

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ**  
**AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**BRNO 2015**

**LUCIE SVAČINOVÁ**

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav výživy zvířat a pícninářství**

---



**Vliv antioxidantů (selen, vitamín C a E) na  
spermatogenezi kanců**

Diplomová práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. Pavel Horký, Ph.D.

*Vypracoval:*  
Lucie Svačinová



## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv antioxidantů (selen, vitamin C a vitamin E) vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 25. dubna 2015

.....  
podpis

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Pavlovi Horkému, Ph.D. za laskavý přístup, ochotu a své rodině za pomoc, podporu a trpělivost.

## Abstrakt

**SVAČINOVÁ, L.:** Vliv antioxidantů (selen, vitamínu C a vitamínu E) na spermatogenezi kanců. Diplomová práce, MENDELU v Brně, 2015, 52 s

Cílem diplomové práce bylo prověřit vliv antioxidantů, vitamínu C, vitamínu E a selenu na spermatogenezi plemenných kanců. Kvalita ejakulátu byla hodnocena pomocí kvalitativních a kvantitativních hodnot (objem ejakulátu, motilita, koncentrace spermatu a počet abnormálních spermií). Experiment byl proveden na inseminační stanici kanců (ISK) ve Velkém Meziříčí. Do pokusu bylo zařazeno 12 kanců plemene *Duroc*. Kanci byli rozděleni do dvou skupin. U první experimentální skupiny kanců (n=6) bylo do krmné dávky přidáváno 350 mg vitamínu C (kyselina askorbová); 70 mg vitamínu E (alfatokoferol) a 0,5 mg selenu (selenomethionin) na kilogram diety. Druhá skupina zvířat (n=6) sloužila jako kontrolní a množství vitamínu C, vitamínu E a selenu jí nebylo navýšeno. Pokus probíhal 90 dní (červen – srpen).

U kontrolní skupiny se objem ejakulátu do 60. dne pokusu zvyšoval, ale v poslední etapě výrazně klesl, celkově o 19%. U pokusné skupiny měl stále vzrůstající tendenci a celkově se zvýšil o 32%. Motilita spermií se u kontrolní skupiny snížila z původních 69 % na 54% a u pokusné skupiny se naopak zvýšila o cca 1%. U sledování koncentrace spermií se u kontrolní skupiny koncentrace zvýšila o 6% a u pokusné snížila o 24 %. Počet abnormálních spermií se u kontrolní skupiny zvýšil o cca 1%, v experimentální skupině se počet patologických spermií zvýšil o 30%.

Na základě našich výsledků, lze konstatovat, že selen, vitamín E a C nemají zcela prokazatelný účinek na kvalitu ejakulátu kanců. Musíme ovšem brát v úvahu letní období, ve kterém experiment probíhal. V tomto časovém intervalu na zvířata působily vyšší teploty, které se mohly negativně podepsat na celkovém výsledku.

**Klíčová slova:** Selen, Vitamín C, Vitamín E, spermatogeneze, kvalita ejakulátu, kanec

## **ABSTRACT**

Svačinová, Lucie: The influence of antioxidants (selenium, vitamin C and vitamin E) on the spermgogenesis of boars. Dissertation, MENDELU in Brno, 2015, 52 s

The purpose of this dissertation is the verification of antioxidants, the vitamin C, the vitamin E and selen influence on the spermgogenesis of breeding boars. The ejaculate quality was evaluated with the use of qualitative and quantitative figures (the ejaculate volume, the motility, the sperm concentration and the number of abnormal sperms). The experiment was done at the boars' insemination station (ISK) in Velké Meziříčí. In the experimet, there were 12 boars of DUROC race involved. The boars were split into two groups. By the first boars experimental group (n=6) there were added into the feeding batch 350 mg of the vitamín C (ascorbe acid); 70 mg of the vitamín E (alfatocoferol) and 0,5 mg of selen (selenomethionin) per one kilogram of this special diet. The second group of boars was used as the checking group and the volume of the vitamin C, the vitamin E and the selen was not increased in their diet. The experiment was running for 90 days (June – August).

At the checking group the volume of their ejaculate was increasing untill the 60<sup>th</sup> day of the experiment, in the final stage it has significantly dropped, totally by -19%. By the experimental group, the volume of the ejaculate was constantly increasing trend and the total volume increase during the experiment duration was +32%. The sperm motility at the checking group has decreased from the original 69% down to 54%, while at the experimental group it has increased by approximatelly 1%. The sperm concentration check – by the checking group it has increased by +6% and by the experimental group the sperm concentration has decreased by -24%. The number of abnormal sperms at the checking group has increased by +1% and by the experimental group the number of pathologic sperms has increased by +30%.

Based on our results it is possible to say, that selen, the vitamin C and vitamin E do not have a provable effect on the boars ejaculate quality. But we must také into the consideration also the summer season, during which the experiment was provided. There were higher temperatures affecting the animals, which could have negative influence on the results.

**The key words:** Selenium, Vitamín C, Vitamín E, spermgogenesis, ejaculate quality, boar

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Stavy kanců v ČR</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Anatomie reprodukční soustavy kance</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Varle (<i>testis</i>)</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Nadvarle (<i>epididymis</i>)</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Chámovod (<i>ductus deferens</i>)</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Šourek (<i>scrotum</i>)</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Přídavné pohlavní žlázy (<i>glandulae genitales accessoriae</i>)</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Pyj (<i>penis</i>)</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Spermatogeneze</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Spermatocytogeneze</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Spermiogeneze</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Základní charakteristika ejakulátu</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Odběr ejakulátu</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6</b>	<b>Hodnocení ejakulátu</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Koncentrace spermií</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Motilita</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Počet abnormálních spermií</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Objem ejakulátu</b> .....	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Vlivy působící na kvalitu ejakulátu</b> .....	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Volné radikály</b> .....	<b>25</b>
<b>2.9</b>	<b>Antioxidanty</b> .....	<b>26</b>



2.9.1	Enzymové antioxidační systémy .....	27
2.9.1.1	<i>Superoxiddizmutáza (SOD)</i> .....	27
2.9.1.2	<i>Glutathionperoxidáza</i> .....	27
2.9.1.3	<i>Glutathiontransferázy</i> .....	28
2.9.1.4	<i>Kataláza</i> .....	28
2.9.2	Vysokomolekulární endogenní antioxidyanty .....	28
2.9.3	Nízkomolekulární endogenní antioxidyanty .....	29
2.9.3.1	<i>Koenzym Q</i> .....	29
2.9.3.2	<i>Karotenoidy</i> .....	29
2.9.3.3	<i>Vitamín A</i> .....	29
2.9.3.4	<i>Vitamín C (askorbát)</i> .....	30
2.9.3.5	<i>Vitamín E (tokoferoly)</i> .....	31
2.9.4	Selen .....	32
3	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	33
4	<b>MATERIÁL A METODIKA</b> .....	34
4.1	<b>Principy stanovení laboratorních hodnot ejakulátu</b> .....	37
4.1.1	Stanovení objemu ejakulátu .....	37
4.1.2	Stanovení koncentrace spermií v ejakulátu.....	37
4.1.3	Stanovení procenta patologických spermií v ejakulátu.....	38
4.1.4	Stanovení motility .....	39
5	<b>VÝSLEDKY</b> .....	40
6	<b>DISKUZE</b> .....	44
7	<b>ZÁVĚR</b> .....	46
	<b>LITERATURA</b> .....	47
	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	52

## 1 ÚVOD

Prase domácí bylo domestikováno před 4. tisíci př. n. l. v Egyptě. Rozvojem zemědělství v Evropě se začalo v 15. století chovat i u nás v bukových a dubových lesích. V rámci trojhonného hospodaření se u nás chovaly v 17. - 18. století primitivní klapouchá a ostrouchá prasata. Od roku 1848 do poloviny 19. století se v ČR chovalo prase klapouché českomoravské a prase přímouché. Českomoravské klapouché prase spadalo do původních neušlechtilých klapouchých domácích prasat evropských. Mělo velký tělesný rámec, dlouhou úzkou klínovou hlavu, dlouhý tenký krk, kapří hřbet a dlouhé silné končetiny. Přímouché prase bylo menší, jemnější a tvořilo přechod ke klapoucím západoevropským prasatům. Lépe se vykrmovalo a mělo výbornou plodnost. Střídavé zemědělství, kde mizí úhorové pastviny a nastupují okopaniny a pícniny, vedlo k celoročnímu ustájení prasat ve stáji. Ustájení zvířat vedlo ke změně krmných dávkám, ovšem ty neodpovídali nutričním potřebám zvířete. Až po založení Vyšší zemědělské školy v Lánech byly zavedeny J. Štumpfou z Dessavy pokrokové metody hospodaření. Z Polska k nám byly přiháněna stáda běhounů mangalica o hmotnosti 40-60 kg a ti byli vykrmováni do hmotnosti 350 kg a více. V roce 1900 v důsledku závlaku nálezů a moru, byl jejich příhon skončen.

Od 2. poloviny 19. století do 1. světové války dochází k zvelebení chovu prasat importy ze zahraničí a vznikem mnohých krajových rásů, začíná se uplatňovat řízená plemnitba v chovu prasat. Do Severních Čech se dovážela plemena anglická, yorkshirská a essexká, do Západních Čech zejména prase míšeňské, které pocházelo z Německa. Do dalších oblastí byla importována střední a velká plemena yorkshire a berkshire. Na přelomu 19. století Zemědělská rada přebrala řízení chovu a vzniká rychnovské prase a přeštické prase. Od roku 1898 se v plemnitbě zařazují kanci velkého bílého anglického prasete. Během první světové války dochází k vlivem neexistence dostatečné plemenné evidence a plemenného materiálu k devastaci chovů. V meziválečném období dochází ke stanovení přesného směru a cílu zvelebovacího plánu České zemědělské rady a zakládají se moderní plemenné knihy. Vzniká bílé ušlechtilé prase. V období okupace vychází protektorátní vládní nařízení o plemnitbě hospodářských zvířat, jako základ k provádění plemenářské práce a povinné kontrole užitkovosti a dědičnosti prasat. Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu rozvoji chovu prasat dochází až v poválečném období. Uplatňuje se jednoduché užitkové křížení se

snahou zjemnit kostru bílého ušlechtilého prasete. V letech 1952 – 1955 byla pro regeneraci přeštického prasete dovezena plemena z Ruska, maďarské plemeno berkshire a Mangalica a z Německa německé sádlové, Berkshire a Large Black. Postupně času dochází rozvoji krmivářského průmyslu, technologických linek, používají se složitější metody užitkových křížení a uplatňují se technologické selekce. Vlivem požadavku populace na racionální výživu dochází v roce 1971-1973 k postupné přestavbě masosádelného typu BU prasete na typ s výraznou masovou užitkovostí, rozšiřují se plemenné struktury prasat v ČR zahraničními importy (D, H, z USA a Belgie BL) a její rozdělení na populace mateřské a otcovské, je zavedeno zpeněžování prasat napevno v mase a je vybudována pyramidní struktura chovů, kde se chovy rozdělily na šlechtitelské, rozmnožovací a užitkové.

Od roku 1989 prochází zemědělství složitým procesem transformace a privatizace, které probíhají prakticky dodnes. V rámci EV dochází k volnému pohybu zvířat a lidí což zapříčinilo zhoršení imunity stád prasat a objevily se nové nemoci. Je kladen důraz na welfare a ekologizaci výroby v souladu se směnicemi EU a rovněž i požadavku ze strany potravinových řetězců. Dochází k rapidnímu snižování počtu chovů prasat.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Stavy kanců v ČR

Chov prasat je nedílnou součástí chovu hospodářských zvířat. Vepřové maso si získalo oblibu v tradiční české kuchyni a u nás patří mezi nejkonzumovanější maso. Oproti jiným zvířatům se prase řadí mezi zvířata s vysokou plodností, krátkou dobou výkrmu a rychlou intenzitou růstu.

Mezi největší chovatelé prasat patří v současné době Čína, která chová přes 50% celosvětových stavů, USA se podílí na celosvětových stavech asi 10% a Evropa 20%. Německo, Španělsko, Polsko, Rusko a Francie patří mezi největší evropské chovatelé. Česká republika díky svým nedostatkům, jako je špatná hygiena v chovech, neplnohodnotně využitý genetický potenciál apod., patří mezi malochovatelé.

V současné době bylo v roce 2013 celkem v České republice chováno 1 547 685 ks prasat. Nejvíce kusů je evidováno ve Středočeském kraji, 310 017 ks. Nejméně v karlovarském kraji, 1 534 ks. Prasat na výkrm je za rok 2013 evidováno 596 312 ks, z toho 312 045 ks je v rozmezí 50-80 kg živé hmotnosti, 230 526 ks 80 – 110 kg živé hmotnosti a 53 741 ks o hmotnosti více jak 110 kg. Prasata chovná (50 a více kg živé hmotnosti) 153 588 ks, z toho kanci 2 283 ks. Nejvíce chovných kanců bylo evidováno ve Středočeským kraji a to 402 ks, v Jihočeském kraji 228 ks, v Plzeňském 130 ks, v Karlovarském 7 ks, v Ústeckém 90 ks, v Libereckém 23 ks. Na Moravě bylo registrováno celkem 411 972 ks, z toho Jihomoravský kraj 166 669 ks, Olomoucký 88 196 ks, Zlínský 104 260 ks a Moravskoslezský 52 847 ks. Chovné prasnice 102 402 ks (zapuštěné 72 072, nezapuštěné 30 330), prasničky 48 903 ks (zapuštěné 23 251, nezapuštěné 25 652 ks) – (Anonym, 2014).

## 2.2 Anatomie reprodukční soustavy kance

Schopnost rozmnožovat se, je jednou ze základních funkcí všech forem živé hmoty, které vede k zachování druhu. Proces rozmnožování probíhá dvojím způsobem. Organismy s nižším stupněm vývoje se rozmnožují nepohlavně – vegetativně. Mnohobuněční živočichové se rozmnožují pohlavně, mají pro tento způsob rozmnožování specializované pohlavní orgány, samčí a samičí. Samičí pohlavní orgány rozdělujeme na vnitřní, tj. vaječník, vejcovod, děloha, pochva. Mezi hlavní pohlaví ústrojí patří poševní předsíň, vulva a poštváček. Mezi samčí pohlavní orgány patří varlata, nadvarlata, chámovody, přídatné pohlavní žlázy a pyj (Jelínek a kol., 2003).

### 2.2.1 Varle (*testis*)

Varle je párový orgány uložený spolu s nadvarlaty a semenným provazcem v kožním vaku, v šourku. Hlavní funkcí varlat je tvorba spermií a produkce pohlavního hormonu testosteronu. Tvar varlat je vejčitý a po stranách zploštělý, hmotnost u kance 700 – 1 200g (Marvan a kol., 2007).

Povrch varlete je krytý serózní blankou představující útrobní list poševního obalu a pod nímž se nachází bělavý obal. Bělavý obal tvoří pouzdro křehkého parenchymu a tvoří ho vrstva kolagenního vaziva s bohatě rozvětvenými cévami. Z bělavého obalu vycházejí do nitra parenchymu vazivové přepážky, které rozdělují parenchym na menší úseky, lalůčky. Parenchym lalůček je složen z 2-4 stočených semenotvorných kanálků a v nich se tvoří spermie.

Kromě různých vývojových stádií spermií se nachází ve varleti další dva typy buněk, Sertoliho buňky a Leydigovy buňky. Leydigovy buňky jsou bohaté na granulární endoplazmatické retikulum, ve kterých je produkován testosteron, samčí pohlavní hormon. Sertoliho buňky jsou takzvané buňky podpůrné, poskytují ochranu a výživu vyvíjejícím se spermiím. Tyto podpůrné buňky rozdělují semenotvorné kanálky na dvě části a to na vnější bazální část a vnitřní část. Vnější bazální část poskytuje prostor pro zárodečné epitelové buňky, ve vnitřní části jsou prostory mezi Sertoliho buňkami, které komunikují s lumen kanálku. Sekret tvořen těmito buňkami zajišťuje výživu vyvíjejícím se spermiím. Kančí varlata produkují C-16 nenasycené masné androgeny. Jsou vylučovány slinami a působí jako feromony, které u prasnic vyvolávají reflex

nehybnosti při páření. C-16 nenasycené masné androgeny vytvářejí charakteristický pach moči a také způsobují nežádoucí pachut' kančího masa (Reece, 2011).

Při vrcholu se všechny stočené semenotvorné kanálky spojují a tvoří přímý kanálek, kterým začínají odvodné cesty varlete, na který se napojuje vývod varlete a ten přechází v chámovod (Marvan a kol., 2007).

### **2.2.2 Nadvarle (*epididymis*)**

Nadvarle je kyjovitý orgán, jehož funkce spočívá ve shromažďování a dozrávání spermií. Je tvořeno odvodnými kanálky z varlete, které ústí do jeho vývodu. Nadvarle je uloženo podél varlete a rozlišujeme u něj 3 části: hlavu, tělo a ocas. Hlava nadvarlete je složena z 15 – 20 lalůčků, které jsou složeny z klíček odvodných kanálků varlete. Na hlavu plynule navazuje tělo varlete a na rozšířeném konci přechází ocas. Podstatou těla a ocasu je vývod nadvarlete (Marvan a kol., 2007). Délka rozvinutého nadvarletního vývodu je u kance 50m (Jelínek a kol., 2003).

### **2.2.3 Chámovod (*ductus deferens*)**

Chámovod je párová silnostěnná trubice, která spojuje vývod nadvarlete s močovou trubicí. Spolu s varletní tepnou, žílou, nervy, mízními cévami a vnitřním zdvihačem varlete, je obalen serózou. Tvoří tak semenný provazec. Semenný provazec vznikl vychlípáním pobřišnice při sestupu varlat do šourku. Vyústí uje na semenném hrbolku do močové trubice. Chámovod je zakončen ampulí chámovodu, což je jeho rozšířený žláznatý úsek. U kance ovšem chybí (Reece, 2011).

### **2.2.4 Šourek (*scrotum*)**

Šourek je kožní vak, jsou v něm uloženy varlata. Pod kůží je hladká svalovina, Při poklesu teploty tato svalovina kontrahuje a přidrží varlata blíž ke stěně břicha. Šourek je vystlán povázkou, k níž zevnitř narůstá nástěnný list poševního obalu. Mezi oběma obaly zůstává úzká poševní dutina. Místo, kde pobřišnice přechází z břišní dutiny do šourku, jako útrobní list, se nazývá poševní prstenec. U kanců a u hřebců se často setkáváme s kryptorchidními varlaty. To jsou taková varlata, která nesestoupí do šourku, buď uvíznou v tříselném kanálu, nebo jedno či obě zůstávají v dutině břišní. Hřebci se pak nazývají jirčáci a kanci špičáci (Reece, 2011).

### 2.2.5 Přídavné pohlavní žlázy (*glandulae genitales accessoriae*)

Přídavné žlázy produkují sekrety, které tvoří jednak přirozené ředidlo spermií, jednak obsahují látky k výživě spermií, upravují prostředí během jejich průchodu močovou trubicí v pohlavním ústrojí samice. Tento sekret se označuje jako semenná plazma.

K pohlavním žlázám patří měchýřkovitá žláza, předstojná žláza a bulbouretrální žláza. Měchýřkovitá žláza je párový orgán dlouhý u kance 10-15 cm ležící na dorzolaterální ploše močového měchýře. Mají u hřebce a kance lalůčkovitou strukturu a nepravidelný tvar. Měchýřkovité žlázy chybí u psa. Sekret těchto žláz je vylučován ke konci ejakulace a tvoří 10 – 40% objemu ejakulátu. Jeho pH je kolem 6,08 a mezi hlavní složky tohoto sekretu patří fruktóza, flaviny, kyselina askorbová a citrónová. Cukry jsou energetickými zdroji pro spermie.

Předstojná žláza, prostata, je nepárová a leží na začátku močové trubice. Je složena ze dvou částí, z těla a roztroušené část. Sekret této žlázy je vylučován při ejakulaci těsně před spermii a současně s nimi. Sekret neobsahuje cukry, ale volné aminokyseliny a anorganické soli, které udržují osmotický tlak v ejakulátu.

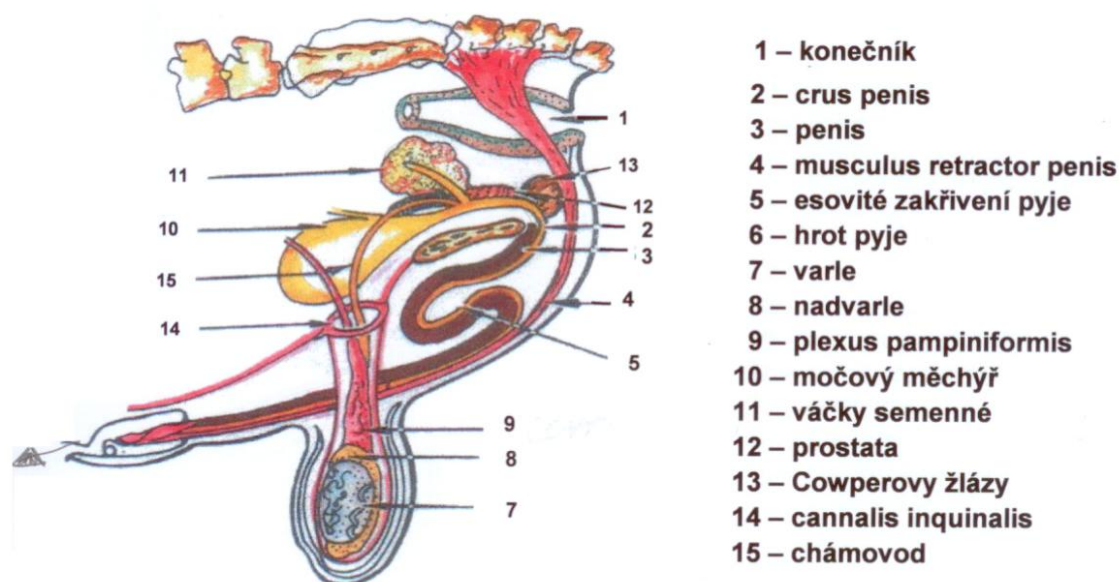
Bulbouretrální žláza, Cowperova, je párová a leží v místě přechodu močové trubice přes sedací oblouk a přikládá se ze stran k pánevnímu úseku močové trubice. U dospělého kance jsou 180 mm dlouhé a 50 mm široké. Jejich sekret je vylučován na konci ejakulace a u kance tvoří tzv. vaginální zátku v děložním krčku, která má zabránit výtoku semene ven z dělohy (Marvan a kol. 2007, Jelínek a kol., 2003).

Na nepatrném podílu objemu ejakulátu se podílejí i Litterovy žlázy, které se nacházejí ve stěně močové roury. Obsahují anorganické soli a jejich funkce spočívá v úpravě pH uretery. Sekret je vylučován jako předspermiová frakce ejakulátu.

### 2.2.6 Pyj (*penis*)

Pyj je nepárový kopulační orgán sloužící k dopravě semene do pohlavního ústrojí samice a současně i odvodnou cestou moči mimo tělo. Je válcovitého tvaru. Pyj je složený z fixované části – kořene a z volné části – těla pyje. Tělo pyje je zakončeno žaludem, který se vývrtkovitě zatáčí doleva a je v ochablém stavu ukryto v kožní duplikatuře, v předkožce. Na dorzální stěně předkožky kance je předkožková výduť,

kteřá obsahuje rozkládající se moč a odloučené epitele. Tekutina v předkožce obsahuje také feromony, které stimulují prasnici k reflexu nehybnosti (Reece, 2011). U konce je pyj poměrně tenký a v klidovém stavu vytváří esovitě ohbí, které se nachází kraniálně od báze šourku. Délka pyje je u kance 50-60 cm a průměru 1-1,5 cm. Podklad pyje tvoří párové topořivé těleso, nepárové houbovitě těleso, močová trubice, pomocné svaly cévy a nervy. Do dutinek topořivého tělesa přivádí krev spirálovité tepny. Pomocné svaly jsou dva a to napřimovač pyje a zatahovač pyje. Napřimovač pyje obklopuje kořen pyje a svým smrštěním uvádí ztopořený pyj do polohy vhodné ke kopulaci (Marvan a kol. 2007, Jelínek a kol., 2003).



**Obr. 1:** Pohlavní soustava kance (Anonym 2015)



## 2.3 Spermatogeneze

Spermatogeneze je složitý proces, při němž se tvoří a vznikají samčí pohlavní buňky – spermie. U kance začíná v období pohlavního dospívání, v 5. – 7. měsíci. Odehrává se v semenotvorných kanálcích ve varlatech a výchozím bodem pro spermatogenezi je množení prvopohlavních buněk (gonocytů) v embryonálním základu gonád. V tomto počátečním období má spermatogeneze ještě pravidelný cyklický charakter a výsledkem je vyšší obsah nezralých forem spermií. Po dosažení pohlavní dospělosti a stabilizaci neuroendokrinní regulace pohlavních funkcí sobího spermatogeneze v pravidelných cyklech v průběhu celého roku. Tyto cykly za sebou následují v přesných časových intervalech a každý cyklus začíná asi o  $\frac{1}{4}$  délky cyklu později než přecházející. Spermatogenní cyklus je u každého druhu zvířete rozdílný. U býka trvá spermatogenní cyklus 54 dní, u berana a kozla 50 dní, u hřebce 54 dní a u kance 35 dní. Spermatogenezy dělíme podle převažujícího charakteru změn na spermatocytogenezy a spermiogenezy (Marvan a kol. 2007, Jelínek a kol., 2003).

### 2.3.1 Spermatocytogeneze

V období dospívání probíhá vývoj ve třech fázích: fáze množení, růstu a zrání. V období množení dochází k mitotickému dělení a v období zrání dochází k meióze.

Pro fázi množení je charakteristické několikanásobné dělení spermatogonií. Množení probíhá při bazální membráně semenotvorného kanálku. Společně s množением spermatogonií probíhá i jejich diferenciaci. Každá mateřská A-spermatogonie se rozdělí na dvě dceřiné buňky. Jedna dceřiná buňka je větší, ta zůstává po delší dobu v „latentním stadiu“ a druhá je menší, tzv. intermediální buňka, která se opět dělí a z ní vznikají B-spermatogonie. V závěru rozmnožovací fáze se tyto buňky opět dělí a vznikají primární spermatocyty.

Ve fázi růstu primární spermatocyty nabývají na objemu a zvětšují se. Spermatocyty jsou největšími buňkami v semenotvorných kanálcích a v jejich jádře se již nacházejí pohlavní chromozomy.

Po fázi růstu následuje fáze zrání, pro kterou je charakteristická meióza, které probíhá ve dvou po sobě následujících dělení. Výsledkem meiózy je redukce počtu chromozómů na polovinu, kdy diploidní počet se mění na haploidní počet a dochází

k rekombinaci genetických vloh. Z primárních spermatocytů vzniknou dva sekundární spermatocyty II. řádu a z nich při druhém meiotickém dělení 4 spermatidy, dvě s chromozomem X a dvě s chromozomem Y.

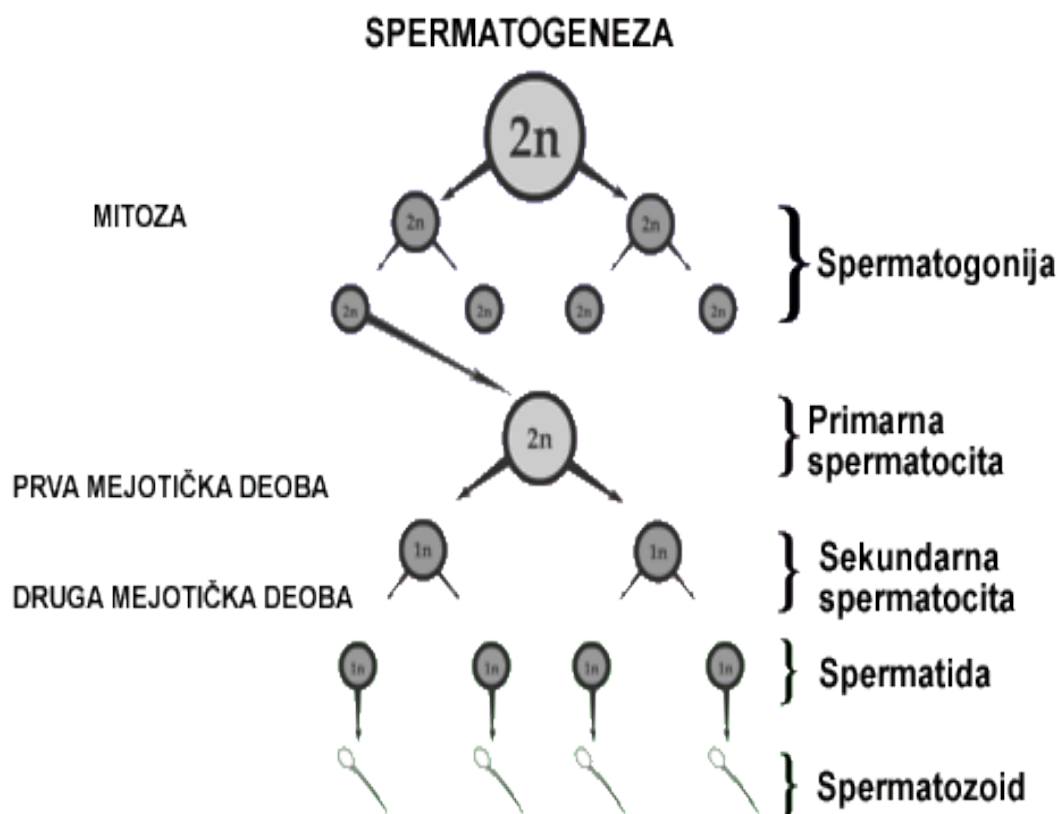
Jednotlivá stádia (rozmnožovací, růstu a zrání) se během spermatogeneze posunují k lumen semenotvorného kanálku, takže na příčném řezu lze zaznamenat několik buněčných generací nad sebou. Tudíž se v semenotvorném kanálku nacházejí čtyři buněčné generace nad sebou. Vznikem 4 okrouhlých a nepohyblivých spermatid končí proces spermatocytogeneze a začíná proces zvaný spermiogeneze (Jelínek a kol., 2003).

### 2.3.2 Spermiogeneze

Spermiogeneze (období metamorfózy) je složitý proces, při němž probíhá přeměna okrouhlé a nepohyblivé spermatidy ve štíhlou a pohyblivou spermii. Tato proměna probíhá ve výběžcích podpůrných buněk. Stadia spermiogeneze můžeme rozdělit na dílčí stadia a to na Golgiho stadium, stadium akrozómové čepičky, stadium kaudální manžety a stadium zrání. Během spermiogeneze dochází k těmto změnám. Nejprve se jádro spermatidy prodlouží, oploští a posune k apikálnímu pólu – formuje se hlavička spermie. Poté se na apikálním pólu jádra vytváří z Golgiho aparátu akrozóm (čepička), která obsahuje velké množství specifických enzymů, které napomáhají k penetraci (proniknutí spermie do vajíčka přes zónu pelikulu a cytoplazmatický obal vajíčka). Pro další stadium metamorfózy je charakteristický přesun obou centriol k zadnímu pólu hlavičky a vzniká krček spermie a osová vlákna bičíku. Spermie se poté uvolňují z výběžků podpůrných buněk a dostávají se do lumenu semenotvorného kanálku a do vývodných cest. Posun nepohyblivých spermií do ocasu nadvarlete trvá zhruba dvanáct dní. V průběhu tohoto posunu získávají spermie schopnost pohybovat se přímo dopředu a oplodňovat. Ocas nadvarlete je pak uložštěm těchto spermií. Spermatogenní výkonnost varlat se liší podle druhu zvířete, například u býka je denně produkováno  $2,5 \cdot 10^9$  spermií, u kance  $15 \cdot 10^9$  spermií za den (Jelínek a kol., 2003).

Spermatogeneze probíhá za účasti působení hormonů, které produkují Leydigovy a Sertoliho buňky. Leydigovy buňky produkují testosteron a jejich produkce je řízená lutropinem (LH). Při spermatogenezi testosteron v semenotvorných kanálcích podporuje meiotické dělení. Mezi další funkce testosteronu patří vznik a udržení libida, sekreční aktivity přídatných pohlavních žláz a rozvoj samčích sekundárních pohlavních znaků,

samčí tvary a chování. Dalším důležitým gonadotropním hormonem je folitropin – FSH, který stimuluje produkci proteinu vázajícího androgeny v Sertoliho buňkách. Tyto buňky produkují také inhibic, který inhibuje sekreci FSH (Reece, 2011).



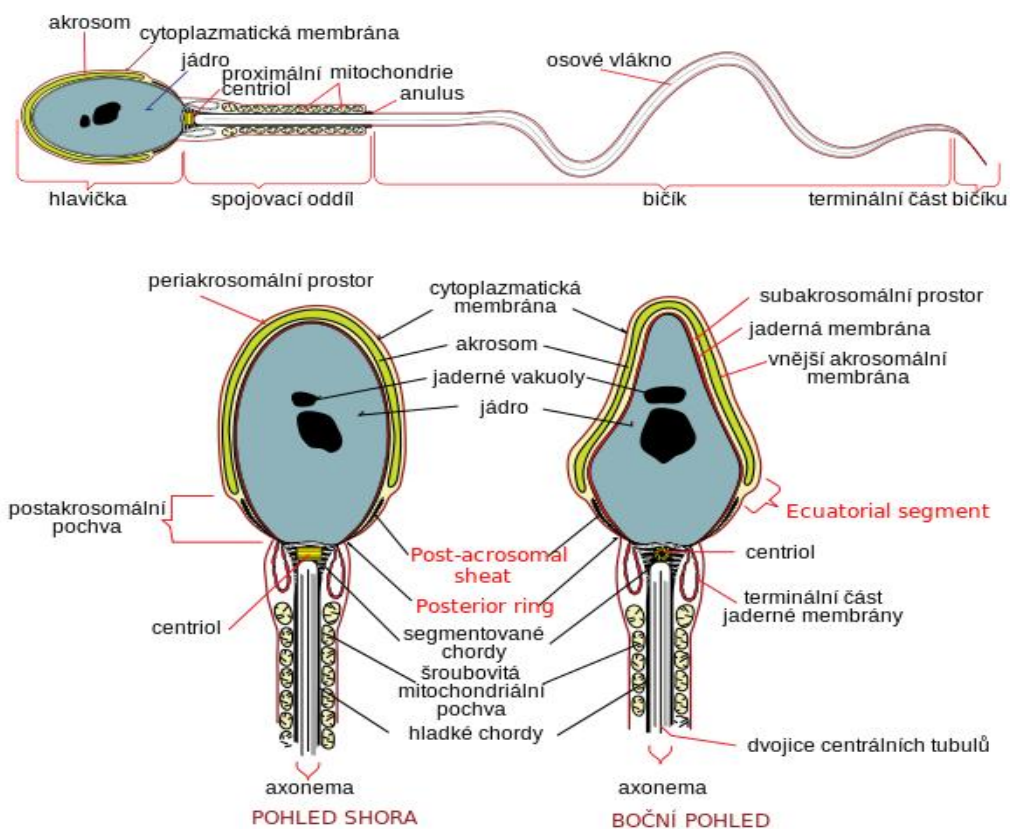
*Obr. 2: Schéma spermatogeneze (Anonym, 2015)*

## 2.4 Základní charakteristika ejakulátu

Ejakulát je šedobílá viskózní tekutina složená z částí tekuté – semenné plazmy a z částí buněčné – spermie.

Semenná plazma představuje u kance 95 - 97% podíl ejakulátu (Jelínek a kol., 2003). Semenná plazma je produktem přídatných pohlavních žláz – nadvarlat, chámovodu, uretrálních žlázek, prostaty, semenných váčků a Cowperových žláz. Hlavní funkcí semenné plazmy je ochrana spermií proti nepříznivým vlivu prostředí, slouží jako zdroj energie pro spermie a podněcuje je k pohybu. Semenná plazma obsahuje velké množství nízkomolekulárních anorganických a vysokomolekulárních složek. Mezi nejdůležitější složku vysokomolekulárních sloučenin patří proteiny, které se při ejakulaci váží na povrch spermií a účastní se jednotlivých kroků fertilizace, tedy kapacitace spermií, rozpoznání a vazby spermie na vajíčko (Marvan a kol. 2007). Další důležitou složkou jsou lipidy, které se nachází zejména v membránách spermií a jsou prekurzory složitých biologických reakcí, důležitých pro kapacitaci spermií.

Spermie je mužská pohlavní buňka, která má za úkol aktivně vyhledat vajíčko, proniknout do něj a přenést genetický materiál samce. Tyto funkce zabezpečuje její anatomická stavba těla. Velikost spermií se dle druhu zvířete liší. Spermie obsahující heterochromozom Y (androspermie) jsou hmotnostně nepatrně lehčí než spermie obsahující heterochromozom X (gynospermie). Tělo spermie je složeno z hlavičky, která nese genetickou informaci a obsahuje akrozom zajišťující penetraci. Akrozom obsahuje hodně enzymů a je složen z mukopolysacharidů. Hlavička je oválného tvaru a je ze stran oploštěná. Mezi další části patří krček, spojující hlavičku a bičík. Krátký krček obsahuje dva za sebou uložené centrioly. Na krček navazuje bičík, u kterého rozlišujeme spojovací oddíl (mitochondriální) a hlavní oddíl. Hlavní oddíl je nejdelší. Podkladem bičíku je osová vlákna obklopená nesegmentovanými chordami (provazci) a obalená fibrózní pochvou. Funkce fibrózní pochvy spočívá v udržení soudržnosti osových vláken a zabezpečit jejich pevnost a pružnost při pohybu bičíku. Koncový oddíl je tvořen pouze osovým vláknem bez chord a fibrózní pochvy. Základní ochranu spermie zajišťuje dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která kryje povrch celé spermie. U živých spermií cytoplazmatická membrána nepropouští některá barviva (eozin, fluorochromy). Na základě tohoto poznatku byla vypracována metoda vitálně letálního barvení, která umožňuje rozpoznat živé a mrtvé spermie.



**Obr. 3:** Spermie (Anonym, 2015)

## 2.5 Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu probíhá v prostředí, které je kanci dobře znán. Neznámé prostředí jako je místnost, odběrový technik, metoda odběru apod., může mít za následek snížení kvality ejakulátu. Vlastnímu odběru předchází přípravné prostředí. Mladý kanec si v tomto období zvyká a učí se nácvik na skok na fantom. V adaptačním období je třeba s kancem klidně zacházet, vyloučit rušivé vjemy, pachy a přítomnost cizích osob. Pro podporu spermatogeneze se doporučuje volný pohyb ve výběhu po dobu půl až jedné hodiny denně. Nutné je dodržovat hygienu kotce.

Vlastní odběr probíhá na fantomu. Spermia je odebírána do odběrových sáčků. Každý odběrový sáček musí obsahovat registrační číslo kance. Odběrový sáček je vložen pro lepší manipulaci do platové krabičky a pomocí gumičky se na něj připevní gáza, která slouží k zachycení nečistot z okolního prostředí a postspermální frakce. Před vlastním odběrem inseminační technik díky buničité vaty ošetří zevní pohlavní orgány a

zároveň provede odstřík předpermiové frakce, ta tvoří 5 – 20% ejakulátu. Předpermiová frakce je bakteriálně znečištěná tekutiny sloužící k vyčištění močové trubice a neměla by kontaminovat ejakulát. Odběr hlavní permiové frakce, která je bohatá na spermie, má smetanové zbarvení a tvoří 30-50% z celkového množství. Postpermiová frakce (sekret Cowperových a semenných váčků) tvoří 40 – 60 % z celkového množství ejakulátu. Při manuálním odběru je nutné brát zřetel na minimální mikrobiální kontaminaci. Celková doba odběru je 7 – 10 minut, průměrný stav kanců v inseminačních stanicích je 3,5 roku a optimální počet odběrů je 4 – 6 za měsíc. Získaný ejakulát je odeslán do laboratoře, kde se hodnotí jeho kvalita a následně se vyrábí inseminační dávky.



**Obr. 4:** Odběr ejakulátu (Anonym, 2015)

## **2.6 Hodnocení ejakulátu**

Kvalitu ejakulátu hodnotíme smyslově a laboratorně. Laboratorní hodnocení ejakulátu zabezpečuje inseminační stanice. Smyslově a laboratorně se i mimo jiné stanovují nežádoucí příměsi v ejakulátu – hnis, krev, moč, barva a pach, konzistence a přímíseniny. Barva by měla být mléčná až šedobílá, sperma bez zápachu a semeno nesmí obsahovat patogenní zárodky, ani masivní nález nepatogenních zárodků.

Laboratorně se hodnotí koncentrace spermií, motilita, počet abnormálních spermií a objem ejakulátu.

### **2.6.1 Koncentrace spermií**

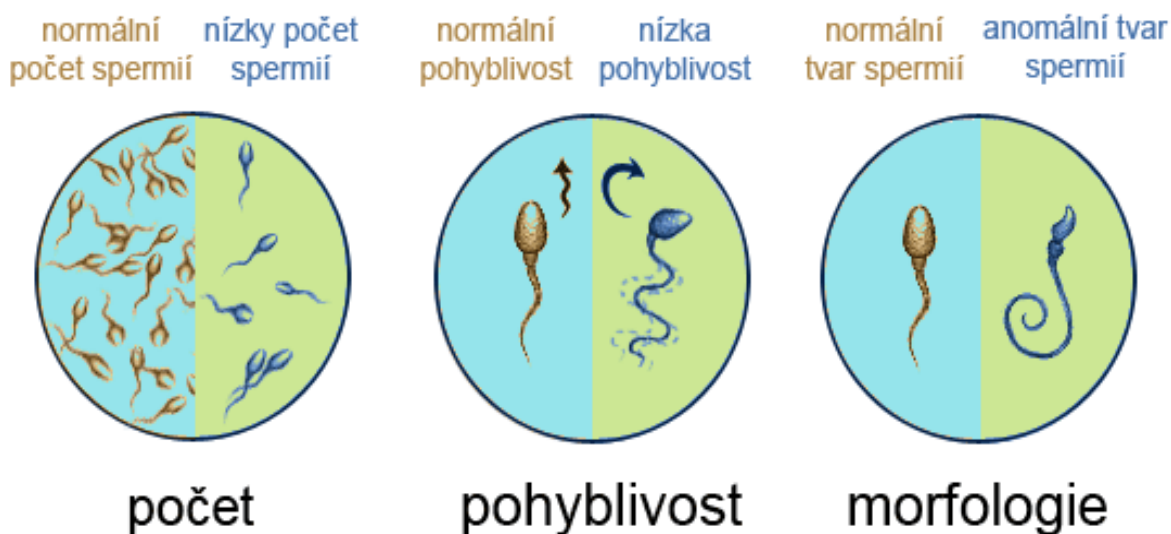
Koncentrace spermií se stanovuje fotometrickou metodou. Touto metodou se hodnotí počet spermií. Přesná koncentrace spermií je důležitá k určení stupně ředění a tím využití ejakulátu. Koncentrace spermií je ovlivněna zejména plemennou příslušností, výživou a klimatickými podmínkami (Adudet a kol., 2009, Lasota a kol., 2004). Pohybuje se v rozmezí od 200 – 300 tisíc spermií na 1 mm<sup>3</sup> (Kozumlík a Kudláč, 1980). Obecně se doporučuje, aby inseminační dávka obsahovala  $3 \times 10^9$  spermií v 80 ml roztoku.

### **2.6.2 Motilita**

Motilita je míra pohyblivosti spermií a je důležitým selekčním kritériem. Hodnotí se do 15 minut po odběru kance, mikroskopicky z šetrně promíchaného spermatu. Hodnotí se subjektivně počet spermií s přímočarým pohybem vpřed za hlavičkou, při tělesné teplotě vzorku a při zvětšení 1:40. Výsledek je udáván v procentech a měl by se pohybovat kolem cca 70%. S narůstajícím věkem kance motilita spermií kolísá (Lasota a kol., 2004).

### **2.6.3 Počet abnormálních spermií**

Počet abnormálních spermií by neměl přesáhnout 20%. Hodnocení se provádí na spermiogramu. Mezi nejběžnější abnormalitu patří výskyt cytoplazmatické kapky. Za abnormální spermie se považují i ty, které mají svlečený nebo defektní akrozóm. Původ této změny je ve varleti a snižuje rezistenci spermií in vitro stárnutí. Celkový podíl cytoplazmatických kapek v ejakulátu pro inseminaci by tedy neměl přesáhnout 15%.



*Obr. 5: Kvalita ejakulátu (Anonym, 2015)*

#### 2.6.4 Objem ejakulátu

Objem ejakulátu se stanovuje vážkovou metodou a výsledek je v mililitrech. U plemenných kanců hodně kolísá (80 – 900 ml), ale měl by se pohybovat od 250 – 300 ml (Kozubík a Kudláč, 1980). Objem spermatu roste s věkem a nejvyšší objem kanec poskytuje při věku nad 40 měsíců (Kumara a kol., 2006).

### 2.7 Vlivy působící na kvalitu ejakulátu

Kvalitu ejakulátu ovlivňuje mnoho endogenních a exogenních vlivů. Z endogenních vlivů je to hlavně genetický potenciál, z exogenních hlavně výživa, organizace odběru spermatu a mikroklima – teplota.

Z hlediska výživy není pro kvalitu ejakulátu důležité množství přijatého krmiva, ale jeho kvalita. Kvalitou krmiva se rozumí obsah živin, vitamínů, minerálů a důležitá je i zdravotní nezávadnost krmiva. Plemení kance se krmí krmnou směsí KA, což je kompletní krmná směs pro kance a to 2,5 – 3 kg/ks/den. Množství řídíme podle kondice kance, která má být chovná a nikoliv žírná. Důležitým hlediskem je i zdravotní nezávadnost krmiva, např. obsah toxických látek produkovaných plísněmi (mykotoxiny). Mykotoxiny jsou tvořeny například polními houbami rodu *Fusarium*.



Patří se Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV), T-2 toxin, HT – 2 toxin, Diacetoxyscirpenol (DAS) a Zeralenon. Nejvíce citlivé jsou prasata na Zeralenon. Ten postihuje zejména kukuřice, pšenici, ječmen a oves. U prasnic způsobuje otoky struků, výhřezy pochvy a tlustého střeva, potraty, předčasné porody a neplodnost. U kanců snižuje kvalitu spermatu a způsobuje edémy pokožky. Nejdou opomenout ani toxiny skladištních hub (Zeman a kol., 1995). Například v minulosti při sledování obsahu mykotoxinu aflatoxinu B<sub>1</sub> – bylo zjištěno v semeni kanců s poruchou plodnosti 1,5 až 2 x vyšší celkovou koncentraci tohoto mykotoxinu než v semeni kanců s neporušenou plodností (Pícha et al. 1986).

Na kvalitu ejakulátu má vliv i organizace odběru. U mladých kanců se provádí odběr 1x za 3 dny, u kanců starších dva dvouskoky týdně. Maximální pauza by neměla překročit dobu 10 dní, protože po delší pauze se kvalita zhoršuje. Pohlaví klid delší než dva a půl měsíce způsobuje degeneraci zárodečného epitelu a tím snížení produkce spermií.

Mezi další negativní vlivy působící na zdraví kance je kvalita ustájení a mikroklima. Prasata mají špatný termoregulační systém. Varlata uložená v šourku, potřebují o pár stupňů nižší teplotu. Pokud je překročena teplotní mez, dochází ke k takzvanému tepelnému stresu a ve v ejakulátu se zvyšuje počet abnormálních spermií a jejich koncentrace. Největšímu tepelnému stresu jsou plemenní kanci vystavováni v letních měsících, kdy kvalita spermatu prudce klesá. Tuto teorii potvrdil SMITAL (2008), kdy hodnotil kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu u 2712 kanců v různých ročních obdobích.

## **2.8 Volné radikály**

Volné radikály jsou látky, které pohoťově reagují s různými biologickými strukturami, jako jsou aminokyseliny a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy lipidy a mastnými kyselinami a s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti, schopní organismus poškodit nebo usmrtit. O volných radikálech hovoříme tehdy,

jestliže atom nebo molekula obsahuje alespoň jeden orbital s jediným elektronem. V každém organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS). (Štípek a kol., 2000)

Reaktivní formy jsou prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signální molekuly buněčné regulace, které za patologických podmínek působí toxicky. Reaktivní formy vznikají při homolytickém štěpení kovalentní vazby, redukcí nebo oxidací. Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu vývoje biologického systému. Mezi reaktivní formy kyslíku patří: superoxid, peroxid vodíku a kyselina chlorná. Mezi reaktivní formy dusíku oxid dusnatý a peroxyinitrit.

Volné radikály ve zdravém organismu slouží jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám. Například reaktivní formy kyslíku využívají neutrofilní leukocyty a makrofágy k odstraňování mrtvých zbytků buněk a k zabíjení bakterií, jsou nástrojem oxidáz a oxygenáz a jsou signální molekuly. Na druhou stranu reaktivními formami kyslíku a dusíku může být postižena většina biomolekul. Při poškození nenasycených mastných kyselin v lipidech dochází ke ztrátě dvojné vazby a tvoří se reaktivní metabolity – peroxidy a aldehydy, což má za následek změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy a tvorbu chemoreaktivních látek pro makrofágy. Postižení proteinů vede k agregaci a síťování, frekmentaci a štěpení, modifikaci thilových skupin a benzenových jader animokyselin, reakce s hemovým železem. Vlivem poškození proteinů dochází k změně v transportu iontů, vstup vápníku do cytosolu a ke změnám v aktivitě enzymů. Při poškození DNA dochází ke štěpení kruhu deoxyribózy, poškození bází a řetězec DNA se láme. Dochází k mutacím, translačním chybám a inhibici proteosyntézy (Štípek a kol., 2000).

## 2.9 Antioxidanty

Vlivem vzestupu koncentrace kyslíku v zemské atmosféře způsobeným před 2,5 miliardami let fotosyntetickou aktivitou sinic musel způsobit stres, který mohly přežít jen druhy, u nichž se vyvinuly mechanismy chránící je před vysoce reaktivním prvkem

a hlavně před jeho metabolity. Organismus používá různé typy ochrany. První nejbezpečnějším způsobem je bránit se tvorbě nadměrného množství reaktivních forem kyslíku a dusíku například regulací aktivity enzymů, které je tvoří nebo vychytávání tranzitních prvků (transferin, feritin) z reaktivních pozic. Na antioxidační formě se podílejí také reparační mechanismy poškozených molekul (fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky a zvláštní reparační enzymy opravují poškozené DNA). Třetí možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. V literatuře se tyto látky označují jako vychytávače, lapače a zhášeče, ale výstižnější je dělení antioxidantů na enzymy a na látky dávající s reaktivními formami kyslíku a dusíku stálejší a tudíž méně toxické produkty (Štípek a kol., 2000).

## **2.9.1 Enzymové antioxidační systémy**

### **2.9.1.1 *Superoxiddizmutáza (SOD)***

Superoxiddizmutáza je obsažena v každé buňce. Urychluje spontánní dizmutaci superoxidu na dioxygen a peroxid vodíku o další čtyři řady (SURAI, 2002). SOD má dvě podskupiny a to SOD1, SOD2 a Fe-SOD a extracelulární SOD. SOD1 se skládá ze dvou stejných podjednotek, v každé je jeden atom mědi a jeden atom zinku. Je velmi stabilní, katalyzuje při pH 4,5 – 9,5 a vyskytuje se v cytosolu a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Gen pro SOD1 se nachází na 21. chromosomu. SOD2 a Fe-SOD se vyskytují u prokaryot jako dimery. SOD 2 (Mn-SOD) je enzymem mitochondriální matrix, považuje se jako zásadní pro přežití aerobních organismů a zajišťuje rezistenci vůči volným radikálům (Fridowich 1995, cit. Surai 2002). Poslední forma, Fe-SOD v živočišných buňkách nalezena nebyla. Gen pro SOD2 se nachází na 6. chromosomu. Extracelulární SOD byla objevena u živočichů a dizmutací katalyzuje iont mědi a stabilizuje atom zinku (Štípek a kol., 2000).

### **2.9.1.2 *Glutathionperoxidáza***

Glutathion peroxidáza byla v roce 1957 objevena Millisem. Později bylo zjištěno, že se jedná o enzym, který obsahuje atom selenu. Tento enzym se nachází v celé řadě tkání a orgánů hospodářských zvířat. Do podskupiny glutathinperoxidázy patří dva enzymy - cytosolová GSH – glutathionperoxidáza a fosfolipidhydroperoxid-GSH-

peroxidáza pomocí nichž jsou odstraňovány intracelulární hydroperoxydy. Glutathionperoxidáza se spolu s dalšími antioxidanty podílí na ochraně cytoplazmy buněk. Její nedostatek se projeví poškozením buněčných membrán, které nejsou chráněny před lipoperoxidací. To může mít za následek hemolytickou anémii (Štípek a kol., 2000).

### **2.9.1.3 Glutathiontransferázy**

Glutathiontransferázy patří mezi cystolové enzymy, které katalyzují konjugační reakci, při které je sulfhydrylová skupina GSH navázána na elektrofilní organickou látku. Tím jsou detoxikovány některé látky tělu cizí. GST je významnou ochranou před následky peroxidace lipidů (Štípek a kol., 2000).

### **2.9.1.4 Kataláza**

Kataláza může kromě dismutace peroxidu na dioxygen a vodu také katalyzovat peroxidázou reakce (Štípek a kol., 2000).

## **2.9.2 Vysokomolekulární endogenní antioxidanty**

Mezi vysokomolekulární endogenní antioxidanty řadíme transferin v plazmě a laktoferin. Tyto proteiny pevně vážou železo ve formě Fe (III) a tím ho zbavují možnosti vstupovat do Fentonovy reakce. Mezi další tyto antioxidanty, které separují železo v buňce, patří feritin, který působí antioxidantně svou feroxidázovou aktivitou, která skladované železo udržuje v oxidovaném stavu, dokud ho odtud neuvolní silně redukující askorbát. Mezi antioxidanty můžeme i řadit haptoglobin, který vylučuje extracelulární hemoglobin a hemopexin, vážající uvolněný hem. Významným antioxidantním proteinem plazmy je ceruloplazmin, který váže měď a umožňuje uvolnění železa z buněk a jeho předání transferinu. Významnou roli v buněčném jádře hrají metalothioneiny, které prostřednictvím síry chelatují ionty kovů a při oxidačním stresu se zvyšuje jejich syntéza. Nelze opomenout ani chaperony, které po oxidačním stresu rozpoznávají poškozené proteiny, vážou je na sebe a urychlují jejich odstranění v proteosomech (Štípek a kol., 2000).

### **2.9.3 Nízkomolekulární endogenní antioxidanty**

Mezi nízkomolekulární endogenní antioxidanty patří koenzym Q, který pomáhá při regeneraci vitamínu E z tokoferolových radikálů, karotenoid a vitamín A, thioly a disulfidy, glutation, jehož posláním je odstraňovat ROS, udržovat v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů a regenerovat tokoferol a askorbát. Dále do této skupiny spadá kyselina lipoová, melatonin, kyselina močová, bilirubin, flavonoidy a vitamíny – askorbát a vitamín E.

#### **2.9.3.1 Koenzym Q**

Koenzym Q patří do skupiny ubichionů. Má nezastupitelnou funkci při buněčném dýchání. Slouží jako mobilní přenašeč energie. Zvláště důležitý je pro svalové buňky a nejdůležitější je pro srdeční svalovinu. Při nedostatku koenzymu Q dochází k poruše funkce srdce. Je katalyzátorem životně důležitých reakcí, chrání tkáň před poškozením a stárnutím a podporuje imunitní systém (Zeman a kol., 1995).

#### **2.9.3.2 Karotenoidy**

Karotenoidy jsou barviva. U zvířat se nacházejí karotenoidy rostlinného původu, které se do těla zvířete dostávají zejména potravou. Zvířata neumí karotenoidy syntetizovat. Mezi hlavní karotenoidy, které se v živočišném těle nachází, patří xantofyly, lutein, zeaxanthin, malé množství  $\beta$ -karotenu a dalších pigmenty. Karotenoidy jsou jako antioxidanty účinné při nízkých koncentracích kyslíku, a tím doplňují antioxidační působení vitamínu E, který je účinný při vyšších koncentracích kyslíku. Karotenoidy jsou zdrojem provitaminu A (Hlúbik a Opltová, 2004).

#### **2.9.3.3 Vitamín A**

Vitamín A neboli retinol, byl pozorován již ve starověku. Patří mezi vitamíny rozpustné v tucích. Zasahuje do mnoha fyziologických procesů. Mezi jeho základní funkce patří ovlivňování metabolismu rodopsinu, tedy procesu vidění. Retinol působí na diferenciaci a růst epitelových buněk, je nezbytný pro udržení stability biologických membrán, pro diferenciaci pohlavních buněk a pro vývoj plodu. Zasahuje do syntézy bílkovin, nukleových kyselin a lipoproteinů. Jako antioxidant působí při tzv. zhášení singletového molekulárního kyslíku, který vzniká fotochemickou reakcí, enzymaticky nebo při peroxidaci lipidů v membránách. Singletový molekulární kyslík, který je velmi

reaktivní a okysličující agens o vysoké energii, může reagovat s biomolekulami a poškozovat tak tkáň. Toto poškození může být zpomaleno právě „zhášecí“ aktivitou retinolu (Hlúbik a Opltová, 2004).

#### **2.9.3.4 Vitamín C (askorbát)**

Vitamín C patří mezi významnou esenciální složku potravy. Patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Amer (1991) uvádí, že podávání kombinace železo/vitamín C podávané pro zlepšení absorpce železa v jeho redukované formě může vést k intestinálnímu lipoperoxidačnímu poškození, to bylo pozorováno u hlodavců. Askorbát jak samotný, tak v kombinaci s jinými antioxidanty (Zn, vitamín E) snižuje krevní tlak (Štípek a kol., 2000). Vitamín C slouží jako kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin, je důležitým redukčním činidlem, redukuje Fe (III) na Fe (II) a Cu (II) na Cu (I) a umožňuje vstřebávání železa ze střeva a využití přechodných prvků v aktivním centru hydroxyláz (Štípek a kol., 2000). Do organismu z potravy dochází železo oxidované, tj. trojmocné. Díky askorbátu se změní na dvoumocné železo a teprve pak se může vstřebat do enterocytů. Enterocyty ho předají na transferin. Transferin předá železo do tkání, kde je v malém množství průběžně využíváno k obnově určitých enzymů. Jelikož k tomuto účelu musí být železo neustále k dispozici, museli organismy vyvinout jeho bezpečné uskladnění. Tuto funkci zastává feritin, který je důležitou součástí antioxidantního systému. Feroxidázovou aktivitu má glykoprotein ceruloplazmin, který zastává funkci transportu železa, při níž oxiduje dvojmocné železo na trojmocné bez vedlejší produkce ROS. Ceruloplazmin je syntetizován hepatocyty v játrech (Štípek a kol., 2000).

Antioxidační účinek askorbátu spočívá v redukcí anorganických i organických radikálů. Při těchto reakcích dochází k tomu, že ztratí elektron a změní se semidehydroaskorbát neboli askorbylový radikál, který je mnohem méně reaktivní než ROS a RNS. Intracelulární ochranné reakce se ovšem mohou obrátit proti organismu, a to tehdy, jestliže měď a železo jsou v katalytické formě. To znamená, pokud se ve zvýšené míře přesunují z bezpečných vazeb transportních a skladovacích struktur do komplexů s látkami, které jsou oxidačně redukční. Pak dochází tomu, že askorbát redukuje měď a železo na formy katalyzující Fentovu reakci a dochází k oxidačnímu poškození tkáň (Štípek a kol., 2000).

Vitamín C tedy působí preventivně proti oxidativní modifikaci LDL tak, že ve vodním prostředí vychytává volné radikály a další reaktivní látky a tím zabráňuje jejich interakci s oxidovatelnými LDL. Je schopen eliminovat prooxidační aktivitu alfa tokoferolu redukcí tokoferoxylového radikálu, stimuluje obranyschopnost organismu, zvyšuje aktivitu fagocytů a chrání jejich membrány před oxidačním poškozením. Zvyšuje hladinu protilátek a interferonu, snižuje riziko karcinogeneze a to tím, že například brání přeměně dusitanů a dusičnanů na karcinogenní nitrosaminy, které způsobují nádorové onemocnění trávicího traktu (Hlúbik a Opltová, 2004).

#### **2.9.3.5 Vitamín E (tokoferoly)**

Vitamín E byl objeven v tukových složkách potravy pro krysy jako faktor s výrazným antisterilním působením- již ve 20 letech minulého století. Později, v 50. letech, byla objevena jeho další funkce v antioxidačním systému buněk. Později byla dokázána i jeho role v prevenci peroxidace lipidů a dalších oxidativních procesů způsobených volnými radikály (Hlúbik a Opltová, 2004).

Tokoferol je směs derivátů tokotrienolu a tokoferolů, které patří mezi hlavní lipofilní antioxidační látky. Biologicky nejúčinnější je alfa-tokoferol, který je antioxidační látkou membrán, protože jeho izoprenová struktura je lipofilní. Jeho ochranná funkce spočívá v tom, že při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály na hydroperoxydy, se kterými si již dále poradí glutathionperoxidáza. Tak se zneškodní peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou atakovat zdravé lipidy. Tokoferol se přitom mění na tokoferolový radikál, který je stabilnější, než látky a s nimi reaguje (Štípek a kol., 2000). Tato skupina lipofilních vitamínových látek chrání buňky před oxidačním stresem a účinky RNOS, proto pomáhá zpomalovat účinky stárnutí, zlepšuje hojení ran, pozitivně působí na tvorbu pohlavních buněk a zvyšuje plodnost (Opletal a Skřivanová, 2010). Tokoferoly obecně působí antioxidačně ve všech tkáních, protizánětlivě, působí preventivně proti vzniku novotvarů, zvyšují imunitní odezvu organismu a tlumí poškození pokožky po ozáření UV světlem. Vitamín E ovlivňuje procesy buněčné signalizace a modifikuje genovou expresi v buňkách carabella. V praxi je kombinován s askorbátem, protože askorbát snižuje degradaci vitamínu E. Nadbytek vitamínu E zvýší hladinu signálního NO a SOD, obsah proteinů v trombocytech, což ovlivňuje trombocytární agregaci (Opletal a Skřivanová, 2010).

#### 2.9.4 Selen

Na antioxidační ochraně organismu se podílí i stopové prvky. Nejvýznamnější roli v antioxidační ochraně má zinek, měď a selen. Zinek je důležitý pro syntézu proteinů a nukleových kyselin pro růst, ovlivňuje metabolismus selenu, kde je především v místech aktivních zón a působí fyziologickou funkcí pohlavního ústrojí, především samčího a to na předstojnou žlázu a na vývoj spermatických buněk (Opletal a Skřivanová, 2010). Měď je významnou součástí řady enzymů a je důležitá pro integritu pojivové a kostní tkáně, syntézu hemoglobinu a tvorbu pigmentů.

Selen byl pojmenován a objeven v roce 1818 švédským chemikem J. J. Berzelieusem (Reilly, 2006). Selen se vyskytuje ve všech tělních tkáních a buňkách. Jeho obsah v organismu je závislý na jeho množství v krmné dávce. U prasat ve svalovině je jeho obsah 50-52%, v kůži, srsti a spárcích 14 – 15% a 10% v kostech (Zeman, 2004). Nejvyšší koncentrace selenu v těle zvířat je v kosterní svalovině, menší podíl je v nervové tkáni a nejmenší množství je v tukové tkáni (Jelínek a kol, 2003).

Selen je úzce spjat s vitamínem E. Zatímco vitamín E chrání buněčnou membránu, selen prostřednictvím glutathionperoxidázy spolu s dalšími selenoproteiny zajišťuje ochranu cytoplazmy buněk (Jelínek a kol., 2003). Selen se uplatňuje při syntéze tyreoidálních hormonů, při syntéze prostaglandinů a je součástí glutathionperoxidázy. Má přímý antioxidační účinek (Štípek a kol., 2000). Při sledování vlivu současně podávaného tokoferolu a selenu bylo zjištěno, že selen hraje významnou roli ve stabilizaci chámovodu a Serotliho buněk, zatímco samotný vitamín E tyto kompartmenty neovlivňuje (Guzman a kol., 2000). Selen v kombinaci s vitamínem E pozitivně ovlivňuje kvalitu spermií, hlavně jejich pohyblivost, zlepšuje stav imunitního systému, zpomaluje destrukci buněčné protoplazmy, zlepšuje kvalitu masa, jeho skladovatelnost a chuť. Společně působí proti vzniku nemocem jako je svalová dystrofie, syndrom MMA, neplodnost samic a samců a degenerace jater (Opletal a Skřivanová, 2010). Společně jsou to dva antioxidanty, které působí na semennou plazmu i samotné spermie. V semenné plazmě se nachází 85% selenu a ve spermích je akumulován ve stěně části krčku (Jelínek a kol., 2003). Je součástí selenoproteinu spermie a ovlivňuje její energetický metabolismus a mobilitu. Jeho nedostatek vede ke snížení koncentrace a motility spermií. Doporučená dávka pro plemenné kance je 0,3 mg Se/kg KS.



### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem práce bylo prověřit vliv antioxidantů, vitamínu C, vitamínu E a selenu na spermatogenezi plemenných kanců. Spermatogeneze byla hodnocena kvalitou spermatu, kde byl laboratorně zkoumán objem ejakulátu, motilita, koncentrace spermatu a počet abnormálních spermií.

#### 4 MATERIÁL A METODIKA

Experiment byl proveden na inseminační stanici kanců (ISK) ve Velkém Meziříčí. Do pokusu bylo zařazeno 12 kanců plemene *Duroc*. Průměrný věk byl  $2 \pm 0,3$  roky, průměrná hmotnost kanců byla  $250 \pm 20$  kg. Pokusná zvířata byla ustájena v individuálních boxech a velikosti 2,5 x 2,5 m a měla neomezený přístup k vodě. Základní krmnou dávku u všech zvířat tvořilo 3,3 kg základní krmné směsi (Tab. 1 a 2). Základní krmná dávka obsahovala 16 mg vitamínu C, 9,9 mg vitamínu E a 0,02 mg selenu na kilogram krmné směsi. Kanci byli rozděleni do dvou skupin. První experimentální skupině kanců (n=6) bylo do krmné dávky přidáváno 350 mg vitamínu C (kyselina askorbová); 70 mg vitamínu E (alfatokoferol) a 0,5 mg selenu (selenomethionin) na kilogram diety. Druhá skupina kanců (n=6) sloužila jako kontrolní a množství vitamínu C, vitamínu E a selenu jí nebylo navýšeno. Směs byla kancům dávkována individuálně při ranním krmení. Obsah selenu vitamínu C a E v krmné směsi byl stanoven pomocí tabulkových hodnot dle jednotlivých krmiv (Zeman a kol., 1995).

Výzkum probíhal 90 dní (červen - srpen). Jednou týdně byl od kanců odebírán ejakulát a pro biochemické analýzy byl použit ejakulát, který byl odebrán na začátku pokusu (kontrolní odběr) a dále v 45. a 90. den experimentu. Ejakulát byl od kanců získáván pomocí skoku na fantom.



**Obr. 6:** odběr ejakulátu

Tabulka 1: Složení krmné směsi pro plemenné kance

<b>Komponent</b>	<b>% v krmné směsi</b>
Ječmen zrno	36.00
Pšenice zrno	20.36
Oves zrno	20.00
Sójová moučka	14.50
EKPO T	3.00
BergaFat	2.10
Uhličitan vápenatý	1.50
Monodicalciumfosfát	1.20
Minerální premix pro kance 0.5%	0.50
Chlorid sodný	0.40
Oxid manganatý	0.15
L-Lysine HCl	0.14
L- Threonin	0.09
Methionin DL	0.06

Bergafat (Berg + Schmidt, Německo) – palmový olej; EKPO T (Delika – Pet, Česká Republika) – sušená směs

Tabulka 2: Složení premixu pro plemenné kance (0.5%)

<b>Parametry</b>	<b>jednotka</b>	<b>množství</b>
Vit.A	U. I.	3,000,000
Vit. D3	U. I.	400,000
Vit.B <sub>1</sub>	mg	500
Vit.B <sub>2</sub>	mg	1,200
Vit.B <sub>6</sub>	mg	800
Vit.B <sub>12</sub>	mg	6
Vit.K <sub>3</sub>	mg	600
Biotin	mg	70
Kyselina listová	mg	200
Niacin	mg	8,000
Pantothenát vápenatý	mg	4,000
Cholin chlorid	mg	55,200
Betain	mg	26,500
Butylhydroxi-toluen	mg	400
Ethoxyquin	mg	180
Cu – ve formě pentahydrátu síranu měďnatého	mg	2,883
Zn – ve formě oxidu zinečnatého	mg	19,976
Mn – ve formě oxidu manganatého	mg	19,760
Fe – ve formě uhličitanu železnatého	mg	23,625
Co – ve formě heptahydrátu síranu kobalnatého	mg	91
Lysine ve formě L-lysinu monohydrochlorinu	g	226
provedeno v – pšeničná mouka, uhličitan vápenatý	kg	1

Hodnoty objemu ejakulátu, motility, koncentrace spermií a procenta abnormálních spermií byly shromažďovány před zahájením experimentu z každé skupiny v počtu 12 vzorků (první – kontrolní perioda). V průběhu celého experimentu byly hodnoceny všechny vzorky semene od pokusných zvířat. Ve druhé periodě (0-30 den) bylo analyzováno 19 vzorků od experimentální skupiny a 18 vzorků semene od skupiny kontrolní. Ve třetí periodě (30-60 den) bylo od skupiny kanců experimentální skupiny získáno k analýze 19 vzorků a od kontrolní skupiny kanců 14 vzorků ejakulátu. V poslední čtvrté periodě (60-90 den) bylo analyzováno 11 vzorků od experimentální skupiny kanců a 6 vzorků od kontrolní skupiny. Celkem tedy bylo od obou skupin, jak od experimentální tak od kontrolní odebráno 87 vzorků spermatu.

Údaje byly zpracovány statisticky pomocí STATISTICA.CZ, verze 10.0 (Česká republika). Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota z měření směrodatná odchylka. Statistická významnost byla stanovena porovnáním základní rozdíly mezi jednotlivými vzorky pomocí ANOVA a Scheffé metoda (dvoufaktorová analýza) pro parametry objemu ejakulátu; pohyblivost spermií; koncentrace spermií a abnormálních spermií. Rozdíly  $P < 0,05$  byly považovány za významné.

## 4.1 Principy stanovení laboratorních hodnot ejakulátu

### 4.1.1 Stanovení objemu ejakulátu

Objem ejakulátu byl stanoven pomocí odměrného válce.

### 4.1.2 Stanovení koncentrace spermií v ejakulátu

Koncentrace spermií v ejakulátu se vyjadřovala jako počet spermií v  $1 \text{ mm}^3$ . Koncentrace se určovala fotometricky pomocí Spekolu 11 (Carl Zeiss, Jena, 2009, <http://www.modernmicroscopy.com/main.asp?article=93&print=true&pix=true>).

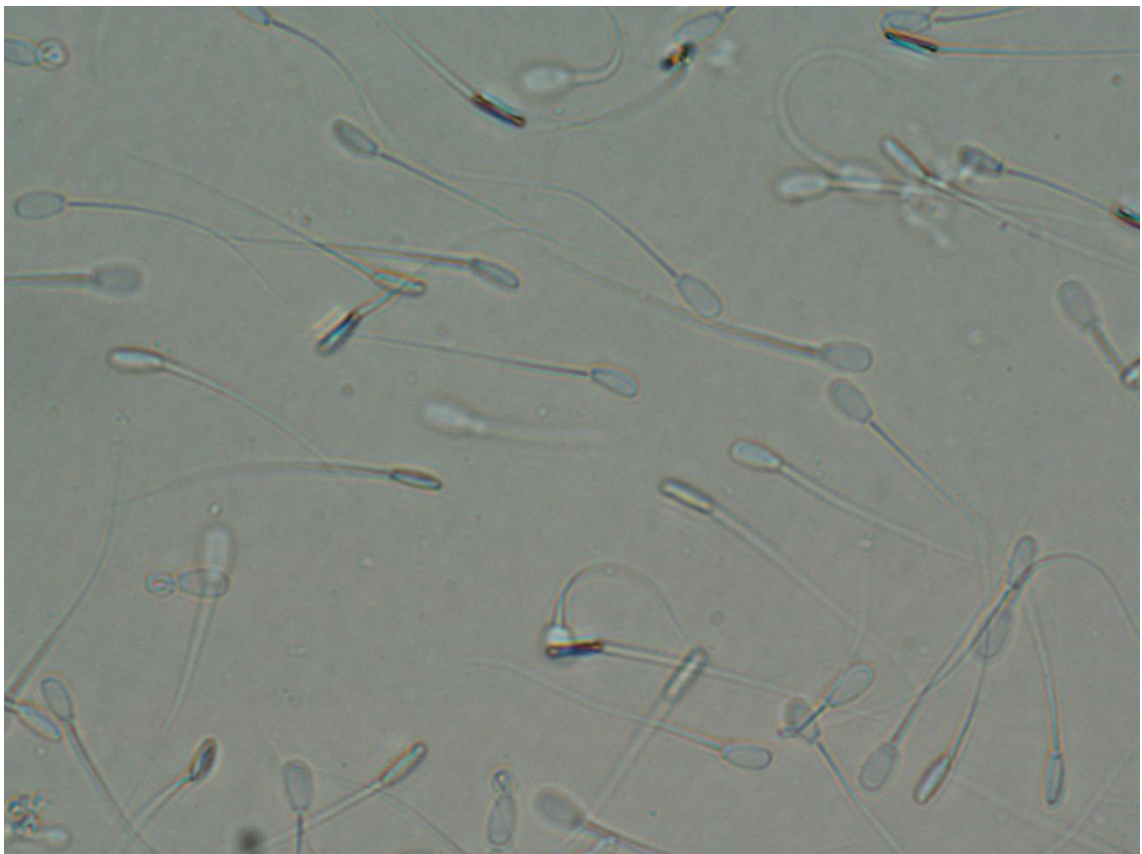
Měření probíhalo při vlnové délce v rozmezí 340 - 850 nm. Dávkovačem pro malé množství tekutiny se nabrala do tenkostěnné zkumavky 9 ml 1M HCl, pomocí varipipety se přidalo 0,25 ml vzorku z rozmíchaného nativního ejakulátu a následně se vzorek promíchal. Zkumavka se zasunula do nástavce Spekolu 11 a odečetla se naměřená hodnota. Podle kalibrační tabulky se stanovila koncentrace spermatu.



*Obr. 7: Spekol*

#### 4.1.3 Stanovení procenta patologických spermii v ejakulátu

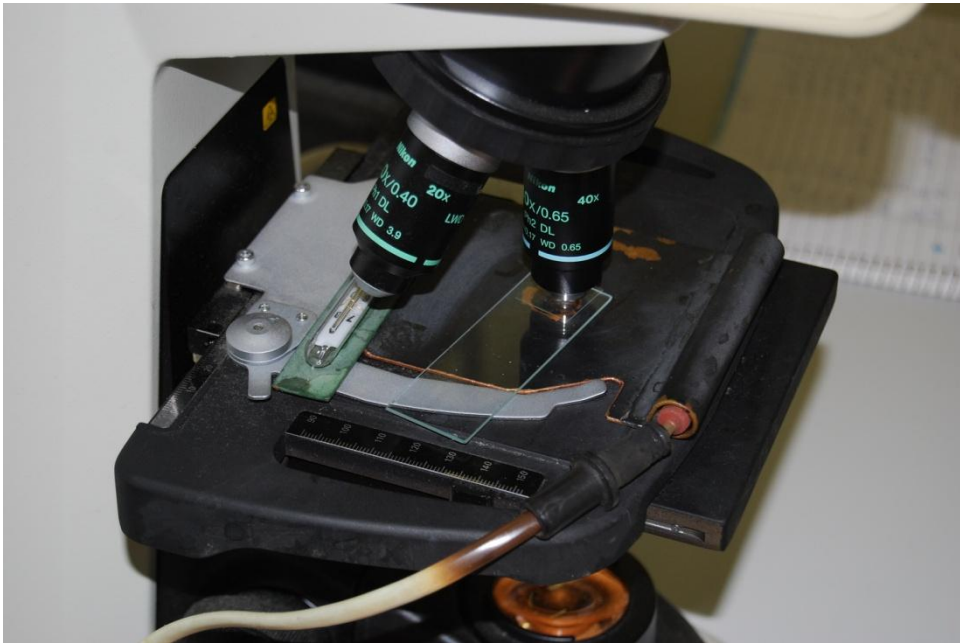
Procento patologických spermii bylo stanoveno z prvního odběru v měsíci. Postup při přípravě roztěru: kapka semene se nanese pomocí skleněné tyčinky na podložní sklíčko, v úhlu 45 stupňů se ke kapce přiblíží zabroušené roztěrové sklíčko tak, aby se kapka po dotyku se sklíčkem rozprostřela po hraně sklíčka a tahem se provedl roztěr v tenké vrstvě. Morfologické posouzení (vyhodnocení abnormálních spermii na připraveném spermiogramu v několika zorných polích – počítaly se jednotlivě všechny abnormální spermie), barvení a vyhodnocení spermiogramu prováděl obvodní veterinární lékař (MVDr. Josef Sedmík).



*Obr. 8: Stanovení abnormálních spermii*

#### 4.1.4 Stanovení motility

Stanovení motility bylo provedeno do 15 minut po odběru kance, mikroskopicky z šetrně promíchaného spermatu. Semeno bylo nabráno skleněnou tyčinkou, kapka semene se nanasla na předehřáté podložní sklíčko (cca 42°C) a překryla krycím sklíčkem. Sklídka byla předehřívána na předehřívajícím stolku, mikroskop měl rovněž předehřívanou destičku. Mikroskopicky bylo určeno mikroskopicky subjektivním odhadem procento spermií s přímočarým pohybem vpřed za hlavičkou, při tělesné teplotě vzorku a při zvětšení 1 : 40. Míra pohyblivosti se určovala v několika zorných polích.



*Obr. 9: Mikroskopické pozorování motility*

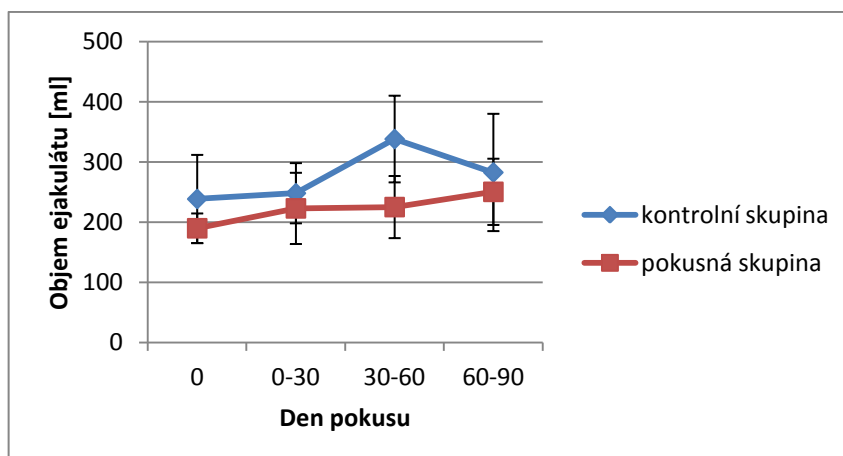
## 5 VÝSLEDKY

Při pokusu nebyly zaznamenány žádné zdravotní problémy u zvířat zařazených do výzkumu jak v kontrolní tak i v pokusné skupině.

### *Vliv antioxidantů na objem ejakulátu*

V průběhu experimentu byl posouzen vliv antioxidantů na objem ejakulátu u kanců. Průměrný stav objemu ejakulátu a směrodatné odchylky zachycuje graf č. 1. Při kontrolním dnu byl u kontrolní skupiny průměrný objem ejakulátu vyšší než u pokusné. Kontrolní skupina měla v kontrolním dnu průměr 238 ml ejakulátu, pokusná 190 ml. Nultý až 30 den pokusu byl u kontrolní skupiny průměrný objem ejakulátu 248 ml, u pokusné 223 ml. Již v tomto období dle grafu se objem ejakulátu pokusné skupiny oproti kontrolní zvyšoval. U kontrolní skupiny jen o 10 ml, kdežto u pokusné o 33 ml. Třicátý až šedesátý den se průměrný objem ejakulátu u kontrolní skupiny prudce zvýšil a to na 338 ml, u pokusné skupiny měl mírně stoupající tendenci. Objem ejakulátu u pokusné skupiny se v tomto období zvýšil jen o 2 ml. 60 – 90 den měl u kontrolní skupiny klesající tendenci, kdy se objem snížil až na průměrnou hodnotu 283 ml. U pokusné skupiny opět stoupal a to na objem 250 ml. Objem ejakulátu za celé sledované období u kontrolní skupiny markantně stoupl ve 30 – 60 dnu, ale pak v dalším sledovaném období rapidně klesl. U pokusné skupiny po celé období objem ejakulátu stoupal. Od kontrolního dne po konec pokusu stoupl objem ejakulátu v pokusné skupině o 32 %, kdežto v kontrolní skupině jen o 19 %. V případě objemu ejakulátu nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly.

**Graf č. 1:** Naměřené hodnoty objemu ejakulátu u kontrolní a pokusné skupiny

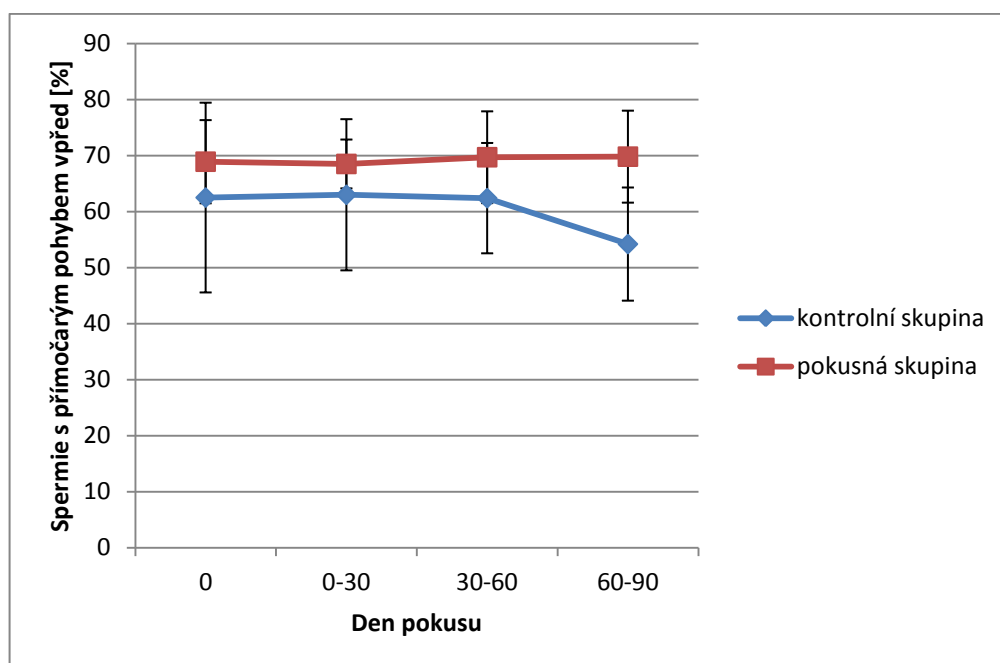




### *Vliv antioxidantů na motilitu spermií*

Motilita spermií byla pozorována jak u kontrolní tak i u pokusné skupiny. Motilita na začátku pokusu u kontrolní skupiny byla 63 %, u pokusné skupiny 69 %. U kontrolní skupiny motilita od kontrolního dne do 30 dne mírně stoupla. V dalším období (30 – 60 den) opět mírně stoupla a v posledním období markantně klesla až na 54 %. U pokusné skupiny naopak motilita měla mírně stoupající tendenci, jen ve 30 – 60 dnu nepatrně poklesla. Celkově se u této skupiny zvýšila o cca 1 % od začátku pokusu (graf č. 2). V případě motility spermií nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly.

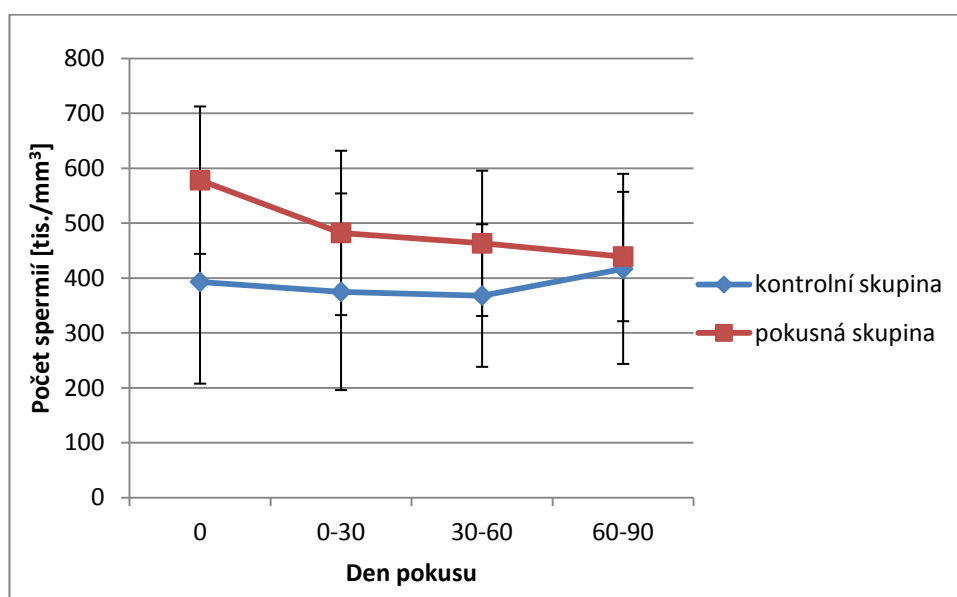
**Graf č. 2:** Sledované hodnoty motility spermií u pokusné i kontrolní skupiny



### *Vliv antioxidantů na koncentraci spermií*

U kontrolní skupiny byla koncentrace v nultý den 393 tis. spermií v 1 mm<sup>3</sup> a u pokusné 578 tis. v 1 mm<sup>3</sup>. U kontrolní skupiny byl průměr u všech skupin převážně stejný, jen v poslední dekádě pokusu se koncentrace zvýšila na 416 tis. To bylo oproti kontrolnímu dnu o necelých 6 %. Koncentrace spermií v pokusné skupině se v průběhu pokusu snižovala. Extrémní pád jsme zaznamenali v první dekádě pokusu, kdy se koncentrace snížila o 17 %. V dalším pokusném období, 30 – 60 den, se snížila o 20 % od kontrolního dne a poslední období o 24 %. Snížení koncentrace v tomto období (60-90 den) oproti předchozího období bylo o 5 %. Celkem se koncentrace u kontrolní skupiny zvýšila o 6 % a u pokusné skupiny se snížila o 24 %. V případě koncentrace spermií nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly. Naměřené hodnoty byly zaznamenány v grafu č. 3.

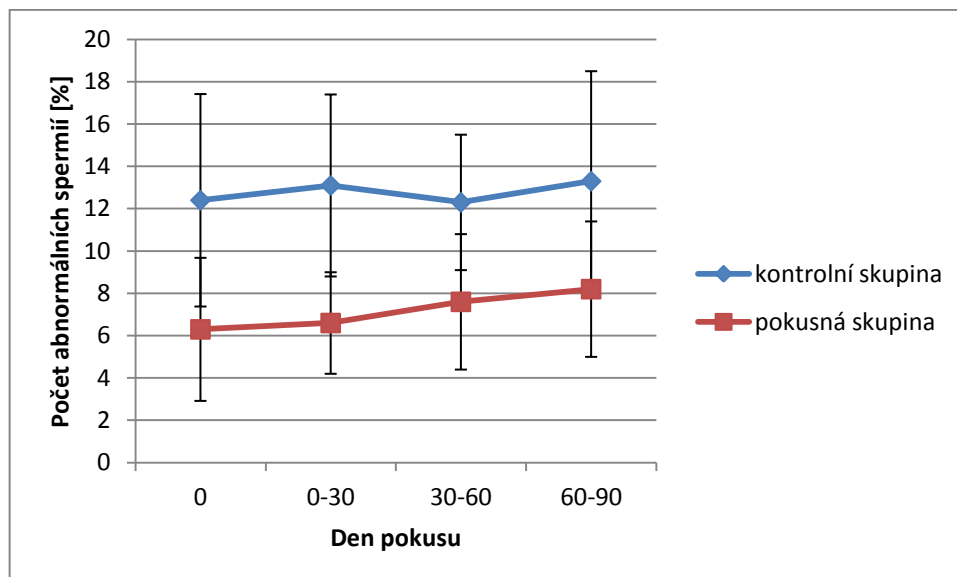
**Graf č. 3:** Naměřené hodnoty koncentrace spermií u pokusné a kontrolní skupiny



### *Vliv antioxidantů na počet patologických spermií v ejakulátu*

U obou skupinách byl počet abnormálních spermií v ejakulátu s požadovanými hodnoty na jeho kvalitu pro použití k výrobě inseminačních dávek. U kontrolní skupiny jsme začínali na 12 %, u pokusné na 6 %. Procenta abnormálních spermií v kontrolní skupině se pohybovaly v rozmezí od 12 % do 13 %. Po celou dobu výzkumu v kontrolní skupině byly zjištěné hodnoty v rozmezí cca  $\pm 1\%$ . V nultém až 30 dnu se počet mírně zvýšil, v dalším období zas klesl o 1 % a v posledním období stoupl o 1%. Celkově se během výzkumu počet patologických spermií zvýšilo o 1 %. U pokusné skupiny se procenta abnormálních spermií zvyšovala. V druhé dekádě pokusu jsme zaznamenali zvýšení o cca 1%, ve třetí o necelé 1 % proti předchozích skupin. Celkově se množství patologických spermií od kontrolního dne zvýšilo o 30%. Zjištěné hodnoty jsou zaznamenány v grafu č. 4. V případě procenta patologických spermií nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly.

**Graf č. 4:** Naměřené hodnoty patologických spermií u kontrolní a pokusné skupiny



## 6 DISKUZE

Skutečnost, že antioxidanty mají pozitivní vliv na kvalitu ejakulátu, nebyla z pokusu prokázána. U pokusné skupin byla navýšena krmná dávka o 350 mg vitamínu C, 70 mg vitamínu E a 0,5 mg selenu/kg KS oproti skupině kontrolní. Navýšení antioxidantů v krmné dávce u pokusné skupiny se neztotožňovalo s výzkumy jiných autorů. V naší studii došlo k navýšení objemu ejakulátu o 32%, motilita se zvýšila o nepatrné 1 %, koncentrace spermií se zvýšila o 6 % a počet abnormálních spermií se zvýšil o 30 %.

Kolodziej a Jacyno (2005) ve své studii popisují vliv vitamínu E a selenu na kvalitu ejakulátu. Studie byly prováděny na 40 - ti mladých kancích. Kanci byli rozděleni na dvě skupiny, kontrolní a pokusnou. Základní krmná dávka u kontrolní skupiny obsahovala 0,2 mg selenu a 30 mg vitamínu E a pokusná skupina měla v krmné dávce 0,5 mg selenu a 70 mg tokoferolu/na kg krmné směsi. Tyto autorky dospěli k závěru, že porovnáním obou skupin, došlo k výraznému zvýšení koncentrace spermií a ke snížení počtu patologických spermií. Marin-Guzman a kol (2000) ve svém pokusu zkoumali vliv vitamínu E a selenu na spermatogenní vývoj v různých stádiích sexuálního vývoje a obsah prostaglandinu F<sub>2</sub>alpha (PGF<sub>2</sub>alpha) v semenných váčcích a prostaty u mladých kanců ve věku 18 měsíců. Výzkumu se účastnilo 61 hybridních kanců. Došli k závěru, že Se hraje roli při stanovení počtu Sertolihových buněk a má vliv na počet spermií ve varleti zatímco doplňkový vitamin E neovlivnil tato kritéria. Marin-Guzman a kol. (1997) prováděli výzkum, kdy také přidali do krmné dávky selen v množství 0,5 mg/kg KS. Experiment byl prováděn u 192 kanců. Kanci byli rozděleny do dvou skupin. Do kontrolní a pokusné. Výsledkem byl fakt, že u kontrolní skupiny došlo k navýšení objemu ejakulátu o 25,7 %, motilitě o 31,3 % a koncentraci spermií o 14,7 %. Kolodziej a kol. (2005) zjistili, že přidáním 0,5 mg Se/kg KS se celkový počet spermií zvýšil o 29,7 % a snížil procento patologických spermií o 46,7 % v porovnání s kontrolní skupinou. Kontrolní skupina měla v krmné dávce obsažen selen pouze z nativních zdrojů (0,2 mg/kg KS). Groenewegen a kol. (2006), kteří po přidání selenu v dávce 0,5 mg/kg KS zjistili zvýšení koncentrace spermií o 11,1 %, ale v motilitě a u objemu ejakulátu tento rozdíl nepotvrdili. Speicht a kol. (2012) přidávali do krmné dávky 0,3 mg/kg KS. Došli k závěru, že celkový počet vyprodukovaných spermií a koncentrace spermií byla průkazně vyšší o 32,2 %. Objem ejakulátu ani motilita spermií nabyly u

žádné z experimentálních skupin kanců změněna. Mustafa Sönmez a kol. (2004) zkoumali účinek askorbátu na kvalitu spermatu, peroxidaci lipidů a plazmatické hladiny testosteronu potkaních samců. Došli k závěru, že kyselina askorbová zlepšuje reprodukční znaky samců krys, které jsou spojeny s vysokou plodností. V naší studii jsme askorbát přidávali díky jeho antioxidačním účinku, který spočívá v redukci anorganických i organických radikálů.

V porovnání s naší studií došlo také ke zvýšení objemu ejakulátu, motilita ale stoupla jen o nepatrné procento, koncentrace spermií se zvýšila jen o 6 %. Počet abnormálních spermií se zvýšil, kdežto u výše zmíněných studií naopak počet klesl. Naše výsledky se téměř neshodují s jinými studii. Tato neshoda mohla být zapříčiněna obdobím, kdy probíhal pokus. Studie probíhala v letních měsících (červen – září), kdy na kance mohl působit tepelný stres. To uvádí i ve své práci Smital (2008), který hodnotil kvalitativní a kvantitativní ukazatele ejakulátu v různých ročních obdobích u 2712 kanců. Došel k závěru, že od října do března jsou laboratorní hodnoty ejakulátu (procento abnormálních spermií, koncentrace, motilita) příznivé, kdežto v letním období kvalita spermatu prudce klesá. Čerovský (2005) uvádí, že vlivem teplotního stresu se počet abnormálních spermií zvyšuje a abnormalita je způsobena proximální protoplazmatickou kapkou. Tato abnormalita podle Malmgrena (1989) právě souvisí s výskytem vysokých teplot. Guillouet et al. (1999), Kondracki et al. (2003) a Smital (2009) ve svých studiích uvádí, že nejnižší hodnoty celkového počtu spermií je možné pozorovat v letním období, zejména v jeho závěru.

## 7 ZÁVĚR

V pokusu byl zkoumán vliv antioxidantů (selenu, vitamínu C a vitamínu E) na spermatogenezi kanců. Spermatogeneze byla hodnocena kvalitou ejakulátu. Byl sledován objem ejakulátu, motilita, koncentrace spermií a počet abnormálních spermií. Do experimentu byly zařazeny 2 skupiny kanců, kontrolní a pokusná. U pokusné skupiny bylo navýšeno v krmné dávce množství vitamínu C o 334 mg/kg KS, vitamínu E o 60,1 mg/kg KS a selenu o 0,48 mg/kg KS. Z dosažených výsledků jsme zjistili, že antioxidanty mají pozitivní i negativní vliv na kvalitu ejakulátu. U objemu ejakulátu u kontrolní skupiny se hodnoty do 60 dne pokusu zvyšovaly, ale v poslední etapě výrazně klesly, celkově o 19%. U pokusné skupiny měly hodnoty stále vzrůstající tendenci a celkově se objem zvýšil o 32%. Motilita spermií se u kontrolní skupiny snížila z původních 69 % na 54% a u pokusné skupiny se naopak zvýšila o 1%. U sledování koncentrace spermií se u kontrolní skupiny koncentrace zvýšila o 6% a u pokusné snížila o 24 %. Počet abnormálních spermií se u kontrolní skupiny zvýšil o 1%, v experimentální skupině se počet patologických spermií zvýšil o 30%.

Na základě našich výsledků, lze konstatovat, že selen, vitamín E a C nemají zcela prokazatelný účinek na kvalitu ejakulátu kanců. Musíme ovšem brát v úvahu letní období, ve kterém experiment probíhal. V tomto časovém intervalu na zvířata působily vyšší teploty, které se mohly negativně podepsat na celkovém výsledku.

## LITERATURA

AUDET, I.: Effects of dietary vitamin supplementation and semen collection frequency on reproductive performance and semen quality in boars. *Journal of Animal Science*. 2009, 87: 1960–1970. ISSN: 0021-8812

AWDA, B. J., MACKENZIE-BELL, M. a BUHR, M.: Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function. *Biology of Reproduction*. 2009, roč. 81, č. 3, s. 553-561. ISSN: 0006-3363

BLAIR, R.: *Nutrition and Feeding of Organic pigs*. London: Cromwell Press, 2007. 318 s. ISBN: 978-1-84593-191-9.

CLOSE, W. H. SURAY, P. F.; TAILOR-PICKARD, J. A.: Current advances in selenium research and application. 1. Netherlands : Wageningen Academic Publishers, 2008. s. 263313. ISBN: 978-90-8686-073-9

EBEIT, T. A.: Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. *British Poultry Science*. 2009, 50, s. 641-647. ISSN 00071668.

ECHEVERRÍA-ALONZO, A.; SANTOS-RICALDE, R.; CENTURIÓN-CASTRO, F.; AKELÓPEZ, R.; ALFARO-GEMBOA, M.; RODRIGUEZ-BUENFIL, J.: Effects of dietary selenium and vitamin e on semen quality and sperm morphology of young boars during warm and fresh season. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009, 8, s. 2311-2317. ISSN: 16805593

HORKÝ, P.; JANČÍKOVÁ, P. a ZEMAN, L.: The effect of a supplement of chromium (picolinate) on the level of blood glucose, insulin activity and changes in laboratory evaluation of the ejaculate of breeding boars. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2012, č. 1, s. 49-56. ISSN 1211-8516.

HLÚBIK, P.; OPLTOVÁ, L.: *Vitamíny*. Grada Publishing, a.s., 2004. 233 s ISBN: 80-247-0373-4

JELÍNEK, P.; KOUDELA, K.: Fyziologie hospodářských zvířat. Vyd. 1. Brno: Mendelova lesnická a lesnická univerzita v Brně, 2003. 414 s. ISBN: 80-7157-644-1

KOŁODZIEJ, A.; JACYNO, E.: Effect of selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. *Archiv Tierzucht*. 2005, 48, s. 68-75. ISSN: 00039438

KOZUMPLÍK, J.; KUDLÁČ, E.: Reprodukce prasat ve velkochovech. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1980. 296 s. ISBN: 07-103-80

KUDRNA, V.: Produkce krmiv a výživa skotu. Praha: Agrospoj Praha, 1998. 362 s.

KUMAR, N.; VERNA, R. P.; SINGH, L. P.; VARSHNEY, V. P.; DASS, R. S.: Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* × *Bos taurus*) bulls. *Reproduction Nutrition Development*. 2006, 46, s. 663-675. ISSN: 09265287

LASOTA, B.; BLACZSZIK, B.; SEREMAK, B.: Selenium Status and GSH-Px Activity in Semen and Blood of Boars at Different Ages Used for Artificial Insemination. *Reproduction Domestic Animals*. 2004, 39, s. 309-314. ISSN: 0936-6768

LÓPEZ, A.; RIJSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; LEROY, J. L. M. R.; De CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J.; MAES, D.: Effect of organic selenium in the diet on sperm quality of boars. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010, 45, s. 297-305. ISSN: 09366768

LOUDA, F.: Reprodukce hospodářských zvířat. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1980. 270 s. ISBN: 17-268-80

MÁCHAL, L.; HOŠEK, M.; RECKOVA, Z.; KŘIVÁNEK, I.: Semen quality parameters and content of selected minerals in boar blood and seminal plasma. *Polish Journal of Natural Science*. 2007, 4, 608-619. ISSN: 1643-9953

MACHLIN, L. J., BENDICH, A.: Free radicals tissue damage: protective role or antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, 1987, no. 1, s. 441-445. ISSN: 0892-6638



MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; CHUNG, Y. K.; PATE, J. L.; POPE, W. F.: Effects of Dietary Selenium and Vitamin E on Boar Performance and Tissue Responses, Semen Quality, and Subsequent Fertilization Rates in Mature Gilts. *Journal of Animal Science*. 1997, 75, s. 2994-3003. ISSN: 0021-8812

MERIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; PATE, J. L.: Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *Journal of Animal Science*. 2000, 78, s. 1537-1543. ISSN 00218812. ISSN: 0021-8812

NAVARO, F.; NAVAS, P.; BURGESS, J. R.; BELLO, R. I.; CABO, R. D.; ARROYO, A.; VILLALBA, J. M.: Vitamin E and selenium deficiency induces expression of the ubiquinonedependent antioxidant system at the plasma membrane. *FASEB Journal*. 1998, č. 12. ISSN: 0892-6638

OPLETAL, L.; SKŘIVANOVÁ, V.: Přírodní látky a jejich biologická aktivita: Využití látek pro ovlivnění fyziologických procesů hospodářských zvířat. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010. 653 s. ISBN: 978-80-246-1801-2

PAPAS, A.: Vitamin E. Praha: Pragma, 1999. 380 s. ISBN: 80-7205-773-1

PASSWATER, R. A.: Vše o selenu. Praha: Pragma, 1999. 97 s. ISBN: 80-7205-902-5

RADOMIL, L.; PETTITT, M. J.; MARKIES, K. M.; HICKEY, K. D.; BUHR, M. M.: Stress and Dietary Factors Modify Boar Sperm for Processing. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011, roč. 46, č. 2, s. 39-44. ISSN: 0936-6768

REECE, W. O.: Fyziologie domácích zvířat. Vyd.1. Praha: Grada Publishing, 1998. 456 s. ISBN: 80-7169-547-5

REILLY, C.: Selenium in Food and Health. 2. vyd. United States of America: Springer Science, 2006. ISBN: 978-0387-33243-7

SAEZ, F.; MOTTA, C; BOUCHER, D; GRIZARD, G.: Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Molecular Human Reproduction*. 1998, 4, s. 667–672. ISSN: 1360-9947

SANOCA, D. a KURPISZ, M.: Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004, roč. 12, č. 2. ISSN: 1477-782

SLAVÍK, P.; ILLEK, J.; RAJMON, R.; ZELENÝ, T.; JÍLEK, F.: Selenium Dynamics in the Blood of Beef Cows and Calves Fed Diets Supplemented with Organic and Inorganic Selenium Sources and the Effect on Reproduction. *Acta Veterinaria*. 2008, 77, s. 11-15. ISSN: 0001-7213

SMITAL, J.: Faktory působící na efektivitu a skladování kančího spermatu v kapalném stavu. *Náš chov*. 2001, 12, s. 34-37. ISSN: 0027-8068

SMITAL, J.: Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2008, 110, s. 335-346 . ISSN 03784320.

SMITH, D. G.; SENGER, P. L.; MECCUCHTAN, F. J.; LANDA, C. A.: Selenium and Glutathione Peroxidase Distribution in Bovine Semen and Selenium-75 Retention by the 77 Tissues of the Reproductive Tract in the Bull. *Biology of Reproduction*. 1979, 20, s. 377-383. ISSN: 0006-3363

STRAW, B. E.: *Nemoci prasat*. Bratislava: TYPOSET, 2003. 880 s. ISBN: 80-88700-58-2

SURAI, P. F. *Selenium in Nutrition and Health*. Vyd. 1. United Kingdom: Nottingham University Pres, 2006, 955 s. ISBN: 1-904761-16-X

SURAI, P. F.: *Natural Antioxidant in Avian Nutrition and Reproduction*. Vyd. 1. Nottingham: Nottingham University Press, 2002. 615 s. ISBN: 1-897676-95-6

SVOBODA, M.; FAJT, Z.; BAŇOCH, T.; DRÁBEK, J.; SALÁKOVÁ, A.: The Use of Selenium Enriched *Enterococcus faecium* as an Alternative Selenium Source for Growingfinishing Pigs. *Acta Veterinaria*. 2010, 79, s. 511-517. ISSN 0001-7213.

ŠIMEČEK, K.; ZEMAN, L.; HEGER, J.: *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro prasata*. Vyd.1. Pohořelice: ČZS a VÚVZ Pohořelice, 1993. 78 s. ISBN: 80-901598-0-X 78

ŠIMEK, M.: *Minerální látky a jejich zdroje u monogastrických zvířat*. *Krmivářství*. 2007, 11, 5, s. 20-22. ISSN: 1212-9992

ŠTÍPEK, S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Vyd. 1. Havlíčkův Brod: Garda Publishing, 2000. 320 s. ISBN: 80-7169-704-4

WILSON, M. E.; ROZEBOOM, K. J.; CRENSHAW, T. D.: Boar Nutrition for optimum Sperm Production. Advances in Pork Production. 2004, 15, s. 295-306. ISSN: 1489-1395

ZEMAN, L. DOLEŽAL, P.; KOPŘIVA, A.; MRKVICOVÁ, E.; PROCHÁZKOVÁ, J.; RYANT, P.; SKLÁDANKA, J.; STRAKOVÁ, E.; SUCHÝ, P.; VESELÝ, P.; ZELENKA, J.: Výživa a krmení hospodářských zvířat. 1. Praha: Profi Press, 2006. 360 s. ISBN: 80-8672617-7

ZEMAN, L.: Výživa a krmení prasat. Vyd. 1. Brno: Ediční středisko MZLU v Brně, 2004. 98 s. ISBN: 80-715-558-5

#### Internetové zdroje

ANONYM. Výsledky chovu prasat 1. a 2. pololetí 2014 [online]. © 2015, [cit. 2015-02-12]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/>

ANONYM. Pohlavní soustava kance [online], [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: <https://www.google.cz/>

ANONYM. Spermatogeneza [online], [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: <http://www.biologija.rs/>

ANONYM. Spermie [online], [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: <http://upload.wikimedia.org/>

ANONYM. Odběr ejakulátu [online], [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://www.zootechnika.cz/>

ANONYM. Hodnocení kvality ejakulátu [online], [cit. 2015-04-12]. Dostupné z: <http://www.fertilaid.cz/>

## SEZNAM ZKRATEK

DAS	diacetolxyscirpenol
DON	deoxynivalenol
ISK	inseminační stanice kanců
KA	krmná směs pro kance
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
NIV	nivalenol
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive nitrogen species
SOD	superoxiddizmutáza