

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**Zemědělská fakulta**

---

**AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Kvalita ejakulátu hřebců působících v inseminaci**

**Ing. Jana Vokrouhlíková**

---

**České Budějovice**

**2022**

## **Autoreferát disertační práce**

**Doktorand:**           **Ing. Jana Vokrouhliková**

**Studijní program:**   Zootechnika

**Studijní obor:**       Speciální zootechnika

**Název práce:**       Hodnocení ejakulátu hřebců působících v inseminaci

**Školitel:**             doc. Ing. Jan Beran, Ph.D.

**Oponenti:**

Obhajoba disertační práce se koná dne . . 2022 v hod. v .....ZF JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

## OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>1. ÚVOD</b> .....	7
<b>2. HYPOTÉZA</b> .....	8
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	9
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	10
<b>4.1 Materiál</b> .....	10
<b>4.2 Metodika</b> .....	10
<b>4.3 Zpracování dat</b> .....	13
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	15
<b>5.1 Hodnocení základních charakteristik ejakulátu hřebců metodou CASA</b> .....	15
<b>6.2 Posouzení morfometrických parametrů hlaviček spermíí</b> .....	17
<b>6.3 Posouzení pohybových charakteristik spermíí v závislosti na morfometrickém měření hlaviček</b> .....	19
<b>6.4 Vliv vybraných ředidel na motilitu a životaschopnost spermíí</b> .....	23
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	28
<b>7. SOUHRN A DOPORUČENÍ PRO PRAXI</b> .....	31
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	32
<b>9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKOVANÝCH PRACÍ</b> .....	37

## ABSTRAKT

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

In Experiment 2, 21 ejaculates from 11 stallions were collected before the beginning of the breeding season 2018 and diluted with Kenney, EquiPlus and INRA 96. Spermatozoa viability (VIT, %), total motility (MOT, %), progressive motility (PMOT, %) and selected kinematic parameters were evaluated for 63 semen samples. These parameters were

determined 2 hours after semen processing and then in 24, 48 and 72-hour intervals of storage at 5 °C.

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

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

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

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

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

## 1. ÚVOD

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

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

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

Na kvalitním ejakulátu závisí úspěšnost inseminace a zabřeznutí klisny, proto musí získaný ejakulát splňovat požadované parametry. Analýza ejakulátu je v současné době nejvíce používaným postupem pro hodnocení plodnosti samců. Jelikož plodnost patří mezi vlastnosti s nízkou dědivostí, je ve větší míře ovlivněna komplexem prostředí. Především u umělé inseminace je proto významná činnost chovatele, zahrnující management chovu, vlastní odběr ejakulátu a jeho následné zpracování a konzervaci pro použití k umělé inseminaci. Kvalita ejakulátu tedy závisí na mnoha vnějších i vnitřních faktorech. Při použití umělé inseminace je velmi významným vlivem také výběr vhodného ředidla, pro zachování co nejlepší oplozovací schopnosti odebraného ejakulátu.

## 2. HYPOTÉZA

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

Pro zpracování práce byly formulovány následující hypotézy:

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



### 3. CÍL PRÁCE

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

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

V návaznosti na formulované hypotézy byly stanoveny následující cíle práce:

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

## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Materiál**

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

### **4.2 Metodika**

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

Vlastní odběry ejakulátu probíhaly v prostorách Zemského hřebčince v Písku. Hřebci byli odebíráni na fantomu za přítomnosti klisny. Všichni hřebci měli během připouštěcí sezóny stejnou frekvenci odběru ejakulátu (2 až 3 krát za týden). Sperma bylo odebíráno do uzavřené umělé vagíny typu Colorado, v jejímž vnitřním prostoru byl umístěn jednorázový sběrač ejakulátu z PVC folie. Bezprostředně po odběru byl odebraný ejakulát filtrován přes sterilní gázu a následně byl zaznamenán objem ejakulátu (kalibrovaná kádinka temperovaná na teplotu 37 °C). Poté bylo sperma naředěno předeřátým ředidlem (37 °C) v poměru 1:1-2. Naředěné vzorky ejakulátů byly 20 minut ekvilibrovány při pokojové teplotě bez přístupu světla a následně byly umístěny do chladničky, kde proběhlo zchlazení na 5 °C. Takto zchlazené vzorky ejakulátu byly převezeny do laboratoře ZF JU v Českých Budějovicích, kde byly vyhodnoceny ostatní parametry pomocí objektivní metody CASA (počítačové analýzy spermatu) za použití komerčního systému SCA (Sperm Class Analyzer, Microptic SL, Barcelona, Španělsko). Součástí tohoto systému je optický mikroskop (Nikon ECLIPSE E200LED MV Series) s fázovým kontrastem a vyhřívaným stolcem (37 °C), digitální kamera (Basler Color) zabudovaná v mikroskopu pro zachycení obrazů a jejich přenosu do počítače (Genuine Intel Core i5).

#### **4.2.1 Hodnocení základních charakteristik ejakulátu hřebců a posouzení pohybových charakteristik spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček**

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

Motilita spermií byla objektivně stanovena prostřednictvím modulu Sperm Class Analyzer® Motility and concentration. Tento modul pro automatickou analýzu motility a koncentrace spermií je založen na analýze 16 na sebe navazujících digitalizovaných fotografických snímků získaných z jednoho pole. Těchto 16 po sobě jdoucích fotografií je pořízeno s odstupem 0,64 s, což znamená rychlost snímání obrazu jedné fotografie každých 40 ms. Spermie jsou detekovány automaticky. Vzorky jsou analyzovány pod negativním fázovým kontrastem (Ph-) a 10x objektivem (100x zvětšení) se zeleným filtrem. Pro analýzu byla ze vzorků spermatu odebrána alikvota, která byla předeřhřáta na teplotu 37 °C po dobu 10 minut. Předeřhřáté Leja podložní sklíčko (4komorové, hloubka 20 mikronů) bylo naplněno 3  $\mu$ l naředěného a předeřhřátého spermatu a bylo hodnoceno 10 zorných polí. Finální koncentrace spermií po analýze byla 30 - 50 x 10<sup>6</sup>/ml, přičemž v jednom zorném poli bylo analyzováno přibližně 100 - 200 spermií. U vzorků spermatu byly hodnoceny následující parametry - MOT (celková motilita, %), PMOT (progresivní motilita, %), VAP (průměrná rychlost,  $\mu$ m/s), VCL (křivočará rychlost,  $\mu$ m/s), VSL (přímočará rychlost,  $\mu$ m/s), STR (přímota, VSL/VAP, %), LIN (linearita, VSL/VCL, %), WOB (kmitání, VAP/VCL, %), ALH (amplituda bočního pohybu hlavičky,  $\mu$ m) a BCF (frekvence kmitání, Hz). Podle křivočaré rychlosti (VCL) byly spermie rozlišeny podle rychlosti pohybu na rychlé (> 90  $\mu$ m/s), středně rychlé (45 – 90  $\mu$ m/s), pomalé (10 – 45  $\mu$ m/s) a statické. Spermie byly považovány za progresivní při nejméně 75 % přímoti (STR). Ve stejném modulu byla současně s hodnocením motility objektivně stanovena také koncentrace spermií v M/ml

Vitalita (životaschopnost) spermií byla systémem Sperm Class Analyzer® Vitality modul analyzována za pomoci fluorescenčního barvení vzorku ejakulátu, kdy živé spermie

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

Morfometrická analýza hlaviček spermií byla hodnocena s použitím Sperm Class Analyzer® Morphology module. Preparát byl zhotoven z 20 µl spermatu, ze kterých byl na podložním sklíčku proveden roztěr a po zaschnutí obarven barvivem SpermBlue (Microptic SL). Po zaschnutí použitého barviva byly vzorky fixovány za použití Eukitt mounting media (Microptic SL) a krycího sklíčka. Pro hodnocení morfologie byl na mikroskopu nastaven modrý filtr, 100x objektiv s olejovou imerzí a procházející světlo (A). V každém preparátu bylo analyzováno 100 spermií. Spermie byly analyzovány náhodně v různých oblastech preparátu, bez překrývajících se spermií. Digitalizované buňky byly automaticky segmentovány na základě automatického algoritmu pro definování kontrastu mezi buňkou a polem. SCA systém detekuje hranici hlaviček spermií a spojovacích částí. Za účelem získání správného obrazu musí spermie kontrastovat s pozadím vzorku a nesmí být přítomny žádné částice, které by zasahovaly do zobrazení spermií. U všech analyzovaných spermií bylo automaticky vypočítáno osm morfometrických parametrů, čtyři definující velikost hlavičky – délka (L, µm), šířka (W, µm), plocha (A, µm<sup>2</sup>) a obvod (P, µm) hlavičky a čtyři derivované parametry pro tvar hlavičky – eliptičnost (Elip = L/W), drsnost (Rugo =  $4\pi A/P^2$ ), prodloužení (Elong =  $(L-W)/(L+W)$ ) a pravidelnost (Regu =  $\pi LW/4A$ ). Rozměry jednotlivých spermií byly zaznamenány v programu Microsoft Exel.

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

#### 4.2.2 Vliv vybraných ředidel na motilitu a životaschopnost spermií

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

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

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

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

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

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

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

#### 4.3 Zpracování dat

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

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

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

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

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

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Hodnocení základních charakteristik ejakulátu hřebců metodou CASA

Tabulky 1 a 2 znázorňují popisné statistiky pro objem ejakulátu, koncentraci spermií, celkovou motilitu, progresivní motilitu, vitalitu spermií a procento morfologicky normálních spermií. Dosažené průměrné hodnoty základních parametrů ejakulátu jsou v souladu s požadavky na sperma pro krátkodobou konzervaci a dále také s prací **Quintero-Moreno et al. (2003)**, kde byl zjištěn průměrný objem ejakulátu 49,2 ml, koncentrace spermií 304,8 x 10<sup>6</sup>/ml a celková motilita 88,9 % a s prací **Hidalgo et al. (2005)** (objem ejakulátu 43 ml, koncentrace spermií 169 x 10<sup>6</sup>/ml, celková motilita 77 % a 72 % morfologicky normálních spermií. V práci **Florez-Rodriguez et al. (2014)** byly u chlazeného spermatu (5 °C) měřeny stejné parametry, které se v závislosti na použitém ředidle pohybovaly v následujícím rozmezí: celková motilita 80,3 až 85,4 %, progresivní motilita 29,2 až 35,6 %, Ve studii **Rezagholizadeh et al. (2015)** byla zjištěna celkové motilita 87,06 %, progresivní motilita 44,54 %,

**Tabulka 1** Popisné statistiky základních charakteristik ejakulátu hřebců v roce 2016

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

**Tabulka 2** Popisné statistiky základních charakteristik ejakulátu hřebců v roce 2017

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

Motilita spermií byla dále charakterizována jednotlivými kinematickými parametry, jejichž průměrné hodnoty za rok 2016 a 2017 jsou znázorněny v tabulkách 3 a 4. Podobné hodnoty kinematických parametrů motility byly zjištěny autory **Quintero-Moreno et al. (2003)** (VAP 40,3  $\mu\text{m/s}$ , LIN 56,13 %, WOB 64,7 % a BCF 13,56 Hz) a rovněž také **De la**

**Cueva et al. (1997)** (VAP 32,5  $\mu\text{m/s}$ , LIN 47,5 %, STR 60,8 %, BCF 7,27 Hz). V obou těchto pracích byl pro hodnocení uvedených parametrů využit rovněž systém SCA.

Ve studii **Rezagholizadeh et al. (2015)** byly zjištěny vyšší hodnoty kinematických parametrů, zejména parametrů rychlosti pohybu (VCL 189,33  $\mu\text{m/s}$ , VSL 82,88  $\mu\text{m/s}$ , VAP 113,52  $\mu\text{m/s}$ , STR 72,20 %, LIN 45,57 %, ALH 6,68  $\mu\text{m}$  a BCF 34,15 Hz). V práci **Florez-Rodriguez et al. (2014)** byly u chlazeného spermatu (5 °C) měřeny stejné parametry, které se v závislosti na použitém ředidle pohybovaly v následujícím rozmezí: VCL 188,7 až 284,5  $\mu\text{m/s}$ , VSL 68,6 až 91,8  $\mu\text{m/s}$ , VAP 97,6 až 151,7  $\mu\text{m/s}$ , STR 59,9 až 70,2 %, LIN 34,4 až 39,4 %, ALH 6,7 až 9,1  $\mu\text{m}$  a BCF 33,0 až 36,1 Hz. Kinematické parametry motility byly zde hodnoceny systémem HTM, Hamilton-Thorne Research. V obou zmíněných pracích se průměrné hodnoty pro parametry rychlosti (VCL, VSP, VAP) a parametry ALH a BCF výrazně lišily od výsledků zjištěných v této práci (získané hodnoty byly nižší o více než 50 %). Oproti tomu vypočtené parametry, které jsou relativní (STR a LIN), byly ve všech studiích porovnatelné.

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



**Tabulka 3** Popisné statistiky kinematických parametrů motility spermií za rok 2016

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

**Tabulka 4** Popisné statistiky kinematických parametrů motility spermií za rok 2017

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

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

## 6.2 Posouzení morfometrických parametrů hlaviček spermií

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

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

Průměrné hodnoty pro plochu hlavičky 15,65 a 16,37  $\mu\text{m}^2$  byly vyšší než hodnoty 14,33  $\mu\text{m}^2$ , 13,42  $\mu\text{m}^2$ , 13,31  $\mu\text{m}^2$ , 13,22  $\mu\text{m}^2$ , 11,37  $\mu\text{m}^2$  a 11,22  $\mu\text{m}^2$  zjištěné autory **Waheed et al. (2015)**, **Hidalgo et al. (2005)**, **Gravance et al. (1997)**, **Davis et al. (1993)**, **Casey et al. (1997)** a **Gravance et al. (1996)**. Zjištěné hodnoty ovšem korespondují s prací **Brito (2007)**, kde je uváděno rozmezí plochy hlavičky 11,43 až 16,28  $\mu\text{m}^2$ . Stejně tak průměrný obvod hlavičky 16,26 a 16,55  $\mu\text{m}$  byl větší než hodnoty 14,16  $\mu\text{m}$ , 14,92  $\mu\text{m}$ , 15,54  $\mu\text{m}$ , 15,00  $\mu\text{m}$ , 13,79  $\mu\text{m}$  a 13,64  $\mu\text{m}$  zjištěné v pracích **Waheed et al. (2015)**, **Davis et al. (1993)**, **Gravance et al. (1997)**, **Hidalgo et al. (2005)**, **Casey et al. (1997)** a **Gravance et al. (1996)**. Střední hodnota pro obvod hlavičky spermií hřebce, uváděná **Britem (2007)**, je 13,76 až 15,64  $\mu\text{m}$ .

Morfometrické hodnoty, získané SCA systémem, mohou být ovlivněny použitou metodou barvení. Barvivo, které poskytuje intenzivnější úroveň šedi (grey-level), způsobuje zvětšení buněk, což ovlivňuje velikost morfometrických parametrů jako je délka, šířka, plocha a obvod hlavičky. Také zvyšující se doba barvení může zvýšit intenzitu a kontrast snímků a následně vést k větším rozměrům spermií (**Hidalgo et al., 2005**). Srovnávací studie **Banazsewské et al. (2015)** však ukázala, že rozměry spermií hřebců, obarvených barvivem SpermBlue, byly nejvíce podobné rozměrům spermií v neobarvených nátěrech.

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

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

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

**Tabulka 5** Popisné statistiky morfometrických parametrů hlaviček spermií v roce 2016

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

**Tabulka 6** Popisné statistiky morfometrických parametrů hlaviček spermií v roce 2017

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

### 6.3 Posouzení pohybových charakteristik spermií v závislosti na morfometrickém měření hlaviček

Je usuzováno, že morfologicky větší spermie jsou schopny produkovat více energie a pohybovat se rychleji (Tourmente et al., 2011; Sanchez et al., 2013). Dle Malo et al. (2006), spermie s větším prodloužením hlavičky mohou dosáhnout větší rychlosti a přímosti pohybu díky sníženému odporu a větší hydrodynamické efektivitě. Na základě těchto tvrzení byl proto hodnocen pozitivní vztah mezi kinematickými parametry spermií a morfometrickým tvarem hlaviček spermií.

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

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

Rezagholizadeh et al. (2015) ve své studii naopak zjistili, že plocha hlavičky byla pozitivně korelována s VCL a negativně korelována s PMOT, VSL, STR a LIN. Prodloužení

hlavičky bylo oproti tomu pozitivně korelováno s PMOT, VSL, STR a LIN a negativně korelováno s VCL. Spermie s větším prodloužením a menší plochou hlavičky tedy měly větší PMOT, VSL, STR a LIN. Na rozdíl od toho spermie s menším prodloužením a větší plochou měly větší VCL.

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

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

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

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

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

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

Dále existují domněnky, že morfometrické rozměry hlaviček spermií mohou mít souvislost s plodností (Casey et al., 1997). Vztah mezi morfometrií hlaviček spermií a plodností u koní naznačily některé studie (Casey et al., 1997). Brito (2007) uvedl, že rozměry hlaviček spermií hřebců se sníženou plodností se značně liší od rozměrů hlaviček spermií plodných hřebců. Ve studiích Gravance et al. (1996) a Casey et al. (1997) byly zjištěny významně vyšší hodnoty délky, šířky, obvodu a plochy hlaviček spermií

u subfertilních hřebců než u hřebců plodných. Spermie subfertilních hřebců byly také více zúžené.

Z výsledků tabulky 9 je patrné, že se snižující se plodností hřebců se snižovala i progresivní motilita spermií. Opačný trend vykazovalo procento abnormalit spermií, kdy se snižující se plodností došlo ke zvyšování procenta abnormálních spermií v ejakulátu. Tyto výsledky jsou v souladu se studií **Waheed et al. (2015)**, kde byli hřebci rozděleni do totožných skupin, podle jejich dosažené průměrné fertility, a jejichž výsledné procento abnormalit bylo podle skupin následující: 33,93 %, 35,60 %, 35,32 a 39,58 %. Vysoké procento morfologických abnormalit, spojené s nízkou plodností, popisují také studie **Chandler et al. (1988)**, **Jasko et al. (1990)** a **Barth et al. (1992)**.

V této práci byly rovněž zjištěny největší hodnoty délky a obvodu hlaviček u skupiny hřebců s nejnižší plodností. V rozporu s předchozími studii jsou ovšem zjištěné rozměry šířky a plochy hlaviček, které byly u této skupiny hřebců nejnižší. Poměr délky a šířky hlavičky se tedy postupně zvyšoval, což znamená, že hlavičky spermií hřebců s nízkou plodností byly více zúžené. Bylo tedy potvrzeno, že hlavičky spermií hřebců s nižší plodností měly větší délku a obvod hlavičky, a zároveň byly více zúžené.

**Tabulka 9** Progresivní motilita a vybrané morfometrické parametry hlaviček spermií ve vztahu k plodnosti hřebců

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

<sup>a,b,c</sup> Hodnoty s různými horními indexy pímen v řadě se průkazně liší (P < 0,05)

Další studie uvádí, že jednou z významných příčin variability morfologie spermií a morfometrických rozměrů je věk hřebců (**Quintero-Moreno et al., 2009; Banaszewska et al., 2011**).

Sledované parametry se významně lišily (P < 0,05) mezi jednotlivými věkovými skupinami (tabulka 10). Největší procento abnormalit spermií bylo zjištěno u mladých hřebců do 5 let (50,60 %). Nejmenší naopak u skupiny hřebců ve věku 6 až 15 let (18 %). Podobné

hodnoty byly popsány u věkových skupin v práci **Waheed et al. (2015)** (32,71 %, 50,92 % a 38,85 %), kde bylo ovšem nejvyšší procento abnormalit zjištěno u skupiny hřebců ve věku 10 až 14 let. Vysoké procento abnormalit spermií u mladých hřebců, zjištěné v této práci, může být vysvětleno testacním a sportovním zatížením této věkové skupiny. Toto je podpořeno prací **Samper (2009)**, který uvádí, že u mladých plemenných hřebců, zařazených do sportovní testace, může mít významný dopad na morfologii spermií absolvování sportovních soutěží v horkých letních měsících. Morfologie spermií může být ovlivněna nejen vysokými teplotami šourku, ale i dlouhodobým stresem v průběhu tréninku a soutěže. Dalším důvodem vysokého procenta abnormalit může být nezralá spermatogeneze u příliš mladých hřebců. Studie **Dowsett, Knott (1996)**, **Pickett (1993)** a **Amann et al. (1979)** uvádějí, že u hřebců mladších 3 let byla zjištěna horší kvalita spermatu, z hlediska celkového počtu spermií a abnormalit spermií.

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

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

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

**Tabulka 10** Vliv věku na progresivní motilitu a vybrané morfometrické parametry spermií

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

<sup>a,b,c</sup> Hodnoty s různými horními indexy pímen v řadě se průkazně liší (P < 0,05)

#### 6.4 Vliv vybraných ředidel na motilitu a životaschopnost spermií

Jelikož chemické složení ředidel je jedním z hlavních faktorů přežitelnosti spermií během konzervace, bylo cílem druhé části práce posoudit, zda ředidla s obsahem definovaných kaseinátů zlepšují kvalitativní ukazatele chlazeného spermatu hřebců.

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

**Tabulka 11** Vliv ředidla a doby skladování na motilitu a vitalitu chlazeného spermatu hodnocené analýzou variance s opakovaným měřením

Parametr	ředidlo	čas	čas*ředidlo
MOT (%)	**	***	-
PMOT (%)	**	***	**
Prog M/ml	+	***	-
VCL (μm/s)	**	***	*
VSL (μm/s)	*	***	-
VAP (μm/s)	**	***	-
VIT (%)	***	***	-

MOT, celková motilita; PMOT, progresivní motilita; prog M/mL, million progresivních spermií na mililitr; VAP, průměrná rychlost; VCL, křivočará rychlost; VSL, přímočará rychlost; VIT, vitalita.

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

Výsledky mnohonásobného porovnání (tabulka 12) ukazují, že celkový ochranný účinek ředidla INRA 96 byl významně lepší než u ejakulátů ředěných ředidlem Kenney ( $P < 0,01$ ). Hodnoty VIT, PMOT, VCL a VAP byly vyšší u vzorků spermatu ředěných ředidlem INRA 96 ( $P < 0,05$ ) než u vzorků ředěných ředidlem EquiPlus. Mezi ředidly Kenney a EquiPlus nebyl prokázán žádný rozdíl. Rozdíly v motilitě spermií mezi použitými ředidly, pozorované v této práci, souhlasí se zjištěním jiných autorů (**Pagl et al., 2006; LeFrappier et al., 2010; Janett et al., 2012; Neuhauser et al., 2018**). Dobré výsledky motility spermií, dosažené při použití ředidla INRA 96, odpovídají speciálnímu složení tohoto ředidla (**Pillet et al., 2008**). Výhodou tohoto ředidla je použití nativního fosfokaseinátu jako ochranného činidla (**da Silva et al., 2012**). Navíc i další látky, obsažené v tomto ředidle, pomáhají chránit spermie před škodlivými účinky dlouhodobého skladování při 5 °C v intervalu 72 hodin.

**Tabulka 12** Mnohonásobné porovnání ředidel INRA 96, EquiPlus a Kenney pomocí Tukeyova HSD testu v rámci hodnocených parametrů

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

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

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

Pro detailní ilustraci účinku tří různých ředidel byly parametry motility spermií chlazeného spermatu hodnoceny po 2, 24, 48 a 72 hodinách. Výsledky ukazují, že se jednotlivé parametry významně lišily mezi ředidly (tabulka 13). Za sledovanou dobu byly hodnoty všech parametrů nejvyšší při použití ředidla INRA 96.



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

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

<sup>a, b</sup> Různé horní indexy v řadě v rámci jednotlivých časových úseků naznačují významné rozdíly mezi ředidly (P < 0,05)

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

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

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

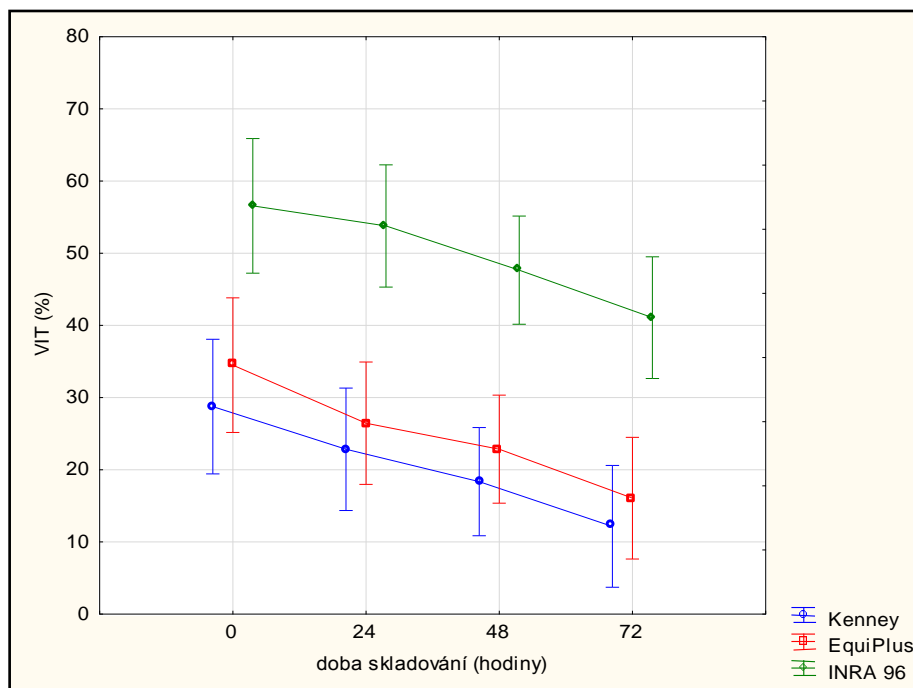
**Price et al. (2008)** a **Webb et al. (2009)** popisují, že motilita a rychlost spermií se často během skladování postupně zhoršují, což bylo potvrzeno u ředidel, jako je INRA 96 a ekvivalentní (**Webb et al., 2009**). Tato zjištění se shodují s našimi výsledky, ve kterých je patrný pokles hodnot všech hodnocených parametrů. V této studii si ředidlo INRA 96 udrželo nejvyšší PMOT ve srovnání s dalšími dvěma ředidly po celou dobu skladování. **Batellier et al. (2001)** uvedli, že INRA 96 je účinné ředidlo pro zachování fertilizačního potenciálu spermií po dobu alespoň 24 hodin. Zdá se také, že chrání buňky spermií během dlouhodobého skladování s větší účinností než tradiční mléčná ředidla.

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

V grafu 1 je znázorněno, že životaschopnost spermií se v průběhu sledovaného času velmi výrazně lišila mezi ředidly. Ve všech čtyřech sledovaných časech po dobu skladování

byla životaschopnost spermií výrazně vyšší u ředidla INRA 96 než u ředidel EquiPlus a Kenney.

**Graf 1** Procento vitálních spermií ve spermatu naředěném třemi různými ředidly během skladování při 5 °C po dobu 72 hodin



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

## 6. ZÁVĚR

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

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

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

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

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

Byl prokázán významný vliv hřebce. Mezi hřebci byly zjištěny významné individuální rozdíly ve všech hodnocených morfometrických parametrech a parametrech motility. Morfologie, včetně morfometrického měření hlaviček spermií hřebců, a PMOT byly dále

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

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

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

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

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

## 7. SOUHRN A DOPORUČENÍ PRO PRAXI

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

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

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

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Amann, R. P., Thompson, D. L., Squires, E. L., Pickett, B. W. (1979). Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement (27)*, 1-6.
- Aurich, C., Seeber, P., Müller-Schlösser, F. (2007). Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 °C. *Reproduction of Domestic Animals* 42(4), 445- 448.
- Banaszewska, D., Kondracki, S., Wysokinska, A. (2011). Effect of age on the dimensions and shape of spermatozoa of Large White Polish boars. *Archives Animal Breeding* 54(5), 504–514.
- Banaszewska, D., Czubaszek, M., Walczak-Jedrzejowska, R., Andraszek, K. (2015). Morphometric dimensions of the stallion sperm head depending on the staining method used. *Journal of Veterinary Research* 59(2), 263–270.
- Barth, A. D., Bowman, P. A., Bo, G. A., Mapletoft, R. J. (1992). Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. *The Canadian Veterinary Journal* 33(1), 31–39.
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M., Magistrini, M. (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 68(3-4),181-190.
- Bergeron, A., Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproductive Development* 73(10), 1338-1344.
- Bolaños, J. G., Morán, A. M., da Silva, C. B., Dávila, M. P., Muñoz, P. M., Aparicio, I. M., Pena, F. J. (2014). During cooled storage the extender influences processed autophagy marker light chain 3 (LC3B) of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 145(1-2), 40-46.
- Brito, L. F. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6(4), 249-264.
- Casey, P. J., Gravance, C. G., Davis, R. O., et al. (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 47(2), 575-582.



- da Silva, M. A. C., Seidel, G. E., Squires, E. L., Graham, J. K., Carnevale, E. M. (2012). Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reproduction* 143(5), 577-585.
- Davis, R. O., Gravance, C. G., Casey, P. J (1993). Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 54(11), 1808–1811.
- De La Cueva, F. C., Pujol, M. R., Rigau, T., Bonet, S., Miró, J., Briz, M., Rodriguez- Gill, J. E. (1997). Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 48(6), 947–968.
- Dhurvey, M., Gupta, V. K., Nema, S. P., Patidar, A., Shivhare, M., Singh, N., Shakya, V. (2012). Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *DHR-IJBLS* 3(1), 62-83.
- Dowsett, K. F., Knott, L. M. (1996). The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46(3), 397-412.
- Florez-Rodriguez, S. A., de Arruda, R. P., Alves, M. B. R., Affonso, F. J., Carvalho, H. F., Lemes, K. M., Celeghini, E. C. C (2014). Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science* 34(7), 911–917.
- Gehlen, H., Bartmann, C. P., Klug, E., Schoon, H. A. (2001). Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. *Journal of Equine Veterinary Science* 21(3), 137–139.
- Gravance, C. G., Liu, I. K., Davis, R. O., et al. (1996). Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 108(1), 41-46.
- Gravance, C. G., Champion, Z., Liu, I. K. M., Casey, P. J (1997). Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Animal Reproduction Science* 47(1-2), 149–55.
- Heckenbichler, S., Deichsel, K., Peters, P., Aurich, C. (2011). Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. *Theriogenology* 75(5), 849-856.
- Hidalgo, M., Rodriguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C. (2005). Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet Med-Czech* 50(1), 24-32.

- Chandler, J. E., Painter, C. L., Adkison, R. W., Memon, M. A., Hoyt, P. G. (1988). Semen Quality Characteristics of Dairy Goats. *Journal of Dairy Science* 71(6), 1638-1646.
- Ijaz, A., Ducharme, R. (1995). Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5 °C. *Theriogenology* 44(7), 1039- 1050.
- Janett, F., Sacher, K., Hassig, M., Thun, R. (2012). Quality of raw and of cold-stored semen in icelandic stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* 32(9), 590-595.
- Jasko, D. J., Lein, D. H., Foote, R. H. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197(3), 389–394.
- Kenney, R. M., Bergman, R. V., Cooper, W. L., Morse, G. W. (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, 327-336.
- Koyago, M., Nakada, K., Tsunoda, N., Moriyoshi, M., Sawamukai, Y. (2009). Change in morphology of spermatozoa from dismount semen during the breeding season in Thoroughbred stallions in Japan. *Journal of Equine Science* 20(1), 1-5.
- Kraemer, M., Fillion, C., Martin-Pont, B., Auger, J. (1998) Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer assisted sperm analysis system. *Human Reproduction* 13(3), 611–619.
- LeFrappier, L., Walston, L., Whisnant, C. S. (2010). Comparison of various extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. *Journal of Equine Veterinary Science* 30(4), 200-204.
- Love, C. C. (2012). Measurement of concentration and viability in stallion sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 32(8), 464-466.
- Malo, A. F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A. J., Roldan, E. R. S. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology Letters* 2(2), 246–249.
- Martins, H. S., Souza, M. R., Penna, C. F. A. M., Da Silva, G. C., Côrtes, S. F., Stahlberg, R., Lagares, M. A. (2016). Milk, caseinate and lactoferrin addition to equine semen cooling extenders. *Andrologia* 48(9), 950- 956.

- Neuhauser, S., Gösele, P., Handler, J. (2018). The effect of four different commercial semen extenders on the motility of stallion epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 62, 8-12.
- Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M., Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skimmed milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology* 66(5), 1115-1122.
- Ortega-Ferrusola, C., Johannisson, A., Vega, F. J. P., Tapia, J. A., Rodriguez Martinez, H., Dalin, A. M., Morrell, J. M. (2011). Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer centrifugation, through Androcoll-E. *Journal of Equine Veterinary Science* 31(7), 411-416.
- Pickett, B. W. (1993). Reproductive evaluation of the stallion. In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (eds), *Equine Reproduction Philadelphia, London: Lea and Febiger*, 755-768.
- Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Magistrini, M. (2008). High fertility rates with stallion sperm cryopreserved in INRA 96® based extender are not predicted by in vitro parameters. *Animal Reproduction Science* 3(107), 339-340.
- Price, S., Aurich, J., Davies-Morel, M., Aurich, C. (2008). Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 degrees C. *Reproduction in Domestic Animals* 43(3), 261-266.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A. T., Rodriguez-Gil, J. E. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59(9), 1973-1990.
- Quintero-Moreno, A., Gonzalez-Villalobos, D., Lopez-Brea, J. J. G., Estes, M. C., Fernandez-Santos, M. R., Carvalho-Crociata, J. L., Mejia-Silva, W., Leon-Atencio, G (2009). Morphometric evaluation of sperm head of domestic pig according their age. *Revista Científica* 19(2), 153–158.
- Rezagholizadeh, A., Gharagozlou, F., Niasari-Naslaji, A., Akbarinejad, V., Ziapour, S. (2015). Evaluation of sperm characteristics in Caspian stallions using computer-assisted sperm analysis. *Journal of Equine Veterinary Science* 35(6), 505-509.

- Samper, J. C. (2009). Equine breeding management and artificial insemination. *Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri*, ISBN 978-1-4160-5234-0, 310 s.
- Samper, J. C., Pycock, J. F., McKinnon, A. O. (2007). Current therapy in equine reproduction. *Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri*, ISBN 978-0-7216-0252-3, 492 s.
- Sanchez, M. V., Bastir, M., Roldan, E. R. S. (2013). Geometric morphometrics of rodent sperm head shape. *PLOS ONE*, 8(11).
- Swokowski, E. W., Olinick, M., Pence, D. (1994) Calculus. 6th ed. *Boston, USA: PWS publishing company*
- Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E. R. (2011). Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC evolutionary biology* 11(1), 1-10.
- Turner, R. M., Zeng, W. (2012). The emerging pathophysiology of age-related testicular degeneration with a focus on the stallion and an update on potential therapies. *Reproduction in domestic animals* 47, 178-186.
- Varner, D. D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70(3), 448 – 462.
- Věžník, Z. et al. (2004). Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. *Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně*, ISBN 80-86895-01-7, 266 s.
- Waheed, M. M., Ghoneim, I. M., Abdou, M. S. (2015). Morphometric characteristics of spermatozoa in the Arabian horse with regard to season, age, sperm concentration, and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* 35(3), 244–249.
- Webb, G. W., Dean, M. M., Humes, R. A., Heywood, J. S. (2009). A comparison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cold stored stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 29(4), 229-32.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*, 2nd ed., vol. 1. New York: Raven Press; 189-317.

## 9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

### **Impactované publikace:**

Křížková, J., Čoudková, V., Maršálek, M. (2017). Computer-Assisted Sperm Analysis of head morphometry and kinematic parameters in Warmblood stallions spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 57, 8-17.

### **Recenzované publikace:**

Křížková, J., Maršálek, M. (2016). Hodnocení kvality spermatu hřebců. *Náš chov*, Praha 2: ProfiPress, 2016(2). s. 74. ISSN 0027-8068.

Vokrouhliková, J., Čoudková, V., Šichtař, J., Vrbová, A., Búďová, A., Maršálek, M., Rutkayová, J. (2021). Chemically defined caseinate extenders and their effect on the cooled semen collected from stallions with long sexual rest. *Journal of Central European Agriculture*, 22(2), 269-279.

### **Publikace ve sbornících:**

Křížková, J., Maršálek, M. (2014). Vlivy působící na kvalitu spermatu hřebců. *Zootechnika 2014: Sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*, JU v českých Budějovicích, s. 28-38. ISBN 978-80-7394-454-4.

Křížková, J., Čoudková, V., Maršálek, M. (2015). Kvalita spermatu hřebců a jeho přežitelnost. *Zootechnika 2015: Sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*, JU v českých Budějovicích, s. 24-34. ISBN 978-80-7394-518-3.

Křížková, J., Čoudková, V., Maršálek, M. (2016). Vliv věku a frekvence odběru ejakulátu na charakteristiky spermatu hřebců. *Zootechnika 2016: Sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*, JU v českých Budějovicích, s. 42-49. ISBN 978-80-7394-518-3.

Kyryanová, A., Kumble, K., Křížková, J., Maršálek, M., Vejčík, A. (2017). Hodnocení reprodukce ovcí a plodnosti beranů. *Zotechnika 2017: Sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*, JU v českých Budějovicích, s. 70-80. ISBN 978-80-7394-641-8.

Vokrouhliková, J., Čoudková, V., Šichtař, J., Maršálek, M. (2019). Vliv vybraných mléčných ředidel na motilitu spermií získaných od hřebců po sexuální pauze. *Sborník referátů ze semináře Aktuální problémy chovu a šlechtění koní v ČR*. Mendelova Univerzita v Brně, s. 23-35. ISBN: 978-80-7509-689-0.

