

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv přídatku semenné plazmy na kvalitu
kryokonzervovaných hřebčích spermií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Chrbolková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

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

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 13.4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za pomoc a vynaložený čas a energii při zpracování této diplomové práce. A také bych ráda poděkovala Ing. Ondřejovi Šimoníkovi a Ing. Filipě Bubeníčkové za konzultace při řešení praktické části diplomové práce.

Vliv přídatku semenné plazmy na kvalitu kryokonzervovaných hřebčích spermií

Souhrn

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že přídatek semenné plazmy zlepší kvalitu rozmražených hřebčích spermií.

Odebraný ejakulát byl zředěn laktózo-EDTA-žloutkovým ředidlem. Konečná koncentrace spermií byla 350×10^6 progresivně pohyblivých spermií v inseminační dávce ($n = 41$). Následně byly inseminační dávky (ID) plněny do 5 ml aluminiových tub, ve kterých byly zmrazeny v tekutém dusíku. Po rozmražení ($37\text{ °C}/30\text{-}60\text{ s}$) byly rozděleny do třech alikvot. Jedna alikvota zůstala jako kontrolní a obsahovala pouze naředěné spermie fyziologickým roztokem. K semenné alikvotě byla přidána semenná plazma (průměrně mrazitelný hřebec) (33,3 % v/v.). K supersemenné alikvotě se vložila také semenná plazma (velmi dobře mrazitelného hřebce) (33,3 % v/v.). Alikvoty pocházely od špatně mrazitelných hřebců. U všech experimentálních skupin byla hodnocena motilita pomocí systému CASA, integrita plazmatické membrány (HOS test) a viabilita (eosin/nigrosin) a to v čase T0 – čas po 5 minutách (rozplavání spermií) a v čase T30 (30 minut/ 37 °C).

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl po přidání semenné i supersemenné plazmy na motilitu spermií po 30 minutách inkubace. Většina kinematických parametrů, kromě VCL, se signifikantně zvýšila, po přidání semenné a supersemenné plazmy. Na subpopulaci spermií mělo významný vliv přidání semenné a supersemenné plazmy jelikož došlo k procentuálnímu zvýšení rychlých spermií, oproti kontrole po 30 minutách inkubace ($p < 0,05$). Byl prokázán statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) ovlivňující integritu plazmatické membrány, která se po přidání semenné plazmy, signifikantně snížila. Přidání supersemenné plazmy se neprojevilo na procentuálním zastoupení spermií s neporušenou membránovou integritou. Na viabilitu rozmražených hřebčích spermií se vliv semenné a supersemenné plazmy neprojevilo.

Z této práce je patrný vliv semenné a supersemenné plazmy na rozmražené spermie špatně mrazitelného hřebce. Po přidání semenné plazmy, ať už od průměrně nebo velmi dobře mrazitelných hřebců, k rozmraženým spermiím, došlo k změně distribuce subpopulací, ve prospěch procentuálního zastoupení spermií v rychlé subpopulaci, a proto lze přídatek semenné plazmy doporučit.

Klíčová slova: hřebec, spermie, kryokonzervace, vliv, semenná plazma

Influence of seminal plasma addition on quality of cryopreserved stallion's sperms

Summary

The aim of this study was to verify the hypothesis that an addition of seminal plasma improves the quality of post-thawed stallion sperm.

Collected ejaculates were diluted with lactose-EDTA-egg yolk extender. Final sperm concentration was 350×10^6 progressively motile sperm per insemination dose ($n = 41$). Then the insemination dose (ID) were loaded into 5 ml aluminum tubes and frozen in liquid nitrogen. The ID were divided into three aliquots after thawing ($37^\circ\text{C} / 30\text{-}60\text{ s}$). One aliquot remained as a control and contained only diluted sperm with physiological solution. We added seminal plasma (average stallion freezing) to the seminal aliquot ($33^\circ\text{C} / v/v$). We added superseminal plasma (very good for freezing stallion) to the superseminal aliquot ($33^\circ\text{C} / v/v$). The aliquots were from poor freezer stallions. For all experimental groups were evaluated for the sperm motility (CASA), membrane integrity (HOS test) and viability (eosin/nigrosin) at time T0 – 5 minutes after thawing, and T30 (30 minutes/ 37°C).

There was not statistically significant difference between casual specimens and those after addition of seminal and superseminal plasma on motility after 30 minutes incubation. Most kinematic parameters, except for VCL, significant increased after addition of seminal and superseminal plasma. The addition of seminal and superseminal plasma had a significant effect on sperm subpopulation, because the percentage of fast sperm counts increased compared to the controls, after 30 minutes incubation ($p < 0,05$). A statistically significant difference was found in the integrity of the plasma membrane that significantly decreased after the addition of the seminal plasma ($p < 0,05$). The addition of superseminal plasma, the percentage of sperm with inactive membrane integrity did not appear. The viability, after addition of seminal and superseminal plasma, to post-thawed stallions sperms, was not affected by the addition of seminal or superseminal plasma.

This work shows the influence of seminal and superseminal plasma on post-thawed sperm of poor-for-freezing stallions. After the addition of seminal plasma, no matter if from an average or very well-freezing type of stallions to thawed sperm, the distribution of subpopulations has changed, favoring the percentage of sperm in fast subpopulation, and therefore the addition of seed plasma may be recommended.

Keywords: stallion, sperm, cryopreservation, influence, seminal plasma

Obsah

1 Úvod.....	2
2 Cíl práce.....	3
3 Literární rešerše	4
3.1 Spermatogeneze	4
3.1.1 Pohlavní soustava hřebce	4
3.1.2 Hormonální řízení spermatogeneze	4
3.1.3 Spermatogeneze	5
3.1.4 Morfologie a stavba spermie	6
3.2 Ejakulát hřebce.....	6
3.2.1 Semenná plazma	7
3.2.1.1 SP proteiny	7
3.2.1.2 Enzymy semenné plazmy	7
3.3 Odběr spermatu	8
3.4 Hodnocení ejakulátu	8
3.4.1 Makroskopické vlastnosti ejakulátu	9
3.4.2 Mikroskopické vlastnosti ejakulátu	9
3.4.3 Standardní hodnocení ejakulátu.....	11
3.4.4 Speciální hodnocení – hypoosmotický test	12
3.4.5 Nadstandardní hodnocení ejakulátu	13
3.5 Zpracování semene	13
3.6 Kryokonzervace hřebčího spermatu	14
3.6.1.1 Balení vzorků	15
3.6.1.2 Proces mražení.....	15
3.7 Možnosti zlepšení kvality spermií po rozmražení	16
3.8 Přídavek semenné plazmy před zmražením	17
3.9 Přídavek semenné plazmy po rozmražení	18
4 Materiál a metodika.....	21
4.1 Roztoky	21
4.1.1 Fyziologický roztok.....	21
4.1.2 Semenná plazma	21
4.2 Odběr, kryokonzervace a rozmražení inseminačních dávek	21
4.3 Design experimentu	22
4.4 Statistická analýza	22
4.5 Hodnocení.....	23

4.5.1	Hypoosmotický test	24
4.5.2	Viabilita	24
5	Výsledky	25
6	Diskuze	31
7	Závěr	35
8	Literatura.....	36

1 Úvod

Inseminace koní kryokonzervovaným spermatem je k dnešnímu dni jeden z nejběžnějších způsobů reprodukce mnoha plemen koní, s výjimkou anglického plnokrevníka a arabského plnokrevníka.

Oblíbenost této metody pramení z jejích výhod, mezi které patří zamezení šíření pohlavních nákaz, omezení nutnosti přepravy hřebců nebo klisen, genové rezervy, více inseminačních dávek z jednoho odběru a v neposlední řadě uskladnění dávek na neomezenou dobu. Tento způsob uskladnění spermatu má i mnoho nevýhod a úskalí. Především proces mražení a rozmrazování může negativně ovlivnit integritu akrozomu, viabilitu a motilitu. V průběhu let se ukazuje, že i přes stále lepší techniky mražení se vyskytují hřebci, u kterých je kryokonzervace nevhodná. V mnoha pracích se ukazuje, že špatné mrazení ejakulátu některých hřebců ovlivňuje složení semenné plazmy.

Semenná plazma tvoří převážnou část ejakulátu hřebce a její hlavní úlohou je poskytnout živiny a energii pro spermie a tím zabezpečit přežitelnou a schopnost transportu v samičím pohlavním traktu. Kvalita semenné plazmy závisí na individualitě jedince, pokud je nízká, schopnost ejakulátu projít kryokonzervací není dobrá. A proto v dnešní době zjišťujeme, z čeho se semenná plazma skládá a jaké účinky mají jednotlivé složky na spermie.

Vzhledem na již prokázaný negativní účinek semenné plazmy na kryokonzervaci hřebčích spermií se v současnosti ejakulát, před mražením, centrifuguje a plazma jako taková se přidává až po následném rozmražení.

Otázkou zůstává, zda zpětným přidáním semenné plazmy po kryokonzervaci lze zlepšit kvalitu ejakulátu a tím zvýšit jeho životaschopnost.

Z těchto informací můžeme vyvodit, že je vždy potřeba zjišťovat příčiny neúspěchů v mražení a zlepšovat kvalitu ejakulátu po rozmražení a v této práci jsme se zaměřili na přidávání semenné plazmy ke spermiím a zjišťování vlivů, které na spermie bude mít.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo ověřit hypotézu, zda přídavek semenné plazmy zlepší kvalitu spermií po rozmrazení.

Následně se výsledky zpracovaly a vyhodnotily pomocí statistických metod.

3 Literární rešerše

3.1 Spermatogeneze

3.1.1 Pohlavní soustava hřebce

Hřebčí pohlavní soustava se skládá z varlat, nadvarlat, chámovodu, přídatných pohlavních žláz a z penisu.

Varlata jsou uložena v šourku. Jedná se o kožní vak, který je u hřebce umístěn mezi stehny. Varle pokrývá *tunica albuginea* neboli vazivový obal. Obal varlete zasahuje až do parenchymu a vytváří lalůčky. V každém lalůčku se nachází semenotvorné kanálky, které jsou vystlány zárodečným epitelem. Zde se vyvíjí spermie. Tyto kanálky se spojují do společného přímého kanálku. Ten je počátkem vývodných cest varlete.

Varlata obvykle sestupují do šourku posledních 30 dnů březosti nebo prvních 10 dnů po narození. Jsou uložena horizontálně k tělu. Tvoří se zde samčí pohlavní hormon testosteron. Nadvarle se skládá z hlavy, těla a ocasu (Samper, 2009).

Nadvarle je místem, kde spermie dozrávají (Kittnar a kol., 2015).

Přídatné pohlavní žlázy hřebce jsou bulbouretrální, tělo prostaty a měchýřkovitá. Žláza bulbouretrální má u koně kulovitý tvar, hladký povrch a má několik vývodů. Úkolem výměšků této žlázy je neutralizovat kyselost močové roury samce. Prostata hřebce, na rozdíl od býka, má tělo rozdělné na dva laloky a roztroušená část chybí. Produkuje látky s typickým zápachem a také poskytují spermii vhodné pH prostředí, které napomáhá přežitelnosti spermií v pohlavním ústrojí samice. Měchýřkovitá žláza má tvar váčku s hladkým povrchem a zřasenou sliznicí. Sekrety této žlázy zvyšují pohyblivost spermií a zajišťují jejich výživu (Marvan, 2011).

3.1.2 Hormonální řízení spermatogeneze

Normální spermatogeneze závisí na správné funkci epifýzy, neboli šišinky, na hypotalamo-hypofyzární ose a na opioidech vylučovaných z mozku. Melatonin je hormon epifýzy a ovlivňuje negativní zpětnou vazbou gonadotropní releasing hormon (GnRH), který se nachází v hypotalamu. U hřebce a jiných sezónních druhů bylo prokázáno, že vliv na uvolňování GnRH mají opioidy uvolňované z mozku. Ty cestují do hypotalamu a v zimních měsících způsobí pokles tohoto hormonu. Hypotalamo-hypofyzární osa, jejímž hlavním hormonem je GnRH, zajišťuje uvolňování hormonů hypofýzy do krevního oběhu a tím ovlivňuje činnost varlat. Zpětnou vazbou, na činnost hypotalamu a hypofýzy, je sekrece

testikulárních hormonů. Z předního laloku hypofýzy, nazývaného také adenohipofýza, jsou uvolňovány luteinizační (LH) a folikulostimulační (FSH) hormony. LH hormon stimuluje Leydigovy buňky, které na podnět odpovídají sekrecí testosteronu a estrogenů. Jedná se o negativní zpětnou vazbu. FSH hormon působí na růst a zrání spermií. Jedná se o hlavní regulátor Sertoliho buněk, jejichž sekrety jsou estrogeny, aktivin a ještě inhibin, který snižuje sekreci FSH na úrovni hypofýzy. V hypotalamu se nachází také hormon dopamin, který ovlivňuje sekreci prolaktinu (PRL) a také sekreci hormonu štítné žlázy (TSH). PRL a TSH jsou hormony s nejasnou funkcí na činnost varlat hřebce (Samper, 2009).

3.1.3 Spermatogeneze

Skládá se ze tří vývojových částí. První je spermatocytogeneze. Zde dochází k mitotickému dělení spermatogonií. Nejprve se spermatogonie typu AI mitoticky rozdělí na dceřiné buňky. Jejich úlohou je dokončit spermatogenezi a dát základ novým kmenovým buňkám. Spermatogonie typu AI se v pravidelných intervalech mitoticky dělí. Nejprve na primární spermatocyty. Druhá část spermatogeneze je meióza, kdy se z primárního spermatocytu stává sekundární spermatocyt, který je podroben morfologické diferenciaci. Vznikne spermatida, které má charakteristický prodloužený tvar s kondenzovaným jádrem. Buňky postupují od bazální membrány směrem do vývodných semenných cest. Třetí částí je spermiogeneze. Ve spermiogenezi probíhá zrání a diferenciace spermatid ve spermie. (Samper, 2009). Spermie jsou odvodnými kanálky přepraveny do nadvarlete. Zde dozrávají (Kittnar a kol., 2015).

Spermie se produkují v zárodečném epitelu semenných kanálků varlete. Zárodečný epitel se skládá ze Sertoliho buněk a různých typů zárodečných buněk. Mezi semennými kanálky v intersticiální tkáni se nachází Leydigovy buňky, které tvoří testosteron.

Ten je společně s hormony a krví odváděn do semenných tubulů. Doba potřebná k produkci spermií trvá u hřebců zhruba 55 dní (Amann, 1981).

Marvan et al. (2011) doplňuje, že období, které můžeme nazývat, jako pohlavního dospívání samce začíná spermatogenezí. V kanálcích se objevují první volné spermie, ale ne všechny dokončí svůj vývoj a některé se zastaví už ve stádiu I. nebo II. řádu spermatocytů anebo spermatid. Po dosažení pohlavní dospělosti se u samce spermatogenní cykly opakují v podstatě po celý život. Samozřejmě se musí přihlížet i na negativní vlivy, které celý proces ovlivňují.

3.1.4 Morfologie a stavba spermie

Spermie hřebce se skládají z hlavičky, krčku a bičíku. Hlavička spermie je zploštělá buňka lopatkovitého tvaru. Je asi 6-7 μm dlouhá. Obsahuje jádro, překrývá ho akrosom. Lze ji rozdělit na několik částí. První se říká akrosomální, další jsou pak postakrosomální čepička a jádro. Jádro, uložené v hlavičce, obsahuje chromozomy, které jsou složené z chromatinu. Chromatin je komplexem DNA a některých proteinů. Jádro má jaderný obal, který je složený z lipidové dvojvrstvy, odděluje obsah jádra od okolní cytoplasmy. Zralé spermie obsahují velké množství aktivních molekul. Zahrnují hydrolytické enzymy, jako jsou hyaluronidáza a proteolytické enzymy, které jsou důležité pro přilnavost a průnik zónou pellucidou. V cytoplasmě v hlavičce se nachází cytoskeletální proteiny, které jsou důležité pro funkci spermií. Střední části se říká krček. Je dlouhý 10 μm . Spojuje hlavičku a bičík. Ve spojovací části hlavičky a krčku jsou segmentované chordy a proximální a distální centriola. Dále je zde velké množství mitochondrií, které slouží jako zdroj energie pro spermie (Jasko, 1992).

Bičík lze dělit na části spojovací, hlavní a koncovou. Je dlouhý 44-45 μm . Obaluje ho plazmatická membrána, která dává spermii různé funkce. Patří mezi ně přilnavost spermie k vajíčku, akrosomová reakce, získání aktivní pohyblivosti. Základní strukturou, která se v bičíku nachází, je axonema. Je to svazek jedenácti mikrotubulů, kdy se okolo centrálního páru nachází devět mikrotubulů. Mezi mikrotubuly jsou rozmístěné můstky. Nachází se zde také dvě centrioly, jedna je distální a jedna je proximální (Kittnar a kol., 2015).

Celý bičík je pokryt fibrózní pochvou až na koncový oddíl. Na koncové části je už jen cytoplazmatická membrána (Jelínek, 2003).

Průměrná délka koňských spermií je 61-86 μm (Jasko, 1992).

3.2 Ejakulát hřebce

Ejakulát je bělavá a viskózní tekutina. Skládá se ze dvou částí. První je tekutá, která zahrnuje semennou plazmu a druhá je buněčná zahrnující spermie. Spermie se tvoří ve varleti a semenná plazma v přídatných pohlavních žlázách (Louda a kol., 2001).

Komárek et al. (1964) uvádí, že největší podíl ejakulátu tvoří voda. Dále jsou zde především draslík, sodík, chlór, vápník, síra a mnoho dalších, jako zástupci anorganických látek. Z látek organických se jedná o bílkoviny, cukry a tuky.

Ejakulát a jeho složení je důležité po vytvoření přirozeného prostředí pro spermie. Zajišťuje jim ochranu před negativními vlivy, poskytuje jim výživu a umožňuje pohyb (Marvan a kol., 2011).

Dušek a kol. (2011) doplňují, že kvalita oplozovací schopnosti spermatu, závisí nejen na individualitě jedince, ale také na mnoha vnějších faktorech, mezi které patří například strava nebo kvalita zpracování inseminační dávky – tedy lidský faktor.

3.2.1 Semenná plazma

Semenná plazma je směs sekretů produkovaných ve varlatech, nadvarleti a přídatných pohlavních žlázách. Přídatné pohlavní žlázy hřebce jsou bulbouretrální, předstojná, měchýřkovitá a ampule chámovodu. Měchýřkovitá žláza produkuje gelovou frakci ejakulátu. Semenná plazma je ejakulovaná v několika po sobě následujících frakcích. Účinky a složení semenné plazmy se liší individuálně. Bulbouretrální tekutina se uvolňuje v takzvané prespermiové frakci a tvoří její převážnou část (Samper, 2009).

Poté během spermiové frakce, která je bohatá na spermie, se vyplavuje tekutina z ampule a spermie z epididimu. Na závěr, v postspermiové části, se uvolňuje frakce ze semenných váčků (Kereskoski and Katila, 2008).

3.2.1.1 SP proteiny

Proteiny semenné plazmy byly intenzivně zkoumány, ale stále je o nich víme velmi málo. Bílkoviny nesou dva nebo čtyři moduly fibronektinu typu II. Sekreční proteiny, které jsou bohaté na cystein (CRISP) a spermadhesiny tvoří hlavní skupiny koňských proteinů semenné plazmy. Hlavními proteiny hřebčí semenné plazmy jsou HSP-1 a HSP-2. Tvoří 70-80 % celkových proteinů. V prespermiové frakci, je bílkovin nejméně. Nejvíce je jich v spermiové frakci. HSP-1, HSP-2 a HSP-4 byly prokázány ve všech třech frakcích hřebčího ejakulátu. Dále je zde protein HSP-7. Je homologní k prasečímu AWN. U koní se syntetizuje AWN proteinový homolog ve varlatech, epididimu a v semenných váčcích (Kereskoski and Katila, 2008).

3.2.1.2 Enzymy semenné plazmy

Nachází se zde laktát dehydrogenasa (LDH). Dále jsou zde ACT, AP, aspartátaminotrasferáza (AST) a glutamyltrasferáza (GGT). U mužů se váží na povrch hlaviček spermií glykosidasy, jako je například N-acetyl-d-glukoaminidáza (NAG). U hřebců byly identifikovány dvě formy glykosidas. Jsou v epididimální tekutině a v SP (Kereskoski and Katila, 2008).

3.3 Odběr spermatu

Účinná metoda odběru semene, s co možná nejlepším možným výsledkem, je nezbytná pro umělou inseminaci (AI) a kryokonzervaci (Torres, 2007).

Pokud dojde k chybě při odběru, může to znamenat snížení oplozovací schopnosti spermií a jejich kvality. Místo odběru podléhá určitým kritériím, jako je čistota, prostornost, neklouzavá podlaha, minimalizace zvuků z okolí nebo zajištění bezpečnost lidí i zvířat. Velikost haly se pohybuje od 20-30 m² podle toho zda se jedná o zkušeného koně nebo ne. Mladý kůň potřebuje více prostoru. U hřebců s nízkým libidem se do odběrové místnosti přivede říjná kobyla, aby se jeho pohlavní aktivita zvýšila. Odběr venku je také možný. Má však nevýhodu nestálé okolní teploty, při níž se může snižovat teplota uvnitř umělé vagíny (AV), a také bývá problémem prašná zem, kterou musíme pravidelně vlhčit, aby nedocházelo k víření nečistot a tím k znečištění penisu, který se před odběrem omývá. Nejlepším odběrovým místem venku je travnatá a prostorná plocha. Jsou čtyři způsoby odebírání hřebce – kondom, AV, masturbace a farmakologicky indukovaná ovulace (Samper, 2009). Nejlépe se odebírá do AV (Jasko, 1992).

Vnitřní teplota AV se pohybuje okolo 44 – 48 °C. Dále je upravován tlak uvnitř AV. Vnitřní část musí být kluzká, proto se využívá lubrikační gel bez obsahu bakteriostatických nebo spermicidních sloučenin. Při odběru by AV měla být držena paralelně, směrem ventrálně od břicha. Odebrané semeno se odnáší do laboratoře ke zpracování. Je důležité, aby vzdálenost od odběrové místnosti do laboratoře byla co nejmenší a minimalizovalo se tak znehodnocení semene (Samper, 2009).

Následné zpracování musí být natolik šetrné, aby se co nejvíce zamezilo poškození spermií. Při manipulaci se semenem si musíme dát pozor na náhlé výkyvy teplot anebo na nadměrnou expozici na slunečním světle a kyslíku. Další důležitý faktor, který ovlivňuje přežitelnou spermií při jejich zpracování je zachování všech zařízení i ředidel při stálé teplotě. Samotné hodnocení by mělo být systematické a rychlé (Jasko, 1992).

3.4 Hodnocení ejakulátu

Hodnocení spermatu lze dělit na základní vyšetření, které zahrnuje makroskopické a mikroskopické hodnocení a na speciální vyšetření - biologické zkoušky, které se zabývají testy přežitelnosti spermií. Makroskopické zahrnuje vyšetření objemu, barvy, pH a jiné. Mikroskopické hodnocení je zaměřené na motilitu, koncentraci a viabilitu (Louda a kol., 2001).

Mezi standardní hodnocení patří morfologie, viabilita a motilita. Dále máme speciální hodnocení, která zahrnují například hypoosmotický test (HOS) a mezi nadstandardní patří DNA fragmentace nebo akrosomální integrita (Samper, 2009).

3.4.1 Makroskopické vlastnosti ejakulátu

Součástí makroskopického hodnocení ejakulátu je objem, pach, barva, pH a osmolarita. Objem závisí na druhu, plemeni a věku. Faktory ovlivňující tuto vlastnost jsou krmení, kondice zvířete nebo frekvence odběru. Ejakulát hřebce je tvořen z větší části semennou plazmou, která je tvořena výměšky přídatných pohlavních žláz. Jedná se o 95-98 % ejakulátu. Průměrným objemem ejakulátu u hřebce je asi 70 ml a celkovým množstvím spermií průměrně okolo 10 miliard (Marvan a kol., 2011).

Čerstvé sperma by mělo být vodnaté, neprůhledné a naředěné barvy. Takové sperma je považováno za fyziologické. Jeho konzistence ovlivňuje vzhled. Čím více je sperma koncentrované, tím více je naředěné (Samper, 2009).

Pokud je sperma s příměsí červené nebo žluté barvy, značí to kontaminaci krví nebo močí. Dále může být s příměsí hnědé barvy a v takovém případě se jedná o znečištění starou krví nebo jinými výměšky. Pach je neutrální (Jasko, 1992).

Normální pH u nativního ejakulátu koně se pohybuje od 7,2 do 7,7. Pokud se jedná o normálního hřebce, bez obtíží, může být pH semene ovlivněno sezónou, frekvencí odběrů anebo koncentrací spermií. Osmolarita se liší u jednotlivých hřebců individuálně. U hřebce se pohybuje mezi 331-336 mOsm. Pokud se významně změní pH nebo osmolarita, může to mít dopad na snížení motility spermií a tím teoreticky i snížení plodnosti (McCue, 2014).

3.4.2 Mikroskopické vlastnosti ejakulátu

Koncentraci spermií v ejakulátu lze stanovit pomocí spektrofotometru nebo hemacytometrickou metodou. Pohybuje se od 25 milionů do 50 milionů spermií na mililitr. Dále se objem spermatu bez gelové frakce vynásobí koncentrací spermií. Tím se zjistí celkový počet spermií v ejakulátu (Jasko, 1992).

Hodnocení motility spermií je možné subjektivně, pomocí mikroskopu, nebo objektivně pomocí počítačem řízené analýzy spermatu – CASA. Cílem odhadu motility spermií je určit procento progresivně se pohybujících spermií. Procento pohyblivých spermií je ovlivněno vyšší koncentrací i pH ejakulátu a ředidla (Jasko, 1992).

3.4.2.1.1 Subjektivní hodnocení motility spermií

Vizuální odhad pohyblivosti spermií je levnější variantou oproti hodnocení objektivní metodou. Je to přesná metoda, ale musí ji provádět zkušený technik, který bude mít příslušná školení a bude dodržovat standardní postup. Hodnocení pohyblivosti spermií pomocí mikroskopu je vyjádřena v procentech jako oscilační, to znamená ty, které jsou naživu, ale pohybují se v kruhu, nebo progresivní. Progresivně pohyblivá spermie je ta, která má aktivní pohyb vpřed. Takový pohyb je správný. Pokud se spermie pohybuje do kruhu, jedná se o chybnou motilitu. Při vyhodnocení spermatu normálně plodného hřebce by měla být okamžitá progresivní motilita ≥ 60 %. Na čistém vyhřátém sklíčku se kápne asi 2-5 μm velká kapka ředěného nebo neředěného spermatu a následně se přiklopí krycím sklíčkem, které je také vyhřáté. Je lepší pokud se sperma před hodnocením naředí, protože čisté sperma podléhá často aglutinaci a tím se zhorší pohyblivost spermií. Následně se vloží pod fázový mikroskop při zvětšení 150-200 x 4. Hodnocení motility musí proběhnout během několika málo minut, protože spermie suspendované v semenné plazmě jsou náchylné na zhoršování motility, jelikož semenná plazma neposkytuje vhodné médium pro pohyb spermií. Také je důležité začít hodnotit od středu sklíčka, jelikož pokrajích rychleji klesá pohyblivost (Samper, 2009).

Jasko (1992) dodává, že počet progresivně motilních spermií v ejakulátu se používá jako kritérium při hodnocení potenciální plodnosti hřebce a pro stanovení optimální inseminační dávky. Toto číslo je odvozeno vynásobením celkového počtu spermií a progresivně motilních spermií.

Pokud je subjektivní vyhodnocení motility použito jen experimentálně, mělo by samotné měření probíhat namátkově a v nejlepším případě zprůměrovat výsledky dvou hodnotitelů. Mimo motilitu by měla být ještě zaznamenána aglutinace, incidence a počet cizích buněk. Aglutinace má několik stupňů – nízký, střední, vysoký a spermie se většinou spojují hlavičkou (Samper, 2009).

3.4.2.1.2 Objektivní hodnocení motility spermií

Subjektivní odhady pohyblivosti spermií nejsou příliš spolehlivé, protože různé pozorovatelé mohou mít různé metody měření. Následně jsou jejich výsledky měření odlišné. Proto byl kladen důraz na vývoj objektivních metod hodnocení motility. Počítačový systém pro analýzu pohybu spermií byl nejnovější a nejvíce spolehlivou metodou, jak určit procento motilních spermií a zároveň zanalyzovat jejich pohyb (Jasko, 1992).

CASA (počítačová analýza spermií) je vhodnou volbou pro ohodnocení motility spermií a jejich parametrů. Lze tuto metodu opakovat a je přesnější nežli metoda s mikroskopem. Podnětem pro rozvoj této analýzy bylo také ohodnocení změn na spermiích, které prošly procesem skladování. Kromě motility a jejich parametrů je analýza vybavená ještě modely pro hodnocení morfologie a koncentrace spermií. S rozvojem pohybu spermií analýzy se vyvíjela i technická stránka zařízení pro objektivní hodnocení. Patří mezi ně například integrované optické hodnocení, video displej a ohřívací destička. Videozáznamy analýzy pohybu spermií jsou snímány ze zorných polí díky mikroskopu. Většinou je 20-30 sérií videozáznamů, které mají 30-60 snímků za sekundu. Po nasnímání analýza zpracuje a oddělí spermie od jiných objektů pomocí algoritmů. Snímky, které analýza zpracuje, mají kinematické parametry. Procento celkově pohyblivých spermií (MOT), progresivní motilitu (PMOT), průměrnou přímočarou rychlost (VSL), průměrnou křivočarou rychlost (VCL), průměrnou rychlost dráhy (VAP), rovnost ($STR = VSL/VAP$), linearita ($LN = VSL/VCL$) a laterální dislokace hlaviček (LHD). Výsledky CASA ovlivňuje typ komůrky, na kterém se snímala motilita a dále množství nečistot a cizích předmětů ve vzorku. Nejčastěji využívanou je Maklerova komůrka, která je vyhřátá na 37 °C. Její hlavní nevýhodou bylo to, že na ní spermie rychle zasychaly. Modernější modely CASA jsou schopné zanalyzovat 400 buněk za 2 minuty a tím se celý proces značně urychlil. Dále je možnost hodnotit spermie na takzvaných Leja komorách, které jsou ihned připravené k použití. Velmi důležitým faktorem pro správné měření je koncentrace, která by měla být mezi 50×10^6 spermií / ml.

Mezi technické vlivy měření patří doba od naplnění komůrky a zahájení měření a dále počet míst, která se nasnímají. Nezáleží jen na technice snímání ale i na tom jaká jsou použita ředidla (Samper, 2009).

Kirk et. al. (2005) uvádějí, že průměrná motilita kryokonzervovaných spermií byla 26% a 36 % když ty samé vzorky byly zhodnoceny vizuálně a počítačovou analýzou.

3.4.3 Standardní hodnocení ejakulátu

Patří sem morfologie, viabilita a motilita, která již byla podrobněji popsána v předešlé části práce.

Vědomosti o morfologii a jejích abnormalitách mohou pomoci při zjišťování snížené nebo úplné neplodnosti plemeníků (Louda, 2001).

Pro vyhodnocení morfologie může být použito mnoho barvicích technik. Nejčastěji jsou hřebčí spermie obarveny metodou eosin-nigrosin. Je to nejčastěji používaná metoda, protože odborník může současně s morfologií rozpoznat kvalitu membránové integrity spermie a zhodnotí úroveň viability (Samper, 2009).

Existuje ještě metoda Karrass-Kördela, Wels, Farellyho nebo Hankoka. Poškození spermií můžeme dělit na primární a na sekundární, podle toho kde k jejich vadě došlo. Primární nastanou již během spermatogeneze. Nejčastěji Nevada projeví na tvaru hlavičky, změnách na akrozomu nebo abnormálně tvarovaném bičíku. K sekundárním změnám dochází při dlouhodobém skladování v ocasu nadvarlete, v průběhu ejakulace nebo špatnou manipulací a přípravou vzorků – lidský faktor. Změny, které v takovém případě můžeme pozorovat, jsou na akrozomu, patologické změny na bičíku, hlavičce nebo spojovací části hlavičky a bičíku. (Louda, 2001).

Životaschopná, nebo také viabilní, spermie je taková, která je schopna udržet svůj membránový potenciál, produkuje ATP a vykazuje další buněčné funkce typické pro spermii. Jedná se o velmi důležitou součást hodnocení, jelikož viabilní spermie, která ztratila schopnost se pohybovat, a v podmínkách in vivo by se tudíž nebyla schopná účastnit procesu oplození, v prostředí in vitro za pomoci techniky intracytoplazmatické injekce spermií (ICSI) je schopna splynout s vajíčkem. V případě hřebčího ejakulátu nás zajímá celkový počet životaschopných spermií na celou populaci spermií. Viabilita je uváděna v procentech. Jsou tři metody hodnocení viability. První metoda je obarvení spermií, nanesení a provedení roztěru na sklíčko a usušení na vzduchu. Následně jsou sklíčka sledována pod světelným mikroskopem. Druhou metodou je sledování pod fluorescenčním mikroskopem. Zde můžeme zvolit suchou metodu, která jsou s krycím sklíčkem nebo mokrou metodu, bez krycího sklíčka. Třetí možností je průtoková cytometrie. U první metody je k obarvení buněk často používán známý eosin-nigrosin. V případě poškození membránové integrity eosin pronikne do buňky a obarví ji. Při fluorescenční metodě je nejčastěji využita kombinace barev SYBR14 a PI. PI proniká jen ke spermiím, které jsou poškozené. Spermie svítí buď zeleně (viabilní), nebo červeně (poškozená spermie). Dalším příkladem využívaných barviv je Calcein-AM (CAM) a PI barvivo, které se osvědčilo hlavně u kryokonzervovaných hřebčích spermií. Průtoková cytometrie je mnohem výhodnější než počítání buněk, jelikož dokáže zachytit tisíce buněk s daleko vyšší statistickou přesností (McKinnon et.al., 2001).

3.4.4 Speciální hodnocení – hypoosmotický test

HOS byl využíván pro lidské spermie a následně se uplatnil i u jiných druhů, mezi kterými byl i hřeben (Jeyendran a kol., 1992).

Tento test se využívání zjišťování funkce membránové integrity pomocí osmoregulačních buněk. Spermie reagují na změnu hypoosmotického stavu morfologickými změnami a zvětšuje se jejich objem a tedy i velikost. Příčinou těchto změn je dosažení

rovnováhy mezi extracelulární a intracelulární tekutinou. Zvýšení objemu zapříčiní expanzi buněčné membrány bičíku, čímž dojde k jeho stočení. Svinutí postupuje od koncové části bičíku směrem k hlavičce. Ideální hypoosmotikum je takové, které zajistí dostatečný nárůst objemu, aby byla vidět změna, ale zároveň dostatečně malý, aby se zabránilo lýze spermatické membrány. Optimum je 50 – 150 mOsm / l. Mezi hodnotami HOS a progresivní motilitou je velmi dobrá korelace. Spermie se svinutým bičíkem je považována jako ta, která nemá porušenou membránovou integritu (Samper, 2009).

3.4.5 Nadstandardní hodnocení ejakulátu

Do této skupiny patří například hodnocení akrosomu, mitochondriální integrity nebo spermatického chromatinu. Mitochondriální integrita je v úzké korelaci s procentem viabilních a motilních spermií. I u tohoto testu je využívána metoda barvení. Spermie se obarví zeleně nebo oranžově podle toho, jak je jejich respiratorní funkce vysoká. Pokud mají větší poměr červené k zelené, jsou vysoce funkční. Podle jejich aktivity je můžeme dělit na mitochondrie s vysokým, průměrným a nízkým potenciálem. Spermatický chromatin se skládá z DNA a nukleoproteinů. Integrita nebo DNA fragmentace může být ohodnocena různě. Jeden z nejpoužívanějších způsobů je test struktury chromozomů spermií (SCSA). Následné hodnocení probíhá pomocí průtokové cytometrie, kdy se nepoškozená DNA zobrazuje zeleně a poškozená (denaturovaná DNA) červeně. Výsledek je uváděn v procentech (Samper, 2009).

Akrosom obsahuje mnoho bílkovin s galaktosylovými zbytky a právě ty se snažíme detektovat pomocí fluoreskujících lektinů a protilátek. Díky fluorescenční technice a průtokového cytometru se následně vzorky vyhodnotí (McKinnon et.al., 2011).

3.5 Zpracování semene

Existují tři typy zpracování ejakulátu, čerstvý, chlazený a mražený. Podle typu zpracování lze ejakulát uskladnit na různě dlouhou dobu. V případě dlouhodobého uskladnění je třeba přidat ke spermiím a ředidlu adekvátní podíl živin a energie na podporu jejich životaschopnosti. V případě nepřítomnosti těchto látek dochází k rychlé spotřebě přirozených zásob energie a živin spermie, které jsou uloženy v její plazmě. Je několik typů kryoprotektantů, ale nejčastěji je využíváné žloutkové.

Čerstvý ejakulát zůstává ve stavu, v jakém byl od hřebce odebrán a tak nepřežije více než několik hodin. Musí se udržovat při stálé tělesné teplotě (38 °C) a slouží k okamžitému zpracování.

Chlazený ejakulát se uchovává při teplotě 3-4 ° C po dobu až 72 hodin. Tato metoda zpracování umožňuje dopravu přes větší vzdálenosti ve speciálních nádobách, které udržují sperma chlazené.

Mražený ejakulát je zpracován obdobně jako chlazený ejakulát ovšem je třeba přidat adekvátní kryoprotektant, kterým je například glycerol. Mražený ejakulát obsahuje menší množství ředidla, takže je více koncentrovaný (Davies, 2005).

Při zpracování ejakulátu pro zmrazení dodržujeme následující postup. Nejprve odebereme sperma bez gelové frakce. Provedeme kontrolu nativní ejakulát, která zahrnuje motilitu a koncentraci. Následně musíme ejakulát zředit a dát do centrifugy abychom se zbavili tekuté části - supernatantu. Následně se přidá ředidlo s obsahem kryoprotektivních látek a bílkovin. Nakonec se naředěné spermie zabalí a zmrazí se (Samper, 2009).

3.6 Kryokonzervace hřebčího spermatu

Obecně lze říci, že se sperma hřebce dá rozdělit na dobře a špatně mrazitelné. Dobře mrazitelní hřebci jsou následně klasifikováni jako ti, kteří mají po rozmrazení více jak 40% progresivně pohyblivých spermií. Špatně mrazitelní jsou potom ti, kteří mají progresivní motilitu okolo 20% (Hoffman et.al., 2011).

Technika zmrazování spermií se neustále vyvíjí, přesto je tento způsob uchování spermií hojně využíván. Má mnoho výhod jako jsou nižší náklady, dostupnost semene, snížení rizika přenosu pohlavních chorob, lepší načasování inseminace nebo zvýšení genetického souboru. Mezi nevýhody patří snížení počtu březích samic v závislosti na tom, o jakého hřebce se jedná, zvýšené náklady majitele klisny, zvýšení pracovní síly nebo nedostatečná standardizace inseminačních protokolů, zmraženým semenem, pro chovné klisny (Samper, 2009).

Po odběru a základním zpracování spermatu hřebce následuje centrifugace spermatu, která má dva důvody. První z nich je úplná eliminace semenné plazmy a druhým důvodem je poskytnutí suspenze s vysokou koncentrací spermií. Semenná plazma je nežádoucí při zmrazování protože poškozuje spermie. A tak se ukázalo její odstraňování jako prospěšné (Amann and Pickett, 1987).

Monteiro et.al. (2011) uvádí, že se odebraný ejakulát naředí v poměru 1:1 a centrifuguje při 600 x g/10 minut. Následně se přidá kryokonzervační žloutkové ředidlo a opět se provede centrifugace, pokud se v supernatantu vyskytuje stále velké množství spermií. Konečná koncentrace spermií by měla být 200 milionů viabilních spermií/ml.

Následuje ekvilibrace, kdy jsou vzorky zabalené do 0,5 ml pejety jsou, při teplotě 5 °C po dobu 20 minut (v závislosti na výrobci), uskladněny v chladícím boxe a poté jsou zmrazeny v parách tekutého dusíku tak, že se dají 6 cm nad jeho hladinu po dobu 20 minut (Amann and Pickett, 1987).

3.6.1.1 Balení vzorků

Jako jedny z prvních obalů byly využívány pelety (Amann and Pickett, 1987). To se však neukázalo jako nejlepší způsob uskladňování, a tak se v dnešní době se pro uchování spermatu nejčastěji používají plastové pejety, které mají 0,5 ml. Jako další alternativou jsou aluminiové obaly (Awad, 2003).

3.6.1.2 Proces mražení

V průběhu let byly rozvinuty mnohé metody pro kryoprezervaci ejakulátu. Jedná se o mrazení v suchém ledu – pomalé mražení, rychlé mražení - vitrifikace. Aby nedocházelo k poškození buněk vlivem ledových krystalků, musí se použít řada kryoprotektiv (Green and Fleming, 1997).

Principem pomalého zmrazování je postupné chlazení spermií po dobu 2-4 h ve 2-3 °C. Tuto metodu lze vykonávat ručně nebo pomocí automatického stroje. Optimální počáteční rychlosti mražení vzorku, u ruční metody, z pokojové teploty do 5 °C je 0,5-1 °C/1 minutu (Mahadevan and Trounson, 1983). Následně je vzorek mražený od 5 °C do -80 °C rychlostí 1-10 °C/ 1 minutu. Poté je ponořena do kapalného dusíku o teplotě -196° C (Thachil and Jewett, 1981). Pomocí automatického stroje lze dle protokolu naprogramovat přístroj pro chlazení z 20 °C na -80 °C při frekvenci 1,5 °C za 1 minutu a následně až o 6 °C za 1 minutu. Tyto automatické stroje mají v sobě zabudované desky, které drží pejety stabilně v zásobníku, kde jsou chlazené pomocí par tekutého dusíku. K dokončení mražení se pejety odstraní a ponoří se do tekutého dusíku, kde je teplota -196 °C (Holt, 2000).

Vitrifikace, neboli rychlé mražení, je proces, při kterém není využíváno kryoprotektiv, ale ředěný ejakulát je ponořen přímo do tekutého dusíku na měděných kryolop nosičích (Nawroth et al., 2002).

Pro využití inseminační dávky je zapotřebí ji rozmrazit a to následujícím způsobem. Do vodní lázně, která je vyhřátá na teplotu 37 °C, se na 30 sekund ponoří pejeta, která byla vyndána z tekutého dusíku. Po vyjmutí z vodní lázně se dokonale pejeta osuší papírem a obsah se přelije do zkumavky a dá se do vodní lázně (Contreras-Mendez and Medrano, 2015).

3.7 Možnosti zlepšení kvality spermií po rozmražení

U kryokonzervovaných spermií savců se obecně uvádí, že mají narušenou plodnost ve srovnání s čerstvým spermatem. To se projevuje snížením životaschopnosti po rozmražení a na změnách v poměru subpopulací. Důvody ztráty viability jsou různé. Jedny z nejčastějších faktorů jsou složky ředidla, přídavek kryoprotektantů (glycerol), chladový šok nebo proces centrifugace (Watson, 2000).

Přítomnost semenné plazmy (SP) je považována za prospěšnou pro spermie, jelikož obsahuje mnoho proteinů, živin a energie, ale je škodlivá pro jejich přežití při procesu mražení. Je známo, že SP obsahuje mnoho faktorů, které pomáhají zachovat funkci spermií, jako jsou například dekapacitační faktory (Perez-Pe et. al., 2001) ale také další látky, které způsobují inhibici motility spermií (Kordan et. al., 1998) Tyto inhibující látky mají restriční účinek na motilitu spermií *in vitro* a na reaktivní druhy kyslíku (ROS). ROS jsou škodlivé pro dlouhodobé přežití spermií (Hammadeh et.al., 2008). Z těchto důvodů se semenná plazma u některých druhů (zejména u druhů, které mají vyšší podíl semenné plazmy) odstraňuje před procesem mražení a opět se ke spermiím přidává po rozmražení v procentuálním zastoupení u kterého je předpoklad, že zvýší jejich životaschopnost (Barrientos-Morales et.al., 2018)

Složení semenné plazmy má vliv nejen na spermie ale i na proces mražení. Jedná se především o bílkoviny, které jsou v rozmezí HSP-1-HSP-8, s výjimkou HSP-4. Jsou periferně vázány na povrch spermií v době ejakulace. HSP-7, u prasat se jedná o AWN, se může podílet na interakci spermie se zónou pellucidou. Enzym laktát dehydrogenasa (LDH) je považována jako významný faktor pro správnou funkci spermií. Je úzce spjata s objemem, koncentrací a úrovní viability. Koncentrace enzymů ACT, AP, aspartátaminotrasferáza (AST) a glutamyltrasferáza (GGT) negativně ovlivňují objem SP a pozitivně působí na koncentraci spermií. Za vliv těchto enzymů pravděpodobně může to, zda pochází z testikulární nebo epidymální části varlete. U mužů se váží na povrch hlaviček spermií glykosidasy, jako je například N-acetyl-d-glukoaminidáza (NAG), která se jeví jako významná součást akrozomální reakce. Glykosidasy obecně hrají významnou roli při zrání spermie a během oplozovacích procesů, ale u muže s nadměrnou expresí glykosidas zřejmě způsobuje neplodnost v důsledku narušení funkce spermií (Kareskoski and Katila, 2008).

Tyto vlastnosti bílkovin doplňuje studie Maxwell et.al. (2006), kteří uvádějí, že obsah proteinů v SP a semenná plazma obecně může buď inhibovat, nebo aktivovat funkce spermií. Hlavní proteiny, které byly izolované a charakterizované v plazmě obsahují spermadhesin a fibronektin-II. *In vitro* manipulace se spermatem, pro umělou inseminaci, zahrnuje procesy

chlazení, mražení a rozmrazování a tím mění charakter bílkovin, které jsou vázané na povrch spermií. Některé změny způsobené manipulací mohou být vratné, ale je to v závislosti na tom, jak je ejakulát zpracováván. Může dojít k destabilizaci jejich membránu, vlivem změn charakteru bílkovin, a také k předčasné kapacitaci a snížení přežitelnosti. V závislosti na tom, kdy tyto proteiny ke spermiím přidáme, můžeme ovlivnit míru přežitelnosti.

Tyto studie doplňují Rueda et. al. (2013), kteří ve své práci uvádějí, že kryokonzervace snižuje životaschopnost spermií o 50 % a tudíž se snažili zjistit, které proteiny semenné plazmy mají vliv na životaschopnost a přežitelnost ejakulátu býků. Výsledky ukazují, že semenné plazmatické proteiny snižují poškození spermií při kryokonzervaci, avšak záleží na dávce kryoprotektantu a plemeni býka.

Další možností, jak ovlivnit zlepšení kvality spermií po rozmražení je správná koncentrace glycerolu. Glycerol jako složka ředidla ovlivňuje životní prostředí spermie při kryokonzervaci. Tím se tedy změní reakce spermií na zmrazení a rozmrazování. Jeden z prvních dokumentů, ve kterém byl zveřejněn pokus o zmrazování spermatu, uvedl, že asi 25 % hřebčích spermií, které byly odděleny od semenné plazmy a resuspendovány v pufru, obsahujícím glukózu a glycerol, přežily zmrazení na -79 °C a následné rozmrazení. Navzdory tomu, že je glycerol pro úspěšné zmrazení nezbytný, může poškodit buněčné membrány spermie a činí ji oplození neschopnou a to i přes to, že se může po rozmražení pohybovat. Proto je jeho množství, přidané do ředidla, omezené (Amann and Pickett, 1987).

Nedílnou součástí procesu mražením centrifugace. Ta ovšem není zcela neškodná. Její škodlivé účinky mohou minimalizovat nízké otáčky, které jsou během procesu použity. Další variantou je naředění spermatu. V každém případě by počet pohyblivých spermií měl být stejný před centrifugací jako po ní. Pokud tomu tak není, musí se odstředivá síla, doba trvání centrifugace nebo ředící médium změnit (Amann and Pickett, 1987).

3.8 Přídavek semenné plazmy před zmražením

Gunay et. al. (2006) ve své práci uvádějí vliv semenné plazmy na rozmražené beraní spermie poté, co se před mražením do ředícího roztoku přidávalo 20 % SP býka. Výsledky ukazují, že se po rozmražení zlepšila plodnost a celkově měla podpurný účinek.

Autoři Ferreira et. al. (2014) ve své práci publikují, že i na kozlím ejakulátu je patrný vliv poté, co se přidala semenná plazma do vaječného ředidla. Výsledky ukazují, že po přítomnost semenné plazmy v ředidle příznivě zvyšuje životaschopnost kryokonzervovaných spermií.

Podobné studie byly zveřejněné i od Aurich et.al. (1996), kteří ve své publikaci zkoumají vliv přídatku semenné plazmy před mražením na hřebčí spermie. Do ředidla se, před kryokonverzací, přidá semenná plazma od homologního hřebce nebo od jiných hřebců, která činí 30 % z celkového objemu spermatu. Z pokusu vyplývá, že motilita není významně ovlivněna přidáním semenné plazmy od stejného hřebce. Hřebcům, kteří mají nízkou pohyblivost spermií po rozmražení, a membrána spermií je neporušená, přídavek semenné plazmy od hřebců, kteří mají pohyblivost spermií po rozmražení vysokou, zvýšil motilitu. Hřebcům se zvýšenou motilitou po rozmražení, přídavek semenné plazmy od hřebců se sníženou motilitou po rozmražení, pohyblivost po rozmražení snižuje. Pokud se v ejakulátu hřebce, s vysokou motilitou po rozmražení, vyskytuje velké procento poškozených spermií s inaktivním akrosomem, je to způsobeno přidáním jeho vlastní semenné plazmy před kryokonzervací. Z toho vyplývá, že složení SP u jednotlivců ovlivňuje jejich vhodnost pro kryokonzervaci.

Al-Essawe et. al. (2018) naopak tvrdí, že pokud se hřebcům odebrala semenná plazma před mražením, zlepšila se kvalita spermií po rozmražení. Následně dodávají, že nebyly prokázány příznivé účinky, na spermie, při použití SP od dobře a špatně mrazitelných hřebců.

V jiné studii zkoušeli Moore et. al. (2005) opětovně vystavit hřebčí spermie, před kryokonzervací, semenné plazmě a to buď krátkodobě, nebo dlouhodobě. Výsledky ukazují, že krátkodobé působení SP nemělo významný vliv na motilitu spermií, ale při delším působení se ukazuje jako škodlivé.

3.9 Přídavek semenné plazmy po rozmražení

Jak uvádí studie Fernández-Gago et.al. (2016) je prokázáno, že přídavek semenné plazmy může po rozmražení pozitivně ovlivnit spermie kanců. Autoři zkoumali vliv 3 různých koncentrací semenné plazmy - 0 %, 10 % a 50 %, od kanců s dobrou fertilitou, po dobu 4 hodin ve 37 °C. Jako nejúčinnější se ukázalo 50% plazmy, která nejlépe chránila schopnost spermií se pohybovat a jejich chromatin.

Podobné výsledky zaznamenali Fernández-Gago et. al. (2013) již tři roky dříve, kdy zjišťovali, zda přídavek plazmy bude mít vliv na kančí spermie. Výsledkem této studie bylo ovšem tvrzení, že při přidání 50 % semenné plazmy zhoršilo, po 4 hodinách inkubace, životaschopnost spermií a zvýšilo poškození akrosomu. Autoři se domnívají, že je to způsobené zvýšeným obsahem ROS a modifikuje biologii spermií.

Tyto dvě studie doplňují i Okazaki et. al. (2009) kteří uvádějí, že odstranění SP výrazně neovlivnilo motilitu kančích spermií po rozmražení. Dále uvádějí, že zmražení spermatu bez

SP výrazně zvýšilo ztrátu akrosomu přidání 10 % SP k rozmraženým spermii potlačila tyto změny na spermii. Tyto metody zmrazování (odstraněním SP ihned po odebrání ejakulátu) spermii se ukazují jako prospěšné a zvyšují úspěšnosti umělé inseminace u kanců, kteří mají špatně mrazitelné sperma.

Podobně jako u kanců i u beranů má vliv semenné plazmy na spermie při kryokonzervaci. Tento účinek lze pozorovat po rozmražení. Promytí semene roztokem sacharózy a odstranění SP, před mražením, zajišťuje zvýšení viability. Dalším faktem je, že po podání SP po rozmražení, nebo alespoň její frakce, zvyšuje akrosomální a plazmatickou membránovou integritu, životaschopnost a motilitu Ollero et. al. (1997).

Vliv semenné plazmy na beraní spermie po rozmražení byl sledován i v práci Ollero et. al. (2013). Výsledky této práce ukázaly, že proces mražení a rozmrazování představují ztrátu heterogenity spermii a integrity membrány. Tyto ztráty byly méně časté, když se SP odstranila před mražením a přidala se až po rozmražení. Navíc byla prokázána zvýšená životaschopnost a heterogenita spermii, u kterých SP nebyla přítomna.

Moore and Graham (2004) poukazují, že přidání semenné plazmy po rozmražení hřebčích spermii je nezbytnou prevencí proti předčasné kapacitaci a již kapacitované spermie se mohou vrátit do stavu před kapacitací. Také je podporována fertilita.

Mnoho výzkumů ukazuje, že semenná plazma (SP) má negativní vliv na hřebčí spermie během jejich skladování. Jedná se o chlazené i kryokonzervované spermie. Proto se snižuje její obsah před mražením. Pokud se SP sníží na přibližně $\leq 5\%$, spermie jsou schopny, udržet si motilitu během dlouhodobého skladování, na rozdíl od vzorků, kde se SP pohybovala okolo 10-30 %. Pokud se SP odstranila úplně, byly zaznamenány vynikající výsledky v oblasti integrity DNA a motility spermii. Účinky SP jsou odlišné u jednotlivých hřebců. Některé složky SP jsou nezbytné pro skladování spermatu a fertilitu.

Proto je nutné pohlížet na hřebčí sperma individuálně a odstranit většinu semenné plazmy u těch hřebců, kteří mají sperma citlivé na chlazení a skladování. Rozdíl v přežití spermii byl hodnocen mnoha studiemi. Při použití pouze spermiové části ejakulátu a naředění 25 x 10⁶ spermii / ml se zlepšilo udržování motility spermii (25 a 24 hodin skladování), na rozdíl od celkového ejakulátu s nižším ředěním. Motilita a integrita po rozmražení u centrifugovaných frakcí ejakulátu, bohatých na spermie, byla lepší, než u necentrifugovaného celého ejakulátu a necentrifugované frakce bohaté na spermie – spermiové části (Kareskoski and Katila, 2008).

De Andrade et.al. (2011) předchozí studii doplňují prokázáním, že přidání 20 % SP, po rozmražení, zvyšuje plazmatickou a membránovou integritu. Motilita zůstala nezměněná.

Pokud se přidala homologní SP, docházelo ke snižování počtu buněk s progresivním pohybem. U autologní SP se naopak snižovala amplituda bočního posazení hlavičky.

Barrientos-Morales et. al. (2018) ve své publikaci naopak uvádějí, že přídavek SP před mražením nijak neovlivnil kvalitu ejakulátu, avšak po přidání 20% plazmy po rozmražení došlo k nárůstu procenta spermií s intaktním akrozomem.

Pokud porovnáme výsledky u epidimálních spermií pak Neuhauser et.al. (2014) ve své publikaci popisují, že přidání semenné plazmy po rozmražení spermií může mít aktivační a ochranné účinky a to především okolo 20 % a 50 %. Vyšší zastoupení SP již motilitu nezvyšovalo.

Aurich et.al. (1996) doplňují, že přídavek semenné plazmy, která je od stejného hřebce jako sperma, po rozmražení ovlivnil motilitu z 36,0 x 1,6 % na 32,0 x 3,7 % přičemž McKinnon et.al. (2001) uvádějí, že ztráta motility, i přes zachování membránové a mitochondriální integrity, je častá u kryokonzervovaných i chlazených ID.

4 Materiál a metodika

4.1 Roztoky

4.1.1 Fyziologický roztok

Jedná se o 0,9% vodný roztok chloridu sodného.

4.1.2 Semenná plazma

Ejakulát byl odebrán od 10 hřebců s průměrně mrazitelným semenem v certifikovaném Equinním reprodukčním centru s.r.o. (ERC). Pro tuto diplomovou práci byly použity dva typy semenných plazem. Od průměrně mrazitelného a od extrémně dobře mrazitelného hřebce, u kterého se semenná plazma pojmenovala jako supersemenná.

Semenná plazma se zpracovávala tak, že se odebraný ejakulát umístil do 15 ml centrifugačních zkumavek a následně při 10 000 g po dobu 10 minut proběhla centrifugace. Poté se odebral supernatant, neboli semenná plazma, a ta se rozpipetovala do 1,5 ml zkumavek ependorf. Takto připravené vzorky semenné plazmy se uchovály při -80 °C až do dalšího použití.

Kvalitativní parametry hřebců, kteří poskytli super semennou plazmu, byly následující. Ihned po odběru byl průměrný objem 80 ml spermatické frakce, koncentrace byla 800-900 x 10⁶/ml a motilita byla >95 %. Po rozmražení byla motilita v rozmezí 60-70 %.

4.2 Odběr, kryokonzervace a rozmražení inseminačních dávek

Ejakulát byl odebrán od 10 hřebců za pomoci umělé vagíny otevřeného typu a byl zpracován ihned po odběru. Zhodnotila se jeho motilita, koncentrace a objem. Byl naředěn mléčným ředidlem a byl vložen do centrifugy na 15 minut při 650 g. Následně byl odstraněn supernatant a spermie byly zředěny laktózo-EDTA-žloutkovým ředidlem. Konečná koncentrace spermií byla 350 x 10⁶ progresivně pohyblivých spermií v inseminační dávce. ID (n = 41). Takto naředěný ejakulát byl zabalen do aluminiových tub o objemu 5 ml.

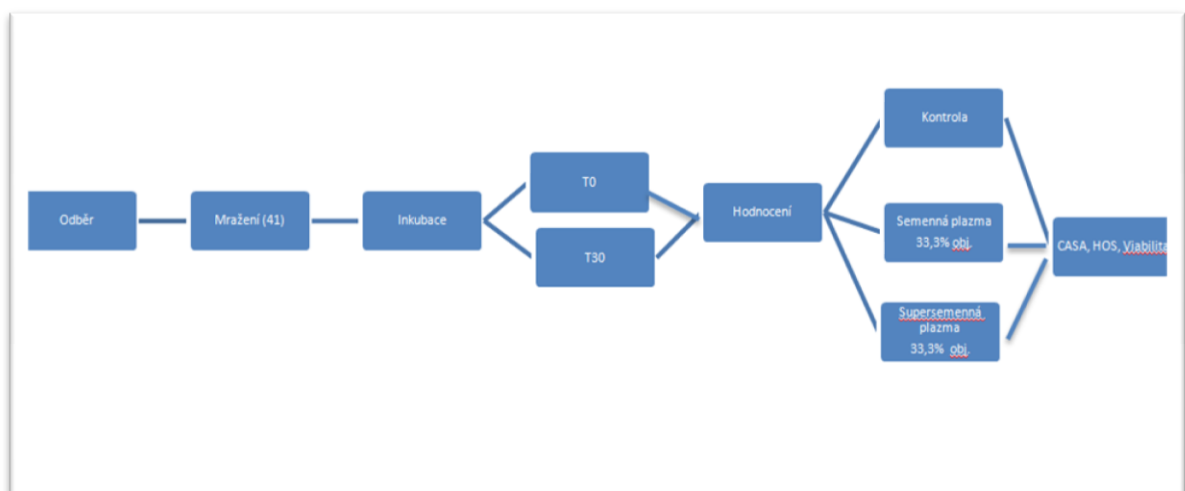
Poté se ekvilibrovaly při 5 °C po dobu 2 hodin a následně horizontálním mrazením na polystyrenové krabici zmrazeny a vloženy do tekutého dusíku.

Rozmražení ejakulátu, po vyjmutí z tekutého dusíku, proběhlo při 37 °C ve vodní lázni po dobu 30-60 s.

4.3 Design experimentu

Pro práci byly vybrány inseminační dávky od špatně mrazitelných hřebců s motilitou 20% a méně. Po rozmražení se u ID stanovila koncentrace s dávka se naředila fyziologickým roztokem. Takovéto ID se rozdělily na tři alikvóty – kontrolní, semenná a supersemenná. Kontrolní alikvóta zůstala naředěná jen fyziologickým roztokem. K semenné alikvótě bylo přidáno 33,3 % semenné plazmy, od průměrně mrazitelného hřebce, z celkového objemu inseminační dávky. Supersemenná alikvóta obsahovala 33,3% plazmy od velmi dobře mrazitelného hřebce, z celkového objemu ID. Alikvóta semenné plazmy byla označena SP a alikvóza supersemenné plazmy S. Takto připravené vzorky se nechaly v 37 °C inkubovat po dobu 5 minut pro čas T0. Druhou částí experimentu bylo hodnocení po uplynutí 30 minutové inkubace, tedy se jednalo o skupinu vzorků nazvanou T30. U T0 i T30 se hodnotila motilita, HOS a viabilita. (Schéma 1).

Schéma 1. Design experimentu



4.4 Statistická analýza

Data byla vyhodnocována pomocí programu Statistika 12. Pro analýzu motility spermií byla použita shluková analýza (vícerozměrná analýza) s použitím shlukové metody k-průměru. Spermie byly na základě CASA parametrů redistribuované do třech shluků, které tvořily kategorie pomalých, středně rychlých a rychlých spermií. Na analýzu hypoosmotického testu a pro test na viabilitu byla využita vhodná analýza rozptylu – jednofaktorová a vícefaktorová ANOVA. Data byla hodnocena na hladině významnosti ($p < 0,05$).

4.5 Hodnocení

Pro hodnocení motility byla zvolena objektivní metoda CASA (Nis-Elements, verze 4.30, Laboratory Imaging, Česká republika). Vzorek o objemu 3 μl byl vložen na 37°C předeřátou Maklerova komůrku (Sefi-Medical Instrument, Izrael).

Hodnocení bylo na principu 41 po sobě jdoucích, digitalizovaných obrazů, které byly v časovém úseku 0,66 pořízeny s fotoaparátém při frekvenci 60 fsp (DMK 23UM021; Imaging Source, Německo). Měřilo se 6 polí a vyhodnocení proběhlo pomocí fázového mikroskopu (Eclipse E600; Nikon) vybaveného nahřívací destičkou, předeřáté na 37 °C. Pro hodnocení celkové motility se bralo procento spermií, které měli prahové hodnoty STR a VAP pro progresivní motilitu byly 50% a 30 $\mu\text{m} / \text{s}$.

Věžník (2004) uvádí přehled parametrů, které se hodnotí u pohyblivých spermií:

- VCL *curvilinear velocity* – rychlost hlavičky na skutečné dráze, průměr mezi dvěma body měření
- VAP *average-path velocity* – rychlost hlavičky na přímé dráze. Vyjádří se tím plynulejší pohyb.
- VSL *straight-line velocity* – měření probíhá mezi počátečním a konečným bodem a jedná se o rychlost hlavičky na přímé dráze
- ALH *amplitude of laterál head displacemant* – odvozením od VCL a VAP se změní maximální možná oscilace hlavičky spermie. Jedná se o odraz pohybu bičíku.
- LIN *lineary* – ze vzorce $(VSL/VCL \times 100)$ se vypočítá linearita skutečné dráhy. Výsledek je uváděn v procentech.
- WOB *wobble* – ze vzorce $(VAP/VCL \times 100)$ vypočteme stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřímené dráhy. Výsledek je v procentech.
- STR *straightness* – přímost napřímené dráhy. Vzoreček procento parametr je $(VSL/VAP \times 100)$ [%].
- BCF *beat cross frequency* – jedná se o množství kolikrát je skutečná dráha překřížená napřímenou dráhou [Hz].

4.5.1 Hypoosmotický test

K hodnocení procentuálního zastoupení spermií se stočeným bičíkem bylo využito hypoosmotického testu (HOS). Do 100 μl roztoku, ohřátého na 37 °C, se přidalo 10 μm spermií. Pipetou se nanoslo 15 μl spermií na sklíčko. Nakonec se roztěrovým sklíčkem, se skosenou hranou, provedl nátěr a vzorek se nechal zaschnout na nahřívací desce. Sklípka se hodnotila pod fázovým mikroskopem s objektivem 40x, pro čas T0 i T30. Počítalo se 200 spermií na sklípka. Výsledky byly zaznamenány v procentech.

4.5.2 Viabilita

Pro zjištění procentuálního zastoupení viabilních spermií bylo použita metoda barvení eosinem a nigrosinem. Nejprve se na hodinové sklípka pipetou umístilo 15 μl spermií. Následně se k nim přidalo stejné množství eosinu a celý vzorek se jemně promíchal po dobu 20 vteřin. Po uplynutí této doby se přidalo opět 15 μl nigrosinu a 20 vteřin se lehce vzorek promíchal. Následně byl proveden nátěr.

Hodnotilo se pod imerzním objektivem se zvětšením 1000x, pro čas T0 i T30. V diplomové práci jsou uvedeny dvě skupiny spermií. Ty, které označujeme, jako živé se zobrazovaly bíle a mrtvé spermie měli červenou barvu. Počítalo se 200 spermií na sklípka. Výsledky se uváděly v procentech.

5 Výsledky

U odebraných vzorků bylo zjišťováno, zda přidání semenné plazmy do rozmražených spermií ovlivní jejich motilitu, přičemž byly hřebčí dávky hodnoceny v časech T0 a 30 minut.

Celková motilita se u všech experimentálních skupin v čase T0 a T30 nelišila, ovšem u všech tří skupin došlo k signifikantnímu snížení v čase T30 oproti T0.

Jedná se o statisticky významný rozdíl, kdy u kontrolní skupiny došlo ke snížení průměrných hodnot z $10,9 \pm 7,0$ % na $6,6 \pm 6,3$ %. Semenná plazma v čase 0 byla $10,8 \pm 8,8$ % a po 30 minutách došlo k poklesu na $5,2 \pm 4,0$ % a průměrná hodnota u supersemenné plazmy v čase 0 byla $11,9 \pm 7,0$ % a po 30 minutách se snížila na $5,4 \pm 6,2$ % (Tabulka 1).

Progresivní motilita se u všech experimentálních skupin v čase T0 a T30 nelišila, ovšem statisticky významná odlišnost byla zaznamenána u jednotlivých skupin na hladině významnosti ($p < 0,05$). Kontrolní skupina klesla po 30 minutách z $9,7 \pm 7,0$ % na $5,4 \pm 5,5$ %. Skupina semenné plazmy klesla po čase 30 z $9,5 \pm 8,5$ % na $4,4 \pm 3,3$ % a supersemenná klesla z $10,8 \pm 7,0$ % na $4,8 \pm 5,9$ %.

Tabulka 1. Rozdíly po přidání semenné nebo supersemenné plazmy na celkovou motilitu spermií v časech T0 a T30.

	TMOT [%]	
	T0	T30
K	$10,9 \pm 7,0^a$	$6,6 \pm 6,3^b$
Sp	$10,8 \pm 8,8^a$	$5,2 \pm 4,0^b$
S	$11,9 \pm 7,0^a$	$5,4 \pm 6,2^b$

^{ab} hodnoty s různými indexy v řádku se liší na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Tabulka 2. Rozdíly po přidání semenné nebo supersemenné plazmy na progresivní motilitu v časech T0 a T30.

	PMOT [%]	
	T0	T30
K	$9,7 \pm 7,0^a$	$5,4 \pm 5,5^b$
Sp	$9,5 \pm 8,5^a$	$4,4 \pm 3,3^b$
S	$10,8 \pm 7,0^a$	$4,8 \pm 5,9^b$

^{ab} hodnoty s různými indexy v řádku se liší na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Byly hodnoceny kinematické parametry v čase T0 a následně v čase T30 po přidání semenné a supersemenné plazmy. ALH po přidání semenné plazmy bylo v čase T0 vyšší než po přidání supersemenné plazmy. BCF se po přidání semenné plazmy zvýšilo oproti kontrole. LIN, STR, VAP, VCL VSL a WOB byly v průměru prokazatelně vyšší po přidání semenné plazmy oproti supersemenné plazmě. V čase inkubace 30 byl ALH vyšší po přidání semenné plazmy oproti supersemenné. BCF, LIN a STR byly vyšší po přidání supersemenné plazmy oproti semenné. VAP, VCL, VSL a WOB byly vyšší po přidání semenné plazmy oproti supersemenné plazmě.

Dále byl hodnocen rozdíl mezi časem inkubace T0 a T30. U kontrolní skupiny byl prokázán rozdíl mezi jednotlivými časy u parametrů BCF, LIN, STR, VAP, VSL a WOB, kdy v čase 0 byly hodnoty vyšší než ve 30. U skupiny semenné plazmy byl průkazný rozdíl u všech uvedených parametrů, kdy v čase 0 byly hodnoty vyšší u BCF, LIN, STR, VAP, VCL, VSL a WOB. ALH hodnota byla v čase nula nižší než v čase T30. Skupina supersemenné plazmy byla ve všech parametrech v čase T0 vyšší než ve 30 minutách.

Tabulka 3. Rozdíly po přidání semenné nebo supersemenné plazmy na kinematické parametry spermií v časech T0 a T30.

	T0			T30		
	K	SP ¹	S*	K	SP ^{2A}	S ^{**B}
ALH	3,4 ± 1,5	3,9 ± 1,8 ^a	3,7 ± 1,7 ^b	3,4 ± 1,6	10,2 ± 5,8	3,3 ± 1,6
BCF	11,0 ± 6,2 ^{a,1a}	11,3 ± 6,6	11,6 ± 6,7 ^b	9,6 ± 5,7 ^{1b}	10,2 ± 5,8	10,3 ± 5,9
LIN	38,5 ± 13,3 ^{1a}	40,1 ± 14,6 ^a	40,7 ± 13,7 ^b	33,3 ± 12,1 ^{1b}	36,0 ± 13,3	37,2 ± 13,0
STR	85,7 ± 14,5 ^{1a}	85,9 ± 15,3 ^a	87,6 ± 13,6 ^b	80,8 ± 16,8 ^{1b}	82,3 ± 16,7	85,6 ± 13,2
VAP	42,4 ± 23,8 ^{1a}	50,1 ± 29,1 ^a	48,7 ± 27,3 ^b	37,1 ± 21,3 ^{1b}	40,8 ± 25,8	38,2 ± 22,7
VCL	95,9 ± 48,2	109,8 ± 57,6 ^a	106,5 ± 54,2 ^b	92,4 ± 49,0	96,1 ± 58,0	89,0 ± 45,4
VSL	37,4 ± 23,4 ^{1a}	44,5 ± 28,5 ^a	44,0 ± 27,1 ^b	31,0 ± 20,5 ^{1b}	34,8 ± 24,8	33,9 ± 22,6
WOB	44,3 ± 11,1 ^{1a}	45,8 ± 12,2 ^a	45,8 ± 11,5 ^b	40,7 ± 10,2 ^{1b}	43,1 ± 11,2	42,8 ± 11,2

^{ab} uvedené rozdílné horní indexy v řádku značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi vzorky v T0

^{AB} uvedené rozdílné horní indexy v řádku značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi všemi hodnocenými parametry označené skupiny v čase T30

^{1a, 1b} rozdílné indexy v řádku značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi časy T0 a T30 kontrolní skupiny

¹² rozdílné indexy v řádku značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi T0 a T30 u všech hodnocených parametrů experimentální skupiny

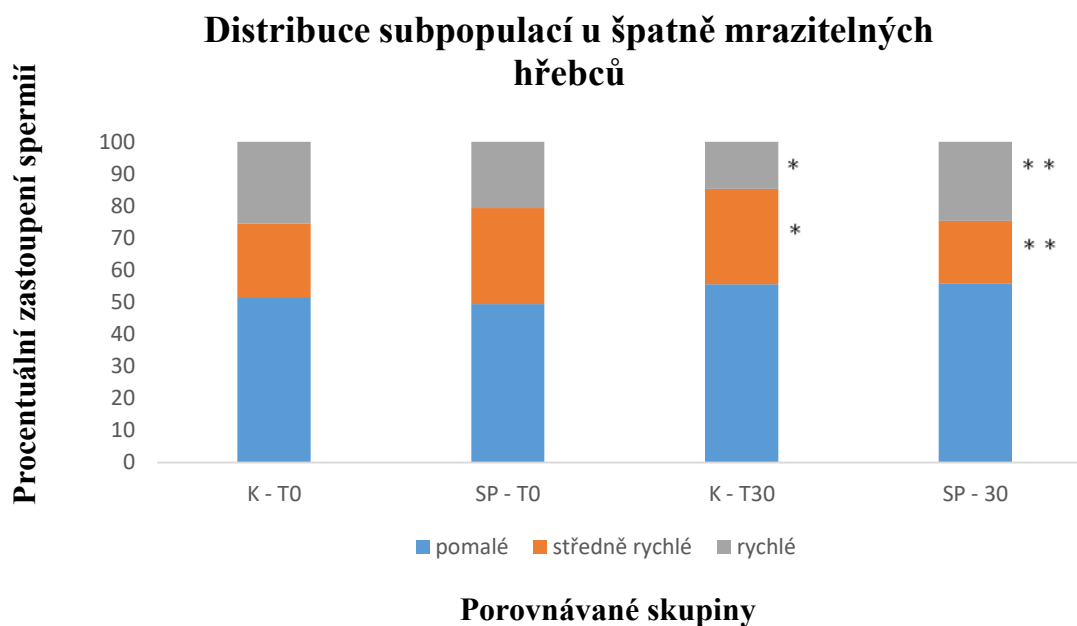
^{*/**} rozdílné indexy v řádku značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi T0 a T30 u všech hodnocených parametrů experimentální skupiny

Problematika subpopulací v ejakulátu je velmi opomíjenou částí při vyhodnocování. Pokud mluvíme o subpopulacích lze říci, že se jedná o skupiny spermií, které se v ejakulátu různě rychle pohybují. Můžeme je tedy rozdělit na pomalé, středně rychlé a rychlé.

Z grafu je patrné, že kontrolní skupina se oproti skupině s přidanou semennou plazmou v čase T0 významně nelišila v žádné z porovnávaných skupin – pomalých, středně rychlých a rychlých spermií. Oproti tomu po čase inkubace T30 se oproti kontrole u skupiny supersemenné plazmy významně snížil počet středně rychlých spermií a zvýšil se počet rychlých spermií. Počet pomalých spermií se nelišil. (Graf 1).

Z toho vyplývá, že přidavek semenné plazmy pozitivně ovlivnil ejakulát, jelikož se zvýšil počet rychlých spermií po 30 minutách.

Graf 1. Rozdělení subpopulací u ejakulátu od špatně mrazitelných hřebců. Porovnání kontroly (K) a semenné plazmy (SP) v čase T0 a T30.

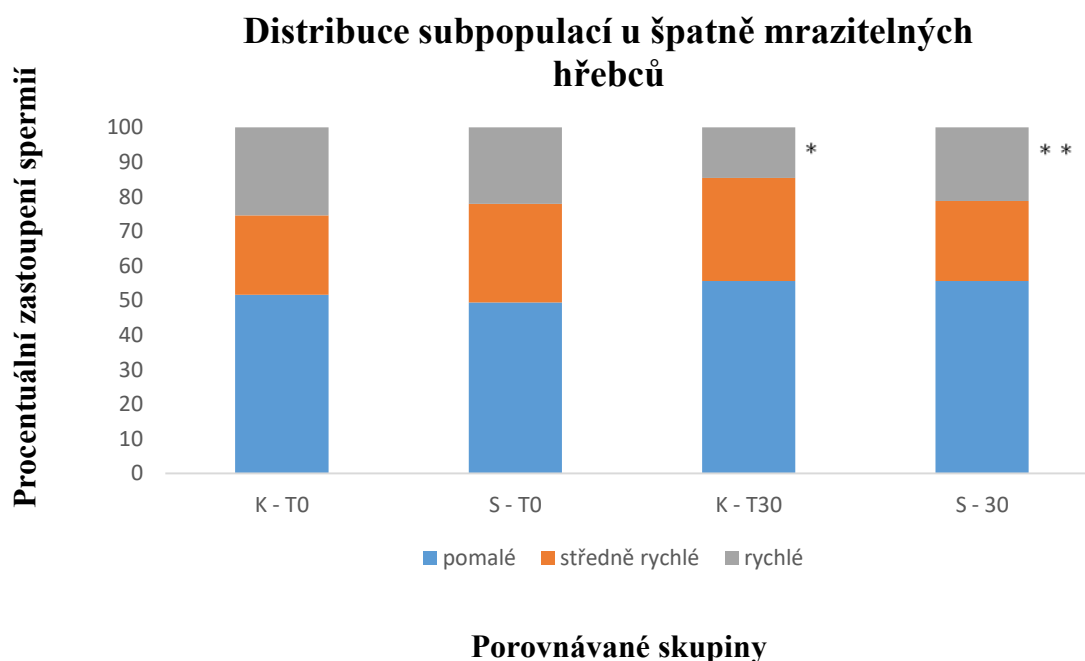


*** hodnoty s různými indexy v sloupci se liší na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Dále se porovnávala kontrolní skupina (K) a supersemenná plazma (S) v čase T0 a T30 (Graf 2). V čase T0 se kontrolní skupina od supersemenné plazmy statisticky významně nelišila. Avšak po 30 minutách inkubace došlo u kontrolní skupiny ke zvýšení počtu středně rychlých spermií a snížení rychlých spermií. V porovnání se supersemennou plazmou v čase T30 se zvýšil počet rychlých spermií a zároveň se snížil počet středně pomalých. Počet pomalých spermií se nelišil.

Z toho vyplývá, že supersemenná plazma měla pozitivní efekt na procentuální zastoupení rychlých spermií.

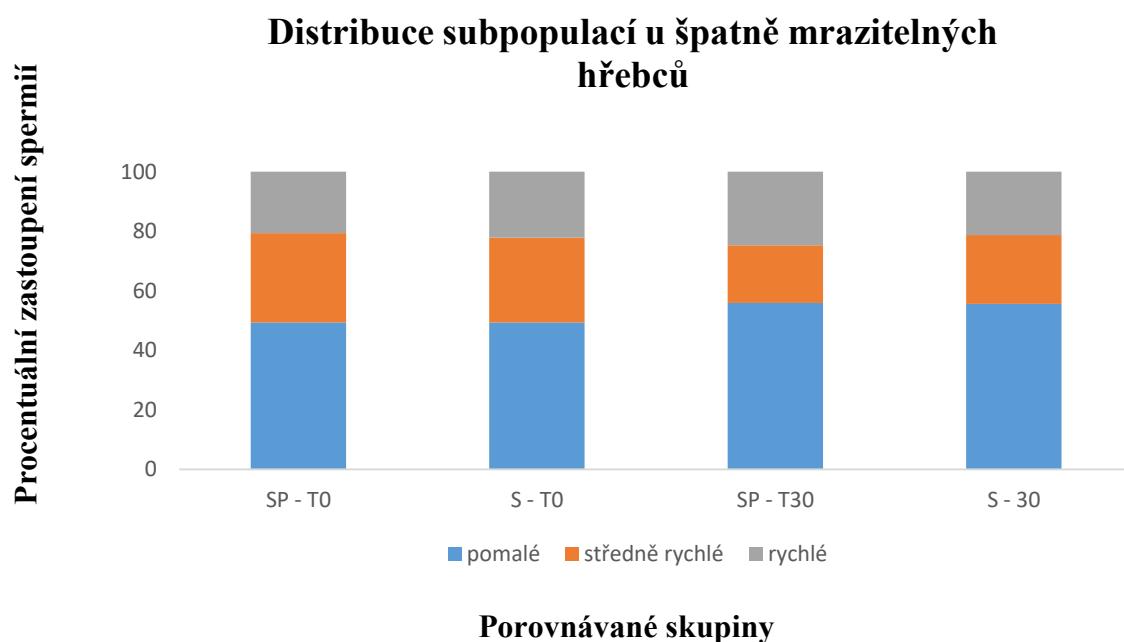
Graf 2. Rozdělení subpopulací u ejakulátu od špatně mrazitelných hřebců. Porovnání kontroly (K) a supersemenné plazmy (S) v čase T0 a T30.



*** hodnoty s různými indexy v sloupci se liší na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Jako poslední se porovnávala semenná (SP) a supersemenná plazma (S) v čase T0 a 30 (Graf 3). Jak je z grafu patrné nebyla zaznamenána statisticky významná odchylka mezi časy inkubace při porovnání těchto dvou skupin.

Graf 3. Rozdělení subpopulací u ejakulátu od špatně mrazitelných hřebců. Porovnání semenné plazmy (SP) a supersemenné plazmy (S) v čase T0 a T30.



U testovaných skupin bylo dále zjišťováno, zda přidání semenné nebo supersemenné plazmy ovlivní výsledky hypoosmotického testu. Následující tabulka ukazuje, že v čase T0 se nevyskytoval mezi testovanými skupinami významný rozdíl. Avšak v čase T30 se skupiny signifikantně lišily na hladině významnosti ($p < 0,05$) a to mezi kontrolní skupinou a semennou plazmou. Při porovnání času inkubace se významně lišila skupina semenné plazmy ($p < 0,05$) (Tabulka 4).

Tabulka 4. Rozdíly po přidání semenné nebo supersemenné plazmy na integritu membrány v časech T0 a T30.

	HOS ⁺ [%]	
	T0	T30
K	33,5 ± 10,1	34,2 ± 8,4 ¹
Sp	34,5 ± 9,8 ^a	29,4 ± 10,3 ^{b,1}
S	33,6 ± 9,9	32,9 ± 11,3

^{ab} hodnoty s různými indexy v řádku se liší na hladině významnosti ($p < 0,05$)

¹² hodnoty s různými indexy ve sloupci se liší na hladině významnosti ($p < 0,05$)

Hodnotila se také viabilita. V čase T0 u všech experimentálních skupin nebyl, zaznamenám statisticky významný rozdíl. Stejně tomu bylo i v čase T30. Ovšem při porovnání dob inkubace u jednotlivých skupin se data lišila na hladině významnosti ($p < 0,05$) a to konkrétně u kontrolní skupiny a supersemenné plazmy (Tabulka 5).

Tabulka 5. Vliv přidání semenné nebo supersemenné plazmy, na viabilitu rozmražených spermií v časech T0 a T30.

	VIABILITA [%]	
	T0	T30
K	$47,6 \pm 9,8^a$	$39,3 \pm 10,2^b$
Sp	$45,7 \pm 8,3$	$41,7 \pm 11,0$
S	$46,1 \pm 9,8^a$	$37,8 \pm 11,1^b$

^{ab} hodnoty s různými indexy v řádku se liší na hladině významnosti ($p < 0,05$)

6 Diskuze

Obecně lze říci, že se sperma hřebce dá rozdělit na dobře a špatně mrazitelné. Dobře mrazitelní hřebci jsou následně klasifikováni jako ti, kteří mají po rozmražení více jak 40% progresivně pohyblivých spermií. Špatně mrazitelní jsou potom ti, kteří mají progresivní motilitu okolo 20% (Hoffman et.al., 2011). Kuisma et.al. (2006) odhadli, že asi 20% hřebců je dobře mrazitelných a dalších 20 % je špatně mrazitelných a většina hřebců (tedy 60%) produkuje sperma nevhodné k mražení, avšak lze jej technikami mrazení úspěšně kryokonzervovat.

Vzhledem k tomu, že je zhruba 20% špatně mrazitelných hřebců zaměřili jsme se v této diplomové práci právě na inseminační dávky od takových hřebců. Jejich motilita, po rozmražení, byla 20 % a méně.

Výsledky této práce ukazují, že celková motilita klesla po 30 minutách inkubace nižší u všech ID, jak u kontrolní tak i u semenné a supersemenné plazmy. Při hodnocení vlivu přídatku semenné nebo supersemenné plazmy na celkovou motilitu nebyl prokázán významný efekt. Dále byl hodnocen vliv doby inkubace na progresivní motilitu. Z výsledků vyplývá, že opět došlo k poklesu průměrných hodnot po 30 minutách. Největší pokles byl zaznamenán u ID, kam byla přidávána semenná plazma a nejlepší výsledky, s nejvyššími hodnotami, měla kontrolní skupina. Vliv přídatku semenné nebo supersemenné plazmy, na progresivní motilitu, nebyl prokázán. Aurich et. al. (1996) testovali přidání 30 % semenné plazmy od dobře mrazitelných hřebců (tedy s motilitou spermií, která se pohybuje okolo 30% a více po rozmražení), ke spermiím hřebců s špatnou pohyblivostí, a uvádějí, že semenná plazma zvýšila procento progresivně motilních spermií. Pokud se ke spermiím přidala SP od špatně mrazitelného hřebce, snížila se motilitu spermií po rozmražení z $36,0 \pm 1,6 \%$ na $32,0 \pm 3,7 \%$ ($p < 0,05$). Oproti tomu De Andrade et.al. (2011) ve své publikaci taktéž hodnotí přidání semenné plazmy (SP) ke hřebčím spermiím po rozmražení a uvádějí, že přidání 20% SP, což je ještě o 11,3% méně než bylo přidáváno v této diplomové práci, po rozmražení motilitu nemění. Vliv SP se hodnotí i u epididimálních spermií a účinky popisují například Neuhauser et. al. (2014) kteří uvádějí, že při přidání 20% - 50% SP, dochází k aktivačním účinkům spermií – tedy dochází k jejich zvýšenému pohybu. Při dalším zvyšování procentuálního podílu semenné plazmy se již žádné vlivy na spermie neprojevovaly, nicméně v této práci, u ejakulovaných spermiím, se přidání semenné plazmy (konkrétně 33,3%) neprokázalo jako účinné pro zvýšení jejich aktivity. Jak vyplývá z mnoha publikací, na motilitu spermií nemá dobrý efekt dlouhodobá inkubace, jelikož dochází ke snižování

pohyblivosti spermií. Výsledky uvedených prací ukazují, že pokud se ke špatně mrazitelným spermiím hřebců přidá SP od dobře mrazitelných hřebců, zvýší se motilita. Ve srovnání s touto diplomovou prací se ovšem práce neshodují, jelikož jsme hodnotili ID od špatně mrazitelných hřebců a tudíž docházelo k poklesům v motilitě. I přes to, že práce Neuhauser et. al. (2014) je hodnocena na epididimálních spermiích ukazuje, že příliš vysoké procento SP nezlepšuje motilitu spermií a dokonce dochází k jejímu snižování. Proto lze říci, že nižší procento SP je lepší pro zvýšení motility.

Dále byly v to diplomové práci hodnoceny jednotlivé kinematické parametry spermií. Z výsledků vyplývá, že přidání 33,3% semenné nebo supersemenné plazmy má statisticky průkazný vliv na všechny kinematické parametry v čase T0 i T30 ($p < 0,05$).

Výsledky ukazují, že hodnoty VAP, VCL a VSL signifikantně narostly v čase T0, oproti kontrole což značí lepší motilitu a tím i potenciální schopnost spermie uplavat delší vzdálenost. Stejně statisticky významné výsledky ($p < 0,05$) byly zaznamenány u těchto parametrů v čase T30 až na parametr VCL u kterého jsme zaznamenaly pokles hodnot oproti kontrole. Při hodnocení vlivu doby inkubace na kinematické parametry, byl zjištěn u jednotlivých ID mezi experimentálními skupinami, byl zjištěn signifikantní rozdíl. U kontrolní skupiny se parametry VAP a VSL statisticky významně snížily po 30 minutách inkubace a u VCL nebyl zjištěn významný rozdíl. U zkoumaných skupin semenné a supersemenné plazmy byl ve všech třech parametrech – VAP, VCL a VSL zjištěn statisticky významný rozdíl, kdy se hodnoty těchto parametrů snížily oproti kontrole ($p < 0,05$). Neuhauser et.al. (2014) ve své práci naopak uvádějí, že hodnoty VAP a BCF stoupají, u epididimálních spermií, s rostoucí koncentrací semenné plazmy. Toto pravidlo platí až do 50% semenné plazmy. Přičemž při přidání 80% a více docházelo ke snížení hodnot. Dále hodnoty VCL, VSL a ALH byly vyšší po přidání semenné plazmy s výjimkou VSL při 80% SP. Naproti tomu hodnoty LIN, STR a WOB klesly s rostoucí koncentrací SP. Braun a kol., (1994) v podobné práci uvádějí, že semenná plazma je schopna zvýšit motilitu bezprostředně po jejím přidání k ejakulovaným i epididimálním spermiím. Po delší době inkubace se tento efekt vytrácí. Z výsledků je patrné, že dlouhodobá konverzace spermiím příliš neprospívá a odráží se to právě na klesajících hodnotách kinematických parametrů, které jsme v této práci zaznamenali. Jak vidíme v práci Neuhauser et. al. (2014), který oproti této diplomové práci přidával ke spermiím o 16,7% (a více) semenné plazmy, větší množství SP nepřispívá ke zlepšení kinematických parametrů spermií, dokonce je od 80% zhoršovalo. Lepší výsledky těchto autorů můžeme přisuzovat tomu, že epididimální spermie do té doby nepřišly do styku se SP a tudíž přídavek plazmy by měl mít lepší účinnost nežli tomu je u ejakulovaných

spermií, které byly předmětem testování v této diplomové práci. Navíc se jednalo v této DP o ID od hřebců se špatnou mrazitelností ejakulátu, a jak vychází i z práce autorů Brauna a kol. (1994) přídavek SP není při dlouhodobé inkubaci schopen zajistit zvýšení pohyblivosti spermií.

V této práci byl kladen důraz i na problematiku subpopulací, které odrážejí problematiku motilitu. Je patrné, že na procentuelní zastoupení jednotlivých subpopulací v ejakulátu má vliv čas inkubace za současného porovnání jednotlivých roztoků. Byl prokázán významný rozdíl mezi kontrolou a semennou plazmou, po 30 minutách, kdy po přidání semenné plazmy došlo ke zvýšení procentuálního zastoupení rychlých spermií ve středněrychlé subpopulaci. Při porovnávání kontroly a supersemenné plazmy po 30 minutách byl prokázán významný vliv supersemenné plazmy na středně rychlé spermie, ale skupina rychlých spermií zůstala nezměněna. Dále byly v diplomové práci porovnávány plazmy mezi sebou a neprokázal se statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). Autoři Šichtař a kol. (2017) se zabývali vlivem různých ředitel na distribuci subpopulací spermií v ejakulátu, jak čerstvém tak mraženém. S důrazem na jejich motilitu. Výsledky ukázaly, že různá ředidla ovlivňují podíl zastoupení hřebčích spermií v subpopulacích, které byly pomalé, střední a rychlé přičemž se ukázalo ředidlo Gent jako lepší. Tato práce se sice nezabývala přídavkem semenné plazmy a jejím vlivem na subpopulace spermií, ovšem lze na ní ukázat, i to, co uvádějí ve své práci Simonik et al. (2015), že zkoumání a hodnocení různých vlivů na subpopulace v ejakulátu hřebců velmi dobře odráží kvalitu a biologické vlastnosti ejakulátu a dává nám lepší obraz o tom, jak na spermie působí různé vlivy.

V práci byl také hodnocen vliv přídavku semenné plazmy na integritu plazmatické membrány. Je patrné, že přidání semenné plazmy ovlivňuje významně procento spermií, které mají neporušenou plazmatickou membránu ($p < 0,05$). Signifikantně se snižuje procento spermií s neporušenou integritou plazmatické membránou u semenné plazmy oproti kontrole v čase T30. Vliv doby inkubace je statisticky významný ($p < 0,05$) u semenné plazmy dojde k poklesu hodnot. Přídavek semenné plazmy nijak neovlivnil procento spermií s neporušenou plazmatickou membránou, po 30 minutách – spermie si udržely svou integritu po této době. De Andrade et.al. (2011) ve své studii uvádějí, že přidání 20 % SP k hřebčím spermiím, po rozmražení, zvyšuje plazmatickou a membránovou integritu a podobně jako u hřebců i u beranů Ollero et. al. (1997) se hodnotí vliv semenné plazmy na spermie. Autoři uvádějí, že po podání SP po rozmražení, nebo alespoň její frakce, zvyšuje akrosomální a plazmatickou membránovou integritu, životaschopnost a motilitu. Coyan et. al. (2011) zkoumali účinky

cysteinu a ergothioneinu na rozmražené beraní spermie a z výsledků vyplývá, že přídavek těchto porovnávaných látek neovlivnil integritu membrány akrozomu spermie.

García et. al. (2008) zkoumali vliv takzvané single-layer (SLC) centrifugace s kombinací přídavku Androcoll-ETM na rozmražené hřebčí spermie a na to, jaký vliv na integritu membrány tento postup bude mít. Zjistili, že se výrazně zlepšil zastoupení spermii s neporušenou integritou plazmatické membrány. Výsledky byly srovnatelné s čerstvým ejakulátem. Při srovnání s touto diplomovou prací můžeme soudit, že rozdílné výsledky s De Andrade et. al. (2011) jsou způsobeny tím, že v této diplomové práci byly použity ID od špatně mrazitelných hřebců, kdežto autoři práce využili ve své studii hřebce s prokázanou plodností. Coyan et. al. (2011) nezaznamenali významný vliv testovaných látek na integritu membrány a ani v této diplomové práci nebyl zaznamenán efekt semenné plazmy na rozmražené hřebčí spermie, proto lze očekávat, že přídavek semenné plazmy nemá podpůrné účinky na integritu membrány u rozmražených spermii a to může dokazovat i fakt, že u publikace autorů García et. al. (2008) se integrita při dané technice zpracování ejakulátu zlepšila a tedy lze říci, že záleží, do jakých médií se spermie dávají.

Z výsledků hodnocení viability spermii vyplývá, že nebyl statisticky významný rozdíl po přidání semenné a supersemenné plazmy ani v čase T0 ani po 30 minutách inkubace. Statisticky významná rozdíl vlivem doby inkubace byl zaznamenán u supersemenné plazmy oproti kontrole, kdy došlo k poklesu hodnot ($P > 0,05$). Naopak De Andrade et. al. (2011) ve své práci uvádějí vliv přídavku semenné plazmy k hřebčím spermii po rozmrazení a zmiňují, že je to klíčový moment, jelikož odstraněním semenné plazmy před mražením a její opětovné přidání, zlepšilo životaschopnost spermii. Ollero et. al. (1997) ve své práci uvádějí, že i u beranů má vliv semenné plazmy na spermie při kryokonzervaci. Tento účinek lze pozorovat po rozmrazení, kdy dojde k zvýšení viability. Dalším faktem je, že po podání SP po rozmrazení, nebo alespoň její frakce, zvyšuje životaschopnost spermii beranů. I přes to, že práce Ollero et. al. (1997) a De Andrade et. al. (2011) uvádějí pozitivní vliv SP na spermie po rozmrazení a v této DP jsme nepotvrdili příznivý účinek na viabilitu po přidání semenné ani supersemenné plazmy, je důležité, že nedošlo alespoň k poklesu procentuálního zastoupení a je možné, že jsou tyto výsledky ovlivněny právě tím, že se jednalo o spermie špatně mrazitelných hřebců a také je třeba zmínit fakt, který je známi i z mnoha publikací, například Watson (2000), na spermie má vliv mnoho faktorů včetně doby inkubace nebo typů ředidel, která jsou při manipulaci s nimi použita a mohou snížit životaschopnost spermii.

7 Závěr

V této diplomové práci byla potvrzena hypotéza, že přídavek semenné plazmy má vliv na kryokonzervované hřebčí spermie. Z výsledků vyplynuly následující závěry.

- Na celkovou a progresivní motilitu rozmražených hřebčích spermií se vliv přídavku semenné a supersemenné plazmy neprojevil.
- Většina kinematických parametrů, až na VCL, se zvýšila, po přidání semenné a supersemenné plazmy.
- Procentuální zastoupení subpopulací, se signifikantně zvýšilo, po 30 minutách inkubace, po přidání semenné a supersemenné plazmy.
- Integrita plazmatické membrány se, po přidání semenné plazmy, signifikantně snížila. Přidání supersemenné plazmy se neprojevilo na procentuální zastoupení spermií s neporušenou membránovou integritou.
- Na viabilitu rozmražených hřebčích spermií se vliv semenné a supersemenné plazmy neprojevil.

Závěrem lze říci, že semenná plazma pozitivně ovlivňuje hřebčí ejakulát od špatně mrazitelných hřebců, přičemž nebyl prokázán rozdílný nebo efektivnější vliv supersemenné plazmy, která byla od dobře mrazitelného hřebce, oproti semenné plazmě od průměrně mrazitelného hřebce.

8 Literatura

- Al-Essawe, E. M., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., Morell, J.M. 2018. Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*. 17. 30257-2
- Amann, R. P. 1981. Spermatogenesis in the stallion: a review. *Equine veterinary science*. 1(4). 131-139.
- Amann, R. P., Pickett, B. W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Special review. *Equine veterinary science*. 7(3). 145-173.
- Aurich, J. E., Kühne, A., Hoppe, H., Aurich, C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Elsevier*. 46. 791-797.
- Awad, M.M., Graham, J.K. 2003. A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the chondrial surface of cattle fat. *Animal Reproduction Science*. 84. 83-92.
- Barrientos-Morales, M., Barrientos-Villeda, M., Domínguez-Mancera, B., Pinos-Rodríguez, J. M., Jaárez-Mosqueda, M.L. 2018. Effect of supplemental seminal plasma on cryopreserved boar sperm quality. *South African Journal of Animal Science*. 48 (1).
- Contreras-Mendez, L. A., Medrano, A. 2015. A comparative study of two cooling protocols on stallion sperm cryosurvival. *Andrologia*. 48 (5). 558-563.
- Davies-Morel, M. 2005. *Breeding horses*. Blackwell Publishing. 225. ISBN-13 978-14051-2966-4
- De Andrade, A.F.C., Zaffalon, F. C., Celeghini, E.C.C., Nascimento, J., Tarragó, O.F.B., Martins, S.M.M.K., Alonso, M.A., Arruda, R.P. 2011. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: What is the effect on sperm cell viability? *Reproduction in domestic animals*. 46. 682-686.
- Coyan, K. Basqinar, N., Bucak, M. N., Akalin, P. P. 2011. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *ScienceDirect. Elsevier*. 63 (1). 1-6.

- Dušek, J., a kol. 2011. Chov koní. Brázda. Praha. 400 s. ISBN: 978-80-209-0388-4
- Fernández-Gago, R., Domínguez, J. C., Martínez-Pastor, F. 2013. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. 80 (4). 400-410.
- Fernández-Gago, R., Álvarez-Rodríguez, M., Alonso, M. E., Ramiro González, J.R., Juan, C., Martínez-Pastor, J.C.D., Martínez-Pastor, F. 2016. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations. *Reproduction, Fertility and Development*. 29 (8) 1576-1584.
- Ferreira, V. D. S. Mello, M. R. B. D., Onseca, C. E. M. D., Dias, Á. C. F., Cardoso, J. M., Silva, R.B., Martins Júnior, W.P. 2014. Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 43 (10). 513-518.
- Gunay, U., Dogan, I., Nur, Z., Manalov, I., Sagirkaya, H., Soylu, M. K., Alpınar, L. 2006). Influence of bull seminal plasma on post-thaw ram semen parameters and fertility. *BULLETIN-VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY*. 50 (4), 503.
- Garvía, B. M., Morell, J. M., Ortega-Ferrusola, C., González-Fernández, L., Tapia, J. A., Rodríguez-Martínez, H., Peña, F. J. 2009. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Animal reproduction science*. 114 (1-3), 193-202.
- Green S., Fleming, S.D. 1997: Principles and practise of semen cryopreservation. In: G1 Meniru et al, Eds., *A handbook of intrauterine insemination*. Cambridge University Press, Cambridge: 163-189.
- Holt, W. V. 2000. Basis aspect of frozen storage of semen. *Animal and Reproduction science*. 62 (1-3). 3-22.
- Jasko, D. J. 1992. Evaluation of stallion semen. *Veterinary clinics of north american equine practice*. 8(1). 129-148.
- Jelínek, P., Koudela, K. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická fakulta. Brno. 414 s. ISBN: 80-7157-644-1.

- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Zaneveld, J. D. 1992. The hypoosmotic swelling test and update. Hemisphere publishing corporation. 29. 105-116.
- Kareskoski, M., Katila, T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. Elsevier. Animal Reproduction Science. 107. 249-256.
- Kittnar, O. a kol. 2011. Lékařská fyziologie. Grada. 800 s. ISBN: 978-80-247-3068-4
- Kirk, E. S., Squires, E. L., Graham, J.K., 2005. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. Theriogenology 64, 1422–1439.
- Komárek V. et al. (1964): Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství. Praha, 1. vyd., 387 s.
- Kordan, W., Holody, D., Eriksson, B., Fraser, L., Rodriguez-Martinez, H., Strzezek, J. 1998. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) – a placental peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. Reproduction Domestic Animal. 33: 347-54
- Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E., Katila, T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. 48 (1): 14.
- Louda, F. A kol. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Živočišná výroba. Česká zemědělská univerzita. Praha. 225 s. ISBN: 80-213-0702-1.
- Mahadevan, M., Trounson, A. O. 1983: Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. Andrologia 15: 355-366.
- Mammadeh, ME, AI Hassani, S., Rosenbaum, P., Schmidt, W., Fisher, H. C. 2008. Reactive oxygen species, total anti-oxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. Arch. Gynecol. Obstet. 277: 515-26.
- Marvan, F. A kol. 2011. Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita. Praha. Brázda. 304 s. ISBN: 978-80-213-2188-5.
- Maxwell, W. M. C., De Graaf, S. P., Ghaoui, R. E., Evans, G. 2006. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. Society of Reproduction and Fertility supplement 64, 13.

- McCue, P. M. 2014. Evaluation of pH and osmolarity of semen. *Equine reproductive procedures*, first edition. 399-400.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W.E., Varner D.D. 2011. *Equine Reproduction*. Second edition. Volume 1. Wiley-Blackwell. 3056 p. ISBN-13: 978-0-8138-1971-6/2011.
- Moore, A. I., Squires, E. L., Graham, J. K. 2004. Effect o seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 63 (9). 2372-2381.
- Monteiro, G.A., Papa, F.O., Zahn, F.S., Dellaqua, J.A., Melo, C.M., Maziero, R.R.D., Avanzi, B.R., Alvarenga, M.A., Guasti, P.N. 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Elsevier*. 127. 197-201.
- Morrell, J. M., Nunes, M. M. 2016. Practical guide to single layer centrifugation of stallion semen. *Equine Veterinary Education*. 28 (10). 535-591.
- Nawroth, F. et al. 2002: Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Letters* 23: 93-102.
- Neuhauser, S, Dörfel, S, Handler, J. 2015. Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. *Andrology*. 3 (3). 536-543.
- Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M. 2009. Seminal plalsma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*. 71 (3). 491-498.
- Ollero, M., Cebrian-Perez, J.A., Muiño-Blanco, T. 1997. Improvement of cryopreservation ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *Journal of Andrology*. 18(6). 732-739.
- Ollero, M., Cebrian-Perez, J. A., Muiño-Blanco, T. 2013. Improvement od cryoprecerved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. 18 (6).
- Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, A., Muino Blanco, T. 2001. Semen plasma proteins prevent coldshock membráně daamge to ram spermatozoa. *Theriogenology*. 56: 425-34.

Rueda, F. L., Herrera, R., Arbeláez, L.F., Garcés, T., Velásquez, H., Peña, M.A., Cardozo, J.A. 2013. Increase in post-thaw viability by adding seminal plasma proteins to Sanmartinero and Zebu sperm. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 26 (2). 98-107.

Samper, J. C. 2008. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Elsevier Health Sciences. 336 p. ISBN: 9781437711226.

Saragusty, J., Gacitua, H., Pettit, M.T., Arav, A. 2007. Directional Freezing of Equine Semen in Large Volumes. *Reproduction in Domestic animals*. 42 (6). 610-615.

Šichtař, J., Nehasilová, A., Šimoník, O., Bubeníčková, F. 2017. Effect of two freezing extenders on characteristic of fresh and frozen-thawed semen in endangered old Kladruber stallions – A pilot study. *Czech J. Animal Science*. 62 (6). 227-233.

Simonik O., Sichter J., Krejcarkova A., Rajmon R., Stadnik L., Beran J., Dolezalova M., Biniova Z. (2015): Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85, 3–11.

Thachil, J. V., Jewett, M. A. 1981. Preservation techniques of human semen. *Fert. Steril*. 37. 100-103.

Torres, M. A., Díaz, R., Boguen, R., Martins, SMMK, Ravagnani, G. M., Leal, D. F., et. al. 2016. Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It? *PLoS ONE*. 11 (8).

Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. 2004. Brno. ISBN: 80-86895-01-7.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61. 481-492.