$4,7 \pm 8,0^{a,3,I}$	$7,9 \pm 20,4^{b,2,I}$
		T30	$4,0 \pm 5,9^{a,\gamma,II}$	$5,3 \pm 11,3^{b,\gamma,II}$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	K	T0	$0,7 \pm 3,8^{a,1,I}$	$0,9 \pm 4,6^{b,1,I}$
		T30	$0,5 \pm 1,9^{a,II}$	$0,5 \pm 2,0^{a,II}$
	SP	T0	$1,0 \pm 4,3^{a,2,I}$	$2,0 \pm 8,3^{b,2,I}$
		T30	$0,7 \pm 2,6^{a,\beta,II}$	$2,6 \pm 9,7^{b,\beta,II}$



	S	T0	$0,7 \pm 3,0^{a,1,I}$	$2,3 \pm 10,0^{b,3,I}$
		T30	$0,5 \pm 1,5^{a,\gamma,II}$	$1,0 \pm 4,8^{b,\gamma,II}$
WOB (%)	K	T0	$26,1 \pm 10,3^{a,1,I}$	$29,0 \pm 9,3^{b,1,I}$
		T30	$27,1 \pm 10,5^{a,\alpha,II}$	$28,1 \pm 9,0^{b,\alpha,II}$
	SP	T0	$27,8 \pm 11,1^{a,2}$	$32,6 \pm 12,8^{b,2,I}$
		T30	$28,0 \pm 10,9^{a,\beta}$	$33,2 \pm 13,1^{b,\beta,II}$
	S	T0	$27,9 \pm 10,1^{a,2,I}$	$31,6 \pm 12,7^{b,3,I}$
		T30	$28,2 \pm 9,9^{a,\beta,II}$	$29,6 \pm 9,5^{b,\gamma,II}$
			A	B

<sup>a,b</sup> statisticky průkazný rozdíl v řádku mezi ředidly A a B ( $P < 0,05$ )

<sup>1,2,3</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi dvěma ředidly v čase T0 ( $P < 0,05$ )

<sup>I, II</sup> statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi T0 a T30 v rámci jednoho ředidla K, SP, S u jednoho parametru ( $P < 0,05$ ).

<sup>$\alpha,\beta,\gamma$</sup>  statisticky průkazný rozdíl ve sloupci mezi dvěma ředidly v čase T30 ( $P < 0,05$ ).