

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Vliv ivermektinu na kvalitu kančího ejakulátu u plemene
Duroc**

Diplomová práce

**Bc. Markéta Davidová
Reprodukční biotechnologie**

Mgr. Ing. Tereza Krejčová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv ivermektinu na kvalitu kančího ejakulátu u plemene Duroc" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Mgr. Ing. Tereze Krejčové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení mé diplomové práce a za věčný optimismus a trpělivost. Dále také paní Ing. Anitě Klímové, Ph.D. za odbornou pomoc a v neposlední řadě pracovníkům testačního a inseminačního střediska firmy Lipra pork ve Skršíně za čas, který mi věnovali, a za trpělivé řešení všech mých otázek.

Vliv ivermektinu na kvalitu kančího ejakulátu u plemene Duroc

Souhrn

Diplomová práce vznikla ve spolupráci s testačním a inseminačním střediskem firmy Lipra pork ve Skršíně. Plemenní kanci v tomto středisku jsou zástupci plemene Duroc a představují vysoce ceněný genetický materiál programu DanBred. Udržení vysoké plodnosti kanců je klíčovým parametrem pro zajištění kvalitních produkčních i ekonomických výsledků. Hodnocené parametry kančího ejakulátu mohou být ovlivňovány velmi mnoha faktory. Proto je kladen důraz na zajištění optimálních podmínek managementu chovu těchto kanců. Reprodukční soustava kanců je obecně velmi citlivá na výkyvy vnějších i vnitřních podmínek a rychle reaguje na změny v kvalitě výživy, je výrazně sezónní a je také velmi citlivá k účinkům různých farmakologických látek. Zajištění kvalitní výživy, stabilního managementu chovu a výborného zdravotního stavu je pro udržení vysokých parametrů plodnosti a získání kvalitních inseminačních dávek zcela klíčové. Kanci jsou pod zvýšeným veterinárním dohledem, jsou pravidelně očkováni a také jim jsou pravidelně podávána anthelmintika. Podávání anthelmintik probíhá 1x ročně subkutánní aplikací přípravku na bázi ivermektinu. Jedná se o makrocyclický lakton, který se běžně používá proti endoparazitům i ektoparazitům. Je velmi účinný a je jedním z nejvíce rozšířených antiparazitik pro zvířata po celém světě. Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu pracovníků testačního a inseminačního střediska Skršín, kteří se subjektivně domnívali, že přípravek Biomectin, který obsahuje účinnou látku ivermektin a je kancům aplikován, má významný dlouhodobý negativní vliv na parametry kančího spermatu.

Pro naplnění cíle této diplomové práce byli vybráni kanci, kteří se aktuálně využívali pro odběr spermatu pro zpracování na inseminační dávky a současně byli přítomni v tomto středisku dostatečně dlouhou dobu, aby bylo možné i zpětně ze záznamů zhodnotit parametry jejich ejakulátu. Standardně se po každém odběru hodnotil ejakulát jak makroskopicky, tak mikroskopicky. Hodnocenými parametry byl objem ejakulátu, koncentrace spermií v 1 cm^3 , aktivita spermií, procento abnormálních spermií, počet spermií v ejakulátu a další dílčí parametry, které nebyly zahrnuté do této diplomové práce. Výše zmíněné parametry byly podrobeny statistické analýze s cílem zhodnotit, zda existuje statisticky významný rozdíl v parametrech ejakulátu u odběrů kanců odebíraných přibližně dva měsíce před aplikací přípravku Biomectin (prosinec), u odběrů ejakulátu odebíraných v období těsně po aplikaci Biomectinu (únor) a u odběrů ejakulátů odebíraných přibližně dva měsíce po aplikaci Biomectinu (duben). Statistickou analýzou získaného souboru dat byly prokázány signifikantní rozdíly u následujících parametrů: objem ejakulátu a stanovení procenta abnormálních spermií. Objem ejakulátu u skupin během času rostl a procento abnormálních spermií se snížilo, což nepředstavuje z pohledu využití ejakulátu žádný negativní výsledek. U koncentrace spermií v 1 cm^3 a celkového počtu spermií nedošlo k žádným statisticky významným rozdílům mezi pozorovanými skupinami. Parametr aktivita spermií byl hodnocen pouze okometricky a vykazoval známky binárního znaku, proto tento parametr nebylo možné kvalitně statisticky vyhodnotit. Stanovená hypotéza této diplomové práce se tedy nepotvrdila. S ohledem na statistické hodnocení vybraného souboru dat je nutné zdůraznit významný efekt jedince, který zde byl patrný, ikdyž byl dopředu kladen důraz na výběr kanců s pokud možno

homogenními parametry ejakulátu. Je také nutné zohlednit ostatní možné vlivy, které jsou pravděpodobně zodpovědné za získané výsledky více než testovaný vliv přípravku Biomectin. Především možná sezónnost zde může hrát důležitou roli, ale ani ostatní významné faktory nelze vylučovat.

Ikdyž se nepodařilo potvrdit stanovenou hypotézu, výsledky této diplomové práce jsou pro testovací a inseminační středisko ve Skršíně velmi hodnotné. Pro relevanci vyřčených závěrů by bylo potřeba rozšířit soubor dat o více jedinců i hodnocení ejakulátu, to je však již nad rámec této diplomové práce.

Klíčová slova: Biomectin, ivermektin, kanec, spermie, inseminace

The effect of ivermectin on boar ejaculate quality in the Duroc

Summary

This diploma thesis has been created in cooperation with the Lipra pork company's testing and insemination center in Skršín. The boars in this center are representatives of the Duroc breed and represent the highly valued genetic material of the DanBred program. Maintaining their high fertility is a key parameter to ensure both – quality production and economic results. Since there are many factors, that can influence the evaluated parameters of boar ejaculate, ensuring optimal conditions for the breeding management of these boars is mandatory. In general, the boars' reproductive system is very sensitive to any external or internal conditions fluctuations, quickly reflects changes in the quality of nutrition, is highly seasonal, and last, but not least, is very sensitive to the effects of various pharmacological substances. To maintain the high fertility parameters and to obtain quality insemination doses, it is crucial to ensure quality nutrition, stable breeding management, and excellent health. Boars have been under increased veterinary supervision including regular vaccination and anthelmintics administration. Anthelmintics are administered once a year by subcutaneous administration of an ivermectin-based preparation. This macrocyclic lactone is commonly used against endoparasites and ectoparasites, is very effective and one of the most widespread antiparasitic drugs for animals worldwide. The aim of this diploma thesis was to verify the subjective hypothesis of the staff of the testing and insemination center Skršín, who had believed that Biomectin, which contains the active ingredient ivermectin and is applied to boars, has a significant long-term negative effect on the boar sperm parameters.

To fulfill the goal of this diploma thesis, boars that have met the following criteria have been selected. First, they had to be currently used to collect semen for processing into insemination doses. Second, they had to be in the center long enough that it has been possible to evaluate the parameters of their ejaculate retrospectively from the historical records. By default, ejaculate was evaluated both macroscopically and microscopically after each collection. The evaluated parameters include ejaculate volume, sperm concentration in 1 cm³, sperm activity, percentage of abnormal sperm, number of sperm in the ejaculate, and few other partial parameters that have not been included in this diploma thesis. The above-mentioned parameters were subjected to statistical analysis to assess whether there has been a statistically significant difference in ejaculate parameters in boar samples taken approximately two months before Biomectin (December), immediately after Biomectin (February), and approximately two months after Biomectin administration (April). The statistically significant differences have been proved for the following parameters: ejaculate volume and percentage of abnormal sperm. While the volume of ejaculate increased over time, the percentage of abnormal sperm decreased, which does not imply any negative effect considering the ejaculate use. There were no statistically significant differences between the observed groups in the sperm concentration in 1 cm³ and the total sperm count. Sperm activity was only evaluated visually and showed signs of binary trait, therefore this parameter could not be evaluated statistically. To sum it up, the established hypothesis of this diploma thesis was not confirmed. Despite the focus on the selection of boars with as homogeneous ejaculate parameters as possible, there was a significant

effect of the individual (regarding the statistical evaluation). There might be also other possible effects, with greater influence on the results than Biomectin, that need to be taken into account. Above all, the possible seasonality may play an important role here but other important factors cannot be eliminate either.

Although the established hypothesis could not be confirmed, the results of this diploma thesis are very valuable for the testing and insemination center in Skršín. For the relevance of the stated conclusions, it would be necessary to expand the data set by more individuals and ejaculate evaluations, which is however beyond the scope of this diploma thesis.

Keywords: Biomectin, ivermectin, boar, spermatozoa, insemination

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše	3
3.1 Reprodukční funkce samců	3
3.1.1 Spermatogeneze	3
3.1.2 Morfologie spermie	5
3.1.2.1 Hlavička.....	5
3.1.2.2 Jádro.....	6
3.1.2.3 Akrozom	6
3.1.2.4 Bičík.....	6
3.1.3 Epididymální maturace	6
3.1.4 Ejakulát.....	7
3.1.5 Kapacitace spermií.....	8
3.2 Inseminace	9
3.2.1 Inseminační stanice kanců	9
3.2.2 Inseminační dávky	10
3.2.3 Odběr spermatu.....	10
3.2.4 Hodnocení spermatu	11
3.2.4.1 Morfologické změny.....	11
3.2.5 Ředění a konzervace spermatu	13
3.3 Ivermektin	14
3.3.1 Farmakokinetika	16
3.3.2 Podání léčiva.....	17
3.3.3 Mechanismus působení ivermektinu	17
3.3.4 Vliv na reprodukci	18
4 Metodika a materiál	20
4.1 Metodika	20
4.1.1 Odběr ejakulátu v testačním a inseminačním středisku Skršín	20
4.1.2 Laboratorní hodnocení ejakulátu	20
4.1.2.1 Objem ejakulátu.....	20
4.1.2.2 Koncentrace spermií v 1 cm ³	20
4.1.2.3 Aktivita spermií	21
4.1.2.4 Procento abnormálních spermií	21
4.1.2.5 Celkový počet spermií v ejakulátu.....	21
4.2 Materiál	22
4.2.1 Vstupní data	22

4.2.2	Statistické vyhodnocení	22
5	Výsledky.....	23
5.1	Objem ejakulátu.....	23
5.2	Koncentrace spermií v 1 cm ³	26
5.3	Aktivita spermií.....	29
5.4	Procento abnormálních spermií.....	29
5.5	Celkový počet spermií v ejakulátu.....	32
5.6	Shrnutí výše hodnocených parametrů	35
6	Diskuze.....	36
7	Závěr	39
8	Bibliografie	40

1 Úvod

Vysoké ukazatele reprodukce jsou klíčovým hlediskem hodnotícím úroveň managementu chovu všech hospodářských zvířat. Úspěšná reprodukce slouží nejenom k zachování druhu, ale i k produkci výkrmových zvířat zajišťujících ekonomiku chovu. S rozvojem biotechnologií se v chovu prasat začala velmi využívat umělá inseminace. Její nesporné výhody jsou obecně známé a řadíme sem například zvýšení počtu plemenic na jednoho plemeníka nebo možnost skladování ejakulátu geneticky vynikajících jedinců i několik desítek let. Ekonomické hledisko využití inseminace je také důležitým aspektem, a i proto umělou inseminaci podniky preferují. Dochází nejenom ke snížení materiálních, ale i pracovních nákladů. Na rozdíl od přirozené plemenitby se však zvyšují nároky na odběr a zpracování kančího ejakulátu a výrobu inseminační dávky pro plemenici. Vysoká plodnost kance hraje klíčovou roli pro získání kvalitního ejakulátu, který bude následně zpracován a naředěn v inseminační dávce tak, aby byla zajištěna úspěšnost samotné inseminace.

Reprodukční soustava kanců je obecně velmi citlivá na různé změny vnějších i vnitřních podmínek a rychle reaguje například na změny v kvalitě výživy, je také výrazně sezónní a je velmi citlivá k účinkům různých farmakologických látek. Kancům plemene Duroc v testačním a inseminačním středisku Skršín je každý rok podáván antiparazitický přípravek Biomectin, který je na bázi ivermektinu. Ivermektin patří do řádu makrocyclických laktonů a je jedním z nejvíce používaných antiparazitik v chovech hospodářských zvířat. Tato látka působí na široké spektrum parazitů, jako jsou hlístice, vši a plicní červi. Možný negativní vliv ivermektinu na kvalitu ejakulátu však již byl prokázán v několika studiích (Wrona & Krzyzanowski 1995; Tanyildizi & Bozkurt 2002; Naoman 2012; Ali 2014; Sadek & Shaheen 2015).

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu pracovníků testační stanice Skršín, kteří se subjektivně domnívali, že přípravek Biomectin, který obsahuje účinnou látku ivermektin a je kancům aplikován, má významný dlouhodobý negativní vliv na parametry kančího ejakulátu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s testačním a inseminačním střediskem ve Skršíně firmy Lipra pork a cílem je popsat vliv aplikace přípravku Biomectin s účinnou látkou ivermektin na parametry kančího ejakulátu u kanců plemene Duroc v inseminační stanici.

3 Literární rešerše

3.1 Reprodukční funkce samců

Reprodukční funkce samců představuje jednu ze základních funkcí živého organismu, která v sobě zahrnuje tvorbu spermií a jejich transport do samičích pohlavních orgánů, a tím ve svém důsledku slouží k zachování druhu (Cibulka 2004).

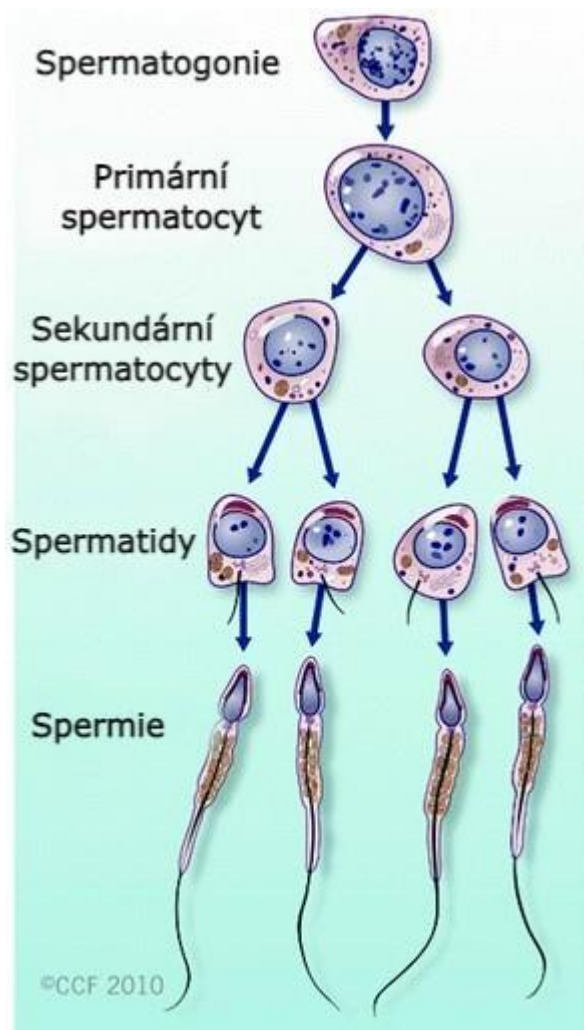
Základem samčích pohlavních orgánů je párová pohlavní žláza – varle. Ve varlatech probíhá tvorba spermií – spermatogeneze. U kanců spermatogeneze trvá 45 dní, z toho 10 až 12 dní trvá průchod a zrání spermií v epididymu (Louda 2001) a začíná v době pohlavní dospělosti, což je zhruba v 5. měsících stáří kance (Tichý 2004). Samčí pohlavní soustava se také podílí na udržení homeostázy v organismu a zajištění dlouhověkosti druhů, a to především produkcí pohlavních hormonů a jejich činností (Chłopik & Wysokińska 2019).

Oplození savců je na buněčné úrovni velice složitý proces, který je druhově velmi specifický, ale vždy vede ke stejnému výsledku, spojení dvou odlišně vypadajících zárodečných buněk. Spermie a vajíčko spolu interagují a vytváří zygotu, buňku se somatickým počtem chromozomů (Tulsiani & Abou-Haila 2012). Aby spermie byly vůbec schopné oplodnit vajíčko, musí projít několika zásadními změnami v přísně regulovaných procesech, mezi které patří epididymální maturace, poté velice důležitá kapacitace v samičím pohlavním traktu, následovaná akrozomální reakcí, jež vyústí ve fúzi plazmatické membrány spermie a vnější akrozomové membrány spermie. Tato reakce je zásadním krokem v umožnění samotného rozpoznání, vazby a následného oplození vajíčka savců (Berger et al. 1989).

U všech hospodářských zvířat, prase nevyjímaje, se úroveň reprodukčních ukazatelů odvíjí od samčí i samičí plodnosti. Konkrétně u kanců se plodnost jedinců liší především na podkladě genetického založení a méně už pak díky vlivům prostředí (Smítal 2000).

3.1.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze má obecně dvě fáze – spermatocytogenezi a spermatohistogenezi (Chłopik & Wysokińska 2019). Při tomto procesu se tvoří samčí pohlavní buňky – spermie a probíhá po celou dobu pohlavní aktivity samce (Tichý 2004). Celý proces probíhá především v semenotvorných kanálcích ve varleti, které jsou vystlané zárodečným epitelem. Zde se nachází dva typy buněk – zárodečné buňky a Sertoliho buňky, které mají podpůrnou a výživnou funkci, také jsou schopny fagocytovat cytoplazmu při přeměně spermatid na zralé spermie (Chłopik & Wysokińska 2019). Během spermatogeneze se v zárodečném epitelu vytváří spermatické buňky – spermatogonie, primární spermatocyty, sekundární spermatocyty, spermatidy, které poté dozrávají ve spermie.



Obrázek 1 – Spermatogeneze. Převzato a upraveno z (Sharma & Agarwal 2011)

Spermatocytogeneze probíhá ve třech periodách, perioda množení, perioda růstu a perioda zrání (Tichý 2004). Spermatogonie opakovaně rostou a mitoticky se dělí a dávají vzniknout dvěma typům: spermatogoniím A nebo spermatogoniím B. Spermatogonie B se pak vstupem do meiózy přeměňují na primární spermatocyty. Každý primární spermatocyt se meioticky dělí a vznikají dva sekundární spermatocyty. Každý pak opět prochází meiotickým dělením, které vede ke vzniku dvou haploidních spermaticid. Spermaticidy se pak transformují na spermie (Tulsiani & Abou-Haila 2012).

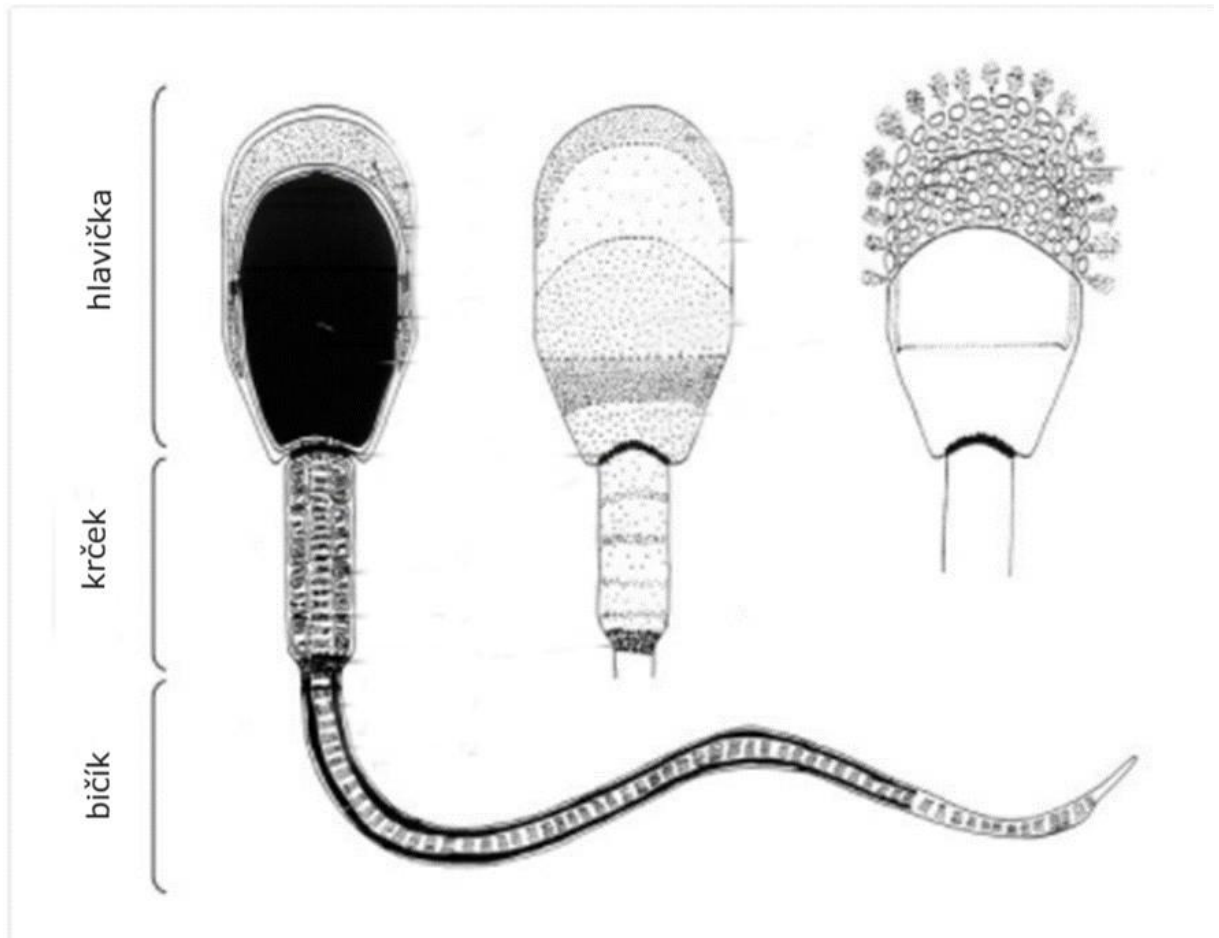
Pro správný vývoj spermií je nutné, aby teplota parenchymu varlat byla o 4 až o 7 °C nižší, než je teplota těla kance (Louda 2001), proto se spermie vyvíjejí ve varlatech, která jsou uložena v šourku mimo břišní dutinu samce. Kančí varlata sestupují do šourku už před narozením jedince (Najbrt 1973). Pro správnou spermatogenezi je také velmi důležitá hemotestikulární bariéra, což je fyzická bariéra mezi krevními cévami a semenotvornými kanálky. Tato bariéra neumožňuje kontakt spermií a buněk imunitního systému, proto nejsou imunitním systémem produkovány protilátky proti spermiím (Chłopik & Wysokińska 2019).

Regulaci spermatogeneze řídí hypothalamus, kde se produkuje hormon GnRH, který spouští v adenohipofýze tvorbu hormonů LH a FSH, které stimulují vývoj pohlavních žláz. U samců hovoříme o testes-adenohypofýzo-hypothalamus zpětnovazebném mechanismu, který zajišťuje nepřetržitou tvorbu těchto hormonů (Tichý 2004). LH má vliv na Leydigovy buňky,

kteře produkují testosteron. Roli zde má i hormon prolaktin, který je vylučován hypofýzou. Ten působí synergisticky s LH. Naopak hormon FSH reguluje funkci Sertoliho buněk. Tyto buňky pak produkují inhibin, který hladinu FSH snižuje a aktivin, který naopak stimuluje FSH (Chłopik & Wysokińska 2019).

3.1.2 Morfologie spermie

Zralá samčí pohlavní buňka se nazývá spermie, je tvořena hlavičkou, krčkem a bičkem. Kančí spermie se velmi podobá ostatním domácím kopytníkům (Hancock 1956) a je velká zhruba 51,6 mikrometrů (Tichý 2004).



Obrázek 2 – Morfologie spermie. Převzato a upraveno z (Gadella et al. 2008)

3.1.2.1 Hlavička

Hlavička spermie se skládá z cytoplazmatické membrány, akrozomu, jádra, cytoskeletárních struktur a cytoplazmy. Hlavička kančí spermie je dlouhá 7,2 μm široká 4,1 μm a tloušťka se pohybuje okolo 1,5 μm (Tichý 2004). Ve velikosti a tvaru spermie existují i meziplenné rozdíly. Kanci plemene Pietrain mají spermie ve srovnání s plemenem Duroc kratší a spermie mají užší hlavičky (Kondracki et al. 2012).

Plazmatická membrána spermie je složená z fosfolipidů, cholesterolu a glykoproteinů (Chłopik & Wysokińska 2019), kterým se díky jejich zakomponování do struktury membrány říká strukturální. Zevní povrch pokrývají polysacharidy a tvoří glykokalyx. Ten stabilizuje

buněčnou membránu, selektivně ovlivňuje rychlost difuze látek buněčnou membránou, udržuje pH a povrchové napětí (Věžník et al. 2010). Konzistence membrány závisí na počtu dvojných vazeb a přítomnosti cholesterolu. Dvojně vazby fosfolipidů membrány zvyšují její chemickou reaktivitu, cholesterol naopak způsobuje její rigiditu. Mezi membránové fosfolipidy patří například fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylcholin plasmanyl a fosfatidylcholin plasmenyl, ty fungují také jako markery motility spermií. V membráně najdeme také membránové proteiny, které fungují jako receptory, iontové kanály, strukturní proteiny a enzymy (Chłopik & Wysokińska 2019).

3.1.2.2 Jádro

Jádro spermie je klíčovou strukturou hlavičky spermie. V jádře se nachází kondenzovaný chromatin, který je nositelem genetické informace.

V průběhu spermatogeneze také dochází k protaminaci. V tomto procesu se histony nahradí menšími protaminy 1 a 2. Ty jsou velmi důležité při maturaci spermie, zkompaktnují chromatin díky množství disulfidických vazeb. Protaminy ovlivňují i úspěšnost kryokonzervace (Chłopik & Wysokińska 2019).

3.1.2.3 Akrozom

Akrozom představuje svrchní strukturu hlavičky, která se vytvořila z Golgiho aparátu při přeměně ze spermatidy. Jedná se o váček obsahující enzymy, jako je například akrosin, glykosidázy – hyaluronidáza, neurominidáza a kyselinu fosforečnou. Akrozomová reakce je proces důležitý pro následnou primární vazbu spermie na *zonu pellucidu* vajíčka. Uvolní se při ní obsah akrozomového váčku s mnoha hydrolytickými enzymy (Chłopik & Wysokińska 2019).

3.1.2.4 Bičík

Bičík je důležitou částí spermie zajišťující pohyb. Celým bičíkem se probíhá axonema, která je složena z keratinových vláken. Ve střední části bičíku najdeme mitochondrie, ty jsou zodpovědné za oxidativní fosforylaci, produkci energie a homeostázu vápníku. Mitochondrie mají svoji vlastní DNA – mtDNA. Pokud se počet kopií mtDNA zvýší, sníží se kvalita spermatu (Chłopik & Wysokińska 2019).

Kondracki et al. (2012) poukazují i na meziplemenné rozdíly v anatomii bičíků u kanců. Zjistili, že kanci plemene Pietrain měli delší bičíky než kanci plemene Duroc a tím pádem byli spermie i pohyblivější.

3.1.3 Epididymální maturace

Spermie produkované ve varlatech jsou nezralé, protože se nemohou pohybovat progresivně za hlavičkou a nejsou schopny rozpoznání a vazby na vajíčko (Weigel Muñoz et al. 2019). Tyto schopnosti nabývají při průchodu epididymem, kdy získávají motilitu a schopnost fertilizace (Hassan & Holtz 2021). Zrání spermií v epididymu označujeme jako epididymální maturaci (Chłopik & Wysokińska 2019). Tento složitý proces zahrnuje neustálou

interakci spermií s lumenální tekutinou epididymu, která obsahuje nejen anorganické ionty a proteiny, ale také malé nekódující RNA, nepatologické amyloidy a epididyzomy, což jsou vezikuly podobné exozomu (Weigel Muñoz et al. 2019). Spermie postupují epididymem díky peristaltice hladkého svalstva a nacházejí se po celé jeho délce (Chłopik & Wysokińska 2019).

Epididymis můžeme rozdělit na tři části – *caput*, *corpus* a *cauda*. Každá tato anatomicky oblast má odlišné složení tekutiny a funkčnost (Weigel Muñoz et al. 2019).

Jednotlivé oddíly epididymu jsou specifické svými kontinuálními a progresivními změnami prostředí po celé délce epididymu a přítomností specificky koncentrovaných složek, které nebyly nalezeny v jiných tělních tekutinách. Tato specifická je udržována nejen aktivní sekrecí a resorbí podél celého epididymu, ale také významným omezením výměny látek mezi lumen epididymu a krevní plazmou (Pruneda et al. 2005). Tato krevně-epididymální bariéra vedle inhibiční imunitní odpovědi k antigenům na spermiích, která by mohla vést k chronickému zánětu epididymu nebo až k neplodnosti. Lumenální mikroprostředí a zejména lumenální pH epididymu je rozhodující pro nabytí schopnosti fertilizace, průběhumaturace a následné skladování zralých spermií v epididymu (Weigel Muñoz et al. 2019). Hlavní buňky v epitelu epididymu se podílejí na syntéze proteinů, které jsou lokalizovány v buňkách anebo sekretovány do epididymální tekutiny (Pruneda et al. 2005; Weigel Muñoz et al. 2019). U dospělého kance je popsáno přibližně 125 epididymálních proteinů (Pruneda et al. 2005).

Epididymis je u kanců silně vyvinuto, zejména pak *caput* epididymis (Najbrt 1973). Epididymální kanálek měří zhruba 6,0-6,2 metrů (Hassan & Holtz 2021). Chłopik & Wysokińska (2019) uvádí, že u kance trvá epididymální maturace zhruba 9 dní. Hassan & Holtz (2021) zase uvádí, že průchod spermií epididymem u pohlavně dospělých kanců je kontinuální proces a trvá v průměru 13 dní. *Caput* a *corpus* jsou spermiemi překonány do 5 dnů, poté následuje zhruba 6 dní pro průchod do *cauda* epididymu a další dva dny, kdy spermie prochází *cauda* epididymis.

Spermie z prvních dvou částí epididymu ještě nejsou schopné oplození, mají nízkou fertilizační schopnost. Schopnost spermií se pohybovat je získávána až v epididymálním *corpu* a motilita epididymálních spermií se zvyšuje ve směru ke *cauda* epididymis.

V *cauda* epididymis se spermie skladují a jsou udržovány v životaschopném stavu až do ejakulace (Chłopik & Wysokińska 2019; Hassan & Holtz 2021). Odhadovaná fertilita spermií v *cauda* epididymis je 60 dní (Louda 2001). Aby nedošlo k předčasné aktivaci pohybu spermií, působí v *cauda* epididymis glykoprotein immobilin, který tomuto pohybu zabraňuje (Chłopik & Wysokińska 2019).

3.1.4 Ejakulát

Ejakulát je druhově specifický a existují i rozdíly mezi jednotlivými plemeny zvířat. Ejakulát může mít různý objem, koncentraci spermií i procento morfologicky správných spermií. Rozdíly jsou také ve schopnosti fertilizace, plodnosti a celkově u hodnocených parametrů spermatu. Například u kanců plemene Duroc byl sledován nižší objem ejakulátu, ale s vyšší koncentrací spermií než u kanců plemene Pietrain (Kondracki et al. 2012). U kance se objem ejakulátu pohybuje okolo 200–250 ml (Rodríguez-Martínez et al. 2005). Tichý (2004) uvádí objem až 500 ml. Höfner et al. (2020) uvádí, že kančí objemy ejakulátu mohou přesahovat i 500 ml. Vysokoobjemové ejakuláty jsou ale obvykle spojeny s nízkou koncentrací spermií a

vysokým množstvím semenné plazmy (Höfner et al. 2020). Celkové množství spermií v ejakulátu se u kance pohybuje mezi 20–80 miliardami (Cibulka 2004). Zásadní význam na produkci spermií má i velikost varlat. Uvádí se že 1 g varletního parenchymu produkuje denně 20 až 30 milionů spermií. Existují údaje, že kanci selektovaní na velikost varlat produkovali o 15 miliard víc spermií v ejakulátu než kanci v neselektované kontrolní skupině. Pozitivní korelace byla prokázána i mezi hmotností varlat a libidem sexualis (Louda 2001). Velikost varlat bývá v dospělosti okolo 400 g (Najbrt 1973).

Ejakulát se skládá ze dvou složek, první jsou formované elementy a druhou je semenná plazma. Do první složky řadíme zralé spermie, kterých může být u kance 25 000 - 300 000 /ml, dále kulovité degenerované buňky zárodečného epitelu, epitelové buňky vývodných pohlavních cest, leukocyty, fragmenty cytoplazmy spermatid, prostatické konkrementy, kapénky lipidů, proteinová granula a podobně (Tichý 2004).

Druhou složkou je semenná plazma. To je vysoce komplexní biologická tekutina, která obsahuje sekrety z vedlejších pohlavních žláz (Rodríguez-Martínez et al. 2005) a také biochemické složky, jako jsou proteiny, lipidy, fruktóza, enzymy a elektrolyty (Ari & Daskin 2010). Semenná plazma je důležitá pro oplozovací schopnost spermií (Höfner et al. 2020), ovlivňuje totiž funkci spermií i případnou možnost jejich kryokonzervace (Ari & Daskin 2010). Nejvíce je v semenné plazmě proteinů, přibližně 40 mg/ml. Složení už je ale druhově specifické. U kanců jsou hlavní proteinovou složkou spermadhesiny. Tato rodina představuje multifunkční glykoproteiny, které jsou schopné vázat heparin AQN, AWN a pak kančí proteiny nevážající heparin PSP-I a PSP-II. Rozdíly ve složení semenné plazmy jsou ovlivněny sezónou, výživou a důležitým aspektem je i stres zvířete (Höfner et al. 2020).

Kanci ejakulují ve třech fázích a ejakulát se skládá ze tří frakcí. Jako první je prespermiová frakce, která obsahuje velmi málo spermií a sekret z prostaty. Tato frakce tvoří zhruba 5 až 20 %. Druhá frakce je spermiová, zde je nejvíce spermií, až 80 % z celkového počtu a sekret z epididymu v menší míře i sekret z prostaty a měchýřkovitých žláz. Objemově tvoří až 50 % z ejakulátu a je nejpodstatnější pro reprodukci kanců (Smital 2000). Spermie z této frakce totiž mají stabilnější plazmatickou membránu, jsou odolnější proti chladovému šoku a neprodělávají předčasně akrozomovou reakci oproti spermiím ze zbytku ejakulátu (Torres et al. 2016). Naposledy je ejakulována postspermiová frakce, kde je zbytek spermií a hodně sekretu měchýřkovitých žláz a sekretu z bulbouretrálních (Cowperových) žláz (Smital 2000).

3.1.5 Kapacitace spermií

Spermie musí projít mnoha biochemickými a fyziologickými změnami, aby byla schopná oplodnit vajíčko (Tulsiani & Abou-Haila 2012). Klíčovým procesem v získání oplození schopnosti je kapacitace, která probíhá až v samičím traktu (Weigel Muñoz et al. 2019). Pouze kapacitované spermie jsou schopné hyperaktivace, akrozomové reakce a interakce se *zona pellucida* vajíčka (Tulsiani & Abou-Haila 2012; Weigel Muñoz et al. 2019).

Jak už bylo zmíněno, spermie musí projít řadou funkčních modifikací. Mezi tyto procesy patří například změna složenílipidové membrány, eflux cholesterolu, aktivace cAMP/PAK dráhy, zvýšení hladiny Ca^{2+} a intracelulárního pH, hyperpolarizace membrány a fosforylace proteinů. Do kapacitace jsou zapojeny molekuly hydrogenuhličitanu a také vápník. Tyto látka

jsou také nezbytnou součástí medií používaných pro kapacitaci spermií při IVF (Romar et al. 2019).

Spermie se musí oddělit od semenné plazmy, například koloidní centrifugací (Morrell & Wallgren 2011). Poté je ke spermiím přidáno kapacitační médium. Použití konkrétního média odpovídá typu použitého spermatu (epididymální, ejakulované, čerstvé nebo mražené), způsobu kapacitace spermií, objemu kultivačního média nebo konečnému cíli experimentu. Klasická média používaná pro prasečí IVF jsou modifikované TALP médium, modifikované TBM médium, jediné bez hydrogenuhličitanu, modifikované médium pro tkáňové kultury M199 (mTCM199) a prasečí PGM médium. Dále média obsahují různé suplementy včetně anorganických solí, živin, vitamínů a růstových faktorů (Romar et al. 2019).

3.2 Inseminace

Primárním cílem každé inseminační stanice je produkce velkého množství spermatu co nejvyšší kvality, v co nejkratším čase (Pruneda et al. 2005). Zvýšil se i biotechnologický zájem o prase, jako o vhodný modelový organismus s využitím v biomedicíně, jelikož je fyziologickými parametry velmi blízké člověku. Tento zájem paralelně zlepšil i techniky asistované reprodukce prasete (Romar et al. 2019). Kanci se pro inseminaci začínají plně využívat po dosažení 10 měsíců, u mladších jedinců se vyskytuje vysoký počet nezralých spermií a nízká koncentrace spermií v ejakulátu.

Inseminace prasat může probíhat ve třech základních formách. První je servisní způsob, kdy si chovatel objednává provedení inseminace. Druhým způsobem je dodavatelská forma, kdy si chovatel objednává hotovou inseminační dávku a sám prasnici inseminuje. Třetí formou je podnikový způsob, kde se v tomtéž podniku inseminační dávky vyrábějí i spotřebovávají. V ČR se nejvíce používá dodavatelský způsob a servisní jen velmi výjimečně (Louda 2001).

3.2.1 Inseminační stanice kanců

Zřizování inseminačních stanic kanců i všech podmínek pro provoz v České republice je řízeno Zákonem o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat č.154/2000, zákon o veterinární péči a příslušné prováděcí vyhlášky (Louda 2001).

Dle Ministerstva zemědělství. 2000. Zákon č. 154/2000 o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) je odběr, hodnocení, zpracování a uchování spermatu možné pouze na místech určených pro tyto účely za dodržení hygienických a bezpečnostních podmínek. U odebraného ejakulátu je nutné posoudit vlastnosti, které určují jeho kvalitu, zdravotní nezávadnost, možnosti ředění a způsobilost k použití. Místnosti na odběr spermatu a místnosti na zpracování by měly být oddělené a splňovat hygienické a technologické podmínky. Odběr spermatu provádí oprávněné osoby na inseminačních stanicích. Odběr lze provádět i mimo inseminační stanice na odběrových místech.

Obaly inseminačních dávek musí být označeny, tak aby bylo možné identifikovat plemeníka.

Inseminační stanice musí mít fyzicky oddělené prostory provozně-administrativní včetně sociálního a hygienického zařízení s funkcí hygienické smyčky, dále prostory pro ustájení plemeníků s možností izolace karantenovaných a nemocných zvířat, místnost pro odběr nebo

venkovní připouštědlo, prostory pro čištění, dezinfekci a sterilizaci pomůcek a zařízení, taky laboratoř pro posuzování a zpracování spermatu a výrobu inseminačních dávek a prostory pro uchovávání a výdej inseminačních dávek.

V chovu prasat je také nutné mít funkční systém protinákazové ochrany. Jedním ze systémů je černobílý provoz, který spočívá v rozdělení farmy na dvě části, bílou – čistou a černou nečistou (Státní veterinární správa ČR 1998). Farma má přísně oddělené zóny, které mají svoje pravidla. Oddělené musí být výrobní zóna, zóna skladu krmiv, zóna skladů odpadních produktů, dále také hygienický filtr, kdy farma má jediný možný vstup do výrobní zóny, součástí je nečistá šatna, hygienické zařízení a čistá šatna. Dalším systémem je veterinární kontrolní smyčka (veterinární filtr), ten zabraňuje přenosu chorob při příjezdu nových zvířat, ta jdou rovnou do místnosti, kde jsou kontrolována. Takže pracovníci uvnitř nepříjdou do kontaktu s pracovníky vnějšího okruhu. Prevencí zavlečení nových onemocnění do chovu může být izolace zvířat, což je preventivní prozatímní separování zvířat před zařazením do stáda. Délku izolace stanovuje místně příslušná Krajská veterinární správa. Naopak do karantény jdou zvířata, u kterých je podezření na onemocnění. Omezování potenciálních zdrojů nákazy je oplocení pozemku, uzavření vstupní brány a dezinfekční vjezd (Novák & Malá 2012).

3.2.2 Inseminační dávky

Úspěšnost zpracování spermatu je hodnocena od schopnosti udržení fertility spermií, které při tomto procesu prochází nefyziologickými změnami. Faktory, které ovlivňují kvalitu inseminační dávky, zahrnují odchov a chov pleménika i jeho výživu. Dalším faktorem je odběr spermatu a jeho následné zpracování. Odebrané sperma je nutné makroskopicky i mikroskopicky zhodnotit a následně připravit ke konzervaci, což zahrnuje i vhodné naředění spermatu (Beran 2014).

K efektivnímu využití kanců a ke zvyšování počtů vyprodukovaných inseminačních dávek, je nutné zabývat se stanovením maximálního stupně ředění a snižovat počet spermií v inseminačních dávkách tak, aby bylo zachováno požadované procento zabřeznutí a plodnost (Smítal 2001). Membrána spermie u kance obsahuje vysokou koncentraci polynenasycených mastných kyselin – PUFA, což má za následek citlivost ke chladovému šoku (Awda et al. 2009), proto k němu nesmí při zpracování inseminační dávky dojít (Beran 2014).

Pokud produkujeme selata pro výkrm, je možné používat na inseminace heterospermie. Ty jsou buď pravé, což je směs spermatu od dvou kanců v jedné inseminační dávce, anebo nepravé, kdy se v říji prasnice použije více dávek od odlišných kanců v rozmezí 10 až 12 hodin (Louda 2001).

3.2.3 Odběr spermatu

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujícím kvalitu spermatu pro inseminaci je frekvence odběru ejakulátu od kance (Pruneda et al. 2005). Je proto nutné zvolit optimální frekvenci odběrů a podpořit správnou produkci spermií. Za 3 dny po odběru už kanec dosahuje maximálního objemu a zhruba za týden je kanec na maximálním počtu spermií v ejakulátu. Přestávka mezi odběry by naopak neměla přesahovat 10 dní, jelikož dochází k vylučování spermií močí a rozpadu spermií s jejich následným vstřebáním (Louda 2001).

3.2.4 Hodnocení spermatu

Pro určení kvality a kvantity spermatu je nutné provést po odběru jeho hodnocení, které zahrnuje zhodnocení fyziologické funkčnosti spermií, morfologické stavby spermií, motility, koncentrace spermií v ejakulátu, objemu spermatu, životaschopnosti a integrity akrozomu (Sutkeviciene et al. 2009). Parametry spermatu jsou závislé na věku kance, zralosti spermií, ročním období, přidružených nemocech a samotném plemeni (Chłopik & Wysokińska 2019).

Morfologie spermií, koncentrace a pohyblivost spermií jsou tři hlavní faktory při rutinním hodnocení spermií. Toto hodnocení je levné, ale poměrně subjektivní (Sutkeviciene et al. 2009). U procenta pohyblivých spermií je nutné hodnotit, jak pohyb vpřed za hlavičkou, tak celkový charakter pohybu (Aust & Bazala 2006).

Nepostradatelným předpokladem úspěšnosti fertilizace je integrita a funkceschopnost plazmatické membrány spermie (Věžník et al. 2010). Ta je zodpovědná za zachování buněčné homeostázy, a proto má zásadní roli v přežití spermií v samičím reprodukčním traktu (Sutkeviciene et al. 2009). Pouze spermie s funkční plazmatickou membránou, umožňující přestup vody do a z buňky a jsou schopné přežít konzervační postupy (Eilts 2005).

Mrtvé spermie je možné rozeznat díky změně permeability plazmatické membrány (Věžník et al. 2010) a ztrátě pohyblivosti spermie (Sutkeviciene et al. 2009).

3.2.4.1 Morfologické změny

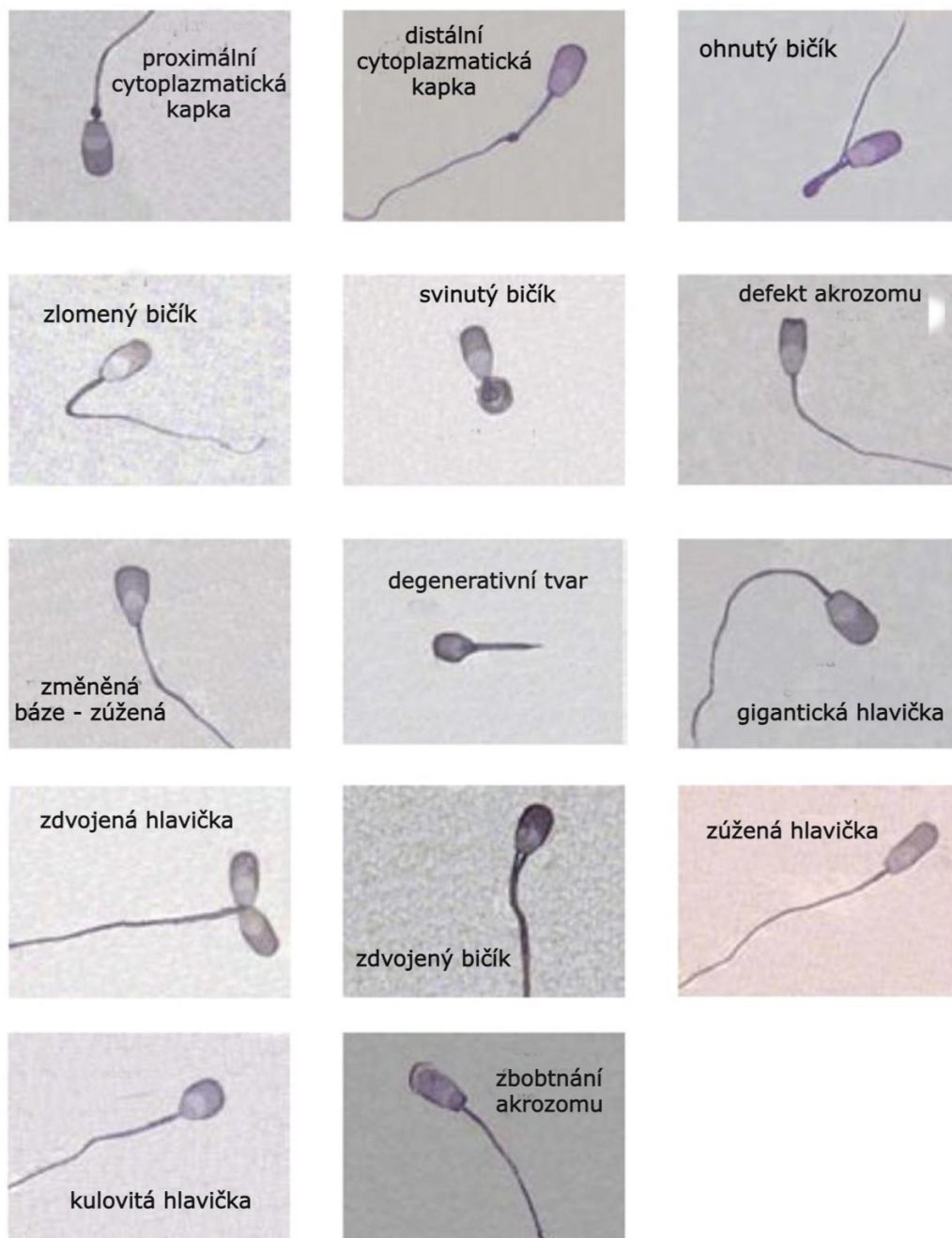
Pro oplození je důležitá správná morfologická stavba spermie. V ejakulátu se abnormální spermie vyskytují běžně. Jsou to spermie, které z morfologického hlediska neodpovídají normě. Pro správnou fertilizační schopnost spermatu je nutné, aby morfologické změny na spermiích nepřekročily určitou hranici. Ta se liší podle druhu zvířete. U plemenných kanců to může být až 20 % (Tichý 2004; Chłopik & Wysokińska 2019). Kondracki et al. (2012) zjistil, že sperma u plemene Duroc a Pietrain mělo až 94,02 % spermií s fyziologickou morfologií. A ejakuláty kanců plemene Pietrain měly o něco více spermií s primárními abnormalitami, ale méně spermií se sekundárními abnormalitami ve srovnání s kancem plemene Duroc. Rozdíly však byly malé a nebyly významné.

Na kvalitu spermií má vliv i roční období. Abnormální spermie se vyskytovaly téměř o 6 % víc v období od dubna do června než v období leden až březen (Lipenský et al. 2010). Změny nastávají i v letním období, kdy dochází k poklesu kvality inseminačních dávek. Je možné pozorovat hlavně zvýšení počtu mrtvých i morfologicky změněných spermií, změny v rychlosti a charakteru pohybu spermií, snížení koncentrace spermií, snížení tolerance spermií vůči procesu ředění a zhoršení přežitelnosti spermií v uchovaných vzorcích naředěného a konzervovaného spermatu plemenných kanců (Aust & Bazala 2006).

Změny na spermiích dělíme na primární, které vznikly během spermatogeneze a sekundární, které vznikají během zrání spermií nebo při přípravě vzorku spermatu (Chłopik & Wysokińska 2019). Další dělení je podle velikosti morfologické změny. První skupinou jsou spermie s velkými defekty, mezi které řadíme například abnormality na hlavičce a akrozomu, stočený bičík spermií a spermie s proximálními kapkami. Druhou skupinou jsou spermie s malými defekty, což je například lehce ohnutý bičík nebo malé změny na hlavičce (Sutkeviciene et al. 2009).

Vady spermií mohou být rozřazeny do skupin i podle umístění defektu:

- změny ve tvaru hlavičky a uložení akrozomu
- tvar a velikost hlavičky
- změny tvaru báze hlavičky a odstup středního segmentu
- změny ve tvaru středního segmentu
- abnormální uložení cytoplazmatické kapky
- změny na bičíku
- nefyziologické tvary spermií (Tichý 2004)



Obrázek 3 – Pozorované abnormální spermie u kanců. Převzato a upraveno z (Čeřovský et al. 2005)

Důležitá pro správné oplození je i zralost spermií. Nezralé spermie poznáme podle cytoplazmatické kapky, která způsobuje různé poruchy. Cytoplazmatická kapka se vyskytuje na hlavičce a postupně se přesouvá směrem k bičíku, obsahuje lipidy, RNA, lipoproteiny a hydrolytické enzymy (Chłopik & Wysokińska 2019). Distální protoplazmatická kapka byla jednou z nejvíce objevovaných abnormalit u kančích spermií a její výskyt byl nejvyšší v období říjen až prosinec (Lipenský et al. 2010).

Kančí spermie jsou velmi citlivé na formy reaktivního kyslíku (Awda et al. 2009; O'Flaherty & Matsushita-Fournier 2017). Jako je například superoxidový anion, peroxid vodíku, oxid dusnatý nebo hydroxyl (O'Flaherty & Matsushita-Fournier 2017). Zvýšené hladiny ROS se označují jako oxidativní stres. Ten může způsobit neplodnost, jelikož snižuje motilitu spermií a jejich mitochondriální aktivitu (Awda et al. 2009). U myši bylo zjištěno, že vystavení spermií oxidativnímu stresu se poté přenáší i na potomky, a to v podobě změny v jejich metabolismu a chování (Romar et al. 2019).

3.2.5 Ředění a konzervace spermatu

Zpracování spermatu pro umělou inseminaci zahrnuje ředění spermatu, kdy dochází současně ke snížení koncentrace semenné plazmy (Höfner et al. 2020).

Ředidla dodávají spermiím výživné a ochranné látky (Smital 2001). Ředěním ejakulátu docílíme zvýšení objemu a vytváříme podmínky pro přežití spermií mimo organismus (Beran 2014). K ředění spermatu se používají tři druhy ředících roztoků, jedná se o skupinu extendorů, protektorů a ředidla označovaná jako implementory. Skupina extendorů pouze zvětšují objem spermatu. Protektory dodávají spermatu i potřebné živiny a implementory jsou podobné protektorům, jen jsou obohaceny o látky působící na pohlavní ústrojí samic. Ředidla kančího spermatu mohou plnit i funkce depozitáře živin a energie, ochrany spermií proti teplotnímu šoku, regulace škodlivých vlivů kolísání pH, udržování správné osmotické rovnováhy (Smital 2001).

Složení ředidel významně ovlivňuje fertilizační schopnost spermií, a proto jsou důležité jeho komponenty. Hlavními složkami ředidla by měla být redestilovaná voda, kryoprotektiva, pufrý, jednoduché cukry, antibiotika, aminokyseliny a mastné kyseliny (Beran 2014).

Ředidla dělíme na krátkodobá – uchování do 3 dnů a střednědobá – déle než 3 dny a kryokonzervační. Doba uchování se odvíjí od doby, kdy je ředidlo schopné uchovat sperma v tekuté formě a v jeho plodnosti.

Konzervováním spermatu je pohyb spermií inhibován a omezuje se jejich metabolismus na minimum, tomuto stavu říkáme anabióza. Při konzervaci je potřeba dbát na to, aby se nepoškodila plazmatická membrána a akrozomspermií, to by později mohlo vést k narušení oplozovací schopnosti spermií (Smital 2001). Dlouhodobé vystavení spermií semenné plazmě během jejich skladování *in vitro* je nefyziologické, neboť při přirozeném páření se spermie oddělují od semenné plazmy (Höfner et al. 2020). Technika separace spermií od semenné plazmy, ředidel nebo kryoprotektantů by měla být rychlá, snadná, nízkonákladová a schopná vybrat pohyblivé a morfologicky normální spermie s nízkou produkcí reaktivních forem kyslíku ROS (Romar et al. 2019).

Kryokonzervace spermatu musí být prováděna tak, aby se zachovala fertilizační schopnost spermií během zmrazení i po jejich rozmrazení (Roca et al. 2006). Úspěšná

kryokonzervace závisí na biofyzikálních charakteristikách buněk, jako je například reakce na anizosmotické podmínky při přidávání a odebrání kryoprotektantů (Benson et al. 2012). Kančí sperma má sníženou osmotickou toleranci ve srovnání se spermatem jiných druhů. Aby byla zachována motilita spermie, musí být odchylka objemu buňky v rozmezí 99 % - 101 % počátečního isosmotického objemu (Gilmore et al. 1998). U kryokonzervace je taky důležité, z jaké spermiové frakce spermie pochází. Spermiové frakce se liší složením, a to má vliv i na možnosti následného uchování spermatu. Spermie z frakce bohaté na spermie lépe odolávají skladování v kapalném stavu i kryokonzervaci než ty ze zbytku ejakulátu. Jedním z důvodů je, že jsou vystaveny hlavně sekretům epididymu a prostaty, a nikoliv sekretům bohatých na bílkoviny z bulbouretrálních žláz.

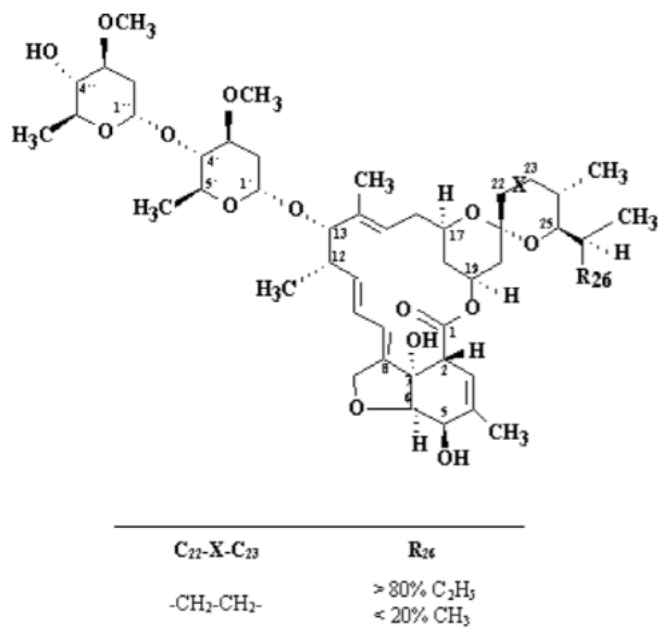
Navzdory velkým pokrokům technologií se v chovech hospodářských zvířat stále nejvíce používá krátkodobé či střednědobé skladování spermatu v tekutém stavu. Toto zpracování je pro sperma méně škodlivé ve srovnání s kryokonzervací, jelikož sperma nevystavujeme mechanickým silám, teplotnímu šoku a extrémně vysokému ředění (Höfner et al. 2020). Zmrazené a zpět rozmrazené spermie ztrácí motilitu a životaschopnost oproti čerstvým spermii (Awda et al. 2009). Při krátkodobé konzervaci se nejčastěji kančí sperma skladuje v 17 °C (Höfner et al. 2020).

3.3 Ivermektin

Samčí reprodukční soustava je velmi citlivá k účinkům farmakologických látek. Vysokou citlivost vykazuje i k mnoha chemikáliím a látkám produkovaným průmyslovými a zemědělskými činnostmi. Jako jsou například pesticidy nebo rozpouštědla (Tabl Ghada et al. 2013). Produkce spermií může být ovlivněna rovněž léky, které jsou schopné ovlivnit reprodukční systém různými cestami a mechanismy. U samců mohou narušit spermatogenezi a tím způsobit špatnou kvalitu spermatu, koncentraci spermií i morfologii. Ve svém důsledku tyto změny mohou vést ke snížené plodnosti nebo až dokonce k neplodnosti (Moreira et al. 2019). Proto je potřeba účinkům léků, které jsou zvířatům podávány, věnovat velkou pozornost.

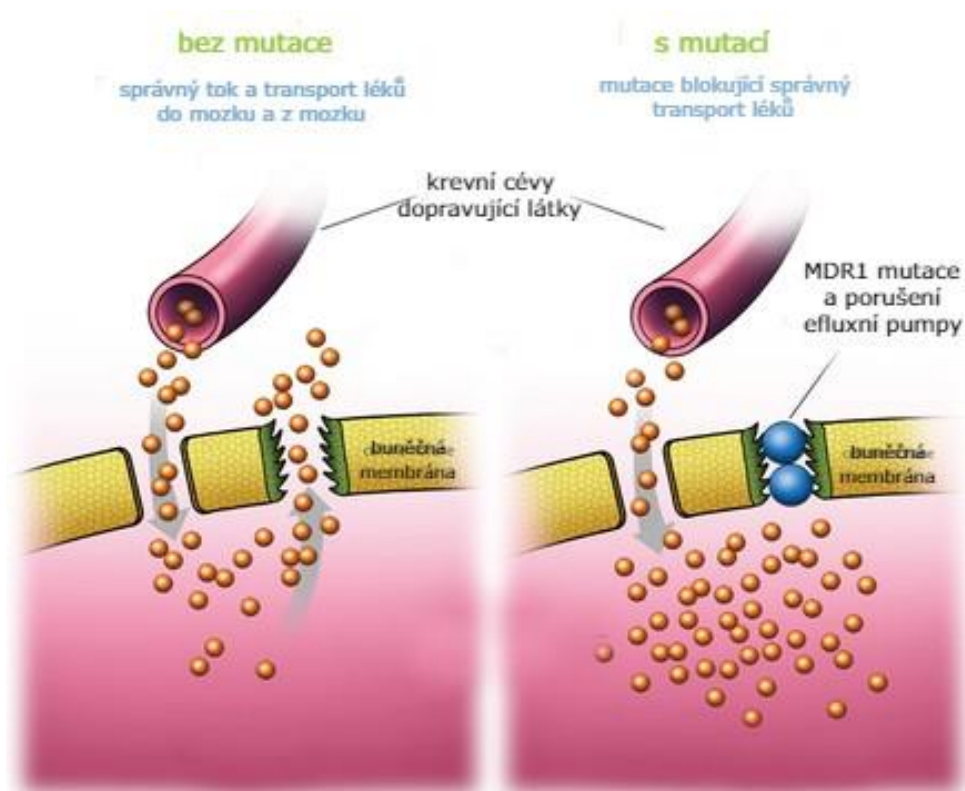
Ivermektin je jedním z nejběžnějších antiparazitik používaným u zvířat po celém světě (González Canga et al. 2009). Je dokonce používán i v lidské medicíně (Lespine et al. 2012). Je to polosyntetický makrocyclický lakton, který byl poprvé izolován ze *Streptomyces avermitilis* (Campbell et al. 1983; Moreira et al. 2020). Společně s ivermektinem do této skupiny laktonů patří i abamektin, eprinomektin, doramektin a selamektin (Lespine et al. 2012). Ivermektin je vysoce lipofilní látka, která se rozpouští v organických rozpouštědlech, zatímco ve vodě je prakticky nerozpustná (González Canga et al. 2009).

Ivermektin je směs dvou chemicky modifikovaných avermektinů s obsahem minimálně 80 % 22,23-dihydroavermektinu-B1a a maximálně 20 % 22,23-dihydroavermektinu-B1b (Campbell et al. 1983; Chiu et al. 1990; González Canga et al. 2009).



Obrázek 4 – Chemický vzorec ivermektinu. Převzato z (Campbell et al. 1983; Chiu et al. 1990; González Canga et al. 2009).

Ivermektin je velmi silné anthelmintikum a insekticid. Působí na široké spektrum parazitů, jako jsou například hlístice, a to jak na jejich larvální stádia, tak i na dospělé (González Canga et al. 2009), plicní červi, vši a svrab (González Canga et al. 2009; Moreira et al. 2020; Martin et al. 2021). U prasat má ivermektin vliv na hlístice konkrétně na škrkavky parazitující na prasatech (*Ascaris suum*), vlasovku prasečí (*Hyostrongylus rubidus*), háďátka (*Strongyloides ransomi*), měchovce (*Oesophagostomum spp.*), plicnivky prasečí (*Metastrongylus spp.*) a háďátko vepří (*Stephanurus dentatus*). Také na členovce jako je například veš prasečí (*Haematopinus suis*) a zákožka svrabová *Sarcoptes scabiei* (González Canga et al. 2009). Účinky ivermektinu nebyly prokázány proti tasemnicím a motolicím. Předběžné studie uvádí, že ivermektin ve vyšších koncentracích vykazuje antivirové, antimalarické, antimetabolické a protirakovinové účinky (Martin et al. 2021). Ačkoliv se struktura ivermektinu podobá makrolidovým antibiotikům, zdá se, že nemá žádné antibakteriální ani protiplísňové účinky (Sadek & Shaheen 2015). Má vysokou účinnost jak proti endoparazitům, tak i proti ektoparazitům, a to již poměrně nízkých dávkách. Uvádí se i jeho velká míra bezpečnosti, intoxikace ivermektinem je obvykle velmi vzácná. Mezi příznaky toxikózy u zvířat se řadí mydriáza a deprese následovaná ataxií, ulehnutím a smrtí. Pouze některá pastervecká plemena psů, zejména kolie, jsou náchylná k intoxikaci ivermektinem, což souvisí s absencí nebo nedostatkem P-glykoproteinu neboli MDR1, který funguje jako transmembránová efluxní pumpa k omezení kumulace cizorodých látek v mozku (González Canga et al. 2009). P-glykoprotein MDR1 se taky nachází v proximálních renálních tubulech, v membráně hepatocytů, v apikální membráně slizničních buněk střeva, v kapilárách endotelových buněk mozku a varlat, v nadledvinách a v placentárních trofoblastech (Schinkel et al. 1995).



Obrázek 5 – Prostupnost membrány pro ivermektin a role MDR1 receptorů. Převzato a upraveno z (WisdomPanel)

Většina toxických účinků je přisuzována předávkování ivermektinem. U prasat vyvolává subkutánní dávka 30 mg/kg za 24 hodin ataxii a letargii, mydriázu, vyčerpanost a anorexii, zatímco při dávce 15 mg/kg nebyly žádné známky toxicity pozorovány (González-Canga et al. 2010).

Ivermektin se využívá jak u zvířat určených k produkci potravin, tak i u jiných druhů, například u koní nebo psů (Chiu et al. 1990). Podává se i kočkám, velbloudům, sobům, bizonům a lidem (Lifschitz et al. 2002).

3.3.1 Farmakokinetika

Znát kinetiku léčiva pomáhá optimalizovat jeho klinickou účinnost. Farmakokinetika ivermektinu je charakterizována obecně pomalým absorpčním procesem, širokou distribucí do organismu, nízkým metabolismem a pomalým vylučováním (Lifschitz et al. 2002; González Canga et al. 2009). U prasat v místě vpichu bylo patrné velké množství látky ještě 24 hodin po aplikaci, což naznačuje pomalý proces jeho distribuce. Ivermektin byl pak detekován ve všech vrstvách gastrointestinálního traktu (včetně jeho obsahu i ochranného mucinu) a i v plicích, kůži a také v ušním mazu. To napovídá jeho účinnosti proti ektoparazitům, zejména roztočům (González Canga et al. 2009). V plazmě byl pak detekován až 20 dní po aplikaci léku, což potvrzuje jeho pomalý metabolismus a vylučování (Lifschitz et al. 2002). Poločas rozpadu ivermektinu je u prasat rychlejší než u skotu nebo u ovcí. Z tohoto důvodu je obvykle u prasat zajištěna kratší ochrana proti parazitům, než je tomu u skotu a ovcí (González Canga et al. 2009).

U všech živočišných druhů je ivermektin vylučován hlavně stolicí bez ohledu na způsob podání léčiva, jen malé dávky jsou vylučovány močí (Chiu et al. 1990; González Canga et al. 2009).

Vzhledem ke své vysoké lipofilní povaze je ivermektin podáván v poměrně velkém objemu u všech druhů zvířat. Má tendenci se hromadit v tukové tkáni, která pak funguje jako rezervoár léčiva (González Canga et al. 2009) a nejvyšší hladiny ivermektinu najdeme v játrech (Chiu et al. 1990).

Kinetika léčiva se liší mezidruhově, záleží i na tělesném stavu, věku a fyziologickém stavu jedince. Všechny tyto parametry pak ovlivňují účinnost léčiva (Lifschitz et al. 2002; González Canga et al. 2009). Farmakokinetiku léčiva taky ovlivňuje způsob jeho podání. Nejlepší dostupnosti léku je dosaženo subkutánní aplikací a dále také orální aplikací (González Canga et al. 2009). I vehikulum, ve kterém je antiparazitikum podáváno, může mít vliv na jeho vstřebávání a kinetiku. Parentálním podáním léčiva došlo k pomalejší absorpci, ale celkově k vyšší dostupnosti léčiva v plazmě (Lifschitz et al. 2002).

3.3.2 Podání léčiva

Lék lze podávat orálně, intramuskulárně, subkutánně nebo lokálně s ohledem na druh zvířete (González Canga et al. 2009). U prasat jsou k dispozici i premixové variace (Lifschitz et al. 2002). Přežvýkavcům, prasatům, koním se podává orálně v dávkách 150–200 µg/kg (Martin et al. 2021). González Canga et al. (2009) uvádí u prasat 300 µg/kg subkutánně.

LD⁵⁰ je u opic uváděna 24 000 µg/kg a u bíglů 80 000 µg/kg (Martin et al. 2021).

El-Nahas & El-Ashmawy (2008) pak uvádí, že ivermektin nemá žádné vedlejší účinky.

3.3.3 Mechanismus působení ivermektinu

Ivermektin a jeho analogy jsou pozitivními alosterickými modulátory, které působí na iontové kanály (Martin et al. 2021).

Teorie mechanismu působení ivermektinu připisuje účinky interakcí s glutamátem chloridových kanálů, čímž zabraňuje jejich uzavření a membrána se stává více propustná pro chloridové ionty, to vede k hyperpolarizaci membrány, čímž se snižuje přenos vzruchu, což vede k paralýze somatických svalů, hltanové pumpy a následně způsobuje smrt parazita (Sadek & Shaheen 2015).

Jeden z dalších popsaných mechanismů je, že se díky vazbě na chloridové kanály stimuluje uvolňování gamma-aminomáselné kyseliny (GABA) v nervových zakončeních parazita, což podporuje vazbu na GABA postsynaptické receptory, tím se zvyšuje membránová propustnost pro chloridové ionty a je narušen nervový přenos, což také vede k ochrnutí a smrti parazita (Terneux et al. 2011).

Ivermektin se uvádí jako agonista GABA receptorů (El-Nahas & El-Ashmawy 2008). U členovců a hlístic působí na GABA receptory, které jsou v periferní nervové soustavě (Sadek & Shaheen 2015). To způsobuje paralýzu, dysfunkci nervových buněk a smrt parazita (Buš 2005). U savců působí ivermektin blokováním postsynaptického přenosu nervových impulsů zprostředkovaných kyselinou aminomáselnou – GABA. GABA je hlavní inhibiční neurotransmitter v CNS (Sadek & Shaheen 2015; Moreira et al. 2020). Proto je bezpečnost použití ivermektinu u savců závislá na funkci P-glykoproteinu neboli MDR1 při udržení

hematocefalické bariéry (Buš 2005). MDR1 chrání organismus před toxickými látkami eliminací těchto látek močí, žlučí a lumenem střeva, aby se předešlo hromadění těchto látek v mozku (Schinkel et al. 1995). Pokud je u savců porušena hematoencefalická bariéra, pak má ivermektin fatální vliv na mozkovou tkáň hostitele (Martin et al. 2021).

Existuje vztah mezi GABAergickým systémem a sexuálním chováním savců. Ivermektin může ovlivňovat chování, pokud je podáván během určitého období maturace mozku (Moreira et al. 2020).

3.3.4 Vliv na reprodukci

Existuje mnoho studií, které se zabývají problematikou vlivu ivermektinu na reprodukci zvířat. Názory se velmi rozcházejí.

González Canga et al. (2009) uvádí, že ivermektin nemá žádné účinky na chovatelskou užitkovost. Janett et al. (2001) uvádí pozitivní vliv na samičí a samčí plodnost. Naopak Naoman (2012) a Ali (2014) a Sadek & Shaheen (2015) uvádějí negativní vliv ivermektinu na některé reprodukční ukazatele. Studie byly provedeny u různých živočišných druhů.

U hřebců nebylo zjištěno, že by přípravek Eqvalan s účinnou látkou ivermektin podávaný orálně měl negativní vliv na kvalitu spermatu nebo úspěšnost jeho kryokonzervace. Naopak se zdá, že má pozitivní účinek na plodnost hřebce, jelikož se většina hodnocených parametrů zlepšila. Došlo k zvýšení koncentrace spermií, jejich lepší motilitě i životaschopnosti spermií (Janett et al. 2001).

U beranů naopak došlo k poklesu objemu ejakulátu, koncentrace spermií a hladiny testosteronu v séru. Výskyt abnormálních spermií byl po aplikaci ivermektinu častější. Po pěti dnech však již nebyly patrné žádné rozdíly ve skupině zvířat ošetřených ivermektinem oproti kontrolní skupině (Naoman 2012). Ali (2014) také uvádí u beranů pokles objemu ejakulátu, motility a výskyt vyššího procenta spermií s morfologickými změnami po aplikaci ivermektinu. Do sedmi dnů se však parametry vrátily do obvyklých hodnot. Snížení motility spermií uvádí i (Tanyildizi & Bozkurt 2002). Naopak Schroder et al. (1986) a Naoman (2012) uvádějí, že ivermektin neměl vliv na motilitu spermií. Jiná studie zase uvádí, že skupina zvířat ošetřovaná ivermektinem měla větší objem ejakulátu než skupina bez ošetření, data však nebyla příliš konzistentní (Schroder et al. 1986). Tanyildizi & Bozkurt (2002) uvádí, že došlo ke snížení koncentrace spermií po aplikaci ivermektinu beranům.

U býků se po ošetření ivermektinem zvýšil objem ejakulátu a koncentrace spermií. Došlo ke zvýšení ALP a ACP aktivity v semenné plazmě, hladiny celkového proteinu, globulinů, močoviny a zinku byly vyšší. Snížila se ALT a AST a hladina sodíku (Tabl Ghada et al. 2013). Ivermektin měl negativní vliv i na estrální cyklus u krav, hladinu reprodukčních hormonů a vápníko-fosforovou homeostázu (Sadek & Shaheen 2015).

Ivermektin u potkanů neměl vliv na varleční parenchym a tím pádem ani na spermatogenezi (Moura et al. 2006). Nebyla zjištěná ani korelace ivermektinu se změnami morfologie hlavičky spermií (Otubanjo et al. 2006). Ani podání ivermektinu v perinatálním období nemělo vliv na vývoj reprodukčního ústrojí, nezasahoval do denní produkce spermií, počtu spermií ve varlatech nebo sexuálního chování (Terneux et al. 2011).

U samců králíka nebyly zjištěny žádné změny v koncentraci, motilitě, morfologii, integritě akrozomální membrány, ani ve fertilizační schopnosti po podání ivermektinu (Moreira et al. 2019).

I u kanců se názory rozcházejí. Některé studie prokázaly pokles živých spermií do dvou týdnů od podání ivermektinu (Wrona & Krzyzanowski 1995). Jiné studie nezaznamenaly žádné změny v objemu ejakulátu, pH, koncentraci, motilitě nebo morfologii spermií po ošetření ivermektinem v dávce 0,4 mg/kg (Brokken 1983).

Podávání ivermektinu jednou týdně po dobu osmi týdnů vyvolalo mírné poruchy plodnosti u potkanů (El-Nahas & El-Ashmawy 2008). Proto se ivermektin nedoporučuje aplikovat v reprodukčním období, protože může snižovat motilitu a koncentraci spermií (Tanyildizi & Bozkurt 2002). Zvířata do reprodukce je vhodnější zařadit nejméně 5 dní od aplikace ivermektinu, kvůli jeho možnému negativnímu vlivu na reprodukční parametry (Naoman 2012). Ali (2014) uvádí raději minimálně sedm dní od aplikace ivermektinu.

4 Metodika a materiál

4.1 Metodika

4.1.1 Odběr ejakulátu v testačním a inseminačním středisku Skršín

V testačním a inseminačním středisku Skršín je zaveden systém černobílého provozu. V době realizace diplomové práce se ve stanici nacházeli kanci pouze plemene Duroc geneticky odpovídající dánskému programu DanBred. Odběry kanců probíhaly podle odběrového plánu, který stanovil zootechnik. Kanci byli před odběrem očištění kartáčem, byl jim vymáčknut obsah předkožkového vaku a v případě potřeby se jim ostříhaly štětiny na předkožce. Před vlastním odběrem bylo ještě provedeno očištění předkožky dezinfekčním ubrouskem. Samotný odběr začínal naskočením kance na fantom a odborně způsobilá osoba začala s masturbací. Odebírala se pouze spermiová a postspermiová frakce. Prespermiovou frakci bylo nutné odstříknout pryč.

Sperma bylo odebíráno do termonádoby, která byla označena registrem, jménem kance a byl v ní nespermicidní odběrový sáček. Nádoba byla překrytá filtrem, který sloužil k okamžitému odfiltrování granul. Odběrový sáček i filtr byly určeny k jednorázovému použití. Po ukončení ejakulace byl odstraněn filtr z odběrné nádoby a sáček byl předán do laboratoře k dalšímu zpracování.

Kanci v testační stanici Skršín byli pravidelně každý rok v únoru odčerveni subkutánní aplikací veterinárního přípravku Biomectin, který je určen také pro skot a ovce. Léčivou látkou je zde ivermektin v množství 10 mg/ml injekčního roztoku. Pro prasata je doporučené množství 0,3 ml přípravku na 10 kg živé hmotnosti a způsob podání je striktně subkutánní do volné kůže za uši nebo mezi lopatky.

4.1.2 Laboratorní hodnocení ejakulátu

Hodnocení odebraného ejakulátu probíhalo v laboratoři, která je oddělena od odběrové místnosti. Je zde snaha o vyloučení možné kontaminace ze stáje, kde probíhal odběr. Hodnocení spermatu se provádělo makroskopicky i mikroskopicky. První zhodnocení bylo pouze smyslové, kdy je posuzována barva, pach, konzistence a přítomnost cizích příměsí. Pokud se objevila odchylka od normálních parametrů, ejakulát se dále nezpracovával. Hodnocenými důležitými parametry byly vždy objem ejakulátu, koncentrace spermií, aktivita spermií, procentuální zastoupení abnormálních spermií a celkový počet spermií v ejakulátu.

4.1.2.1 Objem ejakulátu

Objem ejakulátu byl standardně stanoven na kalibrovaných vahách nebo v kalibrované odměrné nádobě. Hodnota byla uvedena v mililitrech.

4.1.2.2 Koncentrace spermií v 1 cm³

Koncentrace spermií byla stanovena fotometrem ACCUREAD-IMV. K měření koncentrace spermií v ejakulátu bylo použito čisté ředidlo spermatu. Do připraveného vzorku ředidla 2400 μ l se pipetou odměřilo 100 μ l spermatu a provedlo se měření ve fotometru. Pokud

hodnota koncentrace nedosáhla 150000 spermií v 1 mm³ ejakulátu, ejakulát se dále nezpracovával.

4.1.2.3 Aktivita spermií

Pro stanovení aktivity spermií se rozmíchala kapka nativního spermatu na podložní sklíčko, které bylo předeřáté na 38°C. Pod mikroskopem s fázovým kontrastem se subjektivně zhodnotil progresivní pohyb vpřed za hlavičkou. Hodnotila se minimálně tři zorná pole. Aktivita spermií se uváděla v procentech a pokud nedosáhla minimálně 75 %, tak se ejakulát dále nezpracovával.

4.1.2.4 Procento abnormálních spermií

Výpočet procenta abnormálních spermií byl prováděn přímo v laboratoři ve Skršíně. Hodnocení bylo u každého kance prováděno 1x měsíčně pod mikroskopem při zvětšení 1000x a s použitím imerzního objektivu. Hodnotilo se vždy 200 spermií. Vzorky byly připraveny proškolenými a zkušenými pracovníci laboratoře, a to tak, že na podložní sklíčko označené registrem kance byla nanesena kapka nativního spermatu, při vysoké koncentraci se na hodinovém sklíčku udělal naředěný vzorek – fyziologický roztok + sperma (fyziologický roztok byl upravený na pH 7,2). Roztěr se zhotovil jedním tahem pomocí krycího skla, jež se zabroušenou hranou přiložilo ke kapce pod úhlem 45°, roztěr se poté nechal zaschnout při laboratorní teplotě. Barvení bylo prováděno podle Farellyho – fixační roztok, anilinová modř, krystalvioleť. Procento abnormálních spermií nesmělo přesáhnout 25 %, jinak bylo zpracování ejakulátu pozastaveno a u kance se prováděly zkušební skoky do zlepšení stavu, do té doby byla také pozastavena výroba inseminačních dávek. Jednou za dva měsíce se posílaly kontrolní vzorky do Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně.

4.1.2.5 Celkový počet spermií v ejakulátu

Celkový počet spermií v ejakulátu byl stanoven výpočtem. Ve vzorci bylo zohledňováno i procento abnormálních spermií a aktivita spermií. Tento údaj sloužil i k vypočítání množství vyrobených inseminačních dávek.

$$[(\text{objem} \times \text{koncentrace}) - \% \text{ abnormálních spermií}] \times \% \text{ aktivita}$$

Výsledek je vyjádřením celkového množství živých spermií v ejakulátu, schopných oplození a je uváděn v miliardách.

4.2 Materiál

4.2.1 Vstupní data

Pro účely této diplomové práce byly vybrány záznamy z odběrů plemenných kanců z testačního a inseminačního střediska Skršín. Soubor obsahoval data ze tří po sobě jdoucích let, kdy bylo v každém období vybráno 20 kanců. Aplikace Biomectinu proběhla každý rok v únoru. Proto byla vždy vybrána hodnocení tří odběrů u každého kance zhruba dva měsíce před podáním Biomectinu (skupina A), to znamená v prosinci, popřípadě listopadu, poté hodnocení tří odběrů ejakulátu v únoru, popřípadě v březnu, těsně po aplikaci Biomectinu (skupina B) a poté hodnocení tří odběrů ejakulátu po dvou měsících od aplikace Biomectinu, tedy v dubnu (skupina C). Dohromady se tedy jednalo o 180 údajů 2 měsíce před aplikací antiparazitika ve skupině A, 180 údajů v době těsně po podání antiparazitika ve skupině B a 180 údajů 2 měsíce po podání antiparazitika ve skupině C. Četnost hodnoceného souboru byla 540 hodnot.

4.2.2 Statistické vyhodnocení

Získaná data byla hodnocena prostřednictvím Friedmanovy ANOVY v programu Statistika 12 (StatSoft CR, Prague, Czech Republic). Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Vzorky v souboru byly závislé, proto musela být použita Friedmanova ANOVA jako vhodná neparametrická metoda. Nulová hypotéza byla stanovena tak, že rozdíly mezi soubory dat jsou způsobeny náhodným jevem.

5 Výsledky

5.1 Objem ejakulátu

Jedním ze hodnocených parametrů byl objem ejakulátu. Stanovení objemu ejakulátu se provádělo na zkalibrovaných vahách nebo změřením v kalibrované nádobě.

Průměrný objem ejakulátů odebíraných ve skupině A byl 175,47 ml. Medián tohoto souboru byl 168,50ml. Hodnota minima ve skupině A činila 64,00 ml a hodnotamaxima dosáhla 439,00 ml.

Průměrný objem ejakulátů odebíraných ve skupině B vzrostl oproti skupině A na hodnotu 183,06ml. I medián skupiny B byl vyšší a nabyl hodnoty 172,00ml. Minimum naměřené ve skupině B bylo 82,00 ml a maximum v této skupině bylo 391,00.

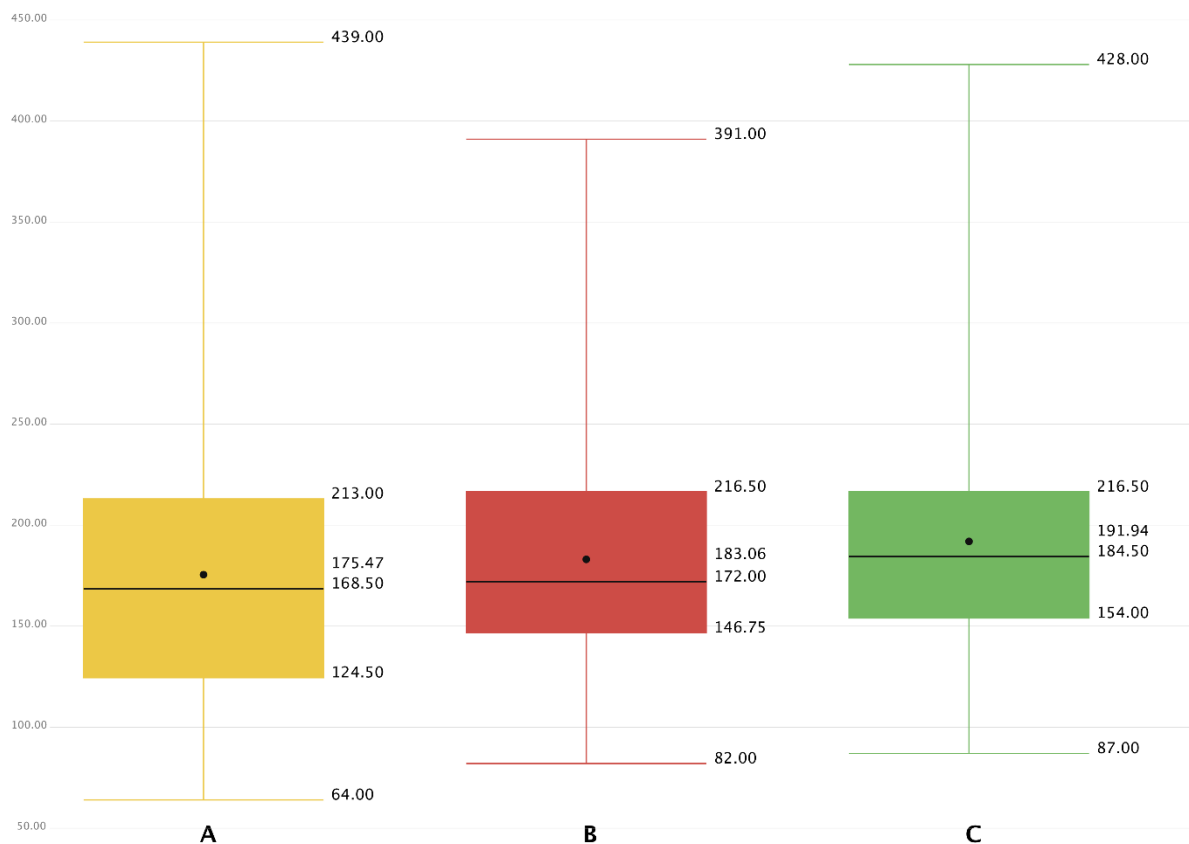
Ve skupině C průměr objemu ejakulátů dosáhl až na hodnotu 191,94ml. Medián také vzrostl a jeho hodnota byla 184,50. Nejnižší naměřená hodnota byla 87,00 ml, což bylo nejvyšší naměřené minimum ze všech tří skupin. Naměřené maximum mělo hodnotu 428,00 ml (Graf 1).

Následující graf 2 znázorňuje jednotlivé objemy ejakulátu u kanců a ukazuje rozdíly mezi odběry, které byly prováděny ve třech časových obdobích. Ve skupině A, skupině B i skupině C je v grafu znázorněn průměr třech měření, která byla prováděna v daném období. Z grafu 2 jsou zřejmé velké individuální rozdíly mezi porovnávanými jedinci.

Z výsledků je patrné, že u parametru objemu ejakulátu můžeme zamítnout nulovou hypotézu ($p < 0,05$; $p = 0,00174$). Objem rostl postupně v čase a již v době aplikace byl vyšší než 2 měsíce před aplikací.

Byl zde proveden Kendallův test, který počítá s průměrným pořadím vzorků. Kendallův koeficient shody je v tomto případě $W = 0,03530$, můžeme tedy konstatovat, že se jedná o málo podobné vzorky.

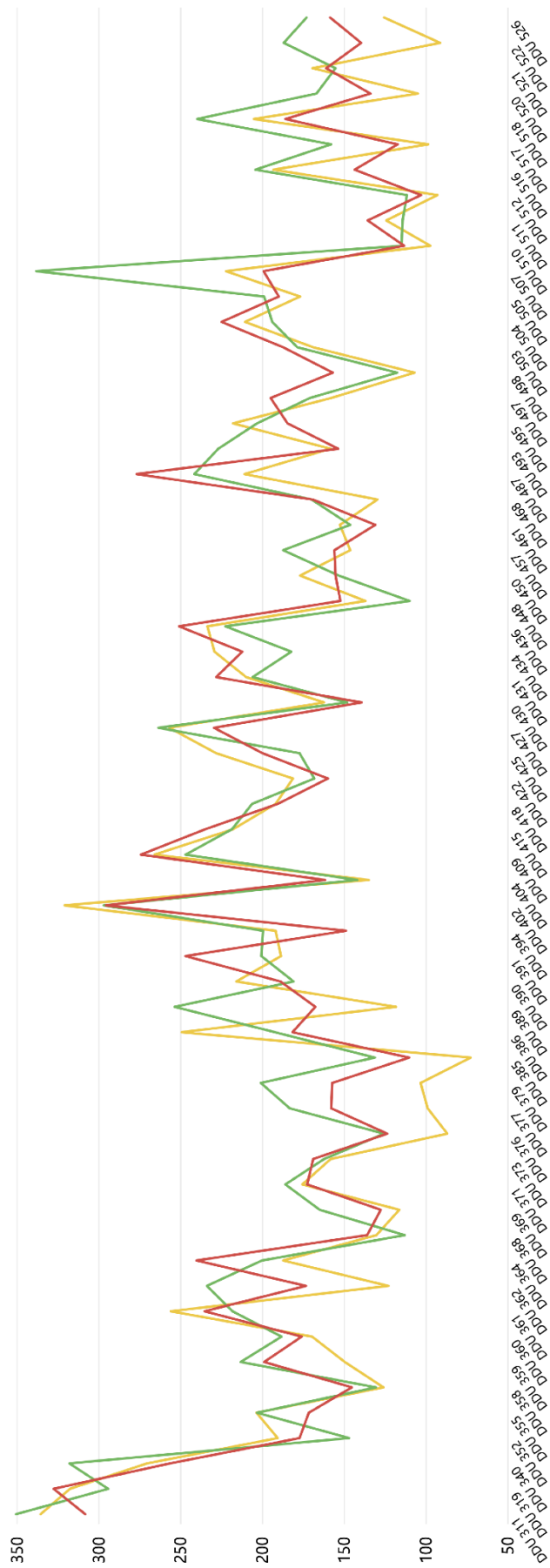
Objem ejakulátu [ml]



Graf 1: Krabicové grafy ukazující minima, maxima, průměry, mediány a kvartily pro parametr objem ejakulátu (ml) u tří skupin kanců, které jsou rozděleny podle časového období, ve kterém byli odebíráni – skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

Objem ejakulátu [ml] – průměrné hodnoty kanců

Skupina ● A ● B ● C
400



Graf 2: Průměrné hodnoty objemů ejakulátů u jednotlivých odebíraných kanců, kteří byli odebráni ve třech časových obdobích. Skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

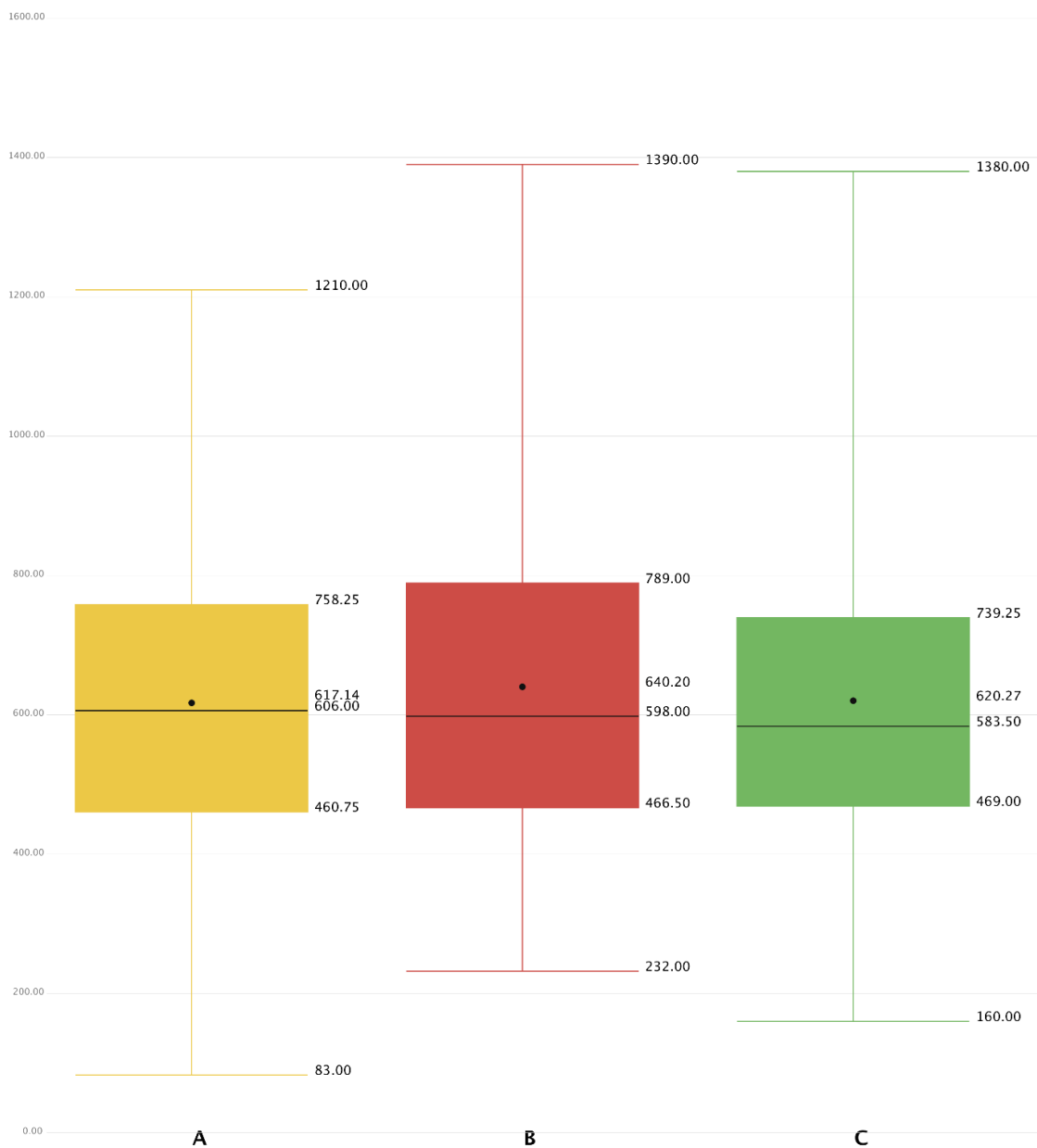
5.2 Koncentrace spermií v 1 cm³

Průměrná hodnota koncentrace spermií v ejakulátu v 1 cm³ byla u skupiny A 617,14/cm³. Medián této skupiny nabyl hodnoty 606,00/cm³. Naměřené minimum této skupiny bylo 83,00/cm³ a maximum činilo 1210,00/cm³. U skupiny B byla průměrná hodnota koncentrace spermií 640,20/cm³ a medián této skupiny byl 598,00/cm³. Ve skupině C se průměrná hodnota koncentrace spermií příliš nelišila a byla 620,27/cm³. Střední hodnota skupiny C byla 583,50/cm³. Minimum této skupiny zvířat činilo 160,00/cm³ a maximum 1380,00/cm³ (Graf 3).

Následující graf 4 znázorňuje průměrnou koncentraci spermií v 1 cm³ ejakulátu jednotlivých kanců, v daných obdobích označených jako skupina A, B a C. V grafu jsou patrné velké individuální rozdíly a směrodatné odchylky hodnot u jednotlivých kanců.

Počítaný parametr koncentrace spermií byl po použití Friedmanovy ANOVY statisticky nevýznamný. Nulovou hypotézu nelze zamítnout ($p > 0,05$; $p = 0,33659$). Můžeme tedy říct, že změny koncentrace spermií po podání Biomectinu byly způsobeny náhodnými jevy. Kendallův koeficient shody činil $W = 0,00605$ a můžeme tedy říct, že vzorky v souboru si nebyly podobné.

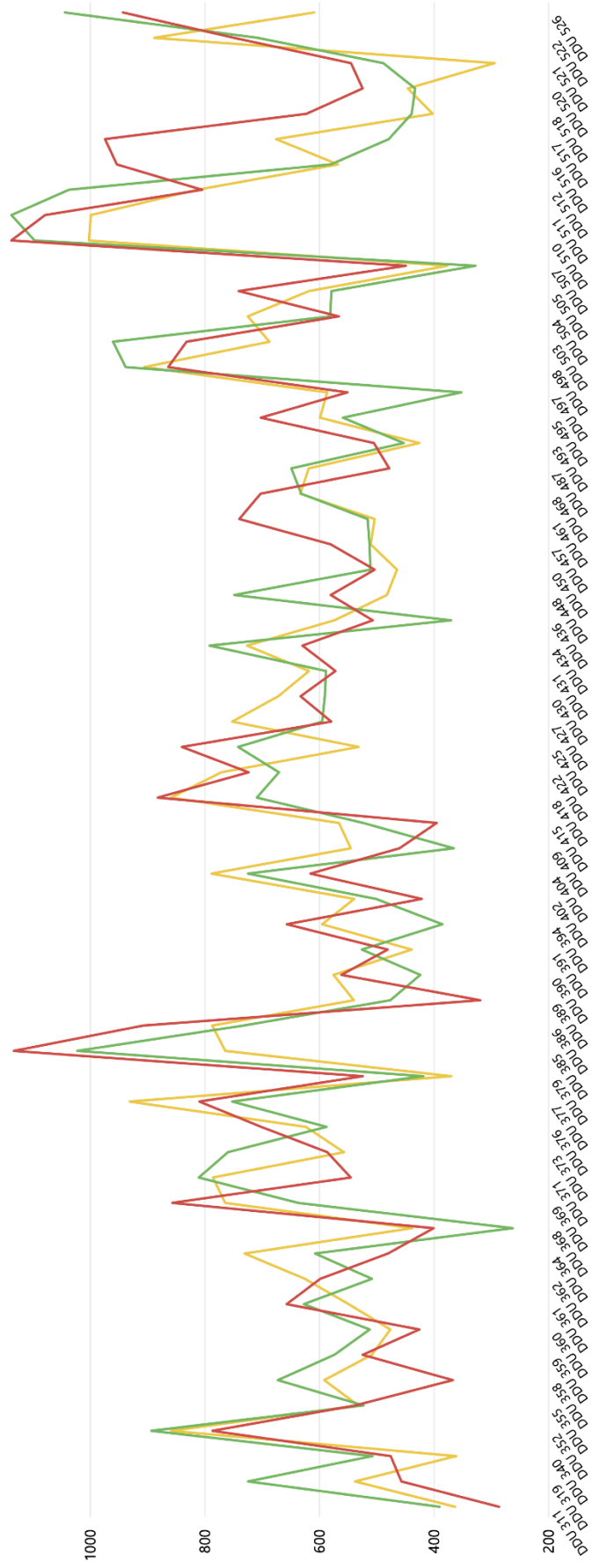
Koncentrace spermií [počet/cm³]



Graf 3: Krabicové grafy ukazující minima, maxima, průměry, mediány a kvartily pro parametr koncentrace spermií v ejakulátu u tří skupin kanců, které jsou rozděleny podle časového období, ve kterém byli odebíráni – skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

Koncentrace spermii [počet/cm³] – průměrné hodnoty kanců

Skupina ● A ● B ● C



Graf 4: Průměrné hodnoty koncentrace spermií v ejakulátu u jednotlivých odebíraných kanců, kteří byli odebíráni ve třech časových obdobích. Skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

5.3 Aktivita spermií

Parametr aktivita spermie byl v testacím a inseminačním středisku Skršín hodnocen pouze subjektivně okometricky, nebylo proto možné tento parametr kvalitně statisticky zhodnotit. Naměřená data odpovídala binárnímu znaku.

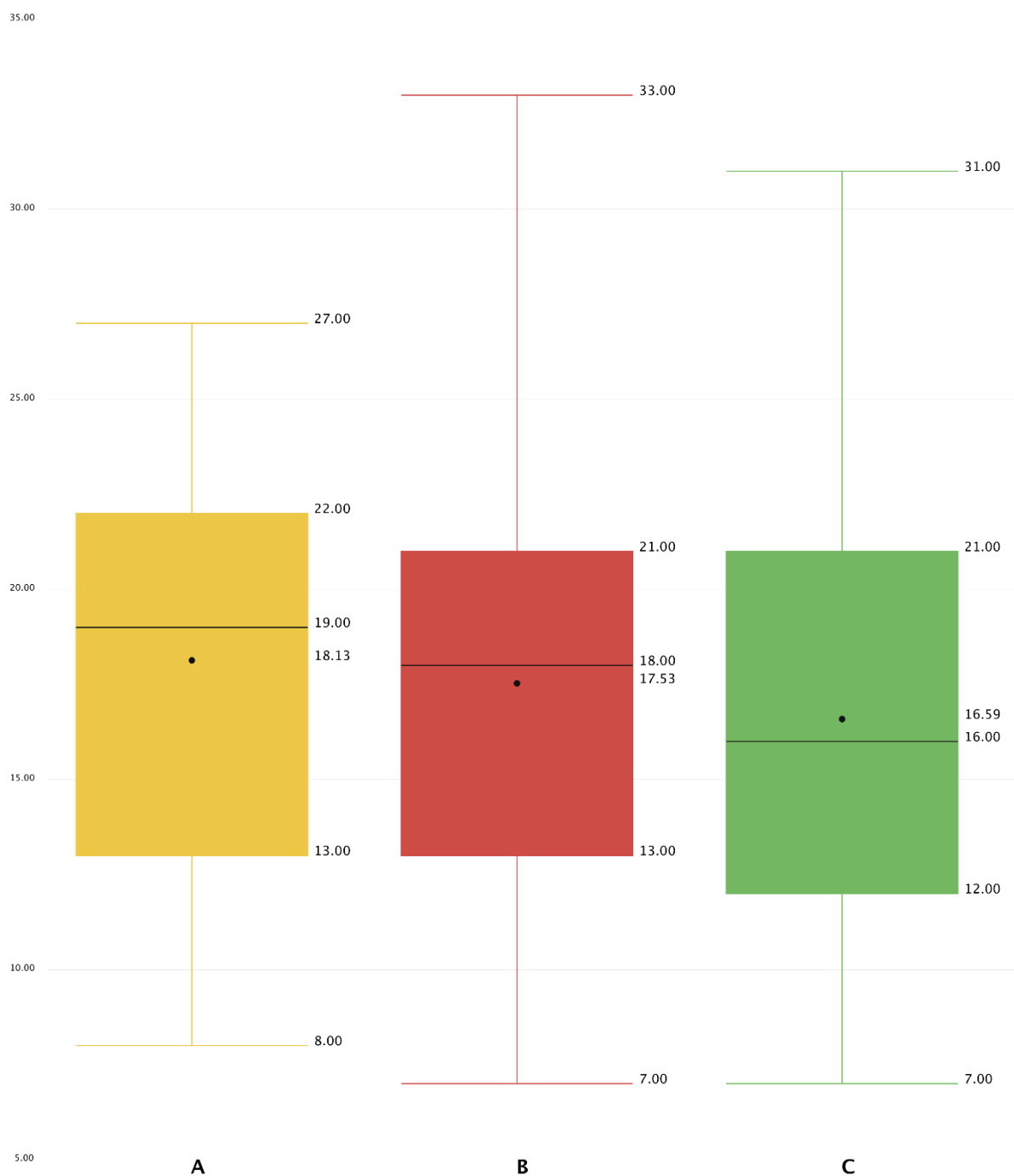
5.4 Procento abnormálních spermií

Průměrná hodnota procenta abnormálních spermií v ejakulátu byla ve skupině A 18,13 %. Střední hodnota byla 19,00 %. Nejnižší naměřená hodnota skupina A byla 8,00 % a maximum mělo hodnotu 22,00 %. Ve skupině B byla průměrná hodnota procenta abnormálních spermií nižší než ve skupině A, a to 17,53 %. Střední hodnota skupiny B byla 18,00 %. Nejnižší naměřené maximum této skupiny bylo 7,00 %, naopak nejvyšší bylo naměřeno 33,00 %. Ve skupině C průměrná hodnota procenta abnormálních spermií klesla na 16,59 % a medián nabyl hodnoty 16,00 %. Minimum souboru bylo stejné jako ve skupině B 7,00 % naopak maximum procenta abnormálních spermií v ejakulátu bylo ve skupině C poměrně vysoké 31,00 % (Graf 5).

Následující graf 6 znázorňuje průměrné hodnoty procenta abnormálních spermií u jednotlivých kanců. Většina kanců v období skupiny C vykazuje nižší procento abnormálních spermií, než ti samí kanci v období A.

Procento abnormálních spermií bylo statisticky významně nižší skupině C oproti skupinám A i B. Bylo možné zamítnout nulovou hypotézu ($p < 0,05$; $p = 0,00111$) a lze tedy říci, že rozdíly mezi skupinou před podáním a po podání nebyly způsobeny náhodným jevem. Kendallův koeficient shody u parametru abnormálních spermií byl $W = 0,3778$. Lze tedy říci, že data si byla málo podobná.

Procento abnormálních spermií [%]



Graf 5: Krabicové grafy ukazující minima, maxima, průměry, mediány a kvartily pro procento abnormálních spermií v ejakulátu u tří skupin kanců, které jsou rozděleny podle časového období, ve kterém byli odebíráni – skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

Graf 6: Průměry procentuálního zastoupení abnormálních spermií v ejakulátu u jednotlivých odebíraných kanců, kteří byli odebíráni ve třech časových obdobích. Skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

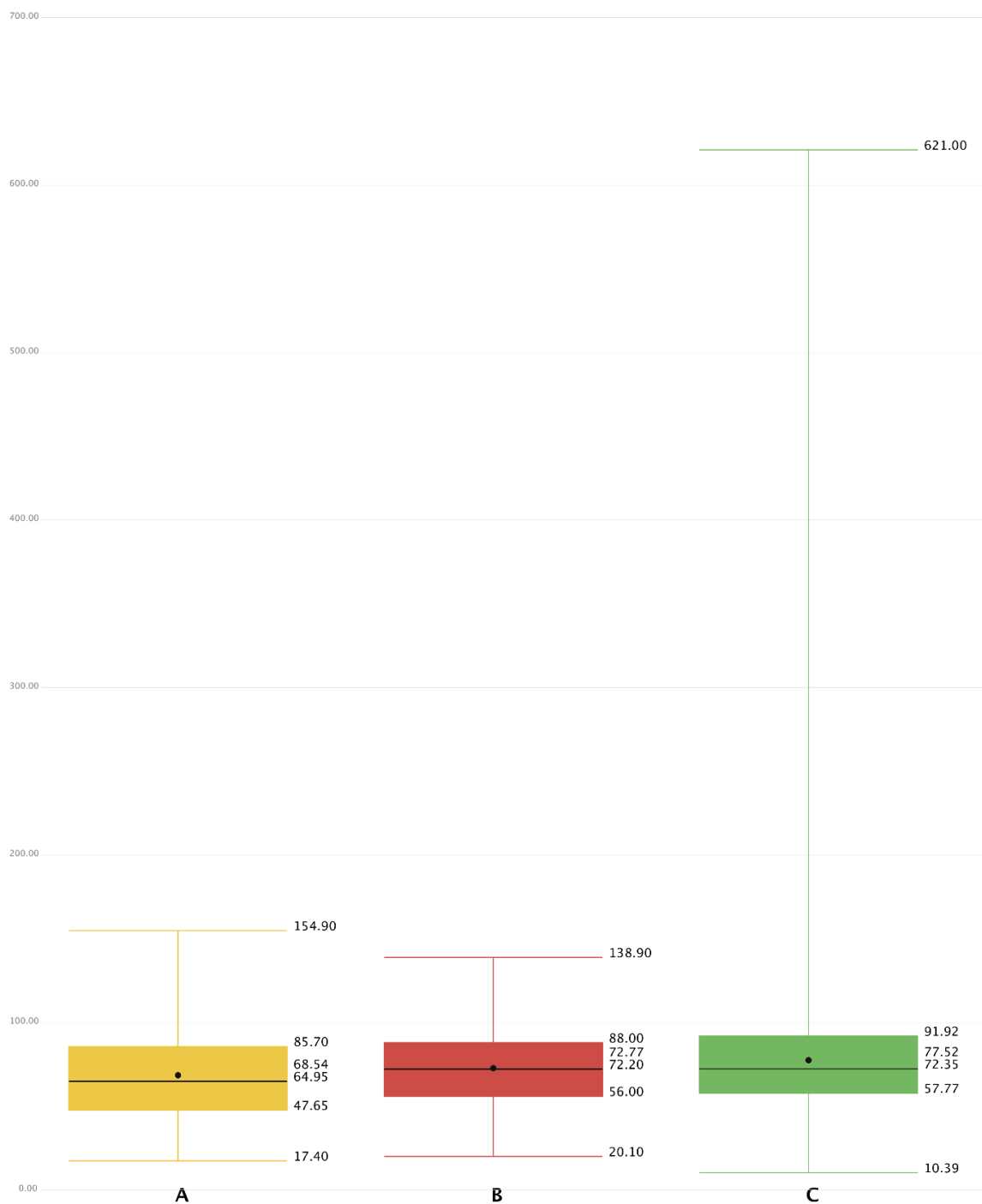
5.5 Celkový počet spermií v ejakulátu

Průměrná hodnota celkového počtu spermií u skupiny A byla 68,54 miliard spermií. Naměřené maximum bylo u jednoho kance 154,90 miliard spermií a nejnižší hodnota byla 17,40 miliard spermií. Medián činil 64,95 miliard spermií. U skupiny B byla průměrná hodnota skupiny vyšší, a to 72,27 %, střední hodnota nabyla téměř stejné hodnoty jako průměr, a to 72,20 %. Minimální počet spermií ve skupině B byl 20,10 miliard spermií a maximální počet byl 138,90 miliard spermií. U skupiny C se průměrná hodnota celkového počtu spermií ještě zvýšila na 77,52 miliard spermií v ejakulátu. Střední hodnota u této skupiny byla 72,35 miliard spermií. Maximální počet spermií ve skupině C byl velmi vysoký 621,00 miliard v ejakulátu a minimum bylo 10,39 miliard spermií v ejakulátu (Graf 7).

Následující graf 8 znázorňuje průměrné hodnoty celkového počtu spermií v ejakulátu u jednotlivých kanců. Hodnoty se velmi liší mezi jednotlivými kanci.

Celkový počet spermií v ejakulátu se mezi skupinami statisticky nelišil v době před podáním přípravku Biomectin a po jeho podání. Nulovou hypotézu nelze zamítnout ($p > 0,05$; $p = 0,06910$). Navýšení spermií v ejakulátu v době po podání Biomectinu bylo způsobeno náhodnými jevy. Kendallův koeficient shody $W = 0,01485$ poukazuje na to, že si data v souboru byla velmi málo podobná.

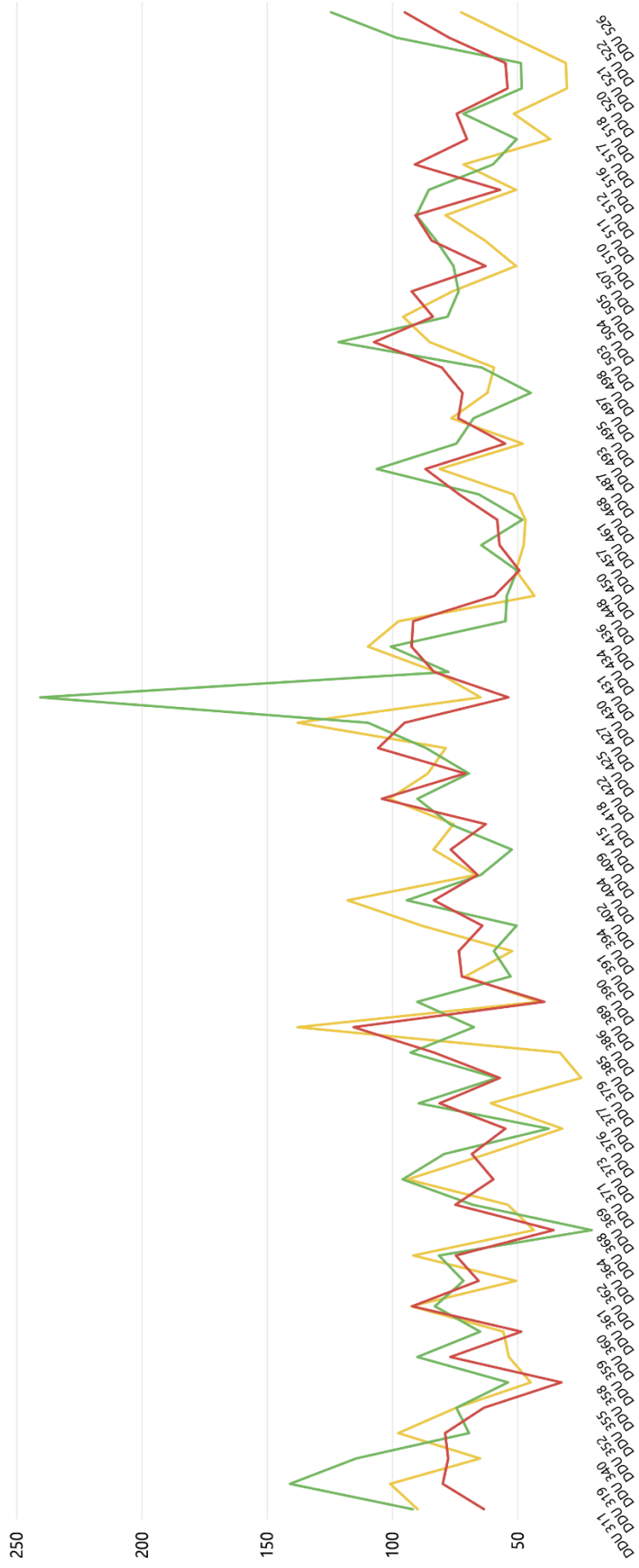
Celkový počet spermií v ejakulátu [v miliardách]



Graf 7: Krabicové grafy ukazující minima, maxima, průměry, mediány a kvartily pro celkový počet spermií v ejakulátu u tří skupin kanců, které jsou rozděleny podle časového období, ve kterém byli odebíráni – skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

Celkový počet spermii v ejakulátu [v miliardách] – průměrné hodnoty kanců

Skupina ● A ● B ● C



Graf 8: Jednotlivé hodnoty celkového počtu spermií v ejakulátu u odebíraných kanců, které byly odebírány ve třech časových obdobích. Skupina A odebíraná 2 měsíce před aplikací Biomectinu (v prosinci), skupina B odebíraná těsně po aplikaci Biomectinu (v únoru, popřípadě v březnu), a skupina C odebíraná 2 měsíce po aplikaci Biomectinu (v dubnu).

5.6 Shrnutí výše hodnocených parametrů

Z tabulky 1 lze vyčíst průměry všech měřených parametrů a jejich směrodatné odchylky.

Tabulka 1: Rozdíly průměrných hodnot sledovaných parametrů v ejakulátu

PARAMETRY	A	B	C
Objem ejakulátu [ml]	175.4722 ± 66.2244 **	183.0556 ± 55.6287	191.9389 ± 57.9088 **
Koncentrace spermií [počet/cm ³]	617.1389 ± 210.7838	640.2000 ± 236.9149	620.2667 ± 226.2904
Procento abnormálních spermií [%]	18.1333 ± 4.9842 **	17.5278 ± 5.2591	16.5889 ± 5.4801 **
Celkový počet spermií v ejakulátu [v miliardách]	68.5422 ± 28.4943	72.7728 ± 22.3882	77.5183 ± 48.4271

** Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi skupinami v hodnoceném parametru spermií z nativního ejakulátu. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku.

6 Diskuze

Tato diplomová práce byla zaměřena na ověření hypotézy, že antiparazitární přípravek Biomectin, který je kancům aplikován a obsahuje účinnou látku ivermektin, dlouhodobě výrazně negativně ovlivňuje parametry kančího ejakulátu.

Vědeckými studii již byl potvrzen negativní efekt podání ivermektinu na kvalitativní parametry ejakulátu, vždy se však jednalo o účinky krátkodobé (Naoman 2012; Sadek & Shaheen 2015). Na sledování dlouhodobých možných negativních účinků ivermektinu se studie doposud buď nezaměřovaly, nebo negativní účinky nepozorovaly (Brokken 1983; Naoman 2012; Ali 2014).

Sledovanými parametry v této práci byli objem ejakulátu, koncentrace spermií v 1 cm³ ejakulátu, aktivita spermií v ejakulátu, procento abnormálních spermií v ejakulátu a celkový počet spermií v ejakulátu.

Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly sledovány u hodnocení parametru objemu ejakulátu a procenta abnormálních spermií.

U parametru objemu ejakulátu docházelo k jeho postupnému zvyšování v čase mezi jednotlivými skupinami. Skupina kanců A, odebíraná v prosinci, měla průměrný objem ejakulátu 175,47 ml, u skupiny kanců B, odebíraných v únoru těsně po aplikaci Biomectinu, se průměrný objem ejakulátu navýšil na 183,06 ml a skupina kanců C, odebíraná v dubnu, měla průměrný objem ejakulátu ještě vyšší, a to 191,94 ml. Zvýšení objemu ejakulátu je pro účely výroby inseminačních dávek při zachování fertilizační schopnosti jistě žádoucí. Podobné výsledky byly již studii popsány. Schroder et al. (1986) u beranů uvádí, že berani po aplikaci ivermektinu měli větší objem ejakulátu, než berani bez aplikace tohoto přípravku. Janett et al. (2001) uvádí ve své studii u koní také pozitivní efekt ivermektinu na některé reprodukční parametry včetně objemu ejakulátu. Zvýšení objemu ejakulátu bylo zaznamenáno i ve studii na býčích (Tabl Ghada et al. 2013). Přesný mechanismus, kterým by mohl být ivermektin zapojen do zvýšení objemu ejakulátu není dostatečně popsán. Ivermektin je popisován jako allosterický modulátor chloridových iontových kanálů a agonista GABA receptorů v synaptických zakončeních neuronů (El-Nahas & El-Ashmawy 2008; Martin et al. 2021). Jak však stimulace uvolňování gamma aminomáselné kyseliny (GABA) může přesně ovlivnit zvýšení objemu ejakulátu, nebylo zatím dostatečně popsáno.

Je ovšem potřeba zohlednit možný vliv i jiných faktorů než ivermektinu, které se na získaných výsledcích mohou podílet. U kanců se jistě nabízí vliv sezónnosti. Ta zde však pravděpodobně roli hrát nebude, neboť několik studií prokazuje dosažení lepších reprodukčních parametrů, včetně objemu ejakulátu, na podzim a v zimě (Wysokińska et al. 2009; Lipenský et al. 2010; Zasiadczyk et al. 2015). Frydrychová et al. (2014) uvádí, že vyšší naměřené objemy ejakulátu byly sledovány v období mezi říjnem a prosincem oproti období od ledna do dubna a období letních měsíců. V letních měsících kanci často reagují na vysoké teploty teplotním stresem, který ovlivňuje kromě fyziologických parametrů i parametry reprodukční. Negativní vliv vysokých letních teplot, který vedl k nízké motilitě spermií a nízkému celkovému počtu spermií v ejakulátu, byl sledován ve studiích (Wysokińska et al. 2009; Savic et al. 2013). Ovšem kanci v inseminačním středisku Skršín mají nastavené konstantní stájové mikroklima v průběhu celého roku a nejsou vystavováni teplotnímu stresu, navíc data zpracovávaná v této práci byla

z období prosince až dubna. Tento faktor tak, s velkou pravděpodobností, v této studii nehraje důležitou roli.

Dalším možným faktorem, který je potřeba zohlednit, je stáří kanců. Zvyšující se objem ejakulátu s přibývajícím věkem kance byl pozorován v mnoha studiích (Louda 2001; Pinart & Puigmulé 2013). I Sonderman & Luebbe (2008) potvrzuje, že starší kanci ejakulují větší objem spermatu. Kanci, hodnocení v této studii, byli věkově vyvážení. Jejich věk se pohyboval od jednoho do dvou let. Je možné, že především u mladších kanců (okolo jednoho roku věku) má opravdu jejich stáří vliv na zvyšující se objem jejich ejakulátu. Může to souviset se stále ještě probíhajícím vývinem přídatných pohlavních žláz u těchto kanců, podobně jako to popisuje Šmerha (1980). Dalším hodnoceným parametrem, kde byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami, bylo procento výskytu abnormálních spermií. To u jednotlivých skupin postupně klesalo z průměrné hodnoty 18,13 % u skupiny A, na 17,53 % u skupiny B, až na hodnotu 16,59 % u skupiny C. Z hlediska využitelnosti je u ejakulátů jistě žádoucí co nejnižší procento výskytu abnormálních spermií. Jakým mechanismem se na tomto výsledku podílí přímo účinek ivermektinu, zůstává ovšem nejasné. Je možné, že zde se na výsledcích podílí i roční období. K podobným závěrům došli i jiní autoři ve svých studiích. Petrocelli et al. (2015) uvádí, že se abnormální spermie vyskytovaly více na podzim než v zimě a na jaře a Frydrychová et al. (2014) uvádí, že abnormální spermie se vyskytovaly více v létě než na jaře. Mohlo by se tedy jednat o nižší výskyt abnormálních spermií s příchodem jarního období. Vysoké teploty v letním období pak negativně ovlivňují i výskyt abnormálních spermií v ejakulátu v důsledku vystavení kanců teplotnímu stresu (Frydrychová et al. 2007).

Statistické hodnocení parametru aktivity spermií nebylo nakonec prováděno, protože aktivita spermií byla měřena pouze okometricky, parametr vykazoval vlastnosti binárního znaku a nebylo proto možné jej kvalitně statisticky vyhodnotit.

U koncentrace spermií v 1 cm³ v ejakulátu a celkového počtu spermií jsme nepozorovali statisticky významné rozdíly, nemůžeme tedy zamítnout nulovou hypotézu a změny v těchto parametrech byly pravděpodobně způsobeny náhodnými jevy. Můžeme tedy konstatovat, že na tyto parametry aplikace Biomektinu neměla žádný dlouhodobý efekt.

K podobným závěrům dospěli i jiní autoři ve svých studiích. U samce králíka neměla aplikace ivermektinu žádný vliv na koncentraci spermií v ejakulátu (Moreira et al. 2019). I Schroder et al. (1986) ve své studii uvádí, že ivermektin nemá žádný vliv na hodnocené parametry ejakulátu, a to včetně koncentrace spermií. Koncentrace spermií dle autorů nebyla ovlivňována ani sezónností (Frydrychová et al. 2014). K jiným závěrům ve své studii dospěl Tanyildizi & Bozkurt (2002) který naopak uvádí, že aplikace ivermektinu negativně ovlivňovala koncentraci spermií v ejakulátu, a po podání ivermektinu došlo k jejímu signifikantnímu snížení.

Celkový počet spermií v ejakulátu se v našich skupinách také statisticky významně neměnil. Což jen potvrzuje některé studie, které uvádějí, že podání ivermektinu nemá žádný dlouhodobý vliv na hodnocené parametry ejakulátu (Brokken 1983; Moreira et al. 2019).

Z hodnocení vybraného souboru dat je nutné zdůraznit výrazný vliv jedince, který byl během statistického hodnocení dat pozorován. Mezi jednotlivými kanci vycházely velké směrodatné odchylky v hodnocených parametrech, a to i přesto, že se při výběru dat pro hodnocení kladl důraz na homogenitu kanců. Na otázku, jaké všechny faktory mohou ovlivňovat individuální rozdíly, je těžké odpovědět. Jistě jich je mnoho. Mimo výše zmíněné,

to mohou být i konkrétní zdravotní stav kance v době odběrů, jeho kondice i výživa, podobně to popisují i jiní autoři ve svých studiích (Maurya et al. 2010; Beran 2014).

Z dosažených výsledků této diplomové práce je patrné, že se nepodařilo potvrdit stanovenou hypotézu. Tyto výsledky jsou velmi cenné pro pracovníky testačního a inseminačního střediska ve Skršíně. Bylo by ještě zajímavé, zhodnotit krátkodobý efekt aplikace Biomectinu u kanců a výsledky porovnat. To by však mohlo být námětem pro jinou diplomovou práci.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu pracovníků testačního a inseminačního střediska Skršín, kteří se subjektivně domnívali, že přípravek Biomectin na bázi ivermektin, který je kancům aplikován jako anthelmintikum, dlouhodobě negativně ovlivňuje parametry kančího ejakulátu.

Hodnocenými parametry zde byl objem ejakulátu, koncentrace spermií v 1 cm^3 , aktivita spermií, procento abnormálních spermií, celkový počet spermií v ejakulátu. Tyto parametry byly podrobeny statistické analýze s cílem zhodnotit, zda existuje statisticky významný rozdíl v jednotlivých parametrech mezi skupinami odběrů kanců prováděných přibližně dva měsíce před aplikací přípravku Biomectin (prosinec), u odběrů ejakulátu odebíraných v období těsně po aplikaci Biomectinu (únor) a u odběrů ejakulátů odebíraných přibližně dva měsíce po aplikaci Biomectinu (duben). Statistickou analýzou získaného souboru dat byly prokázány signifikantní rozdíly u objemu ejakulátu a u stanovení procenta abnormálních spermií. Objem ejakulátu u skupin v čase rostl a procento abnormálních spermií se snížilo, což nepředstavuje z pohledu využití ejakulátu žádný negativní výsledek. U koncentrace spermií v 1 cm^3 a celkového počtu spermií nedošlo k žádným statisticky významným rozdílům mezi porovnávanými skupinami. Parametr aktivita spermií byl hodnocen pouze okometricky a vykazoval známky binárního znaku, proto tento parametr nebylo možné kvalitně statisticky vyhodnotit. Stanovená hypotéza této diplomové práce se tedy nepotvrdila. S ohledem na statistické hodnocení vybraného souboru dat je nutné zdůraznit významný efekt jedince, který zde byl patrný, ikdyž byl dopředu kladen důraz na výběr kanců s pokud možno homogenními parametry ejakulátu. Je také nutné zohlednit ostatní možné vlivy, které jsou pravděpodobně zodpovědné za získané výsledky více než testovaný vliv přípravku Biomectin. Především možná sezónnost zde nejspíš hraje důležitou roli, neboť časové rozložení vybraných odběrů odpovídá nástupu jarní přípařovací sezóny.

Ikdyž se nepodařilo potvrdit stanovenou hypotézu, výsledky této diplomové práce jsou pro testační a inseminační středisko ve Skršíně velmi hodnotné.

8 Bibliografie

Ali A. 2014. Effect of Ivermectin on semen parameters and levels of Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate aminotransferase (AST) enzymes in seminal plasma of Iraqi Awassi rams. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences* **13**:115-119.

Ari U, Daskin A. 2010. Freezing of Washed Angora Goat Semen with Extenders Added Bull or Ram Seminal Plasma. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **16**:233-237.

Aust J, Bazala E. 2006. Vliv fertility spermií na sezónní poklesy v rozmnožování prasat. *Veterinářství*:376-379.

Awda B, Mackenzie-Bell M, Buhr M. 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function1. *Biology of Reproduction* **vol. 81**:553-561.

Benson J, Woods E, Walters E, Critser J. 2012. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* **vol. 78**:1682-1699.

Beran J. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu: uplatněná certifikovaná metodika. Vyd. 1. Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra speciální zootechniky, V Praze.

Berger T, Turner K, Meizel S, Hedrick J. 1989. Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction in Boar Sperm1. *Biology of Reproduction* **vol. 40**:525-530.

Brokken E. 1983. Ivermectin: A new broad-spectrum antiparasitic agent for swine XXII World veterinary congress.

Buš A. 2005. Otrava psů ivermektinem. *Veterinářství* **55**:326-327.

Campbell W, Fisher M, Stapley E, Albers-Schonberg G, Jacob T. 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* **vol. 221**:823-828.

Cibulka J. 2004. Základy fyziologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita, V Praze.

Čeřovský J, Frydrychová S, Lustyková A, Rozkot M. 2005. Changes in boar semen with a high and low level of morphologically abnormal spermatozoa. *Czech Journal of Animal Science* **50**.

Eilts B. 2005. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology* **64**: 692-697. Elsevier.

- El-Nahas A, El-Ashmawy I. 2008. Effect of ivermectin on male fertility and its interaction with P-glycoprotein inhibitor (verapamil) in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **vol. 26**:206-211.
- Frydrychová S, Lustykova A, Cerovsky J, Lipensky J, Rozkot M. 2007. Seasonal changes of boars semen production. *Reproduction in Domestic Animals* **42**:91-91.
- Frydrychová S, Lustyková A, Vaclavkova E, Lipenský J, Rozkot M. 2014. Seasonal changes in fresh semen quality and freezability in boar semen. *Indian Journal of Animal Sciences* **84**:643-646.
- Gadella B, Tsai P, Boerke A, Brewis I. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *The International Journal of Developmental Biology* **vol. 52**:473-480.
- Gilmore J, Liu J, Peter A, Critser J. 1998. Determination of Plasma Membrane Characteristics of Boar Spermatozoa and their Relevance to Cryopreservation1. *Biology of Reproduction* **vol. 58**:28-36.
- González Canga A, Sahagún Prieto A, José Díez Liébana M, Martínez N, Vega M, Vieitez J. 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal* **vol. 179**:25-37.
- González-Canga A, Fernández-Martínez N, Sahagún-Prieto A, García-Vieitez J, Díez Liébana M, Tamame-Martín P, Sierra-Vega M. 2010. Seguridad de la ivermectina: toxicidad y reacciones adversas en diversas especies de mamíferos: toxicidad y reacciones adversas en diversas especies de mamíferos. *Revista MVZ Córdoba* **15**:2127-2135. scieloco.
- Hancock J. 1956. The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society* **76**:84-97. Wiley Online Library.
- Hassan F, Holtz W. 2021. Passage of spermatozoa through the epididymis of the boar (*Sus scrofa domestica*). *Theriogenology* **vol. 161**:126-130.
- Höfner L, Luther A, Waberski D. 2020. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **vol. 220**.
- Chiu S, Sestokas E, Taub R, Green M, Baylis F, Jacob T, Lu A. 1990. Metabolic disposition of ivermectin in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **vol. 38**:2079-2085.
- Chłopik A, Wysokińska A. 2019. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals* **vol. 55**: 113-126.

Janett F, Thun R, Ryhiner A, Burger D, Hassig M, Hertzberg H. 2001. Influence of Eqvalan® (ivermectin) on quality and freezability of stallion semen. *Theriogenology* **vol. 55**:785-792.

Kondracki S, Iwanina M, Wysokińska A, Huszno M. 2012. Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. *Acta Veterinaria Brno* **81**:195-199. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences.

Lespine A, Ménez C, Bourguinat C, Prichard R. 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **vol. 2**:58-75.

Lifschitz, Pis, Alvarez, Virkel, Sanchez, Sallovitz, Kujanek, Lanusse. 2002. Bioequivalence of ivermectin formulations in pigs and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **vol. 22**:27-34.

Lipenský J, Lustykova A, Čerovský J. 2010. Effect of season on boar sperm morphology. *Journal of Central European Agriculture*.

Louda F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Vyd. 1. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Martin R, Robertson A, Choudhary S. 2021. Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. *Trends in Parasitology* **vol. 37**:48-64.

Maurya V, Sejian V, Kumar D, Naqvi S. 2010. Effect of induced body condition score differences on sexual behavior, scrotal measurements, semen attributes and endocrine responses in Malpura rams under hot semi-arid environment. *Journal of animal physiology and animal nutrition* **94**:e308-e317. Wiley Online Library.

Ministerstvo zemědělství. 2000. Zákon č. 154/2000 ze dne 17. května 2000, o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon). Pages 2274-2289 in *Sbírka zákonů České republiky, 2000, částka 49. Česká republika*

Moreira N, Torres M, Navas-Suárez P, Gonçalves V, Raspantini P, Raspantini L, Gotardo A, Andrade A, Spinosa H. 2019. Ivermectin does not interfere with seminal and hormonal parameters in male rabbits. *Theriogenology* **vol. 124**:32-38.

Moreira N, Vicente F, Sandini T, Martinelli E, Navas-Suárez P, Reis-Silva T, Spinosa H. 2020. Effects of ivermectin treatment during prepubertal and pubertal period on sexual parameters and sexual behavior in adulthood in rats. *Research in Veterinary Science* **vol. 129**:21-27.

- Morrell J, Wallgren M. 2011. Colloid Centrifugation of Boar Semen. *Reproduction in Domestic Animals* **vol. 46**:18-22.
- Moura C, Guerra M, Silva Júnior V, Silva C, Caju F, Alves L. 2006. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **vol. 58**:799-808.
- Najbrt R. 1973. *Veterinární anatomie: Veterinární anatomie*. Státní zemědělské nakladatelství.
- Naoman U. 2012. Effect of Ivermectin on semen characteristics of Iraqi Awassi ram.
- Novák P, Malá G. 2012. *Obecné zásady biosecurity v chovech hospodářských zvířat: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha*.
- O'Flaherty C, Matsushita-Fournier D. 2017. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biology of reproduction* **97**:577-585. Oxford University Press.
- Otubanjo O, Mosuro A, F. Ladipo T. 2006. An in vivo Evaluation of Induction of Abnormal Sperm Morphology by Ivermectin MSD (Mectizan®). *Pakistan Journal of Biological Sciences* **vol. 10**:90-95.
- Petrocelli H, Batista C, Gosálvez J. 2015. Seasonal variation in sperm characteristics of boars in southern Uruguay. *Revista Brasileira de Zootecnia* **vol. 44**:1-7.
- Pinart E, Puigmulé M. 2013. Factors Affecting Boar Reproduction, Testis Function, and Sperm Quality. Pages 109-202 in *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*.
- Pruneda A et al. 2005. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology* **vol. 63**:2219-2232.
- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez J, Martínez E. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of animal science* **84**:2692-2699. Oxford University Press.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez J, Martínez E, Roca J, Sanz L, Calvete J. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* **63**: 514-535. Elsevier.
- Romar R, Cánovas S, Matás C, Gadea J, Coy P. 2019. Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go?. *Theriogenology* **vol. 137**:113-121.
- Sadek K, Shaheen H. 2015. The biochemical effects of ivermectin on reproductive hormones and mineral homeostasis in Baladi cows post parturition. *Vet arh* **85**:95-103.

Savic R, Petrovic M, Radojkovic D, Radovic C, Parunovic N. 2013. The effect of breed, boar and season on some properties of sperm. *Biotechnology in Animal Husbandry* **vol. 29**:299-310.

Sharma R, Agarwal A. 2011. Spermatogenesis: An Overview. Pages 19-44 in A. Zini and A. Agarwal, editors. *Sperm Chromatin*. Springer New York, New York, NY.

Schinkel A, Wagenaar E, van Deemter L, Mol C, Borst P. 1995. Absence of the mdrla P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *Journal of Clinical Investigation* **vol. 96**:1698-1705.

Schroder J, Swan G, Barrick R, Pulljam I. 1986. Effect of ivermectin on reproductive potential of breeding. *Journal of the South African Veterinary Association*:211-213.

Smital I. 2000. Současné a perspektivní metody hodnocení plodnosti kanců. *Náš chov* **60**: 32-33. Praha.

Smital I. 2001. Ředění a konzervace kančího spermatu pro účely inseminace. *Náš chov*.

Sonderman J, Luebbe J. 2008. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology* **vol. 70**:1380-1383.

Státní veterinární správa ČR. 1998. Systém protinákazové ochrany chovů prasat. Agris. Available from <http://www.agris.cz/clanek/79630/system-protinakazove-ochrany-chovu-prasat> (accessed 2021-04-25).

Sutkeviciene N, Riskeviciene V, Januskauskas A, Zilinskas H, Andersson M. 2009. Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* **vol. 51**.

Šmerha J. 1980. Reprodukce hospodářských zvířat I. 1. vyd. SPN, Praha.

Tabl Ghada A, El-Desouki, Nabila I, Zeidan, Alaa E, Tag El-Deen, Mohamed A, Kamel, Rabab A. 2013. Effect of anthelmintics drugs on biochemical characteristics of bull Fresian frozen semen. *Delta Journal of Science* **36**:212-223. Department of Zoology, Faculty of Science, Tanta University, Egypt.

Tanyildizi S, Bozkurt T. 2002. An investigation of the effects of ivermectin on blood serum, semen hyaluronidase activities and spermatological characteristics in sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **26**:353-357. The Scientific and Technological Research Council of Turkey.

Terneux E, Pontes D, Fernandez C, Arena A, Porto E, De Grava Kempinas W. 2011. Perinatal exposure to parasiticide ivermectin: long-term effects on reproductive parameters of adult male

rats: long-term effects on reproductive parameters of adult male rats. *Toxicological & Environmental Chemistry* **93**:345-351. Taylor & Francis.

Tichý F. 2004. *Histologie: mikroskopická anatomie*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.

Torres M et al. 2016. Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing^{1,2}. *Journal of Animal Science* **vol. 94**: 1906-1912.

Tulsiani D, Abou-Haila A. 2012. Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica* **vol. 2012**:1-12.

Věžník Z, Přinosilová P, Zajícová A, Kunetková M, Hlavicová J. 2010. Evaluation of sperm membrane resistance in boars by modification of HOS test. *Veterinářství* **60**:695-697. Profi Press, sro.

Weigel Muñoz M, Carvajal G, Curci L, Gonzalez S, Cuasnicu P. 2019. Relevance of CRISP proteins for epididymal physiology, fertilization, and fertility. *Andrology* **vol. 7**:610-617.

Wrona Z, Krzyzanowski J. 1995. The influence of Ivomec on some indices of boar semen: results of sow insemination: results of sow insemination. *Medycyna Weterynaryjna* **51**: 400-400. Polish society of veterinary science.

Wysokińska A, Kondracki S, Kowalewski D, Adamiak A, Muczyńska E. 2009. Effect of seasonal factors on the ejaculate properties of crossbred duroc x pietrain and pietrain x duroc boars as well as purebred duroc and pietrain boars. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **53**:677-685.

Zasiadczyk L, Fraser L, Kordan W, Wasilewska K. 2015. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. *Theriogenology* **vol. 83**:1287-1303.