

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra speciální zootechniky**



**Konzervace ejakulátu hřebců pro využití v umělé  
inseminaci**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Petra Hašková**

**Obor studia: ABPH**

**Vedoucí práce: Ing. Martina Jánošíková**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Konzervace ejakulátu hřebců pro využití v umělé inseminaci" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2017\_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce Ing. Martině Jánošíkové za odborné rady, bratrovi Martinu Haškovi za pomoc s úpravou textu a rodičům za trpělivost a podporu.

# Konzervace ejakulátu hřebců pro využití v umělé inseminaci

## Souhrn

V dnešní době je inseminace nejběžnější metodou reprodukce koní. Využívají se čerstvé, chlazené a mražené inseminační dávky. Dostatečná koncentrace motilních a nepoškozených spermií je předpokladem úspěchu. K dosažení kvality dávky potřebujeme zdravého dobře živeného hřebce, vybavení, zkušenost a správnou přípravu.

Proces začíná odběrem ejakulátu, jeho makroskopickým a mikroskopickým zhodnocením. Obvykle následuje centrifugace, která má za cíl odstranit semennou plasmu. Centrifugaci nepotřebujeme provádět, pokud byla odebrána pouze na spermie bohatá frakce. Ke spermiím je přidáno ředidlo, které chrání membránu při chlazení/mražení a dalších manipulacích a má funkci výživy. Ředidla se v zásadě dělí na mléčná a žloutková. Základem mléčného je odtučněné sušené mléko a glukóza. U žloutkového vaječný žloutek s přídavkem glycinu. K ředidlům se přidávají pufr, antibiotika a cukry.

Pro mražení se využívá kryoprotektivních vlastností těchto látek. Nejrozšířenější látkou je glycerol. Zprvu byl používán u skotu. Reakce hřebčích spermií je různá. Výraznou nevýhodou je toxicita. Používá se v koncentraci okolo 2.5% v závislosti na ředidle. Vaječný žloutek byl zprvu zkoušen na býčích posléze hřebčích spermiích. Jde o neinvazivní kryoprotektivum, kde obsah LDL a fosfolipidů přispívá k ochraně integrity plasmatické membrány během fáze mražení a tání. Žloutek lze nahradit LDL. Glutamin je využitelný u dobře mrazitelných hřebců, kde v nízkých dávkách snižuje toxicitu glycerolu a po rozmražení zlepšuje progresivní motilitu. Med je bohatým zdrojem sacharidů, vitamínů skupiny B a minerálů. Ve směsi s vaječným ředidlem prokazatelně pozitivně působil na motilitu. Obsažená fruktóza a glukóza působí jako nepenetrující extracelulární kryoprotektant udržující osmotickou rovnováhu. Kryoprotektiva umožňují spermiím projít mražením v párách tekutého dusíku, a posléze do něho být v pejetách o objemu 0.5 ml uloženy, a přečkat teplotu -196°C. Mražený mohou být i epididymální spermie, které se odebírají po eutanázii nebo nečekaném úhynu hřebce z ocasu nadvarlete a chámovodu. Touto cestou je možné vyrobit cca 20 inseminačních dávek. Spermie je vhodné inseminovat hysteroskopicky do děložního rohu nebo

je použit na metodu ICSI. Mražené dávky jsou nástrojem pro uchování genů plemen málopočetných, cenných či zařazených do genových zdrojů.

Ejakulát je pomalu chlazen a plněn do stříkaček. Chlazené dávky jsou baleny do přepravních kontejnerů s chladicí vložkou, které udrží teplotu až 48 hodin. Po té se expedují. Inseminace standardně probíhá do 24 hodin po odběru. Koncentrace spermií se běžně pohybuje okolo  $300 \times 10^6/\text{ml}$ .

Při odběru je důležité zacházet s ejakulátem citlivě, odebírat do předeřtých nástrojů, dbát na hygienu, zamezit kontaminaci a zbytečně neriskovat chladový šok spermií. Při vlastním aktu inseminace je opět nutné dbát na správnou teplotu. Celý proces skýtá hodně prostoru pro chyby, snažme se jim aktivně vyvarovat.

**Klíčová slova:** hřebec, ejakulát, ředidlo, umělá inseminace, kryokonzervace

# Preservation of stallion ejaculate for use in artificial insemination

## Summary

These days, artificial insemination is commonly used method in horse reproduction. Fresh, cooled and frozen insemination doses are used. The assumption is that satisfactory concentration of motile unharmed spermatozoa will provide us success. To achieve this goal, we need healthy and well fed stallion, proper equipment, experiences and to be well prepared.

Everything starts with ejaculate collection and its macroscopic and microscopic evaluation. When everything is all right, it's followed by centrifugation. The purpose of centrifugation is to remove seminal plasma, which is unwanted for further semen preservation. We do not need to centrifugate, when we choose to collect only gel-free fraction. Spermatozoa is mixed with dilutant. Its purpose is to protect the spermatic membrane in proces of cooling/freezing and further manipulation. The dilutant has nourishing function too because we have removed seminal plasma. Dilutants can be divided into two main groups: egg-based and milk-based. The milk-based is mixture of non-fat dried milk and glucose. The egg-based combines egg-yolk and glycine. We add buffer, antibiotics and sugar in to dilutants.

We use cryopreservative properties of these substances. Glycerol is commonly used substance widely used in cattle. Reaction of equine spermatozoa differs. Its toxicity is the biggest disadvantage. The used concentration is dependant on dilutant and is about 2.5%. The egg yolk was firstly used in cattle then in equine spermatozoa. It is noninvasive cryopreserving agent. Content of LDL and phospholipids contributes to protection of plasmatic membrane integrity during freezing and thawing phase. The egg-yolk can be completely replaced by LDL. Glutamine is useable in good freezing stallions. In low dose use, it reduces the glycerol toxicity and improves progresive motility after thaw. Honey is good source of sugars, B vitamins and minerals. It clearly positively acts to progresive motility in a mixture of honey and egg-yolk. The content of glucose and fructose act as non-penetrative extracellular cryopreserving agent. It keeps osmotic balance. Cryopreservatives allows the sperm cells to be freezed in fumes of liquid nitrogen and then to be frozen in straws below -196°C. Epididymal spermatozoa can be frozen too. These are taken after euthanasia or unexpected death from the tail of epididymis and vas deferens. We can prepare up to 20 insemination doses. Spermatozoa can be used in ICSI or

inseminated to uterine horn hysteroscopically. Frozen doses are tool of protection to rare, valuable or gene source breeds.

After dilution, ejaculate is slowly cooled and filled into 5 ml syringe. Cooled ejaculate (4-6°C) is packed into transport container which can hold the temperature up to 48 hours. A mare is inseminated in 24 hours after collection. The spermatozoa concentration is about  $300 \times 10^6/\text{ml}$ .

It is important to treat the ejaculate gently, use and collect into pre-warmed vessel and equipment, keep hygiene, prevent contamination and do not risk cold shock. Keep right temperature in the actual process of insemination. In the proces, there is a lot of room to make mistakes. Try to actively avoid them.

**Keywords:** stallion, ejaculate, extender, artificial insemination, cryopreservation

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>10</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>10</b>
<b>3 Literární řešerše.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Historie umělé inseminace.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Anatomie a fyziologie pohlavní soustavy hřebců .....</b>	<b>12</b>
3.2.1 Varle.....	12
3.2.2 Mikroskopická stavba varlete .....	13
3.2.3 Spermatogeneze .....	15
3.2.4 Endokrinní aktivita varlat, fotoperioda a řízení spermatogeneze .....	16
3.2.5 Nadvarle.....	19
3.2.6 Chámovod.....	20
3.2.7 Přídatné pohlavní žlázy.....	20
3.2.8 Pyj.....	22
<b>3.3 Výběr hřebce do plemenitby .....</b>	<b>23</b>
3.3.1 Zdravotní aspekty výběru hřebce.....	23
3.3.2 Vyšetření reprodukčního traktu .....	24
3.3.3 Předvýběr hřebce .....	25
3.3.4 Zkouška výkonnosti hřebců – 70 denní test.....	25
3.3.5 Hodnocení hřebců před zápisem do plemenné knihy .....	27
<b>3.4 Odběr spermatu .....</b>	<b>27</b>
3.4.1 Umělé vagíny .....	28
3.4.2 Trénink na fantom.....	30
3.4.3 Postup odběru .....	31
<b>3.5 Hodnocení spermatu .....</b>	<b>31</b>
3.5.1 Spermie .....	31
3.5.2 Mikroskopické zhodnocení.....	33
3.5.3 Makroskopické zhodnocení .....	38
<b>3.6 Složky a výroba inseminačních dávek.....</b>	<b>39</b>
3.6.1 Ředidla.....	40
3.6.1.1 Mléčná ředidla.....	40
3.6.1.2 Žloutková ředidla .....	42
3.6.1.3 Ředidla využitelná pro mražené ID.....	42
3.6.2 Kryoprotektanty .....	43
3.6.3 Postup výroby čerstvé a chlazené inseminační dávky .....	47
3.6.4 Postup výroby mražené inseminační dávky.....	48
3.6.5 Kryokonzervací indukovaná poškození.....	49
3.6.6 Konzervace epididymálních spermií .....	50



<b>4 Závěr .....</b>	<b>53</b>
<b>5 Použitá literatura .....</b>	<b>54</b>

# 1 Úvod

Nejrozšířenějšími metodami reprodukce používané u koní, jsou přirozená plemenitba a umělá inseminace. U některých plemen není umělá inseminace možná na základě zákazu ze strany plemenné knihy (anglický plnokrevník). Umělá inseminace zahrnuje využití čerstvého, chlazeného a mraženého semene. V dnešní době je umělá inseminace masivně využívána hlavně z důvodů ekonomických, dále z důvodu minimalizace nakažení pohlavně přenosnými chorobami, eliminace zranění jak hřebce, tak klisny, intenzivnějšího využití hřebce během sezóny a v neposlední řadě odpadají starosti ohledně transportu koní.

Zařazení hřebce do umělé inseminace má především zdravotní výhody. Ejakulát je kontrolován a tak odhalení náhlého reprodukčního problému je velice rychlé a vhodná opatření mohou být provedena okamžitě. Umělá inseminace je prostředkem, díky kterému je možné využít staré hřebce, kteří by nebyli schopni pouštět v potřebné intenzitě. Umožňuje mrazit dávky od hřebců intenzivně sportovně využívaných, kteří by jinak nebyli v sezóně k dispozici vůbec nebo jen omezeně. Inseminační dávky je možné jednoduše celosvětově transportovat a využít tak geny, které by jinak nebyly široce dostupné.

V současnosti se stále hledají způsoby jak efektivně uchovávat genetický materiál bez zbytečných ztrát. Jsou známa mezidruhová specifika a tak nelze ředidla neomezeně používat. Hřebčí spermie jsou velice citlivé a každý hřelec je individuální, a tak není dokonce ani vnitrodruhově možné ředidla používat bez omezení. Důvody proč tomu tak je, stále nejsou zcela objasněny. Nejpalčivější je problém u mražených dávek, kdy je skupina hřebců, u kterých v současné době nejsme schopni dosáhnout uspokojivých kvalitativních parametrů ejakulátu, jinými slovy jsou nemrazitelní

## 2 Cíl práce

Cílem práce je sestavit aktuální literární přehled o způsobu konzervace ejakulátu hřebců pro využití v umělé inseminaci.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Historie umělé inseminace

První důležité studie o umělé inseminaci na savcích byly prováděny na koňovitých. Koncem 19. století se první programy umělé inseminace zaměřily přímo na koně. V této době se nejvíce systematického výzkumu odehrávalo v Rusku. Po první světové válce se pozornost přesunula na hovězí dobytek a ovce. Byla to doba vývoje umělých vagín a fantomů, oddělování jednotlivých frakcí a schopnosti oplodnit více klisen najednou. Na konci 30. let 20. století byly vyvinuty techniky chlazení semene, které se využívají dodnes. Po druhé světové válce pokleslo množství inseminovaných klisen, ale s novou rolí koně jako sportovního partnera se opět probudil zájem o umělou inseminaci. Na rozdíl od hovězího dobytka, mražení koňského semene nedosáhlo takového úspěchu. Nedávné pokroky v koňské inseminaci zahrnují sexování spermií, nitroděložní inseminaci nízkou dávkou a itracytoplasmatickou injekcí spermií.

Roku 1678 byl nizozemský přírodovědec Antonie van Leeuwenhoek prvním člověkem, který spatřil spermie, avšak je pokládal za již kompletní předchůdce živých bytostí. Dalším průkopníkem byl německý inženýr Stephan Jacobi, který nejprve odebral jikry a mlíčí, aby je pak sám uměle smíchal a tím oplodnil. Práci publikoval roku 1725. Jeho výzkumy byly důležitým krokem k moderní akvakultuře. O 50 let později jsou zaznamenány první úspěšné odběry semene u savců. Italský kněz a vědec Lazzaro Spallanzani inseminoval fenu a odchoval tři štěňata. Po tomto úspěchu bylo uskutečněno ještě několik dalších umělých inseminací psů. Metoda nezůstala bez povšimnutí humánních lékařů, a tak první pokusy na lidech byly provedeny v 19. století. Zákrok byl roku 1897 zakázán papežem Levem XIII. Roku 1888 francouzský veterinář Repiquet navrhl Společnosti Veterinárních lékařů metodu umělé inseminace jako výborný prostředek pro překonání snížené plodnosti u některých klisen a krav, k produkci mul, a také prostředku, díky němuž může být hřebec v chovu intenzivněji využit. Sperma bylo přenášeno do dělohy pomocí stříkačky nebo želatinových kapslí. V této době (1903) Sand v Copenhagenu odebíral sperma do kondomů vyrobených z prasečích měchýřů a získal čtyři hříbata z osmi klisen. Další úspěšné inseminace byly provedeny v Rakousko-Uherském Chorvatsku, Maďarsku, Ruském Polsku a Japonsku. V 80. letech 20. století byl zaznamenán dramatický rozmach využití umělé inseminace. Pro představu využití umělé inseminace u německých teplokrevných plemen: v roce 1985 bylo 98% klisen zapuštěno přirozeně, 1995 již 50% uměle a v roce 2004 již více než 80%. Dnes se blížíme k číslu 90% uměle inseminovaných klisen (Aurich, 2012).

## 3.2 Anatomie a fyziologie pohlavní soustavy hřebců

### 3.2.1 Varle

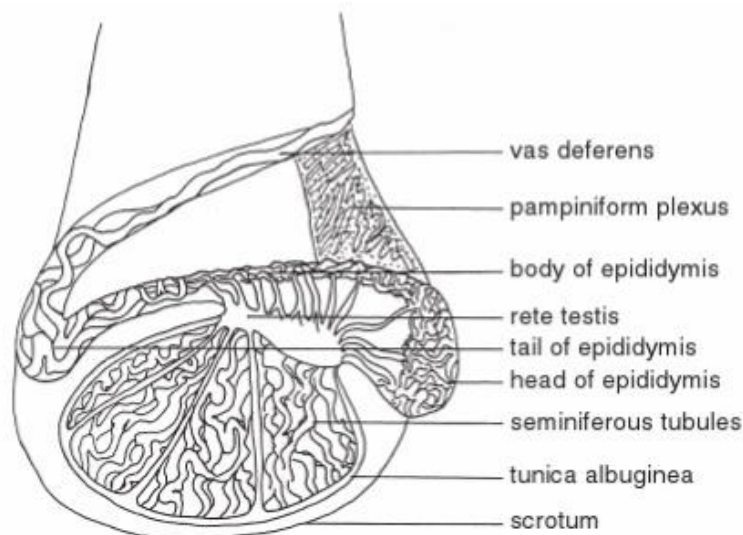
Varle je párová samčí pohlavní žláza tuhoelastické konzistence vejčitého, ze strany mírně zploštělého tvaru (Obrázek 3.1). Je velmi citlivá na tlak. Tvoří spermie a pohlavní hormon testosteron. Hřebčí varlata jsou dlouhá 10 – 12 cm a váží 400 – 600 g (Marvan, 2011). Jejich velikost roste alometricky zároveň s celkovým růstem těla do doby, než je růst kompletně dokončen a to většinou okolo 5. roku věku (Morel, 2008). Většina povrchu varlete je volná, pouze k jednomu okraji se podélně přikládá nadvarle, rozšířené na jednom konci v hlavu, na druhém v ocas nadvarlete. Varlata jsou uložena v šourku (Marvan, 2011).

Varlata plní gametogenní a endokrinní funkci. Jsou zavěšena vně těla hřebce, aby byla udržena teplota zhruba o 3°C nižší, než je teplota těla (tzn. 35-36°C vně, 39°C uvnitř těla). Produkce spermií je větší při této nižší teplotě. Při onemocnění zvyšující teplotu šourku, nadvarlete nebo varlete dochází k výraznému poklesu spermatogeneze. Stav testikulární disfunkce je přechodný a je plně závislý na době zvýšení teploty (Morel, 2008). Pod kůží je podkožní svalová vrstva, která ve střední rovině tvoří přepážku, rozdělující šourkovou dutinu na dvě poloviny. Je složena z hladkosvalových buněk a elastických vláken a citlivě reaguje na změny teploty prostředí. V chladném prostředí se podkožní svalová vrstva smršťuje, svrašťuje kůži šourku, tím zmenšuje jeho plochu. Teplém prostředí ochabuje, čímž se ochlazovací plocha šourku zvětšuje. Pod touto vrstvou je uložen příčně pruhovaný sval - zvedač varlete (*musculus cremaster*). Jako plochý svalový pruh se odštěpuje od vnitřního šikmého břišního svalu a vějířovitě se vytrácí v šourkové stěně. Při svém smrštění zvedá varle a nadvarle dorzálně (Marvan, 2011). Tyto struktury jsou schopny přitáhnout varlata k tělu a regulovat jejich teplotu pomocí potních žláz varlete a arteriovenózní výměny tepla s žilní pletení - pampiniform plexus (Morel, 2008). Krev do varlat přivádějí varletní tepny. Souběžně s nimi probíhají varletní žíly. Jak tepny, tak žíly jsou uzavřeny do semenného provazce. V krátké vzdálenosti nad varlaty se varletní žíly meandrovitě stáčejí (*plexus pampiniformis*) a přikládají se těsně na kličky varletních tepen. Toto těsné sblížení a délka (vzniklá meandrovitým stočením) umožňuje, že arteriální krev přitékající do varlat je ochlazována žilnou krví, které odtéká z varlat. Tepny a žíly se rovněž těsně přikládají k povrchu varlat a tím dochází rovněž k jejich ochlazování (Morel, 2008).

Třetí vrstvu šourkové stěny tvoří silná vazivová blána - vnitřní povázka varlete, k níž zevnitř přirůstá tenká serózní blanka, tzv. nástěnný list poševního obalu. Povázka i poševní obal vznikly při vývoji šourku vychlípáním příčné břišní povázky nástěnné pobřišnice tříselným

kanálem do šourkové dutiny. Na mediální straně šourku přechází nástěnný list poševního obalu ze stěny šourku na varle, nadvarle a semenný provazec, které pak pokrývá jako útrobní list. V místě přechodu obou listů je tedy varle s nadvarletem připojeno k šourkové stěně duplikaturou serózy, označovanou jako okružní varlete. Nástěnný a útrobní list poševního obalu jsou k sobě přiloženy jen volně a uzavírají mezi sebou kapilární štěrbinu, vyplněnou malým množstvím serózní tekutiny. Tato štěrbinu se nazývá poševní dutina a poševním kanálem komunikuje s pobřišnicovou dutinou.

Varle s nadvarletem se embryonálně zakládají na stropu břišní dutiny a až druhotně sestupují do šourku. K dokončení sestupu varlat u koně dochází během 1. týdne po porodu. Při sestupu varlat se uplatňuje vazivový pruh, tzv. kormidlo varlat. Růstem těla a zkracováním kormidla je varle s nadvarletem postupně stahováno do šourku, přičemž před sebou vytlačuje útrobní pobřišnici. Ta se po sestupu přemění v útrobní list poševního obalu a v okružní varlete. Nesestoupí-li varlata do šourku a obě zůstanou v břišní dutině nebo tříselném kanálu, hovoříme o oboustranném břišním nebo tříselným kryptorchismu, který má za následek trvalou neplodnost samce. V přítomnosti jednostranného kryptorchismu je plodnost sice zachována, ale vzhledem k dědičnosti této vady jsou postižení samci vyřazováni z chovu (Marvan, 2011). Hřebci se pak nazývají jirčáci neboli špičáci (Reece, 2011).



Obrázek 3.1; Schématický vertikální řez varletem (Morel, 2008).

### 3.2.2 Mikroskopická stavba varlete

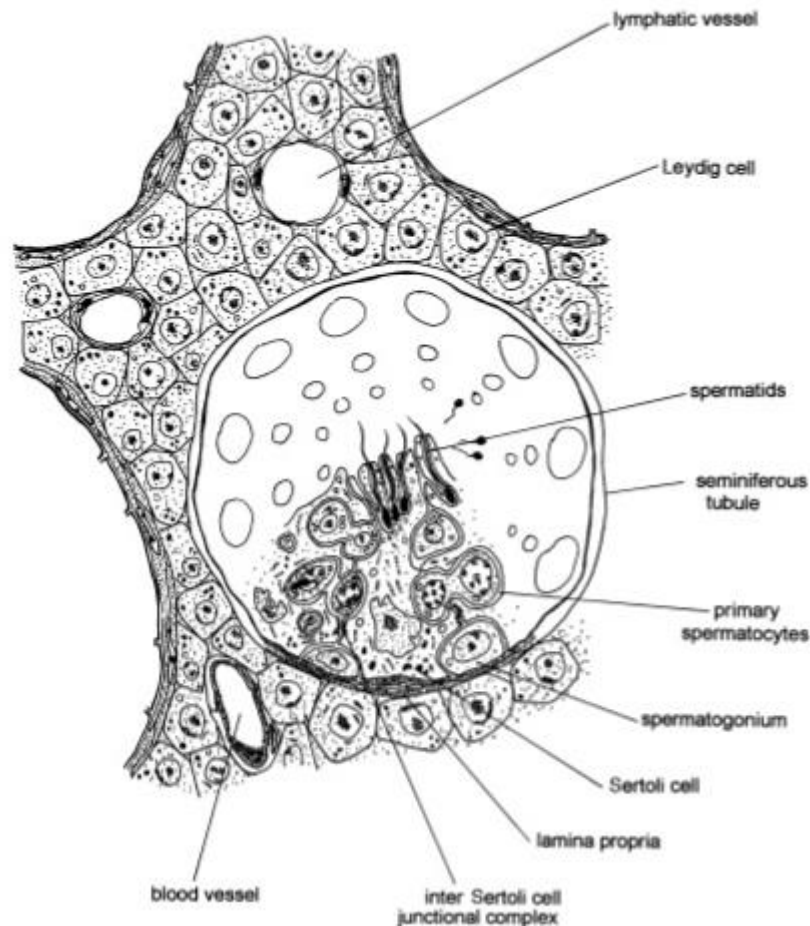
Povrch varlete je hladký, krytý tenkou serózní blankou, která představuje útrobní list poševního obalu (*tunica vaginalis*). Pod ní se nachází bělavý obal (*tunica albuginea*). Bělavý obal je silná vrstva hustého kolagenního vaziva s bohatě rozvětvenými krevními cévami, které prosvítají

přes tenkou serózu a svým zvlněným průběhem vytvářejí na varleti typickou kresbu. Od bělavého obalu vybíhají dovnitř varlete slabší vazivové přepážky (*septula testis*), které se ve středu varlete spojují v ploché středové vazivo varlete – mediastinum. Vazivovými přepážkami je křehký žlutohnědý parenchym varlete rozdělen na 100–300 lalůček (*lobuli testis*). Mají zhruba jehlanovitý tvar a jsou svou širokou bází obráceny k bělavému obalu a tupým vrcholem k mediastinu. Parenchym lalůček má jemně zrnitou strukturu a skládá se z 2-4 stočených semenotvorných kanálků. Tyto kanálky začínají slepě při okraji lalůčku a mají silně zvlněný průběh. Při vrcholu se všechny stočené semenotvorné kanálky lalůčku spojují v krátký a úzký přímý kanálek, jímž začínají vývodné cesty varlete. Délka jednoho stočeného semenotvorného kanálku po rozvinutí všech kliček je v průměru 50-80 cm, takže celková délka v obou varlatech dosahuje od 600 do 1 000 m. U pohlavně dospělého samce jsou stočené semenotvorné kanálky široké 100-300  $\mu\text{m}$  a vystýlá je zárodečný epitel. Ten nasedá na bazální membránu, obklopenou zevně tenkým obalem z vazivových vláken a zploštělých vazivových buněk. Zárodečný epitel je vysoký vícevrstevný epitel a skládá se ze dvou základních typů buněk (Obrázek 3.2), podpůrných a spermatogenních (Marvan, 2011).

Sertolliho buňky lemují semenotvorné kanálky a působí jako podpůrné buňky – vyživují a pomáhají spermatidám při metamorfóze ve zralé spermie v lumen kanálků. Dále mají fagocytickou funkci - likvidují rozpadající se zárodečné buňky a secernují luminální tekutinu a proteiny. Těsným spojením vytvářejí krevní bariéru varlete, která poskytuje ochranu tvořícím se spermii před imunologickým odvrhnutím, a dále zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami. Počet Sertolliho buněk je během sezóny značně proměnlivý, znatelně vyšší je během připouštěcí sezóny, kdy se aktivně podílejí na produkci spermií, na kterou mají dominantní vliv. Zvýšení počtu Sertolliho buněk je doprovázeno odpovídajícím prodloužením semenotvorných kanálků (Morel, 2008). Podpůrné buňky jsou v parenchymu rozloženy jednotlivě v nepravidelných odstupech. Jsou to vysoké štíhlé buňky, které svou rozšířenou základnou dosedají na bazální membránu apikálním pólem a dosahují lumenu kanálku. Vyznačují se jádrem ovoidního tvaru s jemně rozptýleným chromatinem a zřetelným jadérkem. Tělo podpůrných buněk vybíhá v četné dlouhé a větvící se výběžky, ohraničující dutinky, v nichž jsou uloženy spermatogenní buňky (Marvan, 2011).

Intersticiální buňky (Leydigovy) jsou v menších nebo větších shlucích roztroušeny v intersticiu. Jsou to 15 – 20  $\mu\text{m}$  velké buňky polyedrického tvaru, které obsahují v cytoplazmě inkluze lipidů a krystalky bílkovinné povahy. Probíhá v nich syntéza samčího pohlavního hormonu testosteronu. Ve svém souhrnu představují diseminovanou žlázu s vnitřní sekrecí. U mladých, pohlavně nedospělých samců jsou varlata celkově menší, jejich stočené semenotvorné

kanálky jsou úzké, bez lumenu a vystlané zpočátku jen jednou vrstvou málo diferencovaných buněk. Už v prepubertálním období se kanálky začnou rozšiřovat, objevuje se v nich lumen a nastupuje výrazná diferenciacie jejich buněk na podpůrné a spermatogenní. Současně s tím dochází i ke změnám ve vazivu mezi kanálky, v němž se diferencují intersticiální buňky s endokrinní sekrecí (Marvan, 2011).



Obrázek 3.2; Řez varletem – schématický detail (Morel, 2008).

### 3.2.3 Spermatogeneze

V procese spermatogeneze se vyskytujú dva typy dělení, a to mitóza (dělení buněk, při kterém každá nová buňka zůstává diploidní, neboli má  $2n$  počet chromozómů) a meióza (dělení, kdy každá nová buňka má poloviční – haploidní neboli  $n$  počet chromozómů), takže zralá spermie má poloviční počet chromozómů (Reece, 2011). Spermatogenní buňky jsou v zárodečném epitelu zastoupeny nejpočetněji a představují ve skutečnosti různá vývojová stádia spermií. První generací spermií jsou spermatogonie, uložené v kanálku při bazální membráně. Jsou to buňky sférického tvaru s kulovitým jádrem, bohatým na chromatin. Vyznačují se vysokou mitotickou aktivitou a jejich vrstva tvoří tzv. pásmo mitózy (Marvan, 2011).

Reece (2011) uvádí, že při mitotickém dělení vznikne ze spermatogonie jedna stejná buňka, která zůstává uložena na původním místě a druhá, která se nazývá spermatogonie typu A. Ta pak migruje přes Sertolliho buněčnou bariéru do vrstvy buněk blízko dutiny kanálku (adluminální kompartment). Spermatogonie typu A prodělávají mitotické dělení, které někdy zahrnuje několik generací buněk. Vzniká tak velké množství spermatogonií typu B. Tyto buňky se naposledy mitoticky dělí a výsledkem je tvorba primárních spermatocytů s dvojnásobným počtem chromozomů. Primární spermatocyty se dále meioticky dělí a vznikají z nich sekundární spermatocyty, ze kterých po druhém meiotickém dělení vznikají spermatidy (1n). Spermatidy dozrávají v oblasti blízko lumen kanálku.

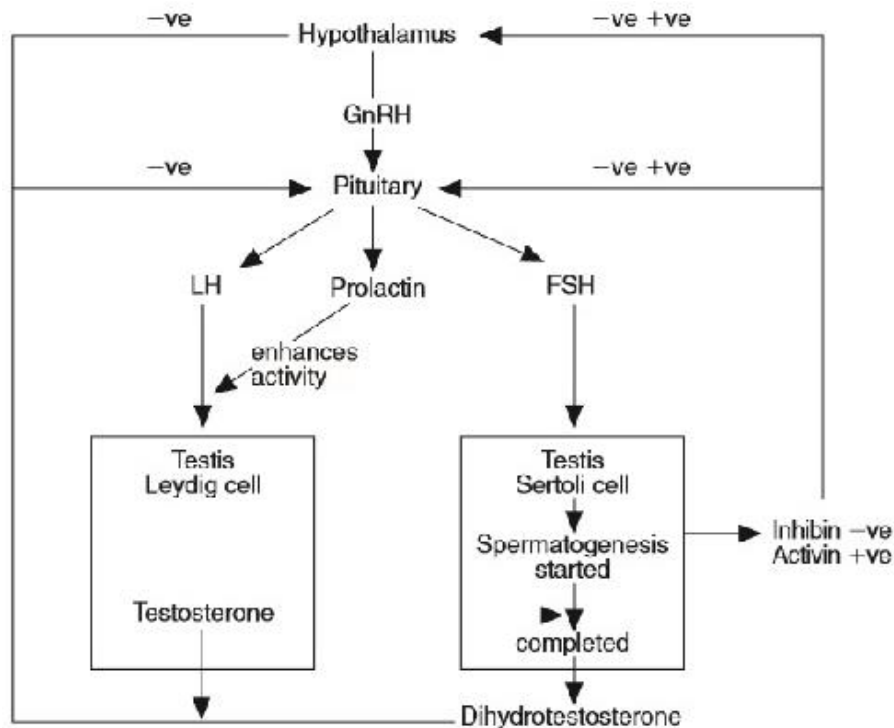
Spermatidy se později zanořují do prohlubní a záhybů cytoplazmatické membrány podpůrných buněk, kde prodělávají složitý proces metamorfózy v bičíkaté spermie. Morfologicky hotové spermie jako poslední, čtvrtá generace spermatogenních buněk, se z podpůrných buněk nakonec uvolňují, přecházejí do lumenu kanálku a jím do vývodných cest. Tato vrstva zárodečného epitelu tvořená spermatidami a spermii se proto nazývá pásmo metamorfózy (Marvan, 2011).

Spermatogenní cykly neprobíhají v celém kanálku synchronně, ale nastupují postupně a vlnovitě se šíří po délce kanálku (Marvan, 2011). Reece (2011) uvádí, že u býků je délka tvorby spermie v jednom kompartmentu 64 dny.

#### **3.2.4 Endokrinní aktivita varlat, fotoperioda a řízení spermatogeneze**

Reprodukce hřebců je řízena na ose hypotalamus-hypofýza-gonády (Obrázek 3.3). Tato osa je ovlivňována stimuly z prostředí ve formě délky dne a teploty. Na tyto změny reaguje šišinka sekrecí melatoninu (Morel, 2008). U hřebců zkrácení fotoperiody zapříčiňuje pokles intenzity testikulárních funkcí. Význam ovlivňování pohlavních funkcí fotoperiodou spočívá v koordinaci narození mláďat do přijatelných povětrnostních podmínek (Reece, 2011). Přípouštěcí sezóna může být manipulací s fotoperiodou i množstvím melatoninu přizpůsobena (Morel, 2008).





Obrázek 3.3; Původ hormonů řídících hřebčí reprodukční orgány (Morel, 2008).

U samců ve varlatech vznikají pohlavní hormony – androgeny, které po dobu pohlavního dospívání ovlivňují růst zvířat a v dospělosti udržují pohlavní aktivitu (Marvan, 2011). Produkce spermií je na rozdíl od produkce vajíček kontinuálním procesem, který není řízen cyklickými hormonálními změnami. Reprodukční aktivita hřebce začíná v pubertě a trvá po zbytek života, ačkoli jsou názory, že kvalita spermatu po 20. roce věku klesá. Stáří hřebce, ve kterém nastupuje puberta nelze přesně stanovit, protože existují velké odlišnosti mezi jednotlivými jedinci a plemeny. Různí vědci určovali pohlavní dospělost zejména podle histologických změn na varlatech – dle pozorování Leydigových buněk. Dospěli k hodnotám mezi 1-2.2 roky života. Nicméně další práce uvádějí, že úplná reprodukční zralost je dosažena až ve věku 5 let. Zahrnuty byly hodnoty hmotnosti varlat, denní produkce spermií, koncentrace testosteronu a v neposlední řadě množství a objem Leydigových a Sertoliho buněk. Hřebci ve věku 3 let obvykle dosáhli puberty a mohou být využiti v plemenitbě, nicméně jejich produkce spermií je omezena. Teprve od 5. roku jsou schopni plně pokrýt potřebu klisen (Morel, 2008).

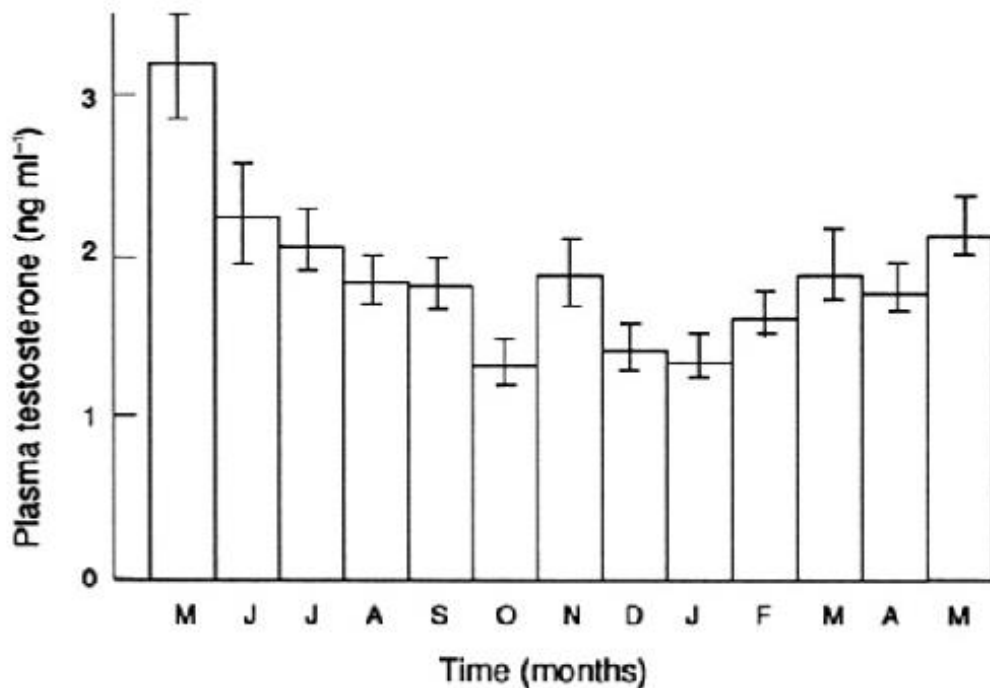
Leydigovy a Sertoliho buňky jsou zodpovědné za produkci hormonů ve varlatech. Produkce testosteronu Leydigovými buňkami je řízena hypofyzárním gonadotropinem známým jako luteinizační hormon (LH). Nízká hladina testosteronu vyvolává větší sekreci LH v adenohipofýze. Zvýšení sekrece LH stimuluje Leydigovy buňky ve varlatech k sekreci testosteronu (Obrázek 3.4). Zvýšená hladina testosteronu zase inhibuje další sekreci LH a

hladina testosteronu je tak stabilizována. Následný pokles testosteronu opět stimuluje LH sekreci a cyklus se opakuje. Tento proces je znám jako negativní zpětná vazba (Reece, 2011). Testosteron se v malém množství tvoří i v kůře nadledvin (Marvan, 2011). Testosteron musí difundovat z intersticiální tkáně do semenotvorných kanálků, aby mohl správně ovlivňovat spermatogenezi. Ukazuje se, že testosteron udržuje spermatogenezi v semenotvorných kanálcích podporou meiotického dělení (Reece, 2011). Ve varlatech vzniká i malé množství estrogenů secernovaných Sertolihovými buňkami v semenotvorných kanálcích varlete (Marvan, 2011).

Další hypofyzární gonadotropní hormon je tzv. folikulostimulační hormon (FSH) z předního laloku hypofýzy, který stimuluje produkci proteinu vázajícího androgeny (ABP) v Sertolihovými buňkách. Tento protein je secernován do lumen semenotvorného kanálku a váže testosteron a další androgeny. Stabilizuje tak jejich koncentrace a zajišťuje jejich přiměřené množství pro spermatogenezi (Reece, 2011).

Sertolihovými buňkami jsou rovněž zdrojem hormonů nazývaných inhibin a activin, které kontrolují samčí reprodukci (Morel, 2008). Ovlivňují sekreci FSH předním lalokem hypofýzy (Reece, 2011). Inhibin působí jako negativní a activin jako pozitivní zpětná vazba. Přesná funkce inhibinu a activinu u koní je stále nejasná (Morel, 2008). LH je pro spermatogenezi vyžadován nepřetržitě. FSH však není pro udržení spermatogeneze – jestliže již jednou začala – nutný. Začátek spermatogeneze v pubertě nebo po fyziologickém či patologickém přerušení FSH vyžaduje (Reece, 2011).

K dalším funkcím testosteronu patří vznik a udržení libida, sekreční aktivity přídatných pohlavních znaků – typicky samčí tvary těla a chování. K těmto znakům počítáme zvýšený růst kostí (větší hmotnost kostí), mohutnější osvalení, silnější kůži. Testosteron řídí během fetálního vývoje sestup varlat. Přítomnost testosteronu determinuje vývoj penisu a šourku. Při normální samčí hormonální stimulaci získávají Wolfovy kanálky tubulární tvar a zakládají samčí pohlavní systém (Reece, 2011).



Obrázek 3.4; *Koncentrace testosteronu v průběhu roku v krevní plasmě dospělých hřebců (Morel, 2008).*

### 3.2.5 Nadvarle

Nadvarle shromažďuje a ukládá do zásoby spermie. Tvoří jej odvodné kanálky z varlete, které vyúsťují do vývodu nadvarlete (Reece, 2011). Je to orgán kyjovitého tvaru, na kterém rozlišujeme tři části: hlavu, tělo a ocas (Marvan, 2011). Do hlavy nadvarlete se dostávají spermie a varletní tekutina vývodními kanálky z varletní sítě. Spermie jsou dopravovány do nadvarlete proudem tekutiny ze semenotvorných kanálků. V nadvarletí spermie dozrávají a získávají schopnost pohybu (Reece, 2011). Je důležité, aby spermie v nadvarletí strávily dobu (až 7 dní) potřebnou k dozrání, jinak nebudou schopny kapacitace v samičím pohlavním ústrojí (Morel, 2008). V hlavě nadvarlete dochází k značné resorpci tekutiny ze semenotvorných kanálků (Reece, 2011). Hlava nadvarlete je rozšířená a pevně připojená k hlavovému konci varlete, který široce překrývá. Skládá se z 15 – 20 lalůčků, složených z kliček odvodných kanálků varlete (Marvan, 2011).

Tělo nadvarlete navazuje plynule na hlavu a má tvar úzkého protáhlého oblouku, volně připojeného k varletí. Před dosažením ocasního konce varlete se tělo nadvarlete zřetelně rozšiřuje a přechází v ocas nadvarlete. Podstatou těla a ocasu je vývod nadvarlete, silně zprohýbaný v četné meandrovité kličky, navzájem spojené řídkým vazivem. Vývod nadvarlete není v celé své délce stejně široký, ale směrem k chámovodu pozvolna zesiluje. Slouží jako dočasný rezervoár, v němž se spermie shromažďují až do ejakulace (Marvan, 2011). Stěna

vývodu nadvarlete je složena z epitelu a z vrstvy řídkého vaziva s hladkosvalovými buňkami. Apikální pól většiny buněk je opatřen dlouhými a rozvětvenými mikrokly, pomocí nichž jsou resorbovány látky vzniklé hlavně rozpadem nejakulovaných spermií (Marvan, 2011). Kromě toho do lumenu vývodu vyměšují tyto buňky sekret, obsahující látky pro výživu spermií. Sekret je mírně kyselého povahy, blokuje motilitu spermií a zabraňuje tak vyčerpání jejich nepatrné energetické zásoby. Ke snížení látkového metabolismu na minimum přispívá dále i nižší teplota a nižší hladina kyslíku a vyšší hladina oxidu uhličitého. To vše jsou důležité faktory, umožňující spermiím zachovat si ve vývodu nadvarlete životnost a oplozovací schopnost po dobu 2 - 3 týdnů (Marvan, 2011).

### **3.2.6 Chámovod**

Chámovod je pokračováním vývodného systému z ocasu nadvarlete do pánevního úseku močové trubice. Jakmile chámovod opustí nadvarle a směřuje do dutiny břišní, je spolu s varletní tepnou, žílou, nervem, lymfatickými cévami a svalem vnitřním zdvihačem varlete obalen útrobním listem poševního obalu. Tento celý útvar se nazývá semenný provazec. Útrobní list poševního obalu obklopuje rovněž varlata a epididymis. Po průchodu semenného provazce vnitřním a vnějším prstencem tříselného kanálu se od něho oddělí chámovod a vstoupí do pánevní části uretry (Reece, 2011). U přežvýkavců a koně se chámovod v pánevním úseku rozšiřuje ve vřetenovitou ampulu chámovodu (Marvan, 2011). Sekrece z ampule obsahuje vysokou koncentraci ergothioninu, což je činidlo, které chrání citlivé látky semene před oxidací. Sekrety odchází v první frakci (Morel, 2008).

### **3.2.7 Přídavné pohlavní žlázy**

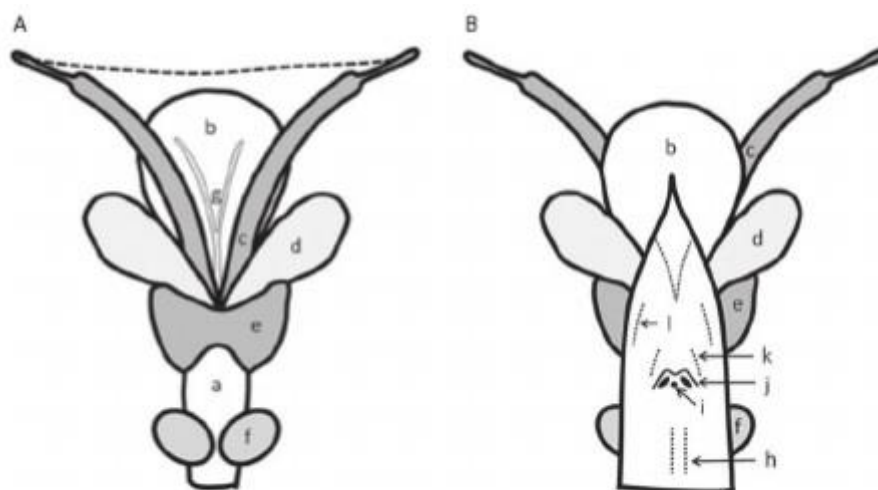
Sekrety přídavných pohlavních žláz jsou důležitou složkou vlastního semene. Jsou vyměšovány do močové trubice a tvoří přirozené ředidlo spermií. Obsahují látky upravující spermiím prostředí pro jejich zdárný průchod močovou trubicí, samičím pohlavním ústrojím a také látky zajišťující jejich výživu. Semeno je složeno ze spermií, sekretů přídavných pohlavních žláz, výměšků žlázových buněk nadvarlete a ampule chámovodu (Marvan, 2011). Přídavné pohlavní žlázy (Obrázek 3.5) jsou tři (někteří autoři k přídavným řadí ampuli chámovodu) – měchýřkovitá žláza, předstojná žláza, bulbouretrální žláza. Umístěny jsou mezi koncem chámovodu a kořenem penisu. Společně jsou žlázy zodpovědné za produkci semenné plasmy. Semenná plasma je hlavní frakcí semene. Zajišťuje přepravu spermií do těla klisny a dozrání. Je zdrojem energie, chrání před poškozujícími změnami osmotického tlaku a před

oxidací. Obsahuje gel, který částečně sráží semeno. Funkce je zatím nejasná. Relativní velikost žláz odráží relativní význam sekretů v semenné plasmě (Morel, 2008).

Měchýřkovitá žláza má u hřebce charakter váčku s hladkým povrchem a zřasenou sliznicí, obsahující žlázy. Strukturálně je to složitá tubulózní žláza vylučující bělavý, slabě zásaditý sekret, který je hromaděn v rozšířených nitrolalúčkových a mezilalúčkových vývodech. Při ejakulaci je sekret vypuzován za pomoci hladké svaloviny vývodů vyměšovacím kanálkem do močové trubice, do níž vyúsťuje společně s chámovodem (Marvan, 2011).

Prostata neboli předstojná žláza se skládá ze dvou laloků spojených můstkem. Obě části prostaty jsou složeny ze sekrečních tubulů, která jsou navzájem spojena intersticiálním vazivem v slabě naznačené lalůčky (Marvan, 2011). Jediný výstup ze žlázy do močovodu je umístěn mezi bulbouretrální žlázou a ampulí chámovodu. Sekrety jsou alkalické s vysokým obsahem bílkovin, kyseliny citronové a zinku. Přesný význam není znám. Sekrety předstojné žlázy se významně podílejí na složení předpermiové frakce (Morel, 2008).

Bulbouretrální žláza jinak také Cowperova žláza, je z přídatných žláz, umístěna nejbližší kořenu pyje. Je párová, oválného tvaru, velká 2-3 cm, ležící po stranách močové trubice (Morel, 2008). Výměšek žlázy se shromažďuje v rozšířených prostorech nitrolalúčkových a mezilalúčkových vývodů a nakonec je odveden do močové trubice pomocí několika vývodů (Marvan, 2011). Sekrety jsou průhledné, řídké téměř vodové konzistence a jsou součástí hlavní, na spermie bohaté, frakce. Nachází se ovšem i v předpermiové frakci, kde pomáhají odstranit zbytky moči a přemíru bakterií. Sekrety dále působí jako lubrikant usnadňující spermii průchod (Morel, 2008).



Obrázek č. 3.5; *Vnitřní pohlavní orgány hřebce. A) dorzální pohled, B) ventrální pohled, a) močová trubice, b) močový měchýř, c) ampule chámovodu, d) měchýřkovitá žláza, e) prostata, f) bulbouretrální žláza, g) uterus masculinus (Frazer, 2014).*

### 3.2.8 Pyj

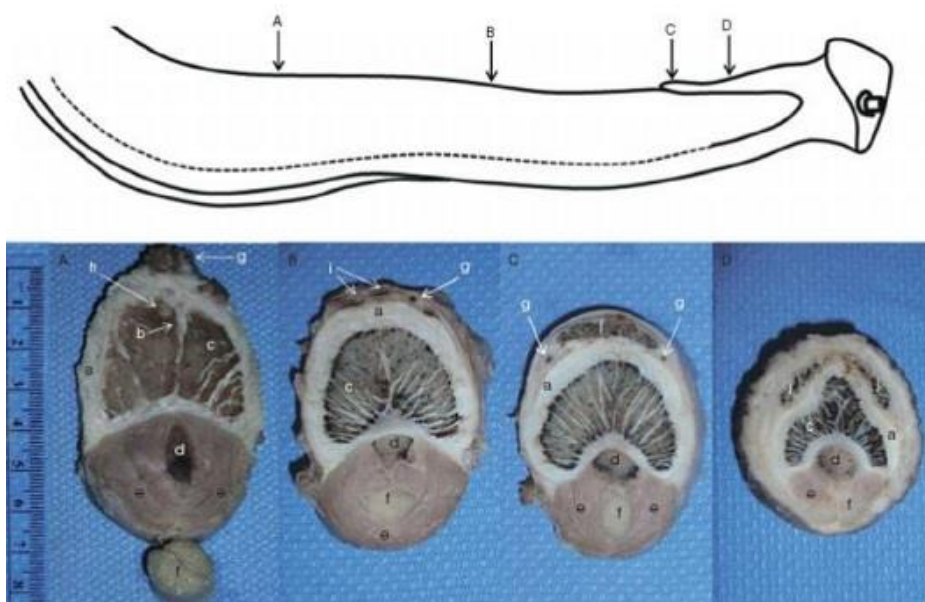
Pyj lze rozdělit na tři části: žalud, tělo a kořen (Obrázek 3.6). V klidu je zatažen a chráněn předkožkou, v této poloze je držen svaly. Předkožka se skládá ze dvou vrstev (Morel, 2008). Z vnějšího listu ochlupené kůže břicha, která se při předkožkovém otvoru vchlipuje dovnitř a přechází ve vnitřní list slizničního charakteru. Vnitřní list v klidu vystylá dutinu předkožky a přechází na pyj jako pyjový list. Při ztopoření se záhyb vnitřního listu vyrovnává a celý se přesouvá na pyj. Ve vnitřním listu jsou mizní uzlíky a předkožkové žlázy (vyměšují aromatické smegma). Samotný pyj se skládá z topořivého a houbovitého tělesa, močové trubice, pomocných svalů, cév a nervů.

Topořivé těleso je na povrchu obaleno silným bělavým obalem z hustého kolagenního vaziva. Na rozdíl od přežvýkavců a prasete je pyj hřebce v ochablém stavu měkký. Do dutinek topořivého tělesa je přiváděna krev pomocí spirálovitých tepen, které jsou větvemi hluboké tepny pyje. Jsou to tepny uzavíracího typu díky čemuž lze regulovat stupeň naplnění dutinek topořivého tělesa krví. Krev je z dutinek odváděna pomocí tenkostěnných žil.

Houbovitě těleso začíná kaudálně na úrovni kořene pyje a rozšiřuje se v houbovitě těleso žaludu. Má slabší bělavý obal, tenčí přepážky a je plněno žilní krví.

Močová trubice začíná na krčku močového měchýře a dělíme ji na pánevní a houbovitou část. Do pánevní části vyústí chámovody a vývody pohlavních žláz. Svalovina je hladká a příčně pruhovaná, která tvoří vůlí ovladatelný svěrač. Houbovitá část je vložena do houbovitě tělesa pyje. Ve sliznici jsou přítomny tubuloalveolární žlázy. Epitel sliznice je přechodný přecházející ve vrstevnatý dlaždicový. Zevní ústí močové trubice je nachází v žaludové jamce v podobě krátkého výběžku.

Důležité svaly ovládající pyj jsou dva: napřimovač a zatahovač. Napřimovač je mohutně vyvinut, obklopuje kořen pyje a smrštěním uvádí pyj při ztopoření do polohy vhodné pro páření. Zatahovač zatahuje ochablý pyj zpět do předkožky. Ztopoření je umožněno naplněním dutinek topořivého tělesa pyje krví. Městnáním krve jsou stlačeny odtokové žíly a pyj tvrdne. Při erekci se stejným způsobem hromadí krev v dutinkách houbovitě tělesa pyje, což udržuje lumen močové trubice otevřený – ejakulace může proběhnout. Po vysemenění pyj ochabne díky zvýšení svalových polštářků spirálovitých tepen a následnému snížení přítoku krve a tlaku na žíly (Marvan, 2011).



Obrázek 3.6; A – proximální, B – střední, C – volná část penisu, D – distální část.

a) tunica albuginea, b) nekompletní septum, c) corpus cavernosum, d) houbovitě těleso a močová trubice, e) musculus bulbospongiosus, f) zatahovač pyje, g) dorsální tepna, h) hluboká tepna, i) dorsální žíla, j) corpus spongiosum glandis (Fraser, 2014).

### 3.3 Výběr hřebce do plemenitby

#### 3.3.1 Zdravotní aspekty výběru hřebce

Pro budoucího plemeníka jsou klíčovou částí těla končetiny a záď, které musí být ve velmi dobrém stavu, aby byl hřebec schopen ustát náročnou připouštěcí sezónu. Zvláště kopyta pánevních končetin nesmějí vykazovat známky laminitidy. Končetiny je po každém pohybování potřeba zkontrolovat. Otoky jsou nežádoucí a jsou známkou možné slabosti. Dále se vyskytují onemocnění, jako jsou artritida, poškození páteře či končetin nebo wobbler syndrom, což je poškození míchy následkem tlaku obratlů. Nesmíme zapomínat na kopyta, která je nutno pravidelně udržovat. Stav kardiovaskulárního systému se vyšetřuje elektrokardiografem. Plemenný hřebec musí být udržován v dobré kondici, na škále od 0 do 5 je ideálním stavem 3. Hřebec má být v pracovní kondici a dobře osvalen. Příliš hubení hřebci mají nižší libido a hůře snášejí intenzivní využití v připouštěcí sezóně. Špatnou kondicí trpí i spermioogeneze. Na druhou stranu obézní hřebci mají také nižší libido, jsou líní a nechtějí skákat. Navíc jejich nadváha při přirozené plemenitbě nebo odběru poškozuje i klisnu. Je nutné mít na paměti, že intenzivní využití hřebce v připouštěcí sezóně si žádá velmi dobrou výživu. Nároky jsou podobné sportovním koním (Morel, 2008).

### 3.3.2 Vyšetření reprodukčního traktu

Vnější vyšetření genitálií je nezbytnou selektivní procedurou, kterou posoudíme schopnost a kondici reprodukčních orgánů. Hřebec vybíraný do plemenitby musí mít dvě normálně fungující varlata, která jsou cítit pohmatem přes šourek. Zjišťujeme, zda jsou zhruba stejně velká, jejich konzistenci, pohyblivost v obalech a jejich teplotu – nesmějí být na pohmat horká. V některých případech je levé varle o něco větší, rozhodně by, ale nemělo mít i vyšší teplotu. Povrch varlat by měl být pocíťován jako hladký, na povrchu jsou místy hmatatelné cévy. Jakékoliv omezení pohybu varlat v šourku indikuje jizvu nebo fibrózní tkáň následkem úrazu. Takový to nález redukuje množství varletní tkáně a omezuje normální spermatogenezi. Velikost varlat je dobrým indikátorem schopnosti produkovat určité množství spermií a tím i potenciál využití v připouštěcí sezóně. Přemíra tuku v šourku následkem nadváhy, izoluje varlata a nebezpečně zvyšuje jejich teplotu, což má opět za následek sníženou produkci spermií. Maligní nebo benigní bujení (Obrázek 3.7) je poměrně vzácné, ale můžeme se s ním setkat. Proto je důležité varlata pravidelně prohmatávat.



Obrázek 3.7; *Benigní nádor pod tunica albuginea (Frazer, 2014).*

Na šourku se mohou vyskytnout dermatitidy, které opět mohou mít vliv na zvýšení teploty varlat. Tkáň nadvarlat má být hmatatelná, normální pozice na uvolněných varlatech je na kraniální straně šourku. Jiná pozice indikuje torzi varlat. Chámovod opouštějící varlata, zásobený varletní krví a inervace, vstupuje do těla přes tříselný kanál, který by měl být prost srůstů a kýly. Penis a předkožku vyšetřujeme na potenciální přítomnost zranění, karcionu, boláků, sarkoidů a infekce. Vyšetřování by mělo být pravidelnou součástí budoucích odběrů.



Vyšetření vnitřních struktur provádí veterinární lékař, důležité je vybrat zkušeného člověka. Přístup k vnitřním částem reprodukčního traktu je obtížný. Vyšetření provádíme rektální palpací a pomocí ultrazvuku. Hmatatelný je chámovod, varleční tepna a přídatné pohlavní žlázy. Varleční tepna má dobře hmatatelný puls. Změny v tlaku v průběhu vyšetření indikují krvácení, tumor nebo sraženinu. Na přídatných pohlavních žlázách posuzujeme velikost, konzistenci a tvar. Párová měchýřkovitá žláza má být symetrická. Pro vyšetření abnormalit sekretivní funkce přídatných pohlavních žláz využíváme ultrasonografii. Tu lze také vyšetřit odběrem semene (Morel, 2008). Více informací viz. 3.5 Hodnocení spermatu.

### **3.3.3 Předvýběr hřebce**

Modelovým plemenem je nejpočetnější plemeno České Republiky - český teplokrevník. Během roku se konají dva předvýběry. Termín je vyhlášen předsednictvem chovatelského svazu. První předvýběr je pro dvouleté hřebce, které v zemském chovu vybírají hodnotitelé chovu koní či pracovníci pověřeni předsednictvem svazu. Komise hřebce vybírá v testačních odchovnách na základě žádosti majitele hřebce. Hřebci musí být v odpovídajícím typu, zevnějšek prostý hrubých vad, zdraví, s pravidelným skusem a sestouplými varlaty. Druhý předvýběr probíhá v zimním termínu, na svazem určeném místě. Chovatel k přihlášce předkládá i protokol o zdravotním stavu hřebce. Hodnocení probíhá před nejméně tříčlennou komisí, kterou jmenuje předseda svazu. Hodnotí se plemenný typ, skok ve volnosti, stavba těla a mechanika pohybu na tvrdém podkladu. Skok ve volnosti probíhá na základní výšce 110 cm a postupně se dvakrát zvyšuje, lze absolvovat skok až do výšky 150 cm. Drezurní hřebci předvádějí mechaniku pohybu při lonžování na kruhu o průměru 12 m. Skok absolvují na základní výšce. Hřebci, kteří obdrží prémii, budou zapsáni do plemenné knihy, předvýběr bude akceptován PK ČT a doporučen RPK ČT. Prémii se rozumí udělení výběru pro následující připouštěcí sezónu. Pokud má majitel hřebce zájem o udělení výběru i v dalších letech, musí hřelec úspěšně absolvovat 70 denní test a zkoušky výcviku nebo dosáhnout sportovní výkonnosti či úspěšné účasti na KMK. Třetí předvýběr je proveden před zahájením 70 denního testu v místě jeho konání. Určen je pouze pro předvybrané hřebce. Hřebci pak mohou nastoupit do testu (SCHČT, 2016).

### **3.3.4 Zkouška výkonnosti hřebců – 70 denní test**

Před nástupem do testu, musí majitel vedoucímu výcviku prokázat ochotu hřebce se nechat nauzdit a osedlat, zvednout končetiny, nechat na sebe nasednout, ovladatelnost hřebce

v základních chodech na pobídky. Sporné případy rozhoduje předsednictvo svazu. Hodnocení při kontrolním dnu a zkouškách výkonnosti provádí na závěr testu komise, která hřebce předvybrala. 70 denní test a závěrečná zkouška se konají ve vybraném testačním zařízení, které je určeno svazem. Do testu jsou přijati hřebci, kteří splňují zásady šlechtitelského programu a podmínky pro zapsání do plemenné knihy. Hřebec musí být zdravý, prost zjevných konstitučních a dědičně podmíněných vad a chorob.

Po 30 dnech je v testačním zařízení kontrolní den. Posuzuje se stupeň výcviku u hřebců navržených vedoucím výcviku a hřebců vybraných hodnotitelskou komisí. Majitelé mohou, na základě svého rozhodnutí nebo doporučení, pobyt hřebce v testu ukončit. V závěru testu se posuzují tyto znaky a vlastnosti: Plemenný typ a pohlavní výraz, stavba těla, výkonnost ve skokové nebo drezurní zkoušce, celkový dojem a vývin. Znamky jsou udělovány při závěrečné zkoušce. Znamka za výcvik zahrnuje ohodnocení chování koně ve stáji, pod sedlem, při kování, temperament zvířete, konstituce, krmitelnost a učenlivost. Je udělena vedoucím výcviku.

Znamka za jezditelnost je aritmetickým průměrem známek vedoucího výcviku a dvou zkušebních jezdců. Znamka hodnotí uvolněnost, prostupnost, ohebnost a rovnováhu koně, jeho soustředěnost, reakce na pomůcky a ochotu je přijímat a v neposlední řadě pohybové nadání. Zkušební jezdec může koně bez jezdce uvolňovat po dobu 15 minut, poté je kůň podroben zkoušce na úrovni požadavků daných závěrečnou zkouškou v délce doby nepřesahující 30 minut. Pro ohodnocení je používána desetibodová stupnice. Zkouška pod sedlem se provádí v kryté hale nebo na ohraničeném kolbišti na postupové řadě a parkuru, hřebci drezurního směru jsou podrobeni drezurní zkoušce na obdélníku o rozměrech 60 × 20 m. Postupová řada je pro skokové hřebce na začátku zkoušky, pro hřebce drezurní je zařazena po skončení úlohy. Výška je stanovena na 100 cm a postupně se zvyšuje po 10 cm do 120 cm. Povinná jsou tři kola. Drezurní hřebci skáčí výšky od 90 do 110 cm. Nelze absolvovat vyšší výšku, aniž by byla bezchybně překonána výška nižší. Třetí chybou, zastavením či shozením na stejné výšce, zkouška pro hřebce končí s hodnocením 0 bodů. Poté je zařazen parkur o výšce 100 cm, kdy je hodnocena ochota koně skákat, skokový projev, respektování překážek, pravidelnost a uvolněnost svalových skoků a ovladatelnost. Povoleny jsou chrániče na předních končetinách, uzdečka s jednoduchým stihlovým udidlem a bičik do 75 cm. Znamka za celkový dojem a vývin vychází z hodnocení za plemenný typ a pohlavní výraz, stavbu těla, mechaniku pohybu a projev hřebce v průběhu celých zkoušek výcviku. Hodnocení hřebce se řídí zásadami uvedenými ve šlechtitelském programu. Zkoušku hřebec úspěšně vykoná, pokud je ukončena s celkovým hodnocením min. 7,1 b., a za výkonnost dosáhne min. 6,1 b (SCHČT, 2016).

### 3.3.5 Hodnocení hřebců před zápisem do plemenné knihy

Toto hodnocení se týká hřebců, kteří splňují výkonnostní kritéria v KMK nebo po sportovní testaci a u dalších hřebců splňující podmínky zápisu do plemenné knihy a nebyl u nich posuzován plemenný typ, pohlavní výraz a stavba těla a jejich majitelé mají zájem o zápis. Sportovní testací se rozumí dosažení obtížnosti 140 cm ve skoku do 8 let věku nebo obtížnosti 150 cm u starších hřebců. Absolvovat musí minimálně tři soutěže s umístěním do 5. místa nebo s celkovým součtem max. 12 trestných bodů. V drezúře absolvováním tři soutěží stupně IM a vyšším s hodnocením vyšším než 60%. Ve všestrannosti dokončením dvou soutěží CIC\*\* nebo CNC\*\* v první polovině pole dokončivších startujících. V zápřeži pak absolvováním pěti kompletních soutěží stupně T v průběhu dvou let.

Majitelé dokládají protokol o zdravotním stavu hřebce, ne starší než 6 měsíců. Hřelec musí být zdrav, bez zjevných nebo geneticky podmíněných vad, zlovyků a chorob. Hodnocení hřebce provádí tříčlenná komise, která se skládá ze členů rady plemenné knihy, předsednictva a hodnotitele, komise je určena předsednictvem. Hodnocen je plemenný typ, pohlavní výraz, rodokmenová hodnota, stavba těla, kmih a elasticita v klusu, krok. Majitelé hřebců musí každoročně žádat o udělení výběru po klisny ČT (SCHČT, 2016).

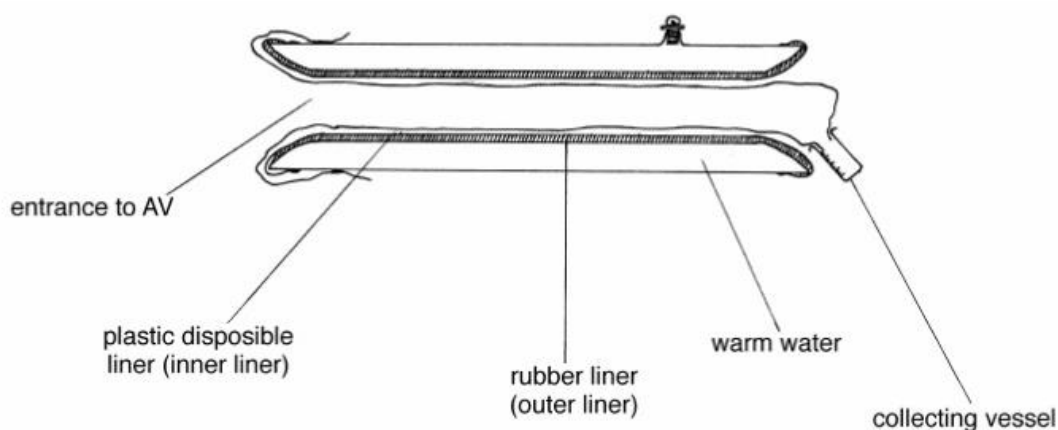
### 3.4 Odběr spermatu

Nejjednodušší metodou je nechat hřebce přirozeně skočit na klisnu. Po vytažení penisu z vulvy je do připravené nádobky odebrán zbytek semene. Vzorek lze odebrat přímo z vagíny. Tento způsob má mnoho nevýhod – nízkou koncentraci spermií a velké množství patogenů. Používán je pouze okrajově. Druhou metodou je použití kondomu, ten má však také nedostatek. Kondomy snadno praskají, a tak je vzorek snadno ztracen (Morel, 2008). Dále je zde risk kontaminace a neochota hřebců kopulovat. Metoda je využitelná u hřebců, kteří jsou zvyklí na přirozenou plemenitbu nebo se z nějakého důvodu nejsou ochotni nechat odebrat pomocí umělé vagíny. Experimentálně byl vyzkoušen i odběr pomocí farmak. Použity byly přípravky xylazin, imipramin a prostaglandin. Tímto způsobem se odebere ejakulát o velké koncentraci a malém objemu. Úspěšnost odběrů je okolo 30 %. Teoreticky je ejakulát mrazitelný nebo i použitelný v chlazené dávce. Odběr pomocí manuální stimulace je velice podobný odběru do umělé vagíny, výhodou je, že je zvládnutelný ve dvou lidech a často ani není třeba přítomnosti klisny. Metoda je náročnější na trénink. Penis je stimulován do ztopoření, pak je umyt teplou vodou. Až když je dosaženo plné erekce, je nasazen plastový rukáv a stimulace pokračuje. Jednou rukou je stimulován žalud a druhá je umístěna na kořeni. Pro ještě lepší stimulaci se na kořen

umist'uje teplý ručník (Samper, 2009). Dnes je nejvíce využíván odběr do umělé vagíny (Morel, 2008).

### 3.4.1 Umělé vagíny

Za dobu existence a využívání umělé inseminace bylo vyvinuto mnoho typů umělých vagín s rozličným vzhledem. Umělá vagína (3.8) se snaží co nejvíce napodobovat přirozený pohlavní aparát klisny. Poskytuje teplý sterilní otvor, který je obklopen pláštěm naplněným vodou, jenž má na svém konci shromažďovací nádobku. Většina umělých vagín je složena z pevného vnějšího obalu s dvěma pryžovými vložkami – vnitřní a vnější. Vnější vložka a obal tvoří plášť, do kterého se pomocí ventilu napustí teplá voda. Voda by měla být o něco teplejší než tělesná teplota koně. Ideálně 44-48°C. Množství vody musí být zvoleno adekvátně k napodobení přirozeného tlaku uvnitř vagíny. Vnitřní vložka je často chráněna ještě jednou jednorázovou vložkou zajišťující sterilitu. Ta je spojena se sběrací nádobkou. Před použitím je vnitřní vložka natřena sterilním porodnickým lubrikantem – slouží k ochraně hřebce. Důležité je, aby nádobka i dutina umělé vagíny měly během odběru okolo 44°C, jde o prevenci šoku z chladu. Teplota nad 48°C působí negativně nejen na spermie. Nedodržením korektní teploty můžeme způsobit nechuť hřebce k dalším odběrům. Vagína má být izolována a chráněna před ultrafialovým zářením. Délka je obvykle okolo 50 cm a váha se může vyšplhat až k 10 kg.



Obrázek 3.8; Schématický nákres umělé vagíny (Morel, 2008).

Velký, těžký a mohutný model Colorado, dlouhý 59 cm a 15 cm v průměru. Umožňuje naplnění vodou o objemu 4.5 l ohřáté na 60°C, dosáhnout tlaku a teploty 46°C ke stimulaci ejakulace. Výhodou je dobré přijetí hřebci a schopnost modelu udržet teplotu v chladnějších podmínkách. Těžkopádnost je velkou nevýhodou, obzvláště u nespolupracujících hřebců. Missouri model je oproti tomu jednodušší a dobře se obsluhuje. Sestaven je ze dvou těžkých latexových vložek,

podpořených odolným koženým pouzdem. Jednoduše se používá, je lehký, ale přesto robustní a hřebci je dobře přijímán (Dascanio, 2014). Umožňuje i korekci tlaku ve své dutině nafouknutím, čímž je snížena celková hmotnost (Morel, 2008). Nevýhodou je, že velice snadno vychladne.

Model Roanoke stimuluje odlišným způsobem než Missouri a Colorado model. Vyvíjí tlak po obvodu, primárně na distální část penisu a na žalud. Vagina je naplněna množstvím vody o teplotě 52°C. Je schopna se přizpůsobit velikosti penisu. Voda naplní port, který se při dosažení tlaku přesahujícího 2.3 kPa otevře. Roanoke je relativně krátká a sahá jen asi do poloviny těla penisu, takže zvýšená stimulace musí být prováděna ručně na kořeni penisu. Tímto simulujeme kontrakce vulvy. Jiná stimulace bohužel není možná kvůli pevnému obalu vagíny. Model navíc nemá držadlo, takže odběry vyžadují cvik. Jednorázová vložka umožňuje snadnou očistu umělé vagíny a je zároveň prevencí přenosu patogenů. Nutno podotknout, že někteří hřebci nemají rádi kontakt s plastem pokrývajícím gumovou vložku (Dascanio, 2014).

Model Krakow by vytvořen v Polsku profesory Bielanskim a Tischnerem. Jeho nástupce, model Cambridge, se uchytil především v Anglii. Oba modely jsou tvořeny jednoduchým kovovým či plastovým rámem obklopeným dvěma pryžovými vložkami. Přední konec je ponechán otevřen, takže je možné semeno shromažďovat do izolované plastové nebo skleněné nádoby připevněné na vnitřní rukávec nebo umožňuje nechat hřebce ejakulovat volně. Je možné odebrat 3 frakce semene, ze kterých je tvořen ejakulát, pomocí trychtýřků zabudovaných do příslušného počtu trubic. Metoda sběru s otevřeným koncem umožňuje vizuálně posoudit průběh a úplnost ejakulace. Dále umožňuje sběr frakcí odděleně, čehož se dá využít při podezření, že hřelec trpí chorobou určité části reprodukčního traktu. Metoda se dá také použít, pokud chceme odebrat pouze druhou frakci bohatou na spermie, která je vhodná k mražení bez nutnosti centrifugace s cílem odstranění přebytečné semenné plasmy (Allen, 2005). Nishikawa/Japonský model vagíny je složen z malého, tuhého hliníkového obalu a jedné pryžové vložky, takže je velice lehký a snadno se s ním manipuluje. Dnes se můžeme setkat spíše s Har-Vet modelem, který má místo hliníku plastový obal. Snadno se sestavuje a udržuje čistý. Nádobka na semeno je připojena přímo k vagíně, prostor pro styk semene s pryžovou vložkou je tudíž minimální. Vložka musí být těsně upevněna gumovými řemínky k pouzdru předtím, než je plášť vagíny plněn vodou. Voda unikne, pokud není těsnění dostatečné. Následně není dosaženo při odběru potřebného tlaku, a navíc hrozí kontaminace samotného ejakulátu. Nezbytná je takové pravidelná kontrola pryžové vložky (Brinsko, 2011).

Hannoverská umělá vagina je nejvíce využívána v Evropě. Model pojme 1-3 l vody a je znatelně lehčí než Colorado, který pojme 6-8 l. Složen je z plastového obalu s koženým

držadlem a jedné pryžové vložky. Tvrdý obal je opatřen kruhovým otvorem na jednom konci – vstup pro penis, a menším kruhovým otvorem na druhém konci. Menší otvor je lehce vyosen a vytváří slepou uličku, která působí tlak na erektilní penis. Pryžová vložka udržuje vodu a k plastovému pouzdru je připevněna nejprve chirurgickou páskou a poté širokými gumičkami. Vnitřní jednorázová plastová vložka je připevněna k plastové sběrací nádobce. Někteří hřebci nesnesou pocit kontaktu plastu s pryží. V tomto případě lze plastovou vložku vyndat a nádobku vyměnit za skleněnou (Dascanio, 2014).

### 3.4.2 Trénink na fantom

Trénink hřebce může trvat od několika pokusů, dní až po několik týdnů. Vše záleží na povaze hřebce. Obvykle hřebec, který již skákal na klisnu, a byl při tom odebírán uměle, nebude mít s fantomem problém. Ovšem hřebec, který nikdy neměl možnost namlouvat si klisnu nebo přirozeně připustit, bude vyžadovat čas. Klíčem k úspěchu je dobrý tým asistentů, klisna v estru, vhodné vybavení a správné využití stimulačních podnětů.

Místo využívané pro trénink, má být prosté podmětů, které by rozptylovaly. Povrh podlahy protiskluzový – kluzká podlaha některé hřebce odrazuje od opakovaných pokusů. Pro vedení hřebce je nejlepší využít řetízku protaženého přes nos. V Evropě je běžné vedení hřebce z levé strany a odebírání ze strany pravé. Důležité je hřebce přivykat na hygienické úkoly s odběrem související, jako je umytí penisu před odběrem. K erekci hřebce stimulujeme vizuálně, sluchově a čichem za pomoci klisny v estru, nebo sbíranou močí říjící klisny, masáží předkožky, manuálním tlakem na kořen penisu, masáží žaludu nebo omytím teplou vodou.

Klisnu postavíme za zkušební stěnu nebo ohradu před fantom, a podle potřeby jí přibližujeme nebo odvádíme dále od hřebce, tak, aby byl hřebec stimulován, ale zároveň se nestal agresivním a nebezpečným. Ten má být na vodění uvyklý a dobře ovladatelný. Uvykáme ho chodit k fantomu pomalu, zamezujeme mu v kroužení, hřebec má jít rovně. Vhodné je potřísnit fantom močí klisny v estru, zvýšíme tak jeho atraktivitu. Pokud k vyprovokování kopulace tento stimul nestačí, snažení podpoříme masáží a tlakem přímo na žalud, čímž vyprovokujeme reflexní aktivitu. Po ztopoření penisu nasazujeme umělou vagínu.

Další trénink odkládáme v případě opakovaných neúspěšných pokusů o ejakulaci, v případě odření končetin a penisu o fantom, při neúspěchu zkoušíme více typů umělých vagín, zdrženlivému hřebci nabídneme skok na živou klisnu s použitím umělé vagíny a poté zkusíme fantom, na fantom umístíme tlustý provaz k zakousnutí (Dascanio, 2014).

### 3.4.3 Postup odběru

Základem úspěšného odběru je příprava a plánování. V laboratoři mají být připraveny čisté nástroje a ředidla, vše předehřáté na teplotu 37°C. Umělá vagína se plní vodou o teplotě 48°-52°C, teplota je vyšší, protože vagína snadno chladne. Pokud budeme využívat klisnu v estru, musí být připravena. Ocas má mít zavázán bandáží a zadní partie těla omyty, abychom zabránili nežádoucí kontaminaci. V tento moment může být hřebec přiveden do odběrové místnosti. V momentě, kdy hřebec dosáhne plné erekce, je penis omyt teplou vodou a dobře vysušen. Tím je významně snížena bakteriální kontaminace semene. Nakonec kontrolujeme teplotu a tlak umělé vagíny, měla by se pohybovat v rozmezí 45°-48°C. Vnitřní vložku lubrikujeme nespermicidní lékařskou vazelínou. Hřebec je ke klisně přiveden z boku, aby ho dobře viděla. Klisna na něho reaguje a hřebec v tento moment obvykle dosahuje plné erekce. Osoba, která bude odběr provádět, by měla být z bezpečnostního hlediska na stejné straně jako vodiči. Jakmile hřebec naskočí, je nutné penis odklonit do připravené umělé vagíny a přidržovat ho při koření. Vagína je držena paralelně s břišní stěnou hřebce. Při ejakulaci je cítit silná pulzace močové trubice. Semeno musí být do laboratoře odneseno okamžitě. Odběr pomocí fantomu probíhá identicky. Vždy je důležité mít na paměti bezpečnost lidí i plemenných zvířat (Samper, 2009).

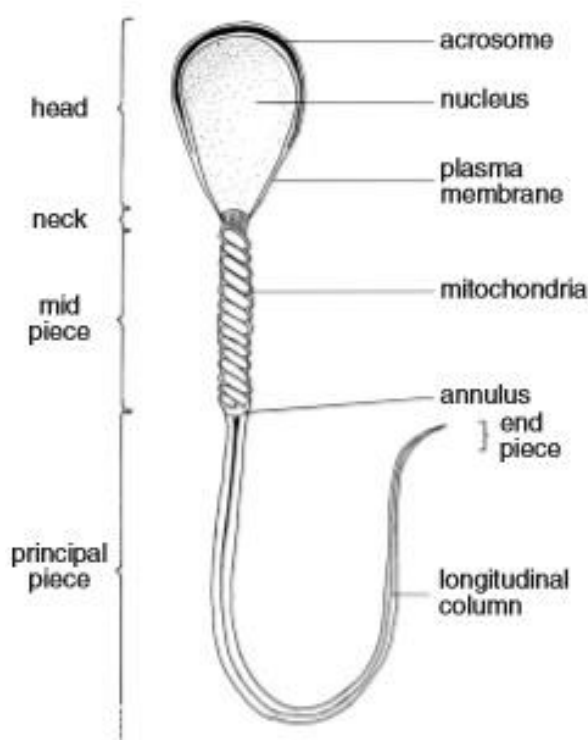
## 3.5 Hodnocení spermatu

### 3.5.1 Spermie

Jednotlivá stádia samčích pohlavních buněk se vyvíjejí na Sertoliho buňkách. V momentě, kdy dosáhnou dostatečného stupně zralosti, jsou uvolňovány do lumen semenotvorného kanálku a s tekutinou jsou rytmickými kontrakcemi posouvány dále do nadvarlete. V tomto stádiu ztratily značnou část cytoplasmy. Již jsou vybaveny bičíky, které ale zatím nejsou funkční. Pohybu schopné budou po plném dozrání v nadvarleti. Vývoj trvá zhruba 57 dní a přísun zralých spermií je zajišťován nepřetržitě. Hřebec ovšem nesmí být nadužíván. Produkce spermií je závislá na velikosti varlat. Ta je nutné vyšetřit pohmatem a ultrasonograficky (Morel, 2008).

Spermie je složena z hlavičky a bičíku, který má tři části – střední část, hlavní část a koncová část bičíku (Obrázek, 3.9). Tvarově equiní spermii charakterizujeme jako zploštělou buňku pádlovitého tvaru, v průměru dlouhou 60-65 µm, z toho hlavička 6-7 µm, střední část 10 µm, hlavní část bičíku 40 µm, konec 4-5 µm. Šířka hlavičky se v equatoriálním segmentu akrozomu pohybuje v rozmezí 3.5 – 4.0 µm. K úspěšnému oplodnění vajíčka musí mít spermie

nezbytně v pořádku plasmatickou membránu, akrozóm, jádro a bičík. Celá spermie je pokryta fosfolipidovou plasmatickou membránou. Ta je složena z cholesterolu, složitých cukrů a proteinů. Bylo prokázáno, že membrána pokrývající hlavičku se od té na bičíku liší obsahem lipidů a proteinů (Samper, 2009). V hlavičce je uložen jaderný materiál s haploidním počtem chromozomů – 32 (Morel, 2008). DNA je nesena na chromatinu. Bylo zjištěno, že chromatin normální spermie je odolný vůči denaturaci kyselinami. Toho se dá využít při průkazném testu subfertilních až infertilních hřebců průtokovou cytometrií (Samper, 2009).



Obrázek 3.9; Schématický nákres hřebčí spermie (Morel, 2008).

Hlavička je kryta dvojitou membránou – vnitřní a vnější (Morel, 2008). Akrozóm se nachází na hlavičce mezi plasmatickou membránou a obalem jádra. Je obalen vlastními membránami a fúzuje s plasmatickou membránou během akrozomální exocytózy nebo při akrozomální reakci. Akrozóm je odvozen z Golgiho komplexu spermatidy. Obsahuje hydrolytické a glykolytické enzymy a matrix jaderného proteinu. Krček spojuje hlavičku s bičíkem spermie. Je složen ze segmentovaných sloupců a capitula. Segmentované sloupce jsou základem devíti hustých vláken, které dodávají pružnost a pevnost. Hustá vlákna obalují centrální axonemu, která je složena z devíti párů párových mikrotubulů (Samper, 2009). Střed spermie je tvořen velkým množstvím mitochondrií, jež produkují energii, která rozkmitává bičík a čímž pohybuje celou spermii kupředu (Morel, 2008). Mitochondrie jsou poskládány



šroubovicovitě. Hřebčí spermie mají okolo 50 otoček (Samper, 2009). Bičík je tvořen množstvím filbril a pohybuje se vlnivě (Morel, 2008). Abaxiální bičík se u hřebců běžně vyskytuje a není považován za vadu. Hřebčí spermie se pohybují specificky ve velkých kruzích (Samper, 2009).

Parameter	Acceptable range
Volume of sperm produced	30–250 ml
Sperm concentration	30–600 × 10 <sup>6</sup> ml <sup>-1</sup>
Morphology	Minimum 40–50% physiologically normal
Live : dead ratio	6.0 : 4.0
Motility	Minimum 40% progressively motile sperm
Longevity at room temperature	45% alive after 3 h 10% alive after 8 h
pH	6.9–7.8
White blood cells	< 1500 m <sup>-1</sup>
Red blood cells	< 500 ml <sup>-1</sup>

Obrázek 3.10; *Normální parametry semene hřebce (Morel, 2008).*

### 3.5.2 Mikroskopické zhodnocení

#### Bakteriologické vyšetření

Odebrané semeno přirozeně obsahuje bakterie. Některé mohou být zcela neškodné, jiné naopak vysoce patogenní. Jejich identifikace je tedy nezbytným krokem v prevenci nákazy. Kultivovat lze přímo vzorek semene, nebo provedeme stěr semene či genitálií a umístíme ho na agarovou desku. Kultivace vzorků probíhá za různých podmínek, čímž umožníme růstu, co největšího množství přítomných druhů. Dlouhodobá či akutní infekce se projevuje přítomností hnisu nebo vysokého množství leukocytů.

**Table 3**

Frequency (%) and number of isolations (isolated/total sampled) and mean ( $\pm$ SEM) microorganism load (ML) expressed in colony-forming units/mL (CFU/mL) of different species isolated in frozen-thawed semen collected from 20 stallions and subjected to single-layer density gradient centrifugation (SLC) or not (C) before freezing.

Isolated species	C, frequency of isolation (%) (No. isolated/total sampled)	SLC, Frequency of isolation (%) (No. isolated/total sampled)	C, ML, (CFU/mL) $\times 10^2$	SLC, ML (CFU/mL) $\times 10^2$
<i>Enterococcus</i> spp.	100% (20/20)	95% (19/20)	14.75 $\pm$ 3.39 <sup>a</sup>	7.40 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase negative	70% (14/20)	65% (13/20)	5.43 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	6.00 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>
Yeasts	65% (13/20)	65% (13/20)	150.20 $\pm$ 116.10 <sup>a</sup>	74.86 $\pm$ 68.95 <sup>a</sup>
<i>Bacillus</i> spp.	60% (12/20)	65% (13/20)	2.87 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	1.80 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>
<i>Corynebacterium</i> spp.	50% (10/20)	45% (9/20)	53.70 $\pm$ 19.96 <sup>a</sup>	37.70 $\pm$ 24.43 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus</i> spp.	20% (4/20)	15% (3/20)	0.80 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus</i> spp.	5% (1/20)	0% (0/20)	1.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
<i>Aerococcus</i> spp.	5% (1/20)	5% (1/20)	3.00 $\pm$ 0.00	5.00 $\pm$ 0.00
<i>Propionibacterium</i> spp.	5% (1/20)	5% (1/20)	5.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00
<i>Micrococcus</i> spp.	5% (1/20)	5% (1/20)	8.00 $\pm$ 0.00	4.00 $\pm$ 0.00
<i>Bacteroides</i> spp.	5% (1/20)	0% (0/20)	4.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
<i>Rhodococcus</i> spp.	5% (1/20)	5% (1/20)	1.50 $\pm$ 1.50	2.50 $\pm$ 2.50
<i>Dermobacter</i> spp.	5% (1/20)	5% (1/20)	15.00 $\pm$ 0.00	7.00 $\pm$ 0.00
<i>Actynomices</i> spp.	5% (1/20)	5% (1/20)	2.00 $\pm$ 0.00	5.00 $\pm$ 0.00
<i>Microbacterium</i> spp.	5% (1/20)	5% (1/20)	2.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscripts, differ ( $P < 0.05$ ).

Obrázek 3.11; *Bakteriální rody, které lze běžně vykultivovat (Guimarães, 2015).*

Zjištění *Pseudomonas aeruginosa*, *Taylorella equigenitalis* a *Klebsiella pneumoniae* vylučuje semeno z užití. (Morel, 2008) Nález *Taylorella equigenitalis* (infekční metritida koní) a *Trypanosoma equiperdum* (hřebčí nákaza) je považován za patologický a musí být hlášen (Dascanio, 2014). Dále se velice často v semeni vyskytují rody *Enterococcus* spp. (100%), *Staphylococcus* spp., kvasinky (eukaryota), *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Aspergillus* spp. (houba), (Obrázek 3.11). Příležitostně jsou izolovány plísňe i u jinak zdravých hřebců. Bylo zjištěno, že až 9 % hřebců bylo pozitivně testováno na plísňe, aniž by vykazovalo poruchy plodnosti (Dascanio, 2014).

### Cytologické vyšetření

Ve vzorcích semene je možné identifikovat bílé a červené krvinky pomocí Wrightova barvení použitím hematoxylinu a eosinu. Pozorujeme je pod hemocytometrem. Pokud je počet bílých krvinek vyšší než 1500 ml<sup>-1</sup>, je zde indikován problém. Příčinou je pravděpodobně infekce, zvláště v případě, kdy je i pH semene vysoké. Takový vzorek nebude v inseminaci použitelný. Koncentrace červených krvinek přesahující 500 ml<sup>-1</sup> také indikuje problém, například hemorágii nebo zranění. Takový vzorek nebude taktéž možno použít (Morel, 2008).

### Koncentrace

Koncentrace spermií ve vzorku semene (Obrázek 3.10) je hlavním ukazatelem kvality. Stanovuje se pomocí hemocytometru nebo spektrofotometru. Hemocytometr se skládá z podložky obsahující počítací komůrky a krycího sklíčka, pod které je umístěn určitý objem

rozředěného semene. Metoda je sice spolehlivá, ale také časově značně náročná, což není v polních podmínkách ideální. Proto je vhodné využití fotospektrometru. Semeno je naředěno v poměru 1:30. Ředidlo musí být opticky čisté, takže se využívá směs 10% formalín a 0.9% salinu. Spektrofotometr vyhodnocuje množství světla procházející vzorkem, a tak je vypočtena koncentrace spermií. Normální koncentrace spermií se pohybuje mezi  $30-600 \times 10^6$  životaschopných spermií v  $\text{ml}^{-1}$  nerozředěného semene. Přijatelná hodnota pro užití v umělé inseminaci byla stanovena na  $100-200 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  životaschopných spermií (Morel, 2008).

### **Motilita**

Pohyblivost spermií je hodnocena škále od 0-5, přičemž 0 je velmi špatně a naopak 5 je výborně. Motilita se stanoví okamžitě, aby byl zjištěn přesný výsledek. Stanovena je vizuálně nebo počítačově. Nerozředěné semeno lze vyšetřit pod světelným mikroskopem. Možné je hodnotit i již rozředěné semeno, tím však mohou být výsledky značně zkresleny. Hodnocení pod světelným mikroskopem je subjektivní a závisí na zkušenosti vyšetřujícího. Dnes dochází k velkému rozvoji počítačového hodnocení spermatu. Počítače již zvládají celou škálu vyšetření, nespornou výhodou je objektivnost (Morel, 2008).

Obecně jsou hodnoceny dva druhy motility. Celková pohyblivost označuje procento spermií, které vykazují nějaký druh pohybu. Zahrnuty jsou tedy jak spermie pohybující se standardně vpřed, tak i ty defektní. Progresivní motilita zahrnuje spermie, které se pohybují pouze vpřed nebo ve velkých kruzích. Většina hřebců vykazuje hodnotu alespoň 60 % (Dascanio, 2014). Pohyb na místě nebo v malých kruzích je klasifikován jako nenormální. Semeno obsahující alespoň 40 % progresivně se pohybujících spermií lze označit jako použitelné v umělé inseminaci. Korelace mezi motilitou a oplození schopností je proměnlivá a nízká (0.7). Nicméně lze z ní nejlépe usuzovat o fertilitě semene (Morel, 2008).

### **Procentuální vyjádření živých a mrtvých spermií**

Motilita je dobrým indikátorem pro vyjádření procentuálního množství živých spermií ve vzorku. Avšak, rozdílná barvitelnost za pomoci nigrosinu a eosinu, a mikroskopický rozbor, nám dává přesnější výsledky. Mrtvé spermie se jeví pod mikroskopem jako fialové, protože jsou pro barvivo prostupnější. Dále je možné barvit spermie ethidium bromidem, fluorescenční akridinovou oranží či fluorescenční H25. Poměr či procento mrtvých a živých spermií je hodnoceno v počtu odebraných vzorků. Pro umělou inseminaci je přijatelným poměrem mezi živými a mrtvými spermii 6:4. Ačkoli, vzorek s nižším poměrem může být také použit,

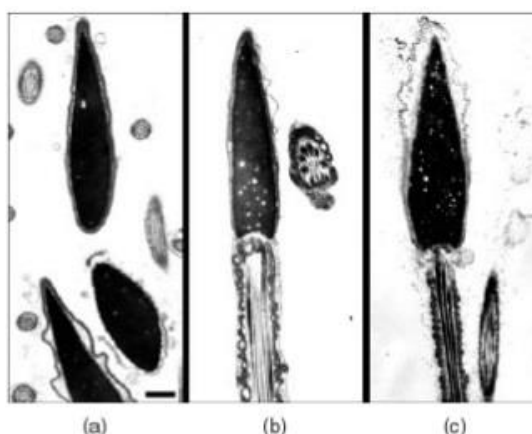
pokud se vyznačuje vysokým celkovým počtem spermií. Může být méně naředěn, a tak bude stále splněn minimální počet živých spermií pro úspěšné oplození (Morel, 2008).

## Morfologie

Morfologické zhodnocení je běžnou metodou posouzení hřebcovy plodnosti. Semeno je rozředěno a poté je zkoumáno mikroskopicky (3.12). Spermie jsou jednotlivě posuzovány a následně je vykalkulováno procentuální zastoupení těch abnormálních. Pro zvýraznění abnormalit jsou spermie barveny. Používá se nigrosin-eosin barvení, které obarví hlavičky mrtvých spermií do fialova. Barvení se využívá také k zhodnocení integrity specifických oblastí např. akrozómu nebo imunofluorescenční test či značení monoklonálních protilátek.

Abnormality jsou klasifikovány primárně jako selhání spermatogeneze a spermatického zrání. Ty se projevují spermii s dvěma hlavičkami či bičíky, absencí krčku nebo bičíku, krátkým nebo stočeným bičíkem. Takové abnormality indikují dlouhodobý nebo dokonce permanentní problém. Selhání zrání je diagnostikováno přítomností cytoplasmy na krčku. Během zrání se kapénka přirozeně posunuje po bičíku a na zdravé zralé spermii se již nevyskytuje. Pokud je tento znak přítomen v ejakulátu, jedná se o nezralé spermie. Tento defekt bývá pouze dočasný.

Druhotně k poškození dochází při ejakulaci nebo necitlivým zacházením po odběru. Při ejakulaci se jedná o abnormality bičíku, zduření, oddělené hlavičky a bičíky. Po ejakulaci je to ztráta akrozómu, ztlustění krčku nebo pukání hlaviček. Korelace mezi morfologií a fertilitou je relativně nízká (0.25-0.5). Semeno, které obsahuje více, než 65 % morfologicky normálních spermií se dá považovat za použitelné v umělé inseminaci (Morel, 2008).



Obrázek 3.12; Snímky z elektronového mikroskopu v měřítku 1  $\mu\text{m}$ , a) poškození plasmatické membrány a akrozómu, b) nekompletní chromatinová kondenzace, c) předčasná akrozomální reakce (Dascanio, 2014).

## **pH**

Pro stanovení kyselosti či zásaditosti vzorku se využívá standardního pH metru (Morel, 2008). Použití pH papírku je také možné, ale je nepřesné. Hodnota pH čerstvě odebraného semene by rozhodně měla být stanovena okamžitě po odběru. Inkubace vzorku po delší dobu snižuje pH. Důvodem je akumulace vedlejších produktů metabolismu – kyseliny mléčné. Semenné pH je ovlivněno ročním obdobím, koncentrací spermií a frekvencí ejakulací (Dascanio, 2014). Kyselé pH je spermicidní a lze ho brát jako indikátor cizí příměsi či infekce. Přijatelné hodnoty pH jsou 6.9-7.8. Hodnoty 7.3-7.7 jsou ideální (Morel, 2008).

## **Životaschopnost**

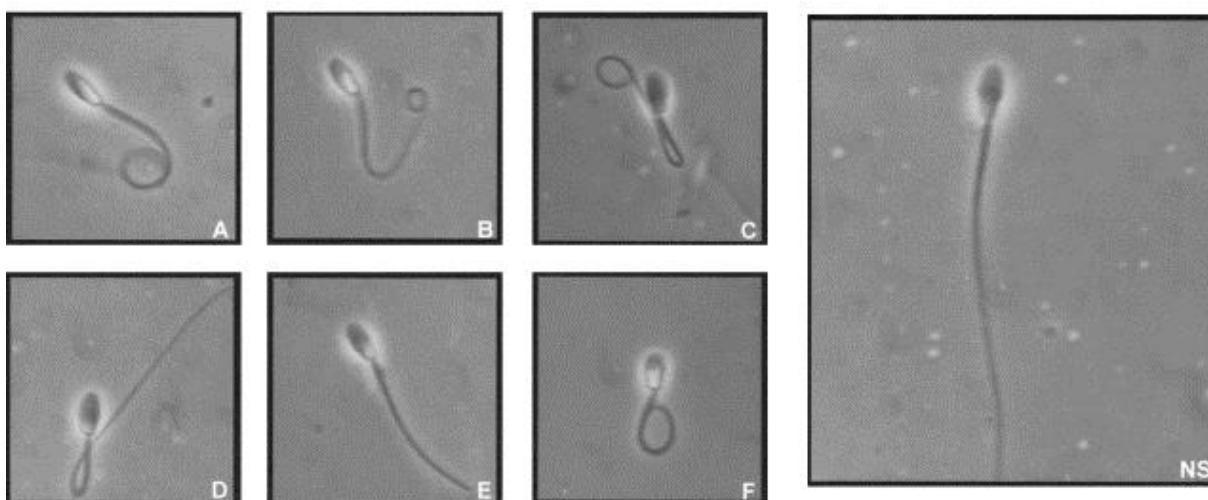
Stanovení motility v průběhu času se dá využít jako indikátor životaschopnosti. Vezmeme však na zřetel, že životnost spermií v testovacích trubičkách není nezbytně stejná jako životnost v děloze. Test zahrnuje stanovení okamžité motility, později se motilita stanovuje v rozličných intervalech uložení při teplotě 5°C, 22°C nebo 37-38°C. Například hodnoty motility větší než 45 % po 3 h nebo 10 % po 8 h při 22°C svědčí o vzorku vhodném pro umělou inseminaci (Morel, 2008).

## **Test dlouhověkosti**

Semeno, určené pro použití v chlazené dávce, je ředěno komerčním ředidlem na koncentraci  $25-50 \times 10^6/\text{ml}$ . Pokud jde o hřebce, u kterého byl test v minulosti proveden, výsledky porovnáme. U hřebce v první sezóně provádíme test opakovaně za použití různých ředidel a antibiotik. Výsledky porovnáme. Ideální je použít běžné Kenneyho ředidlo (odtučněné mléko, glukóza, antibiotika), ředidlo obsahující sukrozu (+ odtučněné mléko, glukózu, antibiotika), ředidlo s přirozenými fosfokaseináty (+ glukóza, antibiotika). Jako antibiotikum se běžně používá amikacin, penicillin, polymixin B. Semeno se umístí do komerčního přepravního kontejneru s chladicí vložkou a prověřováno je po 24, 48 a 72 hodinách. Kontejner je uchováván při pokojové teplotě. Při vyhodnocení je semeno jemně promícháno. Odebrána je kapka, která je přikryta krycím sklíčkem (nahřáto na 37°C) a vyšetřena pod mikroskopem. Výsledek po 72 hodinách nemá být horší než 25-30% motilita, hodnoty motility nad 30% svědčí o vynikajícím semeni (Dascanio, 2014).

### Hypoosmotic swelling test

Výsledkem (HOS) testu je posouzení funkční integrity plasmatické membrány (Obrázek 3.13) spermie. Test je jednoduchý, snadno zopakovatelný a spolehlivý. Základem je vystavení spermií hypoosmotickému roztoku např. 50-100 mOsm laktózového či sukروزového roztoku (1,712g sukروزy a 50ml sterilní deionizované vody). Přes plazmatickou membránu je transportována tekutina hypoosmotického roztoku. Spermie s neporušenou membránou vykazují charakteristický otok bičíku. Pokud spermie neatéká ani se nesvíjí, je to důkazem, že je poškozena plasmatická membrána, tudíž není tekutina zadržena uvnitř buňky. HOS nahrazuje mnohem dražší testy (supravitální barvení - SYBR14 a propidium iodid), které jinak vyžadují průtokovou cytometrii a fluorescenční mikroskopii. HOS test je užitečný při testování membránové integrity mraženého spermatu (Dascanio, 2014).



Obrázek 3.13: *Typické změny při HOS-testu, NS: beze změn (Neild, 2000).*

### 3.5.3 Makroskopické zhodnocení

Semeno je za normálních okolností mléčně bílé, konzistence sladké smetany. Nemělo by vykazovat stopy krve, moči nebo tkáně. Pokud se něco z vyjmenovaných objeví, semeno se nevyužívá a hřebec by měl být podroben veterinárnímu vyšetření. Objem semene je 30–250 ml, průměrem je 100ml. Gelová trakce tvoří normálně 20-40 ml. Rozdíly v objemu jsou jak mezi hřebci, tak i u jednoho hřebce během sezóny (Morel, 2008).

### 3.6 Složky a výroba inseminačních dávek

V 90. letech došlo k světovému nárůstu využívání chlazeného a mraženého semene. Jako velmi užitečné a opodstatněné je užití metod v zemích velkých rozloh typu Austrálie, Kanada a USA, kdy se dávky přepravují letecky nebo po železnici na dlouhé vzdálenosti zcela běžně. Revoluce využívání chlazených dávek byla umožněna vyvinutím izolovaných kontejnerů. Použití umělé inseminace šetří majitelům mnoho peněz na přepravě klisen ke hřebci a umožňuje širší výběr. Mezi chovateli si chlazené semeno získalo značnou oblibu, protože po dobu 48-72 h si uchovává vysokou oplození schopnost, které je dosaženo díky dobré snášenlivosti semene k pomalému zchlazení na 4°C (Allen, 2005). Naproti tomu mražené sperma poskytuje výhodu ve využití hřebců ze zahraničí, intenzivně závodně využívaných, hřebců, kteří se během připouštěcí sezóny zranili nebo jsou již plně vyčerpáni, anebo jen praktický důvod – mít vždy dávku k okamžitému použití k dispozici (Loomis, 2005).

Kryokonzervace zahrnuje větší množství kroků, které ovlivňují výslednou kvalitu spermatu. Proces se skládá z odběru spermatu, prvního rozředění, centrifugace, ředění v mrazicím ředidle, zchlazení, zmražení, a nakonec rozmražení a užití. O semenné plasmě se ví, že je při uchování spermatu škodlivá, a proto všechny techniky konzervace spermatu zahrnují naředění a následné odstranění semenné plasmu centrifugací. Pokud se chceme tomuto kroku jednoduše vyhnout, odebere pouze první frakce semene. První ředění je provedeno při teplotě 20°C, 22°C nebo 37°C, následuje centrifugace. Dále je sperma naředěno v mrazicím ředidle, jehož složkou může být vaječný žloutek, glycerol, lecitin nebo glutamin. Zchlazování musí probíhat pomalu, jinak hrozí fatální vnitrobuněčná krystalizace. Rozmrazování musí být rychlé, aby se předešlo formování krystalů, které mohou dosáhnout ještě větších rozměrů. Změny objemu v důsledku změn osmolarity během kryokonzervace vedou k poškozením membrán (Vidament, 2001).

Nutno však dodat, že ne všichni hřebci mají semeno vhodné ke kryokonzervaci. Uvádí se, že 20% hřebců produkuje semeno dobře mrazitelné, 60% akceptovatelně a 20% semeno nevhodné ke kryokonzervaci. Mechanismy ovlivňující rozdílnou mrazitelnost mezi hřebci nebyly dosud plně objasněny. Rozdílná snášenlivost spermatu k proceduře je připisována genetickým faktorům, použitým kryoprotektivům a jiným neobjasněným vnějším vlivům. Dalším vlivem, u kterého je zjištěno negativní působení na chlazené semeno, je bakteriální kontaminace. Hoogewijs a kolektiv předpokládali, že redukcí bakteriální kontaminace selepší parametry použitého mraženého semene. Negativní vliv však zatím nebyl plně prokázán a je nadále předmětem dalšího výzkumu (Guimarães, 2015).

### 3.6.1 Ředidla

Rozředění semene odpovídajícím médiem bylo zkoumáno již na počátku 20. století. Hoffman v Německu roku 1905 navrhol ředění pomocí čerstvého kravského mléka. Elia Iwanoff experimentoval se salinem (roztok NaCl + H<sub>2</sub>O) a Ringerovým a Lockovým roztokem. Ředění spermatu působilo proti škodlivému účinku semenné plasmy, umožňovalo uchovat semeno a zvýšit objem ejakulátu pro inseminaci více klisen. Waltonův experiment uskutečněný 1938 v Cambridgi vedl k zabřeznutí klisen za použití glukózového ředidla po centrifugaci a uchování semene po dobu 48 hodin při 0°C. Centrifugace byla doporučována i jinými vědci. Ruští vědci vyvinuli metodu s komplexnějšími ředidly obsahující pufovaný glukózový roztok s peptonem, kyselinou vinnou a taninem. Žloutková ředidla, využívaná především v USA a Německu, vykazovala oplození schopnost semene až dva dny skladovaného. S ohledem na teplotu uchování, pokusy prokázaly, že chlazení může být sice pro spermie škodlivé, ale teploty pod 8°C utlumují bakteriální činnost. Což bylo důležité zjištění v dobách neznající antibiotika. Doporučováno bylo pomalé chlazení a teploty lehce nad 0°C (Aurich, 2012).

Ředidlo chrání spermie před šokem z chladu, poskytuje metabolizovatelné substráty, omezuje mikrobiální bujení a než dojde k inseminaci, zajišťuje lepší životaschopnost. Zvolení správného typu ředidla ovlivňuje integritu spermií a schopnost přežít během krátkodobého skladování. Neméně nezbytnými kroky je dodržení správné teploty, rychlost zchlazování vzorku (0.1°C/min.), koncentrace semenné plasmy, a působení kyslíku. Ředidla by měla splňovat následující pravidla: Osmolarita o hodnotách 300-350 mOsm/l, pH 6.8-7.0, pufr stabilizující pH, zdroj energie přístupný spermiím, aditiva omezující mikrobiální bujení, chránící membrány a metabolické funkce, neutralizující vedlejší produkty metabolismu. Žloutek a složky v mléku obsažené pomáhají chránit plasmatickou membránu spermie, mají pufovací schopnosti a chrání před oxidací. Používanými pufrů jsou HEPES, bikarbonát sodný a citrát sodný (Dascanio, 2014).

#### 3.6.1.1 Mléčná ředidla

Jedním z prvních, navržených pro použití u hřebčích spermií, bylo ředidlo z odtučněného mléka s glukózou. Jednoduchý recept je složen z 2.4 g odtučněného sušeného mléka, 4.9 g glukózy, 2 ml roztoku (7.5 g/100 ml) bikarbonátu sodného, 92 ml destilované vody a dle potřeby lze přidat 2 ml sulfátu gentamycinu (50 mg/ml). Upravení pH na 7.0 se provádí přidáním HCl nebo NaOH dle potřeby. Postupem času bylo vyvinuto mnoho modifikací Kenneyho ředidla, které se liší v procentuálním zastoupení složek a obměnou použitých



antibiotik (Dascanio, 2014). Kenneyho ředidlo bylo popsáno v roce 1975. V pokusu El-Shawkaviho byla použita varianta ředidla obsahující 2.4 g/100 ml odtučněného sušeného mléka, 4.9 g/100 ml glukózy, 2 ml 8.4% NaHCO<sub>3</sub>, 100 mg/ 100 ml gentamycinu a 92 ml deionizované vody. Základ mléka a glukózy byl u modifikované verze stejný. Lišilo se v množství antibiotik, kdy bylo použito 150.000IU penicilinu sodného, 150 mg dihydrostreptomycinu a 100 ml destilované vody. Poté bylo 65 % směsi přidáno do 35 % Tyroyova média, které bylo složeno ze 420 mg NaCl, 187 mg KCl, 210 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 190 $\mu$  98% sirupu laktátu sodného, 29 mg CaCl, 8mg MgCl, 238 mg HEPES, 11 mg pyruvátu sodného, 600 mg bovinního sérového albuminu prostého mastných kyselin a 100 ml vody (El-Shawkawy, 2016). Někdy se přidávají jiná antibiotika jako amikacin a draselná sůl penicilinu.

Výrobci Kenneyho ředidla jsou například Nasco, Fort Atkinson, WI. Ředidlo Universal obsahuje dva sacharidy – glukózu a sukrozu, odtučněné sušené mléko a antibiotika amikacin s draselnou solí penicilinu. Často používaná INRA96 (Obrázek 3.14) se skládá z přirozeného fosfátokaseinátu, glukózy a laktózy, 50 000UI penicilinu, 50 mg gentamycinu, 0.25 mg amphotericin B, Hankovy soli a HEPES pufru. E-Z Mixin je složen z glukózy, odtučněného mléka, amikacinu a draselného penicilinu. EquiPro a Equipro CellGuard obsahují kaseináty a pšeničné proteiny. V pokusu provedeném na univerzitě v Nové Karolíně mapujícím stav vzorků semene kultivovaných při teplotě 4°C po 72 h bylo zjištěno, že INRA96 dosahuje v celkové a progresivní motilitě nejlepších výsledků (LeFrappier, 2010).



Obrázek 3.14; Ředidla v originálním balení (Dascanio, 2014).

### 3.6.1.2 Žloutková ředidla

Ředidla založená na žloutku byla nejdříve zkoušena Phillipsem na býčím semeni, později také u koní. Složení mastných kyselin nemůže být přesně stanoveno, protože se jedná o přírodní produkt, který závisí na dietě slepic. Obecně obsahuje 35 % nasycených mastných kyselin, 45 % mononenasycených kyselin a 20 % polynenasycených kyselin. Primárními komponenty žloutku v sušině jsou z 65 % lipidy. Ty jsou složeny z 65 % triglyceriny, z 29 % fosfolipidy, z nichž 86 % tvoří fosfatidylcholin a z 14 % fosfatidylethanolamin. Zbytek lipidů tvoří z 5 % cholesterol a méně než 1 % volné mastné kyseliny (Canisso, 2008).

Vaječný žloutek vykazuje neinvazivní kryoprotektivní vlastnosti během kryokonzervace. Přesné mechanismy kryoprotektivních vlastností žloutku nejsou objasněny, ale je zřejmé, že obsah fosfolipidů a nízko denzitních lipoproteinů (LDL) přispívá k ochraně integrity plasmatické membrány během mražení a tání (Gibb, 2016). LDL mají velkou schopnost emulsifikace a ve žloutku se nacházejí v rozpustné plasmatické frakci. LDL obsahuje okolo 85 % lipidů a 15 % proteinů. Složeny jsou z 69 % z triglyceridů, 26 % fosfolipidů a 5 % cholesterolu. V několika studiích byl žloutek úspěšně nahrazen nízko denzitními lipoproteiny (Canisso, 2008). V praxi se používá Footovo ředidlo, které je založeno na glycinu a vaječném žloutku (Pugliesi, 2012). V Německu, Japonsku a Brazílii se můžeme velice často setkat s použitím vaječných ředitel. Jako nejlepší se jeví 20% koncentrace žloutku (Canisso, 2008).

### 3.6.1.3 Ředidla využitelná pro mražené ID

Důležitou složkou, která ředidlo od běžného odlišuje, je kryoprotektivum. Používány jsou detergenty, směsi cukrů, a zvláště u skotu je využíván glycerol. Bohužel byla pro hřebčí spermie zjištěna toxicita, nicméně je při vhodné koncentraci používán (Morel, 2008). Přesnou koncentraci glycerolu nelze určit, neboť s každým ředidlem funguje odlišně. Například v INRA82 je optimální koncentrace 2-3 % glycerolu, pro laktózo-glukózovou EDTA byla hodnota stanovena na 4 % a pro Kenneyho verzi ředidla je ideální obsah do 2 % (Vidament, 2005).

Parametrs (N = 60)	Type of diluent				
	m-INRA	Kenny	M-Kenny	Equi-Pro®	
Post-thaw total motility (%)	0h	52.50 ± 2.27 <sup>a</sup>	33.00 ± 2.13 <sup>c</sup>	43.00 ± 2.13 <sup>b</sup>	41.50 ± 2.59 <sup>b</sup>
	1h	44.00 ± 1.94 <sup>a</sup>	24.50 ± 1.57 <sup>c</sup>	33.50 ± 1.98 <sup>b</sup>	32.50 ± 2.27 <sup>b</sup>
	2h	35.50 ± 1.89 <sup>a</sup>	15.50 ± 1.38 <sup>c</sup>	25.50 ± 1.74 <sup>b</sup>	24.00 ± 2.08 <sup>b</sup>
	3h	28.50 ± 1.30 <sup>a</sup>	9.50 ± 1.38 <sup>c</sup>	17.00 ± 1.86 <sup>b</sup>	17.50 ± 1.86 <sup>b</sup>
Viability index		134.25 ± 5.99 <sup>a</sup>	66.00 ± 5.23 <sup>c</sup>	97.50 ± 6.40 <sup>b</sup>	94.75 ± 7.33 <sup>b</sup>
Swollen spermat-ozoa (HOS +ve %)		46.60 ± 2.05 <sup>a</sup>	29.80 ± 1.14 <sup>c</sup>	36.70 ± 1.73 <sup>b</sup>	36.60 ± 2.09 <sup>b</sup>
Normal acrosomes (%)		54.50 ± 1.30 <sup>a</sup>	35.50 ± 1.38 <sup>c</sup>	43.00 ± 1.86 <sup>b</sup>	43.5 ± 1.86 <sup>b</sup>
MTT reduction		0.34 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.008 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.008 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.009 <sup>b</sup>
Mitochondrial rate					
Viability acc. to MTT reduction (%)		66.46 ± 1.72 <sup>a</sup>	50.60 ± 1.96 <sup>c</sup>	60.54 ± 2.00 <sup>b</sup>	57.38 ± 2.26 <sup>b</sup>

Obrázek 3.15; *Efekt různých ředidel na parametry po rozmrazení (El-Sheshtawy, 2016).*

Jednoduché ředidlo na mléčném základě, popsané v roce 1995 Samprem, je složeno z 2.4 g odtučněného mléka, 8 ml vaječného žloutku, 9.3 g sukrozy, 3.5 % glycerolu a 100 ml destilované vody (Morel, 2008). Laktózo-žloutkové ředidlo Nagase a Niwi, modifikované Silvou Filhem et al, neobsahující glycerol, se dobře uchytilo v Brazílii. Dosahuje srovnatelných výsledků jako Kenneyho ředidlo (Canisso, 2008). Již výše zmíněným ředidlem používaným pro výrobu mražených dávek je laktózo-glukózová EDTA. Složena je z roztoku 25% laktózo-glukózového EDTA, 20 % vaječného žloutku a 5 % glycerolu. Využíváno je také Kenneyho modifikované ředidlo s bikarbonátem, 4 % vaječného žloutku a 3.5 % glycerolu. Kenney oproti laktózo-glukózové EDTA vykazuje vyšší motilitu spermií (Vidament, 2005). Dalším široce využívaným ředidlem je INRA82 (Obrázek 3.15), která se skládá z 0.5 l solného roztoku: 25 g glukózy, 1.5 g laktózy, 1.5 g rafinózy, 0.25 g dihydrátu citrátu sodného, 0.41 g citrátu draselného, Hepes buffer, 50,000 IU penicilinu, 50 mg gentamycinu a 0.5 l odtučněného UHT mléka o pH 6.8 (Khelifaoui, 2005).

### 3.6.2 Kryoprotektanty

Pravděpodobně největší senzací na poli kryoprotektiv bylo náhodné objevení kryoprotektivních vlastností glycerolu Polgem a kolegy roku 1949 následované objevením dimethylsulfoxidu Lovelockem a Bishopem roku 1959. Od této doby se empiricky, metodicky a systematicky zlepšily výsledky kvality spermatu po rozmrazení až tak, že při dodržení ideálních podmínek mohou být výsledky zabřeznutí po inseminaci mraženou dávkou podobně úspěšné jako přirozená reprodukce. Ačkoli literatura uvádí průměr okolo 45-50% dle standardních inseminačních protokolů (Gibb, 2016).

Glycerol je původem řecký výraz znamenající „sladký“. Objeven byl v roce 1779 švédským chemikem Carlem W. Scheelem. Přirozeně se vyskytuje v živočišných a rostlinných

tucích, ale lze ho derivovat i z petrochemických surovin. Ve vodě je rozpustný. Je bez zápachu a barvy. Bodu varu je dosaženo při 290°C, rozpouští se při 18.2°C. Má široké využití např. v potravinářství, lékařství nebo kosmetice (Pagliaro, 2010). Stal oblíbeným kryoprotektivem napříč druhy. Značně se prosadil zejména u konzervace býčího spermatu. Oproti tomu u hřebců se kýžený výsledek nedostavil a byla mezi nimi značná variabilita. Nejdůležitějšími faktory zapříčínující poškození mrazem dle experimentálních studií jsou toxicita z nerovnoměrného promísení a osmotický stres způsobený dehydratací ředidla a buněk během mražení a následného rozmrazení. Výsledkem použití tohoto kryoprotektiva při koncentraci 3.5% je zlepšení pohyblivosti, životaschopnosti a mitochondriálního membránového potenciálu spermií. Mechanismem účinku glycerolu je stabilizace membrány, což vysvětluje lepší životaschopnost. Použitím nelze předejít defektům akrozomu. Bylo zjištěno, že metylformamid v 4.7 % koncentraci ve spojení s 2.3 % glycerolem zlepšuje životaschopnost a celkovou motilitu. Byly naměřeny hodnoty motility  $70 \pm 4.00$  (v %), a životaschopnosti  $44.65 \pm 4.36$  (v %). Avšak nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi dalšími kombinovanými kryoprotektivy. Celková motilita po rozmražení, membránový potenciál a poškození akrozómů bylo srovnatelné. Základem kryoprotektivního ředidla byla INRA96 s 2.5% vaječného žloutku (Wu, 2015).

Etylen glykol je vysoce viskózní s vodou mísitelná bezbarvá tekutina sladké chuti. Bodu varu dosahuje při teplotě 197,6°C. Je hydrokopický. Při smíchání s vodou tvoří pomalu mrznoucí směs (Burdick, 2010). V Moorově experimentu za použití základního ředidla na mléčné bázi bylo zjištěno, že oproti glycerolu vykazuje etylen glykol horší výsledky, hodnotíme-li celkovou motilitu a progresivní motilitu. Životaschopnost spermií byla srovnatelná. Nutno zdůraznit, že velice záleží na koncentraci kryoprotektiva. Dobrých výsledků bylo dosaženo při koncentracích 0.6-0.9 ml/l. Několik studií prokázalo, že u hřebců s hůře mrazitelným semenem je vhodným řešením právě užití ethylen glykolu či dimethyl foramidu (Moore, 2006). Dále bylo prokázáno, že použitím ethylen glykolu nelze předejít defektům akrozomu (Wu, 2015).

Glutamin je hlavním zdrojem dusíku pro mnoho tkání a metabolickým zdrojem pro rychle se dělící buňky. V organismu je využit pro transport amoniaku do jater (Bender, 2012). Bylo zjištěno, že přidáním 50 mM glutaminu do média složeného z INRA 82 a 2.5% glycerolu, se po rozmrazení zlepšila motilita. V tomto případě však záleží na mrazitelnosti semene. Progresivní motilita po rozmražení je zvýšena o více než 30 % u hřebců, kteří mají bezproblémově nebo přijatelně mrazitelné semeno. Tímto způsobem se lze vyhnout nebo alespoň zredukovat toxicitu glycerolu a zlepšit fertilitu semene. Při vyšších koncentracích

glutaminu se ukázala jeho osmotická toxicita. Hypoteticky působí glutamin ve spojení s glycerolem synergicky. Nezávisle na glycerolu má akční mechanismus hrající roli v extracelulárním prostoru spermií (Khelifaoui, 2005).

Cáceres je ředidlo patentované španělskou univerzitou v Extremaduře. Základem je odtučněné mléko, ke kterému je přidána kombinace 1.5 % glycerolu a 1.5 % dimethylforamidu. V pokusu byla pro porovnání testována ředidla INRA-96 doplněná o 2 % vaječného žloutku a 2.5 % glycerolu, a Ghent. Konečná koncentrace spermií ve vzorcích byla standardních  $100 \times 10^6$  v ml. Poté byly spermie pomalu schlazeny na 4°C a plněny do 0.5 ml plastových brček, následně byly zmrazeny. Po 4týdenním uskladnění byly vzorky po dobu 30 s rozmrazovány ve vodě o teplotě 37°C. Motilita byla měřena po 60 min inkubaci při teplotě 38°C. Stav akrozómu byl stanoven průtokovou cytometrií po 30 minutách kultivace ve tmě při teplotě 38°C. Dále byl posuzován mitochondriální membránový potenciál, membránové změny a životaschopnost buněk. Výsledkem pokusu je, že motilita čerstvého i rozmrazeného semene byla v případě Cáceres ředidla výrazně vyšší než u vzorků s Ghent a INRA96EYG. Homogennějších výsledků po rozmrazení dosahovalo ředidlo Cáceres s hodnotami mezi 23 až 52 %, nejvariabilnější výsledky motility vykazovalo ředidlo Ghent s hodnotami od 7.5 do 52 % (Obrázek 3.16) (Morillo, 2011).

	Caceres	Ghent	INRA96EYG
TM%	40.4 ± 14.67 <sup>a</sup>	28.8 ± 19.71 <sup>b</sup>	23.5 ± 12.39 <sup>b</sup>
LM%	12.2 ± 6.88 <sup>a</sup>	8.5 ± 8.92 <sup>a</sup>	5.5 ± 4.52 <sup>b</sup>
VCL (µm/s)	37.5 ± 7.40 <sup>a,b</sup>	35.0 ± 9.67 <sup>a,b</sup>	32.5 ± 6.75 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	20.4 ± 4.17 <sup>a,b</sup>	18.9 ± 4.98 <sup>a,b</sup>	17.5 ± 3.49 <sup>b</sup>
VSL (µm/s)	15.0 ± 3.54	13.6 ± 4.70	12.9 ± 3.30

a, b within a row values with different superscripts are statistically different ( $p < 0.05$ ).

Obrázek 3.16: Motilita analyzovaná systémem CASA, ejakuláty od 7 hřebců mražené ve třech ředidlech. Experiment opakován 6× u každého hřebce. TM – celková motilita; LM – lineárně motilní; VCL – cirkulární; VAP – průměrná; VSL – rychlost v přímém pohybu (Morillo, 2011).

Včelí med je bohatým zdrojem sacharidů fruktózy a glukózy, minerálů například hořčíku, draslíku, vápníku, chloridu sodného, síry, železa, fosfátů a kyseliny kávové, CAPE, vitaminů B1, B2, C, B6, B5 a B3. Ve směsi s vaječným ředidlem bylo prokázáno pozitivní působení na motilitu (Obrázek 3.17), na poměr živých a mrtvých spermií a na životaschopnost kozlího semene. Pokusy byly prováděny i na býčím a beraním semeni. V humánní medicíně byl med úspěšně použit jako kryoprotektivum v 10% koncentraci. U koní bylo dosaženo

nejlepších výsledků při 3% koncentraci. Ředidlo bylo připraveno smísením 1 ml medu s 9 ml destilované vody, tím bylo dosaženo 10% roztoku. Poté byl smísen s modifikací INRA-82 v poměru 1.5/3.5 ml, tzn. výsledný objem 5ml. Po kryokonzervaci byla výrazně zlepšena membránová a akrozomální integrita, motilita a index životaschopnosti. Použití medu je navíc vítanou prevencí vzniku ledových krystalů. Díky vysoké molekulární hmotnosti působí fruktóza a glukóza jako nepenetrující extracelulární kryoprotektant, který udržuje osmotickou rovnováhu (El-Sheshtawy, 2016).

Honey enrichment %	Motility after thawing (arcsin values)			
	0 h	1 h	2 h	3 h
HEMI 0% (control)	41.67 ± 1.67 <sup>c*</sup>	36.67 ± 4.41 <sup>c</sup>	31.67 ± 4.41 <sup>c</sup>	25.00 ± 2.89 <sup>d</sup>
HEMI 1%	43.33 ± 1.67 <sup>c</sup>	40.00 ± 2.89 <sup>bc</sup>	33.33 ± 3.33 <sup>c</sup>	26.67 ± 1.67 <sup>cd</sup>
HEMI 2%	55.00 ± 2.89 <sup>ab</sup>	48.33 ± 1.67 <sup>ab</sup>	41.67 ± 1.67 <sup>abc</sup>	35.00 ± 2.89 <sup>bc</sup>
HEMI 3%	63.33 ± 1.67 <sup>a</sup>	56.67 ± 1.67 <sup>a</sup>	51.67 ± 1.67 <sup>a</sup>	45.00 ± 2.89 <sup>a</sup>
HEMI 4%	58.33 ± 4.41 <sup>a</sup>	51.67 ± 3.33 <sup>a</sup>	45.00 ± 2.89 <sup>ab</sup>	41.67 ± 1.67 <sup>ab</sup>
HEMI 5%	48.33 ± 4.41 <sup>bc</sup>	41.67 ± 3.33 <sup>bc</sup>	38.33 ± 4.41 <sup>bc</sup>	31.67 ± 4.41 <sup>cd</sup>
F-value	8.04	6.33	5.26	7.70
P <	0.001 6	0.004 2	0.008 7	0.001 9

Obrázek 3.17; *Efekt přidavku medu do modifikované INRA-82, vliv na motilitu u arabského koně (El-Sheshtawy, 2016).*

Potenciál cholesterol-loaded cyklodextrinů (CLCs) byl objeven hned několika týmy. Zájmem bylo vyvinout kryoředidlo vyrobené z látek neživočišného průvodu, které by úspěšně nahradilo ředidla na žloutkovém základě. Vzhledem k tomu, že hlavním faktorem predisponující hřebčí spermie k chladovému šoku, je pravděpodobně nižší obsah cholesterolu a fosfolipidů ve spermatické membráně, se zdá, že CLCs budou velkým průlomem v kryokonzervačních technologiích. Přidáním CLCs je zlepšena osmotická tolerance, tekutost (fluidity) a prostupnost plasmatické membrány ke kryoprotektivům, což má za následek zlepšení membránové integrity po rozmrazení (Gibb, 2016). Pokusem bylo zjištěno, že přidáním 1.5 mg CLC/CnLC je výrazně zvýšena progresivní motilita, a to jak u čerstvých spermií, tak i rozmrazených. V druhém pokusu byla testována vazba spermií na periviteliní membránu slepičího vejce. Bylo zjištěno, že se lépe vazaly spermie ředěné s cholestanol-LC (Moraes, 2015). Hlavním předmětem zájmu dalšího výzkumu je včleňování CLCs do spermatické membrány. Spermatická membrána může dosáhnout takové stability, že je

následně neschopna projít membránovou remodelací, která je nezbytná během kapacitace a akrozomální reakce, a tím může dojít ke snížení oplození schopnosti (Gibb, 2016).

Zdá se, že nejlepším kandidátem s podobnými mechanismy účinku nahrazujícím žloutek, je fosfolipid na rostlinné bázi. Fosfatidylcholin je fosfolipid, který se nachází v membránách, a je hlavním komponentem jak vaječného žloutku, tak i sóji. Ačkoli byl sójový fosfatidylcholin s úspěchem použit jako náhražka žloutku při kryokonzervaci beraního spermatu, tak i v in-vitro výsledcích kryokonzervace hřebčího spermatu se zdálo, že funguje stejně jako u spermií konzervovaných vaječným žloutkem. Avšak rozsáhlý test fertility realizovaný Papem a kolektivem ukázal, že navzdory slibným in vitro výsledkům, hřebčí spermie konzervované sójovým fosfatidylcholinem neprokázaly komerčně přijatelné výsledky plodnosti (Gibb, 2016).

### **3.6.3 Postup výroby čerstvé a chlazené inseminační dávky**

Po odběru je semeno mikroskopicky vyšetřeno, koncentrace a motilita by měla být stanovena do 5 minut po ejakulaci (Katila, 1997). Stanovena je pomocí hematologické mřížky pod optickým mikroskopem při 200× zvětšení (Freitas, 2016). Až do naředění musí být udržena teplota 37°C, kterou se předejde zbytečnému poškození. Ředidlo spermie chrání, takže je rozhodně správným krokem jeho použití, i když je inseminace provedena ve velmi krátkém časovém odstupu. Předpokládá se, že klisny vnímavé k endometritidě mohou v pozitivním slova smyslu těžit z antibiotik v ředidle obsažených. Kenneyho ředidlo, bylo totiž původně představeno jako součást techniky, která měla působit preventivně a minimalizovat možnost infekce při zapouštění. Při ředění je doporučeno dodržet poměr alespoň 1:1. Poměr je používán pro klisny inseminované přímo na farmě několik hodin po odběru.

Koncentraci spermatických buněk je možné upravit centrifugací. Tu provádíme 9 až 18 minut při 400-500×g, supernatant je posléze odstraněn. Pelety se semenem jsou doplněny ředidlem na požadovanou koncentraci. Při této proceduře jsou vždy nějaké spermie poškozeny a vždy je snížena motilita, která se do hodiny sama upraví. Alternativou k centrifugaci je odběr pouze frakce semene, která je bohatá na spermie. Chlazení snižuje metabolickou aktivitu spermií, omezuje mikrobiální růst a prodlužuje životaschopnost. Pro skladování po dobu do 24 h, je osvědčena teplota 20°C. Při skladování delším než 24 h je vhodnější zvolit nižší teploty v rozmezí 4-6°C. Zchlazovat se doporučuje pomalu rychlostí 0.1°C/min. Pokud je semeno plněno do plastových stříkaček, měla by být použita ochranná netoxická plastová čepička (Katila, 1997). Semeno lze také plnit do plastových netoxických sáčků, zatavených vložek do



kojeneckých lahví nebo do plastových kontejnerů. Vždy by mělo být uloženo v anaerobních podmínkách (Dascanio, 2014).

Při inseminaci čerstvým spermatem je pro dosažení uspokojivých výsledků umělé inseminace, doporučována časem prověřená koncentrace  $250-500 \times 10^6$  progresivně se pohybujících spermií (PMS). Obecně je doporučována horní hranice spektra. Původ doporučení není úplně dobře znám. Většina původních prací zabývajících se inseminací pochází z Ruska a Východní Evropy 1. poloviny 20. století. Tehdejší výzkumy se však více zaměřovaly na vliv ředidel než na počet spermií. Teprve až druhá polovina 20. století začala klást na čísla větší důraz. Teprve Pickett a Voss začali zdůrazňovat potřebu dosažení počtu  $500 \times 10^6$  PMS. Kenney et al. dokázal, že pro úspěšné zabřeznutí stačí dávka o počtu  $100 \times 10^6$  PMS. Práce, které ve stejném období zkoušely dávky o  $50 \times 10^6$  PMS už úspěšné nebyly. Pickett et al. poukazuje na fakt, že za horších podmínek, použití podřadnějšího ředidla, či špatného managementu okolo koní, je lepší se držet dogmatu  $500 \times 10^6$  (Brinsko, 2006).

Nejvíce využívaným transportním kontejnerem se stal Equitainer, který je schopen udržet teplotu  $5^\circ\text{C}$  po dobu 48 h. Existují další alternativy v podobě Expecta-foal, Salsbro Boxu, Sarstedt či Celle-container (Katila, 1997). Pro chlazené semeno přepravované v Equitaineru, byla stanovena koncentrace v dávce na  $1 \times 10^9$  PMS. Číslo vychází z předpokladu Picketta a Vosse, že při transportu hyne 50 % spermií. Pochopitelně počítali s výchozí koncentrací  $500 \times 10^6$ . Od té doby se leccos zlepšilo, počty však zůstaly stále stejné. Dnešním standardem pro semeno skladované déle než 12 h, je ředění semene obsahující  $1 \times 10^9$  PMS v poměru 1:3 glukózo-mléčným ředidlem s přidavkem antibiotik tak, aby výsledná koncentrace spermií uchovávaném při teplotě  $4-6^\circ\text{C}$  dosáhla  $25-50 \times 10^6/\text{ml}$  (Brinsko, 2006). Nejlepších výsledků je ovšem dosaženo, pokud není semeno ředěno a inseminováno je bez prodlení. To by ale znamenalo popřít nespornou výhodu umělé inseminace, která umožňuje oplodnit více klisen jedním ejakulátem. Metoda je spíše využívána jako poslední záchrana (Morel, 2008).

#### **3.6.4 Postup výroby mražené inseminační dávky**

Výhody mraženého semene spočívají v dlouhodobém uchování genetického materiálu, zajištění a dalšího využití hřebce při nečekaném úhynu, nachází se vždy po ruce a je snadno celosvětově transportovatelné. Bohužel spermie některých hřebců jsou prakticky nemrazitelné (Dascanio, 2014). Fertilita mraženého semene se pohybuje mezi 32-73 % na cyklus a 56-89 % na sezónu. Je ovlivněna faktory, jako jsou kvalita semene, výběr hřebce, dávka, klisna a její management (Loomis, 2001).



Proces je zpočátku stejný jako u chlazeného semene. Semeno je odebráno a vyšetřeno, poté je ředěno v predehřátém mléčném ředidle na 37°C. Podle odhadované koncentrace spermií se přidává speciální roztok určený na centrifugaci (AndroColl™, EquiPure™). Ten je aplikován do kónické centrifugační trubice, na něj je umístěno naředěné semeno a to je znovu zalito EquiPure™. Trubičky se umísťují proti sobě, aby byla centrifuga vyvážená. Centrifugujeme na nejvyšší otáčky, potom pomalu ubíráme, například u semene s parametry celkové motility vyšší než 50% pokračujeme při rychlosti 300×g po 20 minut. Dosaženo je koncentrace 200-400×10<sup>6</sup>/ml (Dascanio, 2014). Nejlepší kvality spermií a integrity je dosaženo při centrifugaci při 600×g po dobu 10 minut (Ramires Neto, 2013). Po centrifugaci je aspirací odstraněn supernatant obsahující převážně semennou plasmu. Zhruba 5 %, ale nadále zůstává a plní ochranou funkci (McKinnon, 2011). Odstranit semennou plasmu můžeme také pomocí filtrace. Kdy je semeno standardně naředěno v poměru 1:1 a nanese na hydrofilní membránu filtru. Filtr je připevněn na plastový rám. Filtrem proteče 90-95 % semenné plasmy, spermie jsou zachyceny. Posléze jsou zachycené spermie doplněny o kryoředidlo ve vhodném poměru. Při použití filtru byl počet vzpamatovaných spermií po manipulaci vyšší než po centrifugaci – 89% vs. 81% (Ramires Neto, 2013). Semeno je ředěno kryoředidlem a plněno automaticky nebo manuálně do 0.5 ml pejet popsaných jménem hřebce, použitým ředidle a datu plnění. Pejety jsou utěsněny tmelem nebo jilem používaným při stanovení hematokrytu. Umístěny jsou na ocelový stojánek a pomocí tekutého dusíku mrazeny v polystyrenovém boxu. Nejdříve jsou asi 10 minut ponechány 3 cm nad dusíkem. Jakmile teplota dosáhne -120°C, jsou pejety se spermiemi zasunuty do polyethylenových pohárků a mohou být ponořeny do nádoby tekutého dusíku (Dascanio, 2014).

### **3.6.5 Kryokonzervací indukovaná poškození**

Přidání i odstranění kryoprotektantu v molárních množstvích působí výrazný přechodný osmotický stres na plasmatickou membránu spermie v závislosti na relativní permeabilitě kryoprotektiva. Používanými kryoprotektivy u savců jsou glycerol, výjimečně dimethyl sulfoxid. Ty navozují osmotický stress. Spermie jsou velmi citlivé na některá kryoprotektiva, která jsou pro ně výrazně cytotoxická, ač se běžně pro jiné buňky úspěšně používají. Stres působený tvorbou ledových krystalků je převážně spojován s doprovodnými osmotickými tlakovými změnami v nezmrzlé frakci. Ve fázi, kdy je roztok zchlazen pod bod mrazu ledové krystaly nukleují a voda krystalizuje ven jako led. Rozpuštěné látky jsou rozpouštěny ve zbytku frakce kapalné vody a osmotická síla roztoku stoupá. Množství vykrystalizované vody a osmotický tlak zbylého roztoku je závislý na teplotě. Čím nižší teplota, tím méně je nezmrzlé

frakce a tím silnější jsou osmotické síly roztoku. Je všeobecně známo, že doba vystavení takovýmto změnám má být minimalizována a zchlazování má probíhat svižně, pro optimální množství přeživších buněk. Avšak, zchlazování musí probíhat tak pomalu, aby bylo vodě osmózou umožněno vystoupit z buněk a předcházet intracelulární formaci krystalů, která je pro buňky letální. Pokud je známa buněčná permeabilita pro vodu a aktivační energie, mělo by být možné předvídat maximální rychlost zchlazování, která je slučitelná s osmotickou rovnováhou a stanovuje tak optimální kryokonzervační protokoly.

Skutečností je, že jednotlivci jsou klasifikováni jako dobře nebo špatně mrazitelní, což napovídá tomu, že struktura membrány je geneticky determinována a predisponuje k schopnosti přežít pod kryopreservačním stresem (Watson, 2000). Mnoho škodlivých efektů vyvolaných kryokonzervací může být přičteno osmotickému stresu. Výsledkem působení osmotického stresu je porušení membrány, DNA a produkce reaktivních částic kyslíku, které způsobují předčasnou, kapacitaci podobné změny (Gibb, 2016). Pokusy modifikovat složení lipidů nepřinesly žádné výrazné benefity, pravděpodobně zahrnutí dalších prvků membrány se jeví jako důležitější (Watson, 2000).

Významným průlomovým objevem bylo zjištění, že zchlazené a znovuohřáté spermie se chovají, jako kdyby byly kapacitovány. Zchlazené spermie vykazují zvýšený volný intracelulární  $Ca^{2+}$ , což je typické pro kapacitované spermie. Tyrozinová fosforilace se, ale u ohřátých spermií liší. Zhoršení motility je dalším pozorovatelnou charakteristikou kryokonzervovaných spermií. Menšina vykazuje intenzivní posun a naopak většina intenzivní stupeň poškození. Dalším druhem je oxidativní poškození funkce spermie. Jde o obtížně řešitelné téma, protože určitý stupeň superoxidových radikálů pozorujeme při akcích, které předcházejí oplození (Watson, 2000). Výzkumy prokázaly, že proces kryokonzervace a rozmrazování u spermií snižuje akrozomální celistvost, životaschopnost a pohyblivost, a to u všech zkoumaných druhů včetně koně. Existují důkazy, že kryokonzervace porušuje ty úseky DNA, které obsahují geny odpovědné za úspěšné oplození a normální embryonální vývoj (Gibb, 2016).

### **3.6.6 Konzervace epididymálních spermií**

Při neočekávaném úhynu hřebce je pro majitele ztracen hodnotný genetický materiál. Pokud nebyly od hřebce zmrazeny inseminační dávky, je možnost odebrat varlata a izolovat spermie z ocasu nadvarlete a chámovodu. Toto lze provést i po eutanázii, ale pokud majitel ví, že hřelec bude utracen, je lepší odběr provést ještě před eutanázií. Spermie negativně ovlivňují látky v injekci použité.

Při odběru varlat by měla co největší část chámovodu zůstat s varlaty spojena. Zvýšená opatrnost při odběru je na místě, každé zbytečné poškození tubulární tkáně způsobuje prosakování a ztrátu spermií. Konec chámovodu je vhodné zašít. Pro odstranění krve a nežádoucích tkání, je odebraný materiál omyt v teplém (37°C) a sterilním Ringerově roztoku s laktátem. Tkáně jsou umístěny do sterilního plastového sáčku, například porodnické rukavice. Tkáně nesmějí během přepravy vyschnout, k tomu účelu je do sáčku aplikováno 5 ml Ringerova roztoku s laktátem. Sáček je vhodné vakuovat. Balíček se obvykle balí do běžného kontejneru používaného pro přepravu chlazeného semene. Čím dříve varlata dorazí do laboratoře ke zpracování, tím více životaschopných spermií je možné odebrat. Doporučená doba od odběru do zpracování je 12 hodin, určitě ne více než 24 hodin. Množství, které jsme schopni pro kryokonzervaci odebrat, se pohybuje okolo 10-15 miliard spermií. To se rovná 12-20 inseminačním dávkám.

Pohyblivost spermií odebraných z nadvarlete je nižší než ejakulovaných spermií. To je způsobeno nepřítomností semenné plasmy z přídatných pohlavních žláz. Přídavek semenné plasmy hřebce s vynikající plodností, může pomoci zvýšit motilitu a oplozovací schopnost spermií z nadvarlete. Nejlepších výsledků je dosaženo u spermií zpracovaných v intervalu 12-24 hodin po odebrání varlat. Veškeré zpracování se děje při pokojové teplotě, čistém prostředí a za použití sterilních nástrojů. Od těla nadvarlete se oddělí ocas a chámovod. Na každý konec je umístěn hemostat, který zabraňuje odtoku spermií. Hlava a tělo nadvarlete se vyhazuje. Veškerá krev, která by se na vzorcích objevila, se musí odstranit pomocí teplého Ringerova roztoku a přebytečná tekutina je gázou z povrchu odsáta. Vhodnou metodou zpracování a odběru spermií je použití vzduchu a 5 ml teplé semenné plasmy odebrané od hřebce, u něhož známe fertilitu, naplněné do 20 ml stříkačky. Stříkačka je nasazena na upravený konec pipety a vložena do otevřeného konce chámovodu. Jemným tlakem je propláchnut chámovod a nadvarletní ocas. Pokud je třeba, je k evakuaci spermií použito ještě 10-20 ml vzduchu. Rozmrazené epididymální spermie jsou vhodným kandidátem pro použití k intracytoplasmické spermatické injektáži. Epididymální spermie u této metody dosahuje srovnatelných četností zabřeznutí jako při použití mražených ejakulovaných spermií. U hřebců trpících chronickým onemocněním, jejichž spermie jsou potenciálně vystaveny endotoxinům nebo určitým druhům léčiv, očekáváme špatné zotavování životaschopných spermií (Dascanio, 2014).

V pokusu, ve kterém byla zahrnuta varlata šesti hřebců (2-25 let) po volitelné kastraci, a který se zabýval zvolením nejlepší techniky pro zotavení spermií odebraných z okasu nadvarlete, a dále efektu přítomnosti antioxidantů a mrazicích ředidel na motilitu mražených spermií po rozmražení bylo zjištěno, že přídavek antioxidantů nemá na výsledné parametry

vliv. Avšak velký vliv mělo ředidlo k mrazení použité. Celková motilita po rozmrazení byla výrazně vyšší u BotuCrio® ředidla než u Lactose EDTA. Progresivní motilita po rozmrazení vykazovala podobnou tendenci. Výsledky mezi použitím metod proplachování a plavení spermií z nadvarlete se výrazně nelišily (Coutinho da Silva, 2008).

Studie na equinních epididymálních spermiích prokázaly, že buňky dokáží přežít při pokojové teplotě po 24 hodin od kastrace, a mohou být využity v umělé inseminaci čerstvým nebo mraženým semenem, a vyústit v úspěšné zabřeznutí. Bylo prokázáno, že spermie získané z epididymu a naředěné vhodným ředidlem, měly hodnoty progresivní motility podobné spermiím odebraným pomocí umělé vagíny, ačkoli po zmrazení a rozmrazení je fertilita v porovnání s ejakulovanými spermiemi výrazně nižší. V testu kryokonzervace provedené Bruemmerem a kolektivem v roce 2002 nebyl zjištěn rozdíl mezi vzorky, které byly napřed zchlazeny na 5°C a po 24 h skladovány a těmi, které byly okamžitě mrazeny. Pro maximalizaci úspěšného zabřeznutí je nezbytné vlastní inseminaci dobře načasovat tzn. těsně před a po ovulaci. Některé studie dokonce doporučují inseminovat dávkou s nízkým počtem epididymálních spermií za použití hysteroskopie přímo do děložního rohu. Morris v roce 2004 uvedl, že za pomoci hysteroskopie a koncentrace  $200 \times 10^6$  čerstvých spermií dosáhl zabřeznutí ve 45 % případů (Papa, 2008).

## 4 Závěr

Umělá inseminace je v dnešní době neodmyslitelnou součástí chovu a to především sportovních koní. Chovatelům umožňuje celosvětově plně využívat nejlepší hřebce současnosti, a díky mraženému semeni i výborné hřebce minulých dekád, kteří se v produkci sportovních koní osvědčili a jejich geny jsou v rodokmenech více než žádoucí. Dále jsme schopni kryokonzervací udržet genetický materiál málo početných nebo geneticky cenných plemen. Využití chlazených dávek má ekonomické výhody. A to jak pro držitele hřebců, kteří jsou schopni lépe pokrýt poptávku, tzn. z jednoho odběru vyrobit více fertálních dávek, a kontrolovat kvalitu. Tak pro majitele klisen, kteří ušetří na přepravě, sníží riziko zranění a infekce, a ušetří klisnu stresu z cizího prostředí. Výroba inseminační dávky není zdaleka dokonale probádána a stále je, co zlepšovat. Hřebčí spermie jsou oproti býčím mnohem náchylnější na toxické působení nejužívanějšího kryoprotektiva - glycerolu. Při mrazení dochází vlivem intracelulární a extracelulární krystalizace snáze k poškození membrán. Dále jsou spermie citlivé na chladový šok. Výzkum vhodného kryoprotektivního ředidla, které by umožňovalo dosáhnout srovnatelných parametrů mezi mraženým a chlazeným ejakulátem je stále aktuální. Pro dosažení nejlepších výsledků úspěšného zabřeznutí je vhodné používat hotová standardizovaná ředidla. Reprodukce je oborem, kde významnou roli hraje lidský faktor. Jedině výběrem vhodného rodičovského páru, zkušeného inseminačního technika a kvalitního centra, která dávky připraví, lze dosáhnout umělou inseminací srovnatelné i lepší šance zabřezávání klisen.

## 5 Použitá literatura

1. Allen, W. R. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals*. 40 (4). 310-329.
2. Aurich, J. E. 2012. Artificial insemination in horses – more than a century of practise and research. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32 (8). 458-463.
3. Bender, D. A. 2012. Amino acid metabolism. 3. vydání. Wiley. 480 s. ISBN: 9780470661512.
4. Brinsko, S. P. 2006. Insemination doses: How low can we go? *Theriogenology*. 66 (3). 543-550.
5. Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Love, C. C., Schumacher, J., Varner, D. D. 2010. Manual of equine reproduction. 3. vydání. Mosby. 336 s. ISBN: 0323064825.
6. Burdick, D. L., Leffler, W. L. 2010. Petrochemicals in nontechnical language. 4. vydání. PennWell Corporation. 402 str. ISBN: 9781593702168.
7. Canisso, I. F., Souza, F. A., Silva, E. C., Martinez, M., Lima, A. L. 2008. Egg yolk and LDL: Possibilities for artificial insemination in equines. *Revista MVZ Córdoba*. 13 (3). 1514-1521.
8. Coutinho da Silva, M. A., Johnson, A. E. M. 2008. Effects of recovery technique, freezing extender and antioxidants on motility parameters of cryopreserved stallion epididymal sperm. *Theriogenology*. 70 (3). 579-580.
9. Dascanio, J. J., McCue, P. M. 2014. *Equine Reproductive Procedures*. 1st Edition. Wiley. p. 560. ISBN: 9781118813843
10. El-Sharkawy, A. A., Hattab, S. A., Ghanema, I. I., El-Garhy, M. N., Soliman, M. K., El-Badry, D. A. 2016. Effect of different semen extenders on post-thawing activity of arabian stallion spermatozoa. *Alexandria Journal of Veterinary Science*. 51 (2). 178-182.
11. El-Sheshtawy, R. I., El-Badry, D. A., El-Sisy, G. A., El-Nattat, W. S., Abo Almaaty, A. M. 2016. Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5 (4). 331-334.
12. Fraser, M. L., Kidd, J. A., Lu, K. G. 2014. *Atlas of Equine Ultrasonography*. 1. vydání, John Wiley & Sons. 520s. ISBN: 9781118798133.
13. Freitas, M. L., Bouéres, C. S., Pignataro, T. A., de Oliveira, F. J. g., de Oliveira Viu, M. A., de Oliveira, R. A. 2016. Quality of fresh, cooled, and frozen semen from stallions

- supplemented with antioxidants and fatty acids. *Journal of Equine Veterinary Science*. 46. 1-6.
14. Gibb, Z., Aitken, R. J. 2016. Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*. 43 (Supplement). S29-S36.
  15. Guimarães, T., Lopes, G., Pinto, M., Silva, E., Miranda, C., Correia, M. J., Damásio, L., Thompson, G., Rocha, A. 2015. Colloid centrifugation on fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affection seminal kinetics. *Theriogenology*. 83 (2). 186-191.
  16. Katila, T. 1997. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*. 48 (7). 1217-1227.
  17. Khlifiaoui, M., Battut, I., Bruyas, J. F., Chatagnon, G., Trimeche, A., Tainturier, D. 2005. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*. 63 (1). 138-149.
  18. Le Frapper, L., Walston, L., Whisnant, C. S. 2010. Comparison of various extenders for cooled stallion spermatozoa for 72 hours. *Journal of Equine Veterinary Science*. 30 (4). 200-204.
  19. Loomis, P. R. 2001. The equine frozen industry. *Animal Reproduction Science*. 68 (3-4). 191-200.
  20. Loomis, P. R., Squires, E. L. 2005. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*. 64 (3). 480-491.
  21. Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda. Praha. 328 s. ISBN: 978-80-213-2188-5.
  22. McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. 2011. *Equine Reproduction*. 2. vydání. John Wiley & Sons. 3288 s. ISBN: 9780470961872.
  23. Moore, A. I., Squires, E. L., Bruemmer, J. E., Graham, J. K. 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 26 (5). 215-218.
  24. Moraes, E. A., Matos, W. C. G., Graham, J. K., Ferrari Jr., W. D. 2015. Cholesterol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 158. 19-24.
  25. Morel, M. C. G. D. 2008. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 2nd Edition. CABI Publishing. United Kingdom. p. 372. ISBN: 9781780640730.

26. Morillo Rodríguez, A., Ortega Ferrusola, C., Macías García, B., Morrell, J. M., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Peña, F. J. 2011. Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. *Animal Reproduction Science*. 124 (1-2). 78-83.
27. Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E. 2000. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*. 32 (6). 351-355.
28. Pagliaro, M., Rossi, M. 2010. *Future of glycerol*. 2. vydání. Royal Society of Chemistry. 187 s. ISBN: 9781849731089.
29. Papa, F. O., Mêlo, C. M., Fioratti, E. G., Dell'Aqua Jr., J. A., Zahn, F. S., Alvarenga, M. A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. 107 (3-4). 293-301.
30. Pugliesi, G., de Carvalho, G. R., Rates, D. M., Ker, P. G., da Matta, M. P., de Oliveira, R. R., da Silva Filho, J. M. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41 (12). 2411-2417.
31. Ramires Neto, C., Monteiro, G. A., Soares, R. F., Pedrazzi, C., Dell'aqua Jr., J. A., Papa, F. O., Castro-Chaves, M. M., Alvarenga, M. A. 2013. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*. 79 (7). 1120-1123.
32. Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. 2. vydání. Grada Publishing, a. s. 480 s. ISBN: 978-80-247-3282-4.
33. Svaz chovatelů českého teplokrevníka. 2016. Chovný cíl, šlechtitelský program a zkušební řád, řád plemenné knihy [online]. Dostupné z <<http://www.schct.cz/cz/svaz/slechtitelsky-rad.html>>.
34. Samper, J. C. 2009. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2. vydání. Elsevier Health Sciences. 310 s. ISBN: 9781416052340.
35. Vidament, M., Yvon, J. M., Couty, I., Arnaud, G., Nguekam-Feugang, J., Noue, P., Cottron, S., Le Tellier, A., Noel, F., Palmer, E., Magistrini, M. 2001. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Animal Reproduction Science*. 68 (3). 201-218.
36. Vidament, M. 2005. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 89 (1). 115-136.
37. Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61. 481-492.



38. Wu, Z., Zheng, X., Luo, Y., Huo, F., Dong, h., Zhang, G., Yu, W., Tian, F., He, L., Chen, J. 2015. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combination of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*. 163. 75-81.