

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Kvalita ejakulátu hřebců působících
v inseminaci**

Ing. Jana Vokrouhliková

České Budějovice

2022

Vypracovala:

Ing. Jana Vokrouhliková

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Speciální zootechnika

Školitel:

doc. Ing. Jan Beran, Ph.D.

Katedra zootechnických věd

Zemědělská fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Jana Vokrouhliková

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto poděkovat doc. Ing. Miroslavu Maršálkovi, CSc. a doc. Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za odborné připomínky, pomoc a ochotu při vypracování předložené disertační práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Jiřímu Ptáčkovi ze ZH Písek za projevenou ochotu a umožnění realizace této práce. Velký dík patří také Mgr. Veronice Čoudkové za odbornou pomoc a spolupráci. Největší dík patří celé mé rodině za podporu v průběhu celého studia

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo pomocí Sperm Class Analyzer systému (SCA, MICROPTIC SL) stanovit semenné charakteristiky teplokrevných hřebců, posoudit vztah mezi parametry motility spermií a rozměry hlaviček spermií (experiment 1) a porovnat ochranný účinek tří mléčných ředidel na chlazené sperma (experiment 2).

V experimentu 1 bylo od 10 klinicky zdravých a plodných hřebců (věk 3 až 22 let) odebráno 32 vzorků ejakulátu během připouštěcí sezóny 2016 a 36 vzorků ejakulátu během připouštěcí sezóny 2017. U odebraných vzorků byl sledován objem ejakulátu (ml), koncentrace spermií (M/ml), motilita spermií s jednotlivými kinematickými parametry, životaschopnost (%) a morfologie spermií s morfometrickými parametry.

V experimentu 2 bylo před začátkem připouštěcí sezóny 2018 odebráno celkem 21 ejakulátů od 11 hřebců. K ředění byla využita ředidla Kenney, EquiPlus a INRA 96. U 63 vzorků ejakulátu byla hodnocena životaschopnost spermií (VIT, %), celková motilita (MOT, %), progresivní motilita (PMOT, %) a vybrané kinematické parametry. Tyto parametry byly stanoveny 2 hodiny po zpracování spermatu a poté po 24, 48 a 72 hodinách skladování při 5 °C.

U získaných vzorků ejakulátu byly za sledovaná období připouštěcích sezón 2016 a 2017 zjištěny následující průměrné hodnoty - objem ejakulátu 49,22 a 56,77 ml, koncentrace spermií 208,20 a 222,19 M/ml, MOT 82,44 a 81,38 %, PMOT 37,34 a 35,46 %, VIT 60,71 a 42,91 %, morfologicky normální spermie 75,00 a 64,50 %, rychlost na křivočaré dráze (VCL) 62,67 a 60,26 $\mu\text{m/s}$, přímočará rychlost (VSL) 32,10 a 27,55 $\mu\text{m/s}$, průměrná rychlost (VAP) 48,14 a 44,35 $\mu\text{m/s}$, linearita křivočaré dráhy (LIN) 50,64 a 44,89 %, linearita průměrné dráhy (STR) 66,56 a 62,01 %, míra kmitání skutečné dráhy kolem průměrné dráhy (WOB) 75,74 a 72,12 %, amplituda bočního posunu hlavičky po její průměrné dráze (ALH) 2,59 a 2,90 μm , frekvence bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy (BCF) 7,32 a 7,49 Hz, délka hlavičky (L) 6,33 a 6,41 μm , maximální šířka hlavičky (W) 3,01 a 3,11 μm , plocha hlavičky (A) 15,65 a 16,37 μm^2 , obvod hlavičky (P) 16,26 a 16,55 μm , prodloužení (Elong) 0,36 a 0,35, eliptičnost (Elip) 2,11 a 2,07, drsnost (Rugo) 0,74 a 0,75 a pravidelnost (Regu) 0,96.

Byl prokázán významný vliv hřebce ve všech hodnocených parametrech. Dále byl u sledovaných parametrů prokázán také vliv věku a fertility hřebců.

Byla zjištěna významná pozitivní korelace MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN a WOB s plochou, šířkou, délkou a obvodem hlavičky a významná negativní korelace těchto parametrů s prodloužením a eliptičností hlavičky spermie. Spermie s většími rozměry hlaviček tak měly větší MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB, STR a menší ALH a BCF. Naopak nižší motilitu a kinematické parametry měly spermie s větším prodloužením a eliptičností.

Byl prokázán významný vliv ředidla ($P < 0,05$) a doby skladování spermatu ($P < 0,001$) na hodnocené parametry. Průměrný ochranný účinek ředidla INRA 96 byl významně lepší po celou dobu skladování u všech sledovaných parametrů než u ředidla Kenney ($P < 0,01$) a než u EquiPlus ($P < 0,05$) u hodnot PMOT, VCL a VAP. Výsledky, dosažené s ředidlem INRA 96 ukázaly, že kvalita chlazeného spermatu může být dostatečně udržena nejméně během prvních 24 hodin skladování.

Klíčová slova: hřebec, ejakulát, CASA, hodnocení spermatu, chlazené sperma, ředidlo, motilita spermií

ABSTRACT

The main objective of the study was to determine the seminal characteristics of warmblooded stallions, to assess a relationship between motility parameters of spermatozoa and sperm head dimensions (Experiment 1) and to compare the ability of three milk-based extenders to preserve the motility and viability of cooled shipped semen (Experiment 2) using Sperm Class Analyzer (SCA, MICROPTIC SL).

In Experiment 1, 32 and 36 ejaculates were collected during breeding seasons 2016 and 2017 from 10 clinically healthy and fertile warmblooded stallions (age 3–22 years). The volume of ejaculate (mL), sperm concentration (M/mL), motility of sperm with kinematic parameters, viability of sperm (%) and sperm morphometry with morphometric parameters were evaluated.

In Experiment 2, 21 ejaculates from 11 stallions were collected before the beginning of the breeding season 2018 and diluted with Kenney, EquiPlus and INRA 96. Spermatozoa viability (VIT, %), total motility (MOT, %), progressive motility (PMOT, %) and selected kinematic parameters were evaluated for 63 semen samples. These parameters were determined 2 hours after semen processing and then in 24, 48 and 72-hour intervals of storage at 5 °C.

The following average values were found in the obtained ejaculate samples for the observed periods of the breeding seasons 2016 and 2017 – volume of ejaculate 49.22 and 56.77 ml, sperm concentration 208.20 and 222.19 M/ml, MOT 82.44 and 81.38 %, PMOT 37.34 and 35.46 %, VIT 60.71 and 42.91 %, morphologically normal sperm 75.00 and 64.50 %, curvilinear velocity (VCL) 62.67 and 60.26 $\mu\text{m/s}$, straight-line velocity (VSL) 32.10 and 27.55 $\mu\text{m/s}$, average path velocity (VAP) 48.14 and 44.35 $\mu\text{m/s}$, linearity coefficient (LIN) 50.64 and 44.89 %, straightness coefficient (STR) 66.56 and 62.01 %, wobble coefficient (WOB) 75.74 and 72.12 %, amplitude of lateral head displacement (ALH) 2.59 and 2.90 μm , beat-cross frequency (BCF) 7.32 and 7.49 Hz, head length (L) 6.33 and 6.41 μm , head maximum width (W) 3.01 and 3.11 μm , head area (A) 15.65 and 16.37 μm^2 , head perimeter (P) 16.26 and 16.55 μm , elongation (Elong) 0.36 and 0.35, ellipticity (Ellip) 2.11 and 2.07, roughness (Rugo) 0.74 and 0.75 and regularity (Regu) 0.96.

There were significant differences among stallions in all evaluated parameters of sperm ($P < 0.05$). Furthermore, the influence of age and fertility of stallions was also demonstrated for the observed parameters.

MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN and WOB were positively correlated with area, width, length and perimeter of the head and negatively correlated with elongation and ellipticity of the sperm head. Sperms with larger head dimensions thus had larger MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB, STR and smaller ALH and BCF. In contrast, sperms with greater elongation and ellipticity had lower motility and kinematic parameters.

The effect of the extender ($P < 0.05$) and the storage time ($P < 0.001$) was highly significant for evaluated parameters. The ejaculates extended with INRA 96 reached significantly higher values ($P < 0.01$) for all evaluated parameters compared to Kenney extender. The INRA 96 extender significantly increased the values of PMOT, VCL and VAP compared to EquiPlus ($P < 0.05$). The results obtained from using INRA 96 showed that quality of cooled semen can be sufficiently maintained during at least 24 hours of storage.

Keywords: stallion, ejaculate, CASA, cooled semen, extender, sperm motility

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
2.1 Plodnost hřebců.....	12
2.2 Ejakulát hřebce.....	17
2.3 Spermatogeneze	18
2.4 Odběr spermatu od hřebců	19
2.5 Hodnocení ejakulátu.....	23
2.5.1 Barva, konzistence a pach ejakulátu.....	24
2.5.2 Objem ejakulátu.....	25
2.5.3 Koncentrace spermií.....	26
2.5.4 Motilita spermií.....	28
2.5.5 Koncentrace vodíkových iontů.....	32
2.5.6 Integrita plazmatické membrány spermií.....	33
2.5.7 Morfologické vyšetření spermií.....	34
2.6 Morfometrická analýza spermií.....	38
2.7 Ředění a konzervace ejakulátu	42
3. HYPOTÉZA.....	47
4. CÍL PRÁCE	48
5. MATERIÁL A METODIKA.....	49
5.1 Materiál	49
5.2 Metodika	49
5.3 Zpracování dat.....	53
6. VÝSLEDKY A DISKUZE	55
6.1 Hodnocení základních charakteristik ejakulátu hřebců metodou CASA.....	55
6.2 Posouzení morfometrických parametrů hlaviček spermií.....	58
6.3 Posouzení pohybových charakteristik spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček	60
6.4 Vliv vybraných ředidel na motilitu a životaschopnost spermií.....	73
7. ZÁVĚR	82
8. SOUHRN A DOPORUČENÍ PRO PRAXI.....	86
9. SEZNAM LITERATURY	87

1. ÚVOD

V posledních několika letech je do České republiky dováženo mnoho zahraničních hřebců, kteří by zde měli působit jako zlepšovatelé a postupně pozdvihnout kvalitu našeho chovu na evropskou úroveň. Jednou z možností, jak přispět k produkci kvalitních koní se stala umělá inseminace, která se řadí mezi moderní biotechnologické metody, využívané v reprodukci a šlechtění koní. V dnešní době se inseminace stala nedílnou součástí plemenářské práce v chovu koní, kde se využívá imigrace genů a zvýšení genetického pokroku v chovu špičkových sportovních koní. Umělá inseminace má u koní, stejně jako u jiných hospodářských zvířat, velký význam především z hlediska zlepšení odhadu plemenné hodnoty. Díky umělé inseminaci může plemeník pomocí inseminačních dávek oplodnit mnohonásobně více klisen, než při přirozené plemenitbě, a tím lze získat více potomků od jednoho hřebce a urychlit tak odhad jeho plemenné hodnoty.

Výběr plemenných hřebců ovšem nelze zaměřovat pouze na jejich sportovní výkonnost nebo na jejich původ. Důvodem je skutečnost, že i vysoce kvalitní plemeník nemusí být schopen produkovat dostatečné množství kvalitního ejakulátu. Proto by jedním z hlavních určujících prvků pro zařazení hřebce do plemenitby měla být kvalita jeho ejakulátu, která je jedním z ukazatelů reprodukční výkonnosti. Získání co nejkvalitnějšího ejakulátu od hřebců má velký význam vzhledem k širokému uplatnění umělé inseminace v chovu koní v ČR a průměrným výsledkům plodnosti klisen.

Při umělé inseminaci je ejakulát po odběru podroben laboratornímu vyšetření, díky kterému lze stanovit reprodukční schopnost plemeníka a kontrolovat tak stav jeho pohlavních orgánů a produkci spermatu. Pro odběry spermatu a výrobu inseminačních dávek je potřebné vybrat hřebce, kteří produkují dostatečné množství ejakulátu dobré kvality. Hřebci využívaní v inseminaci musí mít výbornou reprodukční výkonnost.

Na kvalitním ejakulátu závisí úspěšnost inseminace a zabřeznutí klisny, proto musí získaný ejakulát splňovat požadované parametry. Analýza ejakulátu je v současné době nejvíce používaným postupem pro hodnocení plodnosti samců. Jelikož plodnost patří mezi vlastnosti s nízkou dědivostí, je ve větší míře ovlivněna komplexem prostředí. Především u umělé inseminace je proto významná činnost chovatele, zahrnující management chovu, vlastní odběr ejakulátu a jeho následné

zpracování a konzervaci pro použití k umělé inseminaci. Kvalita ejakulátu tedy závisí na mnoha vnějších i vnitřních faktorech, jako jsou například plemenná příslušnost a věk hřebce, kvalita ustájení a výživy, sportovní využití plemníka, aktuální zdravotní stav a psychická pohoda. Při použití umělé inseminace je velmi významným vlivem také výběr vhodného ředidla, pro zachování co nejlepší oplozovací schopnosti odebraného ejakulátu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 PLODNOST HŘEBCŮ

Plodnost hřebců je ekonomicky důležitou vlastností, která je v malé míře dána geneticky a ve větší míře ovlivněna komplexem prostředí (**Giesecke et al., 2010**). Faktory prostředí, jako je klima, výživa a management chovu mají významný vliv na fyziologii organismu a tím i na jeho plodnost. Mezi tyto faktory patří například extrémní klimatické výkyvy, dlouhá doba přepravy nebo nevybalancovaná krmná dávka (**Parisi et al., 2014**). Klimatické faktory (teplo, chlad, vítr, vlhkost) mohou mít vliv na počet spermií, morfologii, fyziologii a další (**Fuerst-Waltl et al., 2006**).

Nezbytně důležitou součástí optimální reprodukční schopnosti je správná funkce endokrinního systému, respektive řízení produkce spermií a jejich zrání (**Parisi et al., 2014**). **Gilbert et al. (2012)** uvádí, že například koncentrace FSH (folikuly stimulujícího hormonu) a inhibinu v organismu jsou nezbytné pro produkci a životaschopnost spermií.

2.2 EJAKULÁT HŘEBCE

Parametry ejakulátu vypovídají o potenciální oplozovací schopnosti inseminační dávky, tudíž i o samotné plodnosti hřebce. Parametry ejakulátu vychází z biologie spermie a jejího fungování.

Spermie

Spermie jsou vysoce diferencované a polarizované buňky. Tvoří nejdůležitější složku ejakulátu, protože jsou nositeli zárodečné hmoty a kyseliny deoxyribonukleové jako genetické informace (**Gamčík, Kozumplík et al., 1992**). Každý savčí druh je specifický svými proteiny, umístěnými na povrchu spermie, které se podílejí na oplození oocyty, dále jsou známy rozdílné velikosti a tvary spermií, umožňující pohyb a penetraci skrz extracelulární vrstvu chránící oocyt (**Vieira et Miller, 2006**). Délka celé spermie je u hřebců 57,5 až 59,7 μm (**Věžník et al., 2004**). **Pesch et Bergmann (2006)** uvádí délku spermie hřebce přibližně 60 μm .

Spermie se skládá z hlavičky a bičíku (**Pesch et Bergmann, 2006**). Pro každého samce je tvar hlavičky spermií relativně konstantní a pravděpodobně je geneticky kódován. Hlavička spermie představuje útvar složený z několika strukturálních i funkčních částí (**Věžník et al., 2004**). Hlavička spermie je tvořena

akrozomem, postakrozomální laminou a jádrem. Jádro tvoří větší část hlavičky spermie a obsahuje genetický materiál ve formě vysoce kondenzované DNA. Jádro je obklopeno dvojitou jadernou membránou. První dvě třetiny jádra jsou překryty akrozomem, který obsahuje hydrolytické enzymy, nezbytné pro penetraci spermie do oocyту (**Brito, 2007; Hofírek et al., 2009**). U hřebce pokrývá akrozom 60 % dlouhé osy hlavičky spermie (**Věžník et al., 2004**). Zbývající část jádra je pokryta postakrozomální laminou, která je složena z charakteristicky těsných lamel s vysokou hustotou elektronů a pokrývá kaudální část jádra a kaudální prstenc. Bazální část hlavičky, která se též označuje jako postnukleární čepička, má vykrojení, označované jako implantační jamka (nebo také implantační rýha). Do implantační jamky zapadá rozšířená část bičíku, krček, označovaný jako implantační talíř, tvořený segmentovanými chordami. Hranice mezi hlavičkou a krčkem je jasně vymezena kaudálním prstencem a odpovídá místu připojení plazmolemy k jadernému obalu na bazální části hlavičky (**Brito, 2007; Hofírek et al., 2009**).

U většiny hřebčích spermii je implantační jamka excentrické polohy vzhledem k šířce buňky, tudíž spermie s abaxiálním bičíkem nejsou považovány za abnormální (**Pesch et Bergmann, 2006**).

Bičík představuje pohybové ústrojí spermie, je spojen s hlavičkou krčkem (centriolovou částí) a skládá se ze spojovací části, hlavní části a koncové (terminální) části (**Jelínek, Koudela et al., 2003; Pesch et Bergmann, 2006**). Krček spermie je krátký spojovací segment mezi hlavičkou a bičíkem. Krček je v přední části připojen k bazální části hlavičky a v zadní části k vnějším hustým vláknům (fibrilám) bičíku (**Pesch et Bergmann, 2006**). Krček (hlavice bičíku) je vytvořen z proximálního centriolu, který dá vznik implantační ploténce a z přední části distálního centriolu, který dá základ tvorby bičíku. Vzniklá segmentovaná chorda svým tvarem představuje rozšířenou hlavici bičíku. Svým zúžením, které vystupuje z implantační jamky, se pevně přikládá k hladkým chordám. Je jich 9, obdobně jako filament centriolového válce, a tvoří chordový obal komplexu osových vláken.

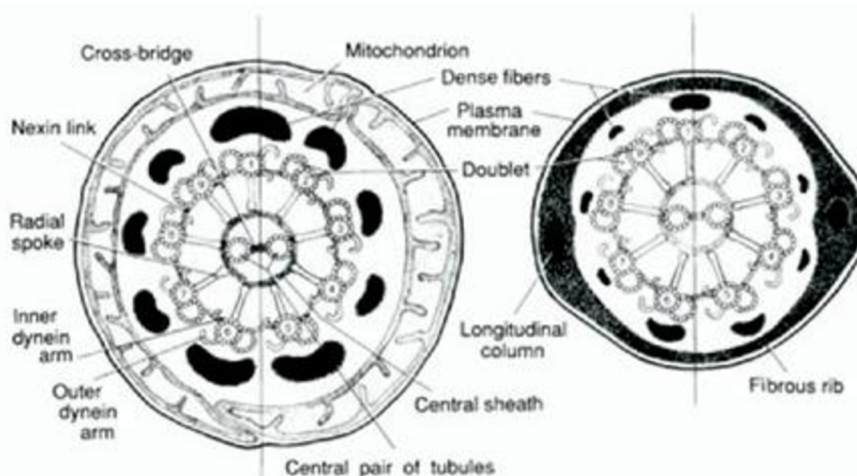
Celým bičíkem prochází axonema. Axonema nebo soubor osových vláken je tvořena centrálním párem mikrotubulů, kolem něhož je uspořádáno 9 párů vláken, označovaných za dublety. Toto uspořádání mikrotubulů je označováno jako struktura 9+2. Každý dublet se skládá z podjednotky A (plné vlákno) a podjednotky B (tvořena neúplně připojeným mikrotubulem ve tvaru písmene C). Obě tyto

podjednotky jsou ve vzájemném kontaktu, z každé podjednotky A vystupují dvě krátká styčná ramena, směřující k elementu B dalšího (sousedního) dubletu (obrázek 1). Raménka tvoří peptidy (dynein) s ATP aktivitou a takto uvolněná energie je transformována do bílkovin kontraktálních vláken. V průběhu tohoto procesu dochází k prodlužování a zkracování molekulárního uspořádání těchto bílkovin, čímž dochází k přenosům prostorových sil a pohybu bičíku (**Brito, 2007; Věžník et al., 2004**).

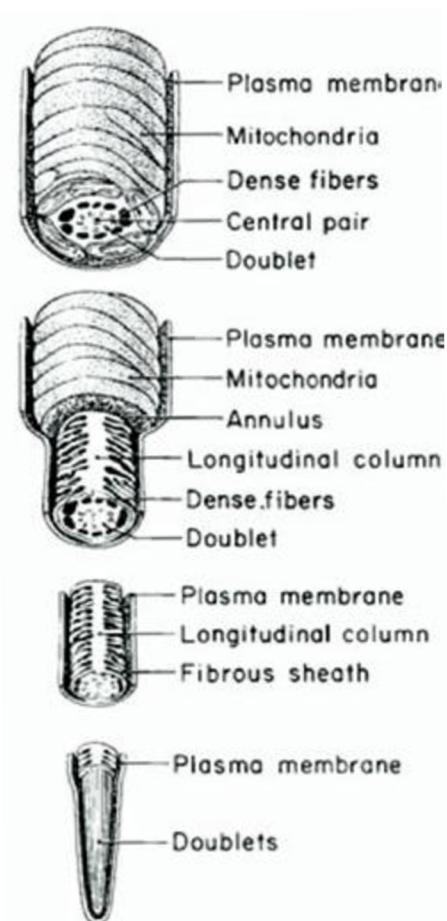
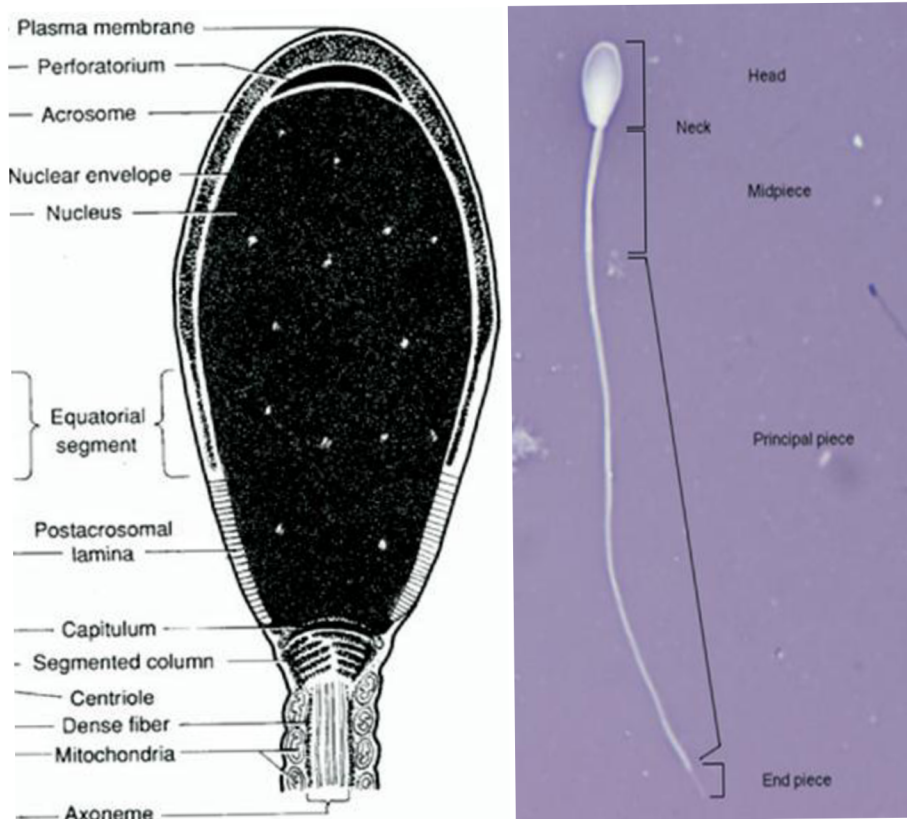
Každý mikrotubulový dublet axonem je obklopen jedním z devíti vnějších hustých vláken. Všechna vlákna jsou nejsilnější v proximální části spojovací části a postupně se zužují směrem ke konci hlavní části a nejsou již přítomné v koncové části bičíku. Ve spojovací části bičíku jsou vnější hustá vlákna obklopena mitochondriemi uspořádanými konci k sobě v nepřetržité dvojité spirále (**Brito, 2007**). Spojovací (mitochondriální) část bičíku je tedy tvořena axonem, obklopenou vnějšími hustými vlákny, a mitochondriálním pouzdem. Mitochondrie jsou zodpovědné za aerobní fungování spermie (**Tanaka et Baba, 2005**). Hlavní funkcí mitochondrií je produkce ATP, ale vstupují také do mnoha fyziologických procesů. Mitochondrie jsou považovány za nejdůležitější orgány pro hodnocení kvality spermií, mají výrazný vliv na funkce spermie, změny v mitochondriální struktuře spermií ovlivňují motilitu spermie (**Piomboni et al., 2012**) a mohou mít vliv na schopnost spermie oplodnit oocyt (**Le Guillou et al., 2013**). Obsahují vlastní DNA a membránový potenciál, který může být snadno zkoumán in vitro pomocí integrity DNA spermií a pomocí hodnocení motility (**Carra et al., 2004**). Na kaudálním konci mitochondriálního pouzdra je prstencový trojboký útvar, tzv. Jensenův prstenec, který přesně vymezuje konec spojovací části bičíku a připisuje se druhé části rozděleného distálního centriolu. Hlavní část je dlouhá přibližně 30 až 44 μm a je nejdelší částí bičíku (**Pesch et Bergmann, 2006**). V porovnání s mitochondriální částí je hlavní část bičíku tenčí. Jejím podkladem je komplex osových vláken (**Věžník et al., 2004**). Specifickým rysem hlavní části bičíku je její ohraničení fibrózní pochvou z proteinového materiálu, která je tvořena ze dvou longitudinálních sloupců (dorzální a ventrální sloupec) probíhajících paralelně s osovými vlákny. Z těchto sloupců vybíhá oběma směry řada ramen obepínajících osová vlákna a hladké chordy (specifická soustava husté cytoskeletální formace, která zajišťuje pohyb vpřed). Hustá vlákna a fibrózní pochva nejsou kontraktní, ale poskytují strukturální podporu a flexibilitu nezbytnou pro efektivní přenos klouzavého pohybu dubletů axonem do pohybů bičíku. Fibrózní pochva je tedy

nejen útvarem strukturálně podporujícím skladbu bičíku, ale svou tvarovou pamětí napomáhá pružnosti bičíku při jeho kmitavém a rotačním pohybu. Fibrózní pochva končí několik mikrometrů od konce bičíku, kde hlavní část přechází do koncové části. Koncová část je krátký, koncový segment bičíku, obsahující pouze axonemu (je tvořena pouze osovým vláknem bez chord a fibrózní pochvy (**Brito, 2007; Věžník et al., 2004**)).

Celý povrch spermie pokrývá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která se skládá převážně z lipidů a proteinů (**Hofírek et al., 2009**). Lipidové složení membrány spermie dodává potřebnou flexibilitu pro buňku, reguluje její buněčné funkce (spermatogeneze, kapacitace) (**Sanocka et Kurpisz, 2004**). Zatímco fosfolipidy představují stavební komponenty plazmatické membrány, proteiny plní její specifické funkce. Transmembránové proteiny slouží jako iontové kanály a přenašeče, účastní se selektivního přenosu molekul skrz membránu a dále regulačních a signálních procesů. Periferní proteiny slouží zejména při oplození (**Tapia et al., 2012**). Integrita cytoplazmatické membrány je podmínkou rezistence buněk. Membrána bičíku má odlišnou antigenní strukturu od membrány hlavičky spermie. Zatímco hlavička spermie má plazmatickou membránu původní spermatidy, bičík po penetraci a jeho morfologickém dotváření má povrchovou membránu nově vytvořenou (**Věžník et al., 2004**).



Obrázek 1 Anatomické uspořádání bičíku spermie – příčný průřez (**Brito, 2007**)



Obrázek 2 Anatomie spermie (Brito, 2007)

Semenná plazma

Je tekutina druhově specifického množství a barvy, rozdílného pH a konzistence. Představuje přirozené prostředí pro spermie, umožňuje jejich výživu a transport v pohlavních orgánech samice. Má relativně stálý osmotický tlak a vyznačuje se velkými pufracími schopnostmi (**Jelínek, Koudela et al., 2003**). Obecně je semenná plazma považována za médium, které umožňuje přežití spermií a usnadňuje jejich transport (**Juyena et Stelletta, 2012**).

Při ejakulaci jsou spermie z ocasu nadvarlete promíseny s tekutinou, která je produkována přídatnými pohlavními žlázami (Cowperovy žlázy, bulbouretrální žlázy a prostata) (**Gibbons et al., 2005**). Semenná plazma tedy obsahuje velké množství molekul produkovaných především přídatnými pohlavními žlázami (**Poiani, 2006**). V malém množství se na jejím složení podílí i tekutina, která má svůj původ ve varleti, nadvarleti, chámovodu a v močové trubici. U hřebce tvoří semenná plazma 95-98 % ejakulátu a představuje tak hlavní podíl ejakulátu (**Marvan et al., 1998**).

Semenná plazma je tvořena ionty (Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl_2), energetickými substráty (fruktóza, sorbitol, glycerylphosphocholin), organickými sloučeninami (kyselina citronová, aminokyseliny, peptidy, proteiny s nízkou a vysokou molekulární hmotností, lipidy, hormony – testosteron, estrogen, prostaglandiny) a dusíkatými komponenty (amoniak, močovina, kyselina močová, kreatin a redukující látky – kyselina askorbová, hypotaurin). Chemické složení semenné plazmy a funkce přídatných pohlavních žláz se liší jak v rámci druhu, tak i mezi ejakuláty jednoho samce. Rozdíly v koncentracích některých komponent v semenné plazmě mohou být způsobeny výživou, managementem chovu, působením enzymů přítomných v plazmě a metabolickou aktivitou spermií rozptýlených v semenné plazmě (**Vieira et Miller, 2006**). Po smíchání spermií s výměškou přídatných pohlavních žláz jsou spermie vystaveny novému prostředí s komplexní směsí nových proteinů. Obecně je známo, že semenná plazma stabilizuje membránu spermií obklopením jejího povrchu. Proteiny semenné plazmy tvoří ochrannou vrstvu spermií s dekapacitačními faktory, které inhibují oplozovací schopnost ejakulované spermií, to umožňuje spermiím zachovat si oplozovací schopnost při průchodu samičím pohlavním traktem, tedy skrz prostředí, které je pro spermie nepříznivé (**Gibbons et al., 2005, Juyena et Stelletta, 2012**).

2.3 SPERMATOGENEZE

Spermie se tvoří po dosažení pohlavní dospělosti v semenotvorných kanálcích varlete a celý proces jejich tvorby je označován jako spermatogeneze (**Marvan et al., 1998**). Proces spermatogeneze se uskutečňuje v pravidelných cyklech a probíhá kontinuálně v průběhu celého reprodukčního období života. V počáteční etapě nemá spermatogeneze ještě pravidelný cyklický charakter, výsledkem je pak vyšší obsah nezralých forem spermií v ejakulátu. Pravidelné cykly následují za sebou v přesných časových intervalech, přičemž každý cyklus začíná o čtvrtinu délky cyklu později než cyklus předcházející. Délka spermatogenního cyklu je druhově rozdílná, u hřebce se pohybuje kolem 54 dní. Dle převažujícího charakteru změn se proces spermatogeneze dělí na dvě vývojové fáze, a to období spermatocytogeneze a období spermatohistogeneze (**Jelínek, Koudela et al., 2003; Věžník et al., 2004**).

Spermatocytogeneze se dále člení na období rozmnožování (stádium mitózy), období růstu a období zrání (stádium meiózy). Stádium mitózy je charakteristické opakovaným mitotickým dělením původních kmenových buněk A-spermatogonií. Každá mateřská buňka A-spermatogonie se rozdělí na dvě nestejně velké dceřiné buňky – jednu větší a podobnou mateřské buňce, která zůstává po delší dobu v latentním stádiu (tzv. interfáze) a druhou, menší intermediární buňku, která se opět několikrát dělí a výsledkem jsou B-spermatogonie. V závěru rozmnožovací fáze se B-spermatogonie rozdělí na spermatocyty I. řádu, neboli tzv. primární spermatocyty, které poté vstupují do období růstu a v tomto stádiu pouze zvětšují svůj objem v důsledku zmnožení zásobních látek v cytoplazmě (**Jelínek, Koudela et al., 2003; Marvan et al., 1998**). Stádium meiózy je charakterizováno dvěma po sobě následujícími děleními, jejichž výsledkem je redukce počtu chromozomů na polovinu. V prvním meiotickém dělení vznikají dva spermatocyty II. řádu. Druhým meiotickým dělením pak vznikají čtyři spermatidy, které jsou charakteristické přítomností vždy jen jednoho sexchromozomu (X nebo Y) (**Jelínek, Koudela et al., 2003**).

K mnoha charakteristickým změnám dochází v průběhu spermatohistogeneze, kdy je dokončeno druhé meiotické dělení spermatocytů a formuje se spermatida jako podlouhlá buňka tvaru spermie. Dále je z Golgiho aparátu formován akrozom, který u zralé spermie překrývá apikální část protáhlého jádra spermie, obsahuje matrix pro enzymy nutné k dosažení povrchu oocyty a průniku skrz kumulární vrstvu

oocyty a zonu pellucidu (hyaluronidázu a akroziny) (**Hofírek et al., 2009; Gadella, 2008**). Oba buněčné centrioly se přesouvají k zadnímu pólu hlavičky a dávají vznik krčku a osovému vláknu bičíku spermie. Takto metamorfované spermie se uvolňují z výběžků podpůrných buněk a dostávají se do lumen semenotvorných kanálků a do vývodných cest (**Jelínek, Koudela et al., 2003**). Před tím, než se spermie odpoutá od lumen Sertoliho buněk, zbavuje se množství nepotřebných organel (Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum, lysozomy, peroxizomy a ribozomy), které nejsou nezbytně nutné pro oplodnění oocyty (**Gadella, 2008**).

Když volné spermie migrují ze semenotvorných kanálků přes rete testis do vývodu nadvarlete v hlavě nadvarlete, mají již svůj typický tvar s hlavičkou obsahující jádro s vysoce kondenzovaným chromatinem, který obsahuje haploidní genom a specifické sekreční organely a vysoce specializovaný bičík. V důsledku událostí, které proběhly na povrchu spermie, došlo ke změnám některých metabolických procesů, což mělo vliv na vlastnosti pohybu spermií (v hlavě nadvarlete jsou spermie nepohyblivé). V ocasu nadvarlete na svůj povrch přitahují množství proteinů, které se následně podílejí na oplození (**Sullivan et Saez, 2013**).

2.4 ODBĚR SPERMATU OD HŘEBCŮ

Efektivní odběr vysoce kvalitního spermatu je v programech umělé inseminace velmi důležitý. Samotný proces odběru ejakulátu může být příčinou špatné plodnosti nebo podřadné kvality ejakulátu (**Hurtgen, 2009**). K maximalizaci kvality čerstvého ejakulátu je velmi důležité, aby hřebci byli sexuálně aktivní (**Sieme et al., 2004**). S cílem maximalizovat počet morfologicky normálních a pohyblivých spermií by hřebci měli být odebíráni pomocí vhodné metody odběru, intervalu a frekvence. Spermie z prvního ejakulátu po období delšího sexuálního odpočinku mají obecně velký počet morfologických abnormalit, vyšší koncentraci a nižší motilitu. Kromě toho mají tyto ejakuláty také nižší životnost (**Samper, 2009**).

Sperma musí být odebíráno od hřebců, kteří vyhovují předepsaným zdravotním podmínkám. Penis hřebce musí být pravidelně ošetřován a dezinfikován. Dezinfikuje se i připouštěcí místnost po skončení odběru a zád' atrapy se dezinfikuje před každým odběrem hřebce (**Louda et al., 2001**).

Odběr spermatu u hřebce se provádí převážně pomocí umělé vagíny a umělého fantomu nebo říjící se klisny (**Müller, 2006**).

Odběr spermatu pomocí umělé vagíny je nejrozšířenější způsob odběru spermatu u hřebců. K tomuto účelu je k dispozici více modelů umělých vagín. Všechny umělé vagíny, používané pro odběr spermatu hřebců, jsou opatřeny vodním pláštěm, který umožňuje pasivní regulaci vnitřní teploty a tlaku uvnitř umělé vagíny. Ve většině případů může být vnitřní průměr umělé vagíny modifikován přidáním vody nebo vzduchu do vodního pláště (**Hurtgen, 2009**). V umělé vagíně musí být stejné tepelné a tlakové poměry jako v přirozené pochvě, proto musí být vodní plášť naplněn vodou o teplotě asi 40 - 42 °C a musí být vytvořen potřebný tlak v umělé vagíně, který by měl být 530 kPa. Dále by měla být zajištěna potřebná kluzkost vagíny, které je dosaženo vymazáním vnitřní vrstvy umělé vagíny nespermicidním lubrikačním gelem (**Louda et al., 2001**). Pro tyto účely se nejčastěji využívá sterilní vazelína nebo methylcelulóza. Jiné lubrikanty mohou obsahovat bakteriostatické nebo spermicidní sloučeniny, které jsou škodlivé pro pohyblivost spermií. Možné důvody škodlivého vlivu lubrikantů se připisují hyperosmolaritě a nefyziologickému pH. Pečlivý výběr lubrikantu, jakož i jeho použité množství, jsou důležitými faktory při procesu odebrání ejakulátu (**Froman et Amann, 1983**). Pro snížení bakteriální kontaminace z pryžových vložek jsou využívány jednorázové sběrače, většinou z PVC folie. V případě, že jednorázové sběrače nejsou používány, měly by být pryžové vrstvy umělé vagíny ponořeny do 70% alkoholu po dobu 1 hodiny, promyty objemem horké vody a uskladněny v bezprašném a suchém prostředí. Na gumové části by neměla být používána mýdla a dezinfekční prostředky. Pro odstranění nečistot, gelové frakce spermatu nebo cizích částic ze vzorku ejakulátu by měl být celý ejakulát filtrován. Filtr může být u většiny komerčně dostupných umělých vagín přímo součástí sběrného systému, nebo je celý ejakulát filtrován až po odběru (nylonové, polyesterové filtry) (**Hurtgen, 2009**).

K odběru hřebčího ejakulátu se používá otevřený nebo uzavřený typ umělé vagíny. U uzavřeného typu je ejakulát získáván přímo do sběrné nádobky nebo PVC folie, která je součástí umělé vagíny. U otevřeného typu se sperma odebírá do samostatné odběrové nádobky, což umožňuje oddělit jednotlivé frakce ejakulátu a získat tak ejakulát s vyšší koncentrací spermií. Při použití tohoto typu umělé vagíny je možné nechat odtéct prespermatickou frakci ejakulátu, která může obsahovat i nežádoucí mikroorganismy, a také závěrečnou postspermatickou frakci, obsahující především hustý gel s velmi malým počtem spermií. Takto získaný ejakulát je lépe skladovatelný než celkový ejakulát, obsahující všechny tři frakce (**Gordon, 2004**).

Specifické vlastnosti jednotlivých typů umělých vagín se liší v celkové délce, průměru, plněním vodního pláště, manipulací, hmotností, a místem ejakulace hřebce. K odběru ejakulátu se používají umělé vagíny různého typu, konstrukce a původu (**Love, 1992**). Mezi běžně používané modely patří například Missouri, Colorado, Hannover, Nishikawa, HarVet a Krakovský typ (**Hurtgen, 2009**). Nejznámější jsou Colorado nebo Missouri, používající vnitřní vložku vagíny z polyetylenu, která neporušuje aktivitu získaných spermií (**Louda et al., 2001**).

Missouri model má zúžený vchod pryžovým prstencem, je založen na domněnce, že reflex ejakulace je vyvolán třením u báze pyje (**Kliment et al., 1989**). Tento typ se skládá z koženého pouzdra s koženou rukojetí, vodního pláště, tvořeného ze dvou tvarovaných vrstev pryže a pryžového kužele, vedoucího z vodního pláště (slouží pro umístění sběrače spermatu). U tohoto typu umělé vagíny je žalud hřebce v době ejakulace mimo teplý vodní plášť, čímž je zabráněno poškození spermií tepelným šokem (**Hurtgen, 2009**).

Model Colorado je podstatně delší, větší v průměru, a těžší než ostatní typy umělých vagín. Skládá se z pevného vnějšího plastového obalu a dvou vrstev pryžových vložek, vytvářejících vodní plášť (**Samper, 2009**). Délka vagíny činí 54 cm a průměr 14 cm. Sběrač se používá jednorázově a je vyroben z PVC folie. Do mezistěny vagíny se nalévá teplá voda v rozmezí 1,5 – 2 l, teplota umělé vagíny v době odběru musí činit 40 – 42 °C (**Kliment et al., 1989**). Předností tohoto typu je udržení potřebné teploty uvnitř umělé vagíny po výrazně delší dobu. Významným nedostatkem naopak je, že většina hřebců ejakuluje přibližně v polovině délky vodního pláště a ejakulát je tak vystaven vysokým teplotám. Je proto zapotřebí při odběru velké opatrnosti, aby se zabránilo tepelnému šoku spermií.

Typ Hannover je kratší a v průměru menší než typ Colorado a je vyroben z pevného pryžového pláště a vnitřní pryžové vložky. K ejakulaci dochází v blízkosti konce vodního pláště. Tento model je vhodný pro většinu hřebců.

Typy Nishikawa a HarVet jsou lehké a snadno ovladatelné, a většina hřebců ejakuluje přímo do sběrače spermatu. Umělá vagína se skládá z hliníkového nebo plastového pouzdra s jednou latexovou vložkou. Model Nishikawa má navíc také výpustný ventil, který umožňuje únik vody pod tlakem během ejakulace (**Hurtgen, 2009**).

Krakovský typ nebo také polský model umělé vagíny se podstatně liší od ostatních modelů. Jedná se o tzv. zkrácenou umělou vagínu. Tento typ umělé

vagíny umožňuje kontrolu žaludu penisu a je proto možné provádět frakcionovaný odběr. Ejakulát je zachycován do připravené tepelně izolované sterilní nádoby (**Louda et al., 2001**). Tato vagina je 40 cm dlouhá o průměru 14 cm. Odběrem do této vagíny je zamezeno vyšší mikrobiální kontaminaci a dosaženo vyšší hustoty ejakulátu a lepší hygieny odběru, což je užitečné zejména v programech kryokonzervace. Rovněž umožňuje použití vysokých teplot ve vodním plášti bez rizika poškození spermií tepelným šokem. Tento typ umělé vagíny nejlépe odpovídá fyziologickým potřebám hřebců (**Kliment et al., 1989; Tischner et Kosiniak, 1992**).

Pro hřebce, kteří mají potíže s ejakulací do umělé vagíny, může být za určitých okolností nutné zvýšit vnitřní teplotu umělé vagíny na 50 °C. V tomto případě je ovšem třeba dát pozor na to, aby hřebec ejakuloval přímo do sběrače spermatu nebo koncové části vodního pláště umělé vagíny, aby se zabránilo tepelnému šoku. Spermie, vystavené přebytečnému teplu ve vodním plášti umělé vagíny, vykazují krouživý typ motility a mají sníženou životnost v čerstvém a naředěném ejakulátu (**Hurtgen, 2009**).

Při samotném odběru by umělá vagina měla být držena rovnoběžně s ventrální plochou břicha hřebce. Ve fázi ejakulace by umělá vagina měla být nakloněna směrem dolů a umožnit rychlý vstup spermatu do sběrné nádoby, aby nedošlo k tepelnému šoku spermií (**Love, 1992**). Ejakulace následuje po několika frikčních pohybech a trvá 5 – 35 sekund, v průměru 16 s (**Louda et al., 2001**).

Chyby při odběru spermatu jsou často spojeny například s nízkou teplotou uvnitř umělé vagíny, přetlakem v umělé vagíně, příliš nízkou nastaveným fantomem nebo nevhodnou pozicí umělé vagíny pro konkrétního hřebce.

Odebrané sperma se laboratorně hodnotí (**Müller, 2006**). Laboratoř by měla být připravena tak, aby veškeré pomůcky, používané při manipulaci s odebraným spermatem, byly čisté a měly příslušnou teplotu (35-37 °C) (**Věžník et al., 2004; Hurtgen, 2009**).

2.5 HODNOCENÍ EJAKULÁTU

Hodnocení kvality spermatu je užitečné pro predikci plodnosti hřebců a má velký význam pro dosažení maximální reprodukční efektivity, ať už v přírodních podmínkách chovu nebo v programech asistované reprodukce (**Colenbrander et al., 2003; Rodriguez et al., 2001**). Kromě toho je také užitečným nástrojem v klinické diagnostice subfertilních zvířat.

Obecným cílem hodnocení spermatu je posoudit plodnost jednotlivých hřebců nebo jednotlivých vzorků spermatu, přičemž sperma může být použito jako čerstvé, zchlazené nebo zmrazené (**Colenbrander et al., 1992; Jasko et al., 1992; Petrunkina et al., 2007**). Kvalita ejakulátu, použitého k inseminaci, musí odpovídat požadavkům stanovených normou pro každý druh plemenků hospodářských zvířat (**Louda et al., 2001**). Cílem hodnocení ejakulátu je proto zjistit, zda jsou kvantitativní a kvalitativní spermiologické parametry v souladu s nejnovějšími minimálními požadavky, stanovenými pro biologické složení hřebčího spermatu (**Klug, 1982; Parvevliet et al., 1994**).

Hodnocení a zpracování odebraného ejakulátu se provádí ve specializované laboratoři. Vzhledem k tomu, že stanovení oplozovací schopnosti ejakulátu je velmi obtížné, používá se řada zkoušek (**Louda et al., 2001**). Obvyklé parametry, zahrnuté do hodnocení kvality čerstvého spermatu, jsou kvantitativní (např. objem, koncentrace spermií na ml, celkový počet spermií v ejakulátu) nebo kvalitativní (např. procento pohyblivých spermií, morfologie spermií, dlouhověkost aktivity spermií po zchlazení a skladování) (**Sieme, 2009**).

Pro získání lepší představy o současné kvalitě získaného ejakulátu by mělo být provedeno makroskopické a mikroskopické vyšetření ejakulátu (**Samper et al., 2007**). Makroskopické vyšetření se provádí bezprostředně po odběru ejakulátu a stanovuje se objem získaného spermatu, barva, konzistence, pach a obsah cizích přímísenin. Mikroskopické vyšetření spermatu zahrnuje stanovení koncentrace, aktivity a morfologie spermií, koncentrace vodíkových iontů a procenta živých a mrtvých spermií (**Kliment et al., 1989**).

Jednotlivé metody hodnocení ejakulátu jsou nápomocné k odhadu potenciální plodnosti konkrétního hřebce. Neexistuje jediné hodnocení, parametr nebo test, které lze použít samostatně k určení míry plodnosti nebo neplodnosti hřebce, proto se důrazně doporučuje využití více metod hodnocení (**Samper et al., 2007**).

Nejpřesnější dosažitelnou metodou objektivního hodnocení spermatu je automatická počítačová analýza spermatu CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), kdy se k hodnocení spermiologických parametrů využívá kombinace mikroskopu, kamery a počítačového softwaru (**Love, 2011**).

Konvenční technika hodnocení je však nejčastěji založena na subjektivním hodnocení objemu, koncentrace a aktivity spermatu (**Verstegen et al., 2002; Varner, 2008; Samper, 2009**).

2.5.1 Barva, konzistence a pach ejakulátu

Makroskopický vzhled ejakulátu závisí na jeho hustotě, která je určena koncentrací spermií, složení semenné plazmy a obsahu fyziologických (epitelové buňky) nebo patologických (moč, krev) složek. Barva a konzistence ejakulátu poskytují důležité údaje o vhodnosti ejakulátu pro použití v AI (**Sieme, 2009**). Tyto makroskopické parametry ejakulátu se posuzují smyslově, bezprostředně po odběru ejakulátu. Pro vyloučení odchylek v barvě nebo vzhledu odebraného ejakulátu je potřeba provést vizuální posouzení (**Samper et al., 2007**). Barva se posuzuje proti světlu. Hřebčí ejakulát by měl být bílé až šedavě bílé barvy, přičemž záleží na koncentraci spermií v ejakulátu (**Louda et al., 2001**). **Samper et al. (2007)** dodává, že jinak zabarvený ejakulát většinou signalizuje poruchu nebo onemocnění. Sperma nažloutlé barvy poukazuje na přítomnost moči v ejakulátu (tzv. urospermie), ejakulát růžové nebo načervenalé barvy je kontaminován krví (tzv. hemospermie). Přestože urospermii i hemospermii lze snížit odstředěním naředěného ejakulátu, jsou tyto vzorky spermatu nevhodné k inseminaci. Konzistence se posuzuje ve sběrači v dopadajícím nebo procházejícím světle (**Louda et al., 2001**). Konzistence se mění s klesajícím počtem spermií z krémové, mléčné, syrovátkové až na vodnatou, a indikuje snížení počtu spermií nebo absolutní absenci spermií (**Sieme, 2009**). Husté sperma dobré jakosti je neprůhledná vazká tekutina, zpravidla smetanového mírně zrnitého vzhledu s pomalu se pohybujícími zrnitými shluky spermatu. Řídké sperma špatné jakosti je vodnaté, průsvitné a bez zrnitosti. Konzistence hřebčího ejakulátu je spíše vodnatá. Pach se posuzuje čichem ve sběrači. Ejakulát hřebce je obvykle pachově neutrální nebo má slabý specifický pach připomínající pach kravského mléka. Ejakuláty se zápachem moči, hnilobným zápachem (svědčícím o přimísení

hnisu) a s druhově specifickým fekálním zápachem musí být zlikvidovány. Ejakulát by měl být prostý cizích částic a příměsí (**Louda et al., 2001; Sieme, 2009**).

2.5.2 Objem ejakulátu

Objem ejakulátu je kvantitativním ukazatelem důležitým pro stanovení celkového počtu spermií v ejakulátu a pro kalkulaci vhodného poměru ředění spermatu pro výrobu inseminačních dávek (**Louda et al., 2001; Root Kustritz, 2007; Sieme, 2009**).

Objem ejakulátu se stanovuje okamžitě po jeho získání a zjišťuje se měřením v odměrných nádobách nebo vážením na laboratorní automatické váze (**Věžník et al., 2004**). Nádoby na měření objemu by měly být sterilní a předeřáté na teplotu 37-38 °C (**Samper, 2009**).

Hřebec, jakožto druh s intrauterinní ejakulací, produkuje větší množství ejakulátu než druhy s intravaginální ejakulací (přežvýkavci). Objem ejakulátu je ovlivněn řadou faktorů, zejména plemennou příslušností a hmotností hřebce, genetickým základem, věkem a prostředím. Faktory prostředí, které mohou ovlivňovat objem ejakulátu, jsou například výživa, ustájení, ošetřování, intenzita pohlavního využití plemeníka, stupeň pohlavního vydráždění, technika a frekvence odběru ejakulátu (odběr celého ejakulátu nebo spermatické frakce), roční období (až 50 % rozdíl mezi produkcí v přípouštěcí sezóně a mimo sezónu) a významně se podílí i vyrovnanost plemeníka v daném prostředí a jeho zdravotní stav (**Věžník et al., 2004; Janett et al., 2003**). Objem spermatu je také do značné míry ovlivněn množstvím sekretů přídatných pohlavních žláz (**Sieme, 2009**).

Objem spermatu u hřebce by měl být stanoven jen ze spermatické frakce, to znamená bez frakcí ejakulátu chudých na spermie, tj. bez nespermatické frakce vylučované močovou trubicí a bulbouretrálními žlázami a stejně tak bez specifické gelové frakce produkované semennými váčky. Tyto frakce ejakulátu se neodebírají, respektive odstraňují. Objem ejakulátu by tedy měl být reprezentován pouze spermatickou frakcí (**Věžník et al., 2004; Samper, 2009**).

Dle **Věžníka et al. (2004)** by objem spermatické frakce hřebce měl být minimálně 20 cm³. **Sieme (2009)** uvádí, že celkový objem ejakulátu by měl být 60-120 cm³, bez gelové frakce 30-100 cm³. Dle **Loudy et al. (2001)** se objem hřebčího ejakulátu pohybuje od 50 do 200 cm³. **Jelínek, Koudela et al. (2003)** uvádějí

průměrný objem okolo 70 cm³. Požadavek na minimální objem ejakulátu, stanovený ve **Vyhláše č. 471/2000 Sb.** kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat (dále jen Vyhláška), je 10 cm³.

2.5.3 Koncentrace spermií

Koncentrace spermií, nebo také hustota, představuje počet spermií na jednotku objemu. Stanovení koncentrace spermií v ejakulátu se vyjadřuje počtem spermií v 1 mm³ a je ukazatelem pro určení stupně ředění spermatu. Obvykle se udává v milionech na mm³ nebo ml (**Věžník et al., 2004; Sieme, 2009**).

Stanovení koncentrace spermií v ejakulátu je jednou ze základních informací o jeho kvalitě. Počet spermií, produkovaných hřebcem, je dán velikostí varlat a funkční aktivitou semenotvorného epitelu (**Louda et al., 2001; Věžník et al., 2004; Samper et al., 2007**). **Samper et al. (2007)** dodává, že denní produkce spermií je jedním faktorem, který ovlivňuje počet spermií v ejakulátu. Jeden gram testikulárního parenchymu produkuje během období rozmnožování přibližně 19 milionů spermií denně, mimo připouštěcí sezónu se tato produkce snižuje na 15 milionů. Celková šířka šourku vysoce koreluje s testikulární hmotností, velikostí a produkcí spermií, a je proto považována za důležitý údaj při hodnocení potenciální plodnosti určitého ejakulátu. Koncentrace spermií na mililitr násobená objemem dává celkový počet spermií (TSC) v ejakulátu, což je jeden z nejdůležitějších ukazatelů kvality ejakulátu (**Martínez, 2004; Sieme, 2009**).

Faktory, ovlivňující koncentraci spermií v ejakulátu, se všeobecně uplatňují prostřednictvím vnitřního prostředí organismu a negativním působením na řídicí mechanismy, popřípadě přímo na cílové tkáně pohlavního systému (**Věžník et al., 2004**). Koncentrace je dána věkem, zdravotním stavem hřebce, připraveností a technikou odběru ejakulátu (**Louda et al., 2001**). Množství spermií, produkované hřebcem, se zvyšuje s věkem, protože celková délka semenných kanálků se zvětší a zvýší o více než 30 % v průběhu života hřebce.

Ke zjištění koncentrace spermií v ejakulátu existuje několik metod. Nejčastěji se koncentrace spermií zjišťuje hemocytometricky nebo fotometricky. Hemocytometrie je přímá metoda počítání spermií (**Samper et al., 2007**). Stanovení koncentrace spermií hemocytometrickou metodou je založeno na počítání spermií

v Bürkerově komůrce. Přesnost této metody velice závisí na přesnosti pipetování, pečlivém promísení a absolutním počtu počítaných spermií (alespoň 100). Ačkoliv je tato metoda časově náročnější, než některé jiné dostupné metody, je považována za velmi přesnou a spolehlivou a slouží také ke kontrole přesnosti měření některých přístrojů, používaných ke stanovení koncentrace spermií (**Louda et al., 2001; Samper et al., 2007**).

Další možností je použití průtokového cytometru v kombinaci s fluorescenčním barvivem označujícím spermie. Tato metoda je rovněž cenným nástrojem k určení koncentrace spermií s vysokou přesností. Vzhledem ke složitosti přípravy spermií a celkovým nákladům nachází tato metoda uplatnění ve specializovaných laboratořích (**Evenson et al., 1993**).

Pro stanovení koncentrace spermií byly vyvinuty i jiné alternativní metody zjišťování koncentrace spermatu, kdy se počet spermatických buněk určuje z naředěných vzorků ejakulátu pomocí speciálních zařízení (**Gordon, 2004**). Při spektrofotometrii je odhad koncentrace spermií založen na hustotě vzorku a propustnosti paprsku světla skrz ejakulát (**Gordon, 2004; Sieme, 2009**). Množství světla přenášené skrze vzorek je nepřímo úměrné koncentraci spermií ve vzorku. Ve standardním spektrofotometru je odečet (optická hustota nebo procento transmitance) převeden do grafu s odpovídající koncentrací spermií (**Samper et al., 2007**). Určitou nevýhodou těchto metod je však chybějící rozlišení mezi spermii a ostatními buňkami ve vzorku spermatu.

V poslední době bylo vyvinuto snadno použitelné zařízení pro počítání spermií NucleoCounter SP-100. Tento přístroj je založen na počítání savčích buněčných jader obarvených specifickým fluorescenčním barvivem (propidium jodid). Propidium jodid je vylučován ze živých buněk, čehož se využívá k odhadu koncentrace neživotaschopných buněk a koncentrace celkového počtu buněk v suspenzi (**Hansen et al., 2006**).

Další možností stanovení koncentrace spermií je integrace do počítačové analýzy spermií (CASA). Tyto systémy mohou s dostatečnou přesností určit koncentraci spermií a pohyblivost spermií současně (**Evenson et al., 1993**).

Koncentrace spermií $100 - 350 \times 10^6/\text{ml}$ jsou běžné v závislosti na sezónních vlivech a frekvenci ejakulace, ale obvykle spadá koncentrace spermií do rozmezí $50 - 150 \times 10^6/\text{ml}$, za předpokladu, že jsou prováděny pravidelné odběry ejakulátu (jednou denně nebo každý druhý den) (**Sieme, 2009**). **Morrel et al. (2008)** uvedli

rozpětí koncentrace spermií u teplokrevných plemen hřebců 162 až 356 x 10⁶/ml. **Louda et al. (2001)** uvádí, že koncentrace spermií v ejakulátu je variabilní a pohybuje se mezi 100 000 až 300 000 spermií v 1 mm³. Frakce bohatá na spermie může dosáhnout koncentrace až 800 000 spermií/mm³. Husté sperma má koncentraci více než 200 000 spermií/mm³, středně husté sperma 80 000 až 200 000 spermií/mm³ a řídké sperma 30 000 až 80 000 spermií/mm³.

Dle **Vyhlášky** je při krátkodobé konzervaci ejakulátu požadována koncentrace spermií nejméně 100 000 spermií v 1 mm³, při dlouhodobé konzervaci pak nejméně 120 000 spermií v 1 mm³. Inseminační dávka krátkodobě konzervovaného spermatu by měla obsahovat nejméně 300 x 10⁶ aktivních spermií.

2.5.4 Motilita spermií

Motilita spermií je všeobecně považována za přední ukazatel pro posuzování kvality ejakulátů a odhadu potenciální fertility a patří tudíž na přední místa výčtu spermatoanalytických metod (**Věžník et al., 2004; Sieme, 2009; Contri et al., 2013**).

Motilita spermií je dána progresivním pohybem spermie vpřed za hlavičkou (**Mortimer, 1997**). Progresivní pohyb spermií je považován za významný ukazatel pro odhad fertilizační schopnosti ejakulátu. Z hlediska funkčního je pohyb spermií nutnou podmínkou jejich průniku do oocyty. Proto je připravenost energie (ATP) výměnou látkovou základní potřebou buněčné vybavenosti každé spermie. Všechny faktory ovlivňující motilitu spermií, ovlivňují i výměnu látkovou a naopak. Přímý progresivní pohyb je znakem funkční plnohodnotnosti a má jej vykazovat při dobrém ejakulátu 70 % spermií. Spermie při svém progresivním pohybu rotují kolem své osy s frekvencí 3-15 otáček za sekundu. U alterovaných spermií postupně mizí rotace a pohyb se stává plochý, přičemž se přímočarý pohyb mění v kruhový. S postupující vitální degradací se mění přímý pohyb většinou na pohyb na kruhu, a čím menší je kružnice, tím vyšší je stupeň vitální degradace. Některé spermie vykazují trhavý nebo přerušovaný pohyb, případně pohyb na místě (oscilační). **Věžník et al. (2004)** uvádí, že dolní hraniční hodnota požadovaného procenta pohyblivých spermií u hřebce je 60 %. Spermie normálně plodných hřebců by měly mít okamžitou progresivní pohyblivost větší nebo rovno 60 % (**Malmgren, 1997**).

Dle **Sampera (2009)** je cílem hodnocení motility určit celkové procento pohyblivých spermií, které zahrnuje ještě procento spermií oscilačních (vitální spermie pohybující se v kruhu kolem své vlastní osy) a podíl progresivně pohyblivých spermií. Uvádí, že abaxiální připojení spojovací části k hlavičce spermie je u hřebčích spermií fyziologické a odpovědné za kruhový pohyb specifické alikvotní části ejakulátu hřebce. Proto odhad pouze progresivní pohyblivosti může podcenit dobrou pohyblivost vzorku spermatu některých hřebců.

Vyšetření motility se provádí ihned po odběru a po skladování spermatu. Základním způsobem kvantitativního stanovení motility spermií je subjektivní stanovení počtu pohyblivých spermií pomocí mikroskopického vyšetření, kdy je odhadem stanoveno procentické zastoupení spermií pohybujících se vpřed za hlavičkou (**Louda et al., 2001**). Při posuzování motility se hodnotí také charakter pohybu, přičemž se určuje jeho směr a rozsah kmitu hlavičky spermie. Neoddělitelným atributem pohyblivosti je i rychlost pohybu spermií. Proto jsou tyto dvě veličiny většinou zkoumány současně. Rychlost pohybu spermií je citlivým ukazatelem, který dovoluje časně posoudit nastupující vitální degradaci ejakulátu (**Věžník et al., 2004**). Současně s hodnocením pohyblivosti spermií, by měl být zaznamenán výskyt aglutinace spermií a počet cizorodých buněk (**Colenbrandner et al., 1992; Brito, 2007**). Sperma by mělo být před analýzou naředěno (na koncentraci 25 až 50 x 10⁶ spermií na mililitr), protože čerstvý ejakulát hřebce má tendenci k aglutinaci (shlukování spermií), což ztěžuje individuální pohyblivost spermií (**Samper et al., 2007; Samper, 2009**).

Klasické mikroskopické hodnocení motility je subjektivní proces ovlivněný řadou subjektivních faktorů. Nevýhodou tohoto hodnocení je menší přesnost, nízká opakovatelnost a skutečnost, že odhad pohyblivosti spermií se může lišit mezi posuzovateli (**Amann et Katz, 2004**). Proto lze pro hodnocení motility spermií využít také objektivních metod, kdy se pro hodnocení využívá počítačová technika (**Věžník et al., 2004**). Značný pokrok v tomto směru přinesla CASA (Computer-Assisted semen analysis).

CASA je poloautomatická počítačová metoda pro objektivní hodnocení parametrů ejakulátu, využívaná nejčastěji pro stanovení různých parametrů motility (**Samper, 2009**). CASA je jedinou objektivní metodou pro analýzu motilních, progresivních a hyperaktivních spermií ve vzorku, a proto poskytuje informaci o oplozovacím potenciálu spermatu. Optický systém zařízení snímá obraz, který je

digitalizován a přenášen na monitor ve formě pixelů. Pomocí speciálních algoritmů, využívajících počty a jasnost pixelů, jsou rozlišovány pohyblivé a nepohyblivé spermie a je analyzována dráha každé spermie. Dráha jednotlivých spermií je determinována funkcí jejich bičíků a charakteristikou pohybu odráží fyziologický stav spermie. Získané trajektorie jsou matematicky zpracovány, což umožňuje definování těchto trajektorií v číselné podobě. Výsledky tohoto zpracování se odráží v řadě kinematických parametrů, které přesně vymezují pohyb každé spermie a jsou prezentovány během několika vteřin (**Quintero-Moreno et al., 2003**).

Kinematické parametry motility

VCL, *curvilinear velocity*, křivočará rychlost ($\mu\text{m/s}$): průměrná rychlost hlavičky spermie po její skutečné křivočaré dráze; okamžitě zaznamenaný sekvenční postup celé trajektorie spermie.

VSL, *straight-line velocity*, lineární (přimočará) rychlost ($\mu\text{m/s}$): průměrná rychlost hlavičky spermie podél přímky mezi její první zjištěnou polohou a poslední zjištěnou polohou; přímá trajektorie spermie za jednotku času.

VAP, *average path velocity*, průměrná rychlost ($\mu\text{m/s}$): průměrná rychlost hlavičky spermie podél své průměrné dráhy - dráha je vypočítána zmírněním křivočaré trajektorie podle algoritmů v SCA Motility modulu; průměrná trajektorie spermií za jednotku času.

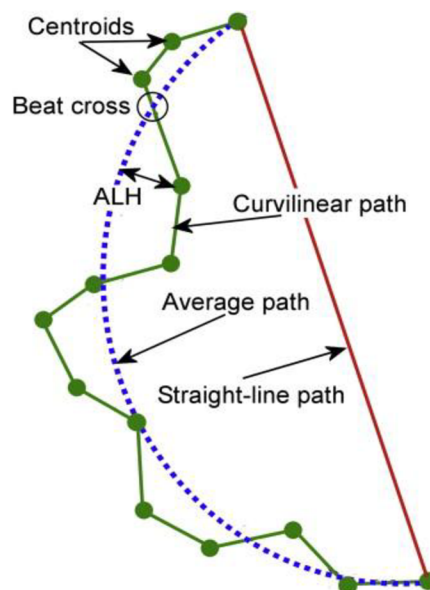
ALH, *amplitude of lateral head displacement*, amplituda bočního posunu hlavičky (μm): rozsah bočního posunu hlavičky spermie po její průměrné dráze, může být vyjádřena jako maximum nebo jako průměr těchto posunů. Odvozena z VCL a VAP, odráží pohyb bičíku.

LIN, *linearity coefficient*, linearita (%): linearita křivočaré dráhy (VSL/VCL).

WOB, *wobble coefficient*, kmitání (%): míra kmitání (stupeň oscilace) skutečné dráhy kolem průměrné dráhy (VAP/VCL).

STR, *straightness coefficient*, přímost (%): linearita průměrné dráhy (VSL/VAP).

BCF, *beat-cross frequency* (Hz): průměrná rychlost, se kterou křivočará dráha protíná průměrnou dráhu; počet bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy (kolikrát je průměrná dráha překřížena křivočarou dráhou).



Obrázek 3 Schématické znázornění zobrazující CASA terminologii kinematických parametrů motility. Východí zpracování obrazu poskytuje těžiště pro každou spermii v prvním snímku, a pro každou spermii je odvozena pozice nejpravděpodobnějšího těžiště v po sobě jdoucích snímcích. Spojení těchto těžišť spermií poskytuje skutečnou trajektorii, která se nazývá zakřivenou dráhou. Průměrná rychlost podél této dráhy je nazývána křivočarou rychlostí – VCL. Dále je vypočítána průměrná dráha a průměrná rychlost podél této dráhy je označována jako průměrná rychlost pohybu po dráze – VAP. Lineární dráha je vynesena od první do poslední pozice hlavičky spermie. Rychlost podél této trajektorie je označována přímočarou rychlost – VSL. Každá poloha těžiště, která je odchylkou od průměrné dráhy, se označuje jako amplituda bočního posunu hlavičky – ALH. Podobně existují body, kde zakřivená dráha protíná průměrnou dráhu a počet těchto průsečíků označuje počet bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy – BCF (počet za sekundu) (Amann et Waberski, 2014).

CASA je velmi přesná metoda, určující celou škálu pohybových charakteristik spermií. U těchto systémů je však nutné zohlednit mezidruhové rozdíly ejakulátů, respektive pohybových charakteristik spermií, což vyžaduje správné nastavení parametrů měření pro vyšetření na různých typech přístrojů. K poskytování přesných a opakovatelných výsledků vyžaduje také standardizaci, kalibraci a technické nastavení, vhodnou přípravu vyšetřovaného vzorku a správnou interpretaci získaných výsledků (Sieme, 2009).

Dle **Vyhlášky** by sperma pro krátkodobou konzervaci mělo obsahovat minimálně 50 % aktivních spermií, sperma pro dlouhodobou konzervaci minimálně 70 % aktivních spermií. Stanovený požadavek na kvalitu inseminační dávky krátkodobě konzervovaného spermatu je nejméně 50 % aktivních spermií po ředění.

Inseminační dávka dlouhodobě konzervovaného spermatu by měla obsahovat nejméně 30 % aktivních spermií po rozmrazení.

2.5.5 Koncentrace vodíkových iontů (pH ejakulátu)

Přestože měření pH není nejpopulárnější technikou, využívanou k hodnocení kvality ejakulátu, může společně s ostatními údaji poskytnout cenné informace k posouzení plodnosti určitého vzorku spermatu (**Samper et al., 2007**). Koncentrace vodíkových iontů se zjišťuje buď pomocí lakmusových papírků, nebo pomocí pH-metrů a měla by být stanovena do 15 minut po odběru, vzhledem ke změnám životních pochodů spermií.

Obecně je reakce vodíkových iontů čerstvého ejakulátu blízka neutrální hranici. Ejakulát hřebce by měl mít pH v rozmezí 6,7 až 7,5. Pokud pH stoupne na 7,8, znamená to, že nebyl získán celý ejakulát. Výrazně alkalické pH může poukazovat na patologické změny sekretů přídatných pohlavních žláz, případně na jiné příměsi v ejakulátu a je tedy doprovázeno poruchami plodnosti (**Louda et al., 2001**). **Samper et al. (2007)** uvádí optimální hodnotu pH přibližně 7,7 a že změny v této hodnotě negativně ovlivňují motilitu spermií. **Contri et al. (2013)** uvádí, že pH 7 až 7,5 umožňuje maximální projev potenciální motility spermií. Dále tvrdí, že pH nižší než 5,5 snižuje motilitu spermií a membránovou integritu, zatímco pH nad 8,5 vede ke znehybnění spermií, což je způsobeno významným poklesem jejich mitochondriální aktivity.

Spermie vykazují větší snížení pohyblivosti v reakci na kyselé prostředí než na prostředí alkalické (**Samper et al., 2007**). Při pH 6 ustává pohyb a dochází ke stavu anabiózy, ve kterém mohou spermie přežít po delší dobu. Obnovení pohybu je možno dosáhnout přidáním alkalických látek nebo zahřáním spermatu. Tohoto jevu je využíváno ke krátkodobé konzervaci spermatu chlazením (**Louda et al., 2001**). Zatímco spermie imobilizované kyselým prostředím jsou schopné obnovit motilitu poté, co se pH vrátí k normálním hodnotám, vliv alkalického prostředí je ireverzibilní (**Samper et al., 2007**).

Vzhledem ke skutečnosti, že hřebec téměř postrádá puфраční schopnost, která vyrovnává kolísání hladiny pH v ejakulátu, je jeho sperma velmi citlivé na výkyvy pH (**Louda et al., 2001**). Byla prokázána negativní korelace mezi objemem ejakulátu a pH a mezi počtem spermií a pH, což naznačuje, že vzorky s vysokým pH mohou mít nízkou koncentraci spermií (**Samper et al., 2007**).

2.5.6 Integrita plazmatické membrány spermii

Integrita a normální funkceschopnost plazmatické membrány spermii je nezbytný předpoklad úspěšnosti fertilizace. Živé buňky si zachovávají asymetrické rozdělení různých fosfolipidů mezi vnitřní a vnější stěnou plazmatické membrány. Jsou-li buňky vystaveny extrémním nefyziologickým podmínkám, dojde v nich k biochemickým a morfologickým změnám a nástupu nekrobiotického procesu. Nekróza začíná zhoršenou schopností buňky zachovat homeostázu, což vede k influxu vody a extracelulárních iontů. Hydropická degenerace se projeví změnou intracelulárních organel a celá buňka se postupně edematicky mění. U spermie je především postižena oblast akrozomu a povrchové membrány, postupně mitochondriální struktury a bičík (**Věžník et al., 2004**). Funkční testy integrity plazmatické membrány mohou potenciálně charakterizovat kvalitu buněk (**Sieme, 2009**). Při rutinní analýze spermii se zjišťuje mnohdy významné procento mrtvých spermii. Všeobecně je tato buněčná smrt považována za důsledek buněčných nekrobiotických procesů, neboť používaná vitální barviva pro rozlišení živých a mrtvých spermii pronikají do spermii změnou permeability plazmatické membrány. Integrita membránových systémů je při vyšetření ejakulátu propojena se stanovením procenta živých a mrtvých spermii, neboť jejich průkaz je podložen právě změnami membrán (**Věžník et al., 2004**).

Základem je supravitální postup barvení spermii, který diferencuje vyšetřovanou buněčnou suspenzi na skupinu spermii s neporušenou povrchovou membránou a skupinu spermii se změnami permeability povrchových membrán a v důsledku porušení jejich integrity ke změnám interakce s použitým barvivem (**Sieme, 2009**). V praxi se používá 0,5% eosin ve fyziologickém roztoku o pH odpovídajícím příslušnému druhu zvířat (pro hřebce pH 7,2). Z používaných fluorochromů se pro mikroskopickou techniku nejčastěji uplatňuje primulin, chlortetracyklin a při využití průtokových cytofotometrů proprium jodid nebo speciálních testovacích setů např. Sperm Viability Kit (**Věžník et al., 2004**).

Zkouška je založena na rozdílné afinitě živých a mrtvých spermii k barvivům. Mrtvé nebo oslabené spermie přijímají barvivo, kdežto živé spermie nepropouštějí semipermeabilní membránou barvivo a hlavička zůstává bílá. Mrtvé spermie se barví bledě růžově až červeně (**Samper et al., 2007**). Hodnotí se 200 buněk a stanoví se procento živých a mrtvých spermii (**Věžník et al., 2004**).

Integrita plazmatické membrány spermií je dokladována též testem membránové tolerance a rezistence vůči hypoosmotickému prostředí. Podstatou tohoto testu je předpoklad, že u nenarušené membrány živé spermie v hypoosmotickém prostředí dojde k reakci bičků jejich stáčením po průniku vody do buněčného interiéru (**Sieme, 2009**).

2.5.7 Morfologické vyšetření spermií

Posouzení normálních a patologicky změněných spermií, jakož i stanovení přítomnosti buněk jiných buněčných kategorií, je považováno za neoddelitelné diagnostické kritérium vedle stanovení koncentrace a motility, proto je morfologie spermií důležitým parametrem pro hodnocení kvality spermatu (**Věžník et al., 2004**). Vzhledem k důležitosti v reprodukčním procesu je studium morfologie spermií nezbytnou součástí analýzy spermatu, protože abnormality v morfologii spermií jsou důležitým ukazatelem snížené plodnosti (**Chandler et al., 1988; Jasko et al., 1990; Barth et al., 1992**). Zjišťování počtu abnormálních spermií při morfologickém vyšetření hraje důležitou roli pro stanovení fertility hřebců, je důležité také pro selekci plemenů a k odhadu potenciální vhodnosti ejakulátu ke skladovatelnosti a pro účely umělé inseminace (**Kuster et al., 2004**).

Abnormality mohou být klasifikovány s ohledem na anatomické místo defektu, tedy jestli je zasažena hlavička, krček, spojovací část nebo bičík (**Jasko et al., 1990**). Na těchto částech spermií jsou posuzovány odchylky od normální struktury spermie (**Věžník et al., 2004; Samper, 2009**).

Podle místa vzniku se abnormality rozdělují na primární a sekundární. Primární změny spermií vznikají v průběhu spermatogenního cyklu a řadí se mezi ně degenerativní formy spermií, změny tvaru hlavičky, změny v nukleoplazmě, změny na akrozomu, tvarové změny bičíku a další vývojové anomálie. Sekundární změny nastávají při dlouhém pobytu spermií v ocase nadvarlete, dále v průběhu ejakulace, špatnou manipulací odebraného ejakulátu a nesprávnou přípravou preparátu. Tyto změny jsou projevem kvalitativních změn v semenné plazmě a nesprávného technologického postupu při zpracování spermatu (**Louda et al., 2001**). Obecně jsou primární defekty považovány za vážnější, protože vznikají během spermatogeneze v semenotvorném epitelu varlat (**Sieme, 2009**).

Patologické formy spermií se dle **Loudy et al. (2001)** dělí do několika skupin:

Vývojové tvarové anomálie degenerativního charakteru – do této skupiny patří všechny formy spermií, které se vyvinuly atypicky a nemají normální diferenciaci - hlavičku s akrozomem, spojovací část bičíku a bičík samotný. Patří sem také spermie s dvojitým bičíkem nebo se zdvojenou hlavičkou. V normálním ejakulátu by se nemělo vyskytovat více než 5 % těchto abnormalit. Vyšší procento je ukazatelem vážnější poruchy spermatogeneze.

Patologické tvary hlaviček – tyto změny jsou nejčastějšími odchylkami při poruchách spermatogeneze a provázejí nejčastěji vznik degenerativních nebo zánětlivých procesů ve varlatech. Nejčastěji se vyskytují hlavičky zúžené, hruškovité (úzká základna), abnormálně velké (macrocephalis), abnormálně malé (microcephalis), asymetrické a dále spermie s abnormální strukturou hlavičky. Všechny tyto anomálie se řadí mezi změny primární a jejich celkový výskyt by neměl překročit hranici 5 %.

Změny akrozomu - stav akrozomu je silně spojený s fertilitou ejakulátu a tak různé morfologické defekty akrozomu musí být zváženy. Tyto defekty mohou způsobit časně embryonální úmrtí nebo zcela zabránit oplození. Typická morfologická změna v utváření akrozomu, která je všeobecně uznávána jako znak snížené fertility, je knoflíkový defekt spermií (knobbed sperm defect). Nápadnost tohoto útvaru je především spojena s jeho prominencí v apikální části akrozomu. Změny akrozomální oblasti mají i jiné formy abnormálního utváření. Častou změnou je zvýšená kondenzace akrozomální hmoty k přednímu okraji hlavičky, tvořící tmavěji zbarvený hřeben hlavičky spermie. Velmi častou anomálií je také zbobtnalý akrozom.

Změny spojovací části – abnormalitou této oblasti mohou být změny v délce nebo tloušťce spojovací části, výskyt proximálních protoplazmatických kapek nebo rozvolnění mitochondriální spirály, které je většinou provázeno narušením povrchové membrány (spermie nevykazují pohyb). Při vážnějších poruchách funkce pohlavních orgánů se může vyskytnout segmentální aplazie (parciální absence mitochondriální spirály).

Patologické změny bičíků – abnormality bičíku mění pohyblivost spermií. Nejčastěji se jedná o různé formy stočení bičíku. Přítomnost stočených bičíků může být považována za signál nedostatečného zrání v nadvarletí. Dále sem patří dekapitace (oddělení hlaviček od bičíků) a abnormity v orientaci bičíku z hlediska podélné osy – uložení abaxiální, ve sklonu k ose – paraaxiální a retroaxiální, což je

bičík v protisměrném postavení, navozující obrácený pohyb. Z funkčního hlediska jsou abnormality v uložení bičíku provázeny změnou charakteru pohybu spermie a ovlivňují motilitu a její efektivitu v procesu fertilizace. Mezi tyto změny se řadí i tzv. Dag-defekt, kdy dochází k abnormálnímu vyvinutí bičíku v důsledku toho, že se bičíkové fibrily nevyvinou v uspořádání 2+9+9, ale ve vnějším kruhu obvykle skupina fibril chybí.

Nezralé spermie – jedná se o spermie se zadrženu protoplazmatickou kapkou na krčku – proximální, nebo v průběhu spojovací části – distální. Zatímco distální kapky jsou z hlediska fertility považovány za méně významné, proximální kapky naznačují vysokou nezralost buněk, které ještě nedokončily proces zrání během jejich průchodu nadvarletem (**Pérez-Sánchez et al., 1997; Gago et al., 2000**). Při vyšším výskytu nezralých spermií v ejakulátu je třeba sledovat výskyt dalších vývojových vad.

Změny v nukleoplazmě – tyto změny se posuzují při použití speciálního barvení, které znázorňuje jadernou substanci. Mezi nejčastější změny pak patří nepravidelné uspořádání deoxyribonukleových kyselin v jádře, makrovakuoly nebo slabá barevná reakce nukleoplazmy. V ejakulátu nemá být více než 15 % těchto anomálií.

Při současném způsobu klasifikace je zaznamenáván počet vyskytujících se morfologických abnormalit. Pokud se na jedné spermii vyskytne takovýchto abnormalit více, znamená to závažnější narušení spermatogeneze a horší prognózu plodnosti. Měla by proto být zaznamenávána frekvence výskytu defektů v nejméně 100 buňkách namísto počtu abnormálních buněk ze 100 (**Samper, 2009**).

Vážnou otázku v posuzování kvality ejakulátu tvoří nepohyblivost spermií bez výrazných morfologických změn (**Věžník et al., 2004**). Procento pohyblivých spermií v ejakulátu by mělo být paralelní s počtem morfologicky normálních spermií. Skutečnost je však taková, že ne všechny pohyblivé spermie mají normální morfologii a ne všechny morfologicky normální spermie jsou pohyblivé (**Samper, 2009**).

Vysoce plodní hřebci mají více než 60 % morfologicky normálních spermií a méně než 5 % abnormalit akrozomu (**Samper et al., 2007**). **Rodriguez-Martinez et Barth (2007)** dodávají, že frekvence výskytu abnormálních hlaviček spermií by neměla převyšovat 10 % a zároveň také abnormality jednotlivých ostatních

parametrů (akrozom, spojovací část, bičík, proximální cytoplazmatické kapky) by neměly převyšovat 5 % nebo celkem činit 10-15 %. Sperma pro krátkodobou konzervaci by mělo obsahovat 60 % morfologicky normálních spermií, u ejakulátu pro dlouhodobou konzervaci je požadavek zvýšen na 70 % morfologicky normálních spermií (**Vyhláška**).

Při hodnocení morfologie spermií lze využít celé řady různých metod a barviv (**Samper et al., 2007**). **Věžník a kol. (2004)** popisuje barvení podle Hancocka, Farellyho, Češovského, Karrase a barvení podle Papanicolaoua. **Samper (2009)** uvádí, že běžně používaná barviva pro morfologické hodnocení jsou Williamsovo, Karrasovo, nigrosin-eosin, Eosin Anilin Blue, Spermac, Feulgen. **Hidalgo et al. (2005)** uvádějí dále Diff-Quick, Hemacolor, Harris hematoxylin.

Dle **Hidalgo et al. (2006)** je subjektivní posuzování morfologie spermií ovlivněno nedostatkem přesnosti a opakovatelnosti, což vede k omezené využitelnosti morfologického hodnocení spermatu pro kvalitní predikci k reprodukci. Subjektivní hodnocení morfologie spermií na základě vizuálního pozorování vede k velmi rozdílným výsledkům vzhledem k řadě faktorů, jako je například použití různých postupů barvení nebo zkušenosti techniků. **Zaini et al. (1985)** uvádějí, že variabilita výsledků se může pohybovat v rozmezí 40 až 60 %.

Cestou, jak překonat problém subjektivity metod, založených na vizuálním posouzení, bylo zavedení automatizovaných systémů pro analýzu morfometrie spermií (ASMA) v roce 1990. Ačkoliv tato technologie byla původně navržena pro lidské spermie, postupně byla přizpůsobena některým druhům zvířat (**Iguer-Ouada et Versteegen, 2001; Estes et al., 2006; Saravia et al., 2007; Hidalgo et al., 2008**). Vývojem automatické analýzy morfometrie spermií (ASMA) se zlepšilo posouzení morfologie spermií s přesným a opakovatelným měřením rozměrů hlaviček spermií různých druhů, včetně hřebců (**Ball et Mohammed, 1995; Arruda et al., 2002; Soler et al., 2003; Hidalgo et al., 2005**).

ASMA systémy poskytují řadu objektivních parametrů, které usnadňují standardizaci morfologického hodnocení spermatu (**Yániz et al., 2015**). Těmito automatickými systémy lze také prokázat nepatrné rozdíly v rozměrech hlaviček spermií mezi plodnými a neplodnými hřebci (**Hidalgo et al., 2008**). Nicméně využití této metody vyžaduje pečlivou přípravu vzorku a jeho barvení za účelem snížení chyb digitalizace (**Davis et Gravance, 1993**).

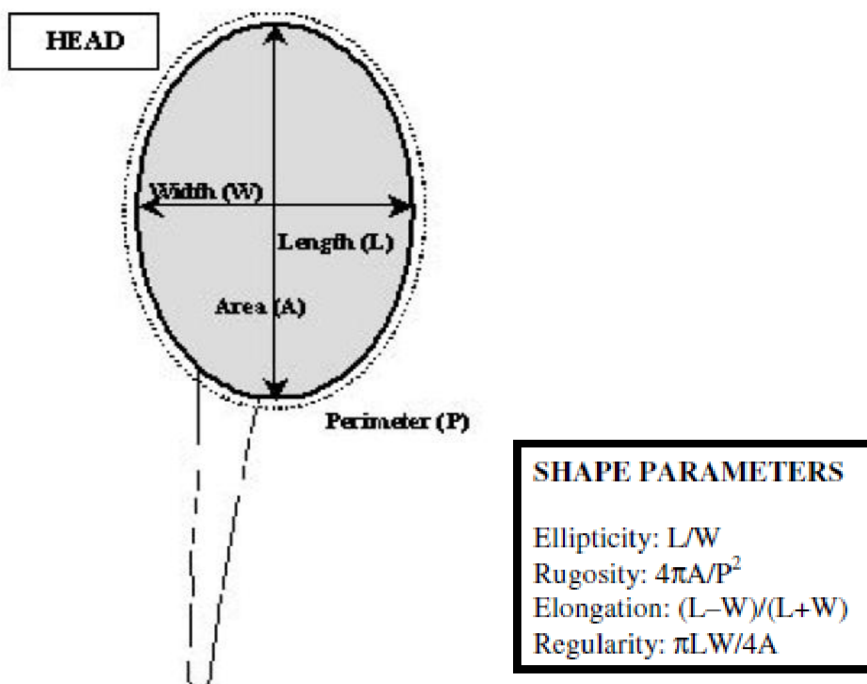
Přesnost ASMA systémů závisí na standardizaci analytických proměnných, využívaných pro každý druh, na odpovídající přípravě vzorku (fixace a barvení) a správné mikroskopické analýze obrazu (**Hidalgo et al., 2004**). Chyby vznikají často důsledkem rozdílů mezi jednotlivými ASMA systémy nebo nedostatečným počtem analyzovaných spermií (není reprezentativní vzorek).

2.6 MORFOMETRICKÁ ANALÝZA SPERMIÍ

Murphy et al. (2013) uvádějí, že i přes zdánlivou jednoduchost spermií, představují tyto specializované buňky obrovskou rozmanitost ve velikosti a tvaru u různých druhů. Spermie se liší tvarem a rozměry mezi druhy i mezi jednotlivci (**Downing- Meisner et al., 2005**).

Morfometrie spermií byla zkoumána u mnoha druhů savců. Většina studií je soustředěna na celou hlavičku spermie, s vysokou variabilitou v rámci druhu, převážně vysvětlovanou rozdíly v metodice. Spermie různých druhů savců mohou být klasifikovány podle velikosti a tvaru hlavičky/jádra. Hlavička spermie hřebce je oválně protáhlá, přičemž nejširší částí je přední třetina hlavičky. Hlavička je relativně plochá a podélný řez je přibližně eliptického tvaru s mírně zesílenou zadní částí (**Brito, 2007**). Délka hlavička spermie hřebce je 6,3 μm , šířka 3,2 μm (**Věžník et al., 2004**). **Samper (2009)** uvádí rozměry pro délku a šířku hlavičky spermie 6,6 μm a 3,6 μm .

K popisu morfometrických parametrů hlavičky spermie jsou využívány různé parametry. Primární parametry poskytují informace o rozměrech hlavičky spermie a obvykle zahrnují délku (L), šířku (W), plochu (A) a obvod (P) (obrázek 4). Odvozené parametry tvaru hlavičky jsou odhadovány pomocí řady matematických vzorců. Mezi tyto parametry patří například eliptičnost ($\text{Elip} = L/W$), drsnost ($\text{Rugo} = 4\pi A/P^2$), prodloužení ($\text{Elong} = (L-W)/(L+W)$) a pravidelnost ($\text{Regu} = \pi LW/4A$) (**Severa et al., 2010; Sanchez et al., 2013**). Vzhledem k tomu, že tyto parametry nevysvětlují všechny morfologické odchylky, pozorované u hlaviček spermií, využívá se pro sofistikovanější analýzu tvaru Fourierova analýza a geometrická morfometrie (**Ostermeier et al., 2001a, b; Thurston et al., 2001, Sanchez et al., 2013**).

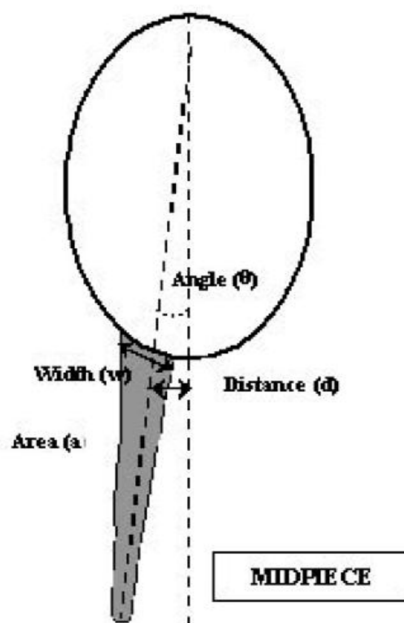


Obrázek 4 Popisované morfometrické parametry hlavičky spermie (Hidalgo et al., 2005)

Se zvyšující se velikostí všech buněčných komponentů se současně zvětšuje velikost spermií a následně jsou schopny produkovat více energie a pohybovat se rychleji (Tourmente et al., 2011, Sanchez et al., 2013). Spermie s větším prodloužením hlavičky mohou také dosáhnout větší rychlosti pohybu díky sníženému odporu a větší hydrodynamické efektivitě (Malo et al., 2006). Morfometrie hlavičky spermie může také určovat vhodnost konkrétní spermie ke kryokonzervaci (Thurston et al., 2001; Peňa et al., 2005). Studií morfometrie subpopulací spermií byly účinně prokázány rozdíly v mrazitelnosti mezi ejakuláty. Na základě toho lze předpokládat, že rozdíly mezi tvarem spermií a buněčným objemem mohou být zodpovědné za rozdíly v rychlosti výměny vody skrz plazmolemu během procesu zmrazení-rozmrazení, a tak vznikají různé osmotické gradienty v různých subpopulacích spermií (Núñez-Martínez et al., 2007).

Morfometrické parametry jádra spermie by měly úzce korespondovat s morfometrickými parametry hlavičky (Ostermeier et al. 2001a; Núñez-Martínez et al., 2005). Yániz et al. (2015) uvádějí, že analýza dalších akrozomálních parametrů, jako jsou plocha a obvod akrozomu, by mohly být zajímavé, ale že nejčastěji popsaným rozměrem je pouze podíl hlavičky krytý akrozomem.

Současné poznatky o morfometrii spojovací části spermie jsou poměrně nízké. Většina studií je zaměřena na měření délky spojovací části za použití světelné mikroskopie a analýzy obrazu (Morrow et Gage, 2001; Malo et al., 2006; Aggarwal et al., 2007; Brito et al., 2010). Analýza této struktury může poskytnout cenné informace nejen o délce, šířce a ploše spojovací části, ale také o vzdálenosti mezi hlavní osou hlavičky a spojovací části a úhlu divergence spojovací části od hlavní osy hlavičky (obrázek 5). Proto by se měl další výzkum věnovat vyhodnocení této struktury. Existují práce, které prokazují souvislost mezi délkou spojovací části spermie a motilitou (Gil et al., 2009; Lupold et al., 2009). Délka spojovací části může mít vliv na množství energie vyrobené v mitochondriích (Bierla et al., 2007). Naopak studie Malo et al. (2006) prokázala, že spermie s delší spojovací částí se pohybují pomaleji než spermie, jejichž délka spojovací části je kratší. Toto zjištění ovšem nepodporuje hypotézu, že velikost spojovací části determinuje množství energie, které je převedeno do rychlosti pohybu. Věžník et al. (2004) uvádějí délku spojovací části spermii hřebce 8,6 μm . Pesch et Bergmann (2006) uvádějí délku 8 až 10,5 μm a průměr 0,6 μm . Dle Sampera (2009) je spojovací část dlouhá 9,8 μm .



Obrázek 5 Popisované morfometrické parametry spojovací části spermie (Hidalgo et al., 2005)

Rychlost spermie a potenciální schopnost oplodnit vajíčko lze determinovat také z bičíku spermie, který by měl být proto hodnocen společně se spojovací částí (**Malo et al., 2006; Kondracki et al., 2011**). ASMA systémy se však soustřeďují především na hlavičky spermií z důvodu ztížené detekce bičíků spermií (**Soler et al., 2003**). Existuje sice několik studií, zabývajících se hodnocením délky bičíku u různých druhů, ale jen málo z nich využívá pro stanovení délky bičíku spermie systém ASMA (**Serres et al., 1983; Gage, 1998; Morrow et Gage, 2001; Kondracki et al., 2005; Malo et al., 2006; Aggarwal et al., 2007; Brito et al., 2010; Kondracki et al., 2011**). Co se týče délky bičíku, tak i zde byla prokázána pozitivní korelace s rychlostí pohybu (**Malo et al., 2006**). **Noorafshan et Karbalay-Doust (2010)** pozorovali přítomnost spermií s kratšími bičíky ve vzorcích spermatu s nízkou pohyblivostí v porovnání se spermatem, obsahujícím vysoké procento progresivně motilních spermií.

Morfometrické výsledky se mohou lišit v závislosti na různých vnitřních a vnějších faktorech.

Vnitřní faktory mohou zahrnovat například genetické faktory, věk a pohlavní dospělost. Účinky genotypu ovlivňují strukturu spermií, je proto pravděpodobné, že odchylky v morfologii spermií vznikají v průběhu spermatogeneze (**Marti et al., 2011a**). Konečná morfologie spermií je definována během průchodu nadvarlaty, kde zrání buněk zahrnuje změny ve složení membrány, DNA a struktury akrozomu (**Yeung et al., 1997; Tablado et al., 1998; Gago et al., 2000; Oberpenning et al., 2000**) a dále přítomnost cytoplazmatických kapek (**Cooper, 2011**). Vnější faktory zahrnují environmentální faktory, dále faktory související se zpracováním vzorku (příprava vzorku, fixace a barvení spermií) a samotnou morfometrickou analýzu (**Yániz et al., 2015**). Několik studií se také zabývalo hodnocením vlivu výživy na morfometrii spermií. Obecně se předpokládá, že sušení, fixace a barvení významně snižují rozměry spermií – u hřebců bylo toto snížení kvantifikováno na přibližně 20 % v délce a 13 % v šířce (**Ball et Mohammed, 1995**).

Významný vliv na morfometrické výsledky může mít také optika, intenzita osvětlení, počet analyzovaných spermií na vzorek, technik a nastavení analyzátoru spermií – standardizace pro daný druh. Závěrem je možné říci, že výsledky

morfometrie spermií mohou ovlivnit různé faktory a že tato metoda musí být standardizována pro poskytování spolehlivých výsledků (Yániz et al., 2015).

2.7 ŘEDĚNÍ A KONZERVACE EJAKULÁTU

Důležitou otázkou rozvoje umělé inseminace je problém uchování oplozovací schopnosti a životnosti spermií mimo organismus po dlouhou dobu. Cílem konzervace ejakulátu je tedy zachovat dobrou oplozovací schopnost a životaschopnost spermií vytvořením vhodného prostředí pro spermie a také zvětšit objem spermatu. Vliv vnějšího prostředí při konzervaci spermatu se projevuje zejména v tom, že proti přirozeným podmínkám musí spermie překonat teplotní změny, ochlazení a znovuzahřátí, na které nejsou připraveny. Hromaděním a působením vlastních zplodin látkové výměny dochází ke změně pH, k vyčerpání výživných látek ještě před zavedením spermatu do pohlavních orgánů samice, k delšímu nežádoucímu působení semenné plazmy na spermie, ke změně metabolických pochodů při zvyšování a snižování teplot, k rychlejší ztrátě elektrického náboje a k aglutinaci spermií. Aby konzervace splnila účel, musí zachovat charakteristické vlastnosti spermií a při všech probíhajících změnách zajistit takovou funkci semene, jakou mělo v okamžiku odběru. Účelem konzervace je dále omezit metabolické pochody v co nejkratší době na co nejnižší stupeň, zachovat energetický potenciál spermií a jejich elektrický náboj (Kliment et al., 1989). Konzervací se snižuje aktivita intracelulárního vápníku ve spermiích a dochází k porušení buněčné homeostáze (Louda, 2001).

Ředění spermatu

Nedílnou součástí konzervace je ředění spermatu. Účelem ředění spermatu je především vytvořit vhodné prostředí pro spermie a zvětšení objemu semene → zajištění podmínek pro přežívání spermií mimo organismus (in vitro). Životními projevy, jako je dýchání spermií, vznikají v ejakulátu produkty látkové výměny, například kyselina mléčná. Ta postupně okyseluje prostředí, zpomaluje pohyb spermií, navozuje anabiózu a jejich odumření (Mutalík et al., 2014). Ředidla jsou důležitou součástí programů umělé inseminace, neboť zvyšují životaschopnost spermií a umožňují transport a skladování spermatu několik dnů (Dietz et al., 2007). Ředidlo musí být zdrojem energie pro spermie, musí mít dobrou pufrovací

schopnost, musí obsahovat malé množství elektrolytů, musí zajistit požadovaný osmotický tlak, stálou hodnotu pH a nesmí být pro spermie toxické (**Rasul et al., 2000**). Teplota přidávaného ředidla i ředěného ejakulátu musí být stejná, aby se předešlo chladovému šoku (**Ball et Peters, 2004**). Dalším cílem ředění je vyrobit maximální počet inseminačních dávek, které odpovídají biologickým požadavkům pro zajištění úspěšného oplození (**Louda et al., 2001**).

Louda et al. (1980) uvádí, že za účelem udržení oplozovací schopnosti spermií se provádí konzervace spermatu, při které se do něho přidávají výživné látky, jako např. vaječný žloutek, jednoduché cukry, citrát sodný a další látky, specifické pro jednotlivé druhy spermatu a způsoby konzervace. Současně s konzervací se provádí i snižování teploty, což omezuje metabolické pochody ve spermatu, a tím prodlužuje jeho životnost a oplozovací schopnost.

Způsob ředění a způsob konzervace se vzájemně podmiňují. Při umělé inseminaci můžeme použít čerstvé sperma, krátkodobě konzervované sperma, či dlouhodobě konzervované sperma, z čehož vyplývají jednotlivé technologické postupy (**Klimet et al., 1989**).

Dlouhodobá konzervace

Dlouhodobě konzervované sperma je konzervované převážně zmrazením a uchovává se v tekutém dusíku. Takto konzervované sperma si zachovává svou oplozovací schopnost po desítky let. Ředidlo pro zmrazení spermatu je na rozdíl od ředidla pro krátkodobou konzervaci obohaceno o kryoprotektivní látky. Tyto látky chrání spermie v procesu zmrazení a rozmrazení. Jako kryoprotektivum se téměř výhradně při zmrazení využívá glycerin. Po ředění se sperma ochladí a poté se zamrazuje většinou v pejetách o obsahu 0,5 – 4 ml nebo v hliníkových tubách o obsahu 7 – 15 ml (**Müller, 2006**). Sperma může být mraženo také do pelet o velikosti 0,1 cm³, 0,5 cm³ a 1 cm³ při rozdílné koncentraci glycerinu. Bylo zkoušeno i mražení odstředěného spermatu v pejetách o objemu 5 – 6 cm³ (**Louda et al., 2001**).

Rychlost poklesu teploty při zmrazování hraje důležitou roli. Proto se využívá programovatelných automatických zmrazovačů. Po zmrazení se uchovává inseminační dávka spermatu v kontejnerech s kapalným dusíkem při teplotě - 196 °C (**Müller, 2006**).

U hřebců existují výrazné individuální rozdíly v mrazitelnosti ejakulátu, s ohledem na oplozovací schopnost spermií po rozmrazení. Byl prokázán vliv individuálního složení semenné plazmy na mrazitelnost spermií. Dále byla zjištěna, pomocí elektronové mikroskopie, vyšší frekvence porušení akrozómu u mraženého spermatu hřebců s nižší oplozovací schopností po rozmrazení (**Louda et al., 2001**).

Následný proces rozmrazování je také důležitý pro přežitelnost spermií stejně jako proces zmrazení. Rychlost rozmrazování inseminační dávky významně ovlivňuje přežitelnost spermií. Je ovlivněna řadou faktorů jako je typ ředidla, koncentrace glycerolu, způsob plnění pejet a rychlost zmrazování (**Rodriguez et al., 1975**).

Krátkodobá konzervace

Odebrané sperma se ředí v poměru 1:1, poměr ředění je volen tak, aby v 1 cm³ ředěného spermatu bylo obsaženo minimálně 20 milionů spermií s progresivním pohybem vpřed. Po ředění je sperma nasáto do jednorázové injekční stříkačky v množství 10 cm³ a umístěno do chladničky o teplotě 4 °C na 1 hodinu (**Louda et al., 2001**). Sperma určené pro krátkodobé použití se uchovává při teplotě 4 - 6 °C, která je považována za optimální skladovací teplotu pro udržení motility a oplozovací schopnosti spermatu a je doporučována kvůli snížené metabolické aktivitě spermií (**Varner et al., 1988; Moran et al., 1992; Love et al., 2002**). Nejkritičtější krokem pro spermie je chlazení na skladovací teplotu. Chlazení snižuje metabolickou aktivitu spermií a redukuje mikrobiální růst a aktivitu (**Varner et al., 1989; Love et al., 2002**). Při chlazení působí na spermie řada nepříznivých vlivů, souhrnně nazývaných jako chladový šok, při kterém dochází k nevratným změnám na plazmatické membráně spermie a ztrátě progresivního pohybu (**Chantler et al., 2000; Drobnis et al., 1993**). Spermie jsou obvykle ochlazovány pomalu a opatrně, aby se částečně zabránilo negativním vlivům chlazení. Sperma může být rychle ochlazeno z 37 °C na 20 °C. V teplotní zóně mezi 19 až 8 °C jsou spermie hřebce citlivé na chladový šok a rychlost ochlazování je třeba snížit na 0,05 °C/min. Poranění spermií se obecně snižuje, pokud je rychlost ochlazování nízká (< 0.3 °C/min). Rychlé ochlazování může být obnoveno pod teplotou 8 °C (**Katila, 1997; Amann et Pickett, 1987; Louda et al., 2001**).

Zchlazené spermie zůstávají životaschopné jen pár dní nebo dokonce hodin a rychle ztrácí fertilizační schopnost (**Moran et al., 1992**). Fertilita chlazeného spermatu není obvykle zachována déle než 24 – 48 hodin, proto by k inseminaci mělo dojít nejpozději do 12 – 48 hodin po jeho odběru, přičemž doba je závislá na zvoleném použití ředidla a technologii zpracování.

V průběhu let bylo pro chlazené sperma navrženo velké množství ředidel, kombinujících různé komponenty (cukry, elektrolyty, pufrы, vaječný žloutek, mléko a mléčné produkty) (**Kliment et al., 1989**). Většina z ředidel je založena na bázi odstředěného mléka a vaječného žloutku (**Jasko et al., 1992; Moran et al., 1992; Bergeron et Manjunath, 2006; Aurich, 2005**). Vaječný žloutek obsahuje výživné látky, chrání spermie koloidním obalem proti nepříznivému vlivu vnějšího prostředí. Syrový žloutek obsahuje lecitin a lipoidproteinový komplex, které zvyšují odolnost spermií proti chladovému šoku (**Kliment et al., 1989**). Předpokládá se, že vaječný žloutek stabilizuje plazmatickou membránu tím, že neutralizuje škodlivé složky v semenné plazmě (**Aurich, 2005**). Ředidla na žloutkové bázi chrání především povrchové membrány spermií (**Müller, 2006**). Mléko a ředidla na bázi mléka jsou známá jako praktická a účinná při ochraně spermií během chlazení a skladování před AI (**Michajilov, 1950; Kenney et al., 1975; Palmer, 1984**). Mléko se používá jako koloidní prostředek, který stabilizuje elektrický náboj spermií, zabraňuje aglutinaci a snižuje nebezpečí chladového šoku. Mléčná bílkovina působí jako ochranný koloid spermií. Aktivní složky mléka, které se podílejí na ochraně spermatu, jsou kaseinové micely, které zajišťují ochranu proti odstranění fosfolipidů a cholesterolu z plazmatické membrány (**Kliment et al., 1989**). Hlavním problémem ředidel na bázi mléka a vaječného žloutku však je, že mléko i vaječný žloutek jsou biologické produkty s komplexním složením. Kromě složek s příznivými účinky na cytoplazmatické membrány spermií mohou obsahovat také škodlivé, nebo dokonce toxické látky (**Batellier et al., 2001**). Proto byly vyvinuty různé modifikace těchto dvou základních ředidel s lépe stanoveným složením. Z tohoto důvodu ředidla s definovaným složením, obsahující pouze složky se zřetelně ochrannými účinky na skladované sperma, jsou výhodou (**Aurich, 2005; Lagares et al., 2012**).

Některá komerční ředidla nahrazují mléko definovanou mléčnou frakcí (**Lagares et al., 2012**). Frakcionací mléka pomocí různých metod byla umožněna příprava čistých proteinových frakcí. Bylo zjištěno, že nativní fosfokaseináty (NPPC) a β -laktoglobuliny jsou nejúčinnější pro dlouhověkost spermií během chlazení

a skladování (**Battelier et al., 2001; Pellicer-Rubio et Combarrous, 1998**) a jsou hlavními složkami mléčných ředidel. Ředidla obsahující jen tyto definované komponenty byla vyvinuta ve Francii (INRA 96©, IMV, L'AigleC'edex, France). **Battelier et al. (1997)** vyvinuli ředidlo INRA 96, což je chemicky definované médium s NPPC nahrazujícím odstředěné mléko.

Další společnosti zkusily vytvořit podobná ředidla, obsahující jen definované složky mléka (např. EquiPro, Minitüb). V případě vaječného žloutku byla úspěšně tato látka nahrazena sójovým lecitinem. Toto ředidlo (AndroMed©, Minitüb) bylo nejprve vyvinuto pro konzervaci býčího ejakulátu, ovšem modifikace ředidla Andromed ukázala slibné výsledky rovněž při skladování chlazeného ejakulátu hřebců (**Aurich, 2005**).

3. HYPOTÉZA

Chov koní v ČR je zaměřen více na sportovní výkonnost, než na ukazatele reprodukce či výsledky plodnosti a plodnost se tak stává opomíjenou užitkovou vlastností. Při výběru plemeníka rozhoduje spíše jeho výkonnost, případně jeho charakter, než reprodukční ukazatele. Tento stav je podpořen také skutečností, že výsledky plodnosti a hodnoty reprodukčních ukazatelů nejsou chovatelské veřejnosti k dispozici. Proto by se reprodukční ukazatele v chovu koní měly zařadit mezi základní kritéria výběru plemenných koní. Jednou z možností je poskytnout chovatelům materiál, který bude podávat potřebné informace k výběru hřebce z hlediska jeho plodnosti.

Pro zpracování práce byly formulovány následující hypotézy:

1. Objektivně zpracované informace o kvalitě spermatu hřebců by mohly poskytnout důležité podklady nejen pro chovatele, ale především pro chovatelské organizace, které by mohly podle výsledků kvality spermatu rozhodovat o vhodnosti hřebce pro zařazení do plemenitby.
2. Vzhledem ke skutečnosti, že byly u hřebců prokázány korelace mezi morfometrickým hodnocením hlavičky spermií a plodností, by detekce morfometrických parametrů hlaviček spermií mohla vést k přesnějšímu ověření plodnosti hřebců.
3. Lze předpokládat, že morfologicky větší spermie jsou schopny produkovat více energie a mohou tak dosáhnout větší rychlosti pohybu a zvýšení parametrů motility.
4. Je pravděpodobné, že kvalitativní parametry chlazeného spermatu mohou být významně ovlivněny také jeho zpracováním, zejména pak výběrem vhodného ředidla pro výrobu inseminačních dávek.

4. CÍL PRÁCE

V souvislosti s vyšším počtem klisen zapouštěných umělou inseminací oproti přirozené plemenitbě je důležitá pravidelná kontrola kvality spermatu hřebců. U plemenných hřebců je třeba provádět základní hodnocení kvality ejakulátu před jejich zařazením do chovu, před začátkem připouštěcí sezóny a periodicky v průběhu připouštěcí sezóny.

Cílem práce bude zpracovat přehled o kvalitě spermatu hřebců využívaných v inseminaci čerstvým spermatem v Zemském hřebčinci v Písku.

V návaznosti na formulované hypotézy byly stanoveny následující cíle práce:

1. Vyhodnotit základní charakteristiky ejakulátu hřebců na základě objektivního hodnocení metodou CASA.
2. Posoudit morfometrické parametry spermií na základě velikosti a tvaru hlaviček spermií.
3. Posoudit pohybové charakteristiky spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček.
4. Vyhodnotit vliv vybraných ředidel na kvalitativní parametry ejakulátu (motilitu a životaschopnost spermií).

5. MATERIÁL A METODIKA

5.1 Materiál

Sledování kvalitativních parametrů ejakulátu bylo provedeno na 11 plemenných hřebcích teplokrevných plemen, kteří byli v majetku Zemského hřebčince Písek. Věk hřebců se pohyboval v rozmezí 3 až 22 let. Všichni hřebci byli využíváni v inseminaci čerstvým spermatem. Od hřebců byl odebírán ejakulát a následně byl zpracováván formou krátkodobě konzervovaných inseminačních dávek čerstvého zchlazeného spermatu. Plemenní hřebci byli ustájeni ve stejných podmínkách (boxy 5 x 5 m). Krmná dávka obsahovala 11 kg sena, 1 kg slámy, 3 kg ovsa a přídatek na doplnění minerálních látek a vitamínů (PREMIN pro plemenné hřebce, granulovaná krmná směs STARFIT). U mladších hřebců, zařazených do sportovní testace, byl podíl jaderné složky vyšší v závislosti na výdeji energie při sportovní zátěži (přídatek 1 kg granulované směsi).

5.2 Metodika

Vzorky ejakulátů byly získávány za běžného provozu reprodukčního centra a prioritou bylo zajištění potřebného množství ejakulátu pro výrobu inseminačních dávek, které byly následně distribuovány chovatelům.

Vlastní odběry ejakulátu probíhaly v prostorách Zemského hřebčince v Písku. Hřebci byli odebíráni na fantomu za přítomnosti klisny. Všichni hřebci měli během připouštěcí sezóny stejnou frekvenci odběru ejakulátu (2 až 3 krát za týden). Sperma bylo odebíráno do uzavřené umělé vagíny typu Colorado (obrázek 6), v jejímž vnitřním prostoru byl umístěn jednorázový sběrač ejakulátu z PVC folie.



Obrázek 6 Umělá vagína typu Colorado

Bezprostředně po odběru byl odebraný ejakulát filtrován přes sterilní gázu (z důvodu odstranění gelové frakce) a následně byl zaznamenán objem ejakulátu (kalibrovaná kádinka temperovaná na teplotu 37 °C). Poté bylo sperma naředěno předeřátým ředidlem (37 °C) v poměru 1:1-2. Naředěné vzorky ejakulátu byly 20 minut ekvilibrovány při pokojové teplotě bez přístupu světla a následně byly umístěny do chladničky, kde proběhlo zchlazení na 5 °C. Takto zchlazené vzorky ejakulátu byly převezeny do laboratoře ZF JU v Českých Budějovicích, kde byly vyhodnoceny ostatní parametry pomocí objektivní metody CASA (počítačové analýzy spermatu) za použití komerčního systému SCA (Sperm Class Analyzer, Microptic SL, Barcelona, Španělsko). Součástí tohoto systému je optický mikroskop (Nikon ECLIPSE E200LED MV Series) s fázovým kontrastem a vyhřívaným stolkem (37 °C), digitální kamera (Basler Color) zabudovaná v mikroskopu pro zachycení obrazů a jejich přenosu do počítače (Genuine Intel Core i5).

5.2.1 Hodnocení základních charakteristik ejakulátu hřebců a posouzení pohybových charakteristik spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček

Vzorky byly získány během připouštěcích sezón 2016 a 2017 (duben až červenec). Od 10 hřebců bylo v roce 2016 získáno celkem 32 vzorků ejakulátu (čtyři odběrové termíny - duben 8, květen 9, červen 8 a červenec 7 vzorků spermatu) a 36 vzorků za připouštěcí sezónu 2017 (čtyři odběrové termíny - duben 10, květen 9, červen 10 a červenec 7 vzorků spermatu). U odebraných vzorků byl sledován objem ejakulátu (ml), koncentrace spermií (M/ml), motilita spermií s jednotlivými kinematickými parametry, životaschopnost (živé/mrtvé spermie, %) a morfologie spermií s morfometrickými parametry. Pro morfometrickou analýzu bylo vyhodnoceno celkem 3 200 spermií v roce 2016 a 3200 spermií v roce 2017. Hodnocení fertility vycházelo z údajů za celou připouštěcí sezónu.

Motilita spermií byla objektivně stanovena prostřednictvím modulu Sperm Class Analyzer® Motility and concentration. Tento modul pro automatickou analýzu motility a koncentrace spermií je založen na analýze 16 na sebe navazujících digitalizovaných fotografických snímků získaných z jednoho pole. Těchto 16 po sobě jdoucích fotografií je pořízeno s odstupem 0,64 s, což znamená rychlost snímání obrazu jedné fotografie každých 40 ms. Spermie jsou detekovány automaticky.

Vzorky jsou analyzovány pod negativním fázovým kontrastem (Ph-) a 10x objektivem (100x zvětšení) se zeleným filtrem. Pro analýzu byla ze vzorků spermatu odebrána alikvota, která byla předeřhřáta na teplotu 37 °C po dobu 10 minut. Předeřhřáté Leja podložní sklíčko (4komorové, hloubka 20 mikronů) bylo naplněno 3 μ l naředěného a předeřhřátého spermatu a bylo hodnoceno 10 zorných polí. Finální koncentrace spermií po analýze byla 30 - 50 x 10⁶/ml, přičemž v jednom zorném poli bylo analyzováno přibližně 100 - 200 spermií. U vzorků spermatu byly hodnoceny následující parametry - MOT (celková motilita, %), PMOT (progresivní motilita, %), VAP (průměrná rychlost, μ m/s), VCL (křivočará rychlost, μ m/s), VSL (přimočará rychlost, μ m/s), STR (přímost, VSL/VAP, %), LIN (linearita, VSL/VCL, %), WOB (kmitání, VAP/VCL, %), ALH (amplituda bočního pohybu hlavičky, μ m) a BCF (frekvence kmitání, Hz). Podle křivočaré rychlosti (VCL) byly spermie rozlišeny podle rychlosti pohybu na rychlé (> 90 μ m/s), středně rychlé (45 – 90 μ m/s), pomalé (10 – 45 μ m/s) a statické. Spermie byly považovány za progresivní při nejméně 75 % přímosti (STR). Ve stejném modulu byla současně s hodnocením motility objektivně stanovena také koncentrace spermií v M/ml

Vitalita (životaschopnost) spermií byla systémem Sperm Class Analyzer® Vitality modul analyzována za pomoci fluorescenčního barvení vzorku ejakulátu, kdy živé spermie se pomocí fluorescenčních kitů barví modře a mrtvé nebo oslabené spermie červeně. Pro hodnocení vitality spermií bylo využito vitální fluorescenční barvení FluoVit (Microptic SL). Vzorek spermatu (10 μ l) byl postupně inkubován při 37 °C nejprve s 1 μ l modrého kitu (Hoechst 33342, Trihydrochlorid Trihydrat 330/380) po dobu 5 minut a poté s 1 μ l červeného kitu (Propidium jodid 536/617) FlouVit po dobu 5 minut. Z takto vytvořeného vzorku byly poté odebrány 4 μ l spermatu a pozorovány pod mikroskopem. Na mikroskopu byl nastaven DAPI filtr (EX 330-380, DM 400, BA 420, standardní filtr pro UV), 20x objektiv a fluorescence. Pro analýzu bylo hodnoceno min. 200 spermií v jednotlivých zorných polích, z čehož byl stanoven počet a procento živých a mrtvých spermií ve vzorku.

Morfometrická analýza hlaviček spermií byla hodnocena s použitím Sperm Class Analyzer® Morphology module. Preparát byl zhotoven z 20 μ l spermatu, ze kterých byl na podložním sklíčku proveden roztěr a po zaschnutí obarven barvivem SpermBlue (Microptic SL). Po zaschnutí použitého barviva byly vzorky fixovány za použití Eukitt mounting media (Microptic SL) a krycího sklíčka. Pro hodnocení morfologie byl na mikroskopu nastaven modrý filtr, 100x objektiv

s olejovou imerzí a procházející světlo (A). V každém preparátu bylo analyzováno 100 spermií. Spermie byly analyzovány náhodně v různých oblastech preparátu, bez překrývajících se spermií. Digitalizované buňky byly automaticky segmentovány na základě automatického algoritmu pro definování kontrastu mezi buňkou a polem. SCA systém detekuje hranici hlaviček spermií a spojovacích částí. Za účelem získání správného obrazu musí spermie kontrastovat s pozadím vzorku a nesmí být přítomny žádné částice, které by zasahovaly do zobrazení spermií. U všech analyzovaných spermií bylo automaticky vypočítáno osm morfometrických parametrů, čtyři definující velikost hlavičky – délka (L, μm), šířka (W, μm), plocha (A, μm^2) a obvod (P, μm) hlavičky a čtyři derivované parametry pro tvar hlavičky – eliptičnost (Elip = L/W), drsnost (Rugo = $4\pi A/P^2$), prodloužení (Elong = $(L-W)/(L+W)$) a pravidelnost (Regu = $\pi LW/4A$). Rozměry jednotlivých spermií byly zaznamenány v programu Microsoft Exel.

Fertilita byla pro každého hřebce vypočtena na základě počtu zjištěných březích klisen děleného celkovým počtem zapuštěných klisen hřebcem a byla vyjádřena v procentech.

5.2.2 Vliv vybraných ředidel na motilitu a životaschopnost spermií

Vzorky byly odebrány před začátkem připouštěcí sezóny 2018. Od 11 hřebců bylo odebráno celkem 21 vzorků ejakulátu. Každý odebraný ejakulát byl rozdělen na 3 alikvoty a ke každé alikvotě bylo přidáno jedno ze tří ředidel (předehřáté na teplotu 37 °C) v poměru 1:1. Celkově tedy bylo pro posouzení vlivu použitého ředidla hodnoceno 63 vzorků ejakulátu.

Byla testována dvě komerčně dostupná ředidla (INRA 96 a EquiPlus) a jedno privátně připravené ředidlo (Kenney).

INRA 96 (Ref. 016441, IMV Technologies, Saint-Ouen-Sur-Iton, Francie) je chemicky definované ředidlo obsahující Hanksovi soli, glukózu (67 mM) a laktózu (126 mM), doplněné o purifikovanou mléčnou frakci a nativní fosfokaseinát (27 g/l).

EquiPlus (Ref. 13570/0202, Minitüb, Tiefenbach, Německo) obsahuje definované kaseináty, glukózu, sacharózu, pufr a antibiotika (linkomycin a spektinomycin). Prášková forma tohoto ředidla byla rozpuštěna ve vodě (Double Distilled Water, pyrogen-free and sterile, Ref. 13570/1000, Minitüb, Tiefenbach, Německo) podle pokynů výrobce.

Ředidlo Kenney je založeno na bázi glukózy a odtučněného mléka a obsahuje 2,4 g sušeného odstředěného mléka, 4,9 g monohydrátu glukózy, 100 ml redestilované vody a antibiotika (0,15 g dihydrostreptomycinu a 0,15 g penicilinu). Toto ředidlo bylo vytvořeno v laboratoři Písek - Nový Dvůr speciálně pro potřeby Zemského hřebčince.

Takto vytvořených 63 vzorků ejakulátu bylo po ekvilibraci a zchlazení na 5 °C opět transportováno do laboratoře JU v Českých Budějovicích a následně hodnoceno. NA SCA analyzátoru byla výše popsaným způsobem stanovena motilita spermií s jednotlivými kinematickými parametry a vitalita spermií.

Tyto parametry byly u každého vzorku měřeny po zchlazení na 5 °C (2 hodiny) a následně po 24, 48 a 72 hodinách při skladování v této teplotě.

5.3 Zpracování dat

Zpracování dat bylo provedeno v programech Ms Office a Statistica 12 (StatSoft®). Soubory dat byly testovány pro normální distribuci pomocí Kolmogorova-Smirnovova testu. Rozdíly mezi hřebci v jednotlivých parametrech motility a morfometrických parametrech byly analyzovány pomocí jednofaktorové ANOVY, využitím Tukeyova testu pro vícenásobné porovnání. Rovněž účinek ředidla na vlastnosti chlazeného spermatu byl hodnocen pomocí analýzy rozptylu s opakovaným měřením.

Závislost mezi morfometrickými parametry hlavičky (délka, šířka, obvod, plocha, prodloužení a eliptičnost hlavičky) a parametry rychlosti spermií (MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, BCF) byla hodnocena pomocí korelační a regresní analýzy.

Pro hodnocení vlivů byla data rozdělena podle věku a fertility hřebců. Podle věku byli hřebci rozděleni do tří skupin: do první skupiny (n = 4) byli zařazeni hřebci do 5 let včetně, druhou skupinu (n = 3) tvořili hřebci ve věku 6 - 15 let a do třetí skupiny (n = 3) byli zařazeni hřebci starší 15 let. Podle fertility pak byli hřebci rozděleni do čtyř skupin. Fertilita ve skupině 1 (n = 3) byla > 80 %, 69 - 79 % ve skupině 2 (n = 2), 60 - 68 % ve skupině 3 (n = 3) a 50 - 59 % ve skupině 4 (n = 2).

Statistická průkaznost byla hodnocena na hladině významnosti $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**) a $P < 0,05$ (*), tendence průkaznosti byla definováno jako $0,05 < P < 0,10$ (+).

Charakteristika dat byla provedena pomocí popisných statistik, konkrétně byl uváděn počet pozorování, průměr, minimum, maximum, směrodatná odchylka a variační koeficient. Část dat pak byla prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Hodnocení základních charakteristik ejakulátu hřebců metodou CASA

Zjištěné průměrné hodnoty základních charakteristik ejakulátu hřebců, včetně jednotlivých kinematických parametrů motility a morfometrických parametrů hlaviček spermií ve sledovaných přípouštěcích sezónách 2016 a 2017, jsou uvedeny v tabulkách 1-6.

Tabulky 1 a 2 znázorňují popisné statistiky pro objem ejakulátu, koncentraci spermií, celkovou motilitu, progresivní motilitu, vitalitu spermií a procento morfologicky normálních spermií. V roce 2016 byly u získaných vzorků ejakulátu zjištěny následující průměrné hodnoty - objem ejakulátu $49,22 \pm 31,28$ ml, koncentrace spermií $208,20 \pm 83,69$ M/ml, celková motilita spermií $82,44 \pm 11,02$ %, progresivní motilita spermií $37,34 \pm 16,16$ %, vitalita spermií $60,71 \pm 18,23$ % a morfologicky normální spermie $75,00 \pm 15,81$ %. V roce 2017 byl zjištěn objem ejakulátu $56,77 \pm 40,78$ ml, koncentrace spermií $222,19 \pm 96,40$ M/ml, celková motilita spermií $81,38 \pm 10,78$ %, progresivní motilita spermií $35,46 \pm 15,82$ %, vitalita spermií $42,91 \pm 16,76$ % a $64,50 \pm 24,58$ % morfologicky normálních spermií. Dosažené průměrné hodnoty základních parametrů ejakulátu jsou v souladu s požadavky na sperma pro krátkodobou konzervaci a dále také s prací **Quintero-Moreno et al. (2003)**, kde byl zjištěn průměrný objem ejakulátu 49,2 ml, koncentrace spermií $304,8 \times 10^6$ /ml a celková motilita 88,9 % a s prací **Hidalgo et al. (2005)** (objem ejakulátu 43 ml, koncentrace spermií 169×10^6 /ml, celková motilita 77 % a 72 % morfologicky normálních spermií. V práci **Florez-Rodriguez et al. (2014)** byly u chlazeného spermatu (5 °C) měřeny stejné parametry, které se v závislosti na použitém ředidle pohybovaly v následujícím rozmezí: celková motilita 80,3 až 85,4 %, progresivní motilita 29,2 až 35,6 %, Ve studii **Rezagholizadeh et al. (2015)** byla zjištěna celkové motilita 87,06 %, progresivní motilita 44,54 %,

Tabulka 1 Popisné statistiky základních charakteristik ejakulátu hřebců v roce 2016

Parametr	n	\bar{x}	Min	Max	V_x	S_x
Objem ejakulátu (ml)	32	49,22	10,00	130,00	63,55	31,28
Koncentrace spermií (M/ml)	32	208,20	53,08	371,63	40,20	83,69
Celková motilita (MOT, %)	32	82,44	62,16	98,96	13,37	11,02
Progresivní motilita (PMOT, %)	32	37,34	2,96	69,74	43,28	16,16
Vitalita (%)	32	60,71	17,05	84,69	30,03	18,23
Morfologicky normální spermie (%)	32	75,00	31,00	92,00	21,08	15,81

Tabulka 2 Popisné statistiky základních charakteristik ejakulátu hřebců v roce 2017

Parametr	n	\bar{x}	Min	Max	V_x	S_x
Objem ejakulátu (ml)	36	56,77	10	200	71,83	40,78
Koncentrace spermií (M/ml)	36	222,19	73,77	397,35	43,39	96,40
Celková motilita (MOT, %)	36	81,38	42,94	97,55	13,25	10,78
Progresivní motilita (PMOT, %)	36	35,46	3,90	66,24	44,61	15,82
Vitalita (%)	36	42,91	15,99	72,66	39,06	16,76
Morfologicky normální spermie (%)	36	64,50	14	97	38,11	24,58

Motilita spermií byla dále charakterizována jednotlivými kinematickými parametry (tabulka 3 a 4), jejichž průměrné hodnoty za rok 2016 a 2017 byly následující: rychlost na křivočaré dráze (VCL) 62,67 a 60,26 $\mu\text{m/s}$, přímočará rychlost (VSL) 32,10 a 27,55 $\mu\text{m/s}$, průměrná rychlost (VAP) 48,14 a 44,35 $\mu\text{m/s}$, linearita křivočaré dráhy (LIN) 50,64 a 44,89 %, linearita průměrné dráhy (STR) 66,56 a 62,01 %, míra kmitání skutečné dráhy kolem průměrné dráhy (WOB) 75,74 a 72,12 %, amplituda bočního posunu hlavičky po její průměrné dráze (ALH) 2,59 a 2,90 μm , frekvence bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy (BCF) 7,32 a 7,49 Hz.

Podobné hodnoty kinematických parametrů motility byly zjištěny autory **Quintero-Moreno et al. (2003)** (VAP 40,3 $\mu\text{m/s}$, LIN 56,13 %, WOB 64,7 % a BCF 13,56 Hz) a rovněž také **De la Cueva et al. (1997)** (VAP 32,5 $\mu\text{m/s}$, LIN 47,5 %, STR 60,8 %, BCF 7,27 Hz). V obou těchto pracích byl pro hodnocení uvedených parametrů využit rovněž systém SCA.

Ve studii **Rezagholizadeh et al. (2015)** byly zjištěny vyšší hodnoty kinematických parametrů, zejména parametrů rychlosti pohybu (VCL 189,33 $\mu\text{m/s}$, VSL 82,88 $\mu\text{m/s}$, VAP 113,52 $\mu\text{m/s}$, STR 72,20 %, LIN 45,57 %, ALH 6,68 μm a BCF 34,15 Hz). V práci **Florez-Rodriguez et al. (2014)** byly u chlazeného spermatu (5 °C) měřeny stejné parametry, které se v závislosti na použitém ředidle pohybovaly v následujícím rozmezí: VCL 188,7 až 284,5 $\mu\text{m/s}$, VSL 68,6 až 91,8

$\mu\text{m/s}$, VAP 97,6 až 151,7 $\mu\text{m/s}$, STR 59,9 až 70,2 %, LIN 34,4 až 39,4 %, ALH 6,7 až 9,1 μm a BCF 33,0 až 36,1 Hz. Kinematické parametry motility byly zde hodnoceny systémem HTM, Hamilton-Thorne Research. V obou zmíněných pracích se průměrné hodnoty pro parametry rychlosti (VCL, VSP, VAP) a parametry ALH a BCF výrazně lišily od výsledků zjištěných v této práci (získané hodnoty byly nižší o více než 50 %). Oproti tomu vypočtené parametry, které jsou relativní (STR a LIN), byly ve všech studiích porovnatelné.

Rozdílné průměrné hodnoty VCL, VSL, VAP, ALH a BCF, které byly v této práci výrazně nižší, mohou být pravděpodobně způsobeny metodikou analýzy. Jak uvádí **Kraemer et al. (1998)**, volba snímkové frekvence při hodnocení motility spermií je stále v rozporu, a to nejen v závislosti na vybavení, ale souvisí také s druhem a experimentálními podmínky. Obecně je pro analýzu pozorováno více variací různých polí než pro opakovanou analýzu téhož pole, takže čím větší je počet analyzovaných buněk, tím více je snížen variační koeficient. V důsledku toho se přesnost výsledků zvyšuje s počtem analyzovaných polí a buněk (**Dhurvey et al., 2012**). CASA systémy jsou schopny analyzovat pohybové vlastnosti spermií využitím digitálních snímků trati každé spermie a její zpracování pomocí algoritmů. Rozdíly v průměrných hodnotách VCL, VSL, VAP, ALH a BCF tak mohou být způsobeny rozdílným nastavením počtu snímků za sekundu v CASA systému. Vyšší počet snímků za sekundu (45 a 60 snímků/s) ve studiích **Florez-Rodriguez et al. (2014)** a **Rezagholizadeh et al. (2015)** mohl mít za následek vyšší hodnoty VCL, VSL, VAP, ALH a BCF v porovnání s touto prací, kde byl počet snímků za sekundu 25. Rozdílné kinematické parametry, zejména parametry rychlosti spermií, proto mohou být vysvětleny odlišným CASA systémem hodnocení.

Tabulka 3 Popisné statistiky kinematických parametrů motility spermií za rok 2016

Parametr	n	\bar{x}	Min	Max	V_x	S_x
VCL ($\mu\text{m/s}$)	32	62,67	34,77	86,01	25,32	15,87
VSL ($\mu\text{m/s}$)	32	32,10	7,53	53,26	31,31	10,05
VAP ($\mu\text{m/s}$)	32	48,14	14,30	72,51	30,72	14,79
LIN (%)	32	50,64	21,64	62,51	15,74	7,97
STR (%)	32	66,56	52,61	76,12	8,74	5,82
WOB (%)	32	75,74	41,14	86,39	10,81	8,19
ALH (μm)	32	2,59	1,88	3,71	14,29	0,37
BCF (Hz)	32	7,32	5,54	9,89	12,84	0,94

Tabulka 4 Popisné statistiky kinematických parametrů motility spermii za rok 2017

Parametr	n	\bar{x}	Min	Max	V_x	S_x
VCL ($\mu\text{m/s}$)	36	60,26	31,94	92,18	27,45	16,54
VSL ($\mu\text{m/s}$)	36	27,55	7,59	45,58	35,83	9,87
VAP ($\mu\text{m/s}$)	36	44,35	14,00	72,21	34,07	15,11
LIN (%)	36	44,89	23,17	59,75	18,65	8,37
STR (%)	36	62,01	44,37	71,45	10,77	6,68
WOB (%)	36	72,12	42,75	84,18	12,70	9,16
ALH (μm)	36	2,90	1,86	4,43	20,35	0,59
BCF (Hz)	36	7,49	6,09	10,95	13,35	1,00

VCL – krivočará rychlost, VSL – přímočará rychlost, VAP – průměrná rychlost, LIN – linearita, STR – přímost, WOB – kmitání, ALH – amplituda bočního posunu hlavičky, BCF - počet bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy

6.2 Posouzení morfometrických parametrů hlaviček spermii

Morfologie spermii byla podrobněji popsána vybranými morfometrickými parametry hlaviček spermii (tabulka 5 a 6). Zjištěná průměrná délka hlavičky $6,33 \pm 0,38$ a $6,41 \pm 0,39$ odpovídá rozmezí 5,33 až 6,62 μm , které pro délku hlavičky spermie uvádí **Brito (2007)**. Tato hodnota je rovněž ve shodě s tvrzením autorů **Věžník et al. (2004)** a **Samper (2009)**, kteří uvádějí délku hlavičky spermie hřebce 6,3 a 6,6 μm . Menší rozměry pro délku hlavičky hřebců (5,96 μm , 5,958 μm , 5,88 μm , 5,66 μm , 5,49 μm a 5,33 μm) byly zjištěny autory **Gravance et al. (1997)**, **Waheed et al. (2015)**, **Davis et al. (1993)**, **Hidalgo et al. (2005)**, **Gravance et al. (1996)** a **Casey et al. (1997)**.

Průměrné hodnoty maximální šířky hlavičky $3,01 \pm 0,20$ a $3,11 \pm 0,24$ korespondují s výsledky **Waheed et al. (2015)**, **Davis et al. (1993)**, **Gravance et al. (1997)** a **Hidalgo et al. (2005)**, kde byly naměřeny hodnoty pro šířku hlavičky 3,06 μm , 2,97 μm , 2,95 μm a 2,85 μm . **Brito (2007)** uvádí rozmezí pro šířku hlavičky 2,79 až 3,26 μm , kterému rovněž odpovídá zjištěná šířky hlavičky v této práci. Nižší průměrná hodnota šířky hlavičky byla zjištěna v pracích autorů **Casey et al. (1997)** a **Gravance et al. (1996)**, a to 2,65 a 2,75 μm .

Průměrné hodnoty pro plochu hlavičky 15,65 a 16,37 μm^2 byly vyšší než hodnoty 14,33 μm^2 , 13,42 μm^2 , 13,31 μm^2 , 13,22 μm^2 , 11,37 μm^2 a 11,22 μm^2 zjištěné autory **Waheed et al. (2015)**, **Hidalgo et al. (2005)**, **Gravance et al. (1997)**, **Davis et al. (1993)**, **Casey et al. (1997)** a **Gravance et al. (1996)**. Zjištěné hodnoty ovšem korespondují s prací **Brito (2007)**, kde je uváděno rozmezí plochy hlavičky 11,43 až 16,28 μm^2 . Stejně tak průměrný obvod hlavičky 16,26 a 16,55 μm byl větší

než hodnoty 14,16 μm , 14,92 μm , 15,54 μm , 15,00 μm , 13,79 μm a 13,64 μm zjištěné v pracích **Waheed et al. (2015)**, **Davis et al. (1993)**, **Gravance et al. (1997)**, **Hidalgo et al. (2005)**, **Casey et al. (1997)** a **Gravance et al. (1996)**. Střední hodnota pro obvod hlavičky spermie hřebce, uváděná **Britem (2007)**, je 13,76 až 15,64 μm .

SCA analyzuje zachycené obrazy vytvořením hranice, která odpovídá vnějšímu obrysu mikroskopického obrazu spermií a vyznačení hlavičky spermatu. K získání správného obrazu musí spermie kontrastovat s pozadím. Morfometrické hodnoty, získané SCA systémem, mohou být ovlivněny metodou barvení. Barvivo, které poskytuje intenzivnější úroveň šedi (grey-level), způsobuje zvětšení buněk, což ovlivňuje velikost morfometrických parametrů jako je délka, šířka, plocha a obvod hlavičky. Také zvyšující se doba barvení může zvýšit intenzitu a kontrast snímků a následně vést k větším rozměrům spermií (**Hidalgo et al., 2005**).

Hidalgo et al. (2005) ve své studii prokázali, že získané morfometrické parametry hlaviček spermií, analyzované SCA systémem, jsou ovlivněny také použitou metodou barvení. Při využití metod barvení Diff-Quik (DQ) a Hema-color (HC) byly získány statisticky průkazně vyšší rozměry spermií ($P < 0,05$) než při barvení metodou Harris'Haematoxylin (HH). DQ a HC poskytují intenzivnější šedý stupeň, což má za následek zvětšení buněk a tím i vliv na morfometrické parametry, jako je délka, šířka, plocha a obvod hlavičky spermií. Při použití barviva Diff-Quick byly zjištěny následující morfometrické parametry hlavičky – délka 5,87 μm , šířka 3,07 μm , plocha 14,72 μm^2 , obvod 15,64 μm a prodloužení 0,31. Srovnávací studie **Banazsewské et al. (2015)** však ukázala, že rozměry spermií hřebců obarvených barvivem SpermBlue byly nejvíce podobné rozměrům spermií v neobarvených nátěrech.

Gago et al. (1998) a **Sancho et al. (1998)** také uvádějí, že některé látky způsobující dehydrataci, jako např. xylen a alkohol, způsobují smršťování zárodečných buněk a fixační prostředky vyvolávají změny rozměrů hlaviček spermií. Obecně se předpokládá, že sušení a fixace výrazně snižují rozměry spermií (přibližně o 20 % délky a 13 % šířky) (**Yániz et al., 2015**).

Nižší hodnoty plochy a obvodu hlavičky, zjištěné v předchozích studiích, mohou být vysvětleny také použitím přepočítávacího vzorce, který uvádí **Swokowski et al. (1994)**:

$$\begin{aligned} \text{Plocha hlavičky} &= 3,14 \times (a \times b) & a &= A/2 & A &\dots \text{délka hlavičky} \\ \text{Obvod hlavičky} &= 3,14 \times (a + b) & b &= B/2 & B &\dots \text{šířka hlavičky} \end{aligned}$$

Tento vzorec byl použit například v práci **Waheed et al. (2015)**, kde byly plocha a obvod hlavičky spermií vypočteny podle tohoto vzorce. Pokud by plocha a obvod hlavičky, zjištěné v této práci, byly vypočítávány podle uvedeného vzorce, zjištěné hodnoty by byly nižší a odpovídající výsledkům v dříve publikovaných pracích. V této práci však bylo všech osm morfometrických parametrů vypočítáno automaticky systémem SCA.

Tabulka 5 Popisné statistiky morfometrických parametrů hlavičky spermií v roce 2016

Parametr	n	\bar{x}	Min	Max	V_x	S_x
Délka hlavičky (μm)	3200	6,33	4,13	8,20	6,00	0,38
Šířka hlavičky (μm)	3200	3,01	2,26	3,67	6,65	0,20
Plocha hlavičky (μm^2)	3200	15,65	8,33	21,41	9,33	1,46
Obvod hlavičky (μm)	3200	16,26	11,39	20,53	5,23	0,85
Prodloužení hlavičky	3200	0,36	0,21	0,52	11,11	0,04
Eliptičnost	3200	2,11	1,53	3,21	8,06	0,17
Drsnost	3200	0,74	0,57	0,84	4,05	0,03
Pravidelnost	3200	0,96	0,94	0,98	0,42	0,004

Tabulka 6 Popisné statistiky morfometrických parametrů hlavičky spermií v roce 2017

Parametr	n	\bar{x}	Min	Max	V_x	S_x
Délka hlavičky (μm)	3200	6,41	4,16	7,82	6,08	0,39
Šířka hlavičky (μm)	3200	3,11	2,12	4,05	7,72	0,24
Plocha hlavičky (μm^2)	3200	16,37	9,68	22,60	10,45	1,71
Obvod hlavičky (μm)	3200	16,55	12,36	19,17	5,26	0,87
Prodloužení hlavičky	3200	0,35	0,15	0,49	11,43	0,04
Eliptičnost	3200	2,07	1,36	2,91	8,70	0,18
Drsnost	3200	0,75	0,61	0,86	4,00	0,03
Pravidelnost	3200	0,96	0,94	1,04	0,42	0,004

6.3 Posouzení pohybových charakteristik spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček

Je usuzováno, že morfologicky větší spermie jsou schopny produkovat více energie a pohybovat se rychleji (**Tourmente et al., 2011; Sanchez et al., 2013**). Dle **Malo et al. (2006)**, spermie s větším prodloužením hlavičky mohou dosáhnout větší rychlosti a přímosti pohybu díky sníženému odporu a větší hydrodynamické

efektivitě. Na základě těchto tvrzení byl proto hodnocen pozitivní vztah mezi kinematickými parametry spermií a morfometrickým tvarem hlaviček spermií.

Na základě morfometrických hodnot hlaviček spermií a kinematických parametrů spermií, získaných ve sledovaných přípouštěcích sezónách 2016 a 2017, bylo zjištěno, že motilita a kinematické parametry pozitivně korelovaly s plochou, délkou, šířkou a obvodem hlavičky, zatímco negativně korelovaly s prodloužením a eliptičností hlavičky spermie. Podrobné výsledky jsou znázorněny v tabulkách 7 a 8. V řadě případů vyšla průkazná závislost, ale s velmi nízkou hodnotou korelačního koeficientu ($r < 0,1$). Naopak nejvyšší hodnoty korelačního koeficientu byly zaznamenány v případě plochy a šířky hlavičky. V sezóně 2017 byla plocha hlavičky pozitivně korelována s MOT ($r = 0,29$), PMOT ($r = 0,32$), VCL ($r = 0,33$), VSL ($r = 0,36$), VAP ($r = 0,34$) a šířka hlavičky pozitivně korelovala s MOT ($r = 0,32$), PMOT ($r = 0,36$), VCL ($r = 0,30$), VSL ($r = 0,38$), VAP ($r = 0,31$) a LIN ($r = 0,32$). V případě prodloužení a eliptičnosti spermií byla zjištěna velmi významná negativní korelace se STR ($r = -0,36$), LIN ($r = -0,27$) a PMOT ($r = -0,24$). Všechny morfometrické parametry pak byly negativně korelovány s BCF.

Pozitivní korelace byla také prokázána mezi morfometrickými rozměry hlaviček (délka, šířka, plocha a obvod) a relativními parametry WOB, STR a LIN. Tento výsledek souvisí s pozitivní korelací parametrů rychlosti spermií a morfometrickou velikostí hlavičky. V případě parametru WOB, se zvětšující se velikostí hlavičky roste VAP rychleji ve srovnání s VCL. To znamená, že spermie s větší velikostí hlavičky mají při pohybu průměrnou dráhou (VAP) menší amplitudu hlavičky (ALH) a zároveň menší počet bočních oscilačních pohybů (BCF). Tento závěr je podpořen také výslednou negativní korelací ALH a BCF s plochou, délkou, šířkou a obvodem hlavičky spermie.

V sezóně 2016 byla tendence korelací mezi parametry stejná, pouze s nižšími hodnotami korelačních koeficientů.

Spermie s větší plochou a šířkou hlavičky tak měly větší MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB, STR a menší ALH a BCF. Naopak nižší motilitu a kinematické parametry měly spermie s větším prodloužením a eliptičností.

Rezagholizadeh et al. (2015) ve své studii naopak zjistili, že plocha hlavičky byla pozitivně korelována s VCL ($r = 0,52$) a negativně korelována s PMOT ($r = -0,62$), VSL ($r = -0,40$), STR ($r = -0,70$) a LIN ($r = -0,72$). Prodloužení hlavičky bylo oproti tomu pozitivně korelováno s PMOT ($r = 0,59$), VSL ($r = 0,32$), STR ($r = 0,64$)

a LIN ($r = 0,69$) a negativně korelovalo s VCL ($r = -0,55$). Spermie s větším prodloužením a menší plochou hlavičky tedy měly větší PMOT, VSL, STR a LIN. Na rozdíl od toho spermie s menším prodloužením a větší plochou měly větší VCL.

Peña et al. (2005) prokázali lineární vztah mezi parametry rychlosti (VAP, VCL, VSL) a morfometrickými parametry hlaviček spermií kanců (délka, šířka, plocha, eliptičnost, prodloužení).

Tabulka 7 Korelační koeficienty pohybových charakteristik spermií a morfometrických parametrů hlaviček spermií v roce 2016

Parametr	Plocha (μm^2)	Prodloužení	Eliptičnost	Délka (μm^2)	Šířka (μm^2)	Obvod (μm^2)
MOT (%)	0,20	-0,11	-0,10	0,09	0,22	0,15
PMOT (%)	0,27	-0,11	-0,11	0,14	0,27	0,21
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,26	-0,08	-0,07	0,16	0,24	0,21
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0,27	-0,06	-0,05	0,18	0,24	0,23
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0,29	-0,06	-0,06	0,19	0,25	0,25
LIN (%)	0,14	0,04	0,04	0,14	0,08	0,15
WOB (%)	0,23	0,03	0,03	0,20	0,15	0,23
STR (%)	-0,01	0,03	0,04	0,01	-0,03	0,003
ALH (μm)	-0,01	0,01	0,01	-0,002	-0,01	-0,01
BCF (Hz)	-0,04	-0,25	-0,24	-0,19	0,12	-0,13

Tučně označené hodnoty jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

Tabulka 8 Korelační koeficienty pohybových charakteristik spermií a morfometrických parametrů hlaviček spermií v roce 2017

Parametr	Plocha (μm^2)	Prodloužení	Eliptičnost	Délka (μm^2)	Šířka (μm^2)	Obvod (μm^2)
MOT (%)	0,29	-0,22	-0,22	0,09	0,32	0,18
PMOT (%)	0,32	-0,24	-0,24	0,11	0,36	0,22
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,33	-0,11	-0,11	0,21	0,30	0,28
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0,36	-0,23	-0,23	0,15	0,38	0,26
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0,34	-0,12	-0,12	0,21	0,31	0,29
LIN (%)	0,24	-0,27	-0,28	0,02	0,32	0,13
WOB (%)	0,27	-0,10	-0,10	0,17	0,24	0,22
STR (%)	0,13	-0,36	-0,36	-0,15	0,29	-0,02
ALH (μm)	-0,20	0,24	0,24	-0,34	-0,002	-0,28
BCF (Hz)	-0,10	-0,13	-0,13	-0,17	0,004	-0,13

Tučně označené hodnoty jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$)

V porovnání s prací **Rezagholizadeh et al. (2015)**, parametry rychlosti spermií pozitivně korelovaly s plochou hlavičky spermie, zatímco v práci zmíněných autorů byla plocha hlavičky pozitivně korelována s VCL, ale negativně s VSL. Z důvodu rozporných výsledných korelací mezi parametry rychlosti spermií a morfometrickým tvarem hlaviček spermií byly dále doplněny korelace mezi jednotlivými parametry

motility, zaměřené především na vztah mezi charakteristikami rychlosti pohybu spermie (VCL, VSL, VAP) (tabulka 9). Výsledky ukazují, že progresivní motilita byla statisticky významně korelována se všemi parametry rychlosti pohybu spermie, a to s VCL ($r = 0,97$, $P < 0,001$), VSL ($r = 0,95$, $P < 0,001$) a VAP ($r = 0,96$, $P < 0,001$). Křivočará rychlost (VCL) byla pozitivně korelována s přímočarou rychlostí (VSL) ($r = 0,92$) i s průměrnou rychlostí (VAP) ($r = 0,97$). Rovněž mezi přímočarou (VSL) a průměrnou (VAP) rychlostí byla prokázána vysoká korelace ($r = 0,96$). Korelace mezi jednotlivými parametry rychlosti spermie byly na hladině významnosti $P < 0,001$.

Tabulka 9 Korelační koeficienty mezi jednotlivými kinematickými parametry motility spermií

	VCL($\mu\text{m/s}$)	VSL($\mu\text{m/s}$)	VAP($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)
PMOT (%)	0,97	0,95	0,96	0,43	0,12	0,60
VCL ($\mu\text{m/s}$)		0,92	0,97	0,29	-0,05	0,52
VSL ($\mu\text{m/s}$)			0,96	0,63	0,31	0,74
VAP ($\mu\text{m/s}$)				0,46	0,07	0,69
LIN (%)					0,85	0,87
STR (%)						0,48

Tučně označené hodnoty jsou statisticky průkazné ($P < 0,05$, $P < 0,001$)

Rozdíly ve velikosti a tvaru normálních hlaviček hřebčích spermií jsou značné. Rozměry spermií jsou velmi variabilní v rámci druhu (**Gage et Morrow, 2003; Downing-Meisner et al., 2005**), plemene (**Saravia et al., 2007**) a rovněž mezi jednotlivci jedné populace (**Morato-Morales et al., 2010; Thurston et al., 2001**). Uplatňuje se zde tedy významný vliv hřebce (**Ball et Mohamed, 1995; Brito, 2007**). To potvrzují i následující výsledky, kdy mezi hřebci byly zjištěny významné individuální rozdíly ve všech hodnocených parametrech motility a morfometrických parametrech (tabulka 10). Zjištěné rozdíly měly hladinu významnosti $P < 0,05$. Nejmenší rozdíly byly pozorovány v případě šířky hlavičky.

Tyto výsledky jsou v souladu s prací **Rezagholizadeh et al. (2015)**, kde byl rovněž zjištěn signifikantní rozdíl mezi hřebci v totožných parametrech ejakulátu, a dále se studii **Ortega-Ferrusola et al. (2009)** (parametry rychlosti spermií) a **Blanchard et al. (2010)** (fertilita hřebců).

Tabulka 10 Průměrné hodnoty semenných parametrů pro jednotlivé hřebce

Parametr	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
Plodnost (%)	84,38	74,00	53,80	59,03	89,47	73,68	63,63	61,53	60,78	81,00
MOT (%)	59,06 ± 11,23 ^a	94,38 ± 2,77 ^b	57,47 ± 14,53 ^a	76,07 ± 6,16 ^c	92,57 ± 3,54 ^b	75,67 ± 4,40 ^c	81,97 ± 8,51 ^d	84,22 ± 4,49 ^e	77,29 ± 8,80 ^c	86,77 ± 4,77 ^f
PMOT (%)	9,00 ± 4,69 ^a	47,96 ± 6,13 ^b	17,44 ± 12,99 ^c	23,92 ± 5,85 ^d	57,88 ± 2,44 ^e	26,47 ± 7,35 ^f	34,29 ± 11,07 ^g	42,08 ± 1,15 ^h	26,85 ± 4,98 ^f	47,60 ± 8,67 ^b
VCL (μm/s)	34,18 ± 1,58 ^a	81,86 ± 9,37 ^b	48,98 ± 17,04 ^c	52,31 ± 6,09 ^d	77,07 ± 3,33 ^e	55,78 ± 10,07 ^f	60,00 ± 11,35 ^g	77,05 ± 6,14 ^e	53,13 ± 5,67 ^d	71,04 ± 8,05 ^h
VSL (μm/s)	13,46 ± 4,65 ^a	36,79 ± 3,91 ^b	22,97 ± 13,29 ^c	21,19 ± 3,98 ^d	43,87 ± 2,23 ^e	23,29 ± 3,84 ^c	24,83 ± 4,77 ^f	31,37 ± 2,84 ^g	28,48 ± 2,00 ^h	35,35 ± 5,42 ⁱ
VAP (μm/s)	20,68 ± 5,44 ^a	66,39 ± 6,28 ^b	34,11 ± 16,63 ^c	36,15 ± 5,42 ^d	62,09 ± 3,37 ^e	36,68 ± 6,76 ^d	42,16 ± 8,43 ^f	58,55 ± 2,73 ^g	43,27 ± 3,95 ^f	51,60 ± 7,15 ^h
LIN (%)	39,12 ± 12,57 ^a	44,99 ± 1,12 ^b	42,61 ± 12,31 ^c	40,16 ± 3,67 ^{ad}	56,93 ± 1,43 ^e	42,02 ± 3,19 ^c	41,36 ± 2,32 ^{cd}	41,21 ± 6,54 ^{cd}	53,93 ± 4,12 ^f	49,53 ± 2,33 ^g
STR (%)	63,65 ± 6,08 ^a	55,34 ± 0,77 ^b	63,41 ± 8,05 ^a	58,28 ± 3,49 ^c	70,67 ± 0,55 ^d	63,80 ± 3,21 ^a	59,01 ± 3,78 ^c	53,87 ± 6,94 ^c	66,01 ± 3,52 ^f	68,36 ± 1,51 ^g
WOB (%)	60,29 ± 14,65 ^a	81,30 ± 2,11 ^b	65,80 ± 11,07 ^c	68,81 ± 2,90 ^d	80,54 ± 1,74 ^b	65,77 ± 1,93 ^c	70,14 ± 0,84 ^d	76,21 ± 2,62 ^e	81,60 ± 1,83 ^b	72,42 ± 1,97 ^f
ALH (μm)	2,37 ± 0,36 ^a	3,55 ± 0,68 ^b	3,27 ± 0,39 ^c	3,11 ± 0,41 ^d	2,35 ± 0,11 ^a	2,89 ± 0,34 ^c	2,75 ± 0,23 ^f	3,70 ± 0,56 ^g	2,31 ± 0,35 ^a	2,88 ± 0,09 ^e
BCF (Hz)	8,86 ± 1,42 ^a	7,50 ± 0,64 ^b	8,72 ± 0,77 ^a	6,74 ± 0,59 ^c	7,35 ± 0,33 ^b	6,93 ± 0,11 ^d	7,88 ± 1,00 ^e	6,74 ± 0,28 ^c	6,68 ± 0,16 ^c	7,69 ± 0,32 ^f
Prodloužení	0,34 ± 0,03 ^a	0,34 ± 0,03 ^a	0,38 ± 0,03 ^{bc}	0,37 ± 0,03 ^b	0,33 ± 0,03 ^a	0,36 ± 0,02 ^d	0,32 ± 0,03 ^e	0,38 ± 0,03 ^c	0,33 ± 0,03 ^a	0,31 ± 0,03 ^f
Plocha (μm ²)	15,39 ± 1,25 ^a	17,35 ± 1,55 ^b	16,58 ± 1,38 ^c	15,63 ± 1,69 ^{ad}	16,06 ± 1,11 ^e	15,85 ± 1,43 ^{de}	14,87 ± 1,11 ^f	17,15 ± 1,69 ^{bg}	16,85 ± 1,34 ^{cg}	18,23 ± 1,31 ^h
Délka (μm)	6,14 ± 0,29 ^a	6,55 ± 0,31 ^b	6,68 ± 0,33 ^c	6,44 ± 0,34 ^{de}	6,26 ± 0,28 ^f	6,38 ± 0,28 ^d	5,94 ± 0,28 ^g	6,84 ± 0,34 ^h	6,41 ± 0,32 ^d	6,49 ± 0,30 ^{bc}
Šířka (μm)	3,05 ± 0,17 ^a	3,23 ± 0,20 ^b	3,02 ± 0,20 ^a	2,95 ± 0,22 ^c	3,12 ± 0,15 ^d	3,02 ± 0,19 ^a	3,04 ± 0,17 ^a	3,06 ± 0,22 ^a	3,21 ± 0,18 ^b	3,43 ± 0,19 ^e
Obvod	15,98 ± 0,68 ^a	16,99 ± 0,77 ^b	16,96 ± 0,72 ^b	16,39 ± 0,85 ^c	16,31 ± 0,63 ^c	16,34 ± 0,74 ^c	15,56 ± 0,61 ^d	17,26 ± 0,82 ^e	16,68 ± 0,68 ^f	17,11 ± 0,62 ^{bc}
Eliptičnost	2,02 ± 0,12 ^a	2,03 ± 0,12 ^a	2,22 ± 0,17 ^{bc}	2,20 ± 0,14 ^b	2,01 ± 0,11 ^a	2,12 ± 0,12 ^d	1,96 ± 0,13 ^e	2,25 ± 0,16 ^c	2,00 ± 0,14 ^a	1,90 ± 0,14 ^f

MOT – celková motilita, PMOT – progresivní motilita, VCL – křivočará rychlost, VSL – přímočará rychlost, VAP – průměrná rychlost, LIN – linearita, STR – přímost, WOB – kmitání, ALH – amplituda bočního posunu hlavičky, BCF - počet bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy

a,b,c,d,e,f,g,h,i Hodnoty s různými horními indexy písmen v řadě se průkazně liší (P < 0,05)

Dále existují domněnky, že morfometrické rozměry hlaviček spermií mohou mít souvislost s plodností (**Casey et al., 1997**). Na tvaru a velikosti hlaviček spermií závisí jejich fertilizační schopnost, protože ovlivňují průběh akrozomální reakce a penetraci spermií do vajíčka (**Sukcharoen et al., 1998; Brito, 2007; Banaszewska et al., 2009; Kondracki et al., 2011**). Velikost a tvar hlavičky spermie vyplývá z velikosti a tvaru jádra a akrozomu (**Banaszewska et al., 2009**).

Z výsledků tabulky 11 a grafů 1 – 5 je patrné, že se snižující se plodností hřebců se snižovala i progresivní motilita spermií (36,37 %, 37,22 %, 34,40 % a 21,75 %). Opačný trend vykazovalo procento abnormalit spermií, kdy se snižující se plodností došlo ke zvyšování procenta abnormálních spermií v ejakulátu (29,17 %, 34,64 %, 34,83 % a 41,22 %). Tyto výsledky jsou v souladu se studií **Waheed et al. (2015)**, kde byli hřebci rozděleni do totožných skupin, podle jejich dosažené průměrné fertility, a jejichž výsledné procento abnormalit bylo podle skupin následující: 33,93 %, 35,60 %, 35,32 a 39,58 %. Vysoké procento morfologických abnormalit, spojené s nízkou plodností, popisují také studie **Chandler et al. (1988), Jasko et al. (1990) a Barth et al. (1992)**.

Co se týče morfometrických parametrů, tak snižující se procento plodnosti hřebců vedlo ke snižování parametrů plochy a šířky hlaviček spermií. Naopak délka a obvod hlaviček se zvyšovaly. U skupiny hřebců s nejvyšší plodností bylo tedy zjištěno nejnižší procento abnormalit spermií (29,17 %), nejvyšší PMOT (36,37 %), největší šířka a plocha hlavičky (3,21 μm a 16,61 μm^2) a nejmenší délka a obvod hlavičky (6,30 μm a 16,48 μm).

Vztah mezi morfometrií hlaviček spermií a plodností u koní naznačily některé studie (**Casey et al., 1997**). **Brito (2007)** uvedl, že rozměry hlaviček spermií hřebců se sníženou plodností se značně liší od rozměrů hlaviček spermií plodných hřebců. Ve studiích **Gravance et al. (1996)** a **Casey et al. (1997)** byly zjištěny významně vyšší hodnoty délky, šířky, obvodu a plochy hlaviček spermií u subfertilních hřebců než u hřebců plodných. Spermie subfertilních hřebců byly také více zúžené. Dle **Brita (2007)** mohou být větší hlavičky spermií, zjištěné u hřebců s nízkou plodností, odrazem poruch spermatogeneze, zahrnující zejména změny struktury chromatinu v průběhu dozrávání spermií a jejich transportu. Avšak je důležité také poznamenat, že u subfertilních hřebců byl také zjištěn nižší celkový počet spermií, procento motilních a normálních spermií v ejakulátu.

Waheed et al. (2015) ve své práci uvedli, že ačkoliv se vyšší hodnoty délky hlaviček spermií zdají být zodpovědné za významné rozdíly v obvodu hlaviček, tendence ke zvyšování maximální šířky hlavičky ukázala, že celkové rozměry hlaviček spermií byly vysoké u hřebců s nízkou plodností.

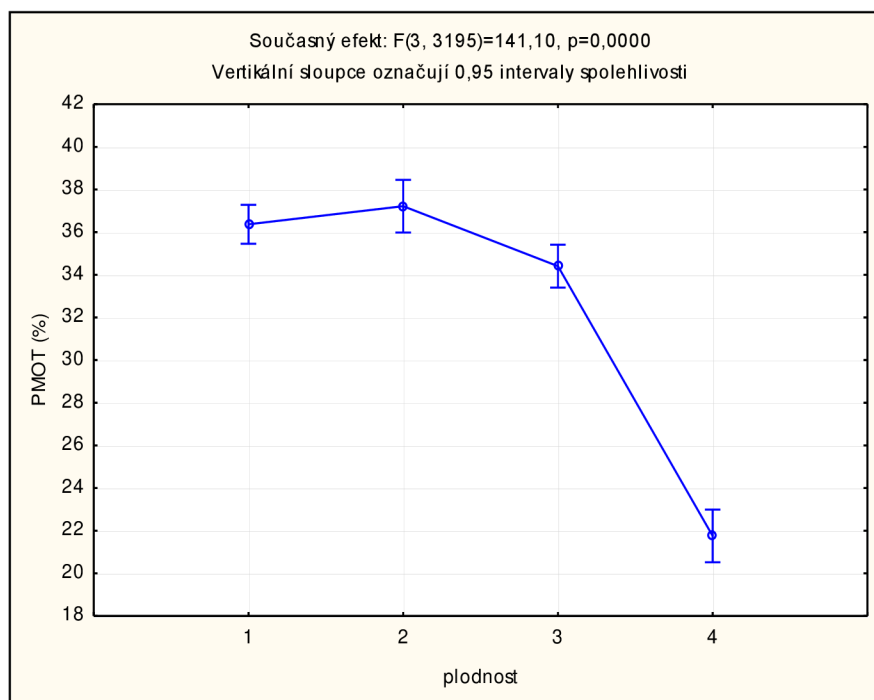
V této práci byly rovněž zjištěny největší hodnoty délky a obvodu hlaviček u skupiny hřebců s nejnižší plodností (6,52 μm a 16,58 μm). V rozporu s předchozími studii jsou ovšem zjištěné rozměry šířky a plochy hlaviček, které byly u této skupiny hřebců nejnižší (šířka 2,97 μm , plocha 15,94 μm^2). Poměr délky a šířky hlavičky se tedy postupně zvyšoval, což znamená, že hlavičky spermií hřebců s nízkou plodností byly více zúžené. Bylo tedy potvrzeno, že hlavičky spermií hřebců s nižší plodností měly větší délku a obvod hlavičky, a zároveň byly více zúžené.

Tabulka 11 Progresivní motilita a vybrané morfometrické parametry hlaviček spermií ve vztahu k plodnosti hřebců

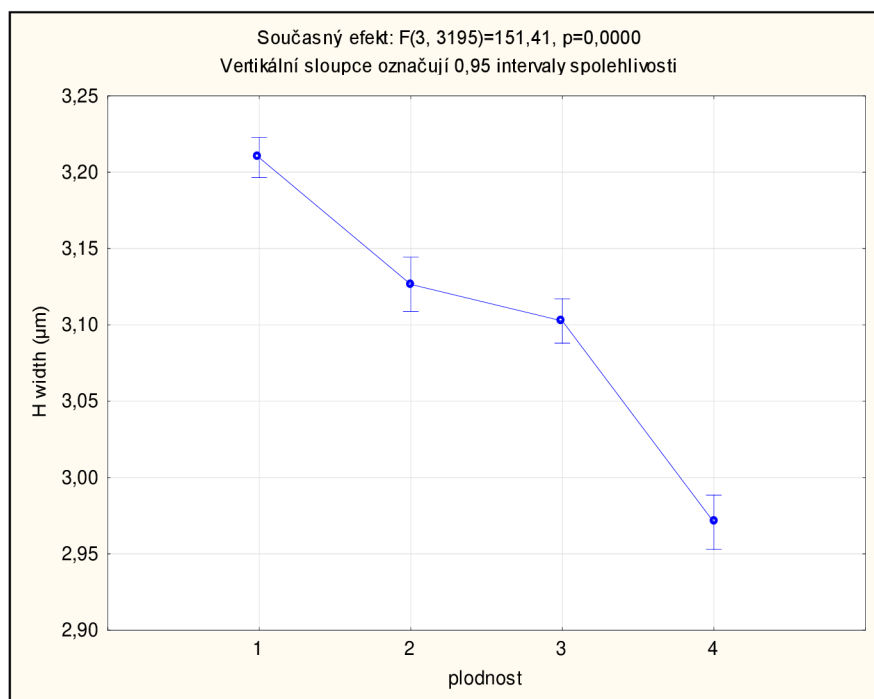
	Skupina 1 >80 %	Skupina 2 69 – 79 %	Skupina 3 60 – 68 %	Skupina 4 50 – 59 %
n hřebců (n ejakulátů)	3 (11)	2 (6)	3 (9)	2 (6)
Abnormality spermií (%)	29,17 ± 22,25 ^a	34,64 ± 30,44 ^b	34,83 ± 15,66 ^b	41,22 ± 26,02 ^c
Progresivní motilita (%)	36,37 ± 19,99 ^a	37,22 ± 12,70 ^a	34,40 ± 9,39 ^b	21,75 ± 9,40 ^c
Délka hlavičky (μm)	6,30 ± 0,33 ^a	6,46 ± 0,31 ^b	6,40 ± 0,48 ^c	6,52 ± 0,35 ^d
Šířka hlavičky (μm)	3,21 ± 0,24 ^a	3,13 ± 0,22 ^b	3,10 ± 0,20 ^b	2,97 ± 0,22 ^c
Plocha hlavičky (μm^2)	16,61 ± 1,76 ^a	16,60 ± 1,67 ^a	16,29 ± 1,73 ^b	15,94 ± 1,65 ^c
Obvod hlavičky (μm)	16,48 ± 0,81 ^a	16,66 ± 0,82 ^b	16,50 ± 1,00 ^a	16,58 ± 0,85 ^{ab}

^{a,b,c} Hodnoty s různými horními indexy písmen v řadě se průkazně liší ($P < 0,05$)

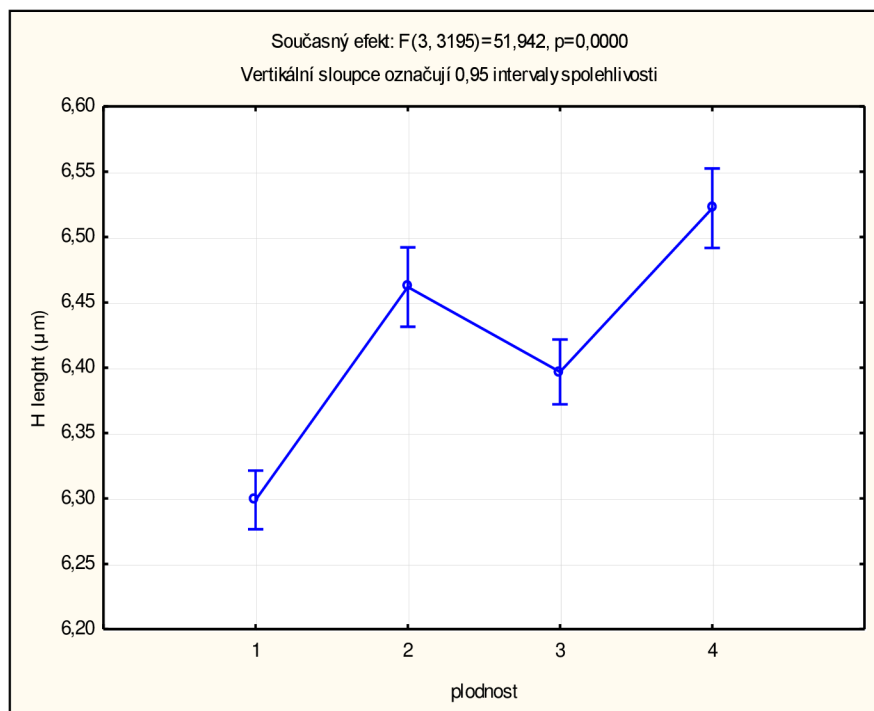
Graf 1 Vliv plodnosti hřebců na progresivní motilitu spermií



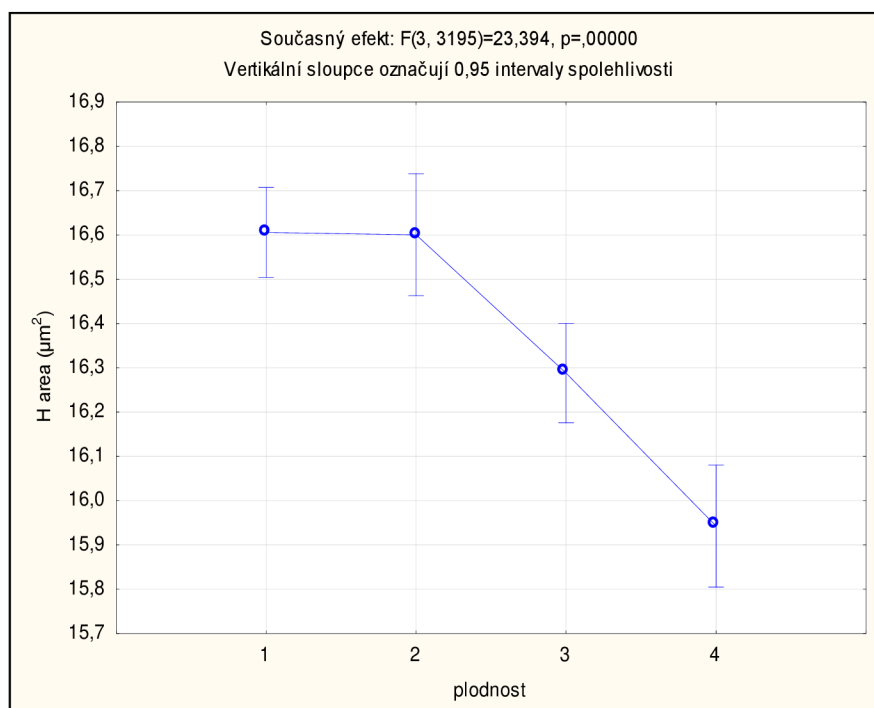
Graf 2 Vliv plodnosti hřebců na šířku hlaviček spermií



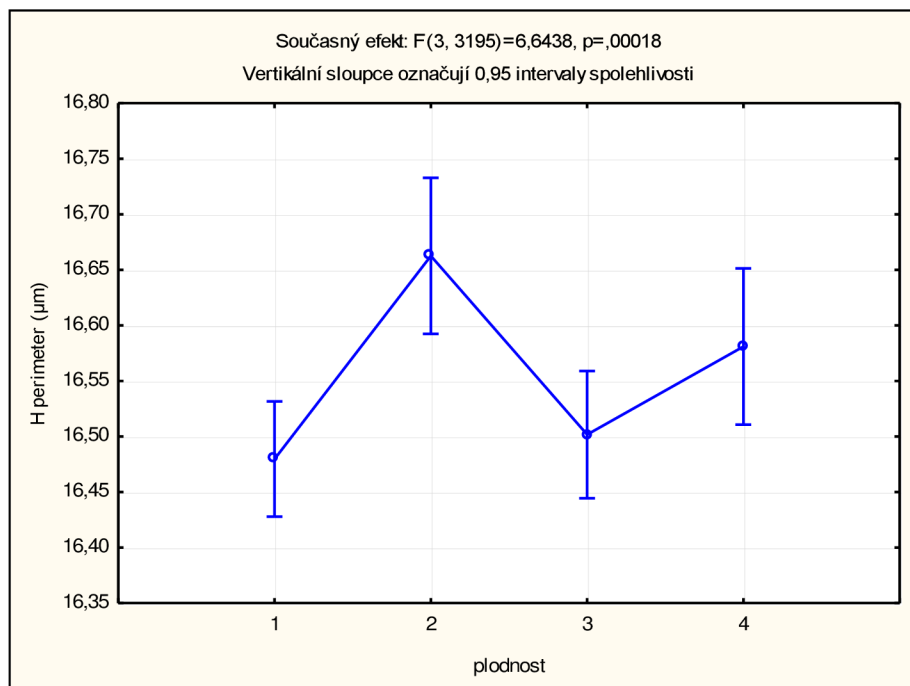
Graf 3 Vliv plodnosti hřebců na délku hlaviček spermií



Graf 4 Vliv plodnosti hřebců na plochu hlaviček spermií



Graf 5 Vliv plodnosti hřebců na obvod hlaviček spermii



Další studie uvádí, že jednou z významných příčin variability morfologie spermii a morfometrických rozměrů je věk hřebců. Rozměry a tvar spermii jsou významně ovlivněny věkem (**Quintero-Moreno et al., 2009; Banaszewska et al., 2011**).

Bylo zjištěno, že sledované parametry se významně lišily ($P < 0,05$) mezi jednotlivými věkovými skupinami (tabulka 12 a grafy 6 - 9). Největší procento abnormalit spermii bylo zjištěno u mladých hřebců do 5 let (50,60 %). Nejmenší naopak u skupiny hřebců ve věku 6 až 15 let (18 %). Podobné hodnoty byly popsány u věkových skupin v práci **Waheed et al. (2015)** (32,71%, 50,92 % a 38,85 %), kde bylo ovšem nejvyšší procento abnormalit zjištěno u skupiny hřebců ve věku 10 až 14 let. Vysoké procento abnormalit spermii u mladých hřebců, zjištěné v této práci, může být vysvětleno testačním a sportovním zatížením této věkové skupiny (od 2 let věku probíhá testování výkonnosti, u hřebců konkrétně předvýběry hřebců do plemnitby, 60-ti denní test hřebců, soutěže KMK a sportovní soutěže). Toto je podpořeno prací **Samper (2009)**, který uvádí, že u mladých plemenných hřebců, zařazených do sportovní testace, může mít významný dopad na morfologii spermii absolvování sportovních soutěží v horkých letních měsících. Morfologie spermii může být ovlivněna nejen vysokými teplotami šourku, ale i dlouhodobým stresem v průběhu tréninku a soutěže. Dalším důvodem vysokého procenta abnormalit může

být nezralá spermatogeneze u příliš mladých hřebců. Studie **Dowsett, Knott (1996)**, **Pickett (1993)** a **Amann et al. (1979)** uvádějí, že u hřebců mladších 3 let byla zjištěna horší kvalita spermatu, z hlediska celkového počtu spermií a abnormalit spermií.

Zvýšené procento abnormalit u skupiny hřebců starších 15 let (34,88 %) může být způsobeno testikulární degenerací spojenou se stárnutím hřebců, kterou se zabývali autoři v předchozích studiích (**Varner, 2008; Samper et al., 2007; Gehlen et al., 2001; Turner, Zeng, 2012**).

Stejný trend výsledných hodnot byl zaznamenán také v případě progresivní motility. Nejvyšší hodnota PMOT byla zjištěna u skupiny nejmladších hřebců (38,46 %), nejnižší hodnota naopak u skupiny hřebců 6 až 15 let (27,76 %). Tento vývoj hodnot je zajímavý z hlediska zjištěných abnormalit spermií, jejichž trend vývoje by měl být opačný. Vývoj hodnot PMOT proto může být spojen s výše uvedenou průkaznou pozitivní korelací mezi PMOT a morfometrickou velikostí hlavičky, kdy se zvyšujícími se parametry hlavičky dochází ke zvýšení PMOT (šířka hlavičky $r = 0,32$, plocha hlavičky $r = 0,36$, obvod hlavičky $r = 0,22$). Jak je patrné z výsledků, tak u první skupiny hřebců byla s nejvyšší PMOT současně zjištěna také největší šířka (3,20 μm) a plocha hlavičky spermií (16,87 μm^2) a s nejnižší PMOT (27,76 %) nejnižší plocha a šířka hlavičky (3,03 μm a 15,66 μm^2) u druhé skupiny hřebců.

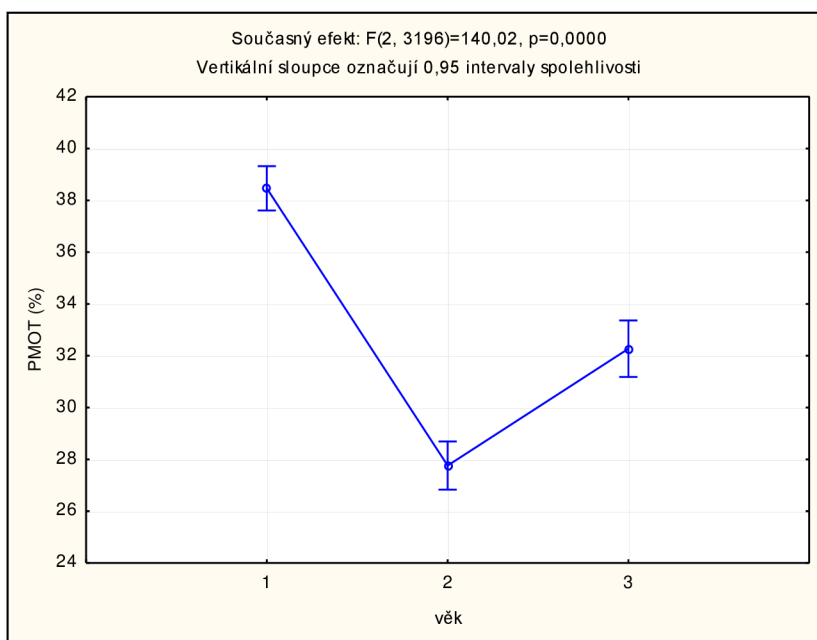
Trend poklesu rozměrů hlaviček spermií mezi první a druhou věkovou skupinou hřebců lze porovnat s prací **Koyago et al. (2009)**, ve které autoři zjistili významnou negativní korelaci věku hřebců s plochou a šířkou hlaviček spermií ($P < 0,05$), přičemž věkové rozmezí sledované skupiny hřebců bylo 4 až 15 let.

Tabulka 12 Vliv věku na progresivní motilitu a vybrané morfometrické parametry spermií

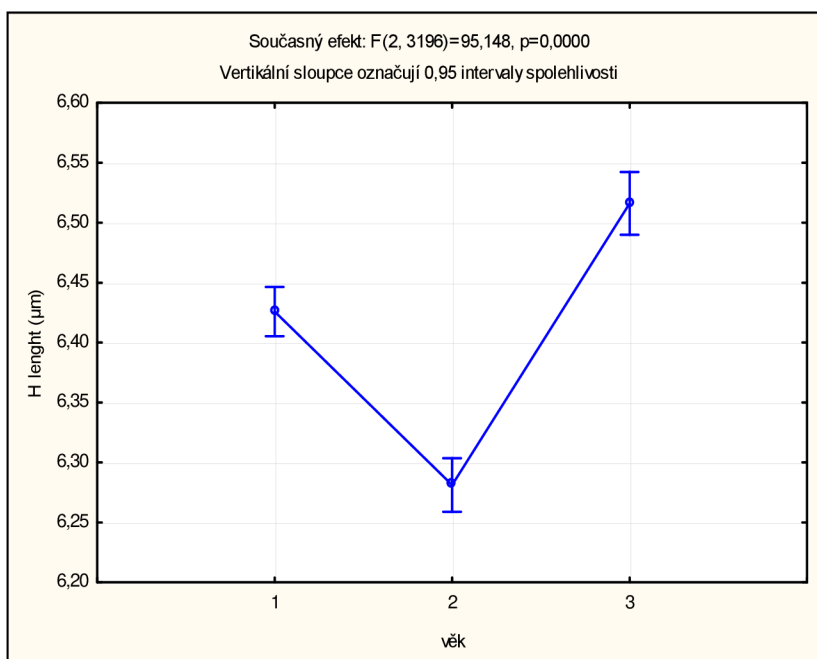
	Skupina 1 < 5 let	Skupina 2 6 – 15 let	Skupina 3 > 15 let
n hřebců (n ejakulátů)	4 (13)	3 (11)	3 (8)
Abnormality spermií (%)	50,60 ± 27,07 ^a	18,00 ± 12,07 ^b	34,88 ± 21,71 ^c
PMOT (%)	38,46 ± 11,01 ^a	27,76 ± 20,08 ^b	32,27 ± 15,38 ^c
Délka hlavičky (μm)	6,43 ± 0,44 ^a	6,28 ± 0,33 ^b	6,52 ± 0,33 ^c
Šířka hlavičky (μm)	3,20 ± 0,25 ^a	3,03 ± 0,20 ^b	3,10 ± 0,22 ^c
Plocha hlavičky (μm^2)	16,87 ± 1,84 ^a	15,66 ± 1,42 ^b	16,59 ± 1,60 ^c
Obvod hlavičky (μm)	16,69 ± 0,94 ^a	16,22 ± 0,76 ^b	16,73 ± 0,81 ^a

^{a,b,c} Hodnoty s různými horními indexy pímen v řadě se průkazně liší ($P < 0,05$)

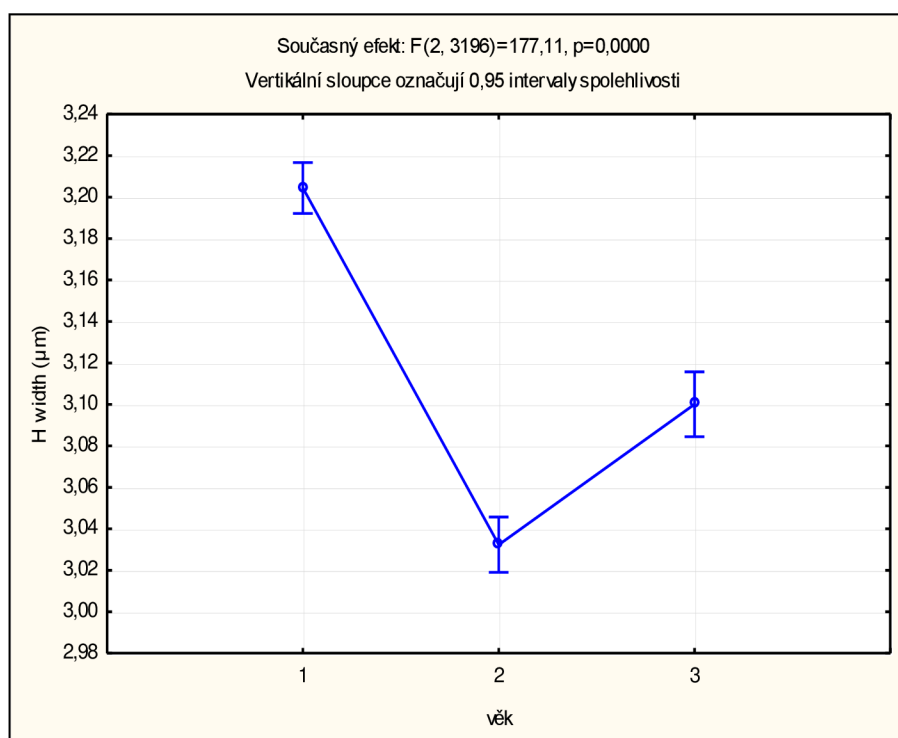
Graf 6 Vliv věku hřebců na progresivní motilitu spermií



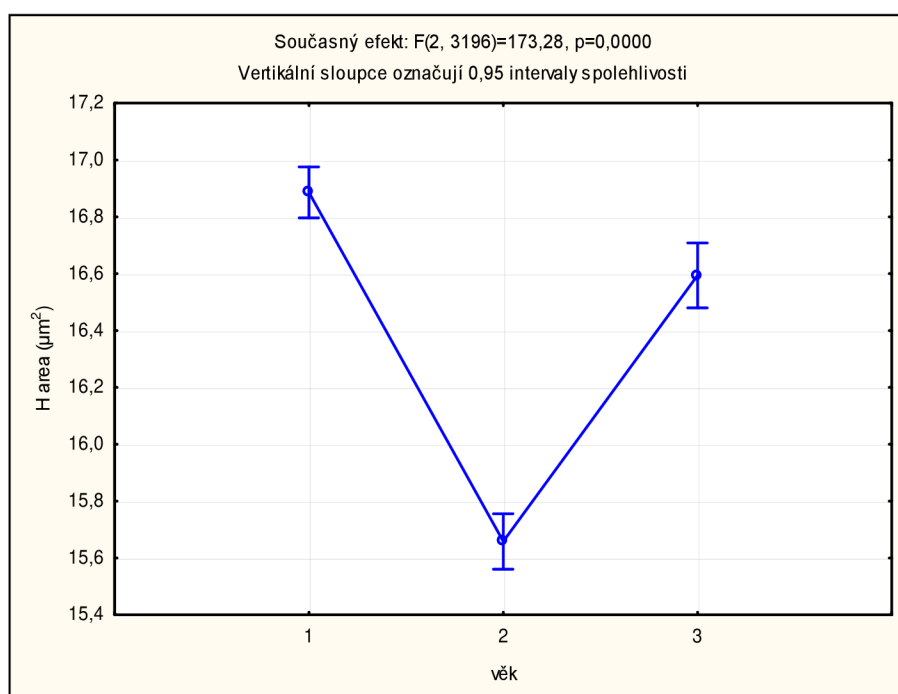
Graf 7 Vliv věku hřebců na délku hlaviček spermií



Graf 8 Vliv věku hřebců na šířku hlaviček spermií



Graf 9 Vliv věku hřebců na plochu hlaviček spermií



6.4 Vliv vybraných ředidel na motilitu a životaschopnost spermií

Úspěšnost umělé inseminace závisí na udržení fertilizační schopnosti spermií během chlazení a skladování. Za tímto účelem bylo vyvinuto několik základních ředidel a jejich modifikací. Jelikož chemické složení ředidel je jedním z hlavních faktorů přežitelnosti spermií během konzervace, bylo cílem druhé části práce posoudit, zda ředidla s obsahem definovaných kaseinátů zlepšují kvalitativní ukazatele chlazeného spermatu hřebců.

Z tabulky 13 je zřejmé, že použité ředidlo mělo významný vliv na VIT, MOT, PMOT, VCL, VSL a VAP ($P < 0,05$). Zároveň byl prokázán vysoce významný vliv doby skladování na všechny hodnocené parametry ($P < 0,001$). Interakce doby skladování a použitého ředidla byla významná pro parametry PMOT a VCL ($P < 0,05$). Tato zjištění jsou v souladu s předchozími studiemi, prokazujícími účinek ředidla (Webb et al., 2009; LeFrappier et al., 2010) a doby skladování (Aurich et al., 2007; Janett et al., 2012) na parametry spermatu hřebců.

Tabulka 13 Vliv ředidla a doby skladování na motilitu a vitalitu chlazeného spermatu hodnocené analýzou variance s opakovaným měřením

Parametr	ředidlo	čas	čas*ředidlo
MOT (%)	**	***	-
PMOT (%)	**	***	**
prog M/ml	+	***	-
VCL ($\mu\text{m/s}$)	**	***	*
VSL ($\mu\text{m/s}$)	*	***	-
VAP ($\mu\text{m/s}$)	**	***	-
VIT (%)	***	***	-

MOT, celková motilita; PMOT, progresivní motilita; prog M/mL, million progresivních spermií na mililitr; VAP, průměrná rychlost; VCL, křivočará rychlost; VSL, přímočará rychlost; VIT, vitalita. Data byla prezentována na hladině významnosti $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**), $P < 0,05$ (*), tendence při $P < 0,10$ (+), $P > 0,10$ (-).

Výsledky mnohonásobného porovnání (tabulka 14) ukazují, že celkový ochranný účinek ředidla INRA 96 byl významně lepší než u ejakulátů ředěných ředidlem Kenney ($P < 0,01$). Hodnoty VIT, PMOT, VCL a VAP byly vyšší u vzorků spermatu ředěných ředidlem INRA 96 ($P < 0,05$) než u vzorků ředěných ředidlem EquiPlus. Mezi ředidly Kenney a EquiPlus nebyl prokázán žádný rozdíl. Rozdíly v motilitě spermií mezi použitými ředidly, pozorované v této práci, souhlasí se zjištěním jiných autorů (Pagl et al., 2006; LeFrappier et al., 2010; Janett et al., 2012; Neuhauser et al., 2018). Dobré výsledky motility spermií, dosažené při použití ředidla INRA 96, odpovídají speciálnímu složení tohoto ředidla (Pillet et al., 2008). Výhodou tohoto ředidla je použití nativního fosfokaseinátu jako ochranného činidla (da Silva et al., 2012). Navíc i další látky, obsažené v tomto ředidle, pomáhají chránit spermie před škodlivými účinky dlouhodobého skladování při 5 °C v intervalu 72 hodin.

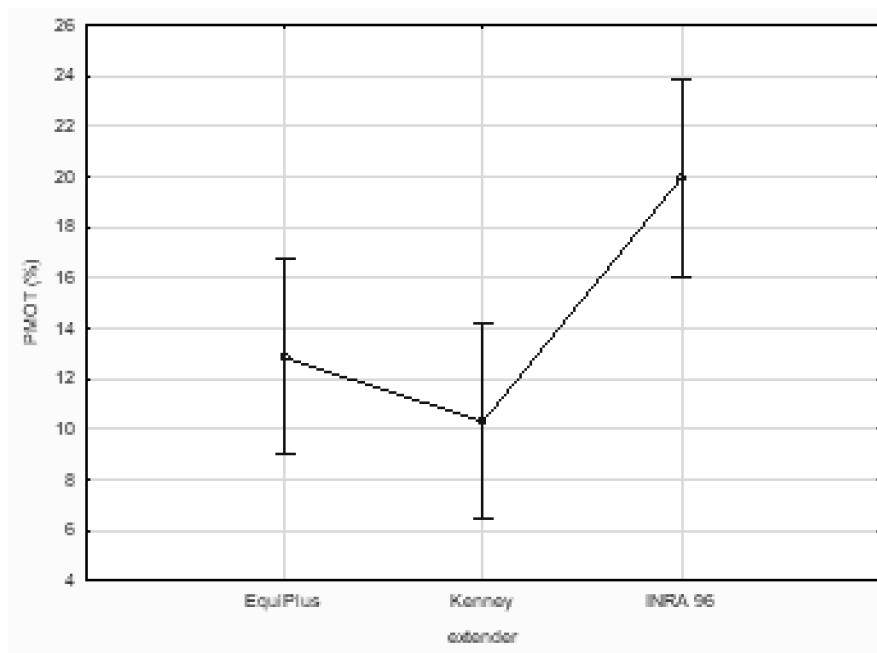
Tabulka 14 Mnohonásobné porovnání ředidel INRA 96, EquiPlus a Kenney pomocí Tukeyova HSD testu v rámci hodnocených parametrů

MOT (%)	EquiPlus	Kenney	INRA 96	PMOT (%)	EquiPlus	Kenney	INRA 96
EquiPlus		-	+	EquiPlus		-	*
Kenney	-		**	Kenney	-		**
INRA 96	+	**		INRA 96	*	**	
VCL (µm/s)	EquiPlus	Kenney	INRA 96	VSL (µm/s)	EquiPlus	Kenney	INRA 96
EquiPlus		-	*	EquiPlus		-	+
Kenney	-		**	Kenney	-		*
INRA 96	*	**		INRA 96	+	*	
VAP (µm/s)	EquiPlus	Kenney	INRA 96	VIT (%)	EquiPlus	Kenney	INRA 96
EquiPlus		-	*	EquiPlus		-	***
Kenney	-		**	Kenney	-		***
INRA 96	*	**		INRA 96	***	***	

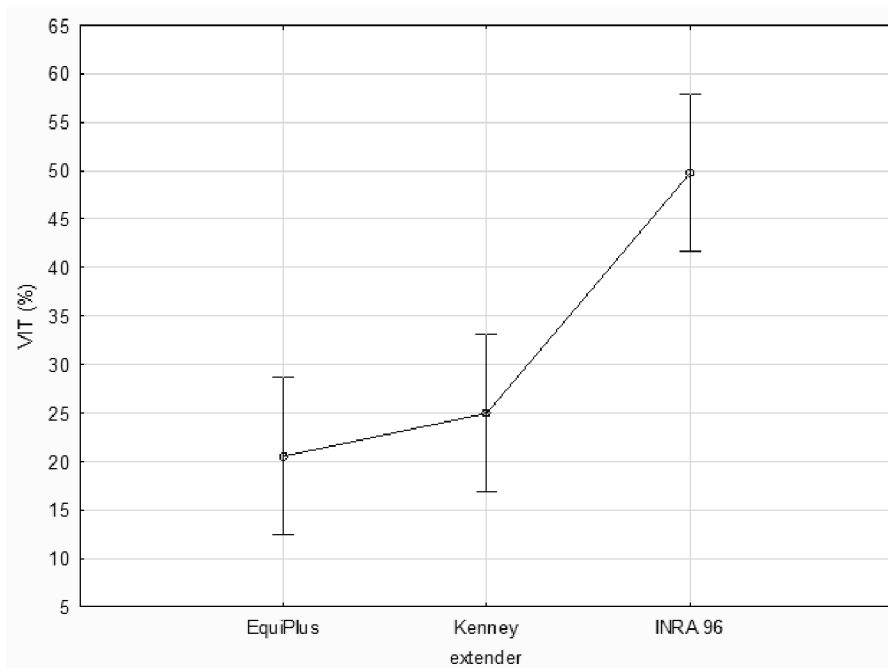
MOT, celková motilita; PMOT, progresivní motilita; VAP, průměrná rychlost; VCL, křivočará rychlost; VSL, přímočará rychlost; VIT, vitalita

Data byla prezentována na hladině významnosti $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**), $P < 0,05$ (*), tendence při $P < 0,10$ (+), $P > 0,10$ (-).

Graf 10 Mnohonásobné porovnání ředidel INRA 96, EquiPlus a Kenney pomocí Tukeyova HSD testu v rámci progresivní motility spermií



Graf 11 Mnohonásobné porovnání ředidel INRA 96, EquiPlus a Kenney pomocí Tukeyova HSD testu v rámci vitality spermií



Pro detailní ilustraci účinku tří různých ředidel byly parametry motility spermií chlazeného spermatu hodnoceny po 2, 24, 48 a 72 hodinách (tabulka 15). Výsledky ukazují, že se jednotlivé parametry významně lišily mezi ředidly. Za sledovanou dobu byly hodnoty všech parametrů nejvyšší při použití ředidla INRA 96. Ve sledovaném intervalu 2 hodiny od odběru spermatu byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty PMOT, VCL a VAP u ředidla INRA 96 v porovnání s ředidly EquiPlus a Kenney. V porovnání s ředidlem Kenney mělo ředidlo INRA 96 významně vyšší parametry prog M/ml a VSL. V intervalech 24 a 48 hodin po odběru byla MOT významně vyšší u ředidla INRA 96 než u ředidla Kenney. PMOT měla mezi těmito ředidly tendenci k významnému rozdílu (24 hod, $P = 0,06$; 48 hod, $P = 0,05$). Stejně tak prog M/ml (48 hod, $P = 0,07$). Na konci experimentálního období (72 hodin) se MOT nelišila mezi ředidly INRA 96 a Kenney ($P = 0,07$), zatímco PMOT a prog M/ml se mezi těmito dvěma ředidly významně lišily.

Rozdílné účinky ředidel na parametry motility spermií během konzervace spermatu, zjištěné v této práci, korespondují s dříve publikovanými daty (**Pagl et al., 2006; Aurich et al., 2007; LeFrappier et al., 2010**). Hlavním cílem zpracování spermatu, při přípravě chlazené inseminační dávky, je najít nejlepší ředidlo, které zachová uspokojivou kvalitu spermatu během přepravy až do doby inseminace (**Heckenbichler et al., 2011**). Jelikož expedice inseminační dávky trvá v případě nepravidelně odebíraných hřebců cca 24 hodin, tak podle výsledných parametrů motility, hodnocených v této práci, by z testovaných ředidel bylo nejlepší volbou ředidlo INRA 96. Zjištěné výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, ve kterých byla při použití ředidla INRA 96 rovněž zachována odpovídající kvalita spermatu po dobu 24 hodin od naředení (**LeFrappier et al., 2010; Ortega-Ferrusola et al., 2011; Janett et al., 2012; Bolaños et al., 2014**).

Nicméně v následujících intervalech (po 48 a 72 hodinách skladování při 5 °C) se ředidla INRA 96 a EquiPlus vyrovnaly. Tyto výsledky jsou v rozporu s prací **LeFrappier et al. (2010)**. Ovšem potenciální slabinou citované práce jsou chybějící prahové hodnoty CASA a také skutečnost, že byli do pokusu zahrnuti pouze dva hřebci. To může být nedostatečný počet pro pozorování kvůli individuální variabilitě hřebců, která byla pozorována v předchozích studiích (**Webb et al., 2009; Janett et al., 2012**). Nedostatečný počet pozorování mohl způsobit kolísavý vliv na sledované parametry spermií hřebců. V této práci byly vzorky spermatu získány od 11 klinicky

zdravých a plodných hřebců a účinek ředidla na charakteristiky chlazeného ejakulátu byl hodnocen pomocí analýzy rozptylu s opakovaným měřením.

Pokud jde o podrobné výsledky parametrů motility, zdá se, že ve srovnání s kaseinátovými ředidly je Kenney méně příznivou volbou. Tento výsledek je v souladu s předchozími studiemi, kde sperma ředěné pomocí ředidla Kenney dosáhlo nižší kvality in vitro ve srovnání s ředidlem EquiPro (**Pagl et al., 2006**) nebo INRA 82, což je předchozí verze INRA 96 (**Ijaz a Ducharme, 1995**). Tyto výsledky byly podpořeny studií in vivo (**Batellier et al., 2001**). Ředidlo Kenney bylo vyvinuto v roce 1975 (**Kenney et al., 1975**) a představuje základní a levnou možnost pro chovatele nebo koňská reprodukční centra; složení je však velmi jednoduché. I když bylo mléko v ředidle Kenney nahrazeno 0,6 % kaseinátem sodným, celková a progresivní motilita, kinematické parametry a procento spermií s neporušenou plazmatickou membránou se mezi Kenney a Kenney + 0,6 % kaseinátu po 24 hodinovém skladování nelišily (**Martins et al., 2016**).

Krátkodobá konzervace chlazeného spermatu obvykle způsobuje jeho sníženou motilitu a kinematické parametry (**Rigby et al., 2001; Pagl et al., 2006; Bolaños et al., 2014; Love et al., 2015**). Také **Price et al. (2008)** a **Webb et al. (2009)** popisují, že motilita a rychlost spermií se často během skladování postupně zhoršují, což bylo potvrzeno u ředidel, jako je INRA 96 a ekvivalentní (**Webb et al., 2009**). Tato zjištění se shodují s našimi výsledky, ve kterých je patrný pokles hodnot všech hodnocených parametrů. Výsledky **Halo et al. (2018)** pro motilitu a progresivní motilitu spermií hřebců ukázaly klesající trend v každém časovém intervalu. Po šesti hodinách však jejich výsledky ukázaly rychlý procentuální pokles parametrů spermatu. V této studii si INRA 96 udrželo nejvyšší PMOT ve srovnání s dalšími dvěma ředidly po celou dobu skladování. **Batellier et al. (2001)** uvedli, že INRA 96 je účinné ředidlo pro zachování fertilizačního potenciálu spermií po dobu alespoň 24 hodin. Zdá se také, že chrání buňky spermií během dlouhodobého skladování s větší účinností než tradiční mléčná ředidla.

Tabulka 15 Vliv ředidla na parametry motility spermií hřebců (průměr ± SD) v ejakulátech skladovaných při teplotě 5 °C po dobu 72 hodin

Parametr	2 hours			24 hours		
	EquiPlus	Kenney	INRA 96	EquiPlus	Kenney	INRA 96
MOT (%)	86,86 ± 3,39 ¹	82,92 ± 4,12 ¹	94,25 ± 1,48 ¹	65,79 ± 5,14 ^{a,b,2}	59,45 ± 5,64 ^{a,2}	79,09 ± 4,19 ^{b,2}
PMOT (%)	32,40 ± 3,78 ^{a,1}	27,49 ± 3,95 ^{a,1}	47,53 ± 3,68 ^{b,1}	12,27 ± 2,74 ²	9,94 ± 2,97 ²	19,93 ± 3,26 ²
prog M/mL	76,13 ± 12,29 ^{a,b,1}	65,83 ± 11,15 ^{a,1}	103,68 ± 16,06 ^{b,1}	30,89 ± 7,54 ²	22,79 ± 6,15 ²	46,50 ± 9,64 ²
VCL (µm/s)	60,72 ± 3,61 ^{a,1}	55,05 ± 3,87 ^{a,1}	74,28 ± 3,62 ^{b,1}	39,45 ± 2,69 ²	35,98 ± 2,85 ²	46,47 ± 3,17 ²
VSL (µm/s)	28,99 ± 2,20 ^{a,b,1}	26,74 ± 2,24 ^{a,1}	35,01 ± 2,13 ^{b,1}	15,05 ± 1,55 ²	13,85 ± 1,66 ²	18,38 ± 1,73 ²
VAP (µm/s)	45,45 ± 2,99 ^{a,1}	41,34 ± 3,16 ^{a,1}	56,33 ± 2,89 ^{b,1}	25,51 ± 2,27 ²	23,35 ± 2,49 ²	30,85 ± 2,64 ²
LIN (%)	47,52 ± 1,79 ¹	48,67 ± 1,95 ¹	47,39 ± 1,74 ¹	37,54 ± 1,52 ²	37,41 ± 1,25 ²	38,89 ± 1,49 ²
STR (%)	63,20 ± 1,15 ¹	64,47 ± 1,41 ¹	62,07 ± 1,10 ¹	58,42 ± 1,19 ^{1,2}	58,85 ± 1,24 ¹	59,10 ± 1,23 ^{1,2}
WOB (%)	74,78 ± 1,88 ¹	75,04 ± 1,90 ¹	76,33 ± 1,96 ¹	63,95 ± 1,65 ²	63,43 ± 1,29 ²	65,58 ± 1,73 ²
ALH (µm)	2,58 ± 0,11 ¹	2,51 ± 0,11 ¹	2,78 ± 0,12 ¹	2,67 ± 0,10 ¹	2,65 ± 0,09 ¹	2,66 ± 0,11 ¹
BCF (Hz)	6,76 ± 0,61 ^{1,2}	6,66 ± 0,16 ^{1,2}	6,90 ± 0,10 ¹	7,76 ± 0,39 ¹	7,98 ± 0,30 ²	7,81 ± 0,27 ¹
Parametr	48 hours			72 hours		
	EquiPlus	Kenney	INRA 96	EquiPlus	Kenney	INRA 96
MOT (%)	48,64 ± 5,83 ^{a,b,3}	34,78 ± 4,42 ^{a,3}	59,64 ± 5,02 ^{b,3}	28,42 ± 5,01 ⁴	22,04 ± 3,70 ³	38,90 ± 5,55 ⁴
PMOT (%)	4,80 ± 1,50 ^{a,b,2,3}	2,72 ± 0,72 ^{a,2}	8,39 ± 2,04 ^{b,3}	1,87 ± 0,60 ^{a,b,3}	1,05 ± 0,29 ^{a,2}	3,92 ± 0,88 ^{b,3}
prog M/mL	11,28 ± 3,46 ²	5,73 ± 1,34 ²	20,98 ± 6,46 ^{2,3}	4,38 ± 1,47 ^{a,b,2}	2,69 ± 0,75 ^{a,2}	9,07 ± 2,73 ^{b,3}
VCL (µm/s)	28,92 ± 2,03 ³	26,44 ± 1,24 ³	33,03 ± 2,54 ³	24,18 ± 1,43 ³	23,16 ± 1,12 ³	28,55 ± 1,66 ³
VSL (µm/s)	9,58 ± 0,82 ³	8,61 ± 0,57 ^{2,3}	11,15 ± 1,05 ³	6,91 ± 0,59 ³	6,37 ± 0,38 ³	8,49 ± 0,62 ³
VAP (µm/s)	16,63 ± 1,48 ³	15,16 ± 0,90 ³	19,15 ± 1,90 ³	13,02 ± 1,07 ³	12,19 ± 0,61 ³	15,50 ± 1,06 ³
LIN (%)	33,43 ± 1,98 ^{2,3}	32,63 ± 1,34 ^{2,3}	33,42 ± 1,31 ^{2,3}	28,53 ± 1,88 ³	27,89 ± 1,62 ³	29,87 ± 1,62 ³
STR (%)	57,84 ± 1,69 ^{1,2}	56,72 ± 1,20 ^{1,2}	58,64 ± 1,17 ^{1,2}	52,88 ± 1,58 ²	52,03 ± 1,62 ²	54,67 ± 1,32 ²
WOB (%)	56,98 ± 1,99 ^{2,3}	57,15 ± 1,46 ^{2,3}	56,90 ± 1,82 ³	53,19 ± 2,05 ³	52,89 ± 1,48 ³	54,13 ± 1,84 ³
ALH (µm)	2,58 ± 0,12 ¹	2,42 ± 0,19 ^{1,2}	2,60 ± 0,13 ¹	1,88 ± 0,25 ²	1,98 ± 0,22 ²	2,49 ± 0,20 ¹
BCF (Hz)	7,98 ± 0,41 ¹	6,94 ± 0,49 ^{1,2}	8,25 ± 0,40 ¹	5,22 ± 0,67 ^{a,2}	5,57 ± 0,72 ^{a,b,1}	7,40 ± 0,56 ^{b,1}

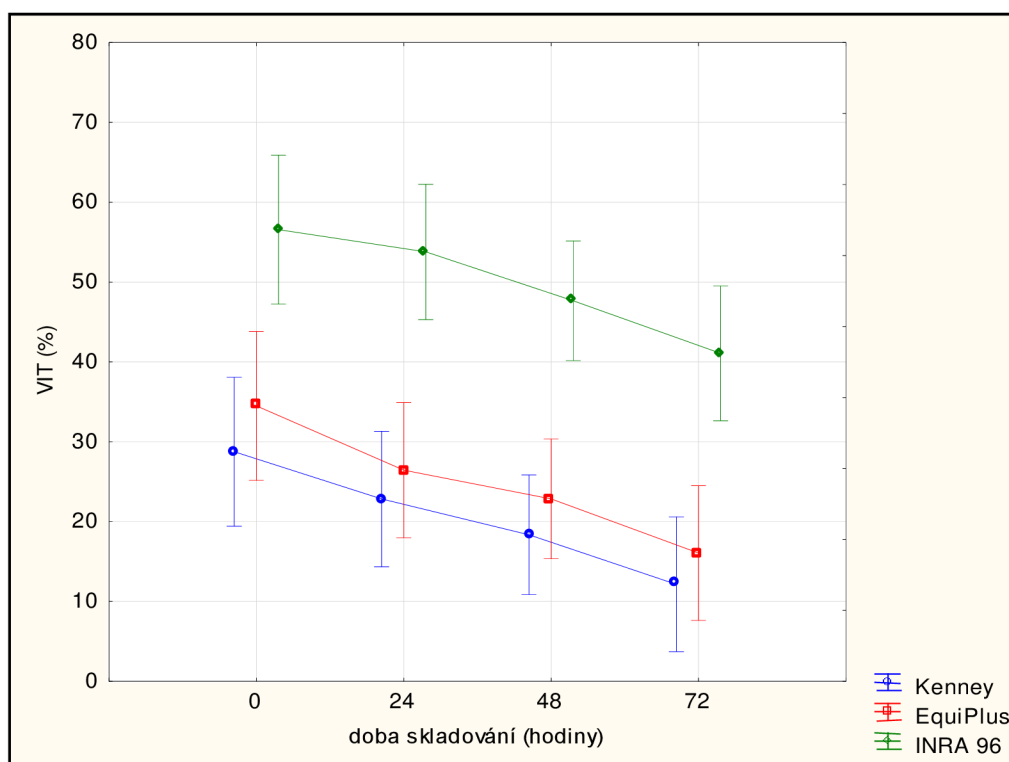
^{a, b} Různé horní indexy v řadě v rámci jednotlivých časových úseků naznačují významné rozdíly mezi ředidly (P < 0,05)

^{1,2,3,4} Různé horní indexy v řadě označují významné rozdíly mezi časovými úseky v rámci ředidla (P < 0,05)

Pouze pohyblivé spermie s neporušenou plazmatickou membránou mohou oplodnit oocyt in vivo (Yanagimachi, 1994), a proto je zajímavé posoudit změny těchto parametrů v průběhu času během skladování spermatu v různých ředidlech (Love, 2012).

V grafu 12 je znázorněno, že životaschopnost spermií se v průběhu sledovaného času velmi výrazně lišila mezi ředidly. Ve všech čtyřech sledovaných časech po dobu skladování byla životaschopnost spermií výrazně vyšší u ředidla INRA 96 než u ředidel EquiPlus a Kenney. V prvním hodnoceném intervalu (2 hodiny po odběru) byla životaschopnost spermií u ředidla INRA 96 průkazně vyšší než u ředidel Kenney (o 27,82 %) a EquiPlus (o 22,06 %). Po 24, 48 a 72 hodinách skladování při 5 °C bylo procento intaktních spermií významně nižší ve vzorcích spermatu ředěných ředidlem Kenney (o 30,9, 29,3 a 28,9 %) a EquiPlus (o 27,3, 24,8 a 25 %) než ve vzorcích ředěných ředidlem INRA 96.

Graf 12 Procento vitálních spermií ve spermatu naředěném třemi různými ředidly během skladování při 5 °C po dobu 72 hodin



Motilita spermií vysoce koreluje s životaschopností spermií. Navzdory individuálním odchylkám mezi hřebci je tedy 70 – 80 % spermií v čerstvém ejakulátu normálního hřebce očekávaných životaschopných (Sieme, 2009). Teoreticky je každá pohyblivá buňka životaschopná, ale ne všechny životaschopné buňky jsou pohyblivé (Nagy et al., 1999). Zatímco integrita plazmatické membrány, pokrývající hlavní části spermií, může být hodnocena analýzou motility spermií, integrita plazmatické membrány, pokrývající akrozom, je zaměřena na integritu vnější akrozomální membrány pomocí mikroskopie, fluorometrů a průtokové cytometrie. Fluorescenční barviva se vážou a barví DNA spermií s defekty postakrozomální plazmatické membrány hlavičky spermie. Neživotaschopné buňky lze determinovat pomocí membránově nepropustných barviv nukleových kyselin, které pronikají poškozenou plazmatickou membránou a vedou k fluorescenčním signálům jader mrtvých spermií. Propidium jodid nemůže procházet neporušenými buněčnými membránami, získává přístup k jaderné DNA pouze tehdy, když jsou buněčné membrány poškozené a neživotaschopné. Vázaný na nukleovou DNA, PI fluoreskuje červeně v reakci na excitaci (Sieme, 2009).

Zde použité fluorochromy označují DNA v hlavičce spermie, a proto indikují pouze stav membrány hlavičky spermie. Poškození membrány spermií obvykle začíná nad bičíkovou subdoménou, proto existují spermie, které mají intaktní membránu hlavičky (takže jsou klasifikovány jako životaschopné), ale jsou nehybné kvůli poškozené ocasní membráně (Nagy et al., 1999). Nižší hodnoty vitality spermií, zjištěné v této studii, nejsou jasné (postup přípravy preparátu pro posouzení vitality v modulu SCA byl přesně dodržen a byl stejný pro všechny hodnocené vzorky, stejně jako analýza vzorků). Na základě nižšího procenta životaschopných spermií ve srovnání s procentem pohyblivých spermií může být možným vysvětlením špatná kalibrace modulu vitality SCA pro analýzu životaschopnosti, což vede k podhodnocení procenta životaschopných spermií ve vzorku. Dhurvey et al. (2012) potvrzují, že nevýhody CASA souvisí s extrémní potřebou validace, kontroly kvality a standardizace realizovaných opatření. Je životně důležité používat vhodnou optiku a nejlepší možné osvětlení pro zvýšení kontrastu hlaviček spermií, což zase usnadňuje manuální výběr prahových hodnot.

Nicméně zjištěné výsledky jsou významné v relativním srovnání hodnot z hlediska vlivu času a použitých ředidel.

V této studii se životaschopnost spermií mezi ředidly v průběhu času významně lišila. Výsledky, týkající se stavu plazmatické membrány, se liší ve srovnání s dříve publikovanými údaji, kde nebyl zjištěn žádný významný účinek mléčných kaseinátů u pravidelně odebraných hřebců (**Pagl et al., 2006; Janett et al., 2012**). Situace se změnila, když bylo sperma před ochlazením odstředěno (**Pagl et al., 2006**). Po 24 a 72 hodinách skladování si ředidlo, obsahující definovaný mléčný protein, zachovalo stav plazmatické membrány na významně vyšší úrovni (**Pagl et al., 2006**). Pozitivní účinek ředidla INRA 96 na plazmatickou membránu spermií při skladování by mohl být důsledkem působení NPPC, kdy tato část ředidla snižuje odtok (eflux) cholesterolu a zachovává tak poměr fosfolipid:cholesterol, důležitý pro udržení správné fluidity membrán spermií (**Bergeron et Manjunath, 2006**). Tento pozitivní efekt je velmi důležitý, když je potřeba sperma skladovat delší dobu při teplotě 5 °C, aby si zachovalo svou fertilizační schopnost. Tento pozitivní účinek NPPC je podpořen také vysokou koncentrací cukrů přítomných v INRA 96, které vytvářejí fyzickou ochranu a zdroj energie pro spermatické buňky během konzervace (**Pillet et al., 2008**). Z ředidel, testovaných v této práci, má INRA 96 nejlepší predispozice pro udržení životaschopnosti spermatu a pro jeho následné použití k inseminaci.

7. ZÁVĚR

Zjištěné výsledky vycházejí z cílů práce, které jsou zaměřeny na objektivní vyhodnocení základních charakteristik ejakulátu teplokrevných hřebců využívaných v inseminaci, na posouzení morfometrických parametrů ejakulátu na základě velikosti a tvaru hlaviček spermií, posouzení parametrů pohybu spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček a na hodnocení vlivu tří vybraných ředidel na kvalitativní parametry ejakulátu.

U získaných vzorků ejakulátu byly za sledovaná období přípouštěcích sezón 2016 a 2017 zjištěny následující průměrné hodnoty - objem ejakulátu $49,22 \pm 31,28$ a $56,77 \pm 40,78$ ml, koncentrace spermií $208,20 \pm 83,69$ a $222,19 \pm 96,40$ M/ml, celková motilita spermií $82,44 \pm 11,02$ a $81,38 \pm 10,78$ %, progresivní motilita spermií $37,34 \pm 16,16$ a $35,46 \pm 15,82$ %, vitalita spermií $60,71 \pm 18,23$ a $42,91 \pm 16,76$ %, morfologicky normální spermie $75,00 \pm 15,81$ a $64,50 \pm 24,58$ %. Průměrné hodnoty základních charakteristik ejakulátu byly v souladu s požadavky na sperma pro krátkodobou konzervaci a zároveň porovnatelné s výsledky v předchozích studiích.

Motilita spermií byla dále charakterizována jednotlivými kinematickými parametry, jejichž průměrné hodnoty za rok 2016 a 2017 byly následující: rychlost na křivočaré dráze (VCL) 62,67 a 60,26 $\mu\text{m/s}$, přímočará rychlost (VSL) 32,10 a 27,55 $\mu\text{m/s}$, průměrná rychlost (VAP) 48,14 a 44,35 $\mu\text{m/s}$, linearita křivočaré dráhy (LIN) 50,64 a 44,89 %, linearita průměrné dráhy (STR) 66,56 a 62,01 %, míra kmitání skutečné dráhy kolem průměrné dráhy (WOB) 75,74 a 72,12 %, amplituda bočního posunu hlavičky po její průměrné dráze (ALH) 2,59 a 2,90 μm , frekvence bočních oscilačních pohybů hlavičky spermie kolem průměrné dráhy (BCF) 7,32 a 7,49 Hz. Na základě výrazných rozdílů mezi průměrnými hodnotami parametrů VCL, VSL, VAP, ALH a BCF, zjištěných použitím SCA systému v této práci, v porovnání se studii, ve kterých byly kinematické parametry hodnoceny HTM (Hamilton-Thorne Research) systémem, byl zjištěn vliv použitého CASA systému pro hodnocení. Odlišnost CASA systémů je pravděpodobně způsobena rozdílným nastavením počtu snímků za sekundu \rightarrow vyšší nebo nižší snímková frekvence.

Morfologie spermií byla podrobněji popsána prostřednictvím velikosti a tvaru hlaviček spermií, kde bylo analyzováno osm morfometrických parametrů. V přípouštěcích sezónách 2016 a 2017 byla zjištěna průměrná délka hlavičky (L) $6,33 \pm 0,38$ a $6,41 \pm 0,39$ μm , průměrná hodnota maximální šířky hlavičky (W) $3,01 \pm 0,20$ a $3,11 \pm 0,24$ μm , průměrná plocha hlavičky (A) $15,65 \pm 1,46$ a $16,37 \pm 1,71$ μm^2 , průměrný obvod hlavičky (P) $16,26 \pm 0,85$ a $16,55 \pm 0,87$ μm , prodloužení (Elong) $0,36 \pm 0,04$ a $0,35 \pm 0,04$, eliptičnost (Elip) $2,11 \pm 0,17$ a $2,07 \pm 0,18$, drsnost (Rugo) $0,74 \pm 0,03$ a $0,75 \pm 0,03$ a pravidelnost (Regu) $0,96 \pm 0,004$. Zjištěné průměrné hodnoty, charakterizující velikost hlaviček (L, W, A, P), odpovídaly stanovenému rozmezí pro parametry velikosti hlavičky. Průměrné hodnoty délky a šířky hlavičky byly také ve většině případů shodné i s naměřenými hodnotami v pracích jiných autorů. V řadě předchozích studií byly ovšem zjištěny poměrně nižší hodnoty pro plochu a obvod hlavičky, ve srovnání s touto prací. Při vzájemném porovnání zjištěných výsledků s výsledky prací jiných autorů a s literaturou byl zjištěn vliv použité metody barvení a samotné morfometrické analýzy na morfometrické parametry hlaviček spermií. Stejně tak byla zjištěna významnost v podobě přepočítávacího vzorce pro výpočet plochy a obvodu hlavičky, který se může v jednotlivých pracích lišit.

Při hodnocení závislosti charakteristik pohybu spermií na morfometrickém tvaru hlaviček byla zjištěna pozitivní korelace motility a kinematických parametrů s plochou, délkou, šířkou a obvodem hlavičky a negativní korelace s prodloužením a eliptičností hlavičky spermie. Nejvyšší hodnoty korelačního koeficientu byly zaznamenány v případě plochy a šířky hlavičky v sezóně 2017, kdy byla plocha hlavičky pozitivně korelována s MOT ($r = 0,29$), PMOT ($r = 0,32$), VCL ($r = 0,33$), VSL ($r = 0,36$), VAP ($r = 0,34$) a šířka hlavičky pozitivně korelovala s MOT ($r = 0,32$), PMOT ($r = 0,36$), VCL ($r = 0,30$), VSL ($r = 0,38$), VAP ($r = 0,31$) a LIN ($r = 0,32$). V případě prodloužení a eliptičnosti spermie byla zjištěna velmi významná negativní korelace se STR ($r = -0,36$), LIN ($r = -0,27$) a PMOT ($r = -0,24$). Všechny morfometrické parametry pak byly negativně korelovány s BCF. Spermie s větší plochou a šířkou hlavičky tak měly větší MOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN, WOB, STR a menší ALH a BCF. Naopak nižší motilitu a kinematické parametry měly spermie s větším prodloužením a eliptičností.

Mezi charakteristikami pohybu, především mezi jednotlivými rychlostmi pohybu spermií, byla prokázána pozitivní korelace. Progresivní motilita byla statisticky významně korelována s VCL ($r = 0,97$, $P < 0,001$), VSL ($r = 0,95$, $P < 0,001$) a VAP ($r = 0,96$, $P < 0,001$). Křivočará rychlost (VCL) byla pozitivně korelována s přímočarou rychlostí (VSL) ($r = 0,92$) i s průměrnou rychlostí (VAP) ($r = 0,97$) a rovněž mezi přímočarou (VSL) a průměrnou (VAP) rychlostí byla prokázána vysoká korelace ($r = 0,96$). To znamená, že při zvyšující se progresivní motilitě spermií se zvyšuje také rychlost pohybu spermií, se skutečnou (křivočarou) rychlostí se současně zvyšuje i přímočará a průměrná rychlost spermií.

Byl prokázán významný vliv hřebce. Mezi hřebci byly zjištěny významné individuální rozdíly ve všech hodnocených morfometrických parametrech a parametrech motility.

Morfologie, včetně morfometrického měření hlaviček spermií hřebců, a PMOT byly dále významně ovlivněny věkem a fertilitou hřebců. Sledované parametry se významně lišily mezi jednotlivými věkovými skupinami. Lepší kvalita ejakulátu, z hlediska PMOT, byla zjištěna u mladých hřebců do 5 let (PMOT 38,46 %). Mladí hřebci měli také největší rozměry šířky (3,20 μm) a plochy hlaviček spermií (16,87 μm^2). Současně bylo ale u této skupiny hřebců zjištěno nejvyšší procento abnormálních spermií (50,60 %). Opačné hodnoty byly zjištěny u druhé skupiny hřebců ve věku 6 až 15 let – nejnížší PMOT (27,76 %), nejnížší procento abnormálních spermií (18 %) a nejmenší rozměry hlaviček spermií.

Z hlediska vlivu fertility hřebce bylo zjištěno, že se snižující se plodností hřebců se snižovala PMOT a hodnoty šířky a plochy hlaviček a zvyšovalo se procento abnormálních spermií v ejakulátu a hodnoty délky a obvodu hlaviček spermií. Na základě poměru délky a šířky hlavičky bylo zjištěno, že spermie hřebců s nižší plodností byly více zúžené.

Charakteristiky chlazeného spermatu byly ovlivněny použitým ředidlem a dobou skladování spermatu. Použité ředidlo mělo významný vliv na VIT, MOT, PMOT, VCL, VSL a VAP ($P < 0,05$). Zároveň byl prokázán vysoce významný vliv doby skladování na všechny hodnocené parametry ($P < 0,001$). Celkový ochranný účinek ředidla INRA 96 byl významně lepší než u ejakulátů ředěných ředidlem Kenney ($P < 0,01$). Hodnoty VIT, PMOT, VCL a VAP byly vyšší u vzorků spermatu ředěných

ředidlem INRA 96 ($P < 0,05$) než u vzorků ředěných ředidlem EquiPlus. Mezi ředidly Kenney a EquiPlus nebyl prokázán žádný rozdíl.

Ředidla s definovanými kaseinátovými složkami (INRA 96 a EquiPlus) vykazaly pomalejší pokles PMOT za 48 a 72 hodin skladování v porovnání s ředidlem na bázi odstředěného mléka (Kenney). Navíc při použití ředidla INRA 96, které obsahuje NPPC, byla ve srovnání s ostatními ředidly prodloužena kvalita spermatu po dobu nejméně 24 hodin po odběru a naředění.

Z ředidel, testovaných v této práci, má INRA 96 nejlepší predispozice pro udržení životaschopnosti spermatu a pro jeho následné použití k inseminaci. Nejlepší výsledky, získané použitím ředidla INRA 96, ukázaly, že odebrané ejakuláty mohou být použity pro produkci inseminačních dávek chlazeného spermatu během prvních 24 hodin skladování.

8. SOUHRN A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

Výsledky plodnosti a hodnoty reprodukčních ukazatelů hřebců nejsou chovatelské veřejnosti k dispozici a nelze je tedy při výběru plemenných hřebců využívat. Je tedy důležité vytvořit pro chovatele takový materiál, který bude podávat potřebné informace k výběru hřebce z hlediska jeho plodnosti.

Na základě porovnání výše uvedených cílů a následně dosažených výsledků práce lze konstatovat, že:

- Objektivním vyhodnocením základních charakteristik ejakulátu hřebců (objem ejakulátu, koncentrace spermií, motilita spermií s podrobnými kinematickými parametry, morfologie a životaschopnost spermií) metodou CASA byly vytvořeny podmínky pro to, aby se následně tyto zjištěné výsledky mohly promítnout do kvalitnějších a podrobnějších informací pro chovatele a následně i do kvalitnějšího výběru hřebců do plemenitby. V neposlední řadě je důležité, aby chovatelé při výběru hřebců do plemenitby zohledňovali také jejich věk. Příliš mladí nebo naopak příliš staří hřebci by měli být v chovu využíváni pouze za předpokladu pečlivého sledování kvality spermatu a kontroly vytižení hřebce.
- Posouzením morfometrických parametrů na základě velikosti a tvaru hlaviček spermií bylo potvrzeno, že tyto parametry souvisejí s plodností hřebců. Detekce nepatrných rozdílů v morfometrii hlaviček spermií proto může vést k přesnějšímu posouzení plodnosti hřebců.
- Posouzením pohybových charakteristik spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček (rozměry hlaviček a jejich tvar) byla potvrzena hypotéza, že morfologicky větší spermie dosahují vyšších parametrů motility a větší rychlosti pohybu. Nebylo ovšem potvrzeno, že by vyšší motility a větší rychlosti pohybu dosahovaly spermie s větším prodloužením hlavičky.
- Hodnocením vlivu vybraných ředidel na motilitu a životaschopnost spermií bylo zjištěno, že sledované parametry chlazeného spermatu byly významně ovlivněny použitým ředidlem a dobou skladování spermatu. Výběrem vhodného ředidla lze tedy zlepšit výslednou kvalitu inseminační dávky a zvýšit tak potenciál úspěšného zabřeznutí klisny.

9. SEZNAM LITERATURY

1. Aggarwal, R. A. K., Ahlawat, S. P. S., Kumar, Y., Panwar, P. S., Singh, K., Bhar-gava, M. (2007). Biometry of frozen-thawed sperm from eight breeds of Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 68(4), 682–686.
2. Amann, R. P., Katz, D. F. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* 25, 317.
3. Amann, R. P., Pickett, B. W. (1987). Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 7(3), 145–173.
4. Amann, R. P., Thompson, D. L., Squires, E. L., Pickett, B. W. (1979). Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* (27), 1-6.
5. Amann, R. P., Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1), 5-17.
6. Aurich C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 89(1-4), 65–75.
7. Arruda, R. P., Ball, B. A., Gravance, C. G., Garcia, A. R., Liu, I. K. M. (2002). Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 58(2-4), 253-256.
8. Aurich, C., Seeber, P., Müller-Schlösser, F. (2007). Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 °C. *Reproduction of Domestic Animals* 42(4), 445- 448.
9. Ball, B. A., Mohammed, A. O. (1995). Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. *Theriogenology* 44(3), 367–377.
10. Ball, P. J., Peters, A. R. (2004). Reproductive efficiency in cattle production. *Reproduction in cattle. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd*, 1-12.
11. Banaszewska, D., Kondracki, S., Wysokinska, A (2009). Effect of sperm concentration on ejaculate for morphometric traits of spermatozoas of the pietrain breed boars. *Journal of Central Europe Agriculture* 10(4), 383–96.
12. Banaszewska, D., Kondracki, S., Wysokinska, A. (2011). Effect of age on the dimensions and shape of spermatozoa of Large White Polish boars. *Archives Animal Breeding* 54(5), 504–514.

13. Banaszewska, D., Czubaszek, M., Walczak-Jedrzejska, R., Andraszek, K. (2015). Morphometric dimensions of the stallion sperm head depending on the staining method used. *Journal of Veterinary Research* 59(2), 263–270.
14. Barth, A. D., Bowman, P. A., Bo, G. A., Mapletoft, R. J. (1992). Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. *The Canadian Veterinary Journal* 33(1), 31–39.
15. Batellier, F., Magistrini, M., Fauquantz, J., Palmer, E. (1997). Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* 48(3), 391–410.
16. Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M., Magistrini, M. (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 68(3-4), 181-190.
17. Bergeron, A., Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproductive Development* 73(10), 1338-1344.
18. Bierla, J. B., Gizejewski, Z., Leigh, C. M., Ekwall, H., Soderquist, L., Rodriguez- Martinez, H., Zalewski, K., Breed, W. G. (2007). Sperm morphology of the Eurasian beaver, *Castor fiber*: an example of a species of rodent with highly derived and pleiomorphic sperm populations. *Journal of Morphology* 268(8), 683–689.
19. Blanchard, T. L., Thompson, J. A., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Love, C. C., Ramsey, J., O'meara, A. (2010). Some factors associated with fertility of Thoroughbred stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* 30(8), 407-418.
20. Bolaños, J. G., Morán, A. M., da Silva, C. B., Dávila, M. P., Muñoz, P. M., Aparicio, I. M., Pena, F. J. (2014). During cooled storage the extender influences processed autophagy marker light chain 3 (LC3B) of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 145(1-2), 40-46.
21. Brito, L. F. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6(4), 249-264.
22. Brito, L. F. C., Sertich, P. L., Stull, G. B., Rives, W., Knobbe, M. (2010). Sperm ultrastructure, morphometry, and abnormal morphology in American black bears (*Ursus americanus*). *Theriogenology* 74(8), 1403–1413.
23. Carra, E., Sangiorgi, D., Gattuccio, F., Rinaldi, A. M. (2004). Male fertility and mitochondrial DNA. *Biochemical Biophysical Research Communications* 322, 333-339.

24. Casey, P. J., Gravance, C. G., Davis, R. O., et al. (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 47(2), 575-582.
25. Colenbrander B., Gadella B. M., Stout T. A. E. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 38(4), 305–311.
26. Colenbrander B., Puyk, H., Zandee, A. R., et al. (1992). Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum* 88, 29.
27. Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Valorz, C., Wegher, L., Carluccio, A. (2013). Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal Reproduction Science* 136(4), 252-259.
28. Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology* 13(1), 130–138.
29. da Silva, M. A. C., Seidel, G. E., Squires, E. L., Graham, J. K., Carnevale, E. M. (2012). Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reproduction* 143(5), 577-585.
30. Davis, R. O., Gravance, C. G. (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertility and Sterility* 59(2), 412–417.
31. Davis, R. O., Gravance, C. G., Casey, P. J (1993). Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 54(11), 1808–1811.
32. De La Cueva, F. C., Pujol, M. R., Rigau, T., Bonet, S., Miró, J., Briz, M., Rodriguez- Gill, J. E. (1997). Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 48(6), 947–968.
33. Dhurvey, M., Gupta, V. K., Nema, S. P., Patidar, A., Shivhare, M., Singh, N., Shakya, V. (2012). Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *DHR-IJBLS* 3(1), 62-83.
34. Dietz, J. P., Sertich, P. L., Boston, R. C., Benson, C. E. (2007). Comparison of ticarcillin and piperacillin in Kenny's semen extender. *Theriogenology* 68(6), 848-852.

35. Downing-Meisner, A., Klaus, A. V., O'Leary, M. A. (2005). Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *Journal of Morphology* 263(2), 179–202.
36. Dowsett, K. F., Knott, L. M. (1996). The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46(3), 397-412.
37. Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchoroguy, T. J., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology* 265(4), 432-437.
38. Estes, M. C., Soler, A. J., Fernandez-Santos, M. R., Quintero-Moreno, A. A., Garde, J. J. (2006). Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *Journal of Andrology* 27(5), 662–670.
39. Evenson, D. P., Parks, J. P., Kaproth, M. T., et al. (1993). Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry. *Journal of Dairy Science* 76(1), 86-94.
40. Florez-Rodriguez, S. A., de Arruda, R. P., Alves, M. B. R., Affonso, F. J., Carvalho, H. F., Lemes, K. M., Celeghini, E. C. C (2014). Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science* 34(7), 911–917.
41. Froman, D. P., Amann, R. P. (1983). Inhibition of motility of bovine, canine and equine spermatozoa by artificial vagina lubricants. *Theriogenology* 20(3), 357-361.
42. Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, Ch., Sölkner, J. (2006). Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science* 95(1-2), 27-37.
43. Gadella, B. M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science* 107(3-4), 229-236.
44. Gage, M. J. G. (1998). Mammalian sperm morphometry. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 265(1391), 97–103.
45. Gage, M. J., Morrow, E. H. (2003). Experimental evidence for the evolution of numerous, tiny sperm via sperm competition. *Current Biology* 13(9), 754–757.
46. Gago, C., Soler, C., Perez-Sanchez, F., Yeung, C. H., Cooper, T. G. (2000). Effect of cetorelix on sperm morphology during migration through the

- epididymis in the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *American Journal of Primatology* 51(2), 103–117.
47. Gago, C., Perez-Sanchez, F., Yeung, C. H., Tablado, L., Cooper, T. G., Soler, C. (1998). Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *International Journal of Andrology* 21(3), 169–176.
 48. Gamčík, P., Kozumplík, J., et al. (1992). Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. *Nakladateľstvi Príroda Bratislava*. ISBN 80-07-00540-4, 299 s.
 49. Gehlen, H., Bartmann, C. P., Klug, E., Schoon, H. A. (2001). Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. *Journal of Equine Veterinary Science* 21(3), 137–139.
 50. Gibbons, R., Adeoya-Osiguwa, S. A., Fraser, L. R. (2005). A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine binding protein 1. *Reproduction*, 130(4), 497-508.
 51. Giesecke, K., Sieme, H., Distl, O. (2010). Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: a review. *The Veterinary Journal* 185(3), 265-271.
 52. Gil, M. C., Garcia-Herreros, M., Baron, F. J., Aparicio, I. M., Santos, A. J., Garcia-Marin, L. J. (2009). Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* 71(2), 254–263.
 53. Gilbert, G. L., Gilbert, E. A., Govindaraj, A., Jury, L., Mason, M. C., Pfeiffer, K. E., Rowlinson, T. M., Ward, L., Kaya, A., Larson, J. (2012). Endocrine control of bull fertility. In: Liu G, editor. *Cattle: Domestication, Diseases and the Environment*. Hauppauge, NY, USA: Nova Publishers, 1-34.
 54. Gordon, I. R. (2004). Reproductive Technologies in Farm Animals. *CABI Publishing, Wallingford*. ISBN 0-85199-862-3, 297 s.
 55. Gravance, C. G., Liu, I. K., Davis, R. O., et al. (1996). Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 108(1), 41-46.
 56. Gravance, C. G., Champion, Z., Liu, I. K. M., Casey, P. J (1997). Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Animal Reproduction Science* 47(1-2), 149–55.

57. Halo, M., Tirpák, F., Kováčik, A., Lípová, P., Gren, A., Massányi, P. (2018). Biochemical parameters of seminal plasma affect motility trans of stallion spermatozoa. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 7(5), 472-474.
58. Hansen, C., Vermeiden, T., Vermeiden, J. P. W. et al. (2006). Comparison of FAC-SCount AF systém, improved Neubauer hemacytometer, Corning 254 photometr, Sperm Vision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determinativ of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology* 66(9), 2188-2194.
59. Heckenbichler, S., Deichsel, K., Peters, P., Aurich, C. (2011). Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. *Theriogenology* 75(5), 849-856.
60. Hidalgo, M., Rodriguez, I., Pérez, C., Dorado, M., Sanchez, M. (2004). Comparison of three staining procedures used for computer-assisted buck sperm head morphometry analysis. *Reproduction in Domestic Animals* 39(271), 35.
61. Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C. (2005). Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet Med-Czech* 50(1), 24-32.
62. Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66(4), 996-1003.
63. Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J., Soler, C. (2008). Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Animal Reproduction Science* 103(3-4), 374-378.
64. Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z., et al. (2009). Nemoci skotu. *Noviko a.s., Česká buiatrická společnost, Brno*, ISBN:978-80-86542-19-5, 1149.
65. Hurtgen, J. P. (2009). Semen collection in stallions. In: Equine breeding management and artificial insemination. *Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri*, ISBN 978-1-4160-5234-0, s. 33-40.
66. Chandler, J. E., Painter, C. L., Adkison, R. W., Memon, M. A., Hoyt, P. G. (1988). Semen Quality Characteristics of Dairy Goats. *Journal of Dairy Science* 71(6), 1638-1646.

67. Chantler, E., Abraham-Peskir, J. V., Little, S., McCann, C., Medenwaldt, R., (2000). Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology* 41(2), 125-34.
68. Iguer-Ouada M., Verstegen J. (2001). Evaluation of the Hamilton Thorn Computer Based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology* 55(3), 733–749.
69. Ijaz, A., Ducharme, R. (1995). Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5 °C. *Theriogenology* 44(7), 1039- 1050.
70. Janett, F., Thun, R., Niederer, K., et al. (2003). Seasonal changes of semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60(3), 453-461.
71. Janett, F., Sacher, K., Hassig, M., Thun, R. (2012). Quality of raw and of cold-stored semen in icelandic stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* 32(9), 590-595.
72. Jasko, D. J., Lein, D. H., Foote, R. H. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197(3), 389–394.
73. Jasko, D. J., Martin, J. M., Squires, E. L. (1992). Effects of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology* 37(6), 1233–1239.
74. Jelínek, P., Koudela, F., et al. (2003). Fyziologie hospodářských zvířat. *MZLU v Brně. Brno*. ISBN 80-7157-644-1, 414 s.
75. Juyena, N. S., Stelletta, C. (2012). Seminal Plasma: An Essential Review Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology* 33(4), 536-551.
76. Katila, T. (1997). Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology* 48(7), 1217-1227.
77. Kenney, R. M., Bergman, R. V., Cooper, W. L., Morse, G. W. (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, 327-336.
78. Kliment, J. et al. (1989). Reprodukcia hospodárskych zvierat. *Príroda, Bratislava*, ISBN 80- 07-00027-5. 378 s.

79. Klug, E. (1982). Untersuchungen zur klinischen Andrologie des Pferdes. Die Bedeutung andrologischer Befunde am Hengst für den Zuchteinsatz, Hannover, Tierärztl Hochsch, Habil-Schr.
80. Kondracki, S., Banaszewska, D., Mielnicka, C. (2005). The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). *Cellular Molecular Biology Letters* 10(1), 3–13.
81. Kondracki, S., Wysokińska, A., Iwanina, M., Banaszewska, D., Sitarz, D. (2011). Effect of sperm concentration in an ejaculate on morphometric traits of spermatozoa in Duroc boars. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 14(1), 35-40.
82. Koyago, M., Nakada, K., Tsunoda, N., Moriyoshi, M., Sawamukai, Y. (2009). Change in morphology of spermatozoa from dismount semen during the breeding season in Thoroughbred stallions in Japan. *Journal of Equine Science* 20(1), 1-5.
83. Kraemer, M., Fillion, C., Martin-Pont, B., Auger, J. (1998) Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer assisted sperm analysis system. *Human Reproduction* 13(3), 611–619.
84. Kuster, C. E., Singer, R. S., Althouse, G. C. (2004). Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology* 61(4), 691-703.
85. Lagares, M. A., Martins, H. S., Carvalho, I. A., Souza, M. R., Penna, C. F. A. M., Loiaza, A. M., Stahlberg, R. (2012). Protecting stallion sperm during cooling and freezing with caseinate based extenders. *Journal of Equine Veterinary Science* 8(32), 492.
86. LeFrappier, L., Walston, L., Whisnant, C. S. (2010). Comparison of various extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. *Journal of Equine Veterinary Science* 30(4), 200-204.
87. Le Guillou, J., Ropers, M. H., Gaillard, C., David-Briand, E., Desherces, S., Schmitt, E., Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Tainturier, D., Anton, M. (2013). Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108, 246-254.
88. Louda, F. (1980). Reprodukce hospodářských zvířat I.: návody k praktickému cvičení. 1. vyd. Praha: SPN.
89. Louda, F., et al. (2001). Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. ČZU v Praze. ISBN 80-213-0702-1, 225 s.

90. Love, C. C. (1992). Semen collection techniques. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 8(1), 111-128.
91. Love, C. C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76(3), 547-557.
92. Love, C. C. (2012). Measurement of concentration and viability in stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 32(8), 464-466.
93. Love, C. C., Thompson, J. A., Lowry, V. K., Varner, D. D. (2002). Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology* 57(3), 1135 – 1142.
94. Love, C. C., Noble, J. K., Standridge, S. A., Bearden, C. T., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Cavinder, C. A. (2015). The relationship between sperm quality in cool-shipped semen and embryo recovery rate in horses. *Theriogenology* 84(9), 1587-1593.
95. Lupold, S., Calhim, S., Immler, S., Birkhead, T. R. (2009). Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276(1659), 1175–1181.
96. Malmgren, L. (1997). Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology* 48(4), 523-530.
97. Malo, A. F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A. J., Roldan, E. R. S. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology Letters* 2(2), 246–249.
98. Marti, J. I., Aparicio, I. M., Garcia-Herreros, M. (2011a). Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology* 75(3), 473–481.
99. Martinez, A. L. P. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science* 82, 209-224.
100. Martins, H. S., Souza, M. R., Penna, C. F. A. M., Da Silva, G. C., Côrtes, S. F., Stahlberg, R., Lagares, M. A. (2016). Milk, caseinate and lactoferrin addition to equine semen cooling extenders. *Andrologia* 48(9), 950- 956.
101. Marvan, F., et al. (1998). Morfologie hospodářských zvířat. *ČZU v Praze a MZLU v Brně, nakladatelství Brázda, s. r. o., Praha*. ISBN 80-209-0273-2, 304 s.
102. Michajilov, N. N. (1950). Sperm dilution in the milk. *Czech. Vet. Mag., January 10, abstracted in Journal of the American Veterinary Medicine Association, 117, 337.*

103. Moran, D. M., Jasko, D. J., Squires, E. L., Amann, R. P. (1992). Determination of temperature and cool rate induced cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38(6), 999–1012.
104. Morrell, J. M., Johannisson, A., Dalin, A. M., Hammar, L., Sandebert, T., Rodriguez-Martinez, H. (2008). Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50(1), 1-7.
105. Morato-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A. J., Estesó, M. C., Martínez-Pastor, F., Pérez-Guzmán, M. D., Garde, J. J. (2010). Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology* 73(4), 437-448.
106. Morrow, E. H., Gage, M. J. G. (2001). Consistent significant variation between individual males in spermatozoal morphometry. *Journal of Zoology* 254(2), 147–153.
107. Mortimer, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update* 3(5), 403-439.
108. Murphy, C., Fahey, A. G., Shafat, A., Fair, S. (2013). Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. *Journal of Dairy Science* 96(7), 4447–4454.
109. Müller, Z. (2006). Nové reprodukční metody v plemenitbě koní. In: *Chov a šlechtění koní v současných ekonomických podmínkách*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, ISBN 80-7375-006-6, s. 147.
110. Mutalík, S., Salián, S. R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A. R., Kumar, P., Kalthur, G., Adiga, S. K. (2014). Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 60(3), 183-188.
111. Nagy, S., Hazas, G., Papp, A. B., Ivancsics, J., Szasz, F., Szasz Jr, F., Foote, R. H. (1999). Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology* 52(7), 1153-1159.
112. Neuhauser, S., Gösele, P., Handler, J. (2018). The effect of four different commercial semen extenders on the motility of stallion epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 62, 8-12.

113. Noorafshan, A., Karbalay-Doust, S. (2010). A simple method for unbiased estimating of ejaculated sperm tail length in subjects with normal and abnormal sperm motility. *Micron* 41(1), 96–99.
114. Núñez-Martínez, I., Moran, J. M., Peña, F. J. (2007). Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *International Journal of Andrology* 30(3), 182-189.
115. Oberpenning, F., Yeung, C., Cooper, T. (2000). Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *International Journal of Andrology* 23, 77-84.
116. Ostermeier, G. C., Sargeant, G. A., Yandell, B. S., Evenson, D. P., Parrish, J. J. (2001a). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology* 22(4), 595–603.
117. Ostermeier, G. C., Sargeant, G. A., Yandell, T. B. S., Parrish, J. J. (2001b). Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. *Journal of Andrology* 22(4), 584–594.
118. Ortega-Ferrusola, C., Johannisson, A., Vega, F. J. P., Tapia, J. A., Rodriguez Martinez, H., Dalin, A. M., Morrell, J. M. (2011). Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer centrifugation, through Androcoll-E. *Journal of Equine Veterinary Science* 31(7), 411- 416.
119. Ortega-Ferrusola, C., Macías García, B., Suárez Rama, V., Gallardo-Bolaños, J. M., González-Fernández, L., Tapia, J. A., Peña, F. J. (2009). Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reproduction in Domestic Animals* 44(3), 419-423.
120. Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M., Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skimmed milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology* 66(5), 1115-1122.
121. Palmer, E. (1984). Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction, Urbana – Champaign II* 3:377

122. Parlevliet, J. M., Kemp, B., Colenbrander, B. (1994). Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallion. *Journal of Reproduction and Fertility* 101(1), 183-187.
123. Parisi, A. M., Thompson, S. K., Kaya, A., Memili, E. (2014). Molecular, cellular, and physiological determinants of bull fertility. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 38(6), 637-642.
124. Pellicer-Rubio, M. T., Combarrous, Y. (1998) Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of Reproduction and Fertility* 112(1), 95-105.
125. Peña, F. J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñezmartínez, I., Tapia, J. A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. (2005). Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology* 26(6), 716-723.
126. Pérez-Sánchez, F., Tablado, L., Soler, C. (1997). Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *Theriogenology* 47(4), 898–901.
127. Pesch, S., Bergmann, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37(7), 597-612.
128. Petrunkina, A. M., Waberski, D., Günzel-Apel, A. R., et al. (2007). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134(1), 3-17.
129. Pickett, B. W. (1993). Reproductive evaluation of the stallion. In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (eds), *Equine Reproduction Philadelphia, London: Lea and Febiger*, 755-768.
130. Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Magistrini, M. (2008). High fertility rates with stallion sperm cryopreserved in INRA 96® based extender are not predicted by in vitro parameters. *Animal Reproduction Science* 3(107), 339-340.
131. Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Journal of Andrology* 35(2), 109-124.
132. Poiani, A. (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60(3), 289-310.

133. Price, S., Aurich, J., Davies-Morel, M., Aurich, C. (2008). Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 degrees C. *Reproduction in Domestic Animals* 43(3), 261-266.
134. Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A. T., Rodriguez-Gil, J. E. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59(9), 1973-1990.
135. Quintero-Moreno, A., Gonzalez-Villalobos, D., Lopez-Brea, J. J. G., Estes, M. C., Fernandez-Santos, M. R., Carvalho-Crociata, J. L., Mejia-Silva, W., Leon-Atencio, G (2009). Morphometric evaluation of sperm head of domestic pig according their age. *Revista Científica* 19(2), 153–158.
136. Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N. (2000). Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 59(1-2), 31-41.
137. Rezagholizadeh, A., Gharagozlou, F., Niasari-Naslaji, A., Akbarinejad, V., Ziapour, S. (2015). Evaluation of sperm characteristics in Caspian stallions using computer-assisted sperm analysis. *Journal of Equine Veterinary Science* 35(6), 505-509.
138. Rigby, S. L., Brinsko, S. P., Cochran, M., Blanchard, T. L., Love, C. C., Varner, D. D. (2001). Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extenders. *Animal Reproduction Science* 68(3-4), 171–180.
139. Rodriguez, O. L., Berndtson, W. E., Ennen, B. D., Pickett, B. W. (1975). Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *Journal of Animal Science* 41(1), 129-135.
140. Rodriguez, I., Sanz, J., Perez, C., Felipe, M., Dorado, J., Hidalgo, M. (2001). Fertilidad *in vivo* del esperma congelado-descongelado. *I Jornadas de Investigacion, Cordoba, Spain*, 317–321.
141. Rodriguez-Martinez, H., Barth, A. D. (2007). In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 64, 39–54.
142. Root Kustritz, M. V. (2007). The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology* 68(3), 329 – 337.
143. Samper, J. C. (2009). Equine breeding management and artificial insemination. *Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri*, ISBN 978-1-4160-5234-0, 310 s.

144. Samper, J. C., Pycock, J. F., McKinnon, A. O. (2007). Current therapy in equine reproduction. *Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri*, ISBN 978-0-7216-0252-3, 492 s.
145. Sanchez, M. V., Bastir, M., Roldan, E. R. S. (2013). Geometric morphometrics of rodent sperm head shape. *PLOS ONE*, 8(11).
146. Sancho, M., Perez-Sanchez, P., Tablado, L., de Monserrat, J. J., Soler, C. (1998). Computer-assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology* 50(1), 27–37.
147. Sanocka, D., Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(1), 1-7.
148. Saravia, F., Nunez-Martinez, I., Moran, J. M., Soler, C., Muriel, A., Rodriguez-Martinez, H., Pena, F. J. (2007). Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology* 68(2), 196–203.
149. Serres, C., Escalier, D., David, G. (1983). Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biology of the Cell* 49(2), 153–216.
150. Severa, L., Máchal, L., Švábová, L., Mamica, O. (2010). Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analysis and Fourier descriptors. *Animal Reproduction Science* 119(1-2), 50-55.
151. Sieme, H. (2009). Semen evaluation. In: *Equine breeding management and artificial insemination*. *Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri*, ISBN 978-1-4160-5234-0, s. 57-74.
152. Sieme, H., Katila, T., Klug, E. (2004). Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61(4), 769-784.
153. Soler, C., De Monserrat, J. J., Gutiérrez, R., Nunez, J., Nunez, M., Sancho, M., Cooper, T. G. (2003). Use of the Sperm-Class Analyser® for objective assessment of human sperm morphology. *International Journal of Andrology* 26(5), 262-270.
154. Sukcharoen, N., Sithipravej, T., Promvienghai, S., Chinpilas, V., Boomkasemsanti, W. (1998). Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 69(3), 564–568.

155. Sullivan, R., Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* 146(1), 21-35.
156. Swokowski, E. W., Olinick, M., Pence, D. (1994) *Calculus*. 6th ed. Boston, USA: PWS publishing company
157. Tablado, L., Perez-Sanchez, F., Nunez, J., Nunez, M., Soler, C. (1998). Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm. *Journal of the Bioelectromagnetics Society* 19(6), 377–383.
158. Tanaka, H., Baba, T. (2005). Gene expression in spermiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(3), 344-354.
159. Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Pena, F. J., Aparicio, I. M. (2012). The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 65-75.
160. Thurston, L. M., Watson, P. F., Mileham, A. J., Holt, W. V. (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology* 22(3), 382-394.
161. Tischner, M., Kosiniak, K. (1992). Techniques for collection and storage of stallion semen with minimal secondary contamination. *Acta Veterinaria Scandinavia Supplement* 88, 83-90.
162. Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E. R. (2011). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC evolutionary biology* 11(1), 1-10.
163. Turner, R. M., Zeng, W. (2012). The emerging pathophysiology of age-related testicular degeneration with a focus on the stallion and an update on potential therapies. *Reproduction in domestic animals* 47, 178-186.
164. Varner, D. D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70(3), 448 – 462.
165. Varner, D. D., Blanchard, T. L., Love, C. L., Garcia, M. C., Kenney, R. M. (1988). Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 29(5), 1043–1054.

166. Varner, D. D., Blanchard, T. L., Meyers, P. J., Meyers, S. A. (1989). Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 °C. *Theriogenology* 32(4), 515-525.
167. Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onelin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57(1), 149–179.
168. Věžník, Z. et al. (2004). Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. *Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně*, ISBN 80-86895-01-7, 266 s.
169. Vieira, A., Miller, D. J. (2006). Gamete interaction: is it species-specific? *Molecular Reproduction and Development* 73(11), 1422-1429.
170. Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon). Příloha č.5, http://www.pravnipredpisy.cz/predpisy/ZAKONY/2000/471000/Sb_471000_----.php
171. Waheed, M. M., Ghoneim, I. M., Abdou, M. S. (2015). Morphometric characteristics of spermatozoa in the Arabian horse with regard to season, age, sperm concentration, and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* 35(3), 244–249.
172. Webb, G. W., Dean, M. M., Humes, R. A., Heywood, J. S. (2009). A comparison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cold stored stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 29(4), 229-32.
173. Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*, 2nd ed., vol. 1. New York: Raven Press; 189-317.
174. Yániz, J. L., Soler, C., Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Animal reproduction science* 156, 1-12.
175. Yeung, C. H., Perez-Sanchez, F., Soler, C., Poser, D., Kliesch, S., Cooper, T. G. (1997). Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Human Reproduction Update* 3(3), 205–213.

176. Zaini A., Jennings M. G., Baker H. W. G. (1985). Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men? *International Journal of Andrology* 8(6), 427–435.

