

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vlastnosti a konzervace kančího spermatu

Bakalářská práce

Autor práce: Jiří Habáň

Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Vlastnosti a konzervace kančího spermatu vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 12.4.2012

.....

Poděkování

Chtěl bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za cenné připomínky, čas a trpělivost při dohledu nad touto prací.

SOUHRN

Cílem této práce je zpracování stručné literární kompilace problematiky fyziologie, získávání, vyšetřování a konzervace kančího ejakulátu.

Kančí ejakulát, čili sperma, je buněčná suspenze složená ze spermií, zralých samčích pohlavních buněk, a tekuté složky, nazývané semenná plazma, tvořené sekrety přídatných pohlavních žláz kanců.

Produkce spermií je výsledkem spermatogeneze, základního procesu v reprodukci kanců, ke které dochází v semenotvorných kanálcích kančích pohlavních žláz – ve varlatech. Následné dozrávání spermií probíhá v kanálku nadvarlat, kde spermie získávají pohybové a oplozovací schopnosti. Dochází zde také k zahušťování a uskladnění spermií. Spermie patří k nejvíce specializovaným živočišným buňkám s řadou jedinečných vlastností. K nejvýznamnějším patří schopnost samostatného pohybu, schopnost oplození a přenos dědičného materiálu, vázaného na DNA.

Nejrozšířenějším způsobem získávání kančího spermatu je metoda manuálního odběru. U odebraného spermatu makroskopicky hodnotíme barvu, pach, konzistenci, objem a cizí příměsi. Mikroskopicky vyšetřujeme motilitu spermií, jejich koncentraci, životaschopnost a morfologii. Provádí se i řada dalších vyšetřovacích metod, včetně počítačových. Zpracování spermatu spočívá především v jeho ředění a konzervaci, směšování spermatu a výrobě individuálních inseminačních dávek. V současnosti se vyrábí inseminační dávky pro krátkodobé uchování po dobu 2 až 3 dní a pro střednědobé uchování po dobu 4 až 10 dní. Pro dlouhodobé uchování se provádí kryokonzervace, jejíž širší použití je však prozatím biologicky a ekonomicky limitováno.

Kvalita inseminačních dávek je ovlivněna řadou faktorů, jako jsou jednak dědičné založení, zdravotní stav, věk a kondice kance, jednak vnější vlivy, mezi něž počítáme zejména úroveň výživy a napájení, mikroklimatické podmínky, způsob ustájení a ošetřování. V neposlední řadě ovlivňuje jakost inseminačních dávek i způsob získávání, hodnocení a zpracování kančího spermatu. Pro chovatele z toho vyplývá nutnost věnovat pozornost všem těmto faktorům, neboť chyba v kterémkoli z nich se může negativně projevit na výsledné jakosti inseminačních dávek a následně zhoršením výsledků reprodukce.

Klíčová slova : kanec – sperma – spermie – konzervace – ředidla

SUMMARY

The aim of this work is the processing of brief literary compilation of physiology, the acquisition, the investigation and preservation of boar ejaculate.

Boar ejaculate is a cell suspension, composed of sperms, mature male sex cells, and the liquid component, called seminal plasma, formed by secretions from accessory sex glands of boars.

The production of sperms is the result of spermatogenesis, the basic process in the reproduction of boar that occurs in the seminiferous tubules of boar gonads - the testis. The subsequent ripening of sperms takes place in epididymides, where sperm acquire the capabilities of movement and fertilization. There is also a concentration and storage of sperm. Sperm belongs to the most specialized animal cells with a number of unique properties. The most important is the ability of a separate motion, the ability of the conception and the transmission of hereditary material linked to DNA.

The most widespread way of getting boar semen is a method of manual collection. Collected semen is macroscopically investigated of colour, the smell, of texture, volume and all foreign matter. Microscopically investigate sperm motility, their concentration, viability and morphology. Shall be carried out and a number of other investigative techniques, including computer. A processing of semen lies mainly in its dilution and preservation, mixing semen and production of the individual insemination doses. At present, there produced preserved semen for short-term preservation for 2 to 3 days and for medium-term retention for a period of 4 to 10 days. For long-term preservation is carried out by cryopreservation, whose wider use is being limited by biologically and economically.

Quality of insemination doses is affected by many factors, including both genetic foundation, health status, age and condition of a boar, both external influences, which we expect especially the level of feeding and watering, micro-climatic conditions of housing and care. Finally, influences the quality of insemination doses and the method of acquisition, processing and evaluation of boar semen. For farmers this implies the need to pay attention to all these factors, for an error in any of them may negatively affect the final quality of insemination doses and subsequent deterioration of the results of reproduction.

Keywords : boar – semen – sperm – preservation – diluent

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍL	1
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	2
3.1. Funkční anatomie pohlavní soustavy kance	2
3.1.1. Varlata.....	2
3.1.2. Vývodné pohlavní cesty.....	3
3.1.3. Přidatné pohlavní žlázy.....	5
3.1.4. Pyj	5
3.1.5. Spermatogeneze	6
3.1.6. Řízení reprodukčního systému.....	7
3.2. Vlastnosti kančího spermatu	8
3.2.1. Spermie	9
3.2.2. Semenná plazma	16
3.3. Odběr, hodnocení a zpracování kančího spermatu	19
3.3.1. Odběr spermatu.....	19
3.3.2. Hodnocení spermatu	22
3.3.2.1. Makroskopické vyšetření spermatu	23
3.3.2.2. Mikroskopické vyšetření spermatu	24
3.3.3. Zpracování spermatu.....	30
3.3.3.1. Ředidla kančího spermatu.....	31
3.3.3.2. Mražení spermatu	35
4. ZÁVĚR	37
5. SEZNAM LITERATURY	38

1. ÚVOD

Tak, jako ve většině evropských zemí, stejně i v České republice tvoří významnou část zemědělské výroby chov prasat, který zajišťuje výrobu přibližně poloviny spotřeby masa. Pro zajištění tohoto úkolu v současné nelehké ekonomické situaci je třeba, aby se chovatelé prasat vyrovnali s několika základními podmínkami. Jednou z nich je reprodukce. Dosažení výborných výsledků v reprodukci prasat je nezbytností pro úspěch v dalších oblastech chovu prasat a je stěžejní pro ekonomiku celého chovu.

Úroveň reprodukce závisí jednak na podmínkách odchovu prasnic a jejich kvalitě, jednak na úrovni odchovu a kvalitě plemenných kanců. Reprodukce prasat v dnešním zemědělství je v převážné míře založena na umělé inseminaci, proto její výsledky závisí také na kvalitě inseminačních dávek, tedy na kvalitě odebraného a konzervovaného kančího ejakulátu.

2. CÍL

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování stručné literární kompilace problematiky fyziologie, získávání, vyšetřování a konzervace kančího ejakulátu. Práce se zaměřuje na tři oblasti, a to na funkční anatomii pohlavní soustavy kance, vlastnosti kančího spermatu a odběr, vyšetřování a zpracování kančího spermatu.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1. Funkční anatomie pohlavní soustavy kance

Pohlavní orgány kance se skládají z pohlavních žláz, vývodných cest, přídatných pohlavních žláz a kopulačního orgánu (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Reprodukční orgány kance mají plnit tři hlavní funkce. Za prvé produkci spermií ve varlatech, za druhé zrání, uchování a transport spermií, a za třetí uložení spermatu v pohlavním ústrojí prasnice prostřednictvím penisu. Podobně kančí hormony mají tři funkce, a to řízení spermatogeneze, ovlivňování samčího chování (libido, agrese) a vývin samčích tělesných znaků (Noakes et al., 2001).

V pubertě jsou všechny složky reprodukčního ústrojí natolik vyvinuté, že umožňují funkci celého systému jako celku. Věk, při kterém reprodukční ústrojí dosáhne plné sexuální zralosti a kanec je považován za sexuálně dospělého je asi 30 týdnů (Hafez and Hafez, 2000).

3.1.1. Varlata

Kančí varlata jsou umístěna v šourku, téměř v horizontální poloze. Jsou velká, ale poměrně měkká (Gordon, 1997). Jsou uložena v cavum vaginale, jenž je vyplněno menším množstvím serózní tekutiny stejného složení jako tekutina břišní dutiny. Jejich podélná osa probíhá šikmo, hlavový konec směřuje ventrokranálně a margo liber (volný okraj) ventrokaudálně (Gamčík a Kozumplík, 1984). Hmota varlat je tvořena dvěma hlavními druhy tkání: semenotvornými kanálky a intersticiální tkání. Lumen semenotvorných kanálků obklopují dvě řady buněk semenotvorného epitelu. Jsou to Sertoliho buňky (Noakes et al., 2001), sahající od bazální membrány po lumen semenotvorných kanálků, jejichž boční buněčné membrány tvoří tzv. krevní varletní bariéru (Pinart et al., 2000), a zárodečné buňky v různém stádiu vývoje. Od intersticiální tkáně je odděluje bazální membrána s myoidními buňkami. Intersticiální tkáň se skládá z množství Leydigových buněk, krevních a drobných lymfatických cév, buněk a vláken pojivové tkáně (Noakes et al., 2001; Franca et al., 2005).

Tyto tkáně plní dvě různé funkce. V točitých semenotvorných kanálkách se vytváří spermie - činnost exkretorická (Gamčík a Kozumplík, 1984), přičemž Sertoliho buňky poskytují chráněné prostředí pro vyvíjející se zárodečné buňky rozdělením semenotvorných kanálků pomocí těsného bazálního spojení, vyživují je a uvolňují poslední spermatidy do

lumen kanálků (Franca et al., 2005). V intersticiální tkáni, v Leydigových buňkách se vytváří androgeny - činnost inkretorická (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Po embryonálním vývoji v břišní dutině se varlata stěhují směrem ke svému konečnému umístění v šourku. Tento proces je nazýván sestup varlat a dochází k němu asi po 85 dnech březosti (Noakes et al., 2001).

Občas varlata do šourku nesestoupí. Tento jev nazýváme kryptorchismus. Za těchto podmínek není dosaženo zvláštních termálních potřeb pro varlata a nadvarlata, přestože endokrinní funkce varlat je neporušena. Proto má oboustranný kryptorchid více nebo méně normální sexuální chování, ale je sterilní. Příležitostně mohou některé břišní orgány projít otvorem při vaginálním procesu a dostat se do šourku. Dochází tak k šourkové kýle, která je u prasat poměrně běžná (Hafez and Hafez, 2000).

U kance je šourek umístěn přímo pod řitním otvorem (Gordon, 1997). Je to důležitý termoregulační orgán, který reaguje na chlad smrštěním a na teplo uvolněním stěn (Gamčík a Kozumplík, 1984). Pro účinnou funkci musí varlata udržovat teplotu nižší, než je teplota celého těla (Hafez and Hafez, 2000). Vyšší teploty však nemají vliv na inkretorickou činnost varlat, tedy na produkci samčího pohlavního hormonu (Gamčík a Kozumplík, 1984). Anatomická stavba varlat a šourku dovoluje regulaci teploty varlat. Kůže varlat je bohatě vybavena rozsáhlými potními žlázami, a její svaly umožňují upravit sílu a povrch varlat a měnit blízkost kontaktu varlat s tělní stěnou. U všech hospodářských zvířat tvoří varletní tepna složitou strukturu ve tvaru kuželu, jehož základna se opírá o jeden z pólů varlat. Tepenná krev, přicházející do varlat je ochlazována žilnou krví opouštějící varlata. Uložení žil a tepen blízko povrchu varlat pomáhá zvětšovat přímou ztrátu tepla z varlat. U kance není šourek tak zavěšen jako u jiných zvířat, je více přisedlý k tělu a pocení je méně účinné (Hafez and Hafez, 2000).

3.1.2. Vývodné pohlavní cesty

Semenotvorné kanálky končí v rete testis, v němž ústí 10 až 12 vývodných kanálků a spojuje se v nadvarletní trubici (Gordon, 1997).

Nadvarle je důležitý reprodukční orgán, ve kterém nezralé spermie po vytvoření ve varlatech prochází konečným dozráváním a získávají zde oplozovací a pohybové schopnosti (Noakes et al., 2001; Maňásková-Postlerová et al., 2011). Skládá se z hlavy, uložené blízko semenného provazce, uprostřed umístěného těla a ocasu, který přechází v chámovod. Vlastní nadvarle tvoří jednoduchá, vysoce stočená nadvarletní trubice (Noakes et al., 2001), o

průměrné délce 63 m (Gordon, 1997), podle jiných pramenů 54 m (Hafez and Hafez, 2000). Spermie jsou posunovány přes její lumen peristaltickými pohyby svalnaté stěny nadvarleční trubice. Tkáň nadvarlete má velmi aktivní sekreční a absorpční činnost (Maňásková - Postlerová et al., 2011). V hlavě nadvarlete dochází k odnímání tekutiny, která vyplavuje spermie z varlete, a k zahuštění spermií (Gamčík a Kozumplík, 1984). Každá část nadvarlete sekretuje jiné komponenty, nejaktivnější je hlava a tělo nadvarlete, kde se syntetizuje asi 80 % složek nadvarleční tekutiny (Gatti et al., 2004). Nadvarleční tekutina obsahuje ionty, aminokyseliny, malé organické molekuly, proteiny, glykoproteiny a velké množství enzymů. Během průchodu nadvarletem jsou spermie přímo vystaveny působení této nadvarleční tekutiny. Složky této tekutiny, zejména proteiny, mají okamžitý vliv na zrání spermií nebo se mohou vázat na povrch spermií a hrát roli v dalších krocích reprodukce jako kapacitace, rozpoznání gamety, navázání se a průnik zónou pellucidou (Maňásková-Postlerová et al., 2011). Je známo více než sto proteinů, produkovaných nadvarletem, mezi hlavní patří například laktoferrin, klusterin, manosidáza, hexosaminidáza. Mnoho z těchto proteinů, obsažených ve spermatu bylo popsáno jako esenciální pro oplození (např. fertilit, cyritestin atd.). Enzymy přítomné ve varleční tekutině jsou schopny kontrolovat změny na povrchu spermií. Motilita spermií v nadvarletí je vyvažována dvěmi důležitými složkami. Jednak je to zrání pohybového mechanismu bičíku, na druhé straně kontrola udržení spermií v nepohyblivém stavu (Gatti et al., 2004).

Dozrávání spermií probíhá v prvních dvou segmentech (Hafez and Hafez, 2000). Ocas nadvarlete slouží jako zásobárna plně vyzrálých spermií (Noakes et al., 2001), obsahuje okolo 75 % všech spermií z nadvarlat. Spermie uskladněné v nadvarlatech si uchovávají oplozovací schopnost po několik týdnů (Hafez and Hafez, 2000).

Činnost nadvarlete je vysoce závislá na androgenech. Proto se snížení hladiny androgenů okamžitě projeví na přerušení jejich funkce (Noakes et al., 2001).

Z ocasu nadvarlete vystupuje chámovod, který dále prochází šourkovou dutinou a tříselným kanálem do dutiny břišní, kde pokračuje směrem k močovému měchýři a na semenném hrbolku ústí do močové roury (Gamčík a Kozumplík, 1984). Chámovod je poměrně silnostěnná trubice, jež také slouží k uložení spermií a jejich postupu z nadvarlete do penisu. Chámovod spolu s nervy, žilami a tepnami zásobujícími varlata vytváří semenný provazec (Noakes et al., 2001), vedoucí z hlavy nadvarlete do tříselného kanálu (Gamčík a Kozumplík, 1984).

3.1.3. Přídavné pohlavní žlázy

U kance nacházíme tyto přídavné pohlavní žlázy: semenné včky, předstojnou žlázu (prostatu) a Cowperovy žlázy. Během ejakulace vyměšují do močové roury sekret, tvořící semennou plazmu, podstatnou a důležitou součást spermatu (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Vezikulární žlázy (měchýřkovité žlázy, včky semenné) vypadají jako včky, přilehlé ke krčku močového měchýře. Jejich sekret bývá vodnatý a významně přispívá k objemu semene (Noakes et al., 2001). Jejich vývod samostatně ústí do močové trubice na semenném vrcholku (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Prostatu tvoří dvě části obepínající krček močového měchýře a močovou trubici, do níž ústí několika otvory. Její sekret je vodnatý (Noakes et al., 2001).

Bulbouretrální (Cowperovy) žlázy jsou výrazně vyvinuté, velké, cylindrické, ležící podél močové trubice (Kliment, 1983; Noakes et al., 2001). U kance dosahují délky 12 cm, výšky 15 cm a šířky 3 cm. Mají lalúčkovou strukturu a jsou ze stran zploštělé. Do močové trubice ústí na každé straně jedním vývodem (Gamčík a Kozumplík, 1984).

3.1.4. Pyj

Pyj (penis) je samčí pářící pohlavní orgán. Začíná v sedacím oblouku a pokračuje přes hráz a stydkou krajinu až do pupeční krajiny. Podkladem pyje je topořivé těleso pyje. Na hřbetu topořivého tělesa je mělký žlábek, ve kterém procházejí cévy a vazy pyje. Na spodině je mnohem hlubší žlábek, ve kterém probíhá močová trubice. Topořivé těleso je obaleno tlustou blanou z fibrózního vaziva, od níž pronikají dovnitř topořivého tělesa četné trávce, které rozdělují topořivé těleso v krypty. Do těchto krypt ústí tepenné a žilní větve, přivádějící a odvádějící krev. Na základě poměru mezi fibroelastickou tkání trávců a tkání kavernózní řadíme kančí pyj k tzv. intermediárnímu typu kopulačních orgánů s vyrovnaným podílem obou druhů tkání. Kančí močová trubice vystupuje vnitřním otvorem z močového měchýře, prochází pánevní dutinou, v sedacím oblouku vstupuje do hlubokého žlábků a ústí zevním otvorem na vrcholu žaludu pyje. Tkáň tvořící hrot pyje není příliš vyznačena (Gamčík a Kozumplík, 1984). Hrot pyje je šroubovitě zatočen doleva, jako zrcadlové přizpůsobení se tvaru děložního krčku prasnice. Tato adaptace umožňuje zachycení pyje v děložním krčku, při kterém dochází k ejakulaci přes děložní krček do dělohy (Gamčík a Kozumplík, 1984; Noakes et al., 2001).

Penis má kraniálně od šourku umístěnou protáhlou, esovitou kličku. Během erekce vstupuje do penisu poměrně málo krve, ale její tlak v době ejakulace přesahuje 40 000 mm

Hg. Díky tlaku krve je penis plně vysunut z úzkého otvoru předkožky. Vyrovnání esovitě kličky a pohyb penisu vpřed je umožněn velmi volným uspořádáním vazivové tkáně, obepínající penis a předkožku. Kopulace u kance trvá poměrně dlouho, mezi 5 až 15 minutami. Erekcce je ukončena přerušením ischio-kavernózní svalové kontrakce, penis je zatáhnut zpět do předkožky kontrakcí retraktoru penisu, který obnoví esovitou kličku (Noakes et al., 2001).

Předkožka je ochranné kožní pouzdro na spodině břicha, ve kterém je v době klidu zatažen pyj. Je tvořena kožním obalem a vnitřním předkožkovým listem (Gamčík a Kozumplík, 1984). Je ukončena úzkým otvorem s tvrdými štětinami. V horní stěně předkožkové dutiny je otvor ústící do vejčitého vaku, prepuciálního divertikula. Předkožkový vak obsahuje směs rozkládající se moči a macerovaných epitelových buněk, která má charakteristický a velmi nepříjemný silný kančí pach (Gordon, 1997).

3.1.5. Spermatogeneze

Spermatogeneze je základní proces v reprodukci kanců, jejímž výsledkem je produkce spermií. Probíhá v semenotvorných kanálcích dospělých varlat a zahrnuje tři hlavní procesy. Nejprve poměrně nediferencovaná spermatogonie prochází mitózou, multiplikací a dělením (Noakes et al., 2001). Tato počáteční fáze se nazývá spermatocytogeneze (Youngquist and Threlfall, 2007). Následuje meiotická redukce z diploidního na haploidní genom. Nakonec postmeiotické buňky prochází morfologickou přeměnou spermiogenezí, vrcholící vytvořením hotové spermie (Noakes et al., 2001).

Spermatogonie jsou ploché buňky ležící v těsném vztahu s bazální membránou. Během diferenciacce získávají oválný profil a ztrácí kontakt s bazální membránou. Spermatocyty jsou okrouhlé buňky pohybující se z bazálního kompartmentu semenotvorného epitelu do adluminálního kompartmentu. U spermatid dochází ke komplexu morfologických změn, vedoucích ke vzniku spermií (Pinart et al., 2000).

Spermie prochází fyziologickými, morfologickými a biochemickými změnami při průchodu nadvarletním kanálkem. Doba tohoto průchodu je odhadována na dva týdny. Makromolekuly důležité pro oplozovací schopnost a pro pohyb kančí spermie jsou získány v počátečním segmentu nadvarlete. Tyto na membrány vázané molekuly jsou následně pokryty proteiny v distálnějších segmentech nadvarlete (Gordon, 1997). Tyto změny na cytoplazmatické membráně spermií pravděpodobně přispívají ke stabilizaci akrozómu během pobytu spermií v pohlavním ústrojí prasnice, redukci povrchové imunogenicity spermie a

zvýšení schopnosti cytoplazmatické membrány spermie navázat se na zónu pellucidu (Noakes et al., 2001).

Blízko hlavičky spermie zůstává zpočátku umístěn zbytek protoplazmy. Ten se v průběhu cesty na konec těla nadvarlete posunuje distálně, až se nakonec úplně ztrácí v ocasu nadvarlete (Noakes et al., 2001).

Doba trvání spermatogeneze, tj. čas mezi dělením spermatogonie a vytvořením spermie je u kance přibližně 35 dní (Youngquist and Threlfall, 2007). Průchod nadvarletem trvá dalších 8 až 14 dní (Noakes et al., 2001). Proto je možné očekávat 6 až 7 týdenní prodlevu před obnovením normálního spermioqramu po narušení spermatogeneze (Youngquist and Threlfall, 2007).

Ačkoliv spermie uskladněné v ocasu nadvarlete mají kapacitu pro pohyblivost, opravdovou pohyblivost získávají až během ejakulace. Proto spermie v nadvarleti projevují nepatrnou motilitu, která je rychle aktivována po smíchání se semennou plazmou během ejakulace (Noakes et al., 2001).

3.1.6. Řízení reprodukčního systému

Činnost reprodukčního systému je zahajována, koordinována a regulována dvěma samostatnými systémy – endokrinní a centrální nervovou soustavou. Nervová soustava řídí tělesné funkce pomocí rychlých elektrických impulsů, endokrinní soustava užívá chemických látek a hormonů (Hafez and Hafez, 2000).

Pohlavní orgány kance jsou inervovány vlákny autonomních (sympatických a parasympatických) nervů, vystupujících z oblasti pánevní nervové pleteně. Do varlat vstupují nervy semenným provazcem podél varletní tepny. Aferentní vlákna z šourku a předkožky vedou hlavně v genitofemorálním nervu (Hafez and Hafez, 2000). Ejakulační reflex je stimulován nervovými senzory v žaludu, odkud je dorzálním nervem přenášen vzruch do míchy. Poté je erekce a ejakulace koordinována jako spinální reflex v dolní bederní páteři (Noakes et al., 2001).

K nejdůležitějším hormonům, ovlivňujícím reprodukční soustavu kanců patří: Gonadotropní releasing hormon reagující na negativní zpětnou vazbu z gonád. Patří k neurohormonům, stimuluje uvolňování FSH a LH. Folokulo-stimulační hormon (FSH) stimuluje spermatogenezi. Luteinizační hormon (LH) stimuluje sekreci testosteronu. Je produkován hypofýzou. Testosteron je produkován Leydigovými buňkami ve varlatech. Podporuje růst, vývoj a funkci přídatných pohlavních žláz, vývoj druhotných pohlavních

znaků, sexuální chování, libido, stimuluje pozdní fáze spermatogeneze, prodlužuje životnost spermií v nadvarlatech, má anabolické účinky. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ je sekretován téměř všemi tkáněmi těla, pomáhá při transportu spermií v pohlavních cestách prasnice. Aktiviny jsou obsaženy v tekutině rete testis, stimuluji sekreci FSH. Inhibiny byly nalezeny v Sertoliho buňkách, ovlivňují hladinu FSH (Hafez and Hafez, 2000).

3.2. Vlastnosti kančího spermatu

Sperma (též semeno, chám, ejakulát) je buněčná suspenze složená ze spermií, samčích pohlavních buněk, a tekuté složky, nazývané semenná plazma, tvořené sekrety přídatných pohlavních žláz samců. Její fyziologickou funkcí po ejakulaci je zajistit proces oplození samičích oocytů II. řádu ve vejcovodu a podílet se tak na vzniku nových jedinců a na udržení druhu (Kliment, 1983; Hafez and Hafez, 2000).

Semeno kance obsahuje také rosolovitá zrna, ze kterých se po kopulaci vytváří v pohlavních orgánech samice zátka, bránící zpětnému vytékání semene z vaginy. Ejakulát kance se skládá ze tří vzájemně se lišících frakcí. První, předspermiová frakce je pravděpodobně uretrálního původu a obsahuje menší množství rosolovitých zrn z Cowperových žláz. Na celkovém objemu ejakulátu se podílí 5 - 50 % (v průměru asi 10). Druhá frakce je bohatá na spermie a tvoří 30 - 50 % objemu ejakulátu. Třetí frakce je relativně chudá na spermie a obsahuje především sekret měchýřkovitých a Cowperových žláz. Na objemu ejakulátu se podílí 35 - 60 %. Tyto tři frakce tvoří ejakulační vlnu, která se může několikrát opakovat (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Normální sperma je bílá až šedobílá tekutina, mléčně neprůhledná (Youngquist and Threlfall, 2007), převážně mléčné konzistence, nevýrazného (po vaječném bílku) nebo slabě specifického pachu (Gamčík a Kozumplík, 1984). Celkový objem spermatu se v průměru pohybuje mezi 240 až 250 ml, z tohoto objemu tvoří asi 20 % želatina a 20 až 30 % spermie (Hafez and Hafez, 2000). Objem ejakulátu je ovlivněn řadou faktorů, například. plemenem, genetickým založením, intenzitou pohlavního využívání, stupněm pohlavního vydráždění, technikou odběru, úrovní užítkovosti, krmení, ošetřování, ročním obdobím, zdravotním stavem kance a vyrovnanosti jeho organismu v daném prostředí (Věžník a kol., 2004). Normální kančí sperma má 60 až 90 % pohyblivých spermií (Hafez and Hafez, 2000). Koncentrace ve spermiové frakci se blíží 6 až 10 x 10⁸ spermií na ml, v konečné koncentraci je nižší vzhledem k objemu předspermiové a postspermiové frakce (Hafez and Hafez, 2000).

Navíc se vyskytují vrozené rozdíly mezi jednotlivými kančími spermaty (Youngquist and Threlfall, 2007). Například u plemene bílé ušlechtilé se uvádí průměrná koncentrace spermií v ejakulátu asi 221 000 spermií na 1 mm^3 , u plemene landrace 330 000 a u plemene duroc 520000 spermií na 1 mm^3 (Gamčík a Kozumplík, 1984). Normální kančí sperma obecně vykazuje méně než 15 až 20 % abnormálních spermií (Youngquist and Threlfall, 2007).

3.2.1. Spermie

Spermie patří mezi nejvíce specializované živočišné buňky (Haden et al., 2000), tvořené v semenotvorných kanálcích varlat (Hafez and Hafez, 2000). Jsou to zralé samčí pohlavní buňky, jež mají v porovnání s jinými buňkami zvláštní stavbu, podmíněnou jejím specifickým posláním – schopností samostatného, aktivního pohybu a oplozovací schopností (Marvan, 2007). Mají podlouhlý tvar, tvoří je zploštělá hlavička a ocásek (Hafez and Hafez, 2000).

Spermie přežvýkavců se tvarem, délkou, šířkou a tloušťkou podobá miniaturní tenisové raketě. Spermie kance se v základních rysech podobá spermii sudokopytníků, od býčí spermie se liší především tím, že je kratší, má užší poměr mezi šířkou a délkou hlavičky a tím, že akrozóm zaujímá větší plochu hlavičky. Kančí spermie má průměrnou celkovou délku $50 \mu\text{m}$, délku hlavičky $8,5 \mu\text{m}$, šířku hlavičky $4,25 \mu\text{m}$, délku spojovacího oddílu $10 \mu\text{m}$ a délku hlavního oddílu $30 \mu\text{m}$. Podíl hmotnosti v hlavičce je 51 % a v bičíku 49 % z celkové hmotnosti spermie (Kliment, 1983).

Mezi jednotlivými samci v rámci jednoho druhu existuje tvarová proměnlivost. Pro každého samce je však tvar hlavičky spermií relativně konstantní a pravděpodobně geneticky kódován (Věžník a kol., 2004).

Ukázalo se, že rozměry hlavičky spermií se mění v závislosti na sexuálním vývoji kance. Spermie kanců nad 18 měsíců mají delší hlavičku, ale šířku, plochu a obvod mají menší než mladí kanci (Quintero-Moreno et al., 2009).

Hlavička spermie kance je téměř pravidelně oválný, ze stran zploštělý útvar, který je na apikálním konci širší a v místě spojení s bičíkem se zužuje (Kliment, 1983). Základní složku hlavičky spermie tvoří jádro pohlavní buňky obalené jadernou membránou. Přední pól hlavičky kryje čepičkovitý obal – akrozóm. Povrch celé hlavičky i bičíku pokrývá dvojitá cytoplazmatická membrána (Marvan, 2007).

Hlavička se skládá z nukleoplazmy, struktur nukleárního původu, akrozomálního systému a postakrozomální čepičky. Vzhledem k lokalizaci dědičného materiálu v nukleoplazmě má hlavička v procesu oplodnění nezastupitelné místo (Kliment, 1983).

Akrozóm je membránový útvar, pokrývající u kance až 70 % jádra (Věžník a kol., 2004), který je zakončen ekvatoriálním segmentem poloměsíčitého tvaru. Akrozóm má podobu čepičky z velmi jemné dvojité blanky, jejíž vnější membrána se přikládá k cytoplazmatické membráně a vnitřní membrána přiléhá k jaderné membráně. Je to důležitý aparát, který určuje tvar hlavičky. Má významnou úlohu při oplodnění (Marvan, 2007). Uvnitř akrozómu se nachází akrozómová hmota obsahující množství mukopolysacharidů vázaných na bílkovinu, fruktózu, manózu, galaktózu a hexosamin. Dále obsahuje lipidy, draslík, alkalickou a kyselou fosfatázu aj. (Kliment, 1983) a řadu enzymů (hyaluronidáza, proakrozín, akrozín aj.), podílejících se na pronikání spermie do ovoplazmy při oplození vajíčka (Marvan, 2007). V akrozómech spermií byla zjištěna také proteináza samčího semene. V semeni kance byly zjištěny dvě formy proakrozínu a tři druhy akrozínu (alfa, beta a gama), které se od sebe liší molekulární hmotností. Nacházejí se jen v akrozómu spermií. V čerstvém ejakulátu kance se nachází převážně jen proakrozín. K aktivaci akrozínu dochází během kapacity v samičím pohlavním ústrojí. Akrozín zjišťujeme v semenné plazmě i po porušení akrozómu v průběhu konzervace semene (Gamčík a Kozumplík, 1984). Zadní část akrozómu je identická s ekvatoriálním segmentem nebo se střední částí hlavičky spermie (Kliment, 1983). Ekvatoriální segment zahajuje fúzi s membránou oocyty při oplození (Hafez and Hafez, 2000). Je zde snížený obsah akrozomální hmoty (Věžník a kol., 2004). Na konci této části obě membrány splývají. Akrozóm nemá tak pevnou konzistenci jako ostatní části hlavičky spermie. Je citlivý na osmotické změny venkovního prostředí (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Akrozóm je penetrační orgán, který umožňuje proniknutí spermie do vajíčka působením akrozomálních enzymů, které účinkují při penetraci. Buňky zevního obalu oocyty II. řádu (corona radiata) jsou pevně k sobě tmeleny kyselinou hyaluronovou. Po prasknutí akrozomální membrány depolarizuje akrozomální hyaluronidáza kyselinu hyaluronovou, která tmelí buňky corony radiaty, ty se od sebe oddělí a tak může spermie proniknout k zoně pellucidě. Akrozín se potom podílí na proniknutí spermie do jádra přes zonu pellucidu a vlastní cytoplazmatickou membránu. Akrozóm je velmi labilní systém, který se snadno poškodí při patologických procesech na pohlavním ústrojí, ale i při náhlých změnách osmotického tlaku, pH, při náhlých termických změnách při procesu ředění a konzervace spermatu. Spermie kance jsou citlivé na hluboké zmrazování, při kterém je poškozeno velké množství akrozómů. Akrozóm spermie však může být poškozen i při styku s neadekvátním cervikálním hlenem nebo neadekvátním děložním prostředím. Pak dochází k vážným degenerativním změnám, které jsou charakterizovány nabobtnáním akrozómu, jeho

zřasením, prasknutím, svlečením aj. V takových případech zaniká oplozovací schopnost spermie, i když si spermie uchovává svůj aktivní pohyb (Kliment, 1983).

U normálních spermii je akrozom sotva vidět. Po poškození cytoplazmatické membrány přijímá vodu, nabobtnává a stává se viditelným. Může se uvolnit nebo praskat (Kliment, 1983).

Na kaudálním konci akrozómu se vytvoří substance zvaná nukleární prstenec (Marvan, 2007). Postakrozómová čepička obaluje zadní část jádra od ekvatoriálního segmentu po bázi (asi 40 % délky jádra). Má miskovitý tvar a proto se nazývá miska. Skládá se z jednovrstevné palisády mikrotubulů. U zadního okraje jádra se připojuje k jaderné a cytoplazmatické membráně. Mezi postnukleární čepičkou a jadernou membránou je nepravidelná vrstva hustého materiálu. Mezi apikálním koncem jádra a akrozómem se nachází tyčinkový útvar označený jako perforatórium (Kliment, 1983).

Celé jádro hlavičky spermie vyplňuje nukleoplazma, která je při malém zvětšení homogenní a při velkém zvětšení má zrnitě vláknitý charakter (Marvan, 2007). Je nositelem otcovského dědičného materiálu vázaného v kondenzované formě na DNA, která se váže na bazální nukleoprotein. V jádře se nachází chromozómy (haploidní počet s jedním sex-chromozómem) v chromatinové formě. V nukleoplazmě spermii můžeme příležitostně pozorovat větší či menší prázdná místa, tzv. vakuoly, nejčastěji na apikálním okraji a v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Průměrná délka jádra kančí spermie je 8,3 – 9,1 μm a průměrná šířka 4,2 – 5,0 μm . Struktura jádra je homogenní, kompaktní. V jádru spermii je otcovský dědičný materiál v kondenzované formě vázán na kyselinu desoxyribonukleovou (DNA), ze které je tvořen hustě nahloučený chromatin (Kliment, 1983). DNA tvoří přibližně polovinu chromatinu, druhou polovinu tvoří proteiny (Hafez and Hafez, 2000). Jádro je uzavřeno v dvojité nukleární membráně, která je velmi elastická, a je velmi nesnadné ji poškodit fyzikálními prostředky. Jádro spermie kance obsahuje průměrně $2,62 \cdot 10^{-12}\text{g}$ DNA (Kliment, 1983). Změna obsahu DNA, stejně jako její poškození, může vést k poruchám až k úplné ztrátě oplozovací schopnosti spermii (Gamčík a Kozumplík, 1984). U samců s poruchami plodnosti klesá hodnota DNA v jádru až na polovinu. Jako protiklad k DNA není kyselina ribonukleová (RNA) přítomna v nukleoplazmě vyžralých spermii (Kliment, 1983).

Proteiny vázané na DNA v jádru spermie jsou bazického typu a jde o protamíny a histony (Kliment, 1983), důležité pro kondenzaci a stabilizaci DNA v chromatinu (Hafez and Hafez, 2000). Během spermiogeneze přetváří vysoce kondenzované jádro spermie do kompaktního hydrodynamického tvaru umožňujícího spermii pohyb a průnik do oocytu (De

Jonge and Barratt, 2006). Kromě bazických protejnů obsahuje jádro vždy také nějaké nebazické nebo reziduální proteiny. Ty na rozdíl od protaminů a histonů obsahují tryptofan jako charakteristickou aminokyselinu (Kliment, 1983).

Na sagitálním řezu hlavičky jsou útvary lamelové struktury, ležící paralelně s délkou konvexní části spermie. Na jejich povrchu jsou smyčkovitá zdrsnění, která zabezpečují kompaktní vazbu membrán. Jádro obaluje hrubá elastická jaderná blána. Tvoří dvojvrstevný obal, na kterém je možno vidět výrazné invaginace mezi hlavičkou a bičíkem. Na malém prostoru v okolí bazálních tělísek se nachází jaderné póry. Předpokládá se, že v tomto místě nastává syntéza informační RNA (Kliment, 1983).

Bičík spermie je orgán pohybu, který zprostředkuje transport spermie na místo oplození (Gamčík a Kozumplík, 1984). Mezi hlavičkou a bičíkem vzniká spojení v podobě kloubu (Kliment, 1983). Bazální část hlavičky je prohloubená v podobě implantační jamky hlavičky, do níž se vkládá hlavice bičíku, která slouží ke spojení bičíku s hlavičkou (Marvan, 2007). Implantační jamka hlavičky přesně kopíruje implantační hlavici bičíku (Kliment, 1983).

Skladba bičíku je uzpůsobena k pohybu spermie. Přední konec bičíku zasunutý do implantační jamky zesílené bazální ploténkou tvoří proximální a distální centriol a po jeho stranách segmentové provazce. Plně zachovalý proximální centriol se nachází v homogenní cytoplazmatické hmotě v implantační jamce hlavičky. Tato část je někdy označována jako krček nebo centriolový či implantační oddíl. Část distálního centriolu je na konci spojovací části bičíku a tvoří tzv. prstenec. Na distální centriol navazuje osové vlákno (axonema), které tvoří podklad celého bičíku a má stejný charakter jako v řasince. Osové vlákno je obklopeno útvary rozdělenými podle oddílů bičíku. Popisujeme tak spojovací, hlavní a koncovou část bičíku. Středem osového vlákna probíhá centrální dvojice mikrotubulů, obklopená vnitřním kruhem devíti dvojic filament (Marvan, 2007). Tyto dvojice jsou označovány jako dublety, složené z elementu A, který je pevné vlákno a elementu B, tvořeným dutým mikrotubulem. Z každého elementu A vystupují dvě styčná raménka k elementu B sousední dublety. Raménka obsahují bílkovinu dynein, která se účastní v procesu pohybu bičíku (Věžník a kol., 2004). Na povrchu osového vlákna probíhají téměř celým bičíkem (mimo koncovou část) hladké provazce, uspořádané na příčném řezu do vnějšího kruhu. Tyto hladké provazce mají podobu devíti silných, plných podélných vláken, která v proximálním úseku bičíku mají segmentovaný charakter. Tvoří zde již výše uvedené segmentové provazce (Marvan, 2007).

Spojovací (mitochondriální) část bičíku se připojuje na krček spermie a na distálním konci ho ohraničuje Jensenův prstenec (Kliment, 1983).

Je nejsilnější, protože osově vlákno a hladké provazce obaluje mitochondriální pochva, mitochondriální membrána, vzniklá seskupením mitochondrií do souvislého, levotočivě spirálovitě probíhajícího vlákna. Mitochondriální pochva obsahuje ATP a enzymy, které jsou nezbytné pro pohyb spermie (Marvan, 2007). Je to respirační aparát spermie. Formuje se z různého počtu (65 – 90) mitochondrií. Mitochondrie spirály se liší od mitochondrií somatických buněk nejen tvarem, ale i ultrastrukturou. Vytváří se v nich mezimembránové prostory, okolo kterých se různě kondenzuje matrix. Poslední závit spirály je u Jensenova prstence, který má na podélných řezech tvar dvou rovnoramenných trojúhelníků (Kliment, 1983).

Hlavní část bičíku je nejdelší a je kryta fibrózní pochvou (Marvan, 2007). Jeho osu tvoří již zmíněná vlákna – fibrily (2 + 9 + 9). Tloušťka dvou centrálních vláken a 9 vláken vnitřního kruhu je přibližně pětkrát menší než tloušťka vláken vnějšího kruhu. Vlákna se postupně ztenčují a rozdíly v jejich síle se vyrovnávají (Kliment, 1983). Hladké provazce se postupně vytrácejí. Koncová (terminální) část bičíku má za základ jen osově vlákno (Marvan, 2007), neboť keratinoïdní spirála - helix končí na hlavní části bičíku. Osově vlákno na konci bičíku ztrácí charakteristické uspořádání, může tu být rozpleteno na jednotlivé filamenty. Celý povrch spermie pokrývá souvislá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, citlivá na osmotické poměry (Kliment, 1983).

Spermie obsahují 20 – 25 % sušiny. Více než polovinu hmotnosti spermií tvoří bílkoviny. Dále obsahují volné aminokyseliny a nerozpustné proteinové složky membrány spermie. Tyto proteiny jsou rozlišitelné vysokým obsahem síry a podobají se keratinu. Minerální látky se podílejí až 2 % na hmotnosti spermie; jsou hlavně ve formě fosforečnanů, částečně i jako chloridy a sírany. Významnou složkou je fosfor, který je vázán na DNA a na plazmalogen. Síra je vázána na thioaminokyseliny. Spermie obsahuje sodík, draslík, vápník, železo, měď a zinek. Hořčík je obsažen ve formě fosfátu a sulfátů. Železo, měď a zinek jsou převážně vázány na spojovací oddíl bičíku. Železo se vyskytuje jako hematin, hlavně ve formě cytochromu, který se podílí na oxidačních procesech. Spermie obsahuje rovněž řadu enzymů, mezi něž patří dehydrogenázy, hyaluronidáza, akrozin, adenzin trifosfatáza, hexokináza, acetylcholinesteráza, nukleáza, cytochromoxidáza aj. Hlavičku, krček a spojovací část bičíku pokrývá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která je bohatá na cystin, arginin a histidin. Je acidorezistentní a u živé spermie permeabilní. Je velmi citlivá na změny osmotického tlaku a lehce se porušuje již např. vypíráním spermií v roztoku NaCl. Tím jsou odkryty labilní enzymové systémy – akrozóm a mitochondriální spirála, s odumřením spermie vzrůstá permeabilita membrány. Tento jev je podkladem vyšetření na živé a mrtvé spermie.

Zatímco živé spermie nepřijímají barvivo, mrtvé spermie se obarví např. eozinem (Kliment, 1983).

V ocasu nadvarlete jsou spermie v částečné anabióze připraveny k ejakulaci a svoje fyziologické vlastnosti si zde uchovávají po dobu 3 – 4 týdnů. Pokud nedojde k ejakulaci, spermie degenerují, odumírají a dochází k jejich resorpci. Fyziologické vlastnosti spermií jsou dány jejich morfologickou strukturou a cytochemickým složením, které podmiňují tři základní funkce spermií. Za prvé se spermie svým aktivním pohybem (ale i za pomoci děložních stahů) musí dostat na místo oplození vajíčka do horní třetiny vejcovodu. K tomu slouží pohybový orgán spermie – bičík a jeho spojovací část, která je motorem pohybu spermií. Druhým úkolem spermií je aktivně pronikat do oocytu II. řádu přes obaly – zonu pelucidu a coronu radiatu. K tomu slouží akrozóm spermií a v něm obsažené enzymy, zejména hyaluronidáza, akrozin a enzym podobný trypsinu. Třetí funkcí spermií je přenést otcovský dědičný materiál na potomka, tj. chromozómy v rozptýlené formě, které jsou vázány na základní genetickou složku DNA a které jsou obsaženy v jádru hlavičky spermie (Kliment, 1983).

Spermie přispívá do zygoty nejen otcovskými chromosomy, ale také centrozómem, perinukleární hmotou a pravděpodobně i messengerovou ribonukleovou kyselinou. Vyvolává aktivaci oocyta a tím i aktivaci mateřské hmoty, obsažené v ooplasmě (De Jonge and Barratt, 2006).

Pohyb spermie je umožněn bičíkem, který mu poskytuje pohybovou energii (De Jonge and Barratt, 2006). Bičík je spojen s hlavičkou krčkem. Spojovací oddíl bičíku je bohatý na proteiny, lipoproteidy a enzymy. Hlavní složku tvoří plazmalogen, obsahující molekulu mastné kyseliny, molekulu aldehydu mastné kyseliny a molekulu glycerylfosforylcholinu. Uvolněná mastná kyselina může být oxidována, a tak se stane endogenním substrátem, který umožňuje spermiím respiraci i pohyb po oddělení spermií od semenné plazmy a energetického zdroje (inositolu u kance). Spojovací oddíl bičíku obsahuje větší koncentraci lipidů a z nich velký podíl reprezentuje lipoproteid. Zde je také lokalizován cytochromatický systém, který je nejdůležitější pro respirační funkce spermií. Cytochemicky je zde možno prokazovat endogenní dehydrogenázy. Většina enzymů řídících aerobní a anaerobní metabolismus spermií je obsažena ve spojovacím oddílu a zvláštní výjimku tvoří právě hyaluronidáza, která je lokalizována v akrozómu. Osová vlákna bičíku, jejichž kontrakcemi je umožněn pohyb spermií, se skládají ze 2 druhů disulfidových polypeptických řetězců. Řetězce o vysoké molekulární hmotnosti (42 000 – 72 000 daltonů) jsou bohaté na kyseliny asparagovou, glutamovou a Lucin. Řetězce o nízké molekulární hmotnosti (28 – 31 000

Daltonů) jsou bohaté na cystin a prolin. Ve spojovacím oddílu je vyšší koncentrace lipidů, z nichž velký podíl reprezentuje lipoprotein. Zde je lokalizován cytochromatický systém, který je nejdůležitější pro respirační funkce spermií (Kliment, 1983). V procesu výměny látkové a dýchání spermií se uplatňuje také enzym indofenoloxidáza a cytochromoxidáza (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Pohyb spermií je vyvoláván kontrakcemi osových vláken bičíku, kinetické impulsy vycházejí z bazálních tělísek na krčku spermie a spermie ke svému pohybu potřebuje energetický zdroj (fruktózu, inositol, ergothionein apod.), který může získávat i ze svého prostředí, a dále enzymy (dehydrogenázy), které jsou lokalizovány ve spojovací části bičíku. Po jejich vypotřebením nebo toxické blokadě (např. Zn) dochází k zástavě pohybu spermií (Kliment, 1983).

Pohyb spermií je ovlivňován řadou dalších faktorů. Z endogenních faktorů je to například věk kance, čas skladování spermií v nadvarlatech, doba mezi a po ejakulaci. Dále je to morfologická, fyziologická a biochemická zralost spermií, zásoba a transport energie, povrchově aktivní látky jako protilátky, receptory, aglutinační faktory. Z exogenních faktorů jsou to například teplota, pH, viskozita, osmotický tlak, nadvarletní tekutina, semenná plazma, tekutiny pohlavního ústrojí prasnice, stimulace a inhibice hormony, farmatiky, anorganickými ionty (Cu, Zn, Cd, Mn, Hg), zplodinami vylučování a enviromentální znečištění (Hafez and Hafez, 2000).

Spermie u domácích zvířat vykonávají rotující pohyby kolem podélné osy spermie. Za 1 s spermie provedou 3 – 15 otáček a fyziologický pohyb spermie směřuje progresivně vpřed za hlavičkou. Dříve převládal názor, že čím rychlejší je pohyb, tím kvalitnější je spermie. Po poznání procesu dekapacitace je však pro fertilizační schopnost spermií významnější časový interval, po který si spermie uchovávají svůj progresivní pohyb. Při velmi rychlém a intenzivním pohybu spermie rychle ztrácejí své enzymy a takové sperma musí být po odběru co nejrychleji uvedeno do anabiózy. Různými autory byla sledována rychlost pohybu spermií. Variace uvedených průměrných hodnot se pohybovaly až $\pm 30\%$. Schopnost pohybu spermií u kance se uvádí 2,5 mm za 1 minutu. Při pohybu se odbourávají sacharidy (fruktolýzou, glykolýzou) a vytvářejí se kyselina pyrohroznová, kyselina mléčná a CO_2 . Proces respirace probíhá pouze za přítomnosti kyslíku. Přitom dochází postupně k okyselení spermatu, poklesu hodnoty pH a k následnému zastavení pohybu spermií. Energie uvolňovaná při odbourávání fosforylovaných cukrů se kumuluje v makroenergetických vazbách adenozintrifosfátu (ATP). Pouze 40 % volné energie, která se může uvolnit při přeměně glukózy na kyselinu mléčnou, může být spermii využito. Při

respiraci (dýchání) mohou spermie získat energetické zdroje za přítomnosti kyslíku přeměnou kyselin mléčné a pyrohroznové za vzniku CO_2 a H_2O (exogenní dýchání). Ztráta energetických zdrojů je rychlá. Proto musí spermie využívat i sacharidy, kyselinu mléčnou a plazmalogen v uterinním prostředí, jinak by nemohly uskutečnit proces dekapacitace. Při biochemické neadekvátnosti uterinního prostředí (např. nízká hladina glukózy u vysokoužitkových plemenic v poporodním období) se podstatně snižuje doba přežitelnosti spermií v samičím pohlavním ústrojí (Kliment, 1983).

Během spermiogeneze, zrání a skladování v nadvarlatech musí spermie zůstat stabilní. Aby mohlo dojít ke spojení s oocytem, musí být v době oplození její cytoplazmatická membrána v nestabilním stavu. Musí dojít k procesu, známému jako kapacitace spermií (Gadella and Harrison, 2002), skládajícího se z řady biochemických změn, při kterých spermie získají schopnost oplodnit oocyt. Kapacitace vyvolává změny ve struktuře cytoplazmatické membrány, vedoucí k její větší tekutosti a propustnosti (Vadnais and Althouse, 2011). Tento přípravný proces membránové destabilizace spermií musí proběhnout v pohlavních cestách prasnice před jejím setkáním s oocytem. (Gadella and Harrison, 2002).

Produkce spermií je silně ovlivněna věkem kance, stoupá až do stáří 3,5 roku. Plodnost kance je závislá na změnách během vývoje jedince. Časné zahájení reprodukční aktivity u mladého kance bývá příčinou snížené plodnosti v průběhu jeho celého života. Kvalita spermatu se rovněž mění v průběhu ročních období, kdy nejnižší bývá v létě (Smital, 2009). Tepelný stres způsobuje vysoké množství poškozených spermií. Období vysokých okolních teplot v kombinaci s vysokou vlhkostí může způsobit samčí sterilitu až na šest týdnů. Velké množství abnormálních spermií se objevuje v ejakulátech odebíraných v období rekonvalescence. Poskytnutí odpovídajícího stínu a čisté chladné vody pomůže minimalizovat efekty tepelného stresu (Hafez and Hafez, 2000). Také různá plemena se odlišují v jednotlivých parametrech (Smital, 2009).

Na kvalitu spermatu má velký vliv výživa. Např. nedostatek zinku může způsobit poškození až degeneraci semenotvorného epitelu a morfologické změny Sertoliho a Leydigových buněk (Cigánková a kol., 2008).

3.2.2. Semenná plazma

Semenná plazma je tvořena sekrety, produkovanými přídatnými pohlavními žlázami, u kance měchýřkovitými žlázami, prostatou a bulbouretrálními (Cowperovými) žlázami. Při

ejakulaci se tyto sekrety smísí se spermatem, tekutinou nadvarlete, chámovodu, močové trubice, a vytvoří semeno (Reece, 1998; Marvan, 2007).

Tvorba semenné plazmy v přídatných pohlavních žlázách není plynulá, tvoří se a uvolňuje reflektoricky ve chvíli odběru spermatu. Její množství z velké části závisí na produkci testosteronu a na stupni pohlavního podráždění plemeníka. Semenná plazma je za fyziologických podmínek vhodným prostředím pro život spermií, energetickým zdrojem pro aktivní pohyb spermií, má pufrovací schopnost a vyrovnává a udržuje chemickou reakci ve slabě kyselých hranicích. Semenná plazma dále ochraňuje spermie, udržuje jejich tvar, rozptýlenost a vnitřní napětí, odebírá zplodiny látkového metabolismu. U populace spermií uchovávaných in vitro jsou počet pohyblivých spermií a intenzita motility ovlivňovány semennou plazmou. Sekrety semenných váčků u kanců podporují depresivní účinek mimonadvarletních složek semenné plazmy na motilitu spermií. Tyto sekrety mají také vliv na motilitu a oplozovací schopnost spermií (Kliment, 1983).

U kance se semenná plazma podílí na objemu ejakulátu až 98 %. Z chemických látek, které obsahuje semenná plazma, je v metabolismu spermatu nutno věnovat pozornost vysokému obsahu cholinu (volný i vázaný), jenž v převážné míře tvoří u domácích zvířat glycerylfosforylcholin, který pochází většinou z nadvarletní sekrece (Kliment, 1983).

Semenná plazma obsahuje také látky, které působí i na organismus samičí a tím i na zlepšení procesu oplození (prostaglandiny aj.). Z biologicky aktivních látek se v semenné plazmě vyskytují i estrogeny a androgeny. V semenné plazmě byla prokázána i řada antigenů, z nichž některé se váží na povrch spermie při styku semenné plazmy se spermii. Antigenní vlastnosti byly však zjištěny i u spermií samotných (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Bílkoviny jako koloidy přispívají k udržení osmotického tlaku v chámu dodávají ochranu spermii proti nepříznivé činnosti elektrolytů semenné plazmy, dále se jako pufry účastní stabilizace pH semene. Specifická hmotnost semene závisí převážně na koncentraci bílkovin semenné plazmy. Čím vyšší je tato specifická hmotnost, tím lepší je pohyblivost a dlouhověkost spermií. Změny v bílkovinách semenné plazmy plemeníků s nízkou plodností jsou výrazem humorální reakce organismu. Zvýšená koncentrace bílkovin bývá v souvislosti funkčními poruchami a se záněty prostaty. Elektroforeticky lze rozlišit 11 frakcí, z nichž tři, které tvoří většinu, odpovídají sérovým alfablobulinům. Když dojde k vzestupu albuminu nad 3 %, dochází ke snížení schopnosti oplození. Je známo, že přítomnost albuminu v ředidlech, zejména z nepasterizovaného mléka, působí nepříznivě na vitalitu spermií (Kliment, 1983).

Sekret nadvarlat má poměrně vysokou koncentraci vodíkových iontů (pH 5,6 - 6,6), draslíku a oxidu uhličitého, ale nízkou koncentraci iontů chlóru, sodíku a dalších. Tato

skutečnost a nižší teplota v nadvarletí udržují u spermií stav anabiózy, takže si spermie uchovávají oplozovací schopnost i déle než jeden měsíc. Sekret obsahuje asi 1-2 % převážně nízkomolekulárních bílkovin a relativně vysoký obsah nebílkovinného dusíku a volných aminokyselin (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Sekret uretrálních žláz se vyznačuje vysokým pH (až kolem 8,0). Často bývá kontaminován i sekrety Cowperových žláz, prostaty nebo sekrety jiných částí pohlavního ústrojí, což ztěžuje přesné určení jejich chemického složení. Proto se také uvádí chemické složení předpermiové frakce, kde tvoří její nejpodstatnější složky (Gamčík a Kozumplík, 1984). Glykoproteiny sekretované bulbouretrálními žlázami se účastní ochrany a lubrikace močové roury, mohou se podílet při regulaci metabolické aktivity spermií a při zachování strukturální integrity akrozomové a cytoplazmatické membrány (Badia et al., 2005). Skupina těchto glykoproteidů se váže na homologické proteiny zony pellucidy. Jsou také spojovány s hemaglutinační aktivitou kančí semenné plazmy a předpokládá se, že hrají roly v regulaci rychlosti kapacitace spermií a jejich přežívání v reprodukčních orgánech prasnice (Parry et al., 1992).

Cowperovy žlázy produkují sekret, který má H^+ kolem 7,5 log molc, je hustý a mléčně zkalený, má bílkovinný charakter a ve styku se sekretem ostatních přídatných žláz vytváří želatinové hrudky, které ucpávají děložní krček prasnice a zamezují zpětnému výtoku semene. Sekret obsahuje N, Na, K, Ca a P (Kliment, 1983).

Prostata produkuje sekret, který obsahuje kyselou fosfatázu, volné aminokyseliny, mucinázu, transaminázu, fibrinogen aj. Je také zdrojem přítomnosti adrenalinu, prostaglandinu a vázogglandinu v semenu, které ovlivňují děložní kontrakce. Z iontů obsahuje Na, K, Ca a hlavně vysoký podíl Zn (Kliment, 1983).

Hodnota pH sekretu prostaty je u kance 7,0-8,0. Obsahuje kyselinu citrónovou 1,98 nmol/l. Sekret prostaty se podílí na celkovém objemu ejakulátu asi 30 % (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Sekret měchýřkovitých žláz je bohatý na bílkoviny, kterých obsahuje asi 10 %. Obsahuje také flaviny (0,47-7,50 mg/l), které podmiňují i silnou fluorescenci v ultrafialovém světle. U kance tvoří 10-30 % celkového objemu ejakulátu. pH sekretu kolísá v rozmezí od pH 6,7 do 7,4. V poměrně velkém množství jsou v sekretu zastoupeny sacharidy, jež slouží spermiím v ejakulátu jako hlavní zdroj energie. Hladina fruktózy v měchýřkovitých žlázách závisí na hormonální aktivitě varlat. Toho se využívá k nepřímému hodnocení androgenní aktivity jedinců, nejčastěji však ve spojení s jinými testy (např. hladiny kyseliny citrónové nebo kyselých fosfatáz). Úloha kyseliny askorbové (vitamínu C) není dosud jednoznačně

objasněna, výše její hladiny je dávana spíše do souvislosti s potencí než s plodností. Kyselina citrónová je zastoupena v poměrně vysoké koncentraci. Vyskytuje se však také v sekretu prostaty a dalších úseků pohlavních orgánů. Uplatňuje se zejména při procesech spojených s koagulací ejakulátu některých samců a částečně je také spermii metabolizována. Její funkce je v souvislosti se schopností vazby vápníku se semennou plazmou. Má i vliv na udržení osmotické rovnováhy ve spermatu, a to ve spojení s ionty Na a K. Tvorba a sekrece kyseliny citrónové se děje hlavně pod vlivem testosteronu, avšak vztah mezi hladinou kyseliny citrónové a plodností nebyl potvrzen. Inozitol je charakteristický pro sekret měchýřkovitých žláz kance. Hladina zjištěná v tomto sekretu je nejvyšší, jaká kdy byla v přírodě na stejný objem látky stanovena. V ejakulátu kance slouží pravděpodobně k udržení osmotického tlaku, protože je zde velmi málo chloridu sodného (Gamčík a Kozumplík, 1984). Nachází se zde ve volné formě a nahrazuje fruktózu jako hlavní energetický zdroj pro aktivní pohyb spermii (Kliment, 1983). Ergotionein velmi účinně chrání spermie proti paralyzujícímu vlivu těžkých kovů. V sekretu měchýřkovitých žláz byly zjištěny i četné anorganické látky : draslík 43,49 - 63,95 nmol/l, sodík 26,10 - 34,8 nmol/l, vápník 1,99 - 3,49 nmol/l, chlor 3,39 nmol/l, hořčík 4,11 nmol/l (Gamčík a Kozumplík, 1984).

3.3. Odběr, hodnocení a zpracování kančího spermatu

3.3.1. Odběr spermatu

Na inseminačních stanicích se získává ejakulát po výskoku kance na fantom. Fantom je zařízení, které imituje tělo prasnice. Některé fantomy svým tvarem či obrysem připomínají tělo prasnice, jiné vypadají spíše jako jednoduché lavice (Kliment, 1983). Odběrový fantom by měl být výškově nastavitelný a mít po stranách opory, o něž se může kanec při odběru opřít předními končetinami (Youngquist and Threlfall, 2007). Měl by být stabilní a pevně fixován k podlaze. Je velice důležité, aby byl kolem fantomu neklouzavý povrch podlahy, na kterém se může kanec při skoku bezpečně odrazit, jako dřevěné hobliny, piliny, nejlépe perforované pryžové rohože (Hafez and Hafez, 2000).

Je vhodné umístit fantom do rohu kotce nebo jedním koncem proti zdi, aby mohl být kanec snadněji na fantom naváděn. Kotec pro odběr spermatu by měl být navržený tak, aby personálu umožnil útěk na několika stranách kotce v případě, že se kanec stává agresivním. Vstup i výstup obsluhy z odběrového kotce by měl být snadný, bez nutnosti otevření či zavření branky, ale měl by omezit kance v odběrovém kotci. Odběrový kotec by měl být 1,8

až 2,4 m široký a 2,4 až 2,75 m dlouhý. Odběrový kotec s fantomem by měl být umístěn odděleně od kanců a dalších rušivých podnětů, jež by odváděli pozornost odebíraného kance od fantomu (Youngquist and Threlfall, 2007).

Mladé kance je potřeba nejprve na odběry navyknout. Někdo navrhuje umístění tzv. "zahřívacího" kotce v těsné blízkosti odběrového kotce. Ten slouží k čekání dalšího kance, který zde může pozorovat a slyšet kance při odběru. Tyto stimuly mohou pomoci rozrušit kance, který po přivedení do připouštěcího kotce reaguje rychleji na fantom a odběr semene je efektivnější (Youngquist and Threlfall, 2007).

Po přivedení do odběrové místnosti je třeba poskytnout kanci dostatek času na seznámení se s okolím. Při nácviku kance k odběru na fantom se doporučuje trpělivost. Může být užitečné nechat nezkušeného kance přihlížet odběru v sousedním kotci. Jakmile kanec rozezná fantom a ukáže o něj zájem, některý snadno naskočí a začne přirážet, zatímco ostatní je třeba opatrně navádět zezadu nebo z boku k fantomu. Jemnou masáží prepucia stimulujeme erekci. Pevně uchopíme penis za spirálovitě stočený konec, tlakem prstů stimulujeme ejakulaci (Youngquist and Threlfall, 2007). Po dobu nácviku a odběru spermatu je nutno se vyvarovat náhlých pohybů a hlasitých zvuků, aby se předešlo překvapení kance a tím k přerušování odběrů narušením pohlavních reflexů kance (Kliment, 1983).

Doba nácviku by neměla být delší než 15 minut jedenkrát denně. Denní nácvik opakujeme dokud není odběr semene úspěšný. Úspěšný odběr opakujeme alespoň dva po sobě jdoucí dny, než kance zařadíme do pravidelného odběrového cyklu (Youngquist and Threlfall, 2007).

Při odběru spermatu se má použít taková metoda, která splňuje několik základních kritérií. Je to získání čistého ejakulátu, zachyceného v jeho celém objemu, neporušení životnosti, morfologie a plodnosti spermií, zabránění škodlivého vlivu na zdravotní stav a plodnost kance a zabránění rozšiřování pohlavních nákaz (Kliment, 1983; Gamčík a Kozumplík, 1984).

Semeno je možno od kance získat několika metodami. Nejstarší z nich je odběr pomocí umělé vagíny. Dnes nejpoužívanější je metoda manuálního odběru a prakticky jen výjimečně, pro diagnostické účely používaná, je elektroejakulace (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Při odběru ejakulátu pomocí umělé vagíny musí mít správně připravená umělá vagina přiměřenou teplotu, tlak a kluzkost, aby se vytvářely podněty kvalitativně shodné s podněty v pochvě prasnice. Všechny typy umělých vagín jsou v podstatě stejné. Skládají se z tuhého

válce, z elastické vložky a ze sběrače (kolektoru) různých typů, např. sáčků z PVC, připevňovaných objímkami nebo vkládaných do vagíny (Kliment, 1983).

Mezistěna umělé pochvy se plní teplou vodou tak, aby byla pochva v době odběru spermatu vyhřátá na 40 až 42 °C. Protože při krytí dochází u prasnic ke kontrakcím děložního krčku, doporučují někteří autoři měnit tlak uvnitř umělé pochvy pomocí pulsátoru. U některých typů jsou řasy krčku imitovány spirálou nebo kovovými prstenci a pružinami. Tato zařízení, včetně elektrického vyhřívání pochvy, jsou poměrně složitá, zdražují provoz, a průběh ejakulace podstatně neovlivňují (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Manuální odběr semene je nejobvyklejší metoda odběru kančího spermatu, kdy je odběr prováděn tlakem na penis, vyvinutý prsty ruky v rukavicích z nespermicidního materiálu (např. vinyl, nitril). Bylo zjištěno, že například latex je pro kančí sperma spermicidní. Odebírající pracovník by měl mít dvě rukavice na odebírající ruce. Jakmile kanec vyskočí na fantom a začne přirážet, pracovník mu začne masírovat předkožku. Masáž předkožky umožní vytlačení kontaminované prepuciální tekutiny a pomůže ztopoření penisu (Youngquist and Threlfall, 2007). Předkožkový vak očistíme a vysušíme papírovým ručníkem (Hafez and Hafez, 2000). Po ztopoření penisu vrchní rukavici zahodíme. Nádobku na odběr spermatu (předehřátou, izolovanou, s filtrem přes otvor) držíme ve volné ruce bez rukavice, klekneme vedle kance a rukou v čisté rukavici uchopíme kance za spirálovitě stočený konec penisu. Prsty vyvíjíme stálý tlak tak, že penis je „uzamknut“ v ruce. Tento úchop napodobuje tlak děložního krčku, ke kterému dochází při přirozeném páření. Tlak na jiném místě penisu může vyvolat negativní reakce. Pokud vyvíjíme odpovídající tlak, kanec reaguje pozitivně plným vysunutím penisu (Youngquist and Threlfall, 2007). U kanců je tlak, spíše než teplota, hlavní smyslový podnět pro receptory v pyji (Gordon, 1997). Tento tlak, stimulující kance k ejakulaci, je proměnlivý, různě silný u každého kance (Hafez and Hafez, 2000).

Ejakulace u kance probíhá v několika frakcích. Začíná několika odstříky předpermiové frakce, která je průsvitná a snadno rozeznatelná, obsahuje větší množství mikrobů a je chudá na spermie. Proto ji pro účely umělé inseminace neodebíráme. Následující na spermie bohaté i chudé frakce odebíráme, přičemž gelovou frakci filtrujeme přes filtr nebo gázu na odběrové nádobce. Další hustá, mléčně bělavá neprůhledná tekutina je nazývána spermiovou frakcí. Tato je následována post-spermiovou frakcí, vzhledově podobnou předpermiové frakci, ale je méně průsvitná s větší koncentrací spermií, šedě bílé barvy (Gamčík a Kozumplík, 1984; Hafez and Hafez, 2000; Youngquist and Threlfall, 2007).

Je důležité udržovat pravidelný odběrový řád. Jak přetěžování, tak nevytížení kanců v umělé inseminaci může mít negativní dopad na plodnost prasnic (Youngquist and Threlfall,

2007). Nadměrné sexuální využívání může vést až k narušení systému, chránícímu spermie proti poškození (Bronicka and Dembinski, 1999). Proti tomu po 2 až 3 týdenním a delším klidovém období získáme, v důsledku stárnutí spermií, ejakulát horší kvality (Gamčík a Kozumplík, 1984). Doporučená frekvence odběrů u kanců při umělé inseminaci je v závislosti na libidu kanců 1 odběr týdně ve věku 6 až 8 měsíců, 1 až 2 odběry týdně ve věku 8 až 12 měsíců a více než 4 odběry za 2 týdny u kanců starších než 13 měsíců (Youngquist and Threlfall, 2007). Podle jiného schématu se od kance ve věku okolo 1 roku odebírá sperma jednou týdně. V 16 měsících je možno přejít na 5 až 6 odběrů za měsíc a ve věku 1,5 až 2 roky je možno frekvenci odběrů zvýšit na 8 až 12 měsíčně. Při snižující se koncentraci spermií je nutné počet odběrů přiměřeně snížit (Gamčík a Kozumplík, 1984). Přijatelné množství spermií se objevuje po třídní sexuální pauze, zásoba spermií se obnovuje po 5 až 7 dnech a k plnému obnovení produkce spermií dochází po 10 až 11 denním klidovém intervalu (Smital, 2009).

3.3.2. Hodnocení spermatu

Nejpřesnější hodnocení plodnosti kanců je podle procenta zabřeznutí a počtu živě narozených selat. Ačkoliv kančí sperma může splňovat několik kritérií, odpovídajících vysoké kvalitě, jeho oplozovací potenciál nemusí být optimální. Hledání jednoduchých in vitro parametrů, předpovídajících kančí plodnost stále pokračuje (Hafez and Hafez, 2000).

Dobrá kvalita kančího spermatu je základem pro uspokojujivé výsledky plodnosti stáda. Podle nejnovějších studií se běžně posuzuje každý odebraný ejakulát (Youngquist and Threlfall, 2007). Standardní metoda hodnocení plodnosti plemenných kanců, kromě přímého posuzování jejich schopnosti oplodňovat, je vyšetřování jejich spermatu. Diagnostická analýza kančího spermatu zahrnuje získání maxima informací o fyziologickém stavu testikulárních a epididymálních funkcí vyšetřováním jednoho nebo více ejakulátů (Hafez and Hafez, 2000). Základním parametrem při vyšetřování spermatu je hodnocení motility spermií, životaschopnosti a morfologie (Banas et al., 2006). Z fyziologického hlediska existuje více podmínek nutných k tomu, aby spermie oplodnila oocyt (Youngquist and Threlfall, 2007). Ejakulát kanců je přirozeně heterogenní, ne všechny spermie splňují veškeré tyto podmínky, potřebné pro oplodnění a zahájení časného vývoje embrya (Rodriguez-Martinez, 2001). K těmto podmínkám patří zejména progresivní motilita, přijatelná morfologie, schopnost projít kapacitací (např. modifikace cytoplazmatické membrány), schopnost proběhnutí akrozomové reakce (např. vezikulace, exocytóza), schopnost penetrovat cumulus investments,

schopnost navázat se a penetrovat zonu pellucidu, fúze cytopazmatické membrány spermie a ovocytu (Youngquist and Threlfall, 2007).

Při posuzování jednotlivých rysů spermií či ejakulátu jsou ve vztahu k určité míře plodnosti pokládány za nejdůležitější vzory motility spermií, složení semenné plazmy, membránová a akrozomová integrita, stupeň stability chromatinu a množství obsažených nekapacitovaných spermií (Rodriguez-Martinez, 2001). Předpovědní hodnota jednotlivých semenných parametrů na zabřeznutí a plodnost je velmi malá. Na druhou stranu předpovědní hodnota určitých sdružení různých semenných parametrů je významná (Vyt et al., 2008). Protože tyto semenné vlastnosti působí komplexně, je jasné, že ideálně by stanovení kvality spermatu mělo obsahovat testy na všechny tyto jednotlivé atributy. Bohužel praktický a jednoduchý in vitro test, prováděný před zpracováním spermatu, který by byl schopen určit jeho kvalitu (např. oplozovací potenciál), je ještě stále ve vývoji. Několik in vitro testů je již dostupných, avšak vyšetřují pouze jednotlivé vlastnosti spermií nezbytné pro přirozené oplození. Ačkoliv jednotlivě mají tyto testy omezenou použitelnost při určení oplozovacího potenciálu, dohromady mají schopnost určit zjevně slabou kvalitu spermatu (Youngquist and Threlfall, 2007).

Standardní test hodnocení kančího semene zahrnuje zběžné vyšetření barvy a pachu, podrobnější analýzu motility spermií, morfologii spermií, koncentraci spermií, objem a celkový počet spermií (Youngquist and Threlfall, 2007). Vzoroky odebíráme suchými, sterilními pomůckami do 15 minut po odběru, teplota spermatu nesmí klesnout pod 30 °C. Barvu, pach a konzistenci hodnotíme smyslově, cizí příměsi smyslově i mikroskopicky (ČSN 467114, 1996).

3.3.2.1. Makroskopické vyšetření spermatu

Po odběru by měla být u ejakulátu vizuálně posouzena barva (Youngquist and Threlfall, 2007). Ta musí být mléčně bílá až šedobílá (ČSN 467114, 1996). Pokud u ejakulátu pozorujeme abnormální barvu (např. hnědou, žlutou, červenou), očekáváme jeho znečistění. Poněvadž mnohá z těchto znečistění vykazují spermicidní aktivitu, musí být tyto ejakuláty vyřazeny (Youngquist and Threlfall, 2007). Kančí sperma nesmí obsahovat cizí příměsi jako krev, moč, hnis, tekutinu prepuciálního vaku a jiné nečistoty (ČSN 467114, 1996).

Konzistence ejakulátu závisí na koncentraci spermií. Většinou bývá konzistence mléčná, velmi husté ejakuláty mají konzistenci smetanovitou a řídké ejakuláty zcela vodnatou (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Stanovení objemu spermatu je jeho základní a nejsnadnější vyšetření (Věžník a kol., 2004). Obecně minimální objem pravděpodobně plodného kančího spermatu by měl být nejméně 60 až 75 ml (Hafez and Hafez, 2000). Objem spermatu se mění s věkem kance a u dospělého jedince nesmí být jeho filtrovaný podíl menší než 100 ml (ČSN 467114, 1996; Věžník a kol., 2004), u mladých kanců do věku 12 měsíců nesmí být menší než 80 ml (ČSN 467114, 1996). Stanovuje se pouze objem z frakcí určených k použití. Objem se měří v kalibrovaných odměrných nádobách nebo vážením netto hmotnosti ejakulátu (Věžník a kol., 2004) s přesností ± 10 ml nebo ± 10 g (ČSN 467114, 1996).

Kančí ejakulát musí být bez zápachu (ČSN 467114, 1996), případně má nevýrazný nebo slabě specifický pach. Ostře páchnoucí ejakulát bývá většinou znečištěn močí nebo sekretem prepuciálního váčku. Hnilobný pach ukazuje na zánětlivé procesy pohlavních orgánů (Gamčík a Kozumplík, 1984).

3.3.2.2. Mikroskopické vyšetření spermatu

Na velikost vrhu a počet živě narozených selat má významný pozitivní vliv procento pohyblivých spermií. Přesné vyhodnocení motility inseminační dávky je proto důležité pro odhad plodnosti (Vyt et al., 2008). Hodnocení pohyblivosti spermií se provádí u čerstvého i naředěného spermatu. Hodnocení čerstvého spermatu je ukazatelem výkonnosti spermií ve vlastním roztoku pohlavních žláz. Motilita spermií je extrémně citlivá na podmínky prostředí, proto je nezbytné chránit sperma před analýzou proti chemickému (voda, zbytky mýdla, líh), tepelnému (nadměrné teplo a chlad) a světelnému (ultrafialové záření) znečištění (Hafez and Hafez, 2000; Youngquist and Threlfall, 2007).

Procento pohyblivých spermií obvykle zjišťujeme pomocí mikroskopické analýzy světelným mikroskopem se zabudovanou nahřívací destičkou a optikou s fázovým kontrastem (Hafez and Hafez, 2000). Přesnost tohoto subjektivního hodnocení vysoce závisí na přípravě vzorku, kvalitě mikroskopu, zkušenosti a přirozených schopnostech posuzovatele. K minimalizaci dopadů lidských omylů by měla být příprava vzorků a mikroskopické vyšetření standardizováno. Nejčastější technikou je kápnutí 7 – 10 μ l vzorku semene na mikroskopické sklíčko vyhřáté na 37 °C a překrytí krycím sklíčkem. Při prohlížení pod mikroskopem se má vzorek ukázat jako jednovrstevná vrstva buněk, ve které je snadno rozeznatelný pohyb jednotlivých spermií. V některých případech může být čisté sperma příliš koncentrované na to, aby mohlo být posouzeno bez prvotního naředění vzorku stejně velkou kapkou izotermního ředidla před přikrytím krycím sklíčkem. Pohyblivost spermií se odhaduje na

nejbližších 5 %, podle zobrazení aktivity na alespoň čtyřech různých polích na sklíčku při 200 nebo 400 násobném zvětšení a pak se bere průměr z těchto měření pro získání konečného odhadu motility (Youngquist and Threlfall, 2007).

Parametry motility zahrnují procento pohyblivých spermií, procento spermií s progresivním pohybem, rychlost spermií (založené na libovolném měřítku od 0 (bez pohybu) do 4 (rychlé), dlouhověkost pohyblivosti spermií čerstvého spermatu (při pokojové teplotě 20 až 25°C), a dlouhověkost pohyblivosti spermií naředěného spermatu při pokojové teplotě nebo při teplotě 4 až 6°C. Obecně se za pravděpodobně plodné kančí sperma považuje sperma s minimálně 65% motilitou (Hafez and Hafez, 2000). Pohyblivost a životaschopnost spermií obvykle klesá během skladování, proto má ejakulát vykazovat alespoň 70 až 80 % hrubé motility, aby byl považován za vhodný k dalšímu zpracování (Youngquist and Threlfall, 2007), podle ČSN musí obsahovat alespoň 70 % aktivních spermií (ČSN 467114, 1996). Minimální doporučené ukazatele kvality čerstvě odebraného kančího semene zpracovávaného a užitého pro umělou inseminaci jsou hrubá motilita nenaředěného spermatu $\geq 70\%$ pro použití do 48 hodin a $\geq 80\%$ pro použití nad 72 hodin (Youngquist and Threlfall, 2007).

Jsou popisovány různé typy motility. Nejběžnějším typem motility spermií v ředěném spermatu je dlouhý polooblouk. Ředidlo může lehce změnit motilitu, obvykle zvýšením rychlosti. Po počátečním naředění může vysoké procento spermií ukázat kruhový vzor pohybu, jež se obvykle rozptýlí po 5 až 10 minutách po naředění. Pokud je mezi podložním krycím sklíčkem příliš mnoho tekutiny, objevuje se reflexní světélkování spermií jako následek jejich spirálního, převráceného pohybu vpřed. V případě malého množství tekutiny spermie předvádí pohyb ve dvourozměrném vzoru. Hyperaktivní spermie reagují tvorbou X-tvaru. Pokud spermie plavou v těsném kruhovém pohybu, značí to, že byly vystaveny chladovému šoku. Kmitavý pohyb může být definován jako stárnoucí či vysychající spermie. U neplodných kanců nebo u kanců s malou plodností je často zjišťován vibrační pohyb, kruhový, šikmý, bez progresu, mnohdy asymetrický nebo chaotický, časté jsou aglutinace spermií, minimální či žádný pohyb. Je vyvíjeno několik postupů pro objektivní, nestranné posuzování motility spermií. Časosběrné fotomikrografy umožňující vizualizaci dráhy spermií, rámeček po rámečku přehrávané videomikrografy, průtokové cytometry, které mohou detekovat viditelné spermie založené na zaslepení fluorescenčními barvivy, spektrofotometry a počítačové analýzy (Hafez and Hafez, 2000).

Analýza CASA (Computer asisted semen analysis) je poloautomatická počítačová metoda pro hodnocení morfologie a motility spermií. Používá se zejména k rozlišení

pohyblivých a nepohyblivých spermií a k analýze dráhy jednotlivých spermií. Při analýze pohyblivosti spermií jsou stanoveny tyto ukazatele: VCL (curvilinear velocity) – rychlost hlavičky na skutečné dráze, VAP (average-path velocity) – rychlost hlavičky na napřímené dráze, VSL (straight-line velocity) – rychlost hlavičky na přímé dráze mezi počátečním a konečným bodem měření, ALH (amplitude of laterál head displacemant) – maximální šířka oscilace hlavičky, LIN (linearity) – linearita skutečné dráhy, WOB (wobble) – stupeň oscilace skutečné dráhy, STR (straightness) – přímost napřímené dráhy, BCF (beat cross frequency) – kolikrát je skutečná dráha překřížena napřímenou dráhou. Je to velmi přesná metoda k určení pohybových charakteristik spermií, vyžadující správné a přesné nastavení, přípravu vzorků a vyhodnocení výsledků (Věžník a kol., 2000). Systémy pro počítačovou analýzu spermatu jsou používány v referenčních laboratořích jako objektivního způsobu hodnocení pohybu spermií. Automatické systémy jsou přesné, ale jejich relativně vysoká cena limituje jejich běžné využití v komerčních laboratořích (Hafez and Hafez, 2000).

Dalším krokem při hodnocení ejakulátu je stanovení koncentrace spermií. Nejběžnější metodou při stanovení koncentrace spermií ve filtrovaném kančím spermatu je měření stupně průhlednosti vzorku pomocí fotometru. Průsvitnost kančího spermatu závisí na počtu buněk spermií a dalších komponentů semenné plazmy, jež zasahují do průniku světla vzorkem. Kančí sperma je normálně příliš neprůhledné pro snadný průchod světla skrz. Proto malý vzorek kančího spermatu naředíme na izotonický roztok před vlastním měřením (Youngquist and Threlfall, 2007). Roztok používaný k ředění ejakulátu je 2,9 % citrát sodný a 5 ml 10 % formalínu na litr. Standardní křivka měření koncentrace oproti 0,5 % zvýšení propustnosti světla dává potřebný rozsah pro měření koncentrace. Avšak fotometry v kontaminovaném spermatu nejsou přesné a přidání zakaleného ředidla před stanovením koncentrace může zkreslit výsledky (Hafez and Hafez, 2000). Aby bylo fotometrické měření relativně přesné, je nezbytné, aby kalibrace přístroje byla druhově specifická. Navíc kvůli vlastním rozdílům mezi fotometry by převodní tabulky neměly být vyměňovány mezi jednotlivými přístroji. K nepřesnostem při fotometrickém měření může dojít, pokud hodnoty spadají mimo pracovní rozsah přístroje, nebo vinou lidského omylu (např. nesprávné ředění, nesprávné zahřívání, chybná manipulace, opožděné čtení). Měla by být dodržována doporučení výrobce (Youngquist and Threlfall, 2007).

Koncentrace spermií kančího spermatu může být stanovena také pomocí ředících přístrojů a sčítací komory, hemocytometru, ačkoliv to není obvyklé (Youngquist and Threlfall, 2007). Hemocytometr je mikroskopické sklíčko s přesně narýsovanými komůrkami.

Počet spermií v komůrce je manuálně počítán. Je to metoda velmi náročná na čas, ale velmi přesná (Hafez and Hafez, 2000). Část čistého spermatu je nejprve naředěna 1 : 200 pomocí spermie –znehýbnujícího isotonického roztoku. Touto směsí je potom naplněna každá komora hemocytometru. Po pěti minutách, kdy necháme spermie usadit na povrchu mřížky, hemocytometr umístíme pod mikroskop a při 200 až 400 násobném zvětšení počítáme spermie. Počítáme minimálně 5 velkých (80 malých) čtverců ve středu (RBC) mřížky hemocytometru. Pouze hlavičky spermií (ne ocásky) dotýkající se horního a levého okraje velkého čtverce se započítávají do součtu, hlavičky dotýkající se spodního a pravého okraje se nepočítají. Ze dvou součtů se udělá průměr, pokud jsou od sebe v rozmezí 10 %. Pokud se liší více než 10 %, výpočty se zruší a hemocytometr se připraví k dalšímu počítání na dvou stranách, dokud se výsledky neliší více než 10%. Toto číslo je vloženo do vzorce dodaného prodejcem hemocytometru při ředění 1:200 k určení počtu buněk spermií v jednom mililitru semene (Youngquist and Threlfall, 2007).

Koncentraci spermií stanovujeme u každého spermatu, v české republice se provádí fotometricky, výjimečně spenziidenzimetrem podle Karase. Správnost výpočtu fotometrem kontrolujeme pomocí Bürkerovy komůrky minimálně 1 x za půl roku, spenziidenzimetrem alespoň 1 x za čtvrt roku. Koncentrace spermií nesmí být nižší než 150 000 v 1 mm³ (ČSN 467114, 1996). Obecně se za pravděpodobně plodné kančí sperma považuje sperma s koncentrací alespoň 100 miliónů spermií na 1 ml (Hafez and Hafez, 2000).

Čas potřebný pro počítání hemocytometrem v kombinaci se zdlouhavostí práce jej činí nepraktickým pro většinu laboratoří. Fotometrická analýza zůstává nejběžnější metodou pro určování koncentrace spermií v mililitru filtrovaného spermatu (Youngquist and Threlfall, 2007).

Koncentrace spermií je dále užívána k určení celkového množství spermií v ejakulátu. Celkové množství spermií se vypočítá násobením celkového objemu filtrovaného ejakulátu koncentrací spermií. Objem ejakulátu se obvykle určuje hmotností ejakulátu za předpokladu, že 1 g odpovídá 1 ml (Youngquist and Threlfall, 2007). Přesně stanovený počet spermií a objem ejakulátu určuje, kolik prasnic může být inseminováno (Hafez and Hafez, 2000).

Jakmile je určena pohyblivost spermií, měla by být vyhodnocena jejich morfologie (Youngquist and Threlfall, 2007). Každý vzorek spermatu obsahuje nějaké abnormální spermie. Morfologické abnormality spermií mají největší vztah k plodnosti hospodářských zvířat. Procento spermií s neporušenou akrozomální membránou je považováno za důležitý parametr kvality spermatu. Pravděpodobně plodné kančí sperma by mělo obsahovat méně než

20 % morfologických abnormalit (Hafez and Hafez, 2000). Kančí sperma musí obsahovat maximálně 25 % morfologicky abnormálních spermií, včetně protoplazmatických kapének (ČSN 467114, 1996).

V chovech prasat se používá dvou způsobů – mokré a suché přípravy vzorku pro objektivní kvantifikaci morfologických abnormalit spermií. Při mokré přípravě se spermie znehyní pomocí pufrovaného formaldehydu nebo roztokem glutaraldehydu. Vzorky jsou dále vyšetřovány pod mikroskopem, jenž jim poskytne jejich vlastní vnitřní kontrast (např. fázový kontrast). Různé kontrastní látky jsou používány pro suchou přípravu vzorků. Řádný kontrast zvýrazní obrys spermie, čímž umožní snadnější vizualizaci a identifikaci normálních a abnormálních spermií pod světlem mikroskopu. Na přípravu barvených kontrastních vzorků kápneme vedle sebe na podložní sklíčko stejné množství (např. 7 – 10 μ l) barviva a vzorku. Obě kapky jemně promícháme pomocí okraje druhého sklíčka. Po promíchání smíchaný vzorek tímto okrajem rozetřeme do tenké vrstvy, kterou necháme na vzduchu uschnout. Pod olejovým překrytím pak posuzujeme morfologii spermií. Při mokré i suché technice by mělo být morfologicky posouzeno a zařazeno minimálně 100 spermií (Youngquist and Threlfall, 2007).

Světelné mikroskopy dovolují omezené zvětšení a proto limitují hodnocení morfologie spermií. Jemné abnormalita ve struktuře spermií mohou být detekovány snímáním nebo přenosem elektronovým mikroskopem. Ačkoliv jsou nákladné, obě tyto mikroskopické metody nabízí vysoké rozlišení detailů dovolující bližší vyšetření morfologie spermií. Trojrozměrné zobrazení celé spermie pozorované snímáním nebo přenosem elektronovým mikroskopem dovolují zobrazení průřezu spermií odhalující detailně její ultrastrukturu (Hafez and Hafez, 2000).

Nedávno byl představen počítačově automatizovaný systém semenné analýzy specifický pro chov prasat. Kromě provedení posouzení motility a koncentrace spermií, tento systém přichází se softwarem na posouzení morfologie spermií. S pomocí technika má tento počítačový systém schopnost hodnotit ejakulát, počítat celkový počet spermií a určit množství ředidla k přidání do ejakulátu k dosažení požadovaného množství spermií v jedné dávce. Díky jejich rychlosti při posuzování semene a vzrůstající přesnosti oproti stávajícím metodám již několik velkých chovů zavedlo tento systém do provozu (Youngquist and Threlfall, 2007).

Bylo vyvinuto několik dalších testů pro posuzování kvality kančího spermatu, například různé spermio-aglutinační testy, hypo-osmotický test, test osmotické rezistence, vybrané biochemické testy spermií a semenné plazmy a fluoroforní testy. Tyto testy mohou posoudit

faktory spojené se spermií či ejakulátem jinak než získané při běžném posuzování motility, morfologie a koncentrace spermií. Kvůli časové zdlouhavosti a nákladům spojeným s prováděním těchto zkoušek, je jejich běžné používání v provozní praxi limitováno (Youngquist and Threlfall, 2007).

Test struktury chromatinu spermie (SCSA) jsou průtokové cytometrické postupy, vyvinuty pro hodnocení strukturální integrity spermiového chromatinu měřením poměrné části dvouvláknové i jednovláknové DNA v populacích spermií. SCSA může být užitečný při určení některých forem neplodnosti. SCSA může zobrazit 5 000 až 10 000 spermií během několika minut (Hafez and Hafez, 2000).

Nové fluorescenční metody byly zkoumány na hodnocení jejich spolehlivosti při funkčních testech spermií pomocí mikroskopu nebo průtočného cytometru. Tyto testy se mohou stát velmi hodnotnými doplňkovými testy kvůli jejich schopnosti poskytovat detailní informace o specifických funkcích spermií, jako je akrozomální integrita, integrita cytoplazmatické membrány a potenciál mitochondriální membrány (Hafez and Hafez, 2000).

Jednoduchou cytochemickou metodou je možno ve spojovacím oddílu bičíku prokazovat přítomnost endogenních dehydrogenáz, které se jeví jako tmavá výrazná granula, pravidelně uspořádaná v průběhu spojovacího oddílu bičíku. S postupujícím pohybem ztrácejí spermie tyto enzymy a po jejich úplné ztrátě je spermii znemožněn její aktivní pohyb. K průkazu těchto endogenních dehydrogenáz se používá tetrazoliová sůl Nitro BT (Kliment, 1983).

Další metodou zkoumání kvality spermatu je test protilátek vytvářených proti spermiím. K tvorbě těchto protilátek může docházet při imunitní odpovědi vyvolané odchodem spermií (nebo jejich haploidních předchůdců) z adluminalního oddělení semenných tubulů, imunologicky privilegovaného místa, obcházejícího imunologické útoky, v němž je dokončováno zrání spermií. Urychlujícími faktory pro tento imunologický útok mohou být tržné rány, biopsie, nádory, poranění a degenerativní změny varlat. Protilátky proti spermiím narušují oplozovací proces, ale specifické mechanismy jejich činnosti jsou stále nevyřešeny (Hafez and Hafez, 2000).

Biochemická analýza semenné plazmy, zahrnující například stanovení koncentrace elektrolytů, koncentrace bílkovin nebo specifického složení bílkovin semenné plazmy neposkytuje dobré informace pro předpověď motility konzervovaného spermatu (Hafez and Hafez, 2000).

3.3.3. Zpracování spermatu

Zpracování spermatu začíná jeho ředěním a konzervací. Úkolem konzervace je co nevíce prodloužit vitalitu spermií a zároveň zachovat jejich oplozovací schopnost. Uchování vitality a oplozovací schopnosti spermií je možné pouze ve stavu anabiózy. Při anabióze jsou silně utlumeny všechny životní pochody, zejména metabolismus a pohyblivost. Odstraní-li se podmínky, vyvolávající stav anabiózy, obnoví se životní pochody v plném rozsahu. K dosažení stavu umělé anabiózy spermií u ředěného spermatu je potřeba poznat řadu faktorů, ovlivňujících metabolismus spermií. Mezi nejvýznamnější z nich patří teplota, koncentrace vodíkových iontů, osmotický tlak, stupeň ředění atd. Za optimální je pokládáno prostředí při pH okolo 7. Nižší teploty zase umožňují zachování životně důležitých vlastností spermií po delší dobu, následkem utlumení jejich metabolismu (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Kromě prodloužení životnosti, reagují spermie na ředění počátečním zvýšením aktivity, následovaným snížením motility a nárůstem poškození membrán. Při nadměrném ředění dochází ke značné ztrátě životaschopnosti spermií, způsobené snížením koncentrace důležitých složek semenné plazmy. Tomuto jevu lze zabránit přidáním albuminu do ředidla (Johnson et al., 2000).

Mezi hlavní důvody ředění spermatu patří zvětšení jeho objemu. Kančí ejakulát obsahuje více spermií, než je potřeba k zabřeznutí. Naředěním ejakulátu umožníme jeho opakované využití na inseminaci více prasnic. Dalším důvodem je pufrovací schopnost ředidla. Spermie mají úzké rozpětí tolerance na změny pH, proto je nutné přidávat pufr do ředidel, ve většině z nich tvoří jejich podstatnou část (Noakes et al., 2001). Běžnými pufrů v kančích ředidlech jsou uhličitán sodný a citrát sodný (Gordon, 1997), v některých ředidlech chlorid draselný (Johnson et al., 2000). Třetím důvodem je udržování osmotického tlaku. Důležitá je také dodávka energie, nezbytná pro zachování metabolismu spermií po celou dobu uchovávání spermatu, zejména u nezmraženého spermatu, u něhož je potřeba energie po delší dobu. Energetické substráty u většiny ředidel jsou tvořeny jednoduchými cukry, jako glukóza, fruktóza, manóza nebo arabinóza. Dalším důvodem je zvýšení antimikrobiální aktivity. Do většiny ředidel jsou přidávána antibiotika proti přenosu patogenních bakterií a k redukci účinků nepatogenních mikroorganismů, kontaminujících sperma. (Noakes et al., 2001). Užívaná antibiotika jsou např. penicilin, streptomycin a gentamycin (Gordon, 1997).

Pokud vzorek spermatu vykazuje alespoň 65 % motilitu a méně než 20 % abnormálních spermií, může být sperma naředěno 8 díly ředidla na 1 díl spermatu pro odpovídající koncentraci pro umělou inseminaci (Hafez and Hafez, 2000). Konečná koncentrace spermií se

stanovuje na základě očekávané doby skladování spermatu před použitím. Obecné pravidlo je, že pokud ejakulát splňuje minimální kritéria pro čisté kančí sperma určené pro umělou inseminaci, potom se na každý den skladování počítá s 1 miliardou spermií v inseminační dávce (např. pokud naředený vzorek budeme skladovat 2 dny, použijí se 2 miliardy spermií/1 inseminační dávku; na 3 dny použijeme 3 miliardy spermií/1 inseminační dávku; na 4 dny 4 miliardy spermií/1 inseminační dávku atd.). V závislosti na kapacitě ředidla se používá poměr ředění od 1 : 4 do 1 : 25 (poměr spermatu k ředidlu). Pokud nemůže být pro ejakulát stanovena koncentrace spermií, měl by být použit ředící poměr 1 díl spermatu na 4 až 7 dílů ředidla, sperma by mělo být spotřebováno do 24 hodin po naředění. Pro zachování životaschopnosti čerstvého spermatu během zpracování, mělo by být použito isothermální ředidlo během procesu ředění (Youngquist and Threlfall, 2007).

Koncentrace spermií v jedné inseminační dávce by měla být v rozmezí 2×10^9 až 3×10^9 pro optimální plodnost (Hafez and Hafez, 2000). Plně naředené kančí sperma by mělo mít konečnou koncentraci spermií od 25×10^6 do 80×10^6 buněk spermií na 1 ml (Youngquist and Threlfall, 2007). Krátkodobě konzervované kančí sperma musí obsahovat nejméně $1,5 \times 10^9$ aktivních spermií v jedné inseminační dávce (ČSN 467114, 1996).

Rezistence spermií jednotlivých kanců na určitý stupeň ředění se liší a většinou se neprojevuje ihned po naředění. Nepříznivý vliv ředění se projevuje i na morfologických změnách spermií, u kterých zjišťujeme vyšší procento porušení struktury akrozómu (bobtnání). Nadměrný stupeň ředění vede také k šoku z ředění (ztrátě pohyblivosti) (Gamčík a Kozumplík, 1984).

K minimalizaci fyzického poškození spermií by naředené sperma mělo být uchováváno při teplotě nad $15 \text{ }^\circ\text{C}$, což však narušuje jeho oplozovací schopnost (Gordon, 1997).

3.3.3.1. Ředidla kančího spermatu

Ředící roztoky je možno podle účinnosti rozdělit do tří skupin na extendory, protektory a implementory. Extendory slouží pouze ke zvětšení objemu spermatu, používaného bezprostředně po odběru. Protektory mimo zvýšení objemu spermatu zajišťují jeho výživu a ochranu spermií v prostředí mimo organismus po delší dobu. Implementory jsou v podstatě protektory s přísadami látek, působících na pohlavní orgány prasnice a příznivě ovlivňující průchod spermií a oplozovací proces (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Ředidla pro uchovávání kančího spermatu jsou snadno dosažitelná u řady komerčních dodavatelů. V závislosti na typu ředidla, ředěné kančí sperma může být uchováváno po dobu 6 dní bez výrazné ztráty oplozovacího potenciálu. V poslední době jsou uváděna na trh

ředidla spermatu, jež údajně udrží životaschopnost spermií až po dobu 10 dní. Zkoušky plodnosti jsou však v současnosti nejednoznačné. Obecně většina provozních farem používá ředěné kančí sperma po dobu 3 až 4 dnů od výroby. Většina ředidel spermatu přichází v práškové formě a je rozpouštěna v destilované vodě (NCCLS/CAP Reagent Grade Type I a II). Rozpuštěné ředidlo semene by mělo být zahříváno na 37°C po dobu 45 až 60 minut, aby se vyrovnalo pH před použitím ve spermatu (Youngquist and Threlfall, 2007).

K okamžitému použití se velmi dobře osvědčuje glukózosolný roztok, ke krátkodobé konzervaci ředidla obsahující žloutek nebo mléko. Pro konzervační teplotu 10 - 16 °C se doporučuje používat ředidla obsahující chelaton - $C_{10}H_{14}O_8Na_2N_2H_2O$ (Gamčík a Kozumplík, 1984).

Jedno z mnoha běžně užívaných ředidel, vyvinutých pro inseminaci prasat, bylo založeno na etylendiamintetraacetátu (EDTA) a známé jako ředidlo Kiev (také Merk nebo Varohm). Toto ředidlo se stalo populárním pro svou jednoduchost přípravy a použitelnost kančího spermatu až po tři dny bez výrazné ztráty oplozovací schopnosti (Gordon, 1997).

K dalším ředidlům užívaným pro krátkodobou konzervaci patří např. na jednostupňové ředění BTS (JOHNSON), BL-1 (PURSEL), na dvoustupňové ředění KARE I a II, KORINAT I a II, ZORLESCO (Věžník a kol., 2000), přičemž ředidlo BTS (Beltsville Thaw Solution) patří mezi jedno z nejpopulárnějších ředidel na světě pro krátkodobé uchování kančího spermatu v kategorii ředidel s 2 až 3 denním konzervačním účinkem (Smítal, 2001). Další používaná ředidla jsou Modena, Zornobsa a Guelph. K tomu Khan at al. (2006) uvádí, že ředidla BTS a Modena jsou pro konzervaci kančího spermatu považována za vhodnější než Zornobsa a Guelph.

U nás je také používáno tekuté ředidlo Safe Cell (Farmapo, 2012) a ředidla řady VIP s obsahem širokospektrálních antibiotik Gentamycin a Neomycin. Ředidlo VIP 3 je krátkodobé, kompletní ředidlo kančího spermatu s možností použití inseminačních dávek do 3 dnů po naředění (Hema, 2012). Pro prodloužení přežitelnosti spermií při krátkodobé konzervaci se doporučuje používat ředidla ANDROHEP (Věžník a kol., 2000). Androhep Endura Guard je ředidlo s použitím inseminační dávky 7.-10. den. To umožňuje větší využití ejakulátu, kdy je možno uchovat a distribuovat navíc vyrobené inseminační dávky, konzervovat i přebytečné množství ejakulátu, využít i tzv. kondiční skoky, otestovat inseminační dávku např. na PRRS ještě před použitím v chovu apod. Androhep Plus je nové ředidlo obsahující speciální ochranný faktor, projevující se zvýšenou odolností proti teplotním vlivům a ochranou membrány akrozomu (Selko, 2012).

Na náš trh je uváděno více ředidel odvozených od Androhepu. Androstar a Androstar Plus jsou levnějšími variantami ředidla Androhep s použitím do 5 až 6 dnů (Selko, 2012). Ředidlo VIP 5 je střednědobé ředidlo androhepového charakteru inhibice spermií, s možností použití inseminačních dávek do 5-ti dnů po naředění. U kvalitních ejakulátů lze inseminační dávky selektivně po kontrole pod mikroskopem použít až do 7 dnů od jejich výroby (Hema, 2012).

Vyšetřováním kančího spermatu, konzervovaného ředidly pro střednědobou konzervaci, se zabývala také Frydrychová a kol. (2010), podle níž bylo jako nejlepší z pěti vyšetřovaných ředidel označeno ředidlo Androhep, další v pořadí byla ředidla Androstar, Androstar plus, M III (Minitub) a LD (Magapor).

Po naředění spermatu odpovídajícím ředidlem, následuje výroba individuálních inseminačních dávek. V současné době se používají tři různé typy obalů pro uchování ředěného kančího spermatu: lahvičky, tuby a sáčky. Tyto obaly jsou vyráběny z nepropustných plastových materiálů a nesmí být toxické pro spermie. Jsou konstruovány, aby byly spíše pružné než tuhé, tak, aby přirozeně povolovaly když prasnice odebírají sperma (Youngquist and Threlfall, 2007). Minimální objem inseminační dávky krátkodobě konzervovaného spermatu musí být 80 ml (ČSN 467114, 1996). V současnosti jsou na trhu nejrozšířenější obaly na inseminační dávky o objemu od 100 do 125 ml. Současné dávky, užívané pro inseminaci do děložního krčku mají objem 70 až 85 ml. Konečná koncentrace spermií, počet spermií na dávku a objem dávky mohou být v budoucnu redukovány (Youngquist and Threlfall, 2007) pomocí vhodných inseminačních postupů, při dosažení vysoké plodnosti. Inseminací za děložní krček je možné dosáhnout trojnásobného snížení počtu spermií v inseminační dávce, hluboká nitroděložní inseminace umožní snížení počtu spermií v inseminační dávce 5 až 20 násobně u chlazených inseminačních dávek a šestinásobně u mraženého spermatu. Laparoskopická inseminace do vaječníku umožňuje inseminovat pouze se 300 000 tříděných spermií (Vazquez et al., 2008).

Míchání a směšování spermatu od různých kanců se stává běžnou technikou při zpracování kančího spermatu pro umělou inseminaci. Bylo zjištěno, že smíšené sperma zlepšuje výsledky plodnosti prasnic. Výhody směšování spermatu jsou dvojí. Za prvé smíšené sperma má tendenci zvyšovat účinnost práce v laboratoři tím, že umožní současné zpracovávání většího počtu kančích ejakulátů. Za druhé poskytuje výrobci prostředky k omezení, či dokonce k odstranění, vlastních rozdílů v plodnosti nacházené mezi spermaty a mezi kanci. Mísení spermatu je jednoduchý proces. U čerstvě odebraného ejakulátu je

vyšetřena jeho kvalita a je vyřazeno zjevně nekvalitní sperma. Zpracování ejakulátu pro smíšené sperma může být prováděno několika rozdílnými způsoby. Jedna z běžných metod je naředění kvalitního spermatu ředidlem v poměru 1 : 1 a jeho umístění do vodní lázně (20 až 37°C , v závislosti na laboratorním způsobu zpracování, typu ředidla, výkonnosti laboratoře atd.) pro udržení konstantní teploty po dobu odběru, posouzení a zpracování druhého ejakulátu, který má být přidán ke stávajícímu. Další metoda směšování spočívá v přidávání ejakulátu do fixního množství ředidla (např. 500 ml) dokud není dosaženo cílového počtu dávek. U obou metod by počet kančích ejakulátů směšovaných dohromady neměl překročit objem kapacity, kterou je provozovatel chopen zpracovat najednou. Doporučují se minimálně 3 ejakuláty na jedno mísení. Když je do směsné nádoby přidán poslední ejakulát, je tento smíšený ejakulát naředěn na konečné vypočítané množství zbývajícím ředidlem a nadále je zpracováván a uchováván podle standardních pravidel. Pro velké objemy může být potřebné zajištění stálého míchání spermatu během balení, aby se zabránilo usazování spermií, což by vedlo k odlišným koncentracím spermií mezi jednotlivými dávkami (Youngquist and Threlfall, 2007).

Ve snaze zvýšit celkovou plodnost se provádí přidávání dalších komponentů do semene před inseminací, například rozmanitých hormonálních sloučenin (estrogeny, oxytocin, prostaglandiny atd.). Testované sloučeniny byly vybírány na základě jejich známých účinků na fyziologické procesy, které jsou důležité pro úspěšnou reprodukci. Prozatím jejich přidávání do spermatu nepřineslo jednoznačné výsledky. Fyziologický základ pro změny pozorované v reakci na tyto látky není znám a vyžaduje další studium (Youngquist and Threlfall, 2007).

Filtrace spermatu přes Sepadexovou kolonu slouží ke zvýšení kvality spermatu zejména u kanců se sníženou plodností, zlepšením morfologie a vitality spermií, bez funkčních změn na spermiích. Pomocí filtrace je možné dosáhnout zvýšeného množství zralých spermií a životaschopných spermií s neporušeným akrozomem, jádrem a mitochondriální pochvou. Filtrací je možné snížit procento spermií s proximální a distální kapičkou a aglutinovaných spermií (Bussalleu et al., 2008).

Důležité pro zachování kvality spermatu jsou také podmínky při jeho skladování. Funkce spermií během skladování ovlivňuje zejména teplota po naředění a podmínky v konzervačním médiu. Kančí spermie jsou velmi citlivé na chladový šok, k němuž dochází při rychlém ochlazení spermatu z tělesné teploty na teplotu pod 15 °C, zvláště když rychlé ochlazování pokračuje až k 1 – 2 °C (Johnson et al., 2000).

Rozsah teplot pro skladování konzervovaného kančího spermatu je od 15 do 18 °C. Expozice naředeného kančího spermatu vyšším teplotám může zvýšit využití jednotlivých komponentů ředidla, může vyvolat terminální biochemické modifikace na buněčných membránách spermií a může zvýšit pomnožování bakterií v kontaminovaných vzorcích. Naopak teploty pod 10 °C mohou způsobit nevratné poškození pohyblivosti spermií a integrity akrozómové vrstvy. V závislosti na typu ředidla by se skladované sperma mělo alespoň dvakrát denně jemně protřepat, a tak propláchnout spermie ředidlem (Youngquist and Threlfall, 2007).

3.3.3.2. Mražení spermatu

Jednotná pravidla pro úspěšné mražení a rozmrazování kančího spermatu stále nejsou běžně k dispozici. Určití kanci a plemena vykazují lepší schopnosti spermií k mražení než ostatní, zkrslující výsledky (Youngquist and Threlfall, 2007). Například k vážnějšímu poškození DNA spermií je mnohem náchylnější plemeno Yorkshire než plemeno duroc (Jiang et al., 2007). Nevýhodou je také snížená trvanlivost mraženého a rozmraženého kančího spermatu v reprodukčních orgánech prasnic. Celkově užití mraženého kančího spermatu snižuje velikost vrhů a prodražuje odchov. Mražené sperma má svou hodnotu především při dlouhodobé konzervaci hodnotné genetiky, pohodlí při zahraniční přepravě po mezinárodních linkách a dostupnosti při nouzovém využití farmami, když je přerušen přístup ke krátkodobě a střednědobě konzervovanému spermatu (Youngquist and Threlfall, 2007).

Kančí sperma obecně nereaguje dobře na kryokonzervaci. Zotavení po roztátí je slabé a vysoce variabilní mezi jednotlivými kanci, rovněž oplozovací schopnost je vždy podstatně nižší než u ředeného semene. Proto při použití mraženého spermatu může být inseminováno pouze okolo pěti prasnic z jednoho ejakulátu. Kryokonzervace udržuje oplozovací schopnost spermatu teoreticky neomezeně, přestože velký podíl spermií nedokáže přežít značný stres při mražení a roztavování (Noakes et al., 2001). Semenná plazma obsahuje určité faktory, které pozměňují před mražením sperma, a snižují jeho mrazitelnost a penetrační schopnost spermií po rozmrazení (Kawano et al., 2004). Aby sperma přežilo mražení, je potřeba, aby bylo naředěno ředidlem obsahujícím nejen látky chránící proti chladovému šoku, ale také kryoprotektanty, které je chrání před škodlivými následky mražení, jako například glycerol (Noakes et al., 2001), exythriol, xylitol, adonitol, acetamid a DMSO. Mimo toho ředidla vyvinutá ke kryokonzervaci obecně obsahují ještě cukry, proteiny a lipoproteidy, pufrý a jiná aditiva (Johnson et al., 2000). Pro dlouhodobou konzervaci zmrazením se používá kubánské nebo žloutkocitrátové ředidlo (Věžník a kol., 2000), nyní spíše ředidla jako Androhep

CryoGuard CF, což je ředidlo určené pro chlazení a mrazení kančího semene, jako rozmrazovací médium se užívá Androhep CryoGuard Thaw (Selko, 2012).

Pro zlepšení výsledků při inseminaci mraženým kančím spermatem se provádí řada výzkumů. Například Maldjian et al. (2005) uvádí, že pro zlepšení mrazitelnosti spermatu se běžně používají vaječné žloutky. Ve svém výzkumu porovnával dva typy žloutků, užívaných jako složky ředidel pro kryokonzervaci, a to žloutky se standardním složením mastných kyselin a žloutky obohacené kyselinou docosahexaenoicovou (DHA). Yi et al. (2002a) zase srovnával laktózo-žloutkové ředidlo (LEY) a laktózo-žloutkové ředidlo s N-acetyl-D-glucosaminem (LEN). Zjistil, že přidání rozpustného N-acetyl-D-glucosaminu v 0,05 % koncentraci zvyšuje kryokonzervaci spermií (Yi et al., 2002b). Rovněž teplota přidávaného N-acetyl-D-glucosaminu je důležitá při ochraně spermií během mrazení a rozmrazování (Yi et al., 2002c). Jsou také studovány změny kvality spermií a změny ve složení a metabolismu tuků spermií při kryokonzervaci (Cerolini et al., 2001). Další výzkum sledoval vliv přidání lipoproteinů o nízké hustotě do ředidla, kdy jejich 9 % koncentrace výrazně zlepšuje celkovou pohyblivost spermií a má kladný efekt na kvalitu mraženého kančího spermatu (Jiang et al., 2007). Byl také vyšetřován vliv mrazících ředidel s různou úrovní osmolarity na přežitelnost spermií při mrazení, pro kryokonzervaci kančích spermií se jeví výhodnější hypertonická ředidla (Zeng et al., 2001).

Jsou používány různé mrazící metody jako pelety, malá brčka (např. 0,5 ml), velká brčka (3 nebo 5 ml) a flatpaky. U prasat inseminační dávky obsahují často ohromné množství spermií (např. 6 až 8 miliard), vyžadující uchovávání dávek ve středně velkých objemech (Youngquist and Threlfall, 2007), používají se dávky o objemu 50 ml (Věžník a kol., 2000). Ke zpracování této velikosti inseminačních dávek je žádoucí mrazící metoda užívající velká brčka a flatpaky. Současné postupy vyžadují přepravu mraženého kančího spermatu v lahvích, obsahujících ředidlo. Tyto mražené, ředěné inseminační dávky jsou vhodné pro inseminaci do děložního krčku, jako při inseminaci čerstvým, ředěným spermatem. Nedávno se v chovech začalo experimentovat s novým typem zavaděčů pro nitroděložní inseminaci. Pokud se tato metoda ukáže být lepší v případě zavedení spermatu do těla dělohy nebo do děložního rohu, nitroděložní umělá inseminace může usnadnit využívání mraženého kančího spermatu (Youngquist and Threlfall, 2007).

4. ZÁVĚR

Reprodukční soustava kance je velice složitý a citlivý systém, reagující na jakékoliv výkyvy podmínek vnějšího prostředí, a v závislosti na nich i na změny, ke kterým dochází uvnitř organismu. Proto je nezbytné kancům vytvořit co nejoptimálnější podmínky, umožňující zejména nenarušený průběh spermatogeneze. Je třeba sledovat nejen celkový zdravotní stav, ale také stav a funkci reprodukčních orgánů, zejména varlat a nadvarlat, ve kterých dochází k rozhodujícím změnám, určujícím množství a kvalitu vytvořeného spermatu.

Úkolem následného získávání a zpracování spermatu je v co možná největší míře tuto kvalitu udržet a prodloužit dobu jeho použitelnosti. Na výsledné jakosti inseminačních dávek se podílí hygienický odběr, přesné a správné vyšetření spermatu, dodržení technologických postupů při jeho zpracování a dodržení optimálních podmínek pro jeho uchování, zejména teploty.

Hlavní důraz je přitom kladen na složení ředidel spermatu. V současné době je k dispozici řada komerčně vyráběných ředidel, vytvořených na podobném základu, u kterých je přesné složení jejich komponentů majetkem obchodních společností. Jsou dodávána ředidla pro krátkodobé uchování inseminačních dávek 2 až 3 dny a pro střednědobé uchování po dobu 4 až 10 dní. Speciální kapitolou je dlouhodobé uchování inseminačních dávek pomocí kryokonzervace kančího spermatu, která však má před sebou ještě řadu nevyřešených otázek. Širšímu využití mrazové konzervace stále brání horší výsledky plodnosti a vyšší ekonomická náročnost.

Kvalita inseminačních dávek je ovlivněna řadou faktorů, jako jsou jednak dědičné založení, zdravotní stav, věk a kondice kance, jednak vnější vlivy, mezi něž počítáme zejména úroveň výživy a napájení, mikroklimatické podmínky, způsob ustájení a ošetřování. V neposlední řadě ovlivňuje jakost inseminačních dávek i způsob získávání, hodnocení a zpracování kančího spermatu. Pro chovatele z toho vyplývá nutnost věnovat pozornost všem těmto faktorům, neboť chyba v kterémkoli z nich se může negativně projevit na výsledné kvalitě inseminačních dávek a následně zhoršením výsledků reprodukce.

5. SEZNAM LITERATURY

- Badia, E., Pinart, E., Briz, M. 2005. Lectin histochemistry of the boar bulbourethral flanda. *European Journal of Histochemistry*. 49 (2). 131-138.
- Banas, K., Banasik, T., Szczesniak-Fabianczyk, B. 2006. Evaluation of boar spermatozoa motility by pulsed field gradient NMR. *Polish Journal of Chemistry*. 80 (7). 1075-1082.
- Bronicka, A., Dembinski, Z. 1999. Current criteria and conditions influencing the quality of boar semen. *Medycyna Weterynaryjna*. 55 (7). 436-439.
- Bussalleu, E., Pinart, E., Rivera, M. M. 2008. Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns. *Reproduction in Domestic Animals*. 43 (1). 48-52.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121 (3). 395-401.
- Cigánková, V., Mesároš, P., Almášiová, V., Bíreš, J. 2008. Morphological changes of testes in zinc deficient boars. *Acta Veterinaria*. 58 (1). 89-97.
- De Jonge, C., Barratt, C. L. R. 2006. Gamete donation: a question of anonymity. *Fertility and Sterility*. 85 (2). 500-501.
- Franca, L. R., Avelar, G. F., Almeida, F. F. L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63 (2). 300-318.
- Frydrychová, S., Čerovský, J., Lustyková, A., Rozkot, M. 2010. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech Journal Animal Science*. 55 (4). 160-166.
- Gadella, B. M., Harrison, R. A. P. 2002. Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. *Biology of Reproduction*. 67 (1). 340-350.
- Gamčík, P., Kozumplík, J. 1984. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda. Bratislava. 344 s.
- Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*. 82-83. 321-339.
- Gordon, I. 1997. *Controlled reproduction in pigs*. CAB International. Oxon. p. 239. ISBN: 0851991165.

- Haden, N. P., Hickox, J. R., Whisnant, C. S. 2000. Systematic characterization of sperm-specific membrane proteins in swine. *Biology of Reproduction*. 63 (6). 1839-1847.
- Hafez, B., Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. p. 509. ISBN: 0683305778.
- Jiang, Z., Li, Q., Hu, J. 2007. Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*. 54 (3). 301-304.
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3). 143-172.
- Kawano, N., Shimada, M., Terada, T. 2004. Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*. 61 (2-3). 351-364.
- Khan, M. H., Naskar, S., Das Anubrata. 2006. Comparative efficacy of different diluents on liquid preservation of boar semen. *Indian Journal of Animal Sciences*. 76 (10). 780-783.
- Kliment, J., Hintnaus, J., Novák, M., Rob, O., Šťastný, P. 1983. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. Príroda. Bratislava. 376 s.
- Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*. 63 (2). 411-421.
- Maňásková-Postlerová, P., Davidová, N., Jonáková, V. 2011. Biochemical and binding characteristics of boar epididymal fluid proteins. *Journal of Chromatography B*. 879 (1). 100-106.
- Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Kresan, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 2007. *Morfologie hospodárskych zvierat*. Brázda. Praha. 304 s. ISBN: 9788021316584
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. 2001. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. Harcourt Publishers Limited. London. p. 868. ISBN: 0702025569.
- Parry, R. V., Barker, P. J., Jones, R. 1992. Characterization of Low Mr Zona-Pellucida Binding-Proteins from Boar Spermatozoa and Seminal Plasma. *Molecular Reproduction and Development*. 33 (1). 108-115.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M. D. 2000. Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: Changes in cryptorchidism. *Journal of Morphology*. 244 (3). 190-202.
- Quintero-Moreno, A., Carvalho, J., González, D., Morales, B., Mejía, W., Osorio, C., Rubio, J. 2009. Biometria De La Cabeza Del Espermatozoide Del Cerdo Domestico. *Jornadas sobre Producción Animal*. 13 (2). 726-728.
- Reece, W.O., 1998. *Fyziologie domácich zvierat*. Grada. Praha. 456 s. ISBN: 8071695475.

- Rodriguez-Martinez, H. 2001. Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. *Archiv fur Tierzucht*. 44. 102-113.
- Smital, J. 2009. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*. 110 (3-4). 335-346.
- (Vadnais, M. L., Althouse, G. C. 2011. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*. 76 (8). 1508-1516.
- Vazquez, J. M., Roca, J., Gil, M. A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J. L., Martinez, F. A. 2008. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology*. 70 (8). 1216-1224.
- Věžník, Z. (eds.). 2000. Hodnocení semene pro asistovanou reprodukci a výběr plemeniků. Striktní analýza spermatické morfologie SASMO. VÚVL. Brno, 141 s.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. VÚVL. Brno. 198 s. ISBN: 8086895017.
- Vyt, P., Maes, D., Quinten, C. 2008. Detailed motility evaluation of boar semen and its predictive value for reproductive performance in sows. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 77 (5). 291-298.
- Yi, Y. J., Kwon, Y. A., Ko, H. J. 2002a. Effects of diluent component, freezing rate, thawing time and thawing temperature on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 15 (11). 1553-1558.
- Yi, Y. J., Cheon, Y. M., Park, C. S. 2002b. Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science*. 69 (1-2). 91-97.
- Yi, Y. J., Im, G. S., Park, C. S. 2002c. Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science*. 74 (3-4). 187-194.
- Youngquist, R. S., Threlfall, W. R. 2007. Current therapy in large animal theriogenology. Saunders Elsevier. St. Louis. p. 1061. ISBN: 0721693237.
- Zeng, W. X., Shimada, M., Isobe, N. 2001. Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. *Theriogenology*. 56 (3). 447-458.
- ČSN 467114 . Spermata kance. 1996. Český normalizační institut. Praha. 8 s.

Použité elektronické informační zdroje:

Hema. Ředidla kančího spermatu [online]. Hema. [cit. 2012-02-25]. Dostupné z <<http://vip-insemination.com/redidla/>>

Farmapo. Vše pro vaší farmu [online]. Farmapo. [cit. 2012-02-25]. Dostupné z <<http://www.farmapo.cz/redidla/>>

Smital, J. Ředění a konzervace kančího spermatu pro účely inseminace [online]. Agroweb. 22.3.2001 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z <http://www.agroweb.cz/Redeni-a-konzervace-kanciho-spermatu-pro-ucely-inseminace_s45x9532.html>.

Selko. Inseminace prasat [online]. Selko. [cit. 2012-02-25]. Dostupné z <<http://www.Selko.cz/index.php?id=Prasata/Inseminace prasat/Ředidla semene>>