



ANALÝZA VYBRANÝCH PARAMETRŮ HŘEBČÍHO EJAKULÁTU S OHLEDEM NA JEHO VYUŽITÍ V CHLAZENÝCH INSEMINAČNÍCH DÁVKÁCH

Zuzana Rečková

2026

ANALÝZA VYBRANÝCH PARAMETRŮ HŘEBČÍHO EJAKULÁTU S OHLEDEM NA JEHO VYUŽITÍ V CHLAZENÝCH INSEMINAČNÍCH DÁVKÁCH

Zuzana Rečková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala zaměstnancům Reprodukčního centra Zemského hřebčince v Tlumačově, především Ing. Ondřeji Mamicovi, Ph.D. a také paní Táni Havlíčkové za jejich nenahraditelnou pomoc při získávání podkladů k této práci.

Recenzenti:

doc. Ing. Jiří Bezdiček, Ph.D. (Katedra zoologie, PřF UP v Olomouci)

prof. Ing. Marko Halo, Ph.D. (Ústav chovu zvířat, FAPZ SPU v Nitre)

doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc. (ASCHK ČR)

Autor:

doc. Ing. Zuzana Rečková, Ph.D.¹;  <https://orcid.org/0000-0002-4863-3785>

¹Ústav chovu a šlechtění zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

Fotografie na obálce:

Monika Špendlíková, Photography Špendla

©Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, Brno 613 00

ISBN 978-80-7701-109-9 (tisk)

ISBN 978-80-7701-110-5 (online ; pdf)

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-110-5>



Open Access. Publikace *Analýza vybraných parametrů hřebčího ejakulátu s ohledem na jeho využití v chlazených inseminačních dávkách* je chráněna licencí Creative Commons Uveďte původ-Zachovejte licenci 4.0 (CC BY-SA 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.cs>

Abstrakt

Cílem práce je zhodnotit vliv vybraných faktorů na kvalitu nativního ejakulátu hřebců a zhodnotit vliv použitého ředidla ejakulátu na kvalitu chlazených inseminačních dávek hřebců využívaných v plemenitbě. V první části práce byly zhodnoceny vybrané parametry nativního ejakulátu plemenných hřebců využívaných v Zemském hřebčinci v Tlumačově během odběrových sezón 2018 až 2020. V průběhu sledovaného období bylo získáno celkem 240 ejakulátů plemenných hřebců a byly zjištěny následující parametry nativního ejakulátu hřebců: objem $42,39 \text{ ml}$, koncentrace spermií $282,60 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, celkový počet spermií $9,01 \times 10^9$, podíl normospermií 79,19 %, motilita spermií 88,68 %. Mezi jednotlivými plemeny hřebců byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly v objemu ejakulátu. Od chladnokrevníků byl získán vyšší průměrný objem ejakulátu (84,82 ml) než od teplokrevníků (39,04 ml). Mezi teplokrevnými plemeny byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi objemem starokladrubských hřebců (54,33 ml) a holštýnských hřebců (27,03 ml). Také byl zjištěn vliv plemenné příslušnosti hřebců i na koncentraci spermií. Od hřebců českého teplokrevníka ($371,10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a oldenburgského koně ($338,91 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) byly získány průkazně vyšší koncentrace spermií v ejakulátech než u hřebců ostatních plemen. Průměrný podíl motilních spermií byl u chladnokrevných hřebců (64,29 %) průkazně nižší než u ostatních plemen. Průměrný podíl normospermií byl v průběhu reprodukční sezóny variabilní a prokazatelně nejhorším měsícem byl srpen (70,29 %), kdy byl podíl normospermií v ejakulátu ve srovnání se všemi ostatními měsíci statisticky významně nižší. Naopak nejvyšší průměrná hodnota byla zjištěna v březnu (84,98 %) a v dubnu (84,67 %). Z Pearsonových korelačních koeficientů vyplývá, že čím je vyšší koncentrace spermií, celkový počet spermií a vyšší podíl normospermií, tím je vyšší i podíl motilních spermií v ejakulátu. Naopak čím je vyšší objem ejakulátu, tím je nižší koncentrace spermií a jejich motilita. Cílem druhé části práce bylo zhodnotit vliv použitých ředidel na kvalitativní parametry spermií v chlazených inseminačních dávkách plemenných hřebců. V sezóně 2018 bylo sledováno celkem 13 hřebců (82 odběrů) a hodnoceno 5 různých ředidel. Mezi jednotlivými hřebci byly nalezeny relativně velké rozdíly v průměrném podílu motilních spermií při použití různých ředidel. Ale i přes tyto rozdíly je zřejmé, že u hřebců bylo pro uchování chlazené inseminační dávky nejvhodnější ředidlo BotuSemen Gold. V sezónách 2019 a 2020 bylo sledováno celkem 19 hřebců (158 odběrů) a byla hodnocena 3 ředidla, která byla vybrána na základě výsledků ze sezóny 2018. Mezi jednotlivými hřebci se vyskytovaly rozdíly v podílu motilních spermií a statisticky významně vyšší průměrné podíly motilních spermií byly získány při použití ředidel BotuSemen Gold a INRA 96. Z hlediska průměrného podílu viabilních spermií v chlazeném ejakulátu, bylo dosaženo nejlepších výsledků při použití ředidla INRA 96.

Klíčová slova: ejakulát hřebců, inseminační dávka hřebců, ředidlo, chlazený ejakulát

Abstract

ANALYSIS OF SELECTED STALLION EJACULATE PARAMETERS REGARDING USE IN COOLED INSEMINATION DOSES

The aim of this study is to evaluate the influence of selected factors on the quality of fresh equine semen and to assess the impact of the diluent used on the quality of cooled insemination doses of stallions used in breeding. In the first part of the study, selected parameters of fresh semen from breeding stallions used at the National Stud in Tlumačov during the collection seasons of 2018 to 2020 were evaluated. During the observed period, a total of 240 ejaculates from breeding stallions were obtained, and the following parameters of fresh equine semen were determined: volume 42.39 ml, sperm concentration $282.60 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, total sperm count 9.01×10^9 , proportion of normal spermatozoa 79.19%, total sperm motility 88.68%. Statistically significant differences in ejaculate volume were found between different breeds of stallions. A higher average ejaculate volume was obtained from cold-blooded stallions (84.82 ml) than from warm-blooded stallions (39.04 ml). Among warm-blooded breeds, statistically significant differences were found between the ejaculate volume of Old Kladruber stallions (54.33 ml) and Holsteiner stallions (27.03 ml). The breed of stallions also influenced sperm concentration. Significantly higher sperm concentrations were obtained from Czech Warmblood ($371.10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) and Oldenburg horses ($338.91 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) compared to other breeds. The average proportion of motile sperm was significantly lower in cold-blooded stallions (64.29%) than in other breeds. The average proportion of morphologically normal spermatozoa was variable during the reproductive season, with August being the statistically significantly worst month (70.29%), while the highest average values were found in March (84.98%) and April (84.67%). Pearson correlation coefficients indicate that higher sperm concentration, total sperm count, and higher proportion of morphologically normal sperm are associated with higher proportions of total sperm motility in the ejaculate. Conversely, higher ejaculate volume is associated with lower sperm concentration and motility. The aim of the second part of the study was to evaluate the effect of extenders on the qualitative parameters of sperm in cooled insemination doses of breeding stallions. In the 2018 season, a total of 13 stallions (82 collections) were monitored and 5 different diluents were evaluated. Relatively large differences in the average proportion of total sperm motility were found between individual stallions when using different extenders. Despite these differences, it is clear that BotuSemen Gold was the most suitable diluent for preserving cooled insemination doses in stallions. In the 2019 and 2020 seasons, a total of 19 stallions (158 collections) were monitored and 3 extenders, selected based on the results from the 2018 season, were evaluated. Differences in the proportion of total sperm motility were found between individual stallions, and statistically significantly higher average proportions of total sperm motility were obtained using BotuSemen Gold and INRA 96 extenders. The best results in terms of the average proportion of live sperm in cooled ejaculate were achieved using the INRA 96 extender.

Keywords: stallion semen, equine artificial inseminations, extender, cooled semen

OBSAH

Úvod	7
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
1.1 Plodnost hřebců	8
1.2 Inseminace koní	8
1.3 Ejakulát hřebce	9
1.3.1 Semenná plazma	10
1.3.2 Spermie	10
1.3.3 Morfologická stavba hlavičky spermie	11
1.3.4 Morfologická stavba bičíku spermie	11
1.4 Hodnocení kvantitativních a kvalitativních parametrů ejakulátu	12
1.4.1 Objem ejakulátu	13
1.4.2 Koncentrace spermií	13
1.4.3 Motilita spermií	14
1.4.4 Morfologie spermií	15
1.4.5 Viabilita spermií	16
1.4.6 Integrita akrozomu spermií	16
1.4.7 Integrita chromatinu spermií	17
1.4.8 Mitochondriální aktivita spermií	18
1.5 Možnosti zpracování ejakulátu hřebců	18
1.6 Chlazené inseminační dávky hřebců	19
1.6.1 Ředidla hřebčího ejakulátu	21
1.7 Kryokonzervace hřebčího ejakulátu	22
2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	25
3 MATERIÁL A METODIKA	26
3.1 Zemský hřebčinec Tlumačov	26
3.2 Hřebci a odběr ejakulátu	26
3.3 Použitá ředidla	26
3.4 Příprava vzorků	27
3.5 Hodnocení kvantitativních a kvalitativních ukazatelů ejakulátu	28
3.5.1 Objem ejakulátu	28
3.5.2 Koncentrace spermií	28
3.5.3 Celkový počet spermií v ejakulátu	28
3.5.4 Motilita spermií – objektivní metoda	28
3.5.5 Motilita spermií – subjektivní metoda	29
3.5.6 Morfologie spermií	29
3.5.7 Viabilita spermií	29
3.6 Statistické zhodnocení	30
3.7 Experimentální schéma	30

3.7.1 Experiment 1.....	30
3.7.2 Experiment 2.....	30
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	31
4.1 Hodnocení vybraných parametrů nativního ejakulátu.....	31
4.1.1 Objem ejakulátu	31
4.1.2 Koncentrace spermií v ejakulátu	34
4.1.3 Celkový počet spermií v ejakulátu.....	37
4.1.4 Podíl normospermií v ejakulátu	40
4.1.5 Podíl motilních spermií v ejakulátu.....	43
4.1.6 Lineární závislosti mezi jednotlivými parametry ejakulátu.....	46
4.2 Vliv použitého ředidla na kvalitativní parametry spermií	47
4.2.1 Reprodukční sezóna 2018	47
4.2.2 Reprodukční sezóny 2019 a 2020.....	55
5 ZÁVĚR.....	62
Seznam použité literatury.....	65
Seznam tabulek.....	77
Seznam obrázků.....	78
Seznam zkratk.....	79

ÚVOD

Plodnost koní je jedním z klíčových faktorů, který významně ovlivňuje úspěšnost jejich chovu a šlechtění. Plodnost koní je zásadní nejen z ekonomického hlediska, ale také z pohledu zachování genetického potenciálu a zajištění dlouhodobé udržitelnosti chovatelských programů. Kůň, jako jedno z nejvýznamnějších domestikovaných zvířat, hraje důležitou roli v historii lidské společnosti, a to jak v zemědělství, lesnictví a dopravě, tak i ve vojenském, sportu a rekreaci. Tato skutečnost vedla k intenzivnímu zájmu o reprodukci a plodnost koní, což mělo za následek rozvoj různých metod a technik, které jsou zaměřeny na zlepšení a kontrolu reprodukčních výsledků.

Plodnost, tedy schopnost produkovat životaschopné potomstvo, je ovlivněna celou řadou genetických, fyziologických, environmentálních a manažerských faktorů. Chovatelé, veterinární odborníci a vědci neustále hledají cesty, jak tyto faktory lépe pochopit, kontrolovat a využít ve prospěch zlepšení reprodukčních parametrů. Rozpoznání a porozumění těmto faktorům je nezbytné pro optimalizaci chovatelských postupů a zajištění zdravých a geneticky silných jedinců. V posledních desetiletích se zásadním způsobem zvýšil význam reprodukčních technologií, mezi nimiž má nezastupitelné místo umělá inseminace. Tato metoda, která umožňuje přesnější a efektivnější řízení reprodukce, je dnes běžně využívána v mnoha chovných programech po celém světě. V dnešní době se díky pokroku v oblasti veterinární medicíny a reprodukční biotechnologie otevírají nové možnosti, jak efektivněji řídit a zvyšovat plodnost koní.

Jednou z významných inovací v oblasti umělé inseminace koní je využití chlazených inseminačních dávek. Tento postup nabízí několik významných výhod oproti tradičním metodám inseminace čerstvým nebo kryokonzervovaným ejakulátem. Chlazené inseminační dávky umožňují zachovat životaschopnost a pohyblivost spermií po dobu několika dnů, což poskytuje flexibilitu pro načasování inseminace a současně zajišťuje vyšší pravděpodobnost úspěšné fertilizace. Dále chlazené inseminační dávky umožňují optimalizovat využití cenných hřebců, kteří mohou být využíváni v inseminaci na několika místech současně, což je zvláště výhodné v případech hřebců s vysokou genetickou hodnotou. Z praktického hlediska nabízí inseminace s chlazenými inseminačními dávkami chovatelům možnost lépe plánovat a koordinovat reprodukční cykly klisen, což vede k vyšší efektivitě chovatelského procesu a může přispět i k lepším ekonomickým výsledkům chovu.

I přes tyto nesporné výhody, které byly uvedeny, je však třeba věnovat pozornost i určitým výzvám, které tato metoda přináší. Především je nezbytné zohlednit kvalitu chlazeného ejakulátu, která je ovlivněna nejen genetickými a fyziologickými vlastnostmi hřebce, ale i technikou odběru ejakulátu, jeho zpracováním a skladováním. V oblasti zpracování nejsou dostatečně zavedeny optimalizované postupy, které by mohly plně využít reprodukční potenciál plemeníků. V neposlední řadě je také samozřejmě důležité i správné technické provedení samotné inseminace, které vyžaduje odborné znalosti a zkušenosti.

Tato práce se zaměřuje na analýzu současných poznatků týkajících se plodnosti koní s důrazem na zhodnocení parametrů nativního ejakulátu a chlazených inseminačních dávek při použití různých druhů ředidel. Hlavním cílem práce je nejen shrnout aktuální stav vědeckého poznání v této oblasti, ale také by výsledky této práce měly přispět k lepšímu porozumění této oblasti a poskytnout i chovatelům užitečné informace pro další rozvoj reprodukce koní.

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 PLODNOST HŘEBCŮ

Podobně jako mnoho jiných savců i koně směřují svou reprodukční aktivitu do určitého období tak, aby bylo co nejvýhodnější pro jejich mláďata (Gamboa *et al.*, 2010). Sezónní změny v délce dne jsou hlavní příčinou nárůstu a poklesu sexuální aktivity koní (Aurich, 2011a). Na severní polokouli trvá fyziologická sezóna plemenitby koní od dubna do října a během tohoto období je u hřebců zvýšená produkce ejakulátu a zvýšená endokrinní funkce varlat (Janett *et al.*, 2003a). Aby mohlo být dosaženo jejich maximální reprodukční výkonnosti, je potřeba u hřebců udržovat jejich normální sexuální chování a libido a tím i zajistit produkci kvalitního ejakulátu (Sieme *et al.*, 2004).

Na rozdíl od jiných druhů hospodářských zvířat, jsou hřebci do chovu vybíráni na základě jejich reprodukčních vlastností jen zřídka. Obvykle je jejich výběr založen na základě jiných kritérií, kterými mohou být například fyzické vlastnosti, jejich původ nebo sportovní výkon, a až poté jejich reprodukční schopnosti (Abah *et al.*, 2023). V Evropě se výběr koní do chovu provádí na základě rodokmenu, sportovních výsledků a temperamentu daného zvířete (Gibb and Aitken, 2016). Rozhodujícím faktorem při výběru plemeníka je i cena jeho ejakulátu (Kowalczyk *et al.*, 2019).

1.2 INSEMINACE KONÍ

Umělá inseminace byla první větší biotechnologií, která byla použita ke zlepšení reprodukce a genetiky hospodářských zvířat. V průběhu posledních více než 200 let bylo dosaženo obrovského pokroku v oblasti umělé inseminace u mnoha druhů zvířat. Ale u koní byl rozvoj umělé inseminace obzvláště pomalý kvůli skutečnosti, že registry plemen byly proti jejímu využití. Proto byly techniky, postupy a zejména ředidla pro hřebčí ejakuláty zkopírovány z těch, které se používají u jiných druhů zvířat (Picket, 2018).

Umělá inseminace je v současnosti v chovu koní rozšířenou biotechnologickou metodou, protože ve srovnání s přirozenou plemenitbou nabízí mnoho výhod (Oliveira *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2016). Jako nejdůležitější z těchto výhod lze označit možnost výběru daného plemeníka z velkého počtu nabízených hřebců (Elkhawagah *et al.*, 2024) a zvýšenou dostupnost nejlepších hřebců, která významně ovlivňuje genetický pokrok (Aurich, 2012; Maciel *et al.*, 2016). K dalším výhodám bezesporu patří omezení bezpečnostního rizika jak pro klisny, tak i pro hřebce (Janett *et al.*, 2003b; Elkhawagah *et al.*, 2024) nebo snížení rizika přenosu infekčních onemocnění a eliminace případných nepříjemností při přepravě (Hernández-Avilés and Love, 2021), možnost zachování genetického materiálu v podobě spermií pro pozdější použití v případě úmrtí, zranění nebo případné neplodnosti (Miller, 2008; Gibb and Aitken, 2016) a v neposlední řadě také možnost vyšetření ejakulátu (Brinsko *et al.*, 2011). Také Pycock (2004) uvádí jako výhody možnost uplatnění hřebce na velké vzdálenosti a využití jeho genetického potenciálu pro více klisen. Kromě toho bylo

zjištěno, že při srovnání úspěšnosti zabřezávání po inseminaci nebo přirozené plemenitbě je při využití umělé inseminace čerstvým nebo chlazeným ejakulátem úspěšnost zabřezávání stejná nebo dokonce vyšší (Janett *et al.*, 2003a). Procento narozených hříbat po inseminaci chlazeným nebo zmrazeným spermatem, dosahuje ve světě přibližně 90 %, v Evropě je to pouze 45 % (Kowalczyk *et al.*, 2019). Také Gibb and Aitken, (2016) uvádí, že přibližně 90 % hříbat se narodí po inseminaci chlazeným nebo zmrazeným spermatem. Díky vyššímu využívání umělé inseminace v chovu koní se dostal do popředí nový a dříve nedůležitý omezující faktor. Protože i navzdory relativně nízké dědičnosti reprodukčních znaků vedla nedostatečná selekce hřebců pro plodnost k situaci, kdy spermie mnoha hřebců nemají dostatečnou kvalitu k tomu, aby byly schopné tolerovat stres spojený s chlazením nebo kryokonzervací semene (Gibb *et al.*, 2015).

Umělá inseminace chlazenou inseminační dávkou je hlavní metodou používanou v chovu koní (Affonso *et al.*, 2017), avšak kvalita ejakulátu a plodnost nemusí být u některých hřebců při použití standardních technik optimální. Proto je velmi důležité vyvinout pro tyto hřebce alternativní přístupy (Segabinazzi *et al.*, 2024).

Úspěšná kryokonzervace spermií je u hřebců stále poměrně náročná. Odhaduje se, že pouze 20 % hřebců produkuje ejakulát, který je vhodný ke kryokonzervaci, a přibližně 20–50 % hřebců produkuje ejakulát, jež lze využít ke kryokonzervaci velmi obtížně. Produkce kvalitních kryokonzervovaných dávek má v chovu koní velký význam, protože přináší chovatelské a ekonomické výhody a také možnost zachovat vysoce hodnotná plemena jako genetické zdroje (Bubeníčková *et al.*, 2020). Díky kryokonzervaci spermií z nadvarlat je umožněna záchrana genetického materiálu v případě nečekaného úmrtí nebo nouzové kastrace cenných chovných plemenů (Neuhauser *et al.*, 2019).

V Evropě ve skupině sportovních klisen postupně vzrostla obliba používání chlazených inseminačních dávek, zatímco ve skupině plemenných klisen vzrostla obliba kryokonzervovaných dávek. Ve zbývajících skupinách klisen, které nejsou klasifikovány jako sportovní nebo plemenné, převažuje využití chlazených inseminačních dávek (Kowalczyk *et al.*, 2019).

Při provádění samotné inseminace je nezbytné dodržovat hygienu na dostatečné úrovni, aby byla minimalizována možnost zavedení patogenů do reprodukčního ústrojí klisen. Případná přítomnost patogenů by mohla vyvolat zánět v pohlavním ústrojí klisny a selhání zabřeznutí (Noakes *et al.*, 2018).

1.3 EJAKULÁT HŘEBCE

Ejakulát je bělavá viskózní tekutina (Louda *et al.*, 2001), která se skládá ze spermií a semenné plazmy (Clulow and Gibb, 2022).

Odběr ejakulátu hřebců se většinou provádí pomocí umělé vagíny (Serafini *et al.*, 2014). Pro zajištění optimálních podmínek při odběru je umělá vagina temperována na 45 až 50 °C a lubrikována sterilním nespermicidním lubrikačním gelem, v množství 3 až 5 ml. Cílem této přípravy je vytvořit pro hřebce komfortní a příznivé prostředí během odběru (Ghorbani *et al.*, 2024). Bezprostředně po odběru ejakulátu z něj bývá filtrací odstraněna jeho gelová frakce (Aguila *et al.*, 2024).

U některých hřebců se vyskytuje urospermie, tj. přítomnost moči v ejakulátu. Ta se u hřebců může vyskytovat sporadicky, trvale nebo nepravidelně. Vzhledem ke složení moči a jejímu vlivu na kvalitu spermií se předpokládá, že urospermické ejakuláty snižují plodnost, což může souviset se zvýšením osmolality, nebo pH, zejména s rostoucí koncentrací moči a dobou expozice (Pearson *et al.*, 2024).

1.3.1 Semenná plazma

Semenná plazma je produkována především přídatnými pohlavními žlázami, je přirozeným prostředím pro spermie a obsahuje řadu složek, zejména proteinů důležitých pro úspěšné zrání spermií a jejich fertilizační schopnost (Poiani 2006; Bubeníčková *et al.*, 2020). Je to tekutina druhově specifického množství, barvy, konzistence a rozdílného pH (Jelínek *et al.*, 2003). Primární úlohou semenné plazmy je spíše transportní úloha pro přenos mezi hřebcem a klisnou než její využití jako média pro uchovávání spermií (Clulow and Gibb, 2022). Semenná plazma obsahuje určité množství sacharidů, lipidů, elektrolytů a minerálních látek, které podporují normální fungování putujících gamet (Kareskoski and Katila, 2008). V semenné plazmě hřebců jsou přítomny lapače reaktivních forem kyslíku (ROS), přičemž primárními zachycovači ROS, jež byli popsáni v ejakulátu hřebců jsou glutathion-peroxidáza, superoxid-dismutáza a kataláza (Jhamb *et al.*, 2023). V rámci přirozené plemenitby jsou spermie v semenné plazmě pouze několik minut mezi ejakulací a přenosem do endometriální tekutiny v pohlavním aparátu klisny. Během této doby procházejí spermie některými zásadními membránovými změnami, což mimo jiné umožňuje proces akrozomální reakce, a nakonec i samotnou fertilizaci oocyty (Clulow and Gibb, 2022).

Přítomnost, nepřítomnost nebo rozdílná koncentrace složek semenné plazmy, zejména proteinů, se mezi jednotlivými hřebci liší (Bubeníčková *et al.*, 2020).

1.3.2 Spermie

Hřebčí spermie jsou vysoce specializované haploidní buňky zodpovědné za přenos otcovského genetického a negenetického vlivu na další generaci tím, že oplodní oocyt a vytvoří zygotu (Akbarinejad *et al.*, 2020; Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2024). Spermie jsou morfologicky jedinečné ve srovnání s ostatními savčími buňkami, protože prošly extrémním zhutněním DNA a buněčnou kompakcí, v důsledku čehož chybí většina cytoplazmy a organel, které jsou přítomny v somatických buňkách (Gibb and Aitken, 2016).

Povrch celé spermie pokrývá cytoplazmatická membrána, samotná spermie se skládá z hlavičky a bičíku (Marvan *et al.*, 1998). Spermie jsou citlivé na mnoho faktorů prostředí, včetně teploty, světla, fyzického poškození a různých chemických látek (Brinsko *et al.*, 2011). Kvalitní samčí gamety jsou nezbytné pro zlepšení výsledků asistovaných reprodukčních technik (Věžník *et al.*, 2007). Spermie jsou u jednotlivých druhů hospodářských zvířat morfologicky odlišné, celková délka hřebčích spermií se dle Věžníka *et al.* (2004) pohybuje v rozmezí 57,6 až 59,7 μm , přičemž hlavička má průměrnou délku 6,3 μm a šířku 3,2 μm , spojovací část bičíku je dlouhá 8,6 μm a hlavní část bičíku je dlouhá 43,7 μm .

Spermie se tvoří po dosažení pohlavní dospělosti v semenotvorných kanálcích varlete a celý proces jejich tvorby je označován jako spermatogeneze (Jelínek *et al.*, 2003). Délka spermatogeneze u hřebců je 55 dní (Berndtson, 2014).

1.3.3 Morfologická stavba hlavičky spermie

Hlavička spermie domácích zvířat má zploštělý oválný tvar (Marvan *et al.*, 1998). Apikální část hlavičky je zaoblená, mírně asymetrická, bazální část je mírně zúžená a vklenutá. U různých druhů zvířat, ale i mezi jedinci v rámci jednoho druhu, existuje určitá variabilita v tvaru hlavičky spermie. U každého samce je tvar hlavičky spermie v průběhu jeho života relativně stejný a je pravděpodobně geneticky kódován (Věžník *et al.*, 2004).

Podstatu hlavičky spermie tvoří jádro pohlavní buňky, které je obaleno jadernou membránou. Jádro spermií obsahuje pouze poloviční množství DNA. Nukleoplazma je při malém zvětšení homogenní struktury a při velkém zvětšení má zrnitě vláknitý charakter (Marvan *et al.*, 1998). Jádro zdravé spermie má vysoce kondenzovaný chromatin, který je tvořený spojením dvouřetězcové DNA pomocí protaminů a histonů (Rodríguez-Martínez, 2003).

Přední pól hlavičky spermie je pokrytý akrozomem (Marvan *et al.*, 1998). Akrozom je membránový útvar a dle Věžníka *et al.* (2004) u hřebce pokrývá asi 60 % hlavičky spermie. Akrozom je zakončen ekvatoriálním segmentem, který má poloměsíčitý tvar. Uvnitř akrozomu se nachází celá řada enzymů, díky kterým je spermie schopna proniknout do oocyty (Marvan *et al.*, 1998). Neporušený akrozom je klíčovou součástí spermie a je nutný k dosažení úspěšné fertilizace. Dle Bubeníkové *et al.* (2020) existuje pozitivní korelace mezi akrozomální integritou a plodností.

Bazální část hlavičky je prohloubená do podoby implantační jamky hlavičky, do které se vkládá hlavice bičíku, což umožňuje spojení hlavičky s bičkem (Marvan *et al.*, 1998). U velké části hřebčích spermií není implantační jamka umístěna na bazální části hlavičky symetricky, takže hřebčí spermie s abaxiálně nasazeným bičkem nemohou být považovány za patologické (Pesch and Bergmann, 2006).

1.3.4 Morfologická stavba bičíku spermie

Skladba bičíku je uzpůsobena k pohybu spermie. Osové vlákno tvoří podklad celého bičíku, jeho středem probíhá centrální dvojce mikrotubulů. Ta je obklopená vnitřním kruhem devíti dvojic filament. Na povrchu osového vlákna probíhají téměř celým bičkem hladké provazce, které jsou na příčném řezu také kruhově uspořádány (Marvan *et al.*, 1998).

Bičik je možné rozdělit na 3 části: mitochondriální (spojovací), hlavní a koncovou část bičíku. Mitochondriální část bičíku sahá od hlavičky až po prstenec a u hřebce má délku 8,6 μm, tato část bičíku je nejsilnější, protože osové vlákno a hladké provazce jsou zde obaleny mitochondriální pochvou. Jedna mitochondrie tvoří zhruba tři čtvrtiny závitů a společně mitochondrie tvoří závitnici, která má 70–80 závitů s pravotočivým směrem vinutí (Věžník *et al.*, 2004). Mitochondrie jsou obecně známé jako „pohonná jednotka“

buňky, protože hrají zásadní roli při produkci ATP prostřednictvím mechanismu oxidativní fosforylace (OXPHOS). Tuto energii lze v případě spermií využít k udržení jejich motility. Ta představuje jeden z hlavních faktorů určujících plodnost samců, čímž jsou mitochondrie jedněmi z nejdůležitějších organel při hodnocení kvality spermií, protože tím, že ovlivňují jejich motilitu, ovlivňují i schopnost jejich fertilizace (Piomboni *et al.* 2012).

Hlavní část bičíku je nejdelší, u hřebce 43,7 μm , a je pokryta fibrózní pochvou, která svou tvarovou pamětí napomáhá pružnosti bičíku při jeho kmitavém a rotačním pohybu (Věžník *et al.*, 2004). Hlavní část bičíku spermie již postrádá mitochondrie a je obohacena o glykolytické enzymy (Piomboni *et al.* 2012). V této části bičíku se postupně vytrácejí hladké provazce. Základem koncové části bičíku je pouze osová vlákna, které v poslední části bičíku ztrácí své charakteristické uspořádání. Celý bičík je pokrytý cytoplazmatickou membránou (Marvan *et al.*, 1998).

1.4 HODNOCENÍ KVANTITATIVNÍCH A KVALITATIVNÍCH PARAMETRŮ EJAKULÁTU

Ve varlatech plemeníků hospodářských zvířat je denně vytvořeno až 35 miliard spermií, ale ne všechny vyprodukované spermie lze označit za normálně vyvinuté. Vysoká produkce spermií je doprovázena přirozenou tvorbou nedostatečně kvalitních buněk. Kvalita spermií, která není ani za ideálních podmínek stoprocentní, je ovlivněna celou řadou vnějších i vnitřních faktorů (Věžník *et al.*, 2004).

Hodnocení samčího fertilního potenciálu je založeno na analýze základních andrologických charakteristik, kterými jsou koncentrace spermií, motilita spermií a morfologie spermií (Gacem *et al.*, 2021). Mezi velmi důležité parametry ejakulátu bezpochyby patří počet spermií, pohyblivost spermií a počet morfologicky normálních spermií (Colenbrander *et al.*, 2003; Love, 2011). Tyto základní parametry obvykle odhalí jasné případy nižší plodnosti, resp. neplodnosti u konkrétního jedince (Rodriguez-Martinez, 1998). Dalšími možnými parametry, které jsou řazeny mezi kvalitativní ukazatele ejakulátu, jsou viabilita spermií (Merkies *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2024) integrita chromatinu spermií (Rečková *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2011; Deichsel *et al.*, 2016), akrozomální integrita spermií (Rečková *et al.*, 2015; Rivera-Concha *et al.*, 2023) a mitochondriální aktivita spermií (Věžník *et al.*, 2007; Gamboa *et al.*, 2010).

Obecným cílem hodnocení ejakulátu hřebců je snaha o predikci fertilizační schopnosti jednotlivých hřebců, resp. nativního ejakulátu, chlazených inseminačních dávek a kryokonzervovaných inseminačních dávek. Cílem laboratorního vyšetření je možnost srovnání kvantitativních a kvalitativních parametrů jednotlivých ejakulátů s ohledem na požadované minimální parametry ejakulátu hřebců (Samper, 2009).

Kvalita inseminačních dávek je obvykle hodnocena na základě jejího objemu, koncentrace spermií a motility spermií. Morfologie spermií, i když se jedná o jednu z velmi důležitých vlastností, nebývá vždy rutinně vyšetřována, ačkoli byl prokázán významný vztah mezi morfologií spermií a jejich plodností (Nagy *et al.*, 2023).

1.4.1 Objem ejakulátu

Stanovení objemu ejakulátu je nejsnadnější a nejzákladnější vyšetření ejakulátu. Objem ejakulátu se v průběhu života jedince mění (Věžník *et al.*, 2004), je variabilní a značně kolísá. U dospělých hřebců má mít spermatická frakce ejakulátu alespoň 10 ml (Louda *et al.*, 2001) a Věžník *et al.* (2004) uvádí 20 ml. Objem ejakulátu je ovlivněn celou řadou faktorů, zejména plemenem, genetickým základem, úrovní užitkovosti, intenzitou pohlavního využívání, stupněm pohlavního vydráždění, technikou odběru, krmnou dávkou a výrazně se na něm podílí také vyrovnanost organismu pleménika v daném prostředí a jeho zdravotní stav (Věžník *et al.*, 2004).

Objem ejakulátu se stanovuje bezprostředně po odběru v odměrných nádobách, nebo vážením. U hřebce se odebírají jen frakce bohaté na spermie a frakce produkované bulbouretrálními žlázami se neodebírají (Věžník *et al.*, 2004), resp. se z odebraného ejakulátu odstraňují (Ghorbani *et al.*, 2024). Samotný objem ejakulátu je pak stanoven jen z frakcí, které jsou určeny k dalšímu využití (Věžník *et al.*, 2004).

Objem inseminační dávky se liší podle použitého ejakulátu, kdy při použití nativního ejakulátu se objem inseminační dávky pohybuje mezi 10 až 30 ml, u chlazené dávky 5 až 40 ml a kryokonzervované dávky 0,5 až 5 ml. Objemy inseminačních dávek větší než 100 ml nebo menší než 0,5 ml se zdají být pro zabřezávání klisen neefektivní. Mimo jiné je důležitá i koncentrace spermií ve vztahu k objemu inseminační dávky. Využívá se $300 \text{ až } 500 \times 10^6$ motilních spermií v inseminační dávce, ale použití $50 \text{ až } 300 \times 10^6$ motilních spermií v inseminační dávce se jeví jako stejně úspěšné (Morel, 2020).

1.4.2 Koncentrace spermií

Koncentrace spermií v ejakulátu je jednou se základních informací o kvalitě ejakulátu a úrovni funkce spermatogenního epitelu daného pleménika. Faktory, které ovlivňují koncentraci spermií v ejakulátu se uplatňují prostřednictvím vnitřního prostředí organismu a negativním působením na řídicí mechanismy, příp. přímo na cílové tkáně pohlavního systému. Geneticky podmíněná je oligospermie (nízký počet spermií), jež je nežádoucím znakem samčí subfertility (Věžník *et al.*, 2004). Z dalších faktorů se uplatňují velikost varlat, věk hřebců, sezóna a exogenní faktory (Berndtson, 2014).

U dospělého hřebce by měla být koncentrace spermií alespoň 50 000 spermií v mm^3 (Věžník *et al.*, 2004), dle Ghorbani *et al.* (2024) by koncentrace spermií měla být alespoň 60 000 spermií v mm^3 a dle Loudy *et al.* (2001) alespoň 100 000 spermií v mm^3 . Hodnota koncentrace spermií, resp. celkového počtu spermií v ejakulátu je výrazně ovlivněna frekvencí odběrů ejakulátu. Berndtson (2014) uvádí že při každodenním odběru je celkový počet spermií v odebraném ejakulátu hřebců $4,5 \times 10^9$ při frekvenci odběrů obden $7,0 \times 10^9$ a při frekvenci odběrů pouze $1 \times$ za týden $11,4 \times 10^9$ spermií.

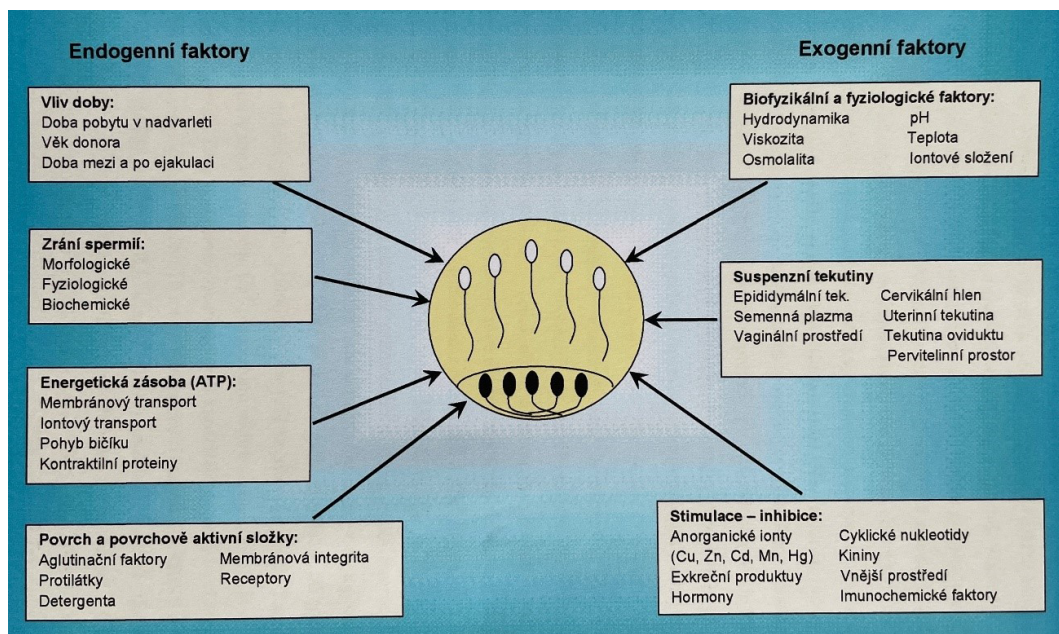
Koncentraci spermií lze stanovit fotometricky (Louda *et al.*, 2001; Serafini *et al.*, 2014), hemocytometricky (Prathalingam *et al.*, 2006; Soušková *et al.*, 2021), nebo s využitím softwarů CASA (Lu *et al.*, 2013), SCA (Rečková *et al.*, 2022).

1.4.3 Motilita spermií

Jednou z hlavních charakteristik spermií je jejich pohyblivost neboli motilita, která je nezbytná k zajištění fertilizační schopnosti spermií. Ve skutečnosti existují dva typy motility, aktivovaná motilita pozorovaná u spermií bezprostředně po ejakulaci a hyperaktivovaná motilita, která je pozorována u spermií v místě fertilizace (Piomboni *et al.* 2012).

Motilita spermií, její posuzování a kvalitativní hodnocení se řadí na přední místa výčtu spermatoanalytických metod. Většina autorů považuje progresivní pohyb spermií za významný ukazatel pro odhad fertilizační schopnosti ejakulátu (Věžník *et al.*, 2004). Motilita spermií je rozhodujícím faktorem při určování plodnosti a jakékoli abnormality motility mohou bránit schopnosti spermií dosáhnout místa oplodnění (Ghorbani *et al.*, 2024). Z funkčního hlediska je pohyb spermií nezbytným předpokladem pro jejich průnik do oocyty. Přímý progresivní pohyb je znakem funkční plnohodnotnosti a v kvalitním hřebčím ejakulátu má tento pohyb vykazovat alespoň 60 % spermií (Věžník *et al.*, 2004), dle Ghorbani *et al.* (2024) by hodnota měla být alespoň 70 %.

Byl stanoven soubor exogenních a endogenních faktorů, které ovlivňují motilitu spermií (obrázek 1). Z endogenních faktorů je to především věk plemene (El-Badry *et al.*, 2017), délka pobytu spermií v nadvarleti a jejich zrání, energetická zásoba ATP, membránový transport a celá řada dalších. Z exogenních faktorů jsou to pH prostředí, teplota, iontové složení resuspendačních tekutin, viskozita a osmolalita prostředí. Na stimulaci i inhibici motility spermií se mohou podílet anorganické ionty, exkreční produkty, hormony, cyklické nukleotidy, kininy, vnější prostředí a imunochemické faktory (Věžník *et al.*, 2004).



Obr. 1: Endogenní a exogenní faktory ovlivňující motilitu spermií

Zdroj: Věžník *et al.*, 2004

Motilitu spermií lze hodnotit subjektivně (Serafini *et al.*, 2014) nebo objektivně (Elkhawagah, *et al.*, 2020). V současné době je k dispozici více než 12 různých systémů počítačové analýzy spermií pro detekci pohybu spermií (Giaretta *et al.*, 2017).

Subjektivní metoda je založena na odhadu procenta pohyblivých spermií (Broekhuijse *et al.*, 2011) a motilita spermií se vyjadřuje jako procento pohyblivých spermií (Věžník *et al.*, 2004). Mezi nevýhody subjektivní metody hodnocení patří fakt, že subjektivní hodnocení nezahrnuje individuální hodnocení spermií a výsledky se mohou u jednotlivých hodnotitelů lišit.

V rámci objektivního hodnocení se využívá počítačové techniky a různých softwarů, jako jsou například obrazová analýza LUCIA (Věžník *et al.*, 2004) nebo počítačová analýza CASA (Janett *et al.*, 2012; Amann and Weberski, 2014; Halo *et al.*, 2024). Systém CASA (Computer-assisted sperm analysis) je automatizovaná metoda, která umožňuje vyhodnotit motilitu spermií (Lu *et al.*, 2014). Tento systém rozpoznává pohyblivé a nepohyblivé spermie a analyzuje trajektorii každého jejich pohybu. Výhodou systému CASA je objektivita výsledků, možnost porovnávání dat mezi různými institucemi a hodnocení pohybu jednotlivých spermií (Verstengen *et al.*, 2002; Mortimer *et al.*, 2015). Nicméně výsledky mohou být značně ovlivněny křížením trajektorií jednotlivých spermií a vzájemnou kolizí spermií (Spiropoulos, 2001; Verstengen *et al.*, 2002), kdy s přibývajícím koncentrací spermií v analyzovaném vzorku se zvyšuje právě i podíl motilních spermií (Soušková *et al.*, 2021).

1.4.4 Morfologie spermií

Posouzení normálních a patologicky změněných spermií je považováno za neoddelitelný diagnostický parametr společně se stanovením koncentrace a motility spermií (Věžník *et al.*, 2004). Hodnocení morfologie spermií je tedy základní složkou analýzy ejakulátu a poskytuje informace pro posouzení potenciální plodnosti spermií jednotlivých hřebců (Brito, 2021). Termín patologie spermií charakterizuje strukturální a funkční deficity abnormálních spermií (Chemes, 2018). Výsledky práce kolektivu autorů Love *et al.* (2000) ukazují, že některé morfologické charakteristiky, kterými jsou podíl normospermií, podíl abnormálních nebo oddělených hlaviček spermií, abnormality na spojovací části bičíku, stočené bičíky a nezralé formy spermií, ovlivňují úspěšnost zabřezávání a díky nim lze předpovědět rozdíl v plodnosti mezi jednotlivými hřebci.

Proces hodnocení morfologie spermií je subjektivní a výsledky do značné míry závisí na odbornosti a zkušenostech hodnotitele. Ve spermioqramu hřebců by měly být uvedeny následující kategorie spermií: normální spermie, abnormální akrozom, abnormální hlavička, oddělená hlavička, proximální kapénky, distální kapénky, abnormální spojovací část bičíku a ohnuté/svinuté bičíky (Brito, 2021). Dle publikace Loudy *et al.* (2001) byl měl být podíl normospermií v ejakulátu hřebce alespoň 60 %.

Pro hodnocení morfologie spermií je možné využít celé řady nejrůznějších metod a barviv, např.: dle Hancocka (Janett *et al.*, 2003b; Ghorbani *et al.*, 2024), dle Farellého (Boersma *et al.*, 2001), eosin/nigrosin (Łacka *et al.*, 2016; Gacem *et al.*, 2021), eosin/gencián (Łacka *et al.*, 2016), dle Papanicolaou (Kalahanis *et al.*, 2002; Menkveld *et al.*, 2003), software SASMO (Věžník *et al.*, 2007), CASA (Lu *et al.*, 2014).

1.4.5 Viabilita spermií

Přítomnost dostatečného počtu viabilních (živých) spermií v ejakulátu je nezbytnou podmínkou pro potenciální penetraci a fertilizaci oocytů (Věžník *et al.*, 2004). Integritu membrány spermií je možné využít k posouzení životaschopnosti spermií (Contria *et al.*, 2010).

Viabilitu spermií lze hodnotit pomocí metod, které jsou založeny na principu průchodu barviva poškozenou membránou spermie, tj. mrtvé spermie jsou nabarveny a živé spermie se nebarví. Používá se celá škála různých metod, např. eosin/nigrosin (Ozturkler *et al.*, 2001; Rijsselaere *et al.*, 2005; Łacka *et al.*, 2016), akridinová oranž/propidiumjodid (Ali *et al.*, 2017) primulin (Věžník *et al.*, 2007), propidiumjodid (Januskauskas *et al.*, 2003), propidiumjodid s využitím průtokové cytometrie (Lühr *et al.*, 2018), SYBR-14/propidiumjodid (Samardzija *et al.*, 2006; Koonjaenak *et al.*, 2007) SYBR-14/propidiumjodid s využitím průtokové cytometrie (Aguila *et al.*, 2024), trypanová modř (Kutvolgyi *et al.*, 2006; Strober *et al.*, 2015), trypanová modř/giemsa (Serafini *et al.*, 2014), bisbenzimid 33258-Hoechst (Fitzsimmons *et al.*, 2007; Hoogendijk *et al.*, 2018; Rečková *et al.*, 2022), Sperm Viability Kit (Jhamb *et al.*, 2023). Dále lze posuzovat i funkční integritu membrán spermií pomocí testu HOS (El-Badry *et al.*, 2017; Ghorbani *et al.*, 2024).

1.4.6 Integrita akrozomu spermií

Neporušený akrozom je klíčovou součástí spermie a je nutný k dosažení úspěšné fertilizace. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi akrozomální integritou a plodností (Bubeníčková *et al.*, 2020). Spermie, aby byly schopné fertilizace, musí projít procesem kapacitace, aby došlo ke konečným zralostním změnám, které jsou nutné k možnosti oplození oocytu. Kapacitace zahrnuje extrémní přestavbu membrány a hyperaktivaci pohyblivosti spermií, a proto je vysoce energeticky náročná (Gibb and Aitken, 2016). Účinnost kapacitace je významně ovlivněna individuální predispozicí spermatu hřebce. Dosud nebylo dosaženo spolehlivého úspěchu při navození plného kapacitního stavu spermií hřebců pomocí specifických kapacitačních agens. Účinek proteinových frakcí semenné plazmy je závislý na koncentraci proteinů a je silně ovlivněn individualitou hřebců (Bubeníčková *et al.*, 2020).

Podobně jako u hodnocení viability spermií lze pro hodnocení integrity akrozomu využít celou řadu různých barviv: trypanová modř (Tartaglione and Ritta, 2004), giemsa (Dhanju *et al.*, 2006; Elkhawagahetal *et al.*, 2024), trypanová modř/giemsa (Serafini *et al.*, 2014), chlortetracycline (Bergqvist *et al.*, 2007), PSA-FITC (Silva and Gadella, 2006; Věžník *et al.*, 2007; Rečková *et al.*, 2015), PSA-FITC s využitím průtokové cytometrie (Love *et al.*, 2012), PNA-FITC (Prathalingam, *et al.*, 2006; Hoogendijk *et al.*, 2018), PNA-FITC s využitím průtokové cytometrie (Lühr *et al.*, 2018; Rivera-Concha *et al.*, 2023; Aguila *et al.*, 2024).

1.4.7 Integrita chromatinu spermií

Normální struktura chromatinu je nezbytným předpokladem dobré úrovně fertilizační schopnosti spermií a je nutná k přenosu otcovské genetické informace do další generace (Erenpreiss *et al.*, 2006). K funkčnímu dozrávání spermií, což je proces, který je nezbytný k fertilizaci, dochází při průchodu spermií nadvarletem, které je vysoce specializovanou oblastí samčího pohlavního ústrojí. Charakteristická pro toto mikroprostředí je přítomnost epididymozomů, což jsou malé membránou obalené vezikuly, které jsou vylučovány právě z nadvarlete (Nixon *et al.*, 2019). V průběhu procesu zrání spermií dochází na jejich povrchu k řadě změn, a mimo jiné i k vyvolání kondenzace jejich chromatinu (Aitken and Vernet, 1998).

Struktura DNA savčí spermie je mezi ostatními eukaryotickými DNA nejvíce kompaktní. Tohoto stupně kompaktnosti DNA je dosaženo právě díky kondenzaci chromatinu (Ward and Coffey, 1991). Po dokončení procesu kondenzace chromatinu je genetická informace spermií chráněna a chromatin je díky své kondenzaci vysoce rezistentní k řadě endogenních a exogenních látek (Chapman and Michael, 2003; Oliva, 2006). Kondenzace chromatinu spermií má přímou souvislost s jejich schopností fertilizovat oocyty. Spermie, které pochází z hlavy a proximální části těla nadvarlete nemají dostatečnou schopnost k oplození oocytů, naproti tomu spermie z distální části těla nadvarlete a ocasu nadvarlete již touto schopností disponují (Haidl, 1994). Nedávno proteomické analýzy odhalily, že spermie ve skutečnosti získávají a ztrácejí proteiny a druhy RNA během svého průchodu nadvarletem působením epididymozomů (Clulow and Gibb, 2022). Díky výsledkům, které byly získány na IVF klinikách je zřejmé, že spermie bez kompletní kondenzace chromatinu dosahují horších výsledků fertilizace oocytů než spermie s plně kondenzovaným chromatinem (Chapman and Michael, 2003). Podle zjištění kolektivu Hammadeh *et al.* (2001) neúplná kondenzace chromatinu spermií nesouvisí s dalšími případy infertility samců, kterými jsou teratospermie (abnormality v morfologii spermií), oligospermie (nízký počet spermií) nebo asthenospermie (nízká motilita spermií).

Integrita chromatinu spermií je důležitým funkčním parametrem ejakulátu, který je vhodné využít při odhadu potenciální fertility samců. Vyšetření integrity chromatinu spermií však není běžnou součástí rutinního hodnocení ejakulátu (Shafik *et al.*, 2006).

Pro hodnocení integrity chromatinu spermií existuje celá škála různých metod, některými z nich jsou: Sperm nuclear maturity test (Zini and Libman 2006), COMET assay (Boe-Hansen *et al.*, 2005; Banks *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2007; Jhamb *et al.*, 2023), Acridine orange test (Martins *et al.*, 2007), TUNEL assay (Li *et al.*, 2006; Waterhouse *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2007; El-Shalofy *et al.*, 2023), využití průtokové cytometrie a barviv Hoechst 33342/Sytox oranž (Rivera-Concha *et al.*, 2023), SCSA - Sperm Chromatin Structure Assay (Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2005; Peris *et al.*, 2007; Rečková *et al.*, 2008; Evenson, 2011).

1.4.8 Mitochondriální aktivita spermií

Mitochondrie jsou pro funkci spermií naprosto zásadní součástí, protože právě prostřednictvím oxidativní fosforylace je produkován adenosintrifosfát (ATP), který je zdrojem energie (Akbarinejad *et al.*, 2020). Oxidativní fosforylace je aerobní proces, který probíhá ve střední části spermie, tedy právě uvnitř mitochondrií (Plessis *et al.*, 2015). ATP může být ve spermiích produkován glykolýzou, a nebo oxidativní fosforylací v mitochondriích (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2024). V případě hřebčích spermií je většina ATP získávána právě prostřednictvím oxidativní fosforylace (Akbarinejad *et al.*, 2020). Při tvorbě ATP je oxidativní fosforylace při srovnání s glykolýzou účinnější, v důsledku čehož mají druhy zvířat využívající oxidativní fosforylaci spermie s vyšší rychlostí pohybu (Plessis *et al.*, 2015). Vedlejšími produkty mitochondriální oxidativní fosforylace jsou však také ROS, které způsobují oxidační poškození mitochondrií, což následně vede k vyčerpání ATP, narušení integrity plazmatické membrány spermií a v konečném důsledku ke snížení pohybové aktivity spermií (Ghorbani *et al.*, 2024) a k zániku spermií během 24–48 hodin (Becerro-Rey *et al.*, 2024).

Pro hodnocení mitochondriální aktivity spermií se využívá celá řada metod. Příkladem mohou být JC1 assay (Arruda de Oliveira *et al.*, 2017; Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2024), JC-10 Assay Kit (Elkhawagahetal *et al.*, 2024) a nebo využití nitrotetrazoliové modři (Věžník *et al.*, 2007).

1.5 MOŽNOSTI ZPRACOVÁNÍ EJAKULÁTU HŘEBCŮ

Moderní reprodukce koní je u většiny plemen založena na využití umělé inseminace (Gibb *et al.*, 2015; Prell *et al.*, 2020). Rozšíření používání umělé inseminace urychluje genetický pokrok tím, že inseminační dávky hřebců jsou dostupné chovatelům mimo zemi nebo region, kde se hřebec nachází (Pagl *et al.*, 2006). V chovu koní se využívá čerstvého, chlazeného a zmrazeného ejakulátu (Ghadimi *et al.*, 2014; Prell *et al.*, 2020;). Bylo zjištěno, že manipulační postupy spojené se zpracováním ejakulátu, jako jsou centrifugace, ředění a zmrazení, snižují jeho kvalitu. To je primárně způsobeno produkcí ROS a zhoršením schopnosti spermií vychytávat ROS. Hřebčí spermie jsou zvláště citlivé na oxidační poškození kvůli jejich vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně a jejich neefektivnímu systému vychytávání volných radikálů (Ghorbani *et al.*, 2024). Přítomnost ROS, ve fyziologické koncentraci, je nezbytná pro normální funkce spermií, jako jsou hyperaktivace, kapacitace a akrozomová reakce (De Iuliis *et al.*, 2009). Vyšší akumulace ROS během manipulace a skladování *in vitro* poškozuje kvalitu spermií, což je charakterizováno snížením pohyblivosti spermií (Aitken *et al.*, 2004), viability a funkčnosti plazmatické membrány (Baumber *et al.*, 2000), změnami funkce mitochondrií (da Silva *et al.*, 2011), změnami chromatinu (Burnaugh *et al.*, 2007), poškozením enzymatického antioxidačního systému (Affonso *et al.*, 2017), poškozením akrozomální membrány, zvýšením abnormalit spermií a vyšší peroxidací lipidů (Marques *et al.*, 2002).

Aby se zachovala kvalita a potenciál plodnosti hřebčího ejakulátu po delší dobu skladování, byly optimalizovány techniky jeho zpracování (Ghorbani *et al.*, 2024) a byla vyvinuta i média, která umožňují skladování spermií i při vyšších teplotách (Becerro-Rey *et al.*, 2024; Nunes *et al.*, 2024a). Adekvátní zpracování ejakulátu je důležitým faktorem pro dosažení dobrých výsledků (Aurich, 2011b).

Skladování ejakulátu umožňuje chovatelům koní větší míru flexibility, pokud jde o načasování ovulace, přepravu zvířat, biologickou bezpečnost a lepší genetický zisk. Před uskladněním je však nutné ejakulát zpracovat, aby byla zachována oplozovací schopnost spermií až do doby inseminace (Clulow and Gibb, 2022). Spermie jsou citlivé na mnoho faktorů prostředí, včetně teploty, světla, fyzického poškození a různých chemických látek. Proces konzervace ejakulátu proto začíná již při jeho odběru, kdy je nezbytné přijmout opatření, která v jeho průběhu znemožní působení negativních vlivů vnějšího prostředí na spermie (Brinsko *et al.*, 2011).

Vysoká koncentrace semenné plazmy v chlazeném ejakulátu hřebců snižuje motilitu a tím i fertilitu ejakulátu. Odstraněním semenné plazmy se zvýší pohyblivost spermií a životnost chlazeného ejakulátu (Roach *et al.*, 2016; Podico *et al.*, 2023). Pokles kvality spermií při skladování v chladu lze snížit díky ředění vhodným ředidlem ve větším poměru než 1:2, nebo odstraněním většiny semenné plazmy pomocí centrifugace. Ačkoli proces centrifugace je pro plazmatickou membránu spermií kritický, tak zejména u hřebců s horší kvalitou spermií po skladování v chladu, vede částečné odstranění semenné plazmy pomocí centrifugace k dosažení lepších výsledků (Pagl *et al.*, 2006).

Také dosažení optimálních podmínek skladování ejakulátu je v praxi výzvou. Provozní podmínky skladování ejakulátu nelze zcela srovnávat s laboratorními podmínkami, už jen přeprava skladovaného ejakulátu mezi vzdálenými místy, která je v současné praxi běžnou záležitostí, ovlivňuje skladovací podmínky a zejména teplotu skladování (Vidament *et al.*, 2012).

1.6 CHLAZENÉ INSEMINAČNÍ DÁVKY HŘEBCŮ

Kryokonzervace je sice jediným způsobem dlouhodobého skladování spermií, ale vyšší náklady a nižší fertilizační schopnost kryokonzervovaných spermií vedly k tomu, že většina chovatelů využívá chlazených inseminačních dávek (Wiebke *et al.*, 2022). Také asi 20 % hřebců, i přes dobrou kvalitu čerstvého ejakulátu, není ke kryokonzervaci tolerantních a po rozmrazení není dosaženo uspokojivé kvality (Blommaert *et al.*, 2016).

Chlazené dávky hřebců se běžně používají k plemenitbě koní v Severní Americe, Evropě a Austrálii, ale plodnost dosažená při plemenitbě transportovaným ejakulátem může být nižší ve srovnání s plemenitbou klisen čerstvým spermatem (Love *et al.*, 2012). Spermie hřebců se během skladování běžně chladí na 4–5 °C (Clulow and Gibb, 2022) resp. 4–10 °C (Gibb and Aitken, 2016). Hlavní výhodou chlazení ejakulátu je snížení rychlosti metabolismu spermií, což má za následek jejich delší životnost během přepravy a skladování (Gibb *et al.*, 2015). Skladování chlazených spermií je velmi důležité pro optimalizaci řízení reprodukce u koní. Stále je však zapotřebí dalších znalostí tohoto procesu, aby bylo možné zlepšit jeho účinnost v laboratorních i provozních podmínkách. Fertilizační schopnost uskladněných hřebčích inseminačních dávek ovlivňuje celá řada faktorů, kterými jsou teplota a doba skladování, použité ředidlo, chladicí křivka, nebo počet spermií v inseminační dávce (Barbas and Mascarenhas, 2009; Vidament *et al.*, 2012).

Obecně se předpokládá, že kvalita ejakulátu, resp. spermií se po odběru, naředění a skladování v chladu časem snižuje. Není však zcela jasné, co k tomuto poklesu přispívá. Bylo prokázáno, že k poklesu kvality spermií v průběhu času přispívají faktory, kterými

jsou koncentrace spermií nebo přítomnost semenné plazmy ve skladovaném ejakulátu (Ghorbani *et al.*, 2024). Dále může být pokles kvality spermií způsoben také oxidačním poškozením spermií během jejich skladování (Ball, 2008; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2011; Guthrie and Welch, 2012), snížením množství metabolizovatelných substrátů nebo naopak zvýšením hladiny metabolických odpadních produktů ve skladovaném ejakulátu (Love *et al.*, 2012). Kvalitu spermií a tím i plodnost by bylo možné prodloužit doplněním nanočástic selenu, díky kterému dochází ke zlepšení celkové motility spermií během 24 hodin chlazeného skladování, progresivní motility během 72 h chlazeného skladování a funkčnosti plazmatické membrány po 48 hodinách skladování (Ghorbani *et al.*, 2024). Ke zlepšení kvality spermií po 48 hodinách skladování dochází i po přidání melatoninu (Jang *et al.*, 2010; Izadpanah *et al.*, 2015) nebo odstředováním uskladněného ejakulátu a každodenní výměnou starého ředidla za čerstvé (Love *et al.*, 2012).

Spermie, které jsou uchovávány v semenné plazmě si neudrží po delší dobu svoji životaschopnost. Důvodem je skutečnost, že v semenné plazmě je přítomno několik proteinů, například clusterin a protein 1 hřebčí semenné plazmy (HSP-1), které mohou způsobit předčasnou kapacitaci spermií a následnou buněčnou smrt. Bylo identifikováno několik složek, které jsou schopny tyto proteiny do určité míry blokovat, a prodloužit tak spermiím fertilizační schopnost během skladování *in vitro* v přítomnosti semenné plazmy. Obecně se jedná o globulární proteiny přítomné nejčastěji v mléce a vaječném žloutku. Předpokládá se, že kaseiny, které jsou globulárními bílkovinami v mléce a jsou také běžnou součástí mnoha ředidel určených k uchování chlazených inseminačních dávek, jsou schopny vázat nejen clusterin a HSP-1, ale také epididymální protein vázající spermie, čímž stabilizují membrány spermií a snižují podíl předčasné kapacity spermií během skladování *in vitro*. To je pravděpodobně důvod, proč nebývají zaznamenány žádné škodlivé účinky semenné plazmy, pokud je ejakulát hřebců podstatně zředěn pomocí ředidel na bázi mléka (Clulow and Gibb, 2022).

Na kvalitu hřebčích ředidel ejakulátu jsou kladeny vysoké nároky, protože ředidla musí dlouhodobě udržet pohyblivost a životaschopnost spermií v inseminačních dávkách, aby byl umožněn jejich úspěšný transport. Ředidla ejakulátu by měla udržet fertilizační schopnost zchlazených spermií po dobu 24-48 hodin (Vidament *et al.*, 2012; Halo *et al.*, 2023), nebo až po dobu 72 hodin (Gibb and Aitken, 2016; Hernández-Avilés and Love, 2021) a to především díky snížení metabolismu spermií až o 93 % (Clulow and Gibb, 2022). Po této době dochází k výraznému poklesu pohyblivosti spermií, což negativně ovlivňuje úspěšnost fertilizace. Využití antioxidantů nebo dalších ochranných látek jako součást ředidel ejakulátu může zlepšit kvalitativní parametry spermií a míru oplození (Halo *et al.*, 2023; Ghorbani *et al.*, 2024).

Existuje však řada hřebců, jejichž spermie jsou na proces chlazení velmi citlivé. Proto je potřeba vyvinout médium, které prodlouží životnost spermií, aniž by bylo nutné je zatížit procesem chlazení nebo kryokonzervací (Gibb and Aitken, 2016). Byla vyvinuta média, která umožňují skladování spermií i při vyšších teplotách, 15–22 °C (Clulow and Gibb, 2022), Nunes *et al.* (2024a) uvádí možnost skladování při 15–20 °C. Chanavat *et al.* (2005) zjistili, že při teplotě skladování 15 °C dosahují spermie sice nižší pohyblivosti než když jsou skladovány při 4 °C, ale díky vyšší teplotě je sníženo peroxidační poškození a poruchy membránových fosfolipidů. Clulow and Gibb (2022) také zmiňují, že jsou vyvíjena média, v kterých je možné skladovat spermie hřebců až po dobu 7 dnů.

Při převážné většině umělých inseminací koní se v dnešní době využívá chlazeného spermatu namísto čerstvého spermatu bezprostředně po odběru (Papin *et al.*, 2021; Segabinazzi *et al.*, 2024) i když fertilizační schopnost spermií při použití čerstvého ejakulátu je vyšší (Gibb *et al.*, 2015; Hernández-Avilés *et al.*, 2020; Clulow and Gibb, 2022). Chlazené inseminační dávky hřebců se používají také častěji než dávky kryokonzervované, protože dosahují lepších parametrů, které mají přímou souvislost s fertilizační schopností spermií (Kowalczyk *et al.*, 2019; Ghorbani *et al.*, 2024). Předpokládá se, že lepší plodnost chlazeného, než kryokonzervovaného ejakulátu hřebců je i důsledkem pouze nepatrného vlivu chlazeného skladování na integritu DNA spermií (Arruda de Oliveira *et al.*, 2017).

1.6.1 Ředidla hřebčího ejakulátu

Samotná ředidla ejakulátu se používají z celé řady důvodů. Základním z nich je zvýšení objemu ejakulátu tak, aby bylo možné inseminovat více klisen z jednoho odebraného ejakulátu. Dalším úkolem ředidla je účinná antibiotická ochrana ejakulátu, protože ten může obsahovat potenciálně patogenní organismy, které jsou tímto eliminovány. Pro jejich maximální účinek musí být antibiotika v ředidle obsažena již před jeho přidáním k ejakulátu. Dále chrání spermie před nepříznivými podmínkami prostředí a prodlužuje tak jejich fertilizační schopnost, aby bylo možné naředit ejakulát transportovat ke klisně i na větší vzdálenost. Vzhledem k výše uvedeným důvodům je zřejmé, že výběr vhodného ředidla je jedním z velice důležitých bodů v rámci chovatelského programu (Picket, 2018).

Postupem času byla vyvinuta různá ředidla pro chlazení hřebčího ejakulátu (Aurich, 2008). Přezítelnost spermií je ovlivněna především složením použitého ředidla (LeFrappier *et al.*, 2010; Coutinho da Silva *et al.*, 2012). Obvykle se ředidla skládají ze složek, jako jsou cukry, elektrolyty, pufry, vaječný žloutek a mléko (Batellier *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2017). Většina ředidel využívaných pro chlazené skladování hřebčího ejakulátu je založena buď na mléce nebo vaječném žloutku (Pugliesi *et al.*, 2012; Gibb and Aitken, 2016). Obecně platí, že vhodné ředidlo musí splňovat následující atributy. Obsahuje látky potřebné k ochraně spermií proti změnám teplot, zejména chladu, toho je dosaženo přidáním mikromolekul a makromolekul vaječného žloutku nebo mléčných proteinů. To umožňuje hřebčím spermii přežít nepříznivé podmínky, zejména ochlazení, pro možnost jejich skladování a možnost případné přepravy. Dále musí mít ředidlo optimální osmotický tlak, správnou rovnováhu minerálních prvků a kombinaci živin. Protože motilita spermií vyžaduje energii, předpokládá se, že ideální ředidlo musí obsahovat složku, která tuto energii poskytuje. Je však možné, že potřebná energie je součástí spermií nebo semenné plazmy (Picket, 2018). Dle práce Hernández-Avilés *et al.* (2020) cukry, jako je glukóza, zvyšují motilitu spermií během jejich skladování. Dále jsou v ředidle obsažena pufrovací činidla, která neutralizují toxické metabolity produkované spermii, a také látky potřebné pro stabilizaci enzymových systémů a zajištění integrity membrán spermií (Picket, 2018). Ředidla musí také obsahovat antibiotika, která minimalizují přítomnost bakterií v inseminační dávce (Hernández-Avilés *et al.*, 2018). V neposlední řadě musí být ředidlo skladováno tak, aby bylo zabráněno jeho kontaminaci a znehodnocení (Picket, 2018).

Mléčná ředidla

Jedna z nejpoužívanějších ředidel v případě chlazených inseminačních dávek jsou ředidla na bázi odstředěného mléka (Batellier *et al.*, 2001), která představují efektivní a praktický způsob krátkodobého uchování ejakulátu hřebců.

Mléko jako biologický produkt s komplexním složením obsahuje látky, které jsou prospěšné pro spermie ale také složky, jež mohou poškodit jejich životnost (Pagl *et al.*, 2006). Mléčná frakce jako je například α -laktoglobulin negativně ovlivňuje motilitu spermií (Batellier *et al.* 1997), naopak β -laktoglobulin a nativní fosfokaseinát jsou pro spermie prospěšné (Batellier *et al.* 2001). Velkým problémem ředidel na bázi mléka je tedy skutečnost, že tyto biologické produkty se skládají z různých látek a nelze je tak standardizovat a mezi šaržemi se mohou lišit (Pagl *et al.*, 2006). Z tohoto důvodu byla vytvořena ředidla s chemicky definovaným složením. Tato ředidla obsahují pouze látky prokazatelně prospěšné pro spermie a snižují potenciální variabilitu mezi jednotlivými šaržemi (Aurich, 2008). Také bylo prokázáno, že přidání antioxidantů, jako je kyselina askorbová nebo pyruvát do ředidla, zvýší podíl membránově intaktních a pohyblivých spermií během jejich skladování (Pagl *et al.*, 2006).

Jedním z chemicky definovaných ředidel je INRA 96, která je založena na obsahu modifikovaných Hanksových solí a ty jsou doplněny nativním fosfokaseinátem (Batellier *et al.*, 2001). Nativní fosfokaseinát je mléčná složka, která se skládá z kaseinů α , β a κ (Batellier *et al.*, 1997) a vykazuje přímý ochranný účinek spermií hřebců (Batellier *et al.*, 2000). Ředidlo INRA 96 je dlouhodobě nejlepším a nejčastěji používaným ředidlem (LeFrappier *et al.*, 2010; Novello *et al.*, 2020).

V posledních letech bylo na trh uvedeno nové mléčné ředidlo, a to BotuSemen Gold. Toto ředidlo obsahuje kaseinát sodný v kombinaci s cholesterolem s obsahem cyklodextrinu (Novello *et al.*, 2020). Kaseinové micely působí jako aktivní složky, které chrání spermie (Bergeron and Manjunath, 2006). Mechanismus ochrany spermií je založen na vazbě na proteiny semenné plazmy a tím snížení ztrát lipidů z membrány spermií během jejich skladování (Manjunath, 2012). Cholesterol v ředidle BotuSemen Gold stabilizuje pomocí cyklodextrinu plazmatické membrány spermií, a tím ovlivňuje fertilizační schopnost inseminační dávky (Hartwig *et al.*, 2014).

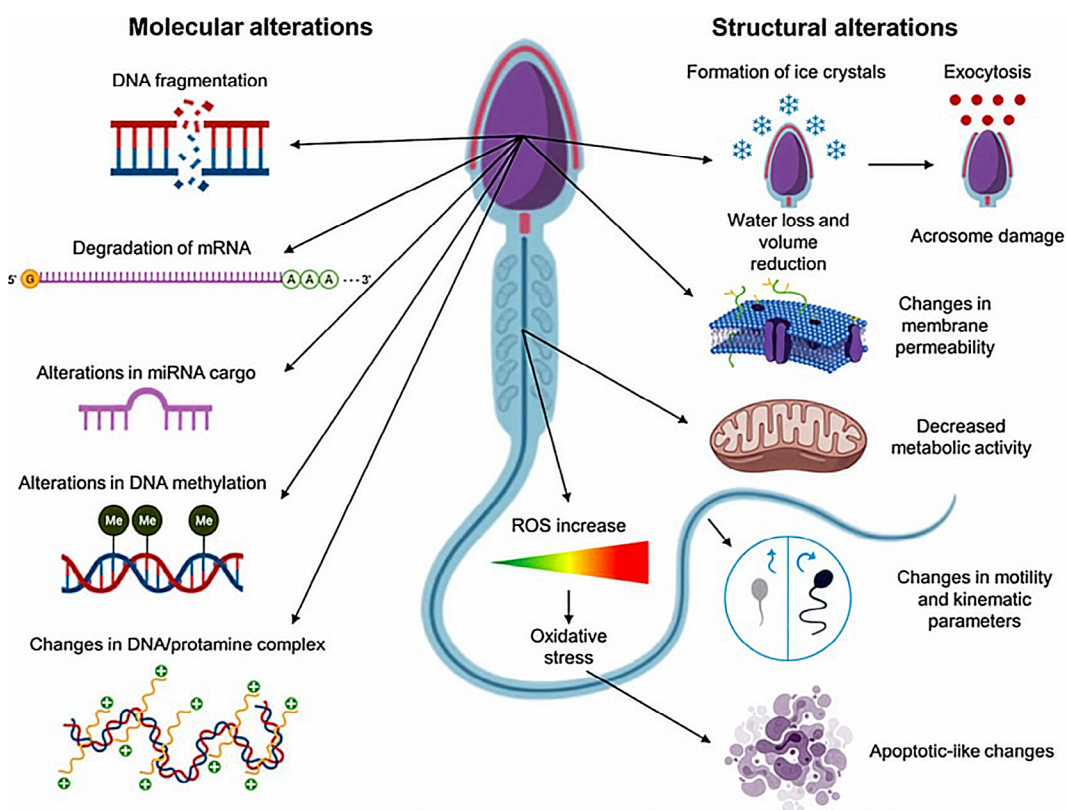
1.7 KRYOKONZERVACE HŘEBČÍHO EJAKULÁTU

Díky kryokonzervaci je metabolismus spermií extrémně snížen a uchování spermií v tekutém dusíku umožňuje jejich skladování po neomezeně dlouhou dobu (Clulow and Gibb, 2022). Využití kryokonzervovaných inseminačních dávek hřebců nabízí při srovnání s inseminací čerstvým, a nebo chlazeným ejakulátem celou řadu výhod (Pasch *et al.*, 2024). Umožňuje dlouhodobé uchovávání genetického materiálu, naprosto odstraňuje geografické bariéry, podporuje šíření genů geneticky lepších jedinců v průběhu generací, přispívá k zachování biologické rozmanitosti (Miller, 2008; Ali *et al.*, 2017), zajišťuje flexibilní dostupnost ejakulátu podle potřeb klisny, snižuje variabilitu kvality ejakulátu a umožňuje efektivnější využití každého odebraného ejakulátu (Pasch *et al.*, 2024). Kryokonzervace ejakulátu hřebců je často spojena se špatnou kvalitou spermií po rozmrazení (El-Badry *et al.*, 2017; Elkhawagah *et al.*, 2020). Jedním z důvodů této snížené

kvality je osmotický stres, ke kterému u spermií dochází během procesu zmrazování a rozmrazování (Jhamb *et al.*, 2023).

Protokoly pro kryokonzervaci ejakulátu hřebců obvykle zahrnují odstředění ihned po odběru spermatu, aby byla odstraněna většina semenné plazmy a zvýšila se koncentrace spermií. Vzniklý sediment spermií se poté znovu suspenduje v kryoextenzoru, následně se ochladí a v pejetách zmrazí (Nunes *et al.*, 2024a). Avšak nejrůznější látky přítomné v semenné plazmě mohou ovlivnit metabolismus, motilitu a mrazitelnost spermií. Proteiny přítomné v semenné plazmě přímo reagují s plazmatickou membránou spermií, čímž zabraňují jejich předčasné kapacitaci a akrozomální reakci. Pokud se semenná plazma před zmrazením odstraní, sníží se dostupnost proteinu důležitého pro funkce plazmatických membrán, a to by mohlo vést k narušení jejich funkce a tím i ke snížení fertilizační schopnosti spermií (Bubeníčková *et al.*, 2020). Odstranění semenné plazmy před kryokonzervací také omezuje ochranné působení antioxidačních enzymů semenné plazmy proti oxidačnímu stresu (Peris-Frau *et al.*, 2020).

V průběhu procesu zmrazování a rozmrazování dochází ke strukturálním a molekulárním změnám (obrázek 2), dochází k různým stupňům poškození membrán spermií (Morris *et al.*, 2007; El-Badry *et al.*, 2017), poškození DNA (Klewitz *et al.*, 2008; Sardoy *et al.*,



Obr. 2: Strukturální a molekulární změny u savčích spermií po kryokonzervaci

Zdroj: Yáñez-Ortiz *et al.*, 2022

2008; Caldevilla *et al.*, 2024) poškození mitochondrií (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2010; Yáñez-Ortiz *et al.*, 2022) a tvorbě ROS, které způsobují předčasné změny podobné kapacitaci (Burnaugh *et al.*, 2010), což ovlivňuje kryopřežitelnost a snižuje fertilizační schopnost spermií (Elkhawagah *et al.*, 2020; Clulow and Gibb, 2022).

Přidáním nejrůznějších aditiv do kryokonzervačních médií lze dosáhnout zlepšení parametrů kvality spermií po jejich rozmrazení (Arruda de Oliveira *et al.*, 2013; Ghallab *et al.*, 2017; Jhamb *et al.*, 2023). Kromě enzymatických antioxidantů jsou pro udržení redoxní rovnováhy důležité i ty neenzymatické. Mezi nimi je nejdůležitějším antioxidantem redukovaný glutathion, který interaguje s enzymy glutathionperoxidázou a glutathionreduktázou. Přidáním redukovaného glutathionu do hřebčího zmrazovacího média vede ke zvýšení progresivní motility spermií, podílu viabilních spermií a spermií s intaktním akrozomem po rozmrazení (Oliveira *et al.*, 2013). Přítomnost trehalózy chrání funkčnost plazmatické membrány spermií, integritu akrozomu a DNA, zvyšuje mitochondriální membránový potenciál a také chrání spermie hřebců před oxidačním stresem (Jhamb *et al.*, 2023). Obecně platí, že zmrazovací ředidla chrání spermie před chladovým šokem, poskytují látky pro dodávání energie (Caldevilla *et al.*, 2024), stabilizují membrány a další buněčné struktury, kontrolují pH a osmolaritu. Navíc přidáním kryoprotektantů se zabraňuje tvorbě intra a extracelulárních ledových krystalů (Nunes *et al.*, 2024b). Nejčastěji používaným kryoprotektivem je glycerol (Benson *et al.*, 2012; Neuhauser *et al.*, 2019).

Mezi hřebci existují značné rozdíly v mrazitelnosti jejich spermií (Oldenhof *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2024b), jak pokud jde o preferenci ředidla, tak křivku poklesu teploty pro přežití procesu kryokonzervace, a to by mělo být vždy zohledněno při zmrazování hřebčího ejakulátu (Caldevilla *et al.*, 2024), přičemž někteří z nich nejsou vhodnými kandidáty pro kryokonzervaci spermií (Blommaert *et al.*, 2016), a to i přes modifikované protokoly (Clulow and Gibb, 2022). Ve srovnání s ostatními hospodářskými zvířaty vykazují inseminační dávky hřebců horší výsledky po rozmrazení a to přibližně 30 % pohyblivosti a životaschopnosti (Catalán *et al.*, 2020; Elkhawagah *et al.*, 2020).

V poslední době jsou v chovatelských programech sportovních koní stále více populární kryokonzervované inseminační dávky (Morris *et al.*, 2024).

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem této práce je zhodnotit vliv vybraných faktorů na kvalitu nativního ejakulátu hřebců a zhodnotit vliv použitého ředidla ejakulátu na kvalitu chlazených inseminačních dávek hřebců využívaných v plemenitbě.

Dílčí cíle práce:

- Cílem první části práce je analyzovat vybrané parametry nativního ejakulátu plemenných hřebců využívaných v Zemském hřebčinci v Tlumačově.
- Cílem druhé části práce je zhodnotit vliv použitého ředidla na kvalitativní parametry spermií v chlazených inseminačních dávkách plemenných hřebců.

Vědecké hypotézy:

- Kvalita hřebčího ejakulátu je ovlivněna individualitou hřebce, jeho plemenným typem a stářím pleménika.
- Kvantitativní a kvalitativní parametry nativního ejakulátu se vzájemně ovlivňují.
- Volba použitého ředidla ovlivní kvalitativní parametry chlazených inseminačních dávek plemenných hřebců.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 ZEMSKÝ HŘEBČINEC TLUMAČOV

Zemský hřebčinec v Tlumačově byl založen již v roce 1925. Hlavním cílem hřebčince je produkovat plemeníky pro zemský chov. Zemský hřebčinec Tlumačov se soustředí zejména na zajištění testace chladnokrevných hřebců a také provádí ranou testaci u českého teplokrevníka v testovní odchovně. Jeho další velmi důležitou aktivitou je také provoz reprodukčního centra, díky kterému je zajištěna produkce inseminačních dávek od nejrozličnějších plemen hřebců.

3.2 HŘEBCI A ODBĚR EJAKULÁTU

Sledování probíhalo v průběhu tří reprodukčních sezón v období 2018 až 2020. Celkem bylo využito 28 hřebců různých plemen, kteří působili v uvedených sezónách v Zemském hřebčinci v Tlumačově. V práci jsou hřebci označeni velkými písmeny dle abecedy. Jednalo se o následující plemena koní: anglický plnokrevník, českomoravský belgický kůň, český sportovní pony, český teplokrevník, hafling, hannoverský kůň, holštýnský kůň, huculský kůň, moravský teplokrevník, oldenburský kůň, shagya arab, slezský norik, starokladrubský kůň, trakenský kůň, westfálský kůň a zangersheide. Všichni tito hřebci byli ustájeni v hřebčinci v Tlumačově. Věk hřebců se pohyboval v rozmezí 2 až 19 let. Celkem 7 hřebců působilo v hřebčinci ve více reprodukčních sezónách sledovaného období, jeden hřebec (A) ve všech třech sezónách a 6 zbývajících hřebců ve dvou sezónách (E a M v sezónách 2018 a 2019, N, S, T a W v sezónách 2019 a 2020), tito hřebci byli do sledování zařazeni ve všech sezónách, v kterých v hřebčinci během sledovaného období působili.

Odběry ejakulátů probíhaly v Reprodukčním centru Zemského hřebčince v Tlumačově pomocí fantomu a metodou odběru do umělé vagíny typu Missouri (Minitübe GmbH, Německo). Celkový počet odběrů v průběhu sledovaného období, které byly předmětem sledování, byl 240. Z toho 82 odběrů bylo provedeno v roce 2018, 101 odběrů v sezóně 2019 a 57 odběrů v roce 2020. Pro účely této práce byly využity všechny odebrané ejakuláty bez ohledu na jejich kvalitu.

3.3 POUŽITÁ ŘEDIDLA

Celkem bylo během sledování využito pěti různých mléčných ředidel, která jsou běžně využívána na přípravu chlazených inseminačních dávek hřebců. Přesné chemické složení ředidel je obchodním tajemstvím jednotlivých výrobců.

Ředidlo dle receptury hřebčince (ZH): je založeno na bázi odstředěného mléka, bylo připravováno na základě receptury Zemského hřebčince v Tlumačově. Toto ředidlo obsahuje sušené odtučněné mléko, glukózu, gentamycin a destilovanou vodu.

Ředidlo BotuSemen Gold (BSG): bylo dodávané firmou Nidacon International AB (Švédsko). BotuSemen Gold obsahuje kaseiny, cukry, aminokyseliny, antioxidanty, cholesterol a pomocné látky. Před samotným odběrem bylo ředidlo BotuSemen Gold připravené dle pokynů výrobce naředěním sterilní redestilovanou vodou.

Ředidlo Equi PRO ApX² (EPA): od výrobce Minitübe GmbH (Německo), obsahuje Ergothioneine pro lepší ochranu fertilizační schopnosti spermií a gentamicin. Bylo dodáno v práškové formě a před použitím rozpuštěno ve sterilní redestilované vodě podle pokynů výrobce.

Ředidlo INRA 96 (INRA): bylo dodávané firmou IMV Technologies (Francie). INRA 96 obsahuje kaseiny, pufr, soli, cukry, vodu, penicilin, gentamycin a amfotericin B. Vidament *et al.* (2012) uvádějí, že je založeno na modifikovaném roztoku Hanksových solí, 67 mM glukózy, 126 mM laktózy, nativní fosfokaseinát (27 g/L, mléčná purifikovaná frakce složená z celkových micelárních kaseinů) a je doplněno o penicilin (50 IU/mL) a gentamicin (50 µg/mL).

Ředidlo Equi PLUS (EP): bylo dodáváno firmou Minitübe GmbH (Německo), jedná se o médium na bázi odstředěného mléka, určené pro uchování aktivity spermií až po dobu 72 hodin. Obsahuje odtučněné sušené odstředěné mléko a vysoce kvalitní cukry (glukóza a sacharóza) a pufr, s obsahem antibiotik (linkomycin a spektinomycin). Bylo dodáno v práškové formě a před použitím rozpuštěno ve sterilní redestilované vodě podle pokynů výrobce.

Po zhodnocení získaných výsledků z odběrové sezóny 2018, byly v letech 2019 a 2020 využívány už pouze tři nejlépe hodnocená ředidla (ZH, BSG a INRA).

3.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Bezprostředně po odběru hřebce byla z ejakulátu odstraněna gelová frakce, a to přefiltrováním přes sterilní gázu do sterilní kádinky. Následně byl změřen objem ejakulátu. Po stanovení objemu byly odebrány vzorky na hodnocení motility a koncentrace spermií. Z nativního ejakulátu byl odebrán také vzorek, ze kterého byl zhotoven nátěr na morfologické hodnocení spermií a vzorek pro hodnocení viability spermií.

Z ejakulátu bylo zhotoveno vždy pět vzorků v roce 2018 a tři vzorky v letech 2019 a 2020, každý o objemu 6 ml. U všech ředidel byl použit poměr ředění ejakulátu ku ředidlu 1:2. První vzorek byl naředěný ředidlem ZH, druhý ředidlem BotuSemen Gold, třetí ředidlem Equi PRO ApX², čtvrtý ředidlem INRA 96 a pátý vzorek byl naředěn ředidlem Equi PLUS. V letech 2019 a 2020 byla využita už jen ředidla ZH, BotuSemen Gold a INRA 96. Tyto vzorky byly převezeny do laboratoře Reprodukce hospodářských zvířat Mendelovy univerzity v Brně, kde byly následně zpracovávány a hodnoceny.

Vzorky byly převáženy a uchovávány v chladicím termoboxu při teplotě 5 °C. Po 24, 48 a 72 hodinách od odběru byla stanovena u jednotlivých vzorků celková motilita spermií, byly zhotoveny nátěry pro morfologické hodnocení spermií a v letech 2019 a 2020 byly odebrány vzorky na hodnocení viability spermií.

3.5 HODNOCENÍ KVANTITATIVNÍCH A KVALITATIVNÍCH UKAZATELŮ EJAKULÁTU

3.5.1 Objem ejakulátu

Objem ejakulátu byl hodnocen pomocí vážkové metody. Po samotném odběru byl získaný ejakulát zbaven gelové frakce pomocí filtrace přes sterilní gázu. Takto získaný ejakulát byl zvážen a tím byla získána hodnota jeho objemu.

3.5.2 Koncentrace spermií

Ze získaného ejakulátu bylo 100 μ l ejakulátu odebráno a naředěno 400 μ l ředidla. Takto vytvořený vzorek byl promíchán a byla zhodnocena koncentrace spermií pomocí Sperm Class Analyzer® CASA systému (Microptic SL, Španělsko) a Nikon Eclipse E200 mikroskopu. Bylo hodnoceno vždy nejméně pět zorných polí a minimálně 1000 spermií, poté byla stanovena koncentrace spermií v miliónech na 1 ml ejakulátu.

3.5.3 Celkový počet spermií v ejakulátu

Celkový počet spermií v ejakulátu by spočítán jako součin objemu ejakulátu v ml a koncentrace spermií v 1 ml ejakulátu. Celkový počet spermií je pak uváděn v miliardách spermií na daný ejakulát.

3.5.4 Motilita spermií – objektivní metoda

Ze získaného ejakulátu bylo 100 μ l ejakulátu odebráno a naředěno 400 μ l ředidla o teplotě 37 °C. Takto vytvořený vzorek byl promíchán a motilita spermií byla hodnocena pomocí Sperm Class Analyzer® CASA systému (Microptic SL, Španělsko) a Nikon Eclipse E200 mikroskopu při stálé teplotě 37 °C. Zhodnoceno bylo vždy nejméně 1000 spermií v minimálně pěti zorných polích, poté byl stanoven podíl motilních spermií v ejakulátu.

Při hodnocení motility spermií v chlazené inseminační dávce bylo vždy odebráno 500 μ l inseminační dávky. U takto získaného vzorku bylo během 30 minut dosaženo teploty 37 °C a opět byl vytvořený vzorek hodnocen pomocí Sperm Class Analyzer® CASA systému (Microptic SL, Španělsko) a Nikon Eclipse E200 mikroskopu při stálé teplotě 37 °C. Zhodnoceno bylo vždy nejméně 1000 spermií v minimálně pěti zorných polích, poté byl stanoven podíl motilních spermií v ejakulátu.

3.5.5 Motilita spermií – subjektivní metoda

Ze získaného ejakulátu bylo 100 µl ejakulátu odebráno a naředěno 400 µl ředidla o teplotě 37 °C. Takto vytvořený vzorek byl promíchán a motilita spermií byla hodnocena subjektivně pomocí mikroskopu Olympus BX51. Zhodnoceno bylo vždy nejméně pět zorných polí a po jejich zhodnocení byl stanoven podíl motilních spermií v ejakulátu.

Při hodnocení motility spermií v chlazené inseminační dávce bylo vždy odebráno 500 µl inseminační dávky. U takto získaného vzorku bylo během 30 minut dosaženo teploty 37 °C a opět byl vytvořený vzorek hodnocen pomocí mikroskopu Olympus BX51. Zhodnoceno bylo vždy nejméně pět zorných polí a po jejich zhodnocení byl stanoven podíl motilních spermií v ejakulátu. Touto metodou byla motilita spermií hodnocena pouze v roce 2018.

3.5.6 Morfologie spermií

Zhotovené nátěry pro morfologické hodnocení spermií byly barvené metodou podle Farellyho (Věžník *et al.*, 2004). Morfologické hodnocení bylo provedeno pomocí mikroskopu Euromex BioBlue s využitím imerzního oleje a zvětšení 1000×. U každého vzorku bylo zhodnoceno 400 spermií a byl stanoven podíl morfologicky normálně utvářených spermií (normospermie) v ejakulátu.

3.5.7 Viabilita spermií

Získaný ejakulát byl naředěn fyziologickým roztokem v poměru 1:2 a z takto připravené suspenze byl připraven vzorek na hodnocení viability spermií. Ke 100 µl naředěného ejakulátu bylo přidáno 10 µl 2,5 % glutaraldehydu a takto zafixovaný vzorek byl uchován při 4 °C až do jeho vyšetření.

Při hodnocení viability spermií v chlazené inseminační dávce bylo vždy odebráno 100 µl inseminační dávky a opět bylo přidáno 100 µl 2,5 % glutaraldehydu a takto zafixovaný vzorek byl uchován při 4 °C až do jeho vyšetření.

Bezprostředně před vyšetřením viability spermií byl vzorek ejakulátu nabarven barvivem bisbenzimid 33258 – Hoechst tím způsobem, že bylo smícháno 20 µl vzorku s 20 µl barviva, na podložní sklo byla zhotovena kapka 15 µl suspenze a preparát byl ihned hodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51 při vlnové délce 450 nm. U každého vzorku bylo hodnoceno 2 × 200 spermií a byl stanoven podíl viabilních spermií v ejakulátu. Viabilita spermií byla hodnocena až v letech 2019 a 2020.

3.6 STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ

Pro statistické zhodnocení byl využit program Statistica 14, data byla analyzována pomocí analýzy rozptylu (post hoc analýza s využitím Tukey HSD testu) a regresní analýzy. Získaná data jsou prezentována pomocí průměrné hodnoty, směrodatné odchylky, minimální a maximální hodnoty.

3.7 EXPERIMENTÁLNÍ SCHÉMA

3.7.1 Experiment 1

V prvním experimentu byly sledovány vybrané parametry nativních ejakulátů hřebců v odběrových sezónách 2018, 2019 a 2020.

Celkem bylo v prvním experimentu vyhodnoceno 240 odebraných ejakulátů od 28 hřebců. Byly sledovány tyto parametry ejakulátu: objem, koncentrace spermií, celkový počet spermií, podíl normospermií a podíl motilních spermií. U každého z uvedených parametrů je uvedena průměrná hodnota za jednotlivé odběrové sezóny a také celková průměrná hodnota za celé sledované období. Také byl sledován vliv měsíce v rámci odběrových sezón, vliv věku hřebců a jejich plemene na daný ukazatel. U hřebců, kteří v průběhu sledování působili ve více odběrových sezónách jsou uvedeny průměrné hodnoty daného ukazatele v jednotlivých letech. V závěru byly vyhodnoceny korelační koeficienty mezi jednotlivými sledovanými parametry nativního ejakulátu hřebců.

3.7.2 4.7.2 Experiment 2

Ve druhém experimentu byl hodnocen vliv ředidel ejakulátu na vybrané kvalitativní ukazatele spermií v chlazených inseminačních dávkách v odběrových sezónách 2018, 2019 a 2020.

V prvním roce experimentu byl hodnoceno 5 různých ředidel ejakulátu využívaných v chlazených inseminačních dávkách. Celkem bylo v roce 2018 zpracováno 82 odebraných ejakulátů od 13 hřebců. Byly sledovány následující parametry ejakulátu: podíl motilních spermií vyhodnocený subjektivní i metodou s využitím CASA po 24, 48 a 72 hodinách skladování při 5 °C v ředidlech ZH, BotuSemen Gold, Equi PRO ApX², INRA 96 a Equi PLUS. Byl také sledován vliv jednotlivých ředidel na podíl normospermií po 24 hodinách skladování.

Ve druhém a třetím roce experimentu byla hodnocena 3 nejvhodnější ředidla ejakulátu, která byla vybrána na základě výsledků z odběrové sezóny 2018. Celkem bylo v letech 2019 a 2020 zpracováno 158 odebraných ejakulátů od 23 hřebců. Byly sledovány následující ukazatele ejakulátu: podíl motilních spermií hodnocený metodou CASA, podíl viabilních spermií a podíl normospermií po 24, 48 a 72 hodinách skladování při 5 °C v ředidlech ZH, BotuSemen Gold a INRA 96.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 HODNOCENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ NATIVNÍHO EJAKULÁTU

4.1.1 Objem ejakulátu

Průměrný objem ejakulátu hřebců mezi jednotlivými odběrovými sezónami kolísal relativně nepatrně, tak jak je uvedeno v tabulce 1. Nejvyšší objem ejakulátu (259 ml) byl zaznamenán v roce 2018, v tomto roce byl zjištěn také nejvyšší průměrný objem ejakulátu (43,55 ml). Ve stejném roce byl paradoxně sledován i vůbec nejnižší objem ejakulátu (4 ml). Nejhorší sezónou, z hlediska objemu ejakulátu, byla sezóna v roce 2019, kdy byl průměrný objem ejakulátu nižší téměř o 2,5 ml ve srovnání s nejlepší sezónou v roce 2018. Průměrný objem ejakulátu hřebců v průběhu celého sledovaného období byl $42,39 \pm 13,64$ ml, což je ve srovnání s dostupnou literaturou nižší hodnota. Kolektiv autorů Věžník *et al.* (2004) uvádí průměrný objem ejakulátu u dospělých plemenných hřebců 50,60 ml, téměř dvojnásobný objem ejakulátu ($83,5 \pm 8,1$ ml), než který byl zjištěn v této práci, uvádí Podico *et al.* (2023) a nejvyšší hodnotu zjistili Serafini *et al.* (2014), a to $98,5 \pm 6,8$ ml.

Tab. 1: Vliv reprodukční sezóny na průměrný objem ejakulátu

sezóna	počet odběrů [n]	objem [ml]	S.D. [ml]	min. [ml]	max. [ml]
2018	82	43,55	13,83	4,00	259,00
2019	101	41,08	16,58	8,00	250,00
2020	57	42,55	10,51	10,00	125,00
celkem	240	42,39	13,64	4,00	259,00

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Tab. 2: Vliv měsíce odběru na průměrný objem ejakulátu

měsíc odběru	počet odběrů [n]	objem [ml]	S.D. [ml]	min. [ml]	max. [ml]
III	17	38,12	26,10	10,00	91,00
IV	31	38,97	28,03	10,00	118,00
V	37	45,43	42,76	4,00	259,00
VI	40	43,93	36,89	10,00	235,00
VII	85	42,16	32,90	8,00	250,00
VIII	30	44,68	27,86	11,00	123,00

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

V rámci jednotlivých měsíců v průběhu odběrových sezón hřebců opět nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v průměrném objemu ejakulátu v rámci jednotlivých měsíců. Zdá se však, že na počátku odběrového období jsou od hřebců získávány ejakuláty nižších objemů než v následujících měsících sezóny (tabulka 2). Tento možný trend by mohl být způsoben nedostatečně dlouhým přípravným obdobím před zahájením samotné odběrové sezóny. Serafini *et al.* (2014) ve své práci porovnávali dvě období a to duben-květen (104,2 ml) a červen-červenec (95,3 ml) a mezi těmito obdobími nenalezli statisticky významné rozdíly i když ve druhém období byl průměrný objem získaného ejakulátu nižší.

Statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,01$) v průměrném objemu ejakulátu hřebců byly nalezeny mezi věkovou skupinou hřebců od 6 do 9 let věku a skupinou hřebců starších 15 let (32,54 ml) a mladších 5 let (41,56 ml). Přičemž hřebci věkové skupiny mezi 6 a 9 rokem dosahovali z hlediska objemu ejakulátů nejlepších výsledků (59,20 ml). Naopak nejnižší hodnota průměrného objemu ejakulátu byla zjištěna u skupiny hřebců starších 15 let a byla o 26,66 ml nižší než u skupiny hřebců od 6 do 9 let (tabulka 3). Práce Věžníka *et al.* (2004) uvádí objem ejakulátu u mladých hřebečků v rozmezí 17,7 ml až 26,3 ml, což jsou mnohem nižší hodnoty, než které byly zjištěny v předkládané práci. Abah *et al.* (2023) uvádí, že objem ejakulátu má u hřebců tendenci s věkem narůstat, zjistili, že hřebata (2 až 3 roky) a starší hřebci (starší 14 let) produkují výrazně menší množství ejakulátu ve srovnání s dospělými hřebci.

Tab. 3: Vliv věku hřebce na průměrný objem ejakulátu

věk	počet odběrů [n]	objem [ml]	S.D. [ml]	min. [ml]	max. [ml]
≤ 5 let	53	41,56 ^a	24,97	10,00	119,00
6–9 let	51	59,20 ^b	44,78	8,00	259,00
10–14 let	40	47,83 ^{a,b}	49,18	14,00	250,00
≥ 15 let	96	32,54 ^a	14,89	8,00	77,00

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$

Tab. 4: Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrný objem ejakulátu

plemenná příslušnost	počet odběrů [n]	objem [ml]	S.D. [ml]	min. [ml]	max. [ml]
český teplokrevník	19	36,00 ^{a,b}	19,32	10,00	94,00
holštýnský kůň	36	27,03 ^a	10,35	15,00	70,00
oldenburský kůň	25	38,48 ^{a,b}	14,69	10,00	68,00
starokladrubský kůň	33	54,33 ^b	34,31	8,00	125,00
chladnokrevník	29	84,82 ^c	64,07	17,00	259,00

Rozdílné indexy a–c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$

Vliv plemenné příslušnosti hřebců na získaný objem ejakulátu byl také statisticky průkazný (tabulka 4). Od chladnokrevných hřebců byl získán vyšší průměrný objem ejakulátu (84,82 ml) než od plemen teplokrevných (39,04 ml). Tato skutečnost je však v rozporu se zjištěním Věžníka *et al.* (2004), jehož tým ve své práci uvádí, že průměrný objem ejakulátu u teplokrevných hřebců je 24,6 ml a o 2,6 ml nižší objem ejakulátu je u chladnokrevných hřebců, tj. 22,0 ml. Ale i mezi teplokrevnými plemeny byly zjištěny statisticky významné rozdíly. A to mezi průměrnými objemy starokladrubských hřebců (54,33 ml) a holštýnských hřebců (27,03 ml).

V tabulce 5 je uveden průměrný objem ejakulátu jednotlivých hřebců, kteří během sledovaného období působili v hřebčinci ve více sezónách. Mezi jednotlivými hřebci jsou v objemech získaného ejakulátu značné rozdíly (tabulka 5), tuto variabilitu potvrzuje i práce Serafini *et al.*, (2014). Hřebci A, E, M, W a N dosáhli v jednotlivých sezónách téměř totožného průměrného objemu ejakulátu i když mezi jednotlivými odběry v rámci sezóny byly objemy získaného ejakulátu poměrně variabilní. U hřebců S a T byl rozdíl průměrných objemů mezi oběma sezónami vyšší.

Tab. 5: Vliv sezóny na průměrný objem ejakulátu individuálních hřebců

sezóna	hřelec	počet odběrů [n]	objem [ml]	S.D. [ml]	min. [ml]	max. [ml]
2018	A	7	31,71	8,65	20,00	45,00
2019	A	7	35,43	15,36	19,00	67,00
2020	A	6	33,83	6,18	26,00	44,00
2018	E	7	22,00	3,59	18,00	28,00
2019	E	7	21,29	4,62	15,00	31,00
2018	M	7	124,71	59,25	75,00	259,00
2019	M	7	125,29	74,60	66,00	250,00
2019	S	7	41,43	10,83	26,00	65,00
2020	S	6	55,67	7,45	45,00	68,00
2019	W	6	45,57	14,45	29,00	77,00
2020	W	6	45,33	8,08	37,00	58,00
2019	N	7	25,57	8,89	17,00	46,00
2020	N	6	23,83	5,43	17,00	33,00
2019	T	7	31,57	10,07	12,00	43,00
2020	T	4	24,25	14,77	10,00	49,00

4.1.2 Koncentrace spermií v ejakulátu

Dosažené hodnoty průměrné koncentrace spermií v ejakulátech hřebců se v jednotlivých sezónách lišily. V sezóně 2019 byla hodnota průměrné koncentrace spermií o $124,15 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ nižší než v roce 2020 a o $72,32 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ nižší než v roce 2018. Tyto rozdíly byly statisticky průkazné ($p \leq 0,01$). Nevyšší průměrné hodnoty dosáhla koncentrace spermií v roce 2020 a to $341,26 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, v této sezóně byla také dosažena nejvyšší maximální hodnota koncentrace spermií za celé sledované období (tabulka 6). Průměrná koncentrace spermií v ejakulátu hřebců během celého sledovaného období byla $282,60 \pm 102,85 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. K podobné hodnotě koncentrace spermií dospěli i Podico *et al.* (2023), kteří uvádí $245 \pm 33,8 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Věžník *et al.* (2004) dospěli k mnohem vyšší průměrné koncentraci spermií v ejakulátu dospělých hřebců, a to $345,02 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Naproti tomu naopak Serafini *et al.* (2014) uvádí koncentraci spermií v ejakulátu hřebců mnohem nižší $98,4 \pm 23,1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

Mezi jednotlivými měsíci v průběhu odběrových sezón nebyly v průměrné koncentraci spermií v ejakulátu nalezeny statisticky průkazné rozdíly (tabulka 7). Nejnižší průměrná koncentrace spermií v ejakulátu byla zjištěna v červnu ($202,14 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$), a ve stejném měsíci byla zjištěna i nejnižší koncentrace spermií ($3,70 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a také maximální hodnota koncentrace spermií v ejakulátu byla v tomto měsíci nejvyšší ($459,50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Naopak nejvyšší hodnoty koncentrace bylo dosaženo v prvním měsíci odběrové sezóny ($378,62 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$), kdy bylo dosaženo i nejvyšší minimální hodnoty koncentrace spermií

Tab. 6: Vliv reprodukční sezóny na průměrnou koncentraci spermií

sezóna	počet odběrů [n]	objem [10^6 ml^{-1}]	S.D. [10^6 ml^{-1}]	min. [10^6 ml^{-1}]	max. [10^6 ml^{-1}]
2018	82	289,43 ^a	124,31	10,80	916,70
2019	101	217,11 ^b	66,88	3,70	531,70
2020	57	341,26 ^a	117,36	90,10	925,50
celkem	240	282,60	102,85	3,70	925,50

Rozdílné indexy a-b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$.

Tab. 7: Vliv měsíce odběru na průměrnou koncentraci spermií

měsíc odběru	počet odběrů [n]	objem [10^6 ml^{-1}]	S.D. [10^6 ml^{-1}]	min. [10^6 ml^{-1}]	max. [10^6 ml^{-1}]
III	17	378,62	234,99	58,90	916,70
IV	31	261,47	168,04	34,90	675,10
V	37	248,76	174,53	10,80	735,80
VI	40	202,14	125,38	3,70	459,50
VII	85	290,80	186,16	39,30	925,50
VIII	30	251,87	155,71	22,20	682,80

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

($58,90 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Serafini *et al.* (2014) ve své práci porovnávali dvě období a to duben-květen ($110,1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a červen-červenec ($96,1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a mezi těmito obdobími našli statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,05$).

Z hlediska věku hřebců nebyly nalezeny mezi jejich jednotlivými věkovými skupinami statisticky významné rozdíly (tabulka 8). Nejvyšší průměrná koncentrace spermií v ejakulátu byla zjištěna u skupiny hřebců od 10 do 14 let ($283,65 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$), v této věkové skupině bylo ale zároveň dosaženo i nejnižší hodnoty koncentrace spermií za celé sledované období ($3,70 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Nejnižší hodnota průměrné koncentrace spermií v ejakulátu byla zjištěna u skupiny hřebců mladších 5 let ($261,14 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a téměř totožné hodnoty bylo dosaženo i u hřebců starších 15 let ($261,57 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). V práci Věžníka *et al.* (2004) byla zjištěna hodnota koncentrace spermií v 1 ml ejakulátu mladých hřebečků v rozmezí $498,93 \times 10^6$ až $654,85 \times 10^6$. Bylo zjištěno, že koncentrace spermií u hřebců různých plemen je signifikantně nižší u plemenníků mladších 3 let ve srovnání se staršími hřebci ve věku 5 až 13 let (Abah *et al.*, 2023).

Plemenná příslušnost hřebců měla statisticky významný vliv na hodnoty průměrné koncentrace spermií v jejich ejakulátu. U skupin hřebců českého teplokrevníka a oldenburského koně byly zjištěny statisticky významně vyšší průměrné koncentrace spermií v ejakulátech než u hřebců ostatních plemen (tabulka 9). Nejvyšší průměrná koncentrace spermií byla zjištěna u skupiny českého teplokrevníka ($371,10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Naproti tomu hodnota průměrné koncentrace spermií v ejakulátu hřebců ze skupiny chladnokrevných

Tab. 8: Vliv věku hřebce na průměrnou koncentraci spermií

věk	počet odběrů [n]	koncentrace spermií [10^6 ml^{-1}]	S.D. [10^6 ml^{-1}]	min. [10^6 ml^{-1}]	max. [10^6 ml^{-1}]
≤ 5 let	53	261,14	194,01	10,80	925,50
6–9 let	51	273,07	193,99	11,20	735,80
10–14 let	40	283,65	197,43	3,70	916,70
≥ 15 let	96	261,57	153,50	42,30	682,80

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Tab. 9: Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrnou koncentraci spermií

plemenná příslušnost	počet odběrů [n]	koncentrace spermií [10^6 ml^{-1}]	S.D. [10^6 ml^{-1}]	min. [10^6 ml^{-1}]	max. [10^6 ml^{-1}]
český teplokrevník	19	371,10 ^a	199,36	163,60	925,50
holštýnský kůň	36	222,50 ^b	117,56	58,70	463,40
oldenburský kůň	25	338,91 ^a	161,88	112,90	682,80
starokladrubský kůň	33	206,11 ^b	143,75	10,80	467,10
chladnokrevník	29	149,44 ^b	152,57	3,70	626,30

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$

koní byla o $221,66 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ nižší, zároveň se jedná o nejnižší průměrnou hodnotu ze všech sledovaných skupin ($149,44 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Kolektiv autorů Věžník *et al.* (2004) uvádí průměrné hodnoty koncentrace spermií u obou typů hřebců mnohem vyšší. U chladnokrevných hřebců $523,65 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ a u teplokrevných hřebců $647,35 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, což je také vyšší hodnota koncentrace spermií než u chladnokrevných hřebců, stejně tak jako v předkládané práci. Rozdíl v koncentracích spermií v ejakulátech teplokrevných a chladnokrevných hřebců byl dle Věžníka *et al.* (2004) 23,64 %, naproti tomu byl tento rozdíl v předkládané práci mnohem vyšší, a to 79,64 %, přičemž průměrná hodnota koncentrace spermií u všech teplokrevných hřebců byla $119,01 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

V tabulce 10 je uvedena průměrná koncentrace spermií v ejakulátu hřebců, kteří během celého sledovaného období působili déle než jednu sezónu. Stejně jako v práci Serafini *et al.*, (2014), byla i v této práci zjištěna vysoká variabilita v koncentraci spermií mezi ejakuláty jednotlivých hřebců. Hřebci A, W, N a T vykazovali v rámci jednotlivých odběrových sezón velké rozdíly v průměrné hodnotě koncentrace spermií. Zajímavé je, že rozdíly v hodnotách objemu ejakulátu v rámci jednotlivých sezón byly u tří těchto hřebců (A, W, N) naopak nepatrné. Naproti tomu hřelec M dostáhl v obou sezónách téměř totožných výsledků a stejně tomu bylo i u hodnot objemu ejakulátu.

Tab. 10: Vliv sezóny na průměrnou koncentraci spermií v ejakulátu individuálních hřebců

sezóna	hřelec	počet odběrů [n]	koncentrace spermií [10^6 ml^{-1}]	S.D. [10^6 ml^{-1}]	min. [10^6 ml^{-1}]	max. [10^6 ml^{-1}]
2018	A	7	261,86	168,20	87,50	628,60
2019	A	7	171,33	119,31	42,30	374,00
2020	A	6	302,87	61,80	230,70	408,20
2018	E	7	293,86	100,27	163,10	463,40
2019	E	7	312,44	66,48	209,80	416,50
2018	M	7	43,09	19,03	11,20	65,20
2019	M	7	41,96	18,53	3,70	71,80
2019	S	7	263,36	98,16	163,70	458,30
2020	S	6	223,65	92,13	112,90	393,30
2019	W	6	228,73	50,15	172,30	315,30
2020	W	6	338,33	104,36	212,40	502,20
2019	N	7	406,70	33,43	362,90	457,90
2020	N	6	316,13	113,84	142,10	467,10
2019	T	7	378,59	92,79	248,20	531,70
2020	T	4	604,68	241,59	295,80	925,50

4.1.3 Celkový počet spermií v ejakulátu

Z hlediska celkového počtu spermií lze hodnotit jako nejúspěšnější sezónu 2020, kdy průměrná hodnota tohoto parametru dosáhla hodnoty $11,52 \pm 3,28 \times 10^9$ spermií v ejakulátu. Rozdíl mezi celkovým počtem spermií v ejakulátu hřebců v sezóně 2020 a ostatních sezónách byl statisticky průkazný (tabulka 11). Nejvyšší celkový počet spermií v ejakulátu ($28,43 \times 10^9$) byl však získán v roce 2018. Průměrná hodnota celkového počtu spermií v ejakulátu hřebců za celé sledované období byla $9,01 \pm 3,06 \times 10^9$. K podobnému závěru dospěli i Serafini *et al.*, (2014), kteří zjistili průměrnou hodnotu $9,26 \pm 0,37 \times 10^9$. K mnohem vyšší průměrné hodnotě celkového počtu spermií v ejakulátu dospělých hřebců ($17,8 \pm 2,5 \times 10^9$) dospěli Podico *et al.* (2023) a Věžník *et al.* (2004), kteří uvádí $17,46 \times 10^9$.

Celkový počet spermií se v jednotlivých měsících odběrových sezón sice lišil, ale tyto rozdíly nebyly statisticky průkazné (tabulka 12). Nejvyšší průměrná hodnota celkového počtu spermií v ejakulátu byla získána na začátku reprodukční sezóny ($10,79 \times 10^9$). Nejvyššího počtu spermií v ejakulátu bylo však dosaženo až v dubnu ($28,43 \times 10^9$), přitom tento měsíc z hlediska průměrné hodnoty byl druhým nejhorším měsícem. Serafini *et al.* (2014) ve své práci při srovnání období duben-květen ($11,57 \times 10^9$) a červen-červenec ($6,94 \times 10^9$) také mezi těmito sledovanými obdobími nenalezli statisticky významný rozdíl v celkovém počtu spermií v ejakulátu.

Tab. 11: Vliv reprodukční sezóny na celkový počet spermií v ejakulátu

sezóna	počet odběrů [n]	spermií v ejakulátu [10 ⁹]	S.D. [10 ⁹]	min. [10 ⁹]	max. [10 ⁹]
2018	82	8,35 ^a	3,37	1,29	28,43
2019	101	7,17 ^a	2,53	0,87	18,79
2020	57	11,52 ^b	3,28	4,69	24,20
celkem	240	9,01	3,06	0,87	28,43

Rozdílné indexy a-b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$.

Tab. 12: Vliv měsíce odběru na celkový počet spermií v ejakulátu

měsíc odběru	počet odběrů [n]	spermií v ejakulátu [10 ⁹]	S.D. [10 ⁹]	min. [10 ⁹]	max. [10 ⁹]
III	17	10,79	6,47	1,96	22,91
IV	31	7,68	5,44	1,85	28,43
V	37	8,15	5,24	1,22	18,79
VI	40	6,44	3,31	0,87	16,46
VII	85	9,16	4,19	0,93	21,16
VIII	30	9,40	5,74	1,04	24,20

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Také mezi jednotlivými věkovými kategoriemi hřebců nebyly v celkovém počtu spermií v ejakulátech nalezeny statisticky významné rozdíly. Nejvyšší průměrná hodnota celkového počtu spermií byla nalezena u hřebců z věkové skupiny 6 až 9 let (tabulka 13), v této skupině byla také zaznamenána i nejvyšší hodnota tohoto ukazatele vůbec.

Naopak nejnižší průměrná hodnota byla získána od hřebců starších 15 let. Berndtson (2014) ve své práci uvádí, že nejvyšší denní produkce spermií byla zjištěna u hřebců ve věku 13 až 20 let, ale v této práci byly zastoupeny pouze jen další dvě věkové kategorie hřebců a to 2 až 3 roky a 4 až 5 let. Věžník *et al.* (2004) uvádí celkový počet spermií v ejakulátu mladých hřebců v rozmezí $11,52 \times 10^9$ až $15,92 \times 10^9$, což je mnohem vyšší hodnota než u jakékoliv věkové kategorie hřebců v této práci. Abah *et al.* (2023) uvádí, že celkový počet spermií v ejakulátech hřebců různých plemen je signifikantně nižší u hřebců mladších 3 let ve srovnání se staršími hřebci ve věku 5 až 13 let.

Statisticky průkazné rozdíly v celkovém počtu spermií v ejakulátech byly nalezeny mezi jednotlivými plemeny. Nejvyšší průměrný počet spermií byl zjištěn u oldenburských hřebců ($11,43 \times 10^9$) a u českého teplokrevníka ($10,67 \times 10^9$). Statisticky nižší hodnotu ($p \leq 0,01$) celkového počtu spermií než oldenburský kůň, měly všechny ostatní skupiny plemen, kromě českého teplokrevníka (tabulka 14). Další statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) byl nalezen mezi českým teplokrevníkem a holštýnskými hřebci, u této skupiny

Tab. 13: Vliv věku hřebce na celkový počet spermií v ejakulátu

věk	počet odběrů [n]	spermií v ejakulátu [10 ⁹]	S.D. [10 ⁹]	min. [10 ⁹]	max. [10 ⁹]
≤ 5 let	53	8,37	4,37	1,29	18,51
6–9 let	51	10,06	5,56	2,62	28,43
10–14 let	40	8,35	4,25	0,87	18,90
≥ 15 let	96	7,85	5,00	0,92	24,20

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Tab. 14: Vliv plemenné příslušnosti hřebce celkový počet spermií v ejakulátu

plemenná příslušnost	počet odběrů [n]	spermií v ejakulátu [10 ⁹]	S.D. [10 ⁹]	min. [10 ⁹]	max. [10 ⁹]
český teplokrevník	19	10,67 ^{a,c}	3,63	5,38	18,51
holštýnský kůň	36	5,42 ^{b,d}	2,31	1,49	9,74
oldenburský kůň	25	11,43 ^a	4,27	5,49	18,79
starokladrubský kůň	33	7,95 ^{c,d}	3,88	0,93	17,76
chladnokrevník	29	7,89 ^{c,d}	6,61	0,87	28,43

Rozdílné indexy a–d vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$

byla průměrná hodnota celkového počtu spermií v ejakulátu vůbec nejnižší ($5,42 \times 10^9$). Mezi ostatními skupinami nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly. Při srovnání s prací Věžníka *et al.* (2004) byly celkové počty spermií v ejakulátech hřebců v této práci mnohem nižší. Věžník *et al.* (2004) uvádí $15,92 \times 10^9$ spermií v ejakulátu teplokrevných hřebců a $11,52 \times 10^9$ u chladnokrevných hřebců, zatímco v této práci byla hodnota celkového počtu spermií v ejakulátu chladnokrevníků $7,89 \times 10^9$ a u teplokrevníků $8,37 \times 10^9$.

V tabulce 15 jsou uvedeny hodnoty celkového množství spermií u hřebců, kteří v sledovaném období působili ve více reprodukčních sezónách. Téměř stejných hodnot průměrného počtu spermií v ejakulátu v průběhu dvou sledovaných sezón dosáhli hřebci E, M a T, kdy rozdíly mezi jednotlivými sezónami byly u těchto hřebců pouze $0,11 \times 10^9$, $0,42 \times 10^9$ a $0,85 \times 10^9$. Naproti tomu největší rozdíly mezi jednotlivými sezónami byly nalezeny u hřebců A, W a N, kdy největší rozdíl byl u hřebce W a to $5,56 \times 10^9$.

Tab. 15: Vliv sezóny na celkový počet spermií v ejakulátu individuálních hřebců

sezóna	hřelec	počet odběrů [n]	spermií v ejakulátu [10^9]	S.D. [10^9]	min. [10^9]	max. [10^9]
2018	A	7	7,11	2,85	3,73	12,57
2019	A	7	4,61	1,92	2,03	7,11
2020	A	6	10,09	2,03	6,92	13,64
2018	E	7	6,31	1,97	4,54	9,59
2019	E	7	6,42	0,96	5,56	8,33
2018	M	7	4,70	2,19	2,62	8,87
2019	M	7	4,28	2,52	0,87	9,83
2019	S	7	10,75	4,53	6,38	18,79
2020	S	6	12,21	4,57	7,00	18,61
2019	W	6	10,24	3,48	6,03	17,98
2020	W	6	15,80	6,49	8,50	24,20
2019	N	7	10,25	3,17	7,78	17,76
2020	N	6	6,92	1,15	4,69	8,00
2019	T	7	11,33	3,15	5,38	15,91
2020	T	4	12,18	4,57	7,31	18,51

4.1.4 Podíl normospermii v ejakulátu

Mezi jednotlivými sledovanými reprodukčními sezónami byly z hlediska průměrného podílu normospermii v ejakulátech hřebců nalezeny statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,01$). V roce 2018 byl podíl normospermii v ejakulátu o 8,11 % vyšší než v roce 2019 a o 6,94 % vyšší než v roce 2020 (tabulka 16). Nejnížší průměrný i absolutní podíl normospermii v ejakulátu hřebců byl zaznamenán v roce 2019. Za celé sledované období byl průměrný podíl normospermii v ejakulátu hřebců $79,19 \pm 5,84$ %. Při srovnání s prací od Věžníka *et al.* (2004) je průměrný podíl normospermii v ejakulátech hřebců v této práci o 5,79 % vyšší, přičemž Věžník *et al.* (2004) uvádějí průměrný podíl normospermii 73,4 %. Naproti tomu Ghorbani *et al.* (2024) zjistili průměrný podíl normospermii v nativním ejakulátu 88,67 %, což je o 9,48 % vyšší podíl, než byl zjištěn v této práci. Také Łacka *et al.* (2016) uvádí vyšší podíl normospermii v nativním ejakulátu hřebců 92,05 %.

V průběhu reprodukčních sezón byl průměrný podíl normospermii v rámci jednotlivých měsíců variabilní (tabulka 17). Z hlediska podílu normospermii v ejakulátu byl jednoznačně nejhorším měsícem srpen (70,29 %), kdy byl podíl normospermii v ejakulátu ve srovnání se všemi ostatními měsíci statisticky významně nejnížší ($p \leq 0,01$). Naopak nejvyšší hodnoty dosáhl tento ukazatel hned na začátku sezóny, v měsíci březnu, kdy byl průměrný podíl

Tab. 16: Vliv reprodukční sezóny na průměrný podíl normospermii

sezóna	počet odběrů [n]	podíl normospermii [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
2018	82	84,21 ^a	4,14	64,00	95,80
2019	101	76,10 ^b	7,11	40,50	93,00
2020	57	77,27 ^b	6,26	44,00	91,50
celkem	240	79,19	5,84	40,50	95,80

Rozdílné indexy a-b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$.

Tab. 17: Vliv měsíce odběru na průměrný podíl normospermii

měsíc odběru	počet odběrů [n]	podíl normospermii [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
III	17	84,98 ^a	5,34	73,80	91,00
IV	31	84,67 ^a	6,67	58,00	93,00
V	37	80,11 ^{a,b}	9,92	45,50	91,00
VI	40	77,53 ^b	11,45	40,50	95,80
VII	85	79,52 ^{a,b}	8,95	44,00	93,50
VIII	30	70,29 ^c	13,35	43,00	91,00

Rozdílné indexy a-c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$.

normospermii v ejakulátu 84,98 % a ve srovnání s již zmiňovaným srpnem (70,29 %) a také červnem (77,53 %) byly tyto rozdíly statisticky významné ($p \leq 0,01$). Statisticky průkazný rozdíl ($p \leq 0,01$) v podílu normospermii byl nalezen i mezi měsíci duben (84,67 %) a červen (77,53 %).

Mezi jednotlivými věkovými kategoriemi hřebců byly v průměrném podílu normospermii v ejakulátech nalezeny statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,01$) a to mezi nejmladší a nejstarší věkovou kategorií. U věkové kategorie hřebců do 5 let byl průměrný podíl normospermii v jejich ejakulátu 76,20 % zatím co u skupiny hřebců starších 15 let byl průměrný podíl normospermii o 5,03 % vyšší (81,23 %). U nejstarší věkové kategorie hřebců byla zaznamenána nejvyšší minimální (57,00 %) i maximální (95,80 %) hodnota tohoto ukazatele, naopak u nejmladší skupinky hřebců byla zjištěna nejnižší minimální (40,50 %) i maximální (88,50 %) hodnota podílu normospermii v ejakulátu. Abah *et al.* (2023) uvádí, že podíl normálních spermií v ejakulátu hřebců je ovlivněn věkem, přičemž u hřebců ve věku 5 až 13 let byl zjištěn signifikantně vyšší podíl normálních spermií ve srovnání s mladými hřebci (≤ 3 roky) a hřebci staršími 14 let.

Plemenná příslušnost hřebců neměla na podíl normospermii v ejakulátu statisticky významný vliv. U chladnokrevných hřebců byl průměrný podíl normospermii v ejakulátu nejnižší (74,77 %), ale i přesto, nebyl tento rozdíl statisticky významný. Z hlediska průměrného podílu normospermii v ejakulátu dosáhli nejlepších výsledků holštýnští hřebci (80,86 %), u kterých byl podíl normospermii v ejakulátu o 6,09 % vyšší než u chladnokrevných hřebců.

Tab. 18: Vliv věku hřebce na průměrný podíl normospermii

věk	počet odběrů [n]	podíl normospermii [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
≤ 5 let	53	76,20 ^a	12,40	40,50	88,50
6–9 let	51	80,08 ^{a,b}	10,44	43,00	91,30
10–14 let	40	77,33 ^{a,b}	12,08	44,00	93,00
≥ 15 let	96	81,23 ^b	8,00	57,00	95,80

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$.

Tab. 19: Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrný podíl normospermii

plemenná příslušnost	počet odběrů [n]	podíl normospermii [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
český teplokrevník	19	79,74	7,47	62,00	87,00
holštýnský kůň	36	80,86	11,16	40,50	91,00
oldenburský kůň	25	79,52	7,49	61,00	91,00
starokladrubský kůň	33	79,77	9,89	48,00	93,00
chladnokrevník	29	74,77	12,44	45,50	90,80

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

U hřebců, kteří působili během sledovaného období ve více odběrových sezónách, nebyly rozdíly v podílu normospermii v jejich ejakulátu příliš rozdílné (tabulka 20). Nejvyšší rozdíl byl zjištěn u hřebců M a W, a to 4,89 %. Nejnižší podíl normospermii byl zjištěn u hřebce T (62,00 %) v sezóně 2019 a naopak nejvyšší u hřebce A (95,80 %) v sezóně 2018.

Tab. 20: Vliv sezóny na průměrný podíl normospermii v ejakulátu individuálních hřebců

sezóna	hřelec	počet odběrů [n]	podíl normospermii [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
2018	A	7	90,71	3,82	82,75	95,80
2019	A	7	86,50	3,85	80,50	93,00
2020	A	6	86,67	2,75	83,00	91,50
2018	E	7	86,17	6,36	71,50	91,00
2019	E	7	87,50	2,04	83,00	89,50
2018	M	7	72,36	5,76	65,00	82,00
2019	M	7	77,25	2,73	72,00	80,00
2019	S	7	80,43	6,85	70,00	91,00
2020	S	6	84,17	2,81	79,00	87,00
2019	W	6	72,36	5,76	65,00	82,00
2020	W	6	77,25	2,73	72,00	80,00
2019	N	7	85,43	5,05	77,00	93,00
2020	N	6	84,50	5,67	75,00	91,00
2019	T	7	79,29	7,74	62,00	87,00
2020	T	4	82,75	3,36	77,00	85,50

4.1.5 Podíl motilních spermií v ejakulátu

Z hlediska průměrné motility spermií v ejakulátech hřebců lze hodnotit jako nejúspěšnější sezónu 2020 (tabulka 21), kdy průměrná hodnota motility spermií byla 94,13 %. Rozdíl v motilitě spermií mezi sezónou 2020 a ostatních sezónách byl statisticky průkazný ($p \leq 0,01$). Nejnižší podíl motilních spermií v ejakulátu vůbec (4,30 %) byl zjištěn v odběrové sezóně 2019, tato hodnota byla naměřena u nejmladšího ze sledovaných hřebců, kdy jeho průměrná motilita za celé sledované období dosáhla 28,00 %. Průměrná hodnota motility spermií v ejakulátu hřebců za celé sledované období byla 88,68 %. Při srovnání uvedené motility spermií s prací Věžníka *et al.* (2004) je tato hodnota motility spermií téměř o 18 % vyšší, než je uvedeno ve zmiňované práci, kde uvedení autoři dospěli k hodnotě 70,7 % motilních spermií v ejakulátu. K podobným hodnotám dospěl i kolektiv autorů El-Badry *et al.* (2017) a Papin *et al.* (2021), kteří uvádí celkovou motilitu spermií u hřebců 70 % reps. v rozmezí 74 až 82 %. V práci LeFrappier *et al.* (2010) byla zjištěna o něco nižší průměrná motilita spermií, a to v rozmezí 72,2 až 78,1 % v závislosti na druhu použitého ředidla, ve kterém byly spermie 30vminut inkubovány a následně byla hodnocena jejich motilita. Studie Love *et al.* (2012), resp. Izadpanah *et al.* (2015), resp. (Hayden *et al.*, 2015) uvádí hodnotu celkové motility spermií v ejakulátu téměř totožnou, jako byla zjištěna v této práci, a to 88,0 %, resp. 88,5 %, resp. 90,0 %.

Tab. 21: Vliv reprodukční sezóny na průměrný podíl motilních spermií

sezóna	počet odběrů [n]	motilita CASA [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
2018	82	87,64 ^a	3,89	40,00	99,00
2019	101	84,27 ^a	5,11	4,30	98,00
2020	57	94,13 ^b	2,97	61,00	99,00
celkem	240	88,68	3,99	4,30	99,00

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$.

Tab. 22: Vliv měsíce odběru na na průměrný podíl motilních spermií

měsíc odběru	počet odběrů [n]	motilita CASA [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
III	17	88,65	14,49	55,00	99,00
IV	31	86,26	15,00	31,00	98,00
V	37	84,78	20,28	17,00	98,00
VI	40	85,80	16,42	31,00	98,00
VII	85	90,36	11,45	30,00	99,00
VIII	30	88,13	14,12	36,00	98,60

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

V rámci jednotlivých měsíců v průběhu odběrových sezón nebyly mezi nimi nalezeny statisticky významné rozdíly v průměrných podílech motilních spermií v ejakulátech hřebců (tabulka 22). Hodnoty motility spermií v průběhu odběrového období kolísaly, ale rozdíly nebyly příliš velké, kdy největšího rozdílu bylo dosaženo mezi květnem (84,78 %), kdy bývá frekvence odběru hřebců nejvyšší, což by se mohlo odrazit i na kvalitě získaného ejakulátu, a červencem (90,36 %), kdy tento rozdíl byl 5,58 % ve prospěch červencových odběrů. V měsíci květnu bylo také dosaženo úplně nejnižší hodnoty motility spermií vůbec a to pouhých 17,00 %.

Věk hřebců také neměl statisticky významný vliv na průměrný podíl motilních spermií v ejakulátech hřebců (tabulka 23). Nejnižšího průměrného podílu motilních spermií dosáhla věková kategorie hřebců mezi 10 až 14 rokem (83,85 %), naopak nejvyšší průměrný podíl motilních spermií (90,41 %) byl zjištěn u nejstarší věkové skupiny hřebců nad 15 let a tento rozdíl byl 6,56 %. Absolutně nejnižší podíl motilních spermií (17,00 %) byl zjištěn u hřebce z věkové skupiny do 5 let. Darr *et al.* (2017) uvádí, že nejnižších podílů motilních spermií dosahují hřebci v pubertě, tj. kolem 3 roku a hřebci starší 10 let. V práci Ghorbani *et al.* (2024) byl zjištěn podíl motilních spermií u hřebců ve věku od 6 do 10 let 77 %, což je o 12,36 % nižší hodnota, než byla zjištěna v této práci. Abah *et al.* (2023) uvádí, že motilita spermií v ejakulátu hřebců je také ovlivněna věkem. U hřebců ve věku 5 až 13 let byla zjištěna signifikantně vyšší motilita spermií ve srovnání s hřebci mladšími 3 let a hřebci staršími 14 let.

Plemenná příslušnost hřebců měla na průměrný podíl motilních spermií v ejakulátu

Tab. 23: Vliv věku hřebce na průměrný podíl motilních spermií

věk	počet odběrů [n]	motilita CASA [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
≤ 5 let	53	84,54	21,56	17,00	99,00
6–9 let	51	89,36	12,63	40,00	99,00
10–14 let	40	83,85	18,05	36,00	98,60
≥ 15 let	96	90,41	8,80	59,00	99,00

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly.

Tab. 24: Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrný podíl motilních spermií

plemenná příslušnost	počet odběrů [n]	motilita CASA [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
český teplokrevník	19	96,11 ^a	2,12	91,00	99,00
holštýnský kůň	36	92,19 ^a	5,85	77,00	98,00
oldenburský kůň	25	92,64 ^a	7,84	61,00	98,00
starokladrubský kůň	33	87,75 ^a	11,12	59,00	98,60
chladnokrevník	29	64,29 ^b	25,76	17,00	98,00

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$.

statisticky významný vliv ($p \leq 0,01$). U chladnokrevných hřebců byl podíl motilních spermií 64,29 % a byl statisticky významně nižší než u všech ostatních plemen (tabulka 24). Také byl v rámci této skupiny získán ejakulát s nejnižším podílem motilních spermií (17,00 %) za celé sledované období. Naopak nejvyšší průměrný podíl motilních spermií byl zjištěn u hřebců českého teplokrevníka (96,11 %), což je o 31,82 % vyšší hodnota než u chladnokrevníků.

Průměrný podíl motilních spermií byl u starokladrubskeho koně při srovnání s českým teplokrevníkem nižší o 8,36 %, ale tento rozdíl již nebyl statisticky významný. Kolektiv autorů Nunes *et al.* (2024) uvádí, že průměrná hodnota progresivní motility v nativním ejakulátu od 16 hřebců Criollo ve věku 6-14 let je 71,98 %, průměrná progresivní motilita spermií u sledované skupiny hřebců v této práci v sezónách 2019 a 2020 byla 81,34 %.

U hřebců, kteří ve sledovaném období působili ve více sezónách, nebyly rozdíly v průměrných podílech motilních spermií mezi jednotlivými sezónami příliš variabilní. Výjimkou byl hřelec S, u kterého byl zjištěn rozdíl 6,31 % v průměrném podílu motilních spermií mezi sezónami 2019 a 2020 (tabulka 25). U hřebce A, který byl odebíráán ve všech třech sezónách, byl zjištěn nejnižší průměrný podíl motilních spermií v roce 2019 a to 88,29 % a o 8,21 % byl tento podíl vyšší v sezóně 2020, která byla pro tohoto hřebce, z hlediska podílu motilních spermií v jeho ejakulátu, nejlepší.

Tab. 25: Vliv sezóny na průměrný podíl motilních spermií v ejakulátu individuálních hřebců

sezóna	hřelec	motilita CASA [%]	podíl normospermií [%]	S.D. [%]	min. [%]	max. [%]
2018	A	7	94,29	2,60	89,00	98,00
2019	A	7	88,29	6,67	78,00	97,00
2020	A	6	96,50	0,96	95,00	98,00
2018	E	7	96,29	1,28	94,00	98,00
2019	E	7	97,71	0,45	97,00	98,00
2018	M	7	61,57	10,38	40,00	74,00
2019	M	7	62,14	14,67	36,00	85,00
2019	S	7	92,14	5,00	83,00	98,00
2020	S	6	85,83	11,31	61,00	94,00
2019	W	6	91,14	4,45	81,00	96,00
2020	W	6	93,33	1,70	91,00	96,00
2019	N	7	97,43	0,73	96,00	98,00
2020	N	6	97,30	0,79	95,90	98,60
2019	T	7	97,00	0,76	96,00	98,00
2020	T	4	98,00	0,71	97,00	99,00

4.1.6 Lineární závislosti mezi jednotlivými parametry ejakulátu

Mezi jednotlivými parametry ejakulátu hřebců, které jsou uvedeny v tabulce 26, byly pozorovány pomocí Pearsonových korelačních koeficientů lineární vztahy. Statisticky průkazné ($p < 0,01$) korelační koeficienty byly zjištěny mezi následujícími ukazateli. Středně silná pozitivní korelace byla pozorována mezi podílem motilních spermií a koncentrací spermií (0,5073), dále mezi celkovým počtem spermií v ejakulátu a koncentrací spermií (0,4864), podílem motilních spermií a podílem normospermií (0,4210) a také mezi podílem motilních spermií a celkovým počtem spermií v ejakulátu (0,3910). Slabá pozitivní korelace byla zjištěna mezi koncentrací spermií a podílem normospermií (0,2475).

Středně silná negativní závislost byla pozorována mezi objemem ejakulátu a koncentrací spermií ($-0,4759$) a také byla zjištěna negativní závislost mezi motilitou spermií a objemem ejakulátu ($-0,3376$). Korelační koeficienty, které byly zjištěny mezi ostatními parametry ejakulátu, nepoukazují na významnější lineární souvislosti.

Lze tedy konstatovat, že čím je vyšší koncentrace spermií, celkový počet spermií v ejakulátu a vyšší podíl normospermií, tím je vyšší i podíl motilních spermií v ejakulátu. Naopak čím je vyšší objem ejakulátu, tím je nižší koncentrace spermií a jejich motilita.

Tab. 26: Korelační koeficienty mezi sledovanými parametry nativního ejakulátu

	koncentrace spermií	celkový počet spermií	podíl normospermií	podíl motilních spermií
objem ejakulátu	$-0,4759^*$	0,1244	$-0,0863$	$-0,3376^*$
	$p \leq 0,001$	$p = 0,053$	$p = 0,180$	$p \leq 0,001$
koncentrace spermií		0,4864*	0,2475*	0,5073*
		$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$	$p \leq 0,001$
celkový počet spermií			0,0750	0,3910*
			$p = 0,244$	$p \leq 0,001$
podíl normospermií				0,4210*
				$p \leq 0,001$

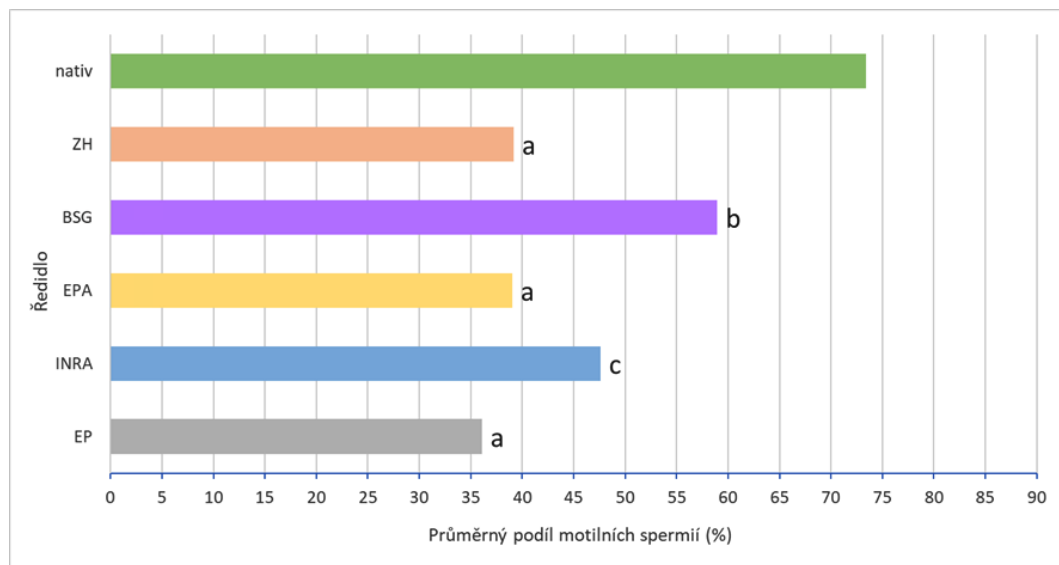
4.2 VLIV POUŽITÉHO ŘEDIDLA NA KVALITATIVNÍ PARAMETRY SPERMIÍ

4.2.1 Reprodukční sezóna 2018

4.2.1.1 Podíl motilních spermií v ejakulátu – subjektivní metoda

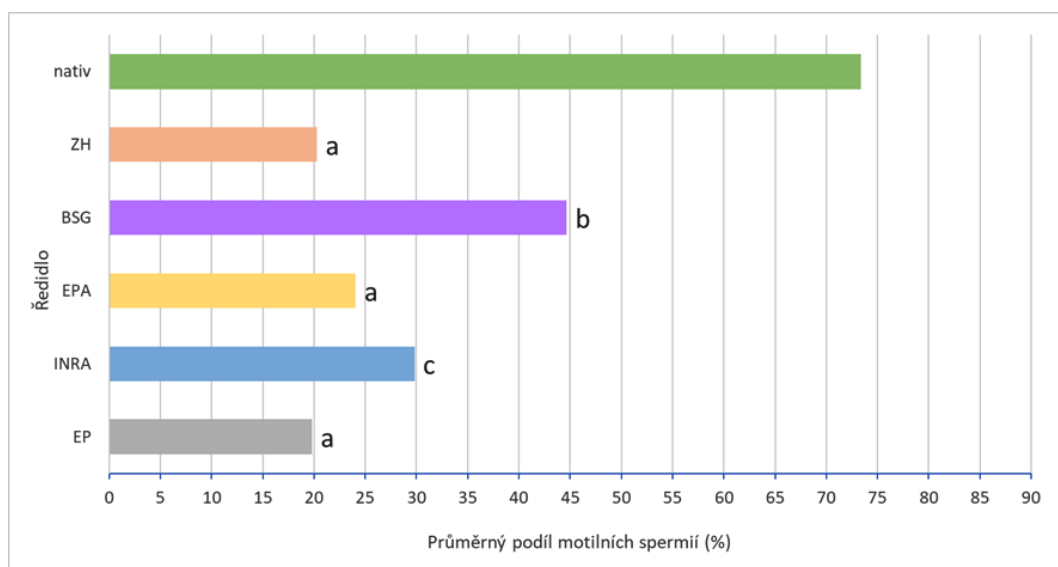
Z hlediska subjektivně hodnocené motility spermií po 24 hodinách skladování inseminačních dávek bylo nejlepším ředidlem ředidlo BotuSemen Gold (obrázek 3), u něj byl zjištěn podíl motilních spermií 58,95 %. U dávky s ředidlem INRA 96 byl nalezen druhý nejvyšší podíl motilních spermií, a to 47,61 %. Rozdíl v průměrných podílech motilních spermií byl mezi těmito ředidly statisticky významný ($p \leq 0,01$) a jeho hodnota činila 11,34 %. Hodnoty podílů motilních spermií u dávek s dalšími ředidly se pohybovaly v rozmezí 36,08 % až 39,14 % a tyto hodnoty byly statisticky významně ($p \leq 0,01$) nižší než hodnoty u dávek s ředidly BotuSemen Gold a INRA 96.

Po 48 hodinách skladování inseminačních dávek byl nejvyšší průměrný podíl motilních spermií zjištěn opět u dávky s ředidlem BotuSemen Gold a to 44,67 % (obrázek 4). Statisticky významně nižší hodnota motilních spermií byla zjištěna u dávky s ředidlem INRA 96 a to 29,80 %, což je o 14,87 % nižší podíl než u dávky s ředidlem BotuSemen Gold. Statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,01$) byly také nalezeny i mezi dávkami s výše uvedenými ředidly (BotuSemen Gold a INRA 96) a ostatními ředidly (ZH, Equi PRO ApX²



Obr. 3: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.



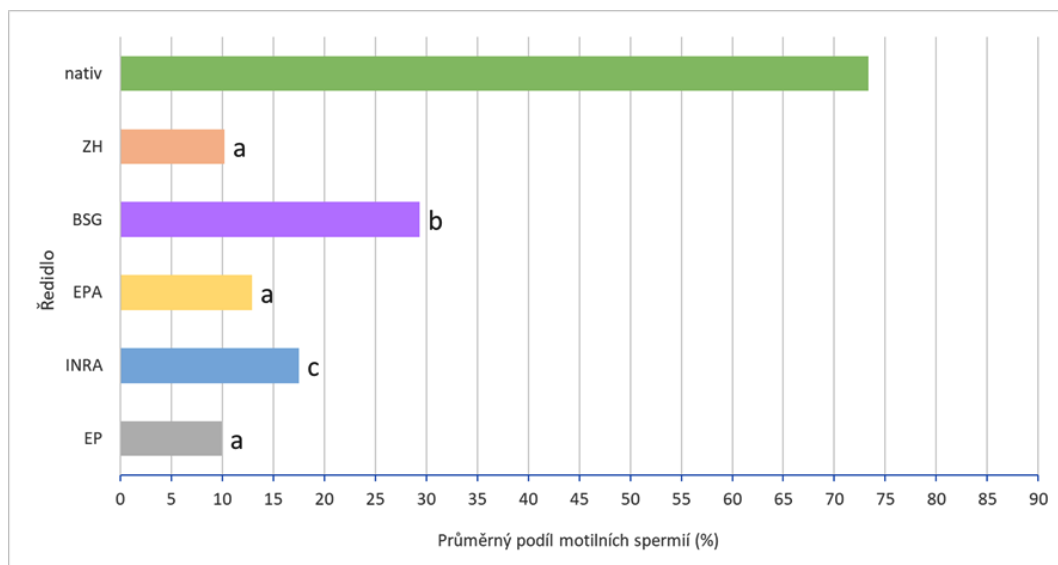
Obr. 4: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.

a Equi PLUS), kde se hodnoty průměrného podílu motilních spermií pohybovaly v rozmezí 19,80 % až 24,07 %. I v tomto časovém intervalu byla nejnižší hodnota průměrného podílu motilních spermií nalezena u dávky s ředidlem Equi PLUS.

Nejvyšší průměrný podíl motilních spermií byl i po 72 hodinách skladování inseminačních dávek nalezen u dávky s ředidlem BotuSemen Gold a jeho hodnota činila 29,32 %. Hodnota průměrného podílu motilních spermií o 11,84 % nižší byla zjištěna u dávky s ředidlem INRA 96 (17,48 %) a tento zjištěný rozdíl mezi uvedenými ředidly byl statisticky významný ($p \leq 0,01$). Rovněž byly nalezeny statisticky významné rozdíly v průměrném podílu motilních spermií mezi dávkami s výše uvedenými ředidly (BotuSemen Gold a INRA 96) a ostatními ředidly (ZH, Equi PRO ApX² a Equi PLUS), u kterých se zjištěné průměrné podíly motilních spermií pohybovaly v rozmezí 9,90 % do 12,88 % a opět byla nejnižší hodnota průměrného podílu motilních spermií nalezena u dávky s ředidlem Equi PLUS (obrázek 5).

V roce 2018 bylo v průběhu odběrové sezóny sledováno celkem 13 hřebců. Mezi jednotlivými hřebci se vyskytovaly poměrně velké rozdíly v průměrném podílu motilních spermií hodnocených subjektivní metodou (obrázek 6). Tuto variabilitu mezi jednotlivými hřebci potvrzuje i Serafini *et al.*, (2014). Nevyšší průměrný podíl motilních spermií v nativním ejakulátu byl zjištěn u hřebce G (88,60 %), druhé nejvyšší průměrné hodnoty dosáhl hřebec E (83,60 %). Poté následovali hřebci I (82,50 %), L (82,50 %) a A (82,10 %). Naopak nejnižší průměrný podíl motilních spermií byl v nativním ejakulátu nalezen u hřebců M (45,00 %) a D (45,80 %). Rozdíl mezi hodnotami nejvyššího průměrného podílu



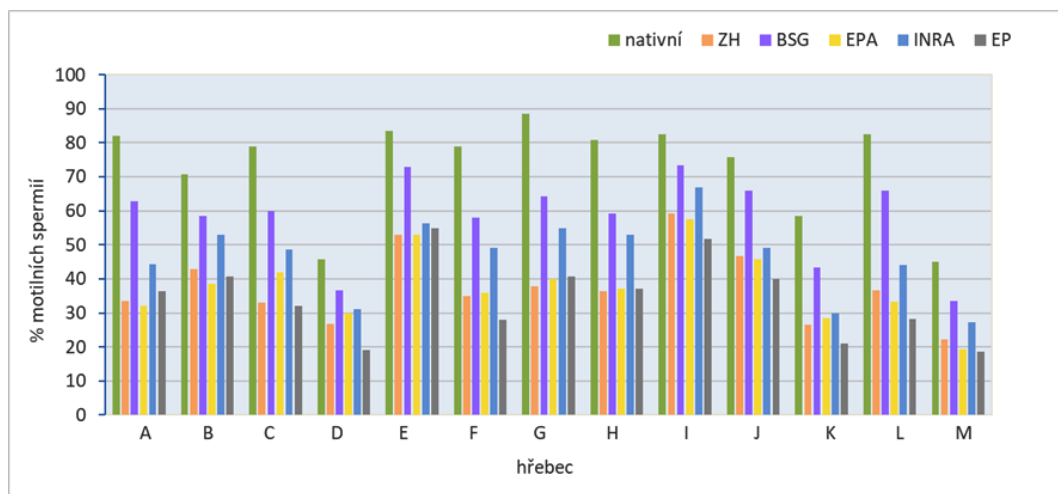
Obr. 5: Vliv ředitel na průměrný podíl motilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředitel dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.

motilních spermií v nativním ejakulátu, a naopak nejnižšího průměrného podílu činil 43,60 %. Serafini *et al.*, (2014) uvádí motilitu spermií hodnocených subjektivní metodou 71,6 %, což je téměř totožná hodnota (73,38 %), která byla zjištěna v této práci.

Při srovnání průměrných podílů motilních spermií v chlazených inseminačních dávkách s různými ředitly, při době skladování 24 hodin, byly mezi jednotlivými hřebci nalezeny relativně velké rozdíly. Ale i přes tyto rozdíly je z obrázku 6 patrné, že u všech hřebců bylo pro uchování chlazené inseminační dávky nejvhodnější ředitel BotuSemen Gold, ve kterém bylo dosaženo vždy nejvyššího průměrného podílu motilních spermií. Nejnižšího poklesu podílu motilních spermií ve srovnání s hodnotou nativního ejakulátu bylo dosaženo u hřebce I, kdy tento pokles činil pouze 28,28 %. U hřebce E, u kterého byl zjištěn druhý nejnižší pokles průměrného podílu motilních spermií, tato hodnota činila již 36,75 %. Naopak nejvyššího poklesu průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazené inseminační dávky v ředitel BotuSemen Gold bylo dosaženo u hřebce A, kdy tento pokles činil 59,13 %. Poté následovaly průměrné podíly hřebců C a G, kdy došlo ke snížení tohoto podílu o 58,23 % resp. o 57,26 %.

I u ředitel INRA 96, u kterého bylo dosaženo druhých nejlepších výsledků z hlediska průměrných podílů motilních spermií po 24 hodinách skladování, bylo tohoto výsledku dosaženo shodně u všech hřebců, i když u některých nebyl rozdíl v tomto podílu s ostatními ředitly již tak výrazný jako u ředitel BotuSemen Gold. Jak je patrné z obrázku 6, tak pořadí dosažených hodnot průměrného podílu motilních spermií v inseminačních dávkách ostatních ředitel bylo u jednotlivých hřebců již rozdílné.

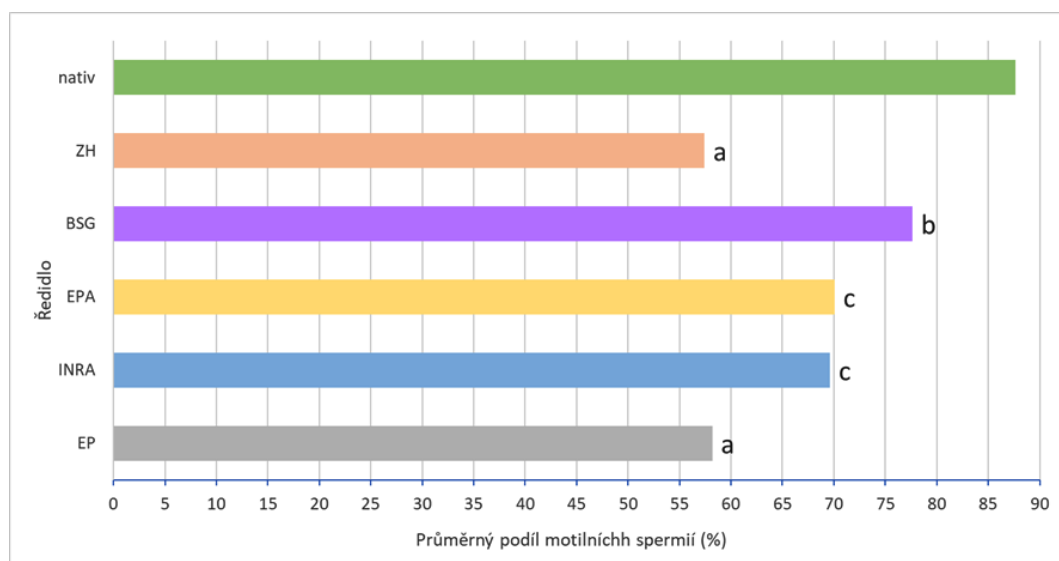


Obr. 6: Vliv ředidla na variabilitu průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.

4.2.1.2 Podíl motilních spermií v ejakulátu – metoda CASA

Z hlediska průměrného podílu motilních spermií hodnocených metodou CASA byly po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek zjištěny statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,01$) mezi jednotlivými ředidly (obrázek 7). Nevyšší průměrný podíl motilních spermií v inseminační dávce byl nalezen u dávky s ředidlem BotuSemen Gold a to 77,63 %. O 7,56 % resp. o 8,00 % nižší průměrné podíly motilních spermií byly zjištěny u dávek s ředidly Equi PRO ApX² (70,07 %) resp. INRA 96 (69,63 %). Nejnižší hodnoty průměrných podílů motilních spermií byly zjištěny u dávek s ředidly ZH (57,43 %) a Equi PLUS (58,17 %). Pearson *et al.* (2024) uvádí celkovou motilitu spermií v rozmezí 57 až 68 % po 24 hodinách v ředidle INRA 96, což jsou hodnoty nižší, než které byly zjištěny v této práci, ale většina dalších autorů zjistila hodnoty spíše vyšší, např. Papin *et al.* (2021) uvádí v ředidle INRA 96 po 24 hodinách skladování 73 %, Webb *et al.* (2009) 74 %, Hayden *et al.* (2015) 76 % motilních spermií, což je o 3,37 %, resp. o 4,37 % a 6,37 % vyšší hodnota, než která byla zjištěna v roce 2018 v této práci. V práci Vokrouhlíkové *et al.* (2021) bylo zjištěno v ředidle INRA 96 po 24 hodinách skladování dokonce 79,09 % motilních spermií, což je o 9,46 % vyšší hodnota, než bylo zjištěno v této práci. Stejný kolektiv autorů také zjistil podíl motilních spermií po 24 hodinách v ředidle Equi PLUS a to 65,79 %, což je o 7,62 % vyšší hodnota než v této práci. V uvedené práci bylo zjištěno, že ředidlo INRA 96 bylo pro uchovávání spermií z hlediska jejich motility vhodnější než ředidlo Equi PLUS, kdy rozdíl mezi uvedenými ředidly byl 13,30 %. V této práci se tento závěr také potvrdil a v ředidle INRA 96 byl podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování o 11,46 % vyšší než v ředidle Equi PLUS. Nejvyšší průměrná motilita spermií je prezentována v práci LeFrappier *et al.* (2010), kdy autoři uvádějí 75,6 % v ředidle EquiPro

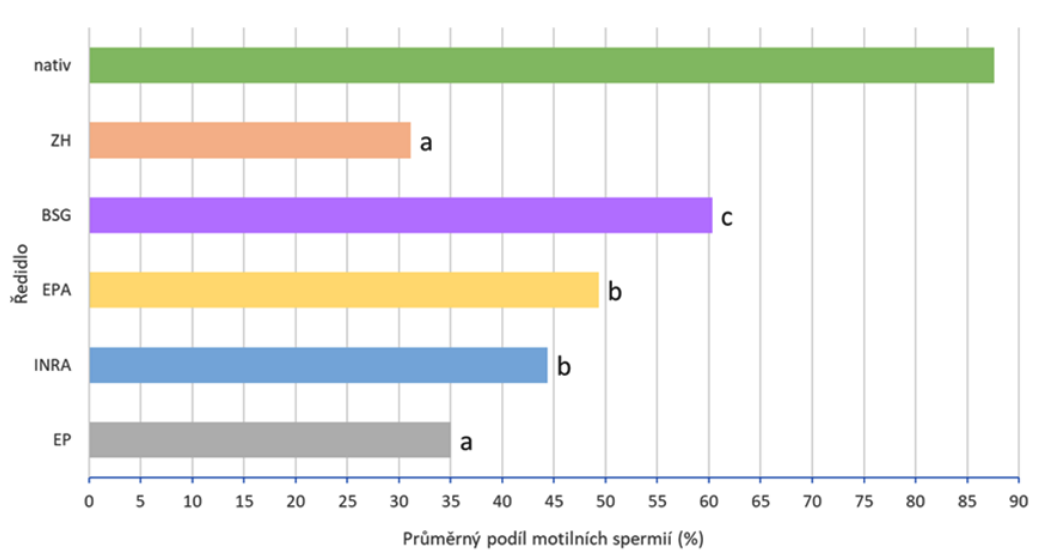


Obr. 7: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX2, INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.

a 80,7 % v ředidle INRA 96, v tomto ředidle tato práce uvádí o 2,6 % vyšší podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování než v době po odběru ejakulátu. V práci Ghorbani *et al.* (2024) byl zjištěn po 24 hodinách skladování v ředidle INRA 96 podíl motilních spermií 65,2 %, což je o 4,43 % nižší hodnota, než byla zjištěna v odběrové sezóně 2018.

U inseminačních dávek skladovaných 48 hodin byly mezi jednotlivými ředidly také nalezeny statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,01$) v průměrném podílu motilních spermií hodnocených metodou CASA (obrázek 8). Nejvyšší hodnota průměrného podílu motilních spermií byla zjištěna opět u dávky s ředidlem BotuSemen Gold a to 60,30 %. Statisticky významně nižší hodnoty byly nalezeny u dávek s ředidlem Equi PRO ApX2 (49,33 %) resp. INRA 96 (44,40 %). Nejnižší hodnoty průměrného podílu motilních spermií byly dosaženy opět u dávek Equi PLUS (35,03 %) a ZH (31,14 %). Papin *et al.* (2021) uvádí po 48 hodinách skladování v ředidle INRA 96 hodnotu 67 %, Webb *et al.* (2009) 65,6 % a Hayden *et al.* (2015) 63 %, což je o 22,6 %, resp. 21,2 % a 18,6 % vyšší motilita spermií než v roce 2018 v této práci. Vokrouhlíková *et al.* (2021) uvádí, že po 48 hodinách skladování v ředidle INRA 96 byl podíl motilních spermií 59,64 %, což je sice nižší podíl, než který uvádí Papin *et al.* (2021), ale stále je to o 15,24 % vyšší podíl motilních spermií, než který byl zjištěn v této práci. V ředidle Equi PLUS dle Vokrouhlíkové *et al.* (2021) byl podíl motilních spermií po 48 hodinách 48,64 %, což je o 13,61 % vyšší podíl motilních spermií než v této práci. I po 48 hodinách skladování se práce Vokrouhlíkové *et al.* (2021) a tato práce shodují v závěru, že ředidlo INRA 96 je pro spermie z hlediska jejich motility vhodnější variantou než ředidlo Equi PLUS, kdy

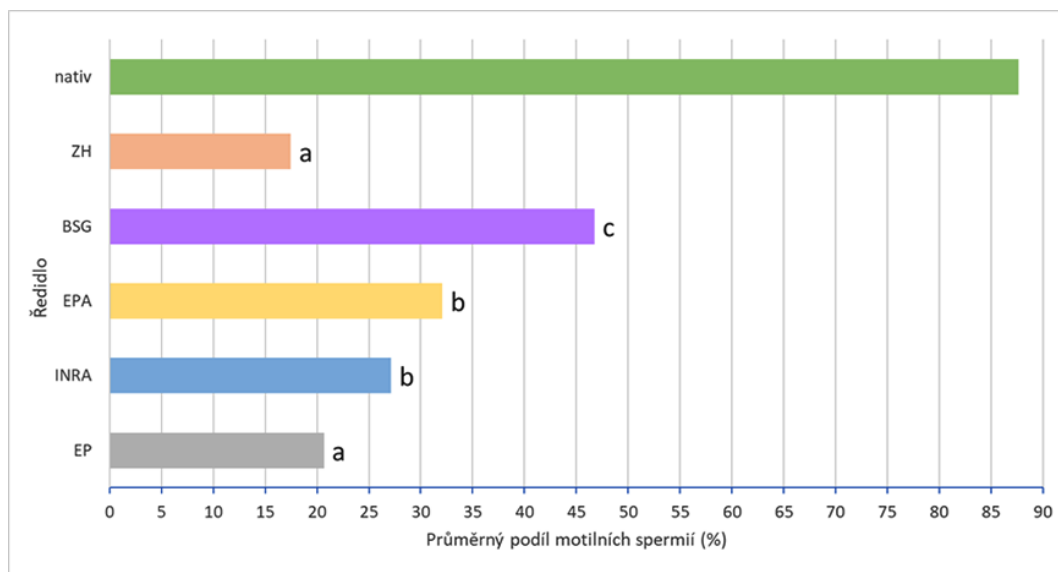


Obr. 8: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.

rozdíly mezi uvedenými ředidly byly 11,00 % resp. 9,37 %. Práce LeFrappier *et al.* (2010) uvádí, že podíl motilních spermií v ředidle EquiPro byl 73,7 % a v ředidle INRA 96 byl tento podíl 76,7 %, což jsou hodnoty, které se od výše uvedených prací výrazně liší.

Po 72 hodinách skladování inseminačních dávek byly mezi jednotlivými ředidly rovněž nalezeny statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,01$) v průměrných podílech motilních spermií (obrázek 9). Nejlepších výsledků z hlediska motility spermií bylo dosaženo opět u dávky s ředidlem BotuSemen Gold, kdy průměrná hodnota motilních spermií byla 46,76 %. O 14,66 % resp. o 19,61 % statisticky významně nižší hodnoty byly nalezeny u dávek s ředidlem Equi PRO ApX² (32,10 %) resp. INRA 96 (27,15 %). Po 72 hodinách skladování v ředidle INRA 96 uvádí Webb *et al.* (2009) 62,3 % motilních spermií a Papin *et al.* (2021) 52 % motilních spermií, což je o 35,15 % resp. o 24,85 % vyšší hodnota, než která byla zjištěna v odběrové sezóně 2018. Vokrouhlíková *et al.* (2021) uvádějí po 72 hodinách skladování v ředidle INRA 96 podíl motilních spermií 38,90 %, což je výrazně nižší hodnota, než uvádí práce Papina *et al.* (2021), ale stále je to o 11,75 % vyšší podíl motilních spermií než v této práci. U ředidla Equi PLUS uvádí práce Vokrouhlíkové *et al.* (2021) hodnotu 28,42 % motilních spermií, což je o 7,76 % vyšší podíl motilních spermií, než bylo zjištěno v této práci. Opět se Vokrouhlíková *et al.* (2021) shoduje se závěrem této práce, že je pro spermie vhodnějším ředidlem INRA 96 než Equi PLUS. Statisticky prokazatelně nejnižší podíly motilních spermií byly zjištěny u ředidel Equi PLUS (20,66 %) a ředidla ZH (17,49 %).

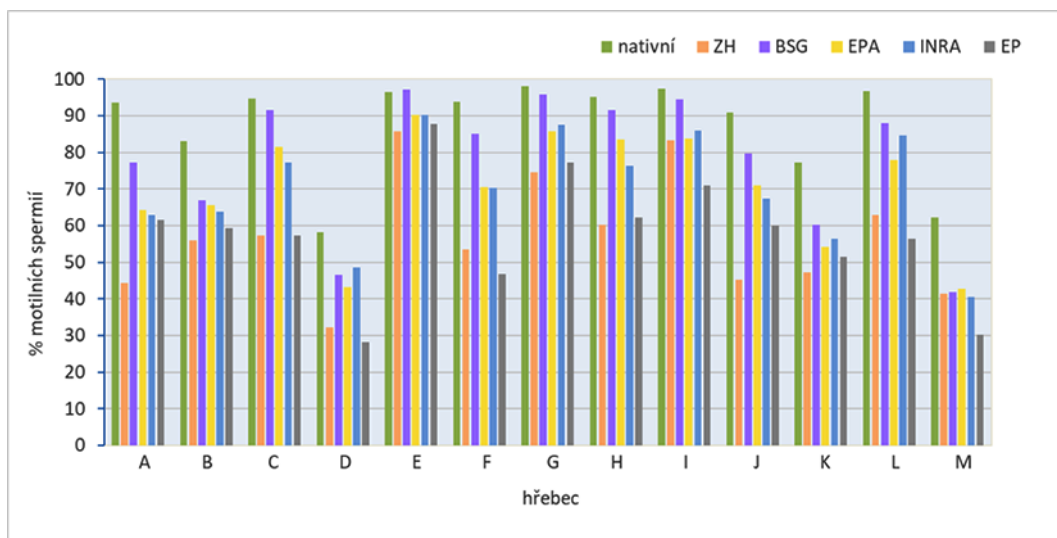


Obr. 9: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–c vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.

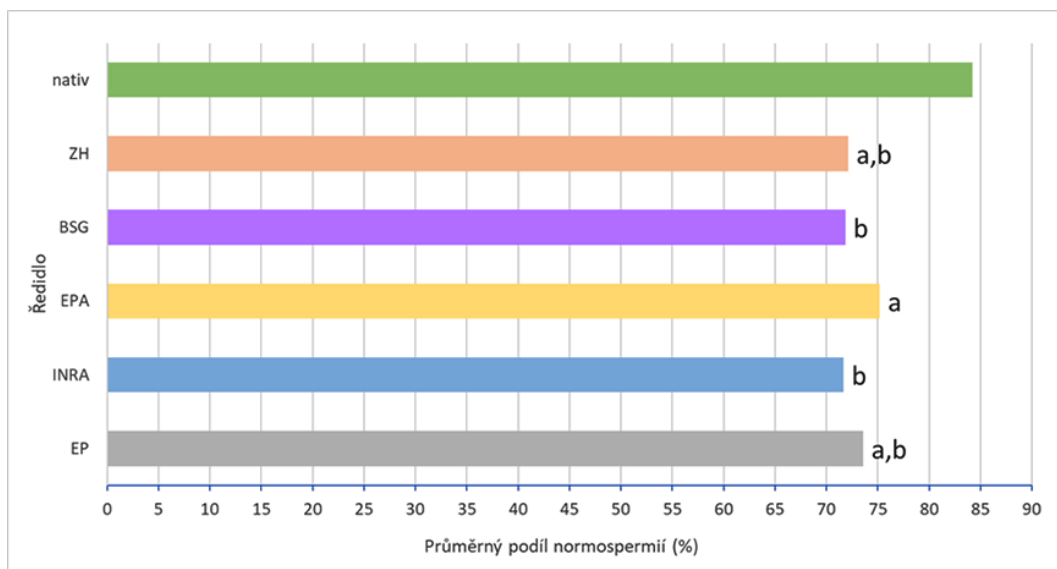
V případě hodnocení motility spermií pomocí objektivní metody CASA, byly hodnoty průměrného podílu motilních spermií v nativním ejakulátu u všech hřebců vyšší při srovnání s metodou subjektivní. Hřebcem, u jehož spermií v nativním ejakulátu byl zjištěn nejvyšší průměrný podíl motilních spermií hodnocených metodou CASA byl opět hřelec G (98,17 %), tento podíl byl o 9,57 % vyšší než v případě hodnocení subjektivní metodou. Druhá nejvyšší hodnota průměrného podílu motilních spermií byla nalezena v nativním ejakulátu hřebce I (97,50 %), poté následovali hřebci L (96,67 %), E (96,50 %), H (95,17 %), C (94,80 %), F (93,80 %), a A (93,67 %). Naopak nejnižších průměrných podílů motilních spermií bylo dosaženo opět u hřebců D (58,20 %) a M (62,17 %), u tohoto hřebce bylo dosaženo velmi vysokého rozdílu mezi oběma použitými metodami hodnocení motility spermií, a to 17,17 %.

Při srovnání průměrných podílů motilních spermií hodnocených metodou CASA byly v chlazených inseminačních dávkách hřebců při použití různých ředidel a při délce skladování 24 hodin mezi jednotlivými hřebci nalezeny relativně velké rozdíly. I při této metodě hodnocení je pro většinu ejakulátů hřebců nejvýhodnější použít ředidla BotuSemen Gold (obrázek 10). Ve dvou případech, u hřebců D a M, nebylo dosaženo nejvyššího průměrného podílu motilních spermií u ředila BotuSemen Gold, ale dosažené hodnoty u ředidel BotuSemen Gold, Equi PRO ApX² a INRA 96 byly u těchto hřebců téměř totožné.



Obr. 10: Vliv ředidla na variabilitu průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.



Obr. 11: Vliv ředidla na průměrný podíl normospermii po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, EPA: Equi PRO ApX², INRA: INRA 96, EP: Equi PLUS.

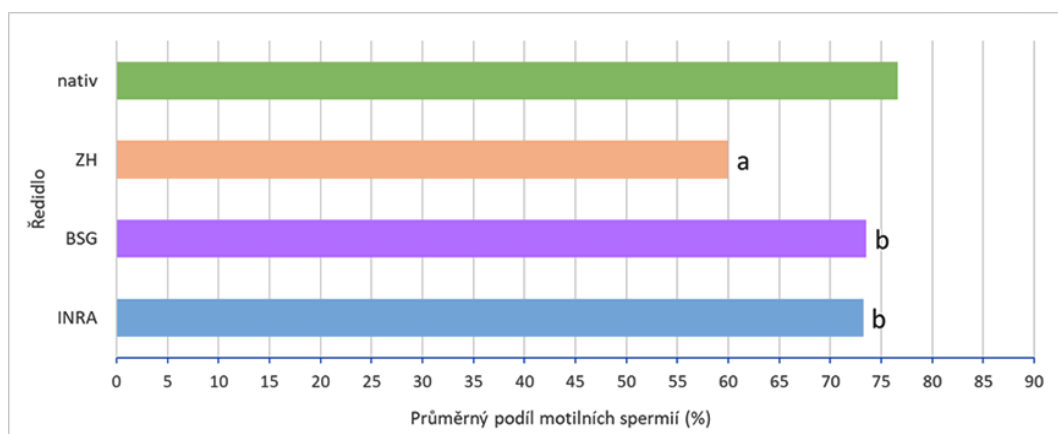
4.2.1.3 Podíl normospermií v ejakulátu

Z hlediska průměrného podílu normospermií v chlazených inseminačních dávkách, které byly skladovány 24 hodin, byly nalezeny mezi jednotlivými ředidly statisticky významné rozdíly ($p \leq 0,05$). U tohoto parametru dosáhla statisticky významně nejlepších výsledků dávka s ředidlem Equi PRO ApX² a to hodnoty 75,19 % normospermií. O 1,61 % resp. o 3,08 % nižší hodnoty průměrného podílu normospermií byly zjištěna u dávek s ředidly Equi PLUS (73,58 %) resp. ZH (72,11 %), rozdíly mezi uvedenými ředidly však nebyly statisticky významné (obrázek 11). Statisticky významně nejnižší průměrné podíly normospermií byly zjištěny u dávek s ředidly INRA 96 (71,68 %) a BotuSemen Gold (71,84 %). Tyto hodnoty průměrného podílu normospermií se statisticky významně ($p \leq 0,05$) lišily od hodnoty, které bylo dosaženo u dávky s ředidlem Equi PRO ApX². Kolektiv Ghorbani *et al.* (2024) ve své práci uvádí 86,5 % podíl normospermií po 24 hodinách skladování v ředidle INRA 96, což je o 14,82 % vyšší hodnota, než která byla zjištěna v této práci.

4.2.2 Reprodukční sezóny 2019 a 2020

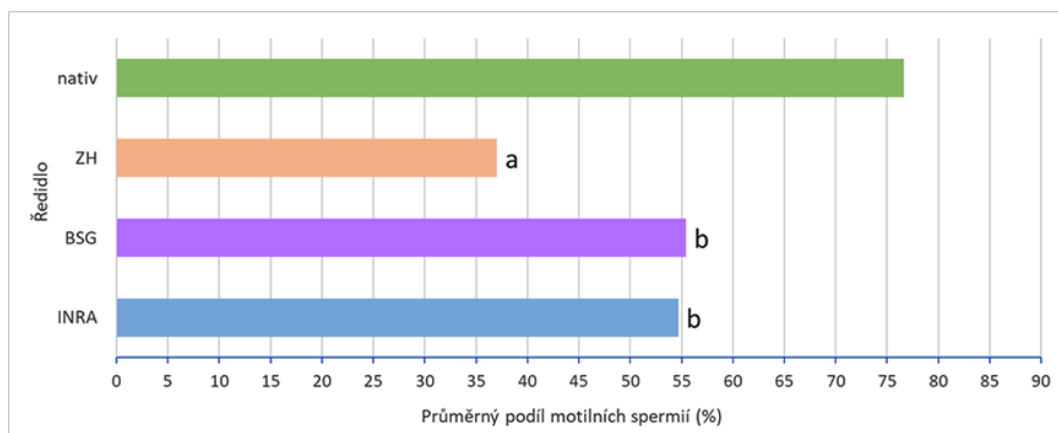
4.2.2.1 Podíl motilních spermií v ejakulátu – metoda CASA

Z hlediska průměrného podílu motilních spermií hodnocených metodou CASA byl po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek nalezen statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) mezi jednotlivými ředidly (obrázek 12). Nejnížší průměrný podíl motilních spermií v inseminační dávce (59,99 %) byl zjištěn u dávky, která obsahovala ředidlo ZH. O 13,56 % resp. o 13,23 % vyšší průměrné podíly motilních spermií byly nalezeny u dávek s ředidly BotuSemen Gold (73,55 %) resp. INRA 96 (73,22 %), tyto rozdíly byly při srovnání s ředidlem ZH statisticky průkazné ($p \leq 0,01$). Téměř totožný podíl motilních spermií po 24 hodinách



Obr. 12: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.



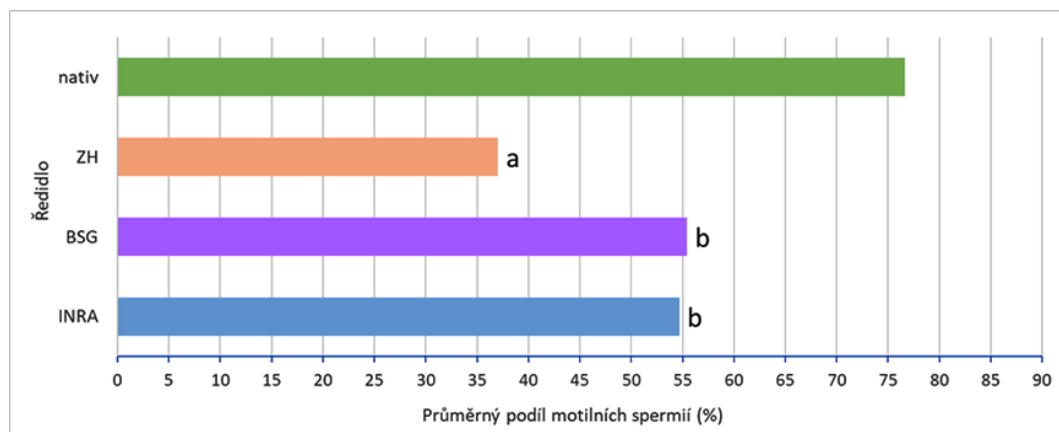
Obr. 13: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.

skladování v ředidle INRA 96 zjistili Webb *et al.* (2009) a to 74,0 %. Vokrouhliková *et al.* (2021) a Hayden *et al.* (2015) uvádí podíly motilních spermií po 24 hodinách v ředidle INRA G96 o 5,87 %, resp. o 2,78 % vyšší než v této práci. Naopak v práci Ghorbani *et al.* (2024) byl tento podíl o 4,43 % nižší. Naproti tomu Eterpi *et al.* (2022) ve své studii uvádí podíly motilních spermií 54 % a 57 %, což jsou výrazně nižší hodnoty než v předchozích studiích nebo v předkládané práci.

Také po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek byl zjištěn nejnižší průměrný podíl motilních spermií opět v dávce s obsahem ředidla ZH, a to 37,03 % (obrázek 13). V chlazených inseminačních dávkách s obsahem ředidel BotuSemen Gold a INRA 96 byly nalezeny hodnoty o 18,4 % resp. 17,64 % vyšší než v případě dávky s ředidlem ZH. Tyto zjištěné rozdíly byly statisticky průkazné ($p \leq 0,01$), hodnoty průměrného podílu motilních spermií byly u těchto ředidel 55,43 % resp. 54,67 %. Dle Vokrouhlikové *et al.* (2021) byl podíl motilních spermií v ředidle INRA 96 po 48 hodinách 59,64 %, dle Hayden *et al.* (2015) 63 % a dle Webb *et al.* (2009) 65,6 % což jsou o 4,97 %, resp. o 8,33 % a o 10,93 % vyšší podíly motilních spermií než podíl, který byl zjištěn v této práci. Naproti tomu v práci Ghorbani *et al.* (2024) byl tento podíl spermií téměř totožný a byl nižší pouze o 0,47 %.

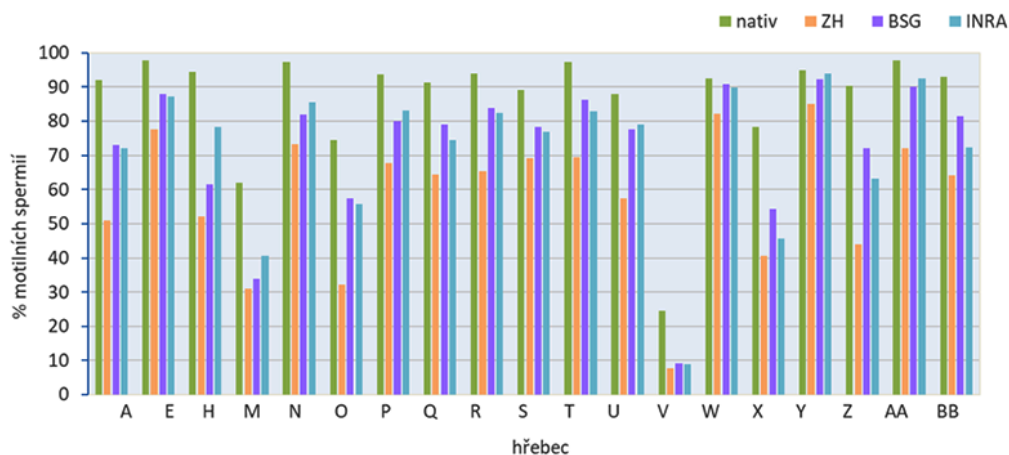
Statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) mezi jednotlivými ředidly použitých v chlazených inseminačních dávkách byl nalezen i po 72 hodinách skladování (obrázek 14). Nejnižší hodnota průměrného podílu motilních spermií byla zaznamenána opět u ředidla ZH, a to 24,96 %. U inseminačních dávek s obsahem ředidel BotuSemen Gold a INRA 96 byly podíly motilních spermií vyšší o 15,29 % resp. 15,82 % a tyto rozdíly byly při srovnání s ředidlem ZH statisticky průkazné ($p \leq 0,01$). Hodnoty průměrných podílů byly u těchto ředidel téměř totožné a to 40,25 % resp. 40,78 %. Dle Vokrouhlikové *et al.* (2021) dosáhl podíl motilních spermií hodnoty 38,90 % po 72 hodinách v ředidle INRA 96, což je o 1,88 % nižší hodnota, než která byla zjištěna v této práci. Takže pokles podílu motilních spermií mezi 48



Obr. 14: Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.

a 72 hodinou byl v uvedené práci výraznější (o 20,74 %) než v předkládané práci (o 13,89 %). V práci Ghorbani *et al.* (2024) byl tento podíl spermií i po 72 hodinách skladování v ředidle INRA 96 téměř totožný a byl vyšší pouze o 0,52 % než v této práci. Naproti tomu Webb *et al.* (2009) uvádí 62,3 % motilních spermií, což je o 21,52 % vyšší podíl motilních spermií po 72 hodinách skladování v ředidle INRA 96. Také Eterpi *et al.* (2022) zjistil po 72 hodinách vyšší podíly motilních spermií, a to 46 % a 51 %.



Obr. 15: Vliv ředidla na variabilitu průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

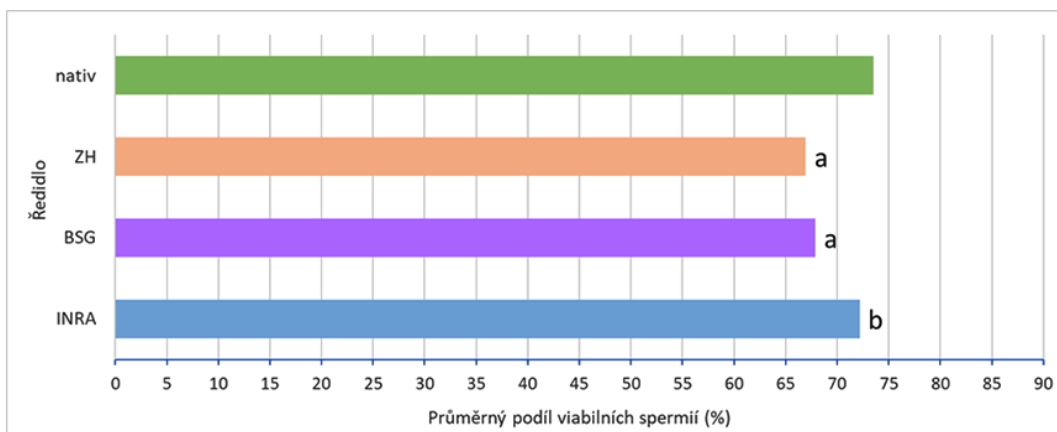
ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.

V letech 2019 a 2020 bylo v průběhu odběrových sezón sledováno celkem 19 hřebců. Mezi jednotlivými hřebci se vyskytovaly poměrně velké rozdíly v průměrném podílu motilních spermií v nativním ejakulátu (obrázek 15). Nejvyšší průměrné podíly motilních spermií v nativním ejakulátu byly zjištěny u hřebců AA (97,88 %), E (97,66 %) N (97,25 %) a T (97,25 %). Nejnižší průměrný podíl motilních spermií byl zaznamenán u hřebce V (24,47 %), dále pak u hřebce M (62,10 %), O (74,50 %) a X (78,23 %).

Mezi jednotlivými hřebci se opět vyskytovaly poměrně velké rozdíly v podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování. Velkou variabilitu mezi jednotlivými hřebci uvádí i Eterpi *et al.* (2022). Z hlediska průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování bylo vždy nejhorším ředidlem ředidlo ZH. Naopak označit jedno ze zbývajících ředidel z hlediska motility spermií za nejlepší není možné, protože dosažené hodnoty byly u jednotlivých hřebců rozdílné (obrázek 15). U hřebců H, M a N bylo vhodnější volbou ředidlo INRA 96 a naopak u hřebců X, Z a BB by bylo vhodnější využívat ředidla BotuSemen Gold. U ostatních hřebců byly zjištěné hodnoty u obou ředidel velmi podobné.

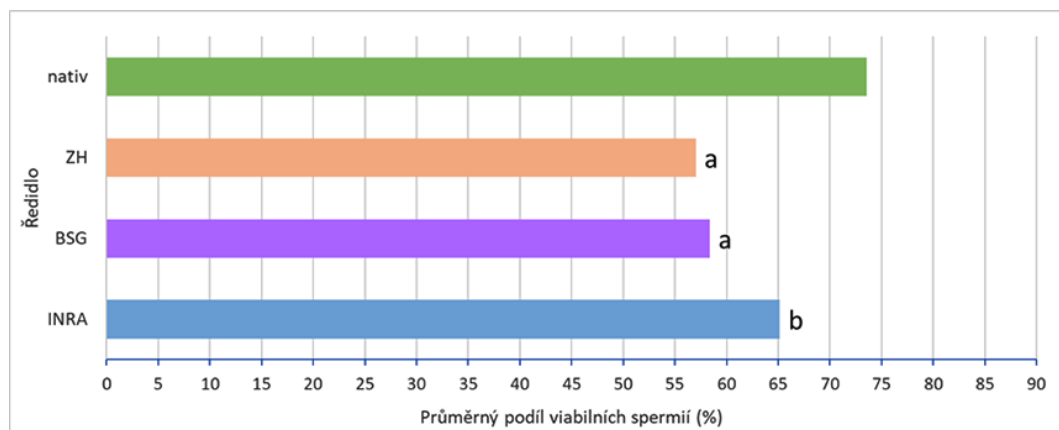
4.2.2.2 Podíl viabilních spermií v ejakulátu

Z hlediska průměrného podílu viabilních spermií bylo po 24 hodinách skladování inseminačních dávek dosaženo nejlepších výsledků při použití ředidla INRA 96 (72,17 %), což je pouze o 1,35 % nižší podíl viabilních spermií při srovnání s nativním ejakulátem (obrázek 16). U inseminačních dávek s ředidly ZH a BotuSemen Gold byly průměrné podíly viabilních spermií statisticky významně nižší ($p \leq 0,01$) než u ředidla INRA 96 a to o 5,21 % resp. o 4,29 %. V práci Ghorbani *et al.* (2024) byl podíl viabilních spermií po 24 hodinách skladování v ředidle INRA 96 téměř totožný a byl vyšší pouze o 0,53 % než v této práci. Naproti tomu dle práce Lühr *et al.* (2018) se podíl viabilních spermií po 24 hodinách skladování pohyboval mezi 43 až 47 %, což jsou výrazně nižší hodnoty, než které byly zjištěny v této práci.



Obr. 16: Vliv ředidla na průměrný podíl viabilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

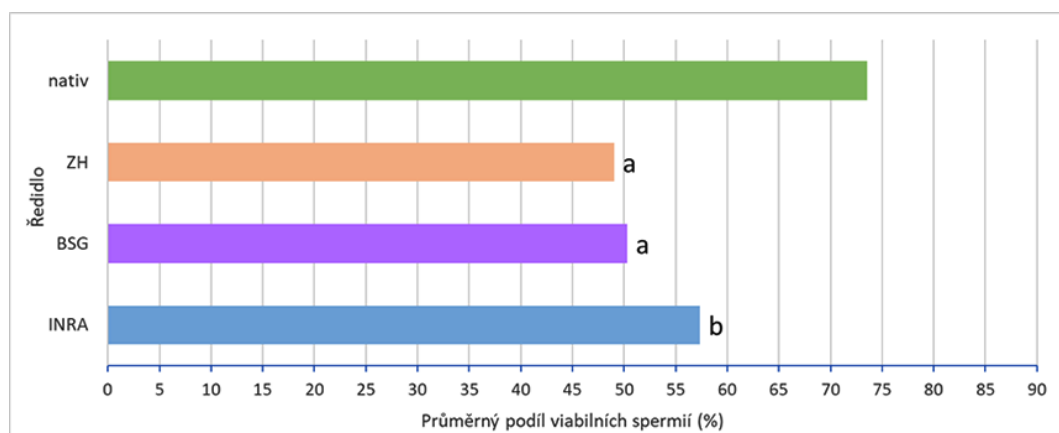
Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.



Obr. 17: Vliv ředidla na průměrný podíl viabilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.

Po 48 hodinách skladování inseminačních dávek byl zjištěn nejvyšší průměrný podíl viabilních spermií opět u dávky s ředidlem INRA 96 (65,16 %), ve srovnání s nativním ejakulátem se jedná o pokles o 8,36 % (obrázek 17). U obou dalších ředidel byly průměrné podíly viabilních spermií statisticky významně nižší ($p \leq 0,01$), nejnižší podíl byl nalezen u dávky s ředidlem ZH (57,02 %) a při použití ředidla BotuSemen Gold byl průměrný podíl viabilních spermií o 1,36 % vyšší (58,38 %). Dle práce Ghorbani *et al.* (2024) byl podíl viabilních spermií po 48 hodinách skladování v ředidle INRA 96, 58,4 %, což je hodnota o 6,76 % nižší, než byla zjištěna v této práci.



Obr. 18: Vliv ředidla na průměrný podíl viabilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

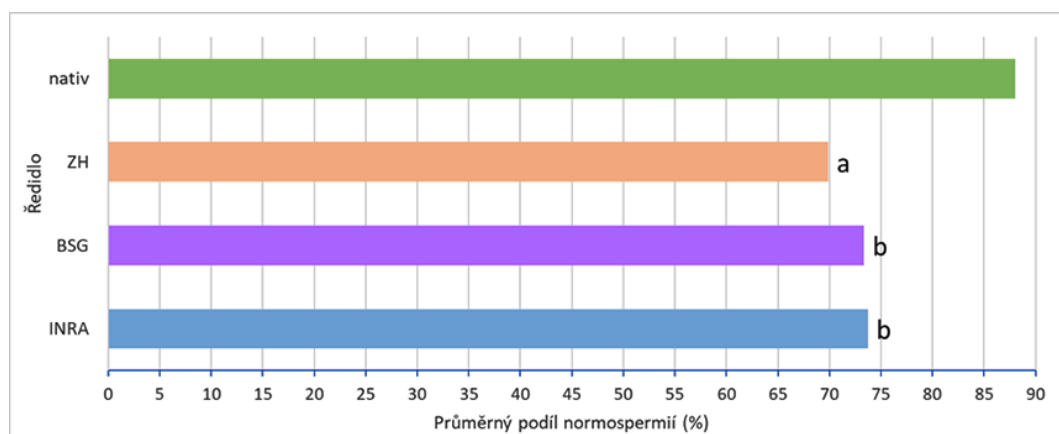
Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.

Také po 72 hodinách skladování byl zjištěn nejvyšší průměrný podíl viabilních spermií při použití ředidla INRA 96 (57,36 %), což je téměř totožný podíl, který byl zjištěn u obou dalších ředidel o 24 hodin dříve. Při srovnání s hodnotou nativního ejakulátu se jednalo o pokles o 16,16 % (obrázek 18). U ředidel ZH a BotuSemen Gold byly zjištěny statisticky významně nižší ($p \leq 0,01$) průměrné podíly viabilních spermií a to 49,03 % resp. 50,31 %. Po 72 hodinách skladování v ředidle INRA 96 byl dle práce Ghorbani *et al.* (2024) podíl viabilních spermií 42,6 %, což je hodnota o 14,76 % nižší, než byla zjištěna v této práci.

4.2.2.3 Podíl normospermií v ejakulátu

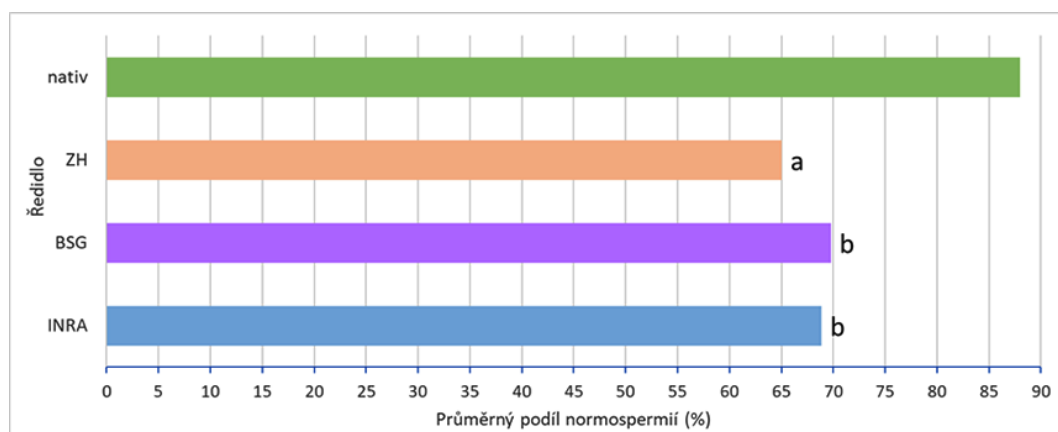
Průměrný podíl normospermií v ejakulátu po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek je uveden v grafu na obrázku 19. Nejlepších výsledků z hlediska podílu normospermií bylo dosaženo při použití ředidla INRA 96 (73,72 %), téměř totožný podíl normospermií byl zjištěn také při použití ředidla BotuSemen Gold (73,37 %). Při použití ředidla ZH byl nalezený podíl normospermií o 3,85 % resp. 3,50 % nižší, a to 69,87 %. Ghorbani *et al.* (2024) uvádí podíl normospermií po 24 hodinách skladování v ředidle INRA 96 (86,5 %) o 12,78 % vyšší, než byl zjištěn v této práci.

V grafu na obrázku 20 je uveden průměrný podíl normospermií v ejakulátu po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek. Po 48 hodinách skladování byl zjištěn nejvyšší podíl normospermií v případě použití ředidla BotuSemen Gold (69,78 %), o necelé procento nižší podíl byl pak nalezen u ředidla INRA 96 (68,87 %). Nejnižší podíl normospermií byl i po 48 hodinách skladování zjištěn opět u ředidla ZH (65,05 %). Práce Ghorbani *et al.* (2024) uvádí 80,4 % normospermií po 48 hodinách v ředidle INRA 96, což je o 11,53 % vyšší podíl, než byl nalezen v této práci.



Obr. 19: Vliv ředidla na průměrný podíl normospermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

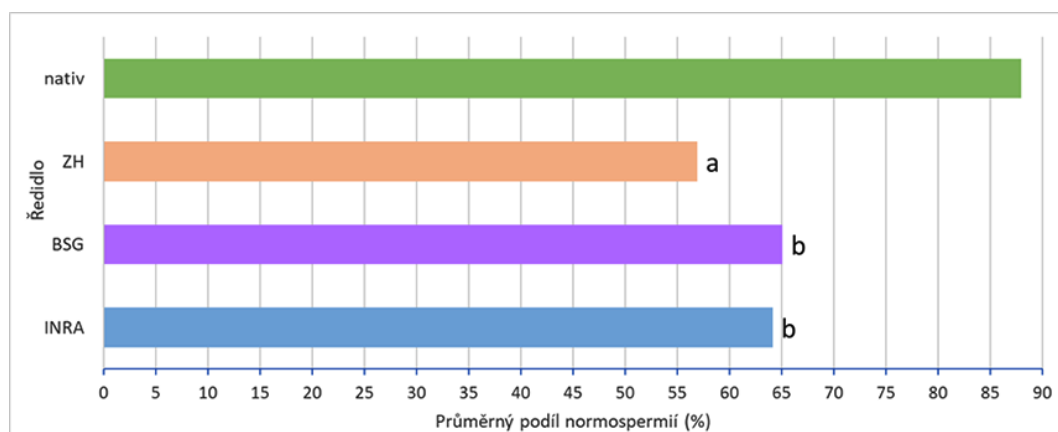
Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.



Obr. 20: Vliv ředidla na průměrný podíl normospermii po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.

Průměrný podíl normospermii v ejakulátu po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek je uveden v grafu na obrázku 21. Nejlepší výsledky z hlediska podílu normospermii byly zjištěny opět při použití ředidla BotuSemen Gold (65,08 %), a podobně jako po 48 hodinách skladování, tak i po 72 hodinách byl zjištěn téměř totožný podíl normospermii (64,15 %) v ředidlo INRA 96. O 8,16 % resp. 7,23 % nižší podíl normospermii byl nalezen u ředidla ZH (56,92 %). U ředidel BotuSemen Gold a INRA 96 představoval pokles podílu normospermii mezi 48 a 72 hodinou 4,70 % resp. 4,72 %. V práci Ghorbani *et al.* (2024) byl tento rozdíl nižší pouze o 3,4 % a podíl normospermii po 72 hodinách v ředidle INRA 96 byl 77,0 %.



Obr. 21: Vliv ředidla na průměrný podíl normospermii po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek

Rozdílné indexy a–b vyjadřují statisticky průkazný rozdíl $p \leq 0,01$; ZH: ředidlo dle receptury Zemského hřebčince v Tlumačově, BSG: BotuSemen Gold, INRA: INRA 96.

5 ZÁVĚR

Cílem první části práce bylo zhodnotit vybrané parametry nativního ejakulátu plemenných hřebců využívaných v Zemském hřebčinci v Tlumačově během odběrových sezón 2018–2020. Z výsledků této části práce je možné vyvodit následující závěry:

V průběhu celého sledovaného období bylo získáno 240 ejakulátů plemenných hřebců a jejich průměrný objem byl 42,39 ml. Mezi jednotlivými reprodukčními sezónami nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly a hodnoty objemu se lišily pouze nepatrně 43,55 ml (2018), 41,08 ml (2019), 42,55 ml (2020). Byl zjištěn statisticky významný vliv věku hřebců na objem ejakulátu. Významně vyšší objem ejakulátu (59,20 ml) byl získán od věkové kategorie hřebců 6–9 let, ve srovnání s věkovou kategorií do 5 let (41,56 ml) a věkovou kategorií nad 15 let (32,54 ml). Statisticky významné rozdíly z hlediska objemu ejakulátu byly nalezeny také v rámci plemenné příslušnosti hřebců. Od chladnokrevných hřebců byl získán vyšší průměrný objem ejakulátu (84,82 ml) než od plemen teplokrevných (39,04 ml). I mezi teplokrevnými plemeny byly zjištěny statisticky významné rozdíly, a to mezi průměrnými objemy starokladrubských hřebců (54,33 ml) a holštýnských hřebců (27,03 ml). U hřebců českého teplokrevníka (36,00 ml) a oldenburského koně (38,48 ml) již nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Průměrná koncentrace spermií v ejakulátu během celého sledovaného období byla $282,60 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, přičemž v reprodukčních sezónách 2020 ($341,26 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a 2018 ($289,43 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) byla zjištěná koncentrace statisticky významně vyšší než v sezóně 2019 ($217,11 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$). Z hlediska věku plemeníků nebyly u koncentrace spermií v ejakulátu nalezeny statisticky významné rozdíly. U hřebců českého teplokrevníka ($371,10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a oldenburského koně ($338,91 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) byly zjištěny statisticky významně vyšší průměrné koncentrace spermií v ejakulátech než u hřebců ostatních plemen, holštýnský kůň ($222,50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$), starokladrubský kůň ($206,11 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) a chladnokrevníci ($149,44 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$).

Průměrná hodnota celkového počtu spermií v ejakulátu plemenných hřebců za celé sledované období byla $9,01 \times 10^9$. V sezóně 2020 byla průměrná hodnota tohoto parametru ($11,52 \times 10^9$) statisticky významně vyšší než v předcházejících sezónách 2018 a 2019 ($8,35 \times 10^9$ a $7,17 \times 10^9$). Z hlediska věku plemeníků nebyly u celkového počtu spermií v ejakulátu nalezeny statisticky významné rozdíly i když u věkové kategorie 6–9 let byl celkový počet spermií vyšší. Statisticky průkazné rozdíly v celkovém počtu spermií byly nalezeny mezi jednotlivými plemeny hřebců. Nejvyšší průměrné počty spermií byly zjištěny u oldenburských hřebců ($11,43 \times 10^9$) a u českých teplokrevníků ($10,67 \times 10^9$). Statisticky nižší celkové počty spermií, než byly zjištěny u oldenburského koně, měla všechna ostatní plemena kromě českého teplokrevníka, tj. starokladrubský kůň ($7,95 \times 10^9$), chladnokrevníci ($7,89 \times 10^9$) a holštýnský kůň ($5,42 \times 10^9$). Další statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi českým teplokrevníkem ($10,67 \times 10^9$) a holštýnskými hřebci ($5,42 \times 10^9$).

V průběhu celého sledovaného období byl průměrný podíl normospermií v ejakulátu hřebců 79,19 %, přičemž nejvyššího podílu normospermií bylo dosaženo v sezóně 2018 (84,21 %) a statisticky prokazatelně nižší podíly byly zjištěny v sezónách 2019 (76,10 %) a 2020 (77,27 %). V průběhu reprodukčních sezón byl průměrný podíl normospermií v rámci jednotlivých měsíců variabilní, jednoznačně nejhorším měsícem byl srpen (70,29 %), kdy byl podíl normospermií v ejakulátu ve srovnání se všemi ostatními měsíci statisticky

významně nižší. Naopak nejvyšší průměrná hodnota byla zjištěna v březnu (84,98 %) a dále pak v dubnu (84,67 %) a tyto hodnoty byly statisticky významně vyšší než v červnu (77,53 %). Plemenná příslušnost hřebců neměla na podíl normospermii v ejakulátu statisticky významný vliv.

Průměrná hodnota motility spermií v ejakulátu hřebců za celé sledované období byla 88,68 %. V reprodukční sezóně 2020 byla průměrná motilita spermií (94,13 %) statisticky významně vyšší než v předchozích sezónách 87,64 % (2018) a 84,27 % (2019). Na motilitu spermií měla statisticky průkazný vliv plemenná příslušnost hřebců. U chladnokrevných hřebců byl podíl motilních spermií (64,29 %) statisticky významně nižší než u ostatních plemen, český teplokrevník (96,11 %), oldenburgský kůň (92,64 %), holštýnský kůň (92,19 %), starokladrubský kůň (87,75 %).

Mezi výše uvedenými parametry ejakulátu hřebců byly pozorovány, pomocí Pearsonových korelačních koeficientů, lineární vztahy a středně silná pozitivní korelace byla zjištěna mezi podílem motilních spermií a koncentrací spermií (0,5073), dále mezi celkovým počtem spermií v ejakulátu a koncentrací spermií (0,4864), podílem motilních spermií a podílem normospermii (0,4210) a také mezi podílem motilních spermií a celkovým počtem spermií v ejakulátu (0,3910). Naopak středně silná negativní závislost byla pozorována mezi objemem ejakulátu a koncentrací spermií (-0,4759) a také byla zjištěna negativní závislost mezi motilitou spermií a objemem ejakulátu (-0,3376). Lze tedy konstatovat, že čím je vyšší koncentrace spermií, celkový počet spermií v ejakulátu a vyšší podíl normospermii, tím je vyšší i podíl motilních spermií v ejakulátu. Naopak čím je vyšší objem ejakulátu, tím je nižší koncentrace spermií a jejich motilita.

Cílem druhé části práce bylo zhodnotit vliv použitých ředidel na kvalitativní parametry spermií v chlazených inseminačních dávkách plemenných hřebců. Z výsledků této části práce je možné vyvodit následující závěry:

Z hlediska průměrného podílu motilních spermií hodnocených jak subjektivní metodou, tak i metodou CASA byly po 24, 48 a 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek zjištěny statisticky významné rozdíly mezi použitými ředidly. Lze konstatovat, že v sezóně 2018, kdy bylo sledováno 13 hřebců (82 odběrů) a hodnoceno 5 různých ředidel, bylo dosaženo nejlepších výsledků motility spermií, hodnocené subjektivní metodou, s ředidly BotuSemen Gold (58,92 %; 44,67 %; 29,32 %) a INRA 96 (47,61 %; 29,80 %; 17,48 %) ve všech sledovaných intervalech, tj. po 24, 48 a 72 hodinách skladování. Mezi jednotlivými hřebci byly nalezeny relativně velké rozdíly v průměrném podílu motilních spermií v jednotlivých ředidlech po 24 hodinách skladování. Ale i přes tyto rozdíly je zřejmé, že u všech hřebců bylo pro uchování chlazené inseminační dávky nejvhodnější ředidlo BotuSemen Gold, ve kterém bylo dosaženo vždy nejvyššího průměrného podílu motilních spermií, hodnocených subjektivní metodou. I v případě hodnocení motility metodou CASA bylo dosaženo nejlepších výsledků opět s ředidlem BotuSemen Gold (77,63 %; 60,30 %; 46,76 %) a dále pak Equi PRO ApX² (70,07 %; 49,33 %; 32,10 %) a INRA 96 (69,63 %; 44,40 %; 27,15 %) po 24, 48 a 72 hodinách skladování. Při srovnání průměrných podílů motilních spermií hodnocených metodou CASA byly v chlazených inseminačních dávkách jednotlivých hřebců při použití různých ředidel a při délce skladování 24 hodin, nalezeny relativně velké rozdíly, avšak i při této metodě hodnocení bylo pro většinu ejakulátů hřebců nejvhodnější použít ředidlo BotuSemen Gold, pouze u dvou hřebců tomu bylo jinak (INRA 96 a Equi PRO ApX²).

V sezónách 2019 a 2020 bylo celkem sledováno 19 hřebců (158 odběrů) a byla hodnocena 3 ředidla, která byla vybrána na základě výsledků z odběrové sezóny 2018. Nejnižší průměrný podíl motilních spermií v inseminační dávce byl zjištěn při použití ředidla ZH (59,99 %; 37,03 %; 24,96 %) po 24, 48 a 72 hodinách skladování. Statisticky významně vyšší průměrné podíly motilních spermií byly zjištěny u ředidel BotuSemen Gold (73,55 %; 55,43 %; 40,25 %) resp. INRA 96 (73,22 %; 54,67 %; 40,78 %) po 24, 48 a 72 hodinách skladování. Mezi jednotlivými hřebci se opět vyskytovaly poměrně velké rozdíly v podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování, lze ale konstatovat, že nejhorších výsledků bylo dosaženo vždy u ředidla ZH. Naopak označit jedno ze zbývajících ředidel z hlediska motility spermií za nejlepší není možné, protože vždy u 3 hřebců bylo jedno nebo druhé ředidlo vhodnější a u 13 hřebců byly výsledky dosažené při použití těchto dvou druhů ředidel téměř totožné. Z hlediska průměrného podílu viabilních spermií, bylo dosaženo nejlepších výsledků při použití ředidla INRA 96 (72,17 %; 65,16 %; 57,36 %) po 24, 48 a 72 hodinách skladování. U zbývajících dvou druhů ředidel bylo dosaženo statisticky průkazně nižších podílů viabilních spermií ve všech sledovaných intervalech.

Výsledky této práce potvrzují následující vědecké hypotézy:

- Kvalita hřebčího ejakulátu je ovlivněna individualitou hřebce, jeho plemenným typem a stářím plemeníka.
- Kvantitativní a kvalitativní parametry nativního ejakulátu se vzájemně ovlivňují.
- Volba použitého ředidla ovlivní kvalitativní parametry chlazených inseminačních dávek plemenných hřebců.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABAH, K. O., FONTBONNE, A., PARTYKA, A., NIZANSKI, W. 2023. Effect of male age on semen quality in domestic animals: potential for advanced functional and translational research? *Veterinary Research Communications*. 47(3), 1125–1137.
- AFFONSO, F. J., CARVALHOA, H. F., LANÇONIA, R., LEMESA, K. M., LEITEA, T. G., OLIVEIRAA, L. Z., CELEGHINIB, E. C. C., DE ARRUDA, R. P. 2017. Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 59, 57–63.
- AGUILA, L., CABRERA, P., ARIAS, M. E., SILVA, M., FELMER, R. 2024. Effect of sperm treatment with lysocleithin on in vitro outcomes of equine intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Equine Veterinary Science*. 138, 105095.
- AITKEN, R. J., VERNET, P. 1998. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 53, 109–118.
- AITKEN, R. J., BAKER, M. A. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*. 16, 581–588.
- AKBARINEJAD, V., FATHI, R., SHAHVERDI, A., ESMAEILI, V., REZAGHOLIZADEH, A., GHALENO, L. R. 2020. The relationship of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, adenosine triphosphate content, sperm plasma membrane integrity, and kinematic properties in warmblood stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*. 94, 103267.
- ALI, M., MUSA, M. M., ALFADUL, S., AL-SOBAYEL, K. 2017. Consequences of adding gum Arabic as a cryoprotectant on motility and viability of frozen stallion semen. *Cryobiology*. 79, 21–28.
- AMANN, R. P., WABERSKI, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81, 5–17.
- ARRUDA DE OLIVEIRA, R., WOLF, C. A., VIU, M. A., GAMBARINI, M. L. 2013. Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33, 1148–1152.
- ARRUDA DE OLIVEIRA, R., SCARLET, D., ILLE, N., AURICH CH. 2017. Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation. *Theriogenology*. 89, 289–294.
- AURICH, CH. 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*. 107, 268–275.
- AURICH, CH. 2011a. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*. 124, 220–228.
- AURICH, CH. 2011b. Actual use of artificial insemination in horse breeding. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 98, 150–155.
- AURICH, J. E. 2012. Artificial insemination in horses – more than a century of practice and research. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32, 458–463.
- BALL, B. A. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*. 107, 257–267.
- BANKS, S., KING, S. A., IRVINE, D. S., SAUNDERS, P. T. K. 2005. Impact of mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*. 129, 505–514.
- BARBAS, J. P., MASCARENHAS, R. D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10, 49–62.
- BATELLIER, F., MAGISTRINI, M., FAUQUANT, J., PALMER, E. 1997. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 48, 391–410.

- BATELLIER, F., GÉRARD, N., COURTENS, J. L., PALMER, E., MAGISTRINI, M. 2000. Preservation of stallion sperm quality by native phosphocaseinate: a direct or indirect effect? *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 56, 69–77.
- BATELLIER, F., VIDAMENT, M., FAUQUANT, J., DUCHAMPB, G., ARNAUDD, G., YVONB, J. M., MAGISTRINIB, M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*. 68, 181–190.
- BAUMBER, J., BALL, B. A., GRAVANCE, C. G., MEDINA, V., DAVIES-MOREL, M. C. G. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*. 21, 895–902.
- BECERRO-REY, L., MARTÍN-CANO, F. E., SANCLER-SILVA, Y. F. R., GIL, M. C., ORTEGA-FERRUSOLA, C., APARICIO, I. M., GAITSKELL-PHILLIPS, G., DA SILVA-ÁLVAREZ, E., PEÑA, F. J. 2024. In vitro, the aging of stallion spermatozoa at 22 °C is linked to alteration in Ca²⁺ and redox homeostasis and may be slowed by regulating metabolism. *Theriogenology*. 229, 127–137.
- BENSON, J. D., WOODS, E. J., WALTERS, E. M., CRITSER, J. K. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*. 78, 1682–1699.
- BERGERON, A. AND MANJUNATH, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*. 73, 1338–1344.
- BERGQVIST, A. S., BALLESTER, J., JOHANNISSON, A., LUNDEHEIM, N., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. 2007. Heparin and dermatan sulphate induced capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa measured by merocyanine-540. *Zygote*. 15, 225–232.
- BERNDTSON, W. E. 2014. Sperm production and its harvest, pp. 11–33. In: CHENOWETH, P. J., LORTON, S. P. (Eds.). *Animal Andrology: Theories and Applications*. Wallingford: CABI, Oxon, England. ISBN 978-1-78064-316-8
- BLOMMAERT, D., FRANCK, T., DONNAY, I., LEJEUNE, J. P., DETILLEUX, J., SERTEYN, D. 2016. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Cryobiology*. 72, 27–32.
- BOE-HANSEN, G. B., MORRIS, I. D., ERSBOLL, A. K., GREVE, T., CHRISTENSEN, P. 2005. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*. 63, 1789–1802.
- BOERSMA, A., RASSHOFER, R., STOLLA, R. 2001. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reproduction in Domestic Animals*. 36, 222–229.
- BRINSKO, S. P., BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D., SCHUMACHER, J., LOVE., C. C. 2011. *Manual of equine reproduction*. 3rd Edition. Maryland Heights, Missouri: Mosby, Elsevier. ISBN 978-0-323-06482-8
- BRITO, L. F. C. 2021. Evaluation of sperm morphology. In: DASCANIO, J., MCCUE, P. (Eds.). *Equine Reproductive Procedures*. 2nd Edition. Hoboken, USA: John Wiley and Sons, pp. 499–504.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J., SOŠTARIĆ, E., FEITSMA, H., GADELLA, B. M. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*. 76, 1473–1486.

- BUBENÍČKOVÁ, F., POSTLEROVÁ, P., ŠIMONÍK, O., SIROHI, J., ŠICHTÁŘ, J. 2020. Effect of seminal plasma protein fractions on stallion sperm cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 6415.
- BURNAUGH, L., SABEUR, K., BALL, B. A. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*. 67, 580–589.
- BURNAUGH, L., BALL, B. A., SABEUR, K., THOMAS, A. D., MEYERS, S. A. 2010. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*. 117, 249–260.
- CALDEVILLA, M. L., FERRANTE, A. A., GAMBAROTTA, M. C., MIRAGAYA, M. H., NEILD, D. M. 2024. Evaluation of equine semen frozen in extenders free of egg yolk using two different freezing curves. *Journal of Equine Veterinary Science*. 137, 105080.
- CATALÁN, J., LLAVANERA, M., BONILLA-CORREAL, S., PAPAS, M., GACEM, S., RODRÍGUEZ-GIL, J. E., YESTE, M., MIRÓ, J. 2020. Irradiating frozen-thawed stallion sperm with red-light increases their resilience to withstand post-thaw incubation at 38 °C. *Theriogenology*. 157, 85–95.
- CLULOW, J., GIBB, Z. 2022. Liquid storage of stallion spermatozoa – Past, present and future. *Animal Reproduction Science*. 247, 107088.
- COLENBRANDER, B., GADELLA, B. M., STOUT, T. A. E. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 38, 305–311.
- CONTRIA, A., DE AMICISA, I., VERONESI, M. C., FAUSTINIC, M., ROBBEA, D., CARLUCCIO, A. 2010. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. *Animal Reproduction Science*. 120, 136–141.
- COUTINHO DA SILVA, M. A., 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 zona pellucida. *Reproduction*. 143, 577–585.
- DARR, CH. R., MORAES, L. E., SCANLAN, T. N., BAUMBER-SKAIFE, J., LOOMIS, P. R., CORTOPASSI, G. A., MEYERS, S. A. 2017. Sperm mitochondrial function is affected by stallion age and predicts post-thaw motility. *Journal of Equine Veterinary Science*. 50, 52–61.
- DE IULIIS, G. N., THOMSON, L. K., MITCHELL, L. A., FINNIE, J. M., KOPPERS, A. J., HEDGES, A., NIXON, B., AITIKEN, R. J. 2009. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biology of Reproduction*. 81, 517–524.
- DEICHSEL, K., SCHRAMMEL, N., AURICH, J., AURICH, CH. 2016. Effects of a long-day light program on the motility and membrane integrity of cooled-stored and cryopreserved semen in Shetland pony stallions. *Animal Reproduction Science*. 167, 68–73.
- DHANJU, C. K., KAUR, R., CHEEMA, R. S. 2006. Protein-leakage during heparin-induced in vitro capacitation of bull sperm. *Archiv für Tierzucht – Archives of Animal Breeding*. 49, 426–433.
- EL-BADRY, D. A., EL-MAATY, A. M. A., EL SISY, G. A. 2017. The effect of trehalose supplementation of INRA-82 extender on quality and fertility of cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 48, 86–92.
- EL-SHALOFY, A., GAUTIER, C., KHAN, Y., AURICH, J., AURICH, CH. 2023. Shipping duration and temperature influence the characteristics of cryopreserved horse semen stored in different shipping devices for up to 14 days. *Animal Reproduction Science*. 256, 107307.

- ELKHAWAGAH, A. R., NERVO, T., POLETTO, M., MARTINO, N. A., GALLO, D., BERTERO, A., VINCENTI, L. 2020. Effect of relaxin on semen quality variables of cryopreserved stallion semen. *Animal Reproduction Science*. 216, 106351.
- ELKHAWAGAH, A. R., DONATO, G. G., POLETTO, M., MARTINO, N. A., VINCENTI, L., CONTI, L., NECCHI, D., NERVO, T. 2024. Effect of mitoquinone on sperm quality of cryopreserved stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 141, 105168.
- ERENPREISS, J., SPANO, M., ERENPREISA, J., BUNGUM, M., GIWERCMAN, A. 2006. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*. 8, 11–29.
- ETERPI, M., MAGISTRINI, M., COUTY, I., GAVIN-PLAGNE, L., AGUIRRE-LAVIN, T., SCHMITT, E., CARION, O. 2022. INRA96 supplemented with phospholipids liposomes, a promising approach for stallion sperm chilling. *Journal of Equine Veterinary Science*. 108, 103801.
- EVENSON, D. P. 2011. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®): 30 Years of Experience with the SCSA®. In: ZINI, A., AGARWAL, A. (Eds.). *Sperm Chromatin: Biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*. New York, NY: Springer, p. pp. 125–149. ISBN 978-1-4419-1781-2
- FITZSIMMONS, C., MCLAUGHLIN, E. A., MAHONY, M. J., CLULOW, J. 2007. Optimisation of handling, activation and assessment procedures for *Bufo marinus* spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 19, 594–601.
- FOSTER, M. L., VARNER, D. D., HINRICH, K., TEAGUE, S., LACAZE, K., BLANCHARD, T. L., LOVE, C. C. 2011. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. *Theriogenology*. 75, 1499–1505.
- FREITAS, M. L., BOUÉRES, C. S., PIGNATARO, T. A., GONÇALVES DE OLIVEIRA, F. J., DE OLIVEIRA VIU, M. A., DE OLIVEIRA, R. A. 2016. Quality of fresh, cooled, and frozen semen from stallions supplemented with antioxidants and fatty acids. *Journal of Equine Veterinary Science*, 46, 1–6.
- GACEM, S., CATALÁN, J., YÁNEZ-ORTIZ, I., SOLER, C., MIRÓ, J. 2021. New sperm morphology analysis in equids: Trumorph® vs eosin-nigrosin stain. *Veterinary Sciences*. 8, 79.
- GAMBOA, S., RODRIGUES, A. S., HENRIQUES, L., BATISTA, C., RAMALHO-SANTOS, J. 2010. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 73, 950–958.
- GHADIMI, V., ZHANDI, M., TOWHIDI, A., SHEHAB-EL-DEEN, M. A. M. M., NOURI, H. 2014. Positive effect of manganese (III) meso-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin on stallion spermatozoa during storage in cool condition. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34, 1329–1332.
- GHALLAB, A. M., SHAHAT, A. M., FADL, A. M., AYOUB, M. M., MOAWAD, A. R. 2017. Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology*. 79, 14–20.
- GHORBANI, B., NASIRI-FOOMANI, N., SAEDI, A., HASANI-BAFERANI, A., SAMADI, F. 2024. Effect of selenium nanoparticles-supplemented INRA96 extender on Turkmen stallion sperm quality and lipid peroxidation during storage at 5 °C. *Journal of Equine Veterinary Science*. 136, 105073.
- GIARETTA, E., MUNERATO, M., YESTE, M., GALEATI, G., SPINACI, M., TAMANINI, C., MARI, G., BUCCI, D. 2017. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal Reproduction*. 176, 11–19.

- GIBB, Z., AITKEN, R. J. 2016. The impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. *BioMed Research International*. 2016, 380609.
- GIBB, Z., LAMBOURNE, S. R., QUADRELLI, J., SMITH, N. D., AITKEN, R. J. 2015. L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biology of Reproduction*. 93(4), 104.
- GUTHRIE, H. D., WELCH, G. R. 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 78, 1700–1708.
- Haidl, G. 1994. Epididymal maturation of human spermatozoa. *Fortschritte der Medizin*. 112, 492–495.
- HALO, M. JR., TIRPÁK, F., SLANINA, T., TOKÁROVÁ, K., MASSÁNYI, M., DIANOVÁ, L., MLYNEKOVÁ, E., GREŇ, A., HALO, M., MASSÁNYI, P. 2023. Combination of taurine and caffeine in stallion semen extender positively affects the spermatozoa parameters. *Cells*. 12, 320.
- HALO, M. JR., TIRPÁK, F., MASSÁNYI, M., DIANOVÁ, L., LENICKÝ, M., SLANINA, T., ZEMANOVÁ, J., MATUŠKOVÁ, A., GREŇ, A., HALO, M., MASSÁNYI, P. 2024. Calcium affects stallion spermatozoa parameters in different incubation temperatures. *Heliyon*. 10, e35879.
- HAMMADEH, M. E., YEGINIA DOV, T., ROSENBAUM, P., GEORG, T., SCHMIDT, W., STREHLER, E. 2001. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Archives of Andrology*. 46, 99–104.
- HARTWIG, F. P., LISBOA, F. P., HARTWIG, F. P., MONTEIRO, G. A., MAZIERO, R. R. D., FREITAS-DELL'AQUA, C. P., ALVARENGA, M. A., PAPA, F. O., DELL'AQUA, J. A. JR. 2014. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*. 81, 340–346.
- HAYDEN, S. S., BLANCHARD, T. L., BRINSKO, S. P., VARNER, D. D., HINRICHS, K., LOVE, C. C. 2015. The “dilution effect” in stallion sperm. *Theriogenology*. 83, 772–777.
- HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., LOVE, C. 2021. Cool-stored and frozen-thawed stallion semen: thoughts on collection, evaluation, processing, insemination, and fertility. *Clinical Theriogenology*. 13, 280–288.
- HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., LOVE, C. C., SERAFINI, R., RAMÍREZ-AGAMEZ, L., FRIEDRICH, M., GHOSH, S., TEAGUE, S. R., LACAZE, K. A., BRINSKO, S. P., VARNER, D. D. 2020. Effects of glucose concentration in semen extender and storage temperature on stallion sperm quality following long-term cooled storage. *Theriogenology*. 147, 1–9.
- HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., LOVE, C. C., GHOSH, S., SERAFINI, R., TEAGUE, S. R., LACAZE, K. A., BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D. 2018. The effect of different antibiotics on sperm quality and antimicrobial activity in cool-stored stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 66, 59.
- HOOGENDIJK, R., GADELLAB, B. M., STOUTA, T. A. E., HENNINGA, H. H. W. 2018. Inducing lipid reorganization and the acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 66, 22.
- CHANAVAT, E., VIDAMENT, M., DEFOIN, L., DUCHAMP, G., LEVILLAIN, N., YVON, J. M., LE VERN, Y., KERBOEUF, D., MAGISTRINI, M. 2005. Effect of storage and temperature on in vitro stallion sperm parameters and fertility rate. *Animal Reproduction Science*. 89, 318–321.
- CHAPMAN, J. C., MICHAEL, S. D. 2003. Proposed mechanism for sperm chromatin condensation / decondensation in the male rat. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1, 20.

- CHEMES, H. 2018. Phenotypic varieties of sperm pathology: Genetic abnormalities or environmental influences can result in different patterns of abnormal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 194, 41–56.
- IZADPANAH, G., ZARE-SHAHNEH, A., ZHANDI, M., YOUSEFIAN, I., EMAMVERDI, M. 2015. Melatonin has a beneficial effect on stallion sperm quality in cool condition. *Journal of Equine Veterinary Science*. 35, 555–559.
- JANETT, F., THUN, R., BETTSCHEN, S., BURGER, D., HASSIG, M. 2003a. Seasonal changes in semen quality and freezability in French-Friesian stallions. *Animal Reproduction Science*. 77, 213–221.
- JANETT, F., THUN, R., NIEDERER, K., BURGER, D., HASSIG, M. 2003b. Seasonal changes in semen quality and freezability in the warmblood stallion. *Theriogenology*. 60, 45–461.
- 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, 590–595.
- JANG, H. Y., KIM, Y. H., KIM, B. W., PARK, I. C., CHEONG, H. T., KIM, J. T., PARK, C. K., KONG, H. S., LEE, H. K., YANG, B. K. 2010. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reproduction of Domestic Animals*. 45, 943–950.
- JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*. 60, 743–758.
- JELÍNEK, P., KOUDELA, K. et al. 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. ISBN 80-7157-644-1.
- JHAMB, D., TALLURI, T. R., SHARMA, S., JUNEJA, R., NIRWAN, S. S., YADAV, D., PARGI, K. K., TANWAR, A., KUMAR, P., KUMAR, R., MEHTA, S. CH., PARASHAR, M., GAUR, M. 2023. Freezability and fertility rates of stallion semen supplemented with trehalose in lactose extender. *Journal of Equine Veterinary Science*. 126, 104293.
- JIANG, Z. L., LI, Q. W., HU, J. H., LI, W. Y., ZHAO, H. W., ZHANG, S. S. 2007. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*. 54, 301–304.
- KALAHANIS, J., ROUSSO, D., KOURTIS, A., MAVROMATIDIS, G., MAKEDOS, G., PANIDIS, D. 2002. Round-headed spermatozoa in semen specimens from fertile and subfertile men. *Journal of Reproductive Medicine*. 47, 489–493.
- KARESKOSKI, M., KATILA, T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*. 107, 249–256.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L., BOCHENEK, M., RYNSKA, B. 2005. Effect of quality of sperm chromatin structure on in-vitro production of cattle embryos. *Archiv für Tierzucht – Archives of Animal Breeding*. 48, 32–39.
- KLEWITZ, J., HAGEN, C., BEHRENDT, D., MARTINSSON, G., SIEME, H. 2008. Effect of multiple freezing of stallion semen on sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science*. 107, 327–328.
- KOONJAENAK, S., PONGPENG, P., WIROWUTHIKUL, S., JOHANNISSON, A., KUNAVONGKRIT, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2007. Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 67, 1424–1435.

- KOWALCZYK, A., CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, E., KUCZAJ, M. 2019. Factors influencing the popularity of artificial insemination of mares in Europe. *Animals*. 9, 460.
- KUTVOLGYI, G., STEFLER, J., KOVACS, A. 2006. Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. *Biotechnic and Histochemistry*. 81, 109–117.
- ŁACKA, K., KONDRACKI, S., IWANINA, M., WYSOKINSKA, A. 2016. Assessment of stallion semen morphology using two different staining methods, microscopic techniques, and sample sizes. *Journal of Veterinary Research*. 60, 99–104.
- LEFRAPPER, 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, 200–204.
- LI, Z. X., WANG, L. Q., CAI, J., HUANG, H. F. 2006. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 23, 367–376.
- LONG, M., STRONATI, A., BIZZARO, D., KRUGER, T., MANICARDI, G. C., HJELMBORG, P. S., SPANO, M., GIWERCMAN, A., TOFT, G., BONDE, J. P., BONEFELD-JORGENSEN, E. C. 2007. Relation between serum xenobiotic-induced receptor activities and sperm DNA damage and sperm apoptotic markers in European and Inuit populations. *Reproduction*. 133, 517–530.
- LOUDA, F., ČEŘOVSKÝ, J., JEŽKOVÁ, A., STÁDNÍK, L. 2001. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 80-213-0702-1
- LOVE, C. C., VARNER, D. D., THOMPSON, J. A. 2000. Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56, 93–100.
- LOVE, C. C. 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*. 76, 547–557.
- LOVE, C. C., BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D., BRINSKO, S. P., VOGEL, J., BLISS, S., SUDDERTH, K., TEAGUE, S., LACAZE, K. 2012. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. *Theriogenology*. 77, 1911–1917.
- LU, J. C., HUANG, Y. F., LÜ, N. Q. 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*. 46, 329–338.
- LÜHR, J., OLDENHOFA, H., BIGALKA, J., MARTINSSON, G., BURGER, D., SIEME, H. 2018. Evaluation of fertilization capacity of cryopreserved stallion sperm, directly after thawing and after cooled storage. *Journal of Equine Veterinary Science*. 66, 72.
- MACIEL, A. C., CAMARGO, V., MATTOS, R. C., RECHSTEINER, S. F. 2016. Viability of equine semen stored in a polyethylene system for transport for eight hours. *Acta Scientiae Veterinariae*. 44, 1429.
- MANJUNATH, P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction*. 9, 809–815.
- MARQUES, A., DE ARRUDA, R. P., CELEGHINI, E. C. C., GOBESSO, A. A. O., NETO, J. R. N. 2002. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology*. 58, 257–260.
- MARTINS, C. F., BÃO, S. N., DODE, M. N., CORREA, G. A., RUMPF, R. 2007. Effect of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology*. 67, 1307–1315.

- MARVAN, F. *et al.* 1998. *Morfologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze a Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. ISBN 80-209-0273-2
- MENKVELD, R., EL-GAREM, Y., SCHILL, W. B., HENKEL, R. 2003. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 20, 432–438.
- MERKIES, K., CHENIER, T., PLANTE, C., BUHR, M. M. 2000. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology*. 54, 1215–1224.
- MILLER, C. D. 2008. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*. 70, 463–468.
- MORRELL J. M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2009. Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. *The Open Andrology Journal*. 1, 1–9.
- MOREL, M. C. G. D. 2020. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. 5th Edition. Oxfordshire: Cabi. ISBN 9781789242249
- MORRIS, G. J., FASZER, K., GREEN, J. E., DRAPER, D., GROUT, B. W. W., FONSECA, F. 2007. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*. 68, 804–812.
- MORRIS, L., HARTEVELD, R., GIBB, Z. 2024. A simplified fixed-time insemination protocol using frozen-thawed stallion spermatozoa stored at 17 °C for up to 24 h before insemination. *Equine Veterinary Journal*. 56, 688–696.
- MORTIMER, S. T., VAN DER HORST, G., MORTIMER, D. 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*. 17, 545–553.
- NAGY, S., KOVACS, B., JOHANNISSON, A. 2023. Evaluation of domestic animal sperm head morphology via flow cytometric DNA labelling and pulse shape analysis using bull and stallion spermatozoa as model species. *Reproduction in Domestic Animals*. 58, 1569–1575.
- NEUHAUSER, S., BOLLWEIN, H., SIUDA, M., HANDLER, J. 2019. Comparison of the effects of five semen extenders on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*. 79, 1–8.
- NIXON, B., DE IULIIS, G. N., HART, H. M., ZHOU, W., MATHE, A., BERNSTEIN, I. R., ANDERSON, A. L., STANGER, S. J., SKERRETT-BYRNE, D. A., JAMALUDDIN, M. F. B., ALMAZI, J. G., BROMFIELD, E. G., LARSEN, M. R., DUN, M. D. 2019. Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation. *Molecular & Cellular Proteomics*. 18, S91–S108.
- NOAKES, D. E., PARKINSON, T. J., ENGLAND, G. C. W. 2018. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 10th Edition. Edinburgh: Saunders Elsevier. ISBN 978-0-7020-7233-8
- NOVELLO, G., PODICO, G., SEGABINAZZI, L. G. T. M., LIMA, F. S., CANISSO, I. F. 2020. Stallion semen cooling using native phosphocaseinate-based extender and sodium caseinate cholesterol-loaded cyclodextrin-based extender. *Journal of Equine Veterinary Science*. 92, 103104.
- NUNES, M. M., MORRELL, J. M., SANTOS, F. C. C., MIRAGAYA, M. H., GALLELLI, M. F., RODRIGUEZ, M., GUIMARÃES, J. D. 2024a. Effect of storage and single layer centrifugation before cryopreservation on stallion sperm cryosurvival. *Journal of Equine Veterinary Science*. 135, 105046.
- NUNES, M. M., GURGEL, J. R. C., MUNHOZ, M. L., DE GIULI, V. JR., CARNEIRO, G. F., MIRAGAYA, M. H., GALLELLI, M. F., GUIMARAES, J. D. 2024b. Effect of novel lyophilized extenders on stallion post-thaw sperm motility. *Journal of Equine Veterinary Science*. 140, 105144.

- OLDENHOF H., FRIEDEL, K., AKHOONDI, M., GOJOWSKY, M., WOLKERS, W. F., SIEME, H. 2012. Membrane phase behavior during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability. *Molecular Membrane Biology*. 29, 95–106.
- OLIVA, R. 2006. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*. 12, 417–435.
- OLIVEIRA, R. A., WOLF, C. A., VIU, M. A. O., GAMBARINI, M. L. 2013. Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33, 1148–1152.
- ORTEGA-FERRUSOLA, C., FERNÁNDEZ, L. G., SANDOVAL, C. S., GARCÍA, B. M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., TAPIA, J. A., PEÑA, F. J. 2010. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 74, 458–465.
- ORTEGA-FERRUSOLA, C., JOHANNISSON, A., PEÑA VEGA, F. J., 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, 411–416.
- ORTIZ-RODRIGUEZ, J. M., BUCCI, D., TOVAR-PASCUAL, L., GRANATA, S., SPINACI, M., NESCI, S. 2024. Analysis of stallion spermatozoa metabolism using Agilent Seahorse XFp Technology. *Animal Reproduction Science*. 271, 107633.
- OZTURKLER, Y., BARAN, A., EVEGEN, M., AK, K., ILERI, I. K. 2001. Comparison of ovine spermatozoal morphological features after staining of fixation and assessment of morphological abnormalities in dead/live spermatozoa. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 25, 675–680.
- PAGL, R., AURICH, J. E., MÜLLER-SCHLÖSSER, F., KANKOFER, M., AURICH, CH. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology*. 66, 1115–1122.
- PAPIN, J., STUHTMANN, G., MARTINSSON, G., SIEME, H., LUNDEHEIM, N., NTALLARIS, T., MORRELL, J. M. 2021. Stored stallion sperm quality depends on sperm preparation method in INRA82 or INRA96. *Journal of Equine Veterinary Science*. 98, 103367.
- PASCH, L., STEFANOVSKI, D., DOBBIE, T., LEWIS, G., TURNER, R. M. 2024. Factors affecting pregnancy rates in mares bred with cryopreserved semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 141, 105167.
- PEARSON, M. M., HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., SPACEK, S. G., BECKHAM, A. M. N., KELLEY, D. E., RAMÍREZ-AGÁMEZ, L., LACAZE, K. A., VARNER, D. D., LOVE, C. C. 2024. Comparison of two processing techniques on the sperm quality of semen contaminated with urine. *Theriogenology*. 216, 137–145.
- PERIS, S. I., BILODEAU, J. F., DUFOUR, M., BAILEY, J. L. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 74, 878–892.
- PERIS-FRAU, P., SOLER, A. J., INIESTA-CUERDA, M., MARTÍN-MAESTRO, A., SÁNCHEZ-AJOFRÍN, I., MEDINA-CHÁVEZ, D. A., FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R., GARCÍA-ÁLVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., MONTORO, V., GARDE, J. J. 2020. Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 2781.
- PESCH, S., BERGMANN, M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*. 37, 597–612.

- PICKET, B. W. 2018. Article. *Animal Reproduction Systems*. [cit. 2024-5-18] <https://www.arssales.com/extenders.html>
- PIOMBONI, P., FOCARELLI, R., STENDARDI, A., FERRAMOSCAÀ, A., ZARA, V. 2012. The role of mitochondria in energy production for humansperm motility. *International Journal of Andrology*. 35, 109–124.
- DUPLESSIS, S. S., AGARWAL, A., MOHANTY, G., VANDERLINDE, M. 2015. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian Journal of Andrology*. 17, 230–235.
- PODICO, G., SPENCER, K. M., MAGALHAES, H. B., CANISSO, I. F. 2023. Semen quality of the first and second ejaculates collected from breeding inactive stallions after cooling and freezing. *Veterinary Sciences*. 10, 173.
- POIANI, A. 2006. Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 60, 289–310.
- PRATHALINGAM, N. S., HOLT, W. W., REVELL, S. G., JONES, S., WATSON, P. F. 2006. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*. 27, 257–262.
- PRELL, M. J., MCCUE, P. M., MOFFETT, P. D., GRAHAM, J. K. 2020. Motility and fertility evaluation of thawed frozen stallion semen after 24 hours of cooled storage. *Journal of Equine Veterinary Science*. 90, 102983.
- PUGLIESI, G., DE CARVALHO, G. R., RATES, D. M., KER, P. G., DA MATTA, M. P., DE OLIVEIRA, R. R., DA SILVA FILHO, J. M. 2012. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk orglycine egg yolk-based extenders. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41, 2411–2417.
- PYCOCK, J. F. 2004. Equine reproduction and stud medicine. 3rd Edition. London: Manson Publishing Ltd. ISBN: 1-874545-44-8
- REČKOVÁ, Z., MACHATKOVÁ, M., RYBÁŘ, R., HORÁKOVÁ, J., HULÍNSKÁ, P., MÁCHAL, L. 2008. Evaluation of chromatin integrity of motile bovine spermatozoa capacitated in vitro. *Zygote*. 16, 195–202.
- REČKOVÁ, Z., MACHATKOVÁ, M., MÁCHAL, L., JEŠETA, M. 2015. Relationship between acrosome integrity changes and in vitro fertilising ability of bovine spermatozoa. *Veterinarni Medicina*. 60, 469–475.
- REČKOVÁ, Z., FILIPČÍK, R., SOUŠKOVÁ, K., KOPEC, T., HOŠEK, M., PEŠAN, V. 2022. The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Animal Bioscience*. 35, 670–676.
- RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., TANGHE, S., CORYN, M., MAES, D., DE KRUIF, A. 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*. 64, 706–719.
- RIVERA-CONCHA, R., MOYA, C., LEÓN, M., URIBE, P., SCHULZ, M., PRADO, A., TAUBERT, A., HERMOSILLA, C., SÁNCHEZ, R., ZAMBRANO, F. 2023. Effect of different sperm populations on neutrophils extracellular traps (NETs) formation in cattle. *Research in Veterinary Science*. 164, 105028.
- ROACH, J., SCHNOBRICH, M., ELLERBROCK, R. E., FEIJO, L., BRADECAMP, E., ALVARENGA, M. A., KLINE, K., CANISSO, I. F. 2016. Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen. *Veterinary Record*. 178, 241.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1998. Optimization of sperm quality in AI bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. 33, 233–237.

- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction of Domestic Animals*. 38, 312–318.
- SAMARDZIJA, M., KARADJOLE, M., MATKOVIC, M., CERGOLJ, M., GETZ, I., DOBRANIC, T., TOMASKOVIC, A., PETRIC, J., SURINA, J., GRIZELJ, J., KARADJOLE, T. 2006. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*. 91, 237–247.
- SAMPER J. C. 2009. *Equine breeding management and artificial insemination*. Elsevier Health Sciences. ISBN 978-1-4160-5234-0
- SARDOY, M. C., CARRETERO, M. I., NEILD, D. M. 2008. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *Animal Reproduction Science*, 107, 349–350.
- SEGABINAZZI, L., CARMO, M.T., DE P. FREITAS-DELL'AQUA, C., ALVARENGA, M. A., PAPA, F. O., CANISSO, I. F. 2024. Post-cooling semen processing and sperm re-suspension as an alternative method to circumvent poor semen cooling in stallions. *Equine Veterinary Journal*. 56, 697–710.
- SERAFINI, R., LONGOBARDI, V., SPADETTA, M., NERI, D., ARIOTA, B., GASPARRINI, B., DI PALO, R. 2014. Trypan blue/giemsa staining to assess sperm membrane integrity in salernitano stallions and its relationship to pregnancy rates. *Reproduction of Domestic Animals*. 49, 41–47.
- SHAFIK, A., SHAFIK, A. A., SHAFIK I., EL SIBAI, O. 2006. Sperm DNA fragmentation. *Archives of Andrology*. 52, 197–208.
- SIEME, H., KATILA, T., KLUG, E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*. 61, 769–784.
- SILVA, P. F. N., GADELLA, B. M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65, 958–978.
- DA SILVA, C. M. B., MACÍAS-GARCÍA, B., MIRÓ-MORÁN, A., GONZÁLEZFERNÁNDEZ, L., MORILLO-RODRIGUEZ, A., ORTEGA-FERRUSOLA, C., GALLARDO-BOLAÑOS, J. M., STILWELL, G., TAPIA, J. A., PEÑA, F. J. 2011. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of Pineal Research*. 51, 172–179.
- SOUŠKOVÁ, K., FILIPČÍK, R., REČKOVÁ, Z. 2021. Evaluation of stallion sperm concentration by two different methods and its influence on sperm motility assessment. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*. 24, 293–296.
- SPIROPOULOS, J. 2001. Computerized semen analysis (CASA): Effect of semen concentration and chambre depth on measurements. *Archives of Andrology*. 46, 37–42.
- STROBER, W. 2015. Trypan Blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols of Immunology*. spl. 111, A3.B.1–A3.B.3.
- TARTAGLIONE, C. M., RITTA, M. N. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 62, 1245–1252.
- VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57, 149–179.
- VĚŽNÍK, Z. *et al.* 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně.
- VĚŽNÍK, Z., ŠVECOVÁ, D., ZAJÍCOVÁ, A., REČKOVÁ, Z., RUBEŠ, J. 2007. The interrelationship between quality parameters of sperm before and after separation by gradient centrifugation. *Veterinarni Medicina*. 52, 423–429.

- VIDAMENT, M., MAGISTRINI, M., LE FOLL, Y., LEVILLAIN, N., YVON, J. M., DUCHAMP, G., BLESBOIS, E. 2012. Temperatures from 4 to 15 °C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. *Theriogenology*. 78, 297–307.
- VOKROUHLÍKOVÁ, J., ČOUDKOVÁ, V., ŠICHTÁŘ, J., VRBOVÁ, A., BÚDOVÁ, 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, 269–279.
- WARD, W. S., COFFEY, D. S. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*. 44, 569–574.
- WATERHOUSE, K. E., HAUGAN, T., KOMMISRUUD, E., TVERDAL, A., FLATBERG, G., FARSTAD, W., EVENSON, D. P., DE ANGELIS, P. M. 2006. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reproduction Fertility and Development*. 18, 781–788.
- 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, 229–232.
- WIEBKE, M., HENSEL, B., NITSCHKE-MELKUS, E., JUNG, M., SCHULZE, M. 2022. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*. 246, 106822.
- YÁANEZ-ORTIZ, I., CATALÁN, J., RODRÍGUEZ-GIL, J. E., MIRÓ, J., YESTE, M. 2022. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*. 246, 106904.
- ZINI, A., LIBMAN, J. 2006. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Canadian Medical Association Journal*. 175, 495–500.

SEZNAM TABULEK

Tab. 1:	Vliv reprodukční sezóny na průměrný objem ejakulátu	31
Tab. 2:	Vliv měsíce odběru na průměrný objem ejakulátu	31
Tab. 3:	Vliv věku hřebce na průměrný objem ejakulátu	32
Tab. 4:	Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrný objem ejakulátu	32
Tab. 5:	Vliv sezóny na průměrný objem ejakulátu individuálních hřebců	33
Tab. 6:	Vliv reprodukční sezóny na průměrnou koncentraci spermií	34
Tab. 7:	Vliv měsíce odběru na průměrnou koncentraci spermií	34
Tab. 8:	Vliv věku hřebce na průměrnou koncentraci spermií	35
Tab. 9:	Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrnou koncentraci spermií	35
Tab. 10:	Vliv sezóny na průměrnou koncentraci spermií v ejakulátu individuálních hřebců	36
Tab. 11:	Vliv reprodukční sezóny na celkový počet spermií v ejakulátu	37
Tab. 12:	Vliv měsíce odběru na celkový počet spermií v ejakulátu	37
Tab. 13:	Vliv věku hřebce na celkový počet spermií v ejakulátu	38
Tab. 14:	Vliv plemenné příslušnosti hřebce celkový počet spermií v ejakulátu	38
Tab. 15:	Vliv sezóny na celkový počet spermií v ejakulátu individuálních hřebců	39
Tab. 16:	Vliv reprodukční sezóny na průměrný podíl normospermií	40
Tab. 17:	Vliv měsíce odběru na průměrný podíl normospermií	40
Tab. 18:	Vliv věku hřebce na průměrný podíl normospermií	41
Tab. 19:	Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrný podíl normospermií	41
Tab. 20:	Vliv sezóny na průměrný podíl normospermií v ejakulátu individuálních hřebců	42
Tab. 21:	Vliv reprodukční sezóny na průměrný podíl motilních spermií	43
Tab. 22:	Vliv měsíce odběru na na průměrný podíl motilních spermií	43
Tab. 23:	Vliv věku hřebce na průměrný podíl motilních spermií	44
Tab. 24:	Vliv plemenné příslušnosti hřebce na průměrný podíl motilních spermií	44
Tab. 25:	Vliv sezóny na průměrný podíl motilních spermií v ejakulátu individuálních hřebců	45
Tab. 26:	Korelační koeficienty mezi sledovanými parametry nativního ejakulátu	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Endogenní a exogenní faktory ovlivňující motilitu spermií.....	14
Obr. 2:	Strukturální a molekulární změny u savčích spermií po kryokonzervaci.....	23
Obr. 3:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	47
Obr. 4:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	48
Obr. 5:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	49
Obr. 6:	Vliv ředidla na variabilitu průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek	50
Obr. 7:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	51
Obr. 8:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	52
Obr. 9:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	53
Obr. 10:	Vliv ředidla na variabilitu průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek	54
Obr. 11:	Vliv ředidla na průměrný podíl normospermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek	54
Obr. 12:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	55
Obr. 13:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	56
Obr. 14:	Vliv ředidla na průměrný podíl motilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	57
Obr. 15:	Vliv ředidla na variabilitu průměrného podílu motilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek	57
Obr. 16:	Vliv ředidla na průměrný podíl viabilních spermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	58
Obr. 17:	Vliv ředidla na průměrný podíl viabilních spermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	59
Obr. 18:	Vliv ředidla na průměrný podíl viabilních spermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek.....	59
Obr. 19:	Vliv ředidla na průměrný podíl normospermií po 24 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek	60
Obr. 20:	Vliv ředidla na průměrný podíl normospermií po 48 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek	61
Obr. 21:	Vliv ředidla na průměrný podíl normospermií po 72 hodinách skladování chlazených inseminačních dávek	61

SEZNAM ZKRATEK

ATP:	adenosintrifosfát
BSG:	ředidlo BotuSemen Gold
CASA:	computer analysis sperm assay
DNA:	deoxyribonukleová kyselina
EPA:	ředidlo Equi PRO ApX ²
EP:	ředidlo Equi PLUS
GPX:	glutathione peroxidase
GSR:	glutathione reductase
HOS:	hypo-osmotic swelling test
HSP-1:	protein 1 hřebčí semenné plazmy
ID:	inseminační dávka
INRA:	ředidlo INRA 96
OXPHOS:	oxidativní fosforylace
PI:	propidium jodid
PNA-FITC	Peanut Agglutinin–Fluorescein Isothiocyanate; fluorescenční metoda pro hodnocení integrity akrozomu spermií
PSA-FITC	Pisum sativum Agglutinin–Fluorescein Isothiocyanate; fluorescenční metoda pro hodnocení integrity akrozomu spermií
ROS:	reaktivní formy kyslíku
SASMO:	striktní analýza morfologického obrazu
SCA:	sperm computer analysis
SCSA:	sperm chromatin structure assay
ZH:	ředidlo dle receptury Reprodukčního centra Zemského hřebčince v Tlumačově

ANALÝZA VYBRANÝCH PARAMETRŮ HŘEBČÍHO EJAKULÁTU S OHLEDEM NA JEHO VYUŽITÍ V CHLAZENÝCH INSEMINAČNÍCH DÁVKÁCH

Autor: Zuzana Rečková

Vydání: první, 2026

Vydala: Mendlova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN 978-80-7701-109-9 (tisk)

ISBN 978-80-7701-110-5 (online ; pdf)

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-110-5>

