

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Zabřezávání dojnic inseminovaných dávkami
obohacenými o LDL cholesterol**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anna Sedláková

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Zabřezávání dojnic inseminovaných dávkami obohacenými o LDL cholesterol" 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 13.4. 2018 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Luďkovi Stádníkovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Martině Doležalové, PhD. za konzultace a vedení praktické části práce.

Zabřezávání dojnic inseminovaných dávkami obohacenými o LDL cholesterol

Souhrn

Míra zabřezávání po inseminaci je jedním ze zásadních ukazatelů reprodukce skotu. Cílem této práce je vyhodnotit procento zabřezávání dojnic po inseminaci dávkami obohacenými o LDL cholesterol ve vybraných chovech dojeného skotu v České republice. Součástí obsahu práce je rešerše, která popisuje roli inseminace na mléčných farmách, aspekty ovlivňující zabřezávání a vliv LDL cholesterolu na ejakulát. V experimentální části práce je vyhodnocena užitkovost, reprodukční ukazatele a jejich souvislost se zabřezáváním. Míra zabřezávání je vyhodnocena pro tři vybrané podniky i celkově v kontrolní a pokusné skupině plemenic.

Inseminace v chovech skotu je globálně rozšířená technika umělé reprodukce a je nedílnou součástí snahy o dosažení kvality produkce, zisku výborného genetického materiálu a vysokého počtu oplozených zvířat. S celkovou kvalitou a profitabilitou chovů dojeného skotu souvisí i výsledky reprodukčních ukazatelů a celkové hodnocení reprodukce. Mezi hlavní reprodukční ukazatele v českých chovech patří především servis perioda, inseminační interval, mezidobí a březost po první inseminaci. V případě zahraničních chovů se hodnotí spíše CR = conception rate, HDR = heat detection rate a PR = pregnancy rate. V rámci hledisek ovlivňujících zabřezávání a plodnost krav jsou zahrnuty zásadní aspekty jako vliv plemene, užitkovosti, vnějšího prostředí, zdravotního stavu a výživy dojnic. Metabolicky vyvážený a zdravý organismus dojnic je základem pro dosažení březosti plemenic. Neopomenutelnou součástí výše zmíněných aspektů je i správná chovatelská péče. Zároveň je věnována pozornost procesu vyhledávání říjí, jakožto jednomu z nejdůležitějších požadavků na prosperitu chovů. Detekci říje by mělo být věnováno alespoň 30 minut třikrát denně a nejlépe ji určit v kombinaci s výsledky ostatních pomůcek, jako jsou pedometry, či aktivometry. Správně načasovaná a pečlivě provedená inseminace má vliv nejen na reprodukci, ale i celkovou ekonomickou rentabilitu chovu.

Přídavek LDL cholesterolu k ředidlům inseminačních dávek je znám svým kryoprotektivním a kryokonzervačním účinkem. V procesu výroby inseminačních dávek je přidáván v době ředění ejakulátu před následnou ekvilibrací. V případě tohoto výzkumu byl LDL cholesterol přidáván k ředidlům v koncentraci 6 % a následně vyrobenými dávkami byly

inseminovány plemenice z českých chovů. Převažovaly Holštýnské plemenice, ČESTR a jejich kříženky. Byly vybrány tři podniky s největším zastoupením dojnic v pokusu a následně byly porovnávány s celkovou skupinou dojnic. Byla hodnocena mléčná užitkovost v kg za laktaci, reprodukční ukazatele – konkrétně SP a interval a ve výsledku byly tyto hlediska srovnávány s mírou březosti po inseminaci dávkami s a bez přídatku LDL cholesterolu. Průměrná hodnota míry zabřezávání v kontrolní skupině dojnic se pohybovala mezi 33,319 % a 38,462 %, v případě celé skupiny dojnic byla tato míra po přídatku LDL cholesterolu 43,699 %. Celkově tedy míra zabřezávání stoupla oproti kontrolní skupině o 6,691 %. Byl tedy prokázán pozitivní vliv LDL cholesterolu nejen na motilitu a přežitelnost spermií, ale i na zabřezávání dojnic.

Klíčová slova: dojnice, plodnost, inseminační dávka, zabřezávání, LDL cholesterol

Conception rate of dairy cows inseminated by doses enriched with LDL cholesterol

Summary

Conception rate of inseminated cows is one of the essentials when evaluating reproductive performance of cattle. The aim of this study is to summarize conception rate of dairy cattle inseminated with doses enriched by LDL cholesterol in selected Czech farms. Content of this Master's thesis is a bibliographic review describing the role of insemination in dairy farms, aspects influencing the conception rate and the effect of LDL cholesterol on ejaculate. In the experimental part a milky yield, reproduction evaluation indexes are described and their coherence with conception. The conception rate was assessed in three selected companies as well as in general in control and experimental groups of cattle females.

Insemination in cattle breeding is globally spread technique of artificial reproduction and is an inseparable part of the achievement of production quality, gain of unique genetic material and high number of fertilized animals. The results of reproduction evaluation and complete reproduction performance is related to overall quality and profitability of dairy farms. The main evaluating methods and indexes in reproduction of Czech dairy farms are service period, insemination interval, parturition interval and conception rate after first insemination. In case of herds in foreign countries the evaluation is mostly about CR = conception rate, HDR = heat detection rate and PR = pregnancy rate. Within the standpoints influencing conception and fertility of cows, the principal aspects such as the effect of breed, yield, health condition and nutrition, are involved. Metabolically balanced and healthy organism of females is fundamental in maintaining cattle pregnancy. The indispensable part of above mentioned aspects is surely the correct breeding care. At the same time the attention should be given to process of heat detection as one of the most important requirements in proper prosperity of dairy farms. The heat detection should be done at least 30minutes three-times a day and the best way is the combination with pedometers and activometers. Correctly timed and carefully made insemination affects not only the reproduction, but the overall economical rentability of the farm as well.

The addition of LDL cholesterol to dilutants for insemination doses is known for its cryoprotective and cryopreserving effect. In the process of insemination doses production, it is

mixed with a dilutant right before the equilibration. In case of this study the LDL cholesterol was added to dilutants in concentration of 6 % and followingly produced doses were used for insemination of females in Czech cattle herds. The Holstein cattle, Czech Red cattle and its crossbreds were mainly represented. Three farms with the highest number of provided cows for this study were selected and compared to a whole group of cows included. The milk yield in kg per lactation, the reproduction performance factors were evaluated – specifically the service period and insemination interval and in the end, all these factors were compared to conception rate after insemination with doses non-enriched and enriched with LDL cholesterol. The average value of conception rate in control group of females ranged between 33.319 % and 38, 462 %, in case of whole group of females this rate was 43, 699 % after the addition of LDL cholesterol. Overall the conception rate in comparison with control group increased by 6,691 %. Positive effect of LDL cholesterol was proved, not only in motility and fertility of spermatozoa but in conception rate as well.

Keywords: dairy cows, fertility, insemination dose, conception rate, LDL cholesterol

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍL PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3.1	Role inseminace v chovech dojeného skotu	3
3.2	Hodnocení reprodukce	4
3.3	Aspekty ovlivňující zabřezávání a plodnost plemenic	5
3.3.1	Plemeno, užitkovost	6
3.3.2	Stáří, parita	6
3.3.3	Roční období a klima	6
3.3.4	Výživa, tělesná kondice a metabolický stav	8
3.3.5	Chovatelská péče o reprodukci	11
3.3.6	Detekce říje	11
3.3.7	Načasování a technika inseminace	13
3.3.8	Kvalita ejakulátu	17
3.3.9	Mražení spermatu	18
3.4	Vliv LDL cholesterolu na fertilitu	21
4	MATERIÁL A METODIKA	23
4.1	Charakteristika zúčastněných zemědělských podniků a jejich skotu	23
4.2	Příprava inseminačních dávek	24
4.3	Inseminace dojnic	25
4.4	Statistické vyhodnocení	26
5	VÝSLEDKY	27
5.1	Popisné statistiky a přehledy pokusu a kontrolního měření	27

5.2	Korelace mléčné užitkovosti a zabřezávání plemenic.....	35
5.3	Vyhodnocení zabřezávání dojnic.....	38
6	DISKUZE.....	41
7	ZÁVĚR.....	46
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47

1 Úvod

Reprodukce je jedním z nejdůležitějších aspektů v chovech skotu. Spolu s vlastní produkcí zajišťuje celkovou rentabilitu a ekonomický profit. Správný management reprodukce spolu se zajištěním zdraví a welfare zvířat umožňuje zvyšovat kvalitu výsledných produktů určených finálnímu spotřebiteli. V případě chovů dojeného skotu hraje hlavní roli v reprodukci inseminace. Její úspěšnost je hodnocena podle procenta dojnic, které skutečně zabřezly po první a všech inseminacích. Ačkoliv se může zdát, že jde o jednoduchý proces, v praxi je jeho procento relativně nízké. Zabřezávání dojnic je ovlivněno mnoha faktory, a to jak vnějšími, tak i vnitřními - především fyziologickými. Na zabřezávání dojnic má vliv zejména zdravotní stav, kondice zvířat, výživa, ale i okolní prostředí, technika inseminace a kvalita inseminační dávky. Vzhledem k tendencím dnešní doby, tj. neustálého zdokonalování a zvyšování celkové profitability, by snahou každého úspěšného reprodukčního manažera chovu mělo být především zlepšování úrovně těchto aspektů. Jednou z takovýchto možností je zlepšování na molekulární úrovni. Kvalitu ejakulátu v kryokonzervovaných dávkách je možné zvyšovat pomocí aditiv, kryokonzervantů a kryoprotektantů. Jedním z těchto aditiv je i LDL cholesterol. Jeho vliv na výsledné zabřezávání dojnic je hodnocen v této diplomové práci.

2 Cíl práce

Cílem práce je vyhodnotit výsledek zabřezávání dojnic, které byly inseminovány dávkami obohacenými o LDL cholesterol. Hypotézou práce je předpoklad, že přídavek LDL do inseminační dávky zlepší přežitelnost a oplozovací schopnost spermií a tím celkově zvýší úroveň zabřezávání dojnic.

3 Literární řešerše

3.1 Role inseminace v chovech dojeného skotu

Umělá inseminace (AI) je technika asistovaného manuálního přenosu pohlavních buněk samce do reprodukčního traktu samice, za účelem jejího oplození. Je jednou z nejvíce používaných metod asistované reprodukce, nejen v chovech skotu (Eklundh, 2013). Zároveň slouží jako biotechnologie zlepšující celkovou úroveň reprodukce stád a genetický potenciál populací – a to především dojeného skotu. AI je využívána globálně a je nezbytnou součástí celkové udržitelné produkce farem. Současně poskytla základ pro rozvoj dalších technologií s ní spojených, jako například kryokonzervace; sexování spermatu; regulace estrálního cyklu; odběr, mražení, kultivace a transfer embryí; a klonování (Foote, 2002). Od roku 1940, kdy se začala inseminace hojně využívat v chovech dojeného skotu (Eklundh, 2013) podléhala AI obrovskému rozvoji a v roce 1995 bylo celosvětově vyrobeno a použito okolo 200 milionů kusů mražených inseminačních dávek a v roce 2002 více než 232 milionů kusů mražených a 11,6 milionů ks chlazených dávek (Vishwanath, 2002). Úroveň těchto čísel zůstává v dnešní době téměř stejná a odpovídá přibližně šestině z celkového počtu hlav skotu, který byl v roce 2016 dle FAO¹ 1,47 miliardy.

V oblasti chovu dojeného skotu je známo, že AI je jednoduchá, úspěšná a ekonomická metoda k získání kvalitního genetického materiálu ve srovnání s embryotransferem a přirozenou plemenitbou. Tento průmysl je zejména znám svou dlouholetou historií systému testování potomků elitních býků a následným šířením těchto kvalitních genů pomocí inseminace (Vishwanath, 2002). Další z mnoha výhod inseminace je zkrácení genetického intervalu, pokles přenosu infekčních chorob mezi zvířaty, překlenutí geografických a časových vzdáleností, snížení možnosti zranění býka, bezpečnější pracovní prostředí pracovníků, velký rozptyl oplozených samic z jednoho ejakulátu (Eklundh, 2013). Dále umožňuje reprodukci zvířat s fyzickými i fyziologickými abnormalitami, využití inseminace a dlouhodobé konzervace buněk u málo četných plemen a ohrožených druhů (Morrell, 2010). Tyto aspekty celkově zvyšují efektivitu reprodukce a zároveň poskytují možnost porovnání plodnosti býků

¹ FAO = Food and Agriculture Organisation of United Nations

včetně kvality jejich semene (Foote, 2002). Na druhé straně profitabilita komerčních stád závisí také na genetickém meritu matek a jejich schopnosti zařazení se zpět do reprodukce v co nejkratším intervalu post partum (Vishwanath, 2002).

Mezi nevýhody AI Morrell (2010) zařazuje případy, kdy někteří býci mohou být přenašeči virových onemocnění bez klinických projevů infekce. Ojedinele mohou být bakteriální patogeny rezistentní vůči antibiotikům v ředidlech ejakulátu, nebo vytvářením biofilmů odpuzují jejich účinek. V některých případech může klesat úroveň plodnosti se zvyšujícím se procentem AI.

3.2 Hodnocení reprodukce

Kontrola a řízení reprodukce (tzv. reprodukční management) je součástí komplexní veterinární péče v chovech skotu. Je podmínkou intenzifikace reprodukce a tím i zvyšování rentability chovu (Doležel a Vinkler, 2004). Přesné aktuální informace o reprodukci jednotlivých plemenic a stád poskytují chovateli možnost okamžitě realizovat potřebná opatření vedoucí k dosažení optimálních výsledků v zabřezávání krav (Louda, 2001). Úroveň reprodukce se hodnotí na základě následujících ukazatelů jejichž hodnotu je třeba posuzovat ve vztahu k mléčné užitkovosti (Říha a kol. 2000). Klíčovými ukazateli jsou servis perioda, interval, inseminační index, mezidobí, NR test 28 nebo 58, natalita krav, interinseminační interval (Říha a kol. 2000). Louda (2001) rozděluje tyto ukazatele na základní – již zmíněné výše a pomocné (hrubá natalita, čistá natalita, úhyn telat, embryonální mortalita).

V případě zahraničních farem se reprodukce hodnotí spíše podle CR = conception rate (podíl zabřezlých a inseminovaných krav), HDR = heat detection rate (podíl krav inseminovaných ve 21 dnech a vhodných k inseminaci) a výslednou PR = pregnancy rate (HDR x CR). Všechny tyto hodnoty jsou vyjadřovány procentuálně (Ferguson et Skidmore, 2012).

Srovnatelný ukazatel s CR je zabřezávání po 1. inseminaci. I v českých chovech je jedním z klíčových ukazatelů reprodukce skotu. Vyjadřuje se procentem poprvé inseminovaných krav, které skutečně po první inseminaci zabřezly. Následuje zabřezávání po všech inseminacích – srovnatelné s pregnancy rate. Procentuální hodnota tohoto ukazatele by neměla být pod úrovní dolní kvalifikační hranice zabřezávání po první inseminaci v jednotlivých kategoriích (Říha a kol. 2000). Procento zabřezávání poukazuje na celkový stav a úroveň chovu a vypovídá o jeho kvalitě (Ferguson et Skidmore, 2012).

Servis perioda je jedním z ekonomicky nejvýznamnějších ukazatelů a vyjadřuje se počtem dnů, které uplynuly od porodu do inseminace, po které dojnice zabřezla. V chovech s průměrnou užitkovostí je vyhovující servis perioda do 80 dnů, uspokojivá do 90 dnů. Tento ukazatel nebere v potaz ekonomické ztráty, které vznikají u plemenic, které se dlouhodobě přebíhají, případně byly vyřazeny. Tento ukazatel je regulovatelný brakací (Říha a kol., 2000). Dle kontroly užitkovosti skotu Českomoravského Svazu Chovatelů, a.s. byla servis perioda v roce 2016 přibližně 117 dnů. Je tedy zřejmé, že s rostoucí užitkovostí klesá reprodukční výkonnost v chovech dojeného skotu.

Inseminační interval vyjadřuje počet dnů, které uplynuly mezi porodem a dnem, kdy byly plemence poprvé inseminovány post partum. Jeho délka závisí především na průběhu involuce pohlavních orgánů po porodu, na obnovení plnohodnotných ovariálních cyklů a projevech říje. Toto období trvá u většiny plemenic 5 až 6 týdnů, u vysoce užitkových dojnic i déle. Plemence necyklující (bez kontrolované říje) do 60 dnů post partum by měly být vyšetřeny a patřičně ošetřeny. Interval nad 60 dnů v chovech s průměrnou užitkovostí je nevyhovující (Říha a kol., 2000). V roce 2016 byl dle ČMSCH, a.s. průměrný počet dnů intervalu cca 74. Tento fakt také potvrzuje výše zmíněnou přímou úměru mezi reprodukční výkonností a užitkovostí.

3.3 Aspekty ovlivňující zabřezávání a plodnost plemenic

Fertilita samic hospodářských zvířat je dána průměrnou mírou zabřezávání na jeden cyklus a pohybuje se okolo 50–80 %. Největší ztráty jsou zaznamenávány ihned po zabřeznutí a do třetího týdne březosti. Špatná plodnost plemenic enormně každý rok zvyšuje náklady na provoz mléčných farem, z nichž je velká část zapříčiněna rannou embryonální mortalitou a tím i prodloužením intervalu do následujícího zabřeznutí. Ačkoliv téměř vymizely specifické infekční choroby, které se ve 40. letech s příchodem inseminace objevily, je stále velkým problémem dnešních chovů udržet stabilně vysoké procento plodnosti stád. Jak se ukazuje, průměrná dojnice se dožívá 5 let, vyprodukuje dvě telata a dokončí dvě laktace. Chyby v reprodukci jsou hlavní příčinou takto zkráceného produktivního života dojnic (Gordon, 2004).

Mezi faktory ovlivňující plodnost a zabřezávání dojnic Rutten et al. (2016) zařazuje mléčnou užitkovost, paritu, plemeno, počet inseminací, fázi laktace, období inseminace, použití sexovaného semene a informace o průběhu předchozího telení. Dalšími aspekty mající vliv na

plodnost a výsledek inseminace jsou infekční onemocnění, BCS (body condition score), ketózy, počet somatických buněk a plemeno skotu. Následně budou zmíněny ty nejdůležitější.

3.3.1 Plemeno, užitkovost

Dle Doležela a Vinklera (2004) lze za jeden z významných faktorů ovlivňující zabřezávání a celkově reprodukci považovat typ plemene a jeho užitkovost. Je zcela zřejmé, že základní rozdíl je mezi masnými plemeny chovanými extenzivně a plemeny mléčnými, vysoko užitkovými. Dojený skot, na který se zaměřuji v této práci má přirozeně vyšší reprodukční výkonnost, než plemena masná a zároveň při plnění vyšších chovatelských nároků mají tendenci k nižší reprodukční výkonnosti. Při nevhodných podmínkách chovu těchto zvířat dochází k narušení zdravotního stavu a zhoršení reprodukční výkonnosti.

3.3.2 Stáří, parita

Při hodnocení reprodukce je třeba přihlížet na věkové složení stáda. Obecně se plodnost u krav postupně zvyšuje současně se stářím a paritou, vrcholí ve stáří 4–8 let (3. - 7. laktace) a postupně klesá a zaniká mezi 20. a 30. rokem. Snahou Chovatele by tak mělo být udržovat neustále ve stádě maximální procento krav ve stáří 4–8 let. Toto však představuje velkou rezervu v našich chovech, poněvadž průměrné stáří, kterého se krávy dožívají v českých chovech většinou nedosahuje 5 let. Krávy se tak nedožijí ani 3. laktace (Doležel a Vinkler, 2004).

V současné době se průměrný počet laktací populace Holštýnského skotu pohybuje okolo 2,11 u živých krav a 2,88 u vyřazených (ČMSCH, 2017). Nízké stáří krav ve stádě poukazuje na zvýšení obratu stáda s vysokou brakací, která může být zapříčiněna vysokou frekvencí zdravotních problémů, nebo intenzivní selekcí stád (Doležel a Vinkler, 2004).

3.3.3 Roční období a klima

Klima je kombinací elementů jako je teplota, vlhkost, dešťové srážky, pohyb vzduchu, záření, tlak vzduchu a ionizace. Podnebná pásma se liší po celém světě a jsou závislá na zeměpisné šířce, převažujícím větru, podmínkách odpařování, dostupnosti vody, nadmořské výšce, vzdálenosti od hor a ostatních faktorech (West, 2003).

Přestože je kráva polyestrické zvíře, přetrvává určitá tendence ovlivnění reprodukce ročním obdobím. Stimulační vliv prodlužující se fotoperiody je u skotu málo významný, i když jalovice rodící se na jaře dosahují puberty dříve než jalovice narozené na podzim (Ball et Peters, 2004; Doležel a Vinkler, 2004). Ball a Peters (2004) uvádí, že první plnohodnotné říje dosahují “jarní“ jalovice již o dva měsíce dříve.

Významněji se v reprodukci skotu uplatňuje inhibiční vliv extrémních teplot (Doležel a Vinkler, 2004). V teplejším podnebí, se můžeme setkat se sezónním anestrem, zkrácenou délkou říje, zhoršenou úrovní zabřezávání a zvýšenou embryonální mortalitou vlivem tepelného stresu, a to jak u *Bos taurus*, tak i *Bos indicus*². Gordon (2004) doplňuje potlačenou intenzitu říje, redukcí síly a velikosti preovulační LH vlny, sníženou sekreci progesteronu, pozměněný vývoj folikulů a sníženou plodnost. Nicméně prodloužení anestru bylo pozorováno zejména u *Bos Taurus*, kdy byl vystaven podmínkám tropického podnebí, avšak ve většině případů k němu docházelo spíše z důvodu malnutrice, než jako přímý efekt vysokých teplot. Dle výzkumu Schüllera et al. (2016) klesla míra zabřezávání dojníc v průměru od 30 do 60 % v období s vysokou teplotou oproti normálu. Studie ze Zimbabwe zkoumala průběh a výskyt ovariální aktivity pomocí profilů progesteronu v mléce u dojeného Holštýnského skotu a jejich kříženek s původními druhy. Většina z nich měla extrémně dlouhé periody ovariální acyklie, často přesahující i 7 měsíců. Zároveň i část stáda s mírně vyšší hodnotou BCS než předchozí skupina, jevila absenci ovariálních cyklů. Tento jev poukazoval tedy i na jiné faktory kromě výživného stavu, jež měly vliv na kříženky a původní druhy (Ball et Peters, 2004).

Je také známo, že tepelný stres má vliv na reprodukční hormonální osu. Některé efekty jsou přímo ovlivňující hypotalamus, adenohipofýzu, dělohu, folikuly a jejich oocyty, ale i samotné embryo. Ostatní efekty jsou nepřímé, pravděpodobně způsobené změnami v metabolismu jako odpověď na snížený obsah vlákniny (Gordon, 2004).

Během tepelného stresu probíhají změny v zaživacím systému, acidobazickém prostředí, a krevních hormonech. Některé krávy proto snižují příjem potravy, ale mnoho změn se objeví jako výsledek fyzického vysílení. Neurony, které jsou citlivé na teplotu jsou lokalizovány po celém těle krávy a vysílají signály do hypotalamu, který způsobí mnohé fyziologické, anatomické a změny v chování ve snaze o udržení tepelné bilance. Během

² *Bos taurus* = *Tur domácí*, rozšíření po celém světě.

Bos indicus = druh afrického a indického skotu, více znám pod jménem *Zebu*.

tepelného stresu krávy snižují příjem krmiva, snižují aktivitu, zvyšují periferní tok krve a pocení, tyto odpovědi mají škodlivý vliv, jak na produkci, tak na fyziologický stav krávy (West, 2003).

Vliv horkých a vlhkých klimatických podmínek působí i na tělesnou teplotu krav. Doporučená horní hranice teploty okolního prostředí pro zachování stabilní tělesné teploty Holštýnského skotu skot je 25-26 °C nad 25 °C by měla být zavedena taková opatření, aby se zabránilo dalšímu zvyšování TT. Produkce tepla z metabolických funkcí tvoří zhruba 31 % z energie krávy 600 kg, produkující 40 kg mléka o 4 % tuku. Fyzická aktivita zvyšuje objem tepla produkovaného svaly kostry a tělesnými tkáněmi (West, 2003).

Výraznější vztah k ročnímu období vykazují zvířata v pastevních odchovech než celoročně ustájená. Znamky pohlavní sezónnosti pozorujeme především u primitivních plemen skotu. V chovech, ve kterých se mění krmná dávka v závislosti na ročním období, se změny uplatňují více prostřednictvím výživy než ročního období (Doležel, Vinkler; 2004).

3.3.4 Výživa, tělesná kondice a metabolický stav

Nutriční stav v průběhu chovné sezony hraje jednu z hlavních rolí na cestě k dosažení březosti plemenic (Dahlen et al., 2015). Interakce mezi výživou a celkovou reprodukční výkonností jsou velmi komplexní, vliv výživy působí na reprodukci dojníc současně nejen s dojivostí, ale také s dalšími faktory jako je roční období a sání telat u masných plemen (Ball et Peters, 2004). Výživa působí na reprodukční výkonnost především nepřímo přes metabolismus, somatický vývoj a kondici zvířete, nebo v menší míře přímo hormonálně (fytoestrogeny) a i toxicky působícími látkami, nebo jejich metabolity (Doležel a Vinkler, 2004). Zároveň je i obnovení reprodukčních funkcí po otelení závislé na energetickém stavu celého organismu skotu (Stádník a kol., 2006). Z kvantitativní stránky negativně působí na reprodukci jak nedostatek, tak nadbytek živin (Doležel a Vinkler, 2004). Příjem energie je pro zachování reprodukční funkce mnohem více limitující, než příjem bílkovin (Ball et Peters, 2004); překrmování lehce stravitelnými dusíkatými látkami doprovází zvýšené koncentrace jejich metabolitů – močoviny a amoniaku ve vnitřním prostředí, které se v sekretech pohlavních orgánů a žláz přímo toxicky působí na gamety a embrya. Snižují tak úroveň zabřezávání a zvyšují embryonální mortalitu (Doležel a Vinkler, 2004). Obdobných výsledků bylo dosaženo i ve studiích sledujících pozitivní korelaci mezi příjmem energie a reprodukční výkonností (Ball

et Peters, 2004). Dle Doležela a Vinklera (2004) je zajištění únosné míry přirozeně se vyskytujících negativní energie post partum jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících obnovení plnohodnotných pohlavních cyklů a plodnosti.

Nízký příjem energie u krav před a po porodu prodlužuje délku anestrů a v případě jalovic vede k menšímu počtu folikulů, nízké hladině progesteronu a horšímu zabřezávání (Ball et Peters, 2004). Vedle vlivu na acyklii je výživný stav rozhodující pro zabřezávání po inseminacích (Stádník a kol, 2006). Pozitivní korelace mezi nutričním stavem, tělesnou hmotností, BCS a plodností byla také potvrzena již mnoha autory. Přestože je nízké zásobení energií z krmiva nejvíce pravděpodobnou nutriční příčinou slabé reprodukční výkonnosti, deficit ostatních specifických živin, zejména vitamínů a minerálních látek je také rozhodující (Ball et Peters, 2004). Z kvalitativní stránky výživy jsou pro reprodukci důležité významné poměry minerálních látek (Ca : P : Mg, dále Na : K), obsah vitamínů jako E, A a beta-karotenu, a také výskyt stopových prvků (Cu, Mn, Co, I, Se, Zn) (Doležel a Vinkler, 2004). Úroveň výživy je stejně důležitá jako body condition score. Ideální situace je taková, kdy se zvyšuje BCS a nutriční kvalita krmné dávky k blížícímu se období zapouštění (Dahlen et al., 2015).

Body condition score (BCS) je metoda hodnocení výživového stavu založena na vnějším pozorování a vizuální evaluaci. Je subjektivní metodou stanovující množství tuku v podkoží, které ukazuje na momentální výživný stav skotu v důsledku metabolismu energie (Stádník a kol. 2006) Technika BCS byla vyvinuta jako jednoduchý monitoring tělesných rezerv dobytka. Zvířata jsou hodnocena palpací, odhaduje se výška podkožního tuku na kořeni ocasu a v lumbální oblasti, následně se přidělí číslo od 0 (vyhublá) do 5 (velmi tlustá) (Ball et Peters, 2004). Dahlen et al. (2015) používá stupnici od 1 do 9 (1 = vyhublá, 9 = obézní) okolo 5.

Základními požadavky pro optimální plodnost je minimalizovaná NEB³ (Paar et al., 2015), stejně jako nadměrná depozice a mobilizace tělesného tuku (Ball et Peters, 2004). Při prohloubené negativní energetické bilanci dochází k inhibici hypotalamo – hypofyzární aktivity i produkce intra ovarálních faktorů stimulačně modifikujících účinek hypofyzárních gonadotropinů (např. insulinu podobný růstový faktor. Zevním výrazem prohloubené NEB je ztráta kondice a živé hmotnosti zvířete (Doležel a Vinkler, 2004). Je důležité zajistit, že vedle

³ NEB = Negativní energetická bilance

energie (která udává BCS), budou naplněny i požadavky plemenic na protein, vitamíny a minerály, a to v období před plánovaným zapařčením (Dahlen et al., 2015). Krávy by měly být před porodem nakrmeny na hodnotu BCS mezi 2,5 – 3,5 a neměly by ztrácet na kondici až do dalšího zabřeznutí. Dle Ticháčka a kol. (2007) kondiční skóre 3 odpovídá stavu, kdy je oblast kořene ocasu zaoblená, nejsou zřetelné prohlubeniny, v podkoží je uložena tuková tkáň v souvislé, ale nevysoké vrstvě. Kosti pánevní jsou při mírném tlaku nahmatatelné. Konce žeber jsou kryta vrstvou tukové tkáně, pro nahmatání kostí je třeba většího tlaku. V oblasti beder je pouze málo znatelná prohloubenina. Při takovéto kondici nejsou nutné korekce v systému výživy.

Zvířata telící se s nízkým BCS trpí vážným nedostatkem energie v době zamýšleného zabřeznutí, tak jako je pro ně velmi těžké přijmout dostatek energie v krmivu a zároveň vydat energii na laktaci. Jak dojnice, tak masné krávy telící se s nízkou BCS následně vykazují nízkou ovariální aktivitu a prodlužují nástup pravidelných ovariálních cyklů. Následně se interval do zabřeznutí rapidně prodlužuje (Ball et Peters, 2004).

Na druhé straně působí na reprodukční výkonnost negativně i nadbytek živin při překrmování a obezitě zvířat stojících na sucho před porodem (Doležel a Vinkler, 2004). Telení obézních krav může přinést komplikace prodloužení involuce, poranění reprodukčního traktu, náchylnost k infekčním chorobám traktu, nebo kombinaci těchto potíží. Zároveň krávy s BCS nad 4 mají tendenci k nadměrné mobilizaci tuků post partum. U dojnic může tato situace vést k metabolickým poruchám, zejména k akumulaci tuků v játrech (ztučnění jater) (Ball et Peters, 2004), které při zátěži po porodu funkčně nestačí vyrovnávat vnitřní prostředí a nástup metabolických poruch sekundárně inhibuje pohlavní aktivitu a plodnost (Doležel a Vinkler, 2004).

Ačkoliv byly mnohé mechanismy již vysvětleny, stále se objevuje mnoho protichůdných názorů a informací ohledně vztahu mezi reprodukcí a plodností krav. Je však pravděpodobné, že energetická bilance je hlavním faktorem určujícím délku acyklických period u dojnic, a také u laktujících masných krav mohou být dlouhé acyklie post partum zkráceny zvýšením obsahu energie v KD. Jednotlivé interakce výživného stavu s ovariální aktivitou, říjového chování a plodností v období zapouštění stále vyžadují detailnější studie (Ball et Peters, 2004).

3.3.5 Chovatelská péče o reprodukci

Kvalitní chovatelská péče o reprodukci představuje zajištění vhodných podmínek chovu pro dané plemeno s ohledem na přirozené faktory, které reprodukci ovlivňují (viz výše), dále pečlivé a pravidelné sledování projevu pohlavní aktivity, vhodné způsoby manipulace se zvířaty a v případě potřeby zajištění kvalifikované asistence. Důležité je sestavení skupin zvířat podle reprodukčního stádia s přizpůsobením chovatelských potřeb (především výživy). Nevhodné způsoby manipulace a nestabilní chovatelský režim vytváří stres, který inhibuje reprodukční výkonnost (Doležel a Vinkler, 2004).

Je známo, že stres u hospodářských zvířat snižuje plodnost, ačkoliv jeho přesný mechanismus ve vztahu k reprodukci není detailně znám. Gordon (2004) se domnívá, že stresor aktivuje hypotalamo – hypofyzární – adrenální osu, která způsobí uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH), který stimuluje sekreci glukokortikoidů z nadledvin. Uvolnění ACTH a glukokortikoidů interferuje s uvolňováním gonadotropinu skrz vliv na hypotalamus a hypofýzu. Je také možné, že hladiny progesteronu přesahující normální stav v době říje (okolo ovulace) mohou vést k prodloužení růstu preovulačních folikulů a zpožděné ovulaci s následným škodlivým efektem na plodnost.

3.3.6 Detekce říje

Vyhledávání říje ve stádě krav je základním předpokladem úspěšné prosperity daného chovu (Louda, 2008). Ačkoliv u hospodářských zvířat jsou vnější projevy říje většinou dobře vyvinuty a snáze pozorovatelné, u vysoko užitkových plemenic nemusí být tolik zřetelné. Základní říjové chování zahrnuje zvýšenou pohybovou aktivitu, neklid, vokalizaci, očuchávání ostatních zvířat a naskakování na ně, zvýšená frekvence urinace, zduření vulvy a její zarudnutí, výtok (Morrell, 2010). Dalšími příznaky říje podle Balla a Peterse (2004) jsou flémování, agresivita, rozcuchané a olízané chlupy v okolí ocasu a řitě.

Mezi fyziologické změny v době říje dle Gordona (2004) patří zvýšená sekrece hlenu z krčku a vaginy (vedoucí k dalšímu z příznaků říje - a to k vazkému průhlednému výtoku z vulvy, který se často lepí k ocasu). V případech vazného ustájení to byl mnohdy jediný způsob detekce říje pro inseminaci, nicméně v závislosti na výtoku se můžeme mnohdy s inseminací zpozdít, nebo naopak inseminovat moc brzy. Výtok se dá snadno splést se zánětlivým výtokem, či výtokem s příměsí krve, jež značí konec říje. Tento jev způsoben vlivem estrogenů na lumen

dělohy v době říje a objevuje se zhruba den až dva po skončení estru. Dále v období zimy a chladného počasí můžeme pozorovat stoupání páry ze zádí krav výsledkem zvýšení tělesné teploty a průtoku krve v místech pohlavních orgánů. Zároveň u dojeného skotu můžeme zpravidla sledovat snížený průměrný denní nádoj v době estru, a to v důsledku fyziologických změn a zaměření organismu na reprodukci namísto reprodukce.

Obecně „zlatý standard“ pro rozpoznání říje u dojnice má tři základní pravidla. Dojnice na sebe nechá ostatní naskakovat – tj. reflex nehybnosti. Dále má dominantní folikul, který následně ovuluje a hladina koncentrace progesteronu v séru, nebo v mléce je značně snížená (LeRoy et al., 2017)

Nezachycená, nebo špatně určená říje má za následek, že se inseminace neprovede vůbec, anebo se provede v nesprávný čas. Tím vznikají značné ekonomické ztráty. Prodloužením mezidobí se nevyužije potenciál k produkci mléka a telat, vzrostou náklady na přílišnou brakaci krav a jejich náhradu jalovicemi, je nutno připočítat náklady na infertilní inseminaci a sníží se rychlost genetického pokroku (Říha a kol., 2000).

Je zřejmé, že detekce říje pozbyde efektivity, nebude-li dobytek vykazovat jasné a zřetelné příznaky estru. Špatně živená, nemocná, podchlazená, mokrá nebo šikanovaná zvířata s největší pravděpodobností výše zmíněné znaky projevovat nebudou. Okolní prostředí by mělo přispívat k možnostem projevů estru a k jejich pozorování. Obecně je říje mnohem lépe pozorovatelná u zvířat pohybujících se venku než u zvířat v uzavřeném prostoru. Pokud je dobytek ustájen uvnitř, podlahy by neměly být kluzké a měl by zde být dostatek prostoru pro volný pohyb a interakce uvnitř stáda. Pokud je využito krmných stolů, tím lépe, jelikož prostor před nimi může být využit k volnému pohybu. Pokud tato možnost není, je doporučeno tento prostor zajistit jiným způsobem. Budova by měla být dobře osvětlena a dávat dobrý rozhled nad zvířaty (Gordon, 2004).

Program na sledování a evidenci říje plemenic vyžaduje stanovení způsobu detekce říje, který bude ve stádě využíván, dále výběr zkušeného a zodpovědného pracovníka, jehož pracovní náplň v programu zajištění reprodukce v daném stádě bude přesně stanovena, včetně časového harmonogramu vlastní detekce říje ve stájích. Součástí pracovní náplně zootechnika musí být úzká spolupráce s inseminačním technikem, veterinárním lékařem a ošetřovateli (Louda, 2008). Jednou z nejdůležitějších pomůcek při vyhledávání říjí u plemenic jsou konkrétní záznamy o zvířatech. Z těchto záznamů by mělo být zřetelně jasné, kdy a jaká

plemenice bude v estru. K zjednodušení můžeme použít 21denní kalendář, kde zapisujeme pozorované chování, změny, či zdravotní obtíže a podle něj můžeme později předpokládat nástup říje u daných zvířat (Ball et Peters, 2004). Obecně, čím více času věnujeme detekování říje, tím větší počet říjí u zvířat identifikujeme a následně je inseminujeme. Zpravidla se plemenice pozorují 30 minut ráno a večer. Pozorování v delším časovém intervalu a častější frekvencí (30 minut až dvě hodiny) ráno, v poledne a večer přináší výrazně lepší výsledky detekce říje (Dahlen et al. 2015). Hegedušová a kol. (2010) považuje za adekvátní vizuální pozorování (prováděné pravidelně jedním pozorovatelem) třikrát denně po dobu 15 minut. Zároveň poukazuje na znalost zvířat a dokonalou reprodukční evidenci a upozorňuje na nereálnost předpokladu zachytit příznaky říje u všech plemenic. Nicméně by měl být zaveden program, který umožní zachytit co nejvíce případů říje. Doležel a Vinkler (2004) připomínají, že detekce říje by se neměla provádět v rámci jiných úkonů (krmení, dojení, čištění), jelikož tyto úkony znesnadňují dostatečnou pozornost sledující osoby. Především ale zneklidňují zvířata a zabraňují rozpoznat neklid zvířat zapříčiněný říjí.

Vedle observace můžeme k lepší detekci říje využít mnoho dalších metod, technologických pomůcek a zařízení jako jsou ocasní barvy, vasektomovaní býci prubíři, tlakem aktivované detektory, pedometry, elektronické snímače citlivé na tlak, počítačem snímané radiotelemetrické tlakové senzory, zařízení na měření vaginální elektrický odpor a hormonální analýzy progesteronových změn v mléce (Gordon, 2004).

3.3.7 Načasování a technika inseminace

Podle Hegedušové a kol. (2010) správný čas inseminace určují následující faktory:

- Čas uvolnění oocyty z folikulu (10 až 12 hodin po skončení říje)
- Doba, po kterou je oocyt životaschopný a může být oplodněn (v průměru 6 hodin)
- Doba průběhu kapacity spermií (5 až 6 hodin)
- Životaschopnost spermií

Jedním z problémů načasování inseminace je předčasné nebo oddálené uvolnění oocyty a různá motilita spermií. Pokud se říje prodlužuje, může tento problém částečně vyřešit Reinseminace. Není však pochyb o tom, že několikrát opakované inseminace zvyšují náklady a nejsou opodstatněné ani technickými výhodami (Hegedušová a kol. 2010). Ball a Peters (2004) poukazují na hlavní příznaky říje předcházející ovulaci o 12-15 hodin. Obecně platí, že

plemenice, u kterých je proestrus pozorován ráno, by měly být inseminovány další ráno, nebo odpoledne příštího dne. Plemenice, které na sebe nechají skákat a zaujímají postoj k páření ráno, by měly být inseminovány odpoledne téhož dne a plemenice, které na sebe nechají skákat a zaujímají postoj k páření večer, by měly být inseminovány příští den ráno (Hegedúšová a kol. 2010). Dle Říhy a kol. (2000) vychází určení správné doby inseminace z několika biologických jevů. Patří mezi ně interval od zjištění reflexu nehybnosti do ovulace – cca $27,6 \pm 5,4$ hod. Následně transport motilních a životaschopných spermií do vejcovodu vyžaduje minimálně 6 hodin. Dle Gordona (2004) potřebují spermie několik hodin na kapacitaci a poté zůstávají oplození schopné cca 24 hodin. Funkční vitalita spermií z mražených ID v reprodukčním traktu samice byla odhadnuta na 20-24 hodin (Říha a kol., 2000). Maximální doba oplození schopnosti oocyty je 20-24 h, Gordon (2004) uvádí přežitelnost oocyty 12 hodin, nicméně ideální doba se odhaduje na 6-12 hodin po uvolnění z folikulu. Ball a Peters (2004) doporučují inseminovat v druhé polovině říje a 6 hodin po zjištění reflexu nehybnosti Gordon (2004). považuje za optimální čas mezi 12-24 hodinami od začátku reflexu nehybnosti. To by mělo zajistit umístění spermií do místa oplození (horní třetina vejcovodu) pár hodin před ovulací., která nastává zhruba 30 hodin od začátku říje (Ball et Peters, 2004).

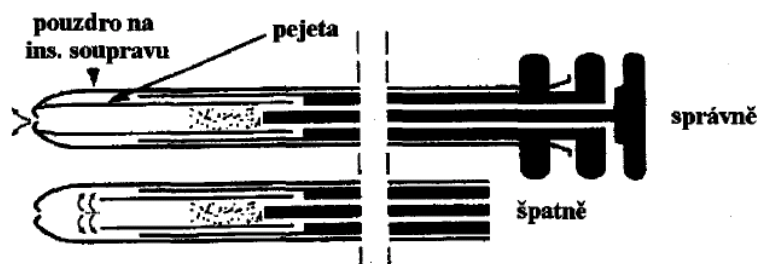
Zároveň je možné dojnice inseminovat po indukci ovulace progestageny, nebo látkami s luteolytickým účinkem. Dále lze normálních výsledků zabřezávání u dojnic docílit inseminací ve fixním čase po propadu hladin progesteronu v mléce. Tento hormonální jev je možno pozorovat i u zvířat bez vnějších příznaků říje. Tato metoda je nyní komerčně využitelná díky rychlým a jednoduchým ELISA testům pro měření hladin progesteronu v mléce (Ball et Peters, 2004).

Vedle požadavků na zdravotní stav, správný management stáda a odpovídající administraci farmaceutik je mnoho dalších faktorů, které ovlivňují proces inseminace. Její úspěšnost je hodnocena podle zabřezávání po první inseminaci, které zároveň značí dobré podmínky pro reinseminaci. Ostatními faktory, jež mají vliv na zabřezávání jsou kvalita semene (primárně závislá na výběru býka), výše zmíněné načasování inseminace a kompetence inseminačního technika při aplikaci dávek (Saacke, 2008). Podle Balla a Peterse (2004) jsou i podmínky prostředí a celková technika inseminace velmi důležité pro její výsledek. Při čekání na samotnou inseminaci by dojnice měly být umístěny v zádržném zařízení či boxu a pokud by zde musely čekat více jak 15 minut, je třeba zajistit adekvátní přísun čerstvé vody a krmiva, ke kterému by za normálních okolností měly přístup. Pro snížení stresu z izolace od stáda se často

vyplatí spolu s inseminovanou dojnící držet i její “společnici“ až do doby inseminace. V každém případě je snaha toto čekání snížit na minimum. Inseminační box, či fixační klec by měly být udržovány v čistotě, s dostatečným přístupem čerstvého vzduchu a světla. Zároveň by zvíře měly fixovat bez narušení jeho komfortu, ale zároveň natolik, aby se nemohlo pohybovat dopředu, dozadu, či do stran. Do klece by dojnice měla vstupovat v klidu, rutinně a nejen v případě aplikace injekcí, či úpravy paznehtů. Pokud není dojnice v adekvátní výšce pro inseminační techniku, je třeba přistavit stabilní stoličku. Dále by měl být k dispozici stolek, či polička pro odložení pomůcek pro inseminaci, tj. rukavic, papírových utěrek, teplé vody s desinfekcí. To vše by mělo být připraveno ještě před vyjmutím goblet s inseminačními dávkami z tanku s tekutým dusíkem.

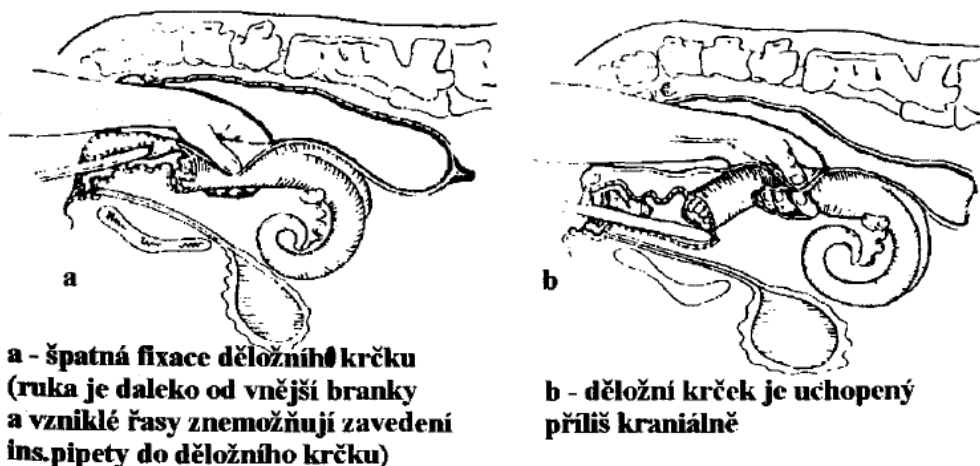
Inseminační dávka by měla zůstat po celou dobu zmražená a neměla by se vyndávat z tekutého dusíku až do chvíle bezprostředně před inseminací. Ačkoliv semeno ve skutečnosti netaje, pokud je vystaveno vyšším teplotám a následně opět zchlazeno v dusíku, způsobí nenávratné poškození spermií. Míra tání dávky by měla být kontrolována a bude se lišit vzhledem ke způsobu, jakým byla mražena. Při běžném postupu se dávka (0,25 ml) ponoří na 20-30 sekund do vody o 35 °C. Louda a kol. (2001) doporučuje teplotu vodní lázně 38–40 °C. Dávky 0,5 ml se rozmrazují 40-60 s (Ball et Peters, 2004). Po vyjmutí z lázně musí být pejeta řádně osušena (Louda a kol., 2001). Zatavený konec dávky se poté odstříhne a nasadí do inseminační zbraně a zabezpečí jednorázovým plastovým pouzdem (pipetou). Je důležité dávku použít ihned po zasunutí do inseminační zbraně, ačkoli studie neprokázaly výrazné změny v míře zabřezávání při trvání inseminace okolo 20 minut. Nicméně je snahou celý proces uskutečnit do 15 minut. Jednou rozmražená dávka se nesmí znovu chladit, či použít (Ball et Peters, 2004).

Obsah dávky je vytlačen do reprodukčního traktu dojnice přímo z inseminační zbraně. Pokud je kráva vhodně uvolněná, inseminační technik uchopí děložní krček skrz rektum a posune ho blíž k sobě tak, aby do něj mohl přímo zavést inseminační zbraň. Konec



Obrázek 3.1.: Příprava inseminační zbraně k inseminaci (Louda a kol., 2001)

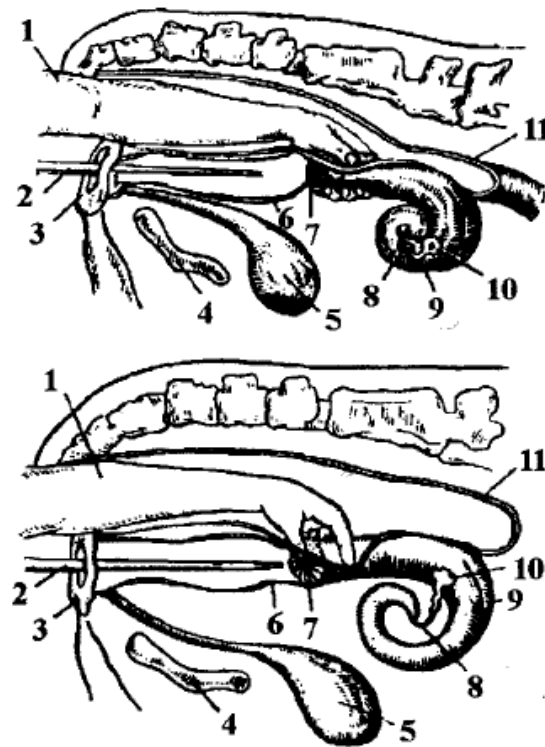
pipety je zasunut do krčku tak, aby mohlo být semeno vytlačeno do děložního těla. Jemným zatlačením na píst zbraně se odlepí vatová zátka a sperma se vytlačí do hrotu krycí pipety tak, aby se hladina spermatu dostala až k vyústění krycí pipety (Louda a kol., 2001). Cílem je se ujistit, že je konec pipety absolutně v jedné linii s předním koncem krčku a že semeno není vypouštěno dovnitř krčku, ale až za něj. Pokud je pipeta zasunuta příliš daleko, hrozí že obsah ID bude vypuštěn jen do jednoho děložního rohu. Běžně se doporučuje inseminovat do těla dělohy pouze při první inseminaci a reinseminaci provést následně jen do krčku. Tímto se dá zabránit možnému abortu, kdy je pipeta zavedena až do těla dělohy, avšak kráva je již březí z předchozí inseminace López-Gatius et Hunter (2011) uvádí kromě tohoto konvenčního stylu inseminace i hlubokou inseminaci do děložního rohu a intra-peritoneální techniku inseminace. Tyto techniky zvyšují procento zabřezávání dojníc. Metoda inseminace do těla děložního a reinseminace do krčku není podporována ve Velké Británii, jelikož nese pravděpodobnost snížení míry zabřezávání, pokud je kráva jalová po první inseminaci. Studie ukazují pokles cca okolo 5 %, v případě, že je zbraň zasunuta více jak do poloviny krčku. Při použití progesteronových testů pro zjištění špatně načasovaných inseminací, není nutné tuto praxi dále provozovat (Ball et Peters, 2004).



Obrázek 3.2.: Nesprávná technika inseminace (Louda a kol., 2001)

Ke zvýšení procenta oplodnění a životaschopnosti potomstva se říjící plemence může opakovaně inseminovat v téže říji. Reinseminace se provádí spermatem stejného býka. Reinseminují se všechny plemence, které byly inseminovány na počátku říje, nebo byly při

inseminaci neklidné, podrážděné a příliš „tlačily“ sperma z traktu ven. Reinseminují se i plemenice, které za 8 hodin po inseminaci stále projevují příznaky říje (Louda a kol., 2001).



**1 - ruka, 2 - inseminační pipeta, 3 - vulva,
4 - pánevní kost, 5 - močový měchýř, 6 - pochva,
7 - poševní část děložního krčku, 8 - vejcovod,
9 - děložní rohy, 10 - vaječník, 11 - rektum**

Obrázek 3.3.: Správná technika inseminace (Louda a kol., 2001)

3.3.8 Kvalita ejakulátu

Výsledek reprodukce skotu je z určité části ovlivněn i samčím komponentem, který je určen vlastní oplození schopností spermií (Beran et al., 2011). Každý ejakulát určený pro účely umělé inseminace musí splňovat předepsané požadavky stanovené normou. Kvalita ejakulátu od prověřeného pleménika musí být zhodnocena ve specializované laboratoři, a to nejlépe do 10 minut po odběru na inseminační stanici. Následně se provede komplexní vyšetření, jež zahrnuje řadu zkoušek a dle jeho výsledku se rozhoduje o vhodnosti použití pro AI (Louda a kol., 2001).

Parametrů pro hodnocení spermatu je poměrně velké množství a dělí se na makroskopická a mikroskopická vyšetření. Objem ejakulátu, barva, pach, konzistence a cizí přímíseniny zahrnují makroskopické hodnocení. Motilita, koncentrace, proporce abnormálních spermií a vířivost představují vyšetření mikroskopická (Louda a kol., 2001; Ball et Peters, 2004). Hodnocení integrity spermatické membrány a chromatinu může být provedeno před i po rozmražení a pro doplnění může být posouzeno procento spermií s abnormálním akrozomem, krčkem a bičíkem (Ahmed et al., 2014; Sieme et al., 2015).

Minimální požadavky na nativní ejakulát býka jsou následující:

- Objem (ml) min. 4.
- Koncentrace spermií (mm^3) min. 700 000.
- pH 6,9.
- Motilita, aktivita (%) min. 70.
- Podíl patologických spermií (%) max. 20 (Louda, 2001).

3.3.9 Mražení spermatu

AI je z větší části prováděna pomocí kryokonzervovaného semene. Tato technologie se vyvinula okolo 50. let 20. století na bázi objevení ochranných vlastností glycerolu při mražení spermií (Hinsch et al., 1997; Standerholen et al., 2015). Ochranný mechanismus molekul glycerolu může reflektovat vazbu hydroxylových skupin atomů vodíku na fosfátové skupiny atomů kyslíku v membráně spermií a tím zajišťovat její stabilizaci při kryokonzervaci (Papa et al. 2015). I přesto kryokonzervace, jejíž účel je především zajistit přežití spermatu, působí nenávratná poškození plasmatických membrán, vedoucí k úmrtí buněk vysokého počtu spermií. U přeživších spermií to vede k obdobným změnám pozorovatelných při kapacitaci, čímž se zkracuje doba jejich přežitelnosti (Rodriguez-Martinez, 2003). Efekt kryokonzervace na funkci a životaschopnost spermií byl široce prostudován především u skotu. U některých spermatických organel je známo, že jsou negativně ovlivněny účinkem kryokonzervace. Indukce předčasné akrozomální reakce, pozměněná funkce mitochondrií, redukce motility a selhání dekondezace chromatinu mají vliv na vitalitu a oplození schopnost spermií (Lemma, 2011).

Úspěch kryokonzervace je ovlivněn několika faktory, jako jsou křivky mražení a kryoprotektiva. Těmto dvěma aspektům je přikládán největší důraz vzhledem k možným

fyzikálně-chemickým změnám, které mohou vést k různým stupňům poruch struktury spermií (Forero-Gonzales et al., 2012).

Použití mraženého spermatu v programech asistované reprodukce hospodářských zvířat má ve výsledku nižší procento oplození schopnosti, než ejakulát chlazený. Tento pokles účinnosti je pravděpodobně způsoben dvěma faktory, ztrátou vitality a poškození funkční schopnosti živých spermií. Změny v motilitě a struktuře spermatu se objevují náhodně v různých fázích mražení, nebo tání. Bylo prokázáno, že rychlé zchlazování semene vyvolává letální tlak na některé buňky a tento tlak je úměrný křivce mražení a teplotnímu intervalu. Tento proces se nazývá chladový šok a jeho průběh se u různých druhů samců liší (Michel et al., 2016).

Kryokonzervace zahrnuje několik úkonů: chlazení, ekvilibraci a mražení. Běžné protokoly mražení začínají chlazením na 4-5 °C následované několikahodinovou ekvilibrací (0 – 24 h) na této teplotě. Ekvilibrace umožňuje spermatu adaptaci na chladnější teploty, usnadňuje postup kryptoprotektiv přes buněčnou membránu (v případě penetrujících kryoprotektiv) a dovoluje pohybu vody ven z buněk, čímž snižuje jejich poškození ledovými krystalky vzniklými při mražení. Dolezalova et al. (2016) dodává i zlepšení integrity membrány a celkovou přežitelnost spermií.

Dle původních domněnek byla doba ekvilibrace důležitá při zajištění dostatečného času pro penetraci glycerolu skrz membránu (Murphy et al., 2017). Avšak Berndtson et Foote (1972) zjistili, že penetrace glycerolu do spermií je rychlá a netrvá více než 5 minut. Nyní tedy usuzují, že ekvilibrace slouží k adaptaci membrán na nižší teploty. Většina protokolů mražení býčího ejakulátu implikuje ekvilibraci okolo 4 hodin, nicméně mnoho studií poukazuje na použití široké škály časových intervalů v závislosti na motilitě a životnosti spermií. Michel et al. (2016) zkoumal význam 8 a 18 hodin, Leite (2010) 4-18 h, Murphy et al. (2017) 6-72 h, Fleisch et al. (2016) 4-96 h.

Nicméně většina autorů se shodla na tom, že prodloužení času ekvilibrace přímo úměrně nesouvisí s následnou fertilitou spermií použitých inseminačních dávek. Ačkoliv bylo prokázáno, že prodloužení doby ekvilibrace z 8 na 18 a ze 4 na 72, může mít za následek zvýšení kvality spermií a jejich vitality, není tento způsob zpracování inseminačních dávek většinou podporován. Mnoho inseminačních stanic musí totiž semeno zpracovat a zmrazit ten samý den, ve kterém bylo odebráno. Doba ekvilibrace je tímto zkrácena na 4-6 h (Murphy et al. 2017).

Tento autor zároveň upozornil na zjevné zlepšení vitality spermatu při ekvilibraci 24 h a doporučil vylepšit časový plán inseminačních stanic a využít tohoto faktu.

U ejakulátu býka autoři navrhuji použití postup pomalého mražení, tj. snižování teploty o 1 až 2 °C / min. v rozmezí teplot 5 °C a -15°C. A dále o 4 až 5 °C / min. od -15 °C do -79 °C. Nebo dalších z úspěšných protokolů mražení je postup o 15 °C / min. od +5 °C do -100 °C s následným transferem do tekutého dusíku (Forero-Gonzales et al., 2012). Leite et al. (2010) shledal optimální interval ekvilibrace 4-18 hodin na teplotě 5 °C před mražením na výslednou teplotu, a to pro pozitivní účinek na býčí ejakulát a maximalizaci oplození schopnosti spermií.

Kryoprotektivum, nebo ředidlo je chemické médium používané pro ochranu, prodloužení života schopnosti a zachování životních funkcí spermatických buněk, během chladového šoku, skladování a transportu při inseminaci. Dobrý kryoprotektant by měl poskytovat energii pro metabolické procesy, udržovat osmotický tlak pomocí solí (Amirat et al. 2005) a pH média. Dále kontrolovat kontaminaci média a chránit ejakulát před rozvojem mikrobů. Různá ředidla poskytují dostačující výživu pro spermatické buňky ve formě fruktózy. Zároveň je chrání před chladovým šokem během zmražení na -196 °C. Mimo to, proces ředění spermatu umožňuje dosáhnout poměrně vysokých procent zabřezávání s relativně malým množstvím spermií. Ředidla jsou jediným médiem, které je schopné využít reprodukčního potenciálu samců velice efektivně, a to téměř bez rizika přenosu pohlavních chorob (Rehman et al., 2013).

Běžná ředidla pro mražení ejakulátu většinou obsahují odstředěné mléko, vaječný žloutek a glycerol jako kryoprotektivní agens. Kromě těchto mohou obsahovat etylenglykol, dymetylformamid, nebo amidy celkově (Forero-Gonzales et al., 2012), tj. látky permeabilní a také nepermeabilní disacharidy jako sacharózu a trehalózu (Sieme et al. 2015). Komerčně vyráběnými ředidly jsou Triladyl®, BULLXcell®, Bovidyl® na bázi vaječného žloutku a AndroMed®, Bioxcell® na bázi sójových extraktů a lecitinu (Rehman et al., 2013).

V současné době stoupá zájem o alternativy namísto komerčně využívaných ředidel na bázi žloutku, vzhledem k vyššímu riziku přenosu exotických chorob skrze toto médium (Amirat et al. 2005; Šimoník et al. 2016). Vaječný žloutek také interferuje s hodnocením spermatu – mění kompozici ředidla (Beran a kol., 2012) a přítomnost některých částic v ředidle může snižovat oplození schopnost spermií (Holt, 2000). Sója obsahuje lecitin a frakci fosfolipidů, které mohou nahradit vysokomolekulární lipoproteiny a fosfolipidy žloutku a tím předcházet,

nebo zlepšovat poškození plazmatické membrány spermií objevující se při ředění, chlazení, nebo kryokonzervaci (Layek et al., 2016).

3.4 Vliv LDL cholesterolu na fertilitu

Cholesterol a triglyceridy se řadí mezi lipidy – látky ve vodě nerozpustné. Z tohoto důvodu musí být uvnitř buněk transportovány pomocí proteinů. Společně vytvářejí komplexní sloučeniny = lipoproteiny. Tyto sloučeniny se vyznačují jádrem obsahujícím estery cholesterolu a triglyceridy obalené volným cholesterolem. Dále jsou obklopeny fosfolipidy a apolipoproteiny. LDL (Low Density Lipoproteins) je skupina lipoproteinů o nízké hustotě, či jinak β -lipoproteinů vyskytujících se běžně v organismu. Vznikají z IDL (Intermediate Density Lipoproteins) a to jejich postupným rozpadem (Feingold et Grunfeld. 2015).

LDL byly již dříve izolovány a představeny jako kryoprotektivní součást vaječného žloutku (Amirat et al., 2005), (Murphy et al. 2018), V mnoha studiích se účinky LDL na výslednou motilitu býčího semene po rozmražení ukázaly jako kryoprotektivní (Amirat et al. 2004; Stádník a kol. 2015; Šimoník et al. 2016). Dále byly předvedeny lepší výsledky motility a progresivního pohybu při nahrazení žloutku osmiprocentním LDL. Při použití kryoprotektiva s LDL autor uvádí zlepšení motility spermií a integrity akrozomu a dokonce i zlepšení následného dělení zygoty při *in vitro* fertilizaci (Amirat et al., 2005). Šimoník et al. (2016) také potvrdil kryoprotektivní účinky ředidel na bázi sójového lecitinu. Zkoumal vliv adice 8, 6 a 4 % LDL do kryoprotektiv na bázi sóji. Všiml si efektu na kvalitativní parametry spermatu a na motilitu spermií bezprostředně po rozmražení a dvě hodiny poté. Jeho výsledky potvrdily zlepšení vitality i pohybových parametrů spermií, zejména u přidaných 8 % LDL. Zároveň upozornil na fakt, že nikdo se doposud nezabýval uchováváním samotného LDL, jenž může limitovat jeho praktické použití, následně dodal, že životnost LDL lze stabilizovat a prodloužit přidáním azidu sodného.

Murphy et al. (2018) dodává, že protekce spermatu přidavkem LDL funguje především na bázi zvýšení poměru cholesterolu a fosfolipidů, čímž zabraňuje ztrátě fosfolipidů z membrány a zvyšuje toleranci vůči ochlazení a snižuje poškození během tepelného šoku. Stádník a kol. (2015) uvedl, že skupina BSP (Phospholipid Binding Proteins), která se vyskytuje v semenné plazmě je škodlivá pro uchovávání spermatu, jelikož interaguje s LDL. Tato interakce zabraňuje efluxu lipidů ze spermatu a pozitivně ovlivňuje skladování v tekutém, či

mraženém stavu. Nicméně optimální časové a teplotní podmínky výše uvedené interakce nebyly dostatečně prozkoumány.

Kromě LDL může být využito vlivu CLC (Cholesterol Loaded Cyklodextrins), jenž uvádí Rajoriya et al. (2016). Byly zkoumány jeho účinky na bývolí sperma. Při inkubaci (těsně před mražením) spermií spolu s cyklodextriny, cyklickými oligosacharidy glukózy, které obsahují hydrofobní jádro schopné inkorporace cholesterolu, bylo objeveno větší procento vitálních a motilních buněk. Pozitivní vliv má CLC i při transportu cholesterolu k membránám spermií.

Efekt přídatku LDL k ředidlům na samotnou fertilitu po inseminaci mraženým spermatem byl sledován ve studii Amirat-Briand (2010) Ačkoliv se předpokládalo značné zvýšení fertility (jako tomu bylo u motility spermií po rozmražení), nebyla tato domněnka jednoznačně naplněna. Výsledky nepřinesly žádné signifikantní rozdíly při inseminaci dávkami s ředidlem a LDL a kontrolními dávkami s komerčním ředidlem Tris – 20 % vaječného žloutku.

Ve výsledku lze tedy říci, že přídatek LDL v inseminačních dávkách napomáhá ke zlepšení kvality a oplození schopnosti spermií a zároveň zajišťuje jejich lepší motilitu po rozmražení (Amirat et al., 2004; Šimoník et al., 2016).

4 Materiál a metodika

Od února 2015 do prosince 2016 probíhal v rámci České Zemědělské univerzity v Praze pokus, do kterého bylo zařazeno 18 farem s mléčnou produkcí. V těchto podnicích bylo k inseminaci vybráno 1024 dojnic plemen Holštýn, ČESTR, Red Holštýn a jejich kříženky. Nejvíce zvířat do výzkumu zařadilo Zemědělského Družstvo Dolní Újezd, ŠZP Lány – farma Ruda a ZAS Nivnice. Inseminace probíhala dle reprodukčního plánu jednotlivých farem, za pomoci inseminačních dávek vyráběných týmem z inseminační stanice Natural s.r.o. v Hradištku pod Medníkem a ČZU.

4.1 Charakteristika zúčastněných zemědělských podniků a jejich skotu

Kromě výše zmíněných podniků se pokusu účastnily farmy z celé oblasti Čech a Moravy. Tyto podniky trvale spolupracují s ČZU a každý v průměru poskytl okolo 40 dojnic pro výzkumné účely. Skladba plemen byla různorodá, avšak převažoval holštýnský skot. 870 holštýnských plemenic a jejich kříženek bylo vybráno pro pokus i kontrolní sledování. V případě českého strakatého skotu se jednalo o 149 plemenic včetně kříženek a pouze 3 plemenice byly stoprocentní Red Holštýn. V případě laktací se pokusu účastnilo 375 krav na první laktaci, 271 na druhé, 299 krav na třetí a další laktaci a 79 jalovic.

Tři podniky s největším počtem poskytnutých dojnic – zejména plemene Holštýn, vykazovaly v kontrolních letech průměrnou užitkovost 8969 kg mléka za laktaci (P1), 10109 kg (P2) a 10434 kg (P3) za laktaci. Průměrná užitkovost zbylých podniků byla 8404 kg mléka za laktaci. Průměrný počet dnů od porodu do inseminace, po které dojnice zabřezly, tedy servis perioda byla v případě podniku P1 207 dnů. Doba od porodu do první inseminace – inseminační interval v podniku P1 trval v průměru 135 dnů. SP u P2 byla 142 dnů a interval 79 dnů. P3 vykazoval SP 156 dnů a inseminační interval 75 dnů. U zbylých podniků byla SP 139 a interval 75 dnů. V porovnání s populací plemene Holštýn šlo v případě P1 spíše o farmu s podprůměrnou užitkovostí i reprodukci. Průměr populace v roce 2016 byl v případě užitkovosti 9744 kg mléka, 113 SP, interval 72 dní (ČMSCH, a.s.; 2017). V případě podniků P2 a P3 byla v kontrolním období užitkovost nad průměrem populace, avšak reprodukční ukazatele byly nad jejím průměrem, což vypovídá o nižší kvalitě reprodukčního managementu. Zbylé podniky byly celkově podprůměrné, a to jak v případě užitkovosti i při pohledu na hodnocení reprodukce.

4.2 Příprava inseminačních dávek

Zpracování a příprava inseminačních dávek použitých pro inseminaci dojnic v pokusu probíhala na inseminační stanici býků Natural s.r.o. Hradištko pod Medníkem a v laboratoři ČZU. Zpracování dávek probíhalo ve dvou technologických postupech, přičemž v prvním probíhal přidavek LDL k ředidlům a v druhém šlo především o zmrazování inseminačních dávek.

Ředění a zpracování ejakulátu

Ejakulát plemenných býků plemen Holštýn a ČESTR byl odebrán na inseminační stanici Natural s.r.o. (Hradištko pod Medníkem). Býci byli odebíráni pomocí umělé vagíny a sperma bylo zpracováváno dle uznaných postupů vždy v den odběru. Věk, systém ustájení, ošetřování a výživa býků byla téměř shodná a sperma býků bylo využíváno i pro komerční účely. Celkově bylo využito dávek 28 býků. Ejakulát splňující standardní vstupní podmínky k výrobě ID byl rovnoměrně rozdělen pomocí sterilní pipety na 6–12 částí. Ejakulát byl po odběru uložen v chladicím boxu (4 °C) po dobu cca 1 hodiny, při převozu na ČZU v Praze, kde probíhalo další zpracování.

V laboratoři ČZU byly vzorky spermatu rozděleny pomocí sterilní pipety do předem vychlazených zkumavek (4 °C). Každý vzorek byl následně naředěn na požadovanou koncentraci 50 000 spermií / ml. Požadovaný objem ředidel byl do zkumavek přenesen za pomoci sterilních stříkaček, zkumavky byly uzavřeny a jemně promíchány a umístěny do chladicího boxu o teplotě 4°C.

V druhém technologickém okruhu byl naředěný ejakulát po promísení naplněn do pejet (0,25 ml, IMV, L'Aigle, France), chlazen a ekvilibrován v chladicím boxu (4 °C) po dobu 30, 120 a 240 minut. Ejakulát byl poté mrazen v programovatelném mrazicím boxu (Digit Cool, IMV, L'Aigle, France). K mrazení byla využita standardně využívaná a výrobcem doporučená třífázová mrazicí křivka, kdy v první fázi teplota klesala z +4 °C na -10 °C rychlostí 5 °C/min, v následující fázi teplota klesala na -100 °C rychlostí 35 °C/min a v poslední fázi klesala na -140 °C rychlostí 20 °C/min. Po zmrazení byly dávky neprodleně přemístěny do kontejneru s tekutým dusíkem -196 °C.

Příprava ředidel

V procesu výroby inseminačních dávek byly použity různé varianty ředidel: první určené pro kontrolu, bez přídavku LDL a další pokusná, obohacená o přídavek LDL. Bylo využito komerčně vyráběných ředidel, běžně využívaných v praxi, jako např. AndroMed ®, Triladyl ® (obě z MiniTub GmbH, Tiefenbach, Německo) a Bioxcell ® (IMV, L' Aigle, Francie). Kontrolní varianty ředidel byly vyrobeny dle doporučených instrukcí stanovených výrobcem. Pokusné varianty obsahovaly přídavek 6 % LDL cholesterolu. Ředila byla vyrobena v den odběrů ejakulátu a byla skladována v chladícím boxu při teplotě 4°C. Vliv různých koncentrací LDL v určitých ředidlech inseminačních dávek byl vyhodnocen v práci Beranem et al. (2016).

4.3 Inseminace dojnic

Inseminační dávky byly převezeny na vybrané podniky v chladícím boxu s tekutým dusíkem. Následně byly použity pro inseminaci dojnic vybraných pro pokus a kontrolu. Plemenice byly vybrány náhodně, počet laktací ani užitkovost nebyly v rámci pokusu uniformní. Inseminaci prováděl akreditovaný inseminační technik, dle zavedených běžných postupů. Výsledky inseminace, tj. úroveň zabřezávání byla následně zpětnou vazbou z podniků seskupena a představena pro vyhodnocení.

Výsledky inseminace, tedy míra zabřezávání, byla hodnocena v interakci s délkou inseminačního intervalu a počtu dnů servis periody, jakožto reprodukčních ukazatelů poukazujících na celkový zdravotní stav stáda a ekonomičnost daného chovu. Dále byl sledován vztah mezi užitkovostí a úrovní zabřezávání. Tato vazba poskytuje možnost sledování závislosti produkční síly dojnic a následnou schopností, či neschopností plodit zdravé potomstvo. Svou roli ve vztahu k úrovni reprodukce hraje i pořadí laktace. Byly hodnoceny dojnice na 1. laktaci, 2. a 3. a další. Míra zabřezávání jalovic byla vyhodnocena zvlášť.

4.4 Statistické vyhodnocení

Následující kapitola obsahuje vyhodnocení pokusu pomocí statistického programu STATISTICA (Verze 12, TIBCO Software Inc. USA) a MICROSOFT EXCEL (Verze 2016, Microsoft © USA).

Kde:

P1 = Podnik č. 1

P2 = Podnik č. 2

P3 = Podnik č. 3

K= Kontrolní skupina

P = Pokusná skupina

Int. Spolehl, IS = Interval spolehlivosti

Sm.odch. = Směrodatná odchylka

SP = Servis perioda

Ii = Inseminační interval

α = hladina významnosti, chyba I. druhu

Samostatné statistické vzorce použité pro výpočet daných hodnocení jsou uvedeny u konkrétních tabulek, včetně vysvětlivek proměnných.

5 Výsledky

5.1 Popisné statistiky a přehledy pokusu a kontrolního měření

V první řadě jsou vyhodnoceny základní ukazatele užítkovosti a reprodukce Holštýnského mléčného skotu zapojeného do pokusu. Byla hodnocena mléčná užítkovost, servis perioda a inseminační interval. To vše v rámci vybraných podniků i celkové populace zvířat zahrnutých do tohoto výzkumu. V tabulkách i grafech je možné pozorovat výsledky kontrolní i pokusné skupiny.

V následující tabulce 5.1 jsou shrnuty základní statistické ukazatele pro konkrétní případ mléčné užítkovosti. A to jak kontrolního měření K, tak prováděného pokusu P. Užítkovost dojnic byla měřena vždy za normovanou laktaci v kilogramech. Naměřené hodnoty je možno vidět a porovnat v rámci podniků P1 až P3 a celkový přehled užítkovosti pro všechny plemenice zahrnuté do pokusu je také obsažen. Byl sledován aritmetický průměr, interval spolehlivosti

$\pm 96\%$ s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$, medián (prostřední hodnota souboru dat), minimum a maximum, rozptyl naměřených dat a směrodatná odchylka. Průměrná mléčná užítkovost Kontrolní skupiny byla 8907,901 kg a pokusné skupiny 8895,983kg mléka za laktaci. Nejvyšší průměrnou mléčnou užítkovost můžeme pozorovat u podniku P3 v pokusném stádě – 10618,18 kg mléka nadojeného za laktaci. Naopak nejhůře dopadlo pokusné stádo P1, jehož užítkovost byla 8955,25 kg mléka za laktaci. Celkově byla pozorována nižší průměrná mléčná užítkovost u pokusné skupiny dojnic oproti kontrolní skupině. Minimální nádoj v rámci celé populace krav v pokusu byl 1985 kg mléka a naproti tomu maximum mléka za laktaci bylo 13639 kg za laktaci. Obě tyto hodnoty byly naměřeny u kontrolní skupiny. Největší hodnotu rozptylu i směrodatné odchylky vykazuje pokusná skupina dojnic a to 2926187 v případě rozptylu a 1710,610 kg směrodatná odchylka. Minimální směrodatná odchylka byla změřena v případě podniku P1 v kontrolní skupině – a to 998,842 kg.

Tabulka 5.1: Souhrn popisných statistik mléčné užitkovosti dojnic kontrolní a pokusné skupiny vybraných podniků a celé populace krav zařazených v pokusu.

Popisné statistiky užitkovosti podniků

Proměnné	Průměr	Int. spolehl. (-96.000%)	Int. spolehl. (96.000%)	Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.
P1 K	8978.89	8828.23	9129.56	9086.50	6217.000	11785.00	997686	998.842
P2 K	10054.90	9623.01	10486.78	10064.00	7221.000	13457.00	2006540	1416.524
P3 K	10255.36	9786.63	10724.09	10411.00	6681.000	12890.00	1894579	1376.437
Celkem K	8907.901	8757.670	9058.132	9128.000	1985.000	13639.00	2789897	1670.298
P1 P	8955.25	8729.95	9180.54	8956.00	3973.000	11948.00	1581103	1257.419
P2 P	10167.52	9729.47	10605.57	10113.00	6578.000	12525.00	1882219	1371.940
P3 P	10618.18	10198.29	11038.08	10598.00	8396.000	13402.00	1478503	1215.937
Celkem P	8895.983	8733.828	9058.139	8992.000	3571.000	13402.00	2926186	1710.610

P1 K – P3 K značí kontrolní skupiny vybraných podniků, P1 P – P3 P pokusné skupiny a Celkem P a K pokusnou a kontrolní populaci krav v pokusu.

Interval spolehlivosti byl spočítán dle následujícího statistického vzorce:

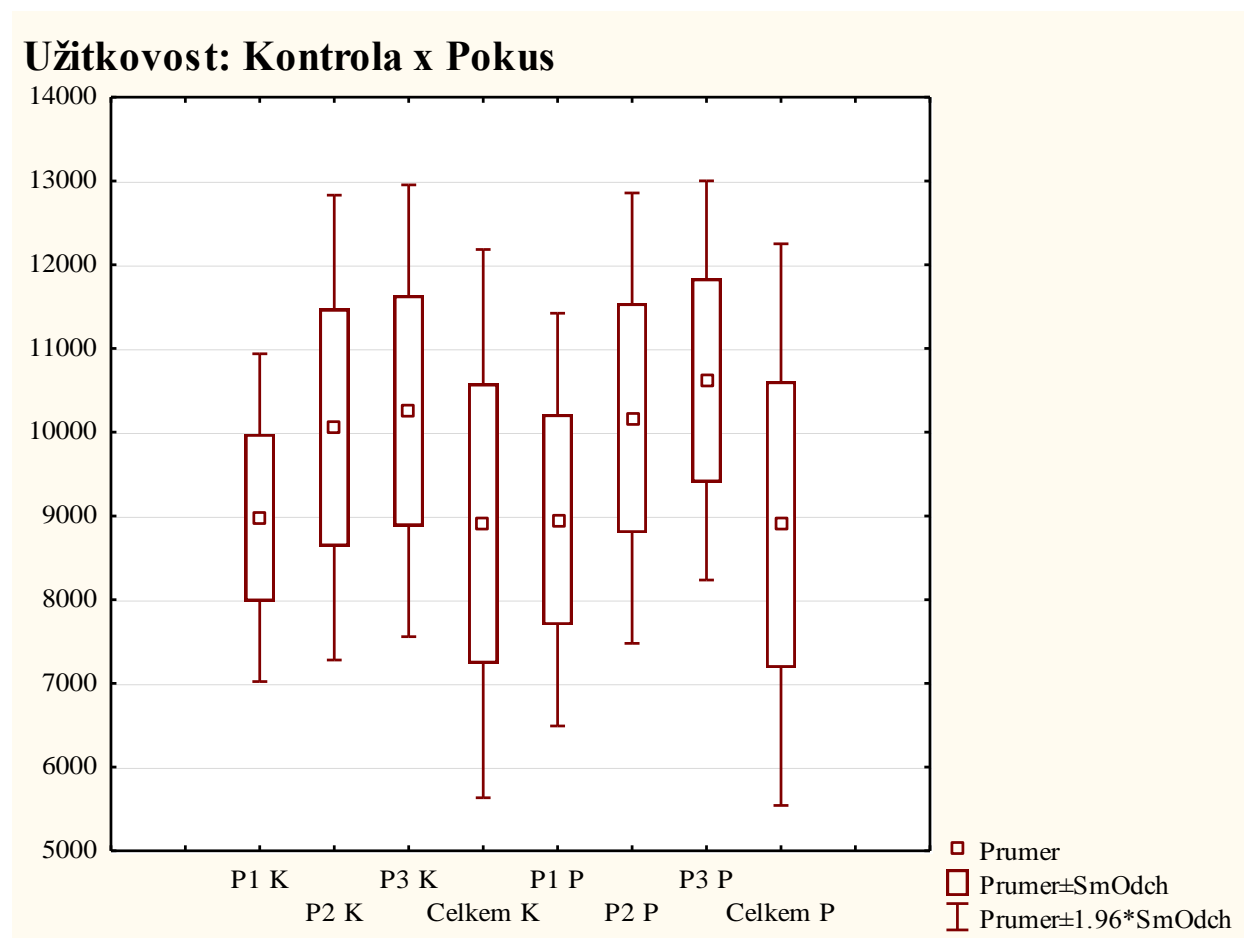
$$\bar{x} \pm z_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Vzorec 5.1: Výpočet intervalu spolehlivosti

Kde \bar{x} s čarou značí průměr vybraných hodnot, z = tabulková hodnota pro výpočet, $\alpha = 0,05$, n = počet hodnot, σ = směrodatná odchylka.

V návaznosti na výše uvedenou tabulku 5.1 následuje grafické zpracování v podobě krabicového grafu 5.1. V tomto grafu s měřítkem 5000-1400 kg mléka jsou zřetelné rozdíly mezi podniky a celkem mezi kontrolní a pokusnou skupinou. Jsou zde zobrazeny průměry mléčné užitkovosti, směrodatná odchylka od průměru a směrodatná odchylka od průměru s intervalem spolehlivosti $\pm 96\%$ a tedy $\alpha = 0,05$.

Graf 5.1: Krabicový graf mléčné užitkovosti dojníc kontrolní a pokusné skupiny vybraných podniků a celé populace krav zařazených v pokusu.



P1 K – P3 K značí kontrolní skupiny vybraných podniků, P1 P – P3 P pokusné skupiny a Celkem P a K pokusnou a kontrolní populaci krav v pokusu.

Tabulka 5.2 znázorňuje souhrn popisných statistik inseminačního intervalu. Je zahrnut aritmetický průměr, medián, minimální a maximální hodnoty, rozptyl, směrodatnou odchylku a interval spolehlivosti $\pm 96\%$, α je v tomto případě také rovna 0,05, jednotkami měření jsou dny. Průměrná doba inseminačního intervalu kontrolní skupiny byla 74,8 dnů. U pokusné skupiny byla tato doba lehce delší, a to 76,8 dnů. Nejkratší dobu od porodu do první inseminace uváděl podnik P3 v kontrolní skupině – 73,6 dnů. Minimální hodnota Ii 40 dnů byla naměřena v podniku P1, a to u kontrolní i pokusné skupiny dojníc. Naopak nejdelší doba byla vyhodnocena u podniku P1, opět v obou skupinách – 229 dnů do první inseminace post partum. Největší rozptyl hodnot byl pozorován u podniku P1 v pokusné skupině a nejmenší naměřená

hodnota rozptylu byla 329 dnů – u podniku P2 v kontrolní skupině. Tento podnik měl zároveň nejmenší směrodatnou odchylku - 18,1 dne. Nejvyšší hodnotu směrodatné odchylky měl opět podnik P1 v kontrolní skupině dojnic – 34 dnů.

Tabulka 5.2: Souhrn popisných statistik inseminačního intervalu dojnic kontrolní a pokusné skupiny vybraných podniků a celé populace krav zařazených v pokusu.

Popisné statistiky Inseminačního intervalu podniků

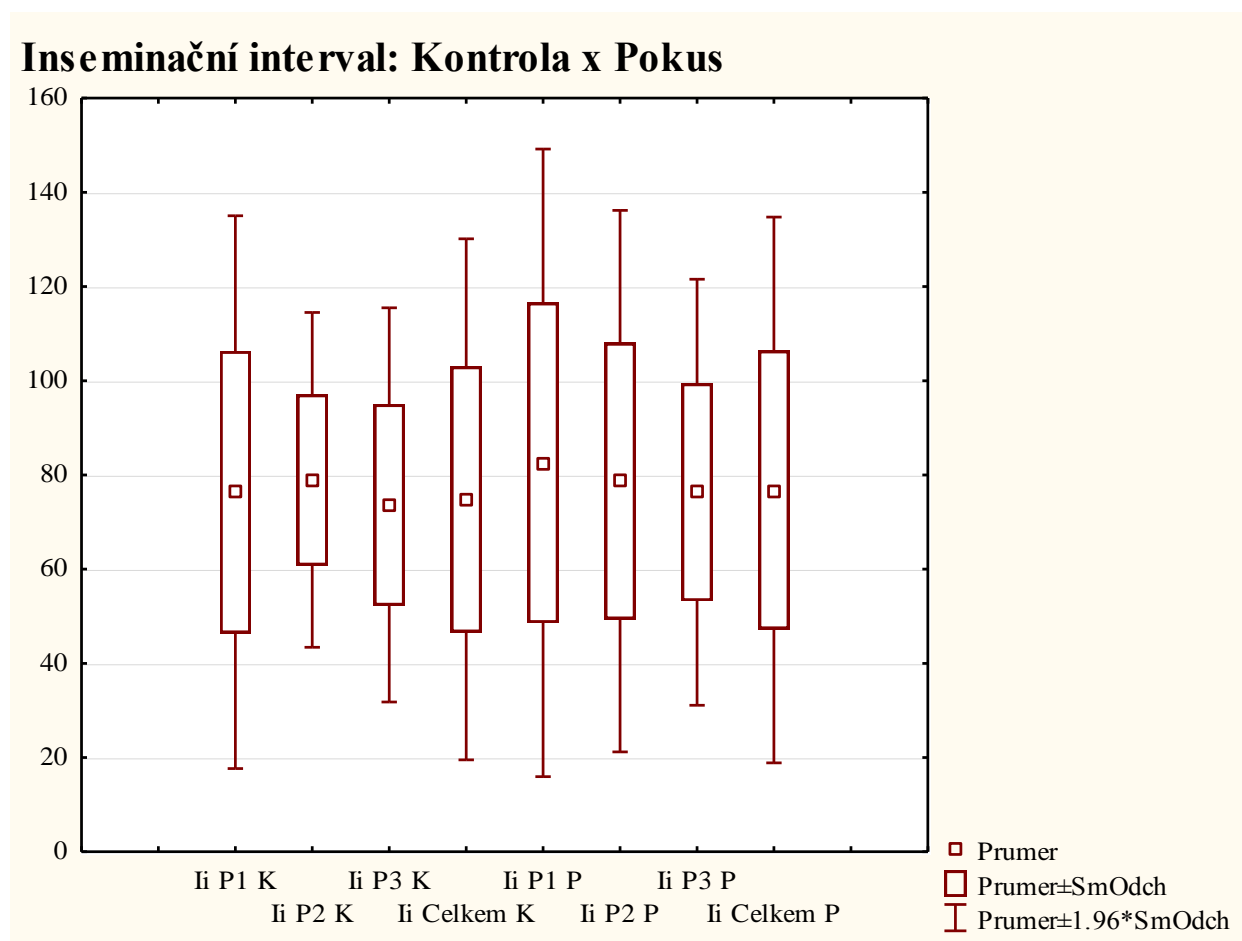
Proměnné	Průměr	Int. spolehl.		Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.
		(-96.000%)	(96.000%)					
Ii P1 K	76.3	71.8	80.9	69	40	229	897	29.9
Ii P2 K	78.9	72.7	85.2	72	54	124	329	18.1
Ii P3 K	73.6	66.0	81.2	73	37	106	456	21.4
Ii Celkem K	74.8	72.2	77.4	69	31	265	796	28.2
Ii P1 P	82.6	76.5	88.7	73	40	229	1155	34.0
Ii P2 P	78.7	66.2	91.2	68	49	195	860	29.3
Ii P3 P	76.3	68.2	84.4	79	37	130	533	23.1
Ii Celkem P	76.8	74.0	79.7	69	28	229	874	29.6

Ii P1 K – Ii P3 K značí délku (dny) inseminačního intervalu kontrolní skupiny vybraných podniků, Ii P1 P – Ii P3 P pokusné skupiny a Ii Celkem P a K pokusné a kontrolní populace krav v pokusu.

Interval spolehlivosti byl v tomto případě také spočítán dle vzorce 5.1.

V krabicovém grafu 5.2 je znázorněn grafický výstup z dat měření inseminačního intervalu. Měřítka grafu je znázorněno od 0 do 160, jednotkami jsou opět dny. Znovu je možné pozorovat směrodatné odchylky od průměru, průměr a odchylku od něj (s intervalem spolehlivosti 96 % a tedy $\alpha = 0,05$). Dále jsou v grafu rozlišeny kontrolní a pokusné skupiny vybraných podniků i celkového stavu dojnic v pozorování. Jak již bylo zmíněno výše, největší směrodatnou odchylku od průměru je možné sledovat u podniku P1 v kontrolní skupině a nejmenší u podniku P2.

Graf 5.2: Krabicový graf inseminačního intervalu dojníc kontrolní a pokusné skupiny vybraných podniků a celé populace krav zařazených v pokusu.



li P1 K – li P3 K značí délku (dny) inseminačního intervalu kontrolní skupiny vybraných podniků, li P1 P – li P3 P pokusné skupiny a li Celkem P a K pokusné a kontrolní populace krav v pokusu.

Tabulka 5.3 poukazuje na souhrn statistických ukazatelů v konkrétním případě délky servis periody u kontrolní skupiny zvířat, pokusné skupiny i celé populace dojníc, jež byly zařazeny do výzkumu. Opět byla sledována délka trvání doby od porodu do inseminace, v tomto případě do inseminace, po které dojnice opravdu zabřezly. Nejdelší servis periodu měl podnik P1 v pokusné skupině, hodnota dosahovala 212,4 dnů. Nicméně nejdelší servis perioda v celé populaci byla alarmujících 399 dní. Naopak nejkratší čas do zabřeznutí po porodu byl 40 dnů – toto číslo poukazuje na dojnici, která je ve výborné zdravotní kondici a nemá potíže se zabřeznutím. Největší rozptyl hodnot měla tentokrát kontrolní skupina – 5791 dnů, nejmenší pak podnik P3 – 4497. Průměrná směrodatná odchylka kontrolní skupiny byla 76,1 dnů a pokusné skupiny 74,7 dnů. Interval spolehlivosti byl opět vypočten pomocí vzorce 5.1, tedy $\pm 96\%$, $\alpha = 0,05$.

Tabulka 5.3: Souhrn popisných statistik servis periody dojnic kontrolní a pokusné skupiny vybraných podniků a celé populace dojnic zařazených v pokusu.

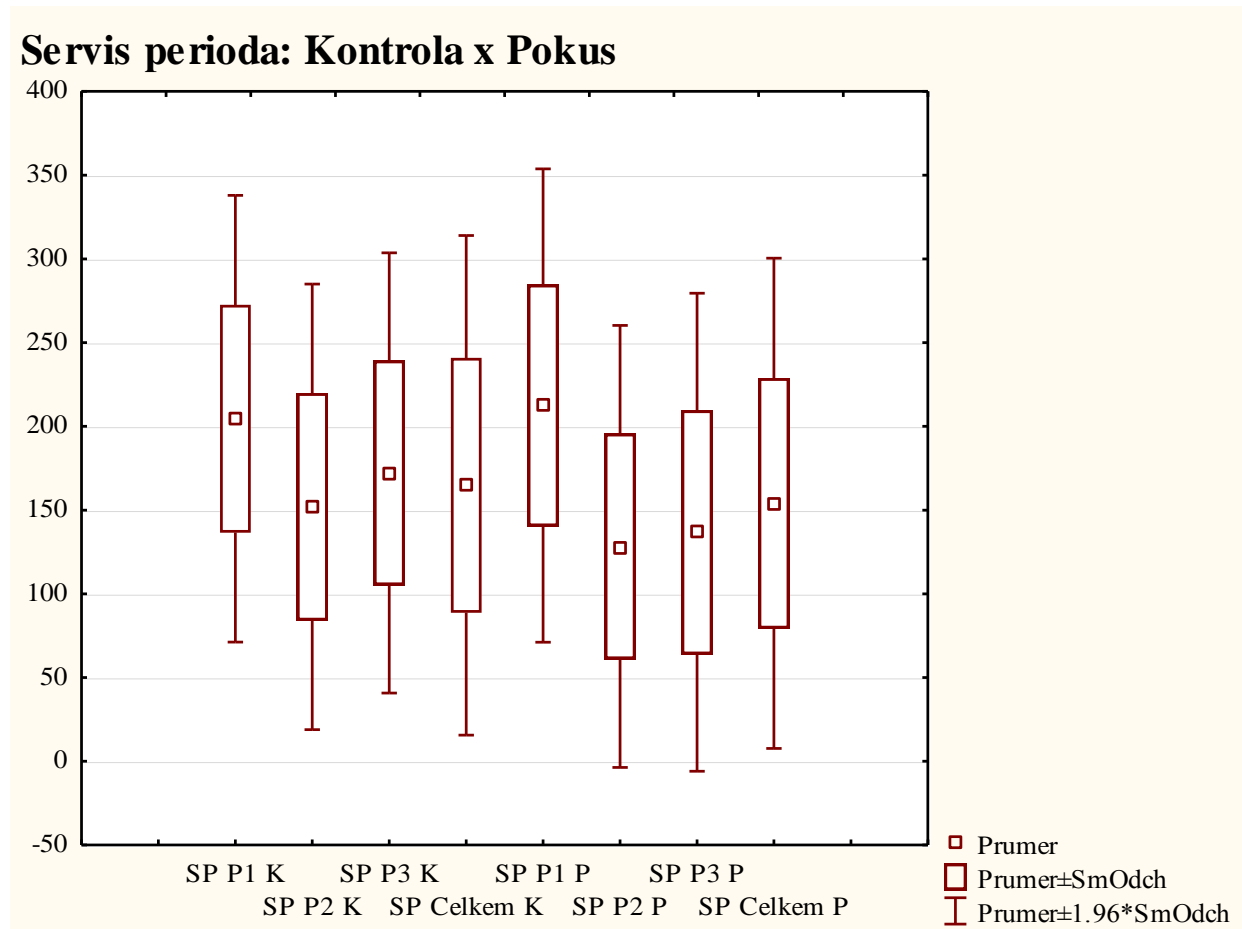
Popisné statistiky Servis periody podniků

Proměnné	Průměr	Int. spolehl. (-96.000%)	Int. spolehl. (96.000%)	Medián	Minimum	Maximum	Rozptyl	Sm.odch.
SP P1 K	204.5	192.8	216.3	204	53	346	4632	68.1
SP P2 K	151.9	128.5	175.4	130	62	283	4609	67.9
SP P3 K	172.2	146.8	197.6	168	45	289	4497	67.1
SP Celkem K	164.8	157.2	172.3	154	40	399	5791	76.1
SP P1 P	212.4	197.0	227.8	220	59	346	5199	72.1
SP P2 P	128.3	99.7	156.9	99	52	252	4532	67.3
SP P3 P	136.7	105.8	167.7	105	49	310	5303	72.8
SP Celkem P	154.0	146.1	162.0	141	43	346	5580	74.7

SP P1 K – SP P3 K značí délku (dny) servis periody kontrolní skupiny vybraných podniků, SP P1 P – i P3 P pokusné skupiny a SP Celkem P a K pokusné a kontrolní populace krav v pokusu.

Následující graf 5.3. navazuje na tabulku 5.3 a zobrazuje grafické rozdělení směrodatných odchylek od průměru, aritmetický průměr a směrodatných odchylek od něj s intervalem spolehlivosti 96 % a v tomto případě $\alpha = 0,05$. Měřítka hodnot je zobrazeno od -50 do 400 dnů. Z grafu je patrné, že největší odchylku od průměru vykazovala kontrolní skupina dojnic a podnik P1 v kontrolní skupině. Nejmenší odchylku měl naopak podnik P3, také v kontrolní skupině.

Graf 5.3: Krabicový graf servis periody dojníc kontrolní a pokusné skupiny vybraných podniků a celé populace krav zařazených v pokusu.



SP P1 K – SP P3 K značí délku (dny) servis periody kontrolní skupiny vybraných podniků, SP P1 P – li P3 P pokusné skupiny a SP Celkem P a K pokusné a kontrolní populace krav v pokusu.

Následující tabulka 5.4 obsahuje statistický souhrn informací a hodnot vypovídající o celkovém stavu podniků v kontrole i celé kontrolní skupiny. Jako proměnné jsou zde uvedeny užitkovost, počet procentuálního zastoupení dojníc v jednotlivých pořadí laktace (z celkového počtu dojníc v kontrolní skupině konkrétního podniku), servis perioda, inseminační interval a procento zabřezávání dojníc v jednotlivých podnicích i celkem mezi kontrolní a pokusnou skupinou. V tomto případě byla pro výpočet intervalu spolehlivosti použita hodnota $\alpha = 0,01$.

Největší procento dojníc na první laktaci měly podniky P1 a P2 a to 50 %, celkově bylo zastoupení dojníc na první laktaci nejpočetnější. Následně bylo nejvíce krav na třetí a další laktaci a poté až zastoupení dojníc na druhé laktaci, a to 28,9 %. Pro přehled jsou uvedeny míry zabřezávání po inseminaci. V kontrolní skupině nejlépe zabřezávaly dojnice v podniku P3.

Tabulka 5.4: Souhrn popisných statistik kontrolních skupin jednotlivých podniků a celé populace dojníc v kontrolní skupině pokusu.

Popisné statistiky podniků - Kontrola

Proměnné	P1	P2	P3	Celkem
Užitkovost	8979 ± 996.2 IS 187.1	10055 ± 1401.7 IS 521.1	10255 ± 1358.7 IS 560.4	8908 ± 1668.7 IS 187.78
1. laktace	50.0%	50.0%	41.0%	38.4%
2. laktace	27.7%	23.7%	10.3%	28.9%
3. a další laktace	22.3%	26.3%	48.7%	32.7%
SP	204.5 ± 67.8 IS 14.5	152 ± 67 IS 28	172.2 ± 66 IS 30.1	164.8 ± 76 IS 9.4
Interval	76.4 ± 29.9 IS 5.7	79 ± 17.9 IS 7.5	73.6 ± 21.1 IS 9	74.8 ± 28.2 IS 3.2
Zabřezlých	30.319%	33.333%	38.462%	37.008%

P1 – P3 značí vybrané podniky, Celkem = shrnutí populace dojníc v pokusu. 1., 2. a 3. a další laktace ukazuje procento dojníc z celé skupiny zúčastněných krav v podnicích na daných laktacích. SP = servis perioda a Interval jsou uvedeny ve dnech.

Tabulka 5.5 zobrazuje statistický souhrn veličin pro podniky v pokusné skupině a celkové výsledky pokusné skupiny dojníc. I v tomto případě je možné sledovat hodnoty proměnných. Konkrétně mléčné užitkovosti, zastoupení dojníc v pořadí laktací, inseminační interval, servis periodu a hodnocení zabřezávání po přidavku LDL cholesterolu k ředidlům inseminačních dávek.

Průměrná užitkovost pokusné skupiny byla nižší než ve skupině kontrolní, přesně 8896 kg mléka za laktaci. Shodná situace s kontrolní skupinou nastává se zastoupením plemenic na první laktaci – i zde je jejich počet z celkového počtu zvířat nejvyšší, v případě podniku P1 šlo o 51,5 % dojníc. Poté následuje počet dojníc na 3. a další laktaci a nejméně plemenic v pokusu bylo na 2. laktaci (28,3 %). Reprodukční ukazatele se neshodovaly s kontrolní skupinou. SP byla kratší a inseminační interval mírně delší. Míra zabřezávání byla ve všech případech kromě podniku P1 po přidavku LDL cholesterolu vyšší.

Tabulka 5.5: Souhrn popisných statistik pokusných skupin jednotlivých podniků a celé populace dojníc v pokusu.

Popisné statistiky podniků - Pokus

Proměnné	P1	P2	P3	Celkem
Užitkovost	8955 ± 1252.7 IS 278.75	10168 ± 1356.3 IS 526.7	10618 ± 1199.8 IS 501.4	8896 ± 1708.8 IS 202.6
1. laktace	51.5%	26.9%	39.5%	40.6%
2. laktace	22.4%	38.5%	18.4%	28.3%
3. a další laktace	26.1%	34.6%	42.1%	31.1%
SP	212.4 ± 71.7 IS 18.9	128.3 ± 66 IS 33.3	136.7 ± 71.4 IS 36,1	154 ± 74.6 IS 9.9
Interval	82.57 ± 33.9 IS 7.6	78.69 ± 28.8 IS 15.5	76.32 ± 22.8 IS 9.6	76.81 ± 29.6 IS 3.6
Zabřezlých	26.119%	77.358%	44.737%	43.699%

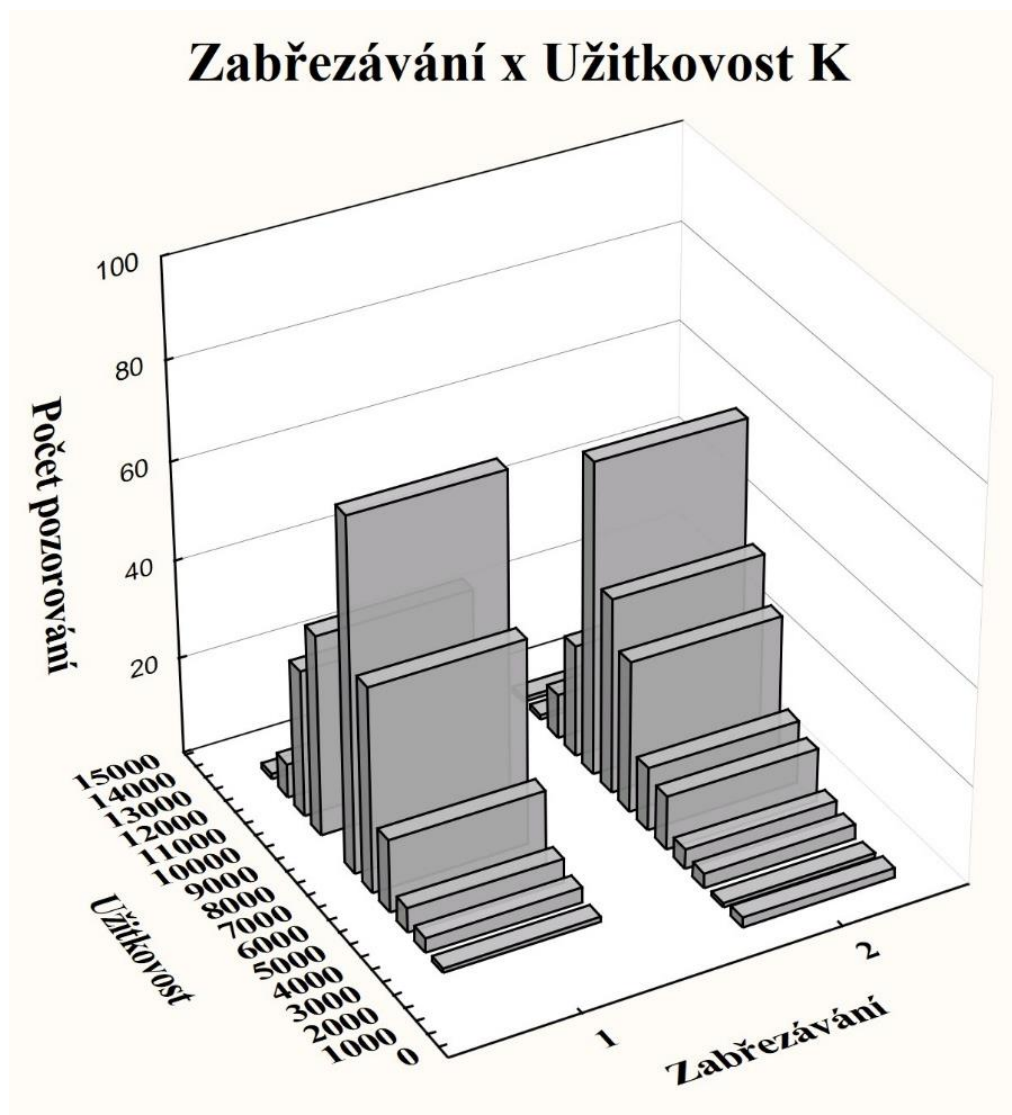
P1 – P3 značí vybrané podniky, Celkem = shrnutí populace dojníc v pokusu. 1., 2. a 3. a další laktace ukazuje procento dojníc z celé skupiny zúčastněných krav v podnicích na daných laktacích. SP = servis perioda a Interval jsou uvedeny ve dnech.

5.2 Korelace mléčné užitkovosti a zabřezávání plemenic

Kapitola obsahuje popis závislosti mezi úrovní užitkovostí dojníc a jejich reprodukční schopností, v tomto případě schopností zabřezávání po inseminaci. V grafu 5.4 a 5.5 je vyobrazena korelace užitkovosti – osa *y* a zabřezávání – osa *x*. Na ose *z* je znázorněn počet pozorování. V rámci osy *x* jsou pod číslem 2 označeny dojnice březí a pod číslem 1 dojnice, jež po inseminaci nezabřezly (jalové).

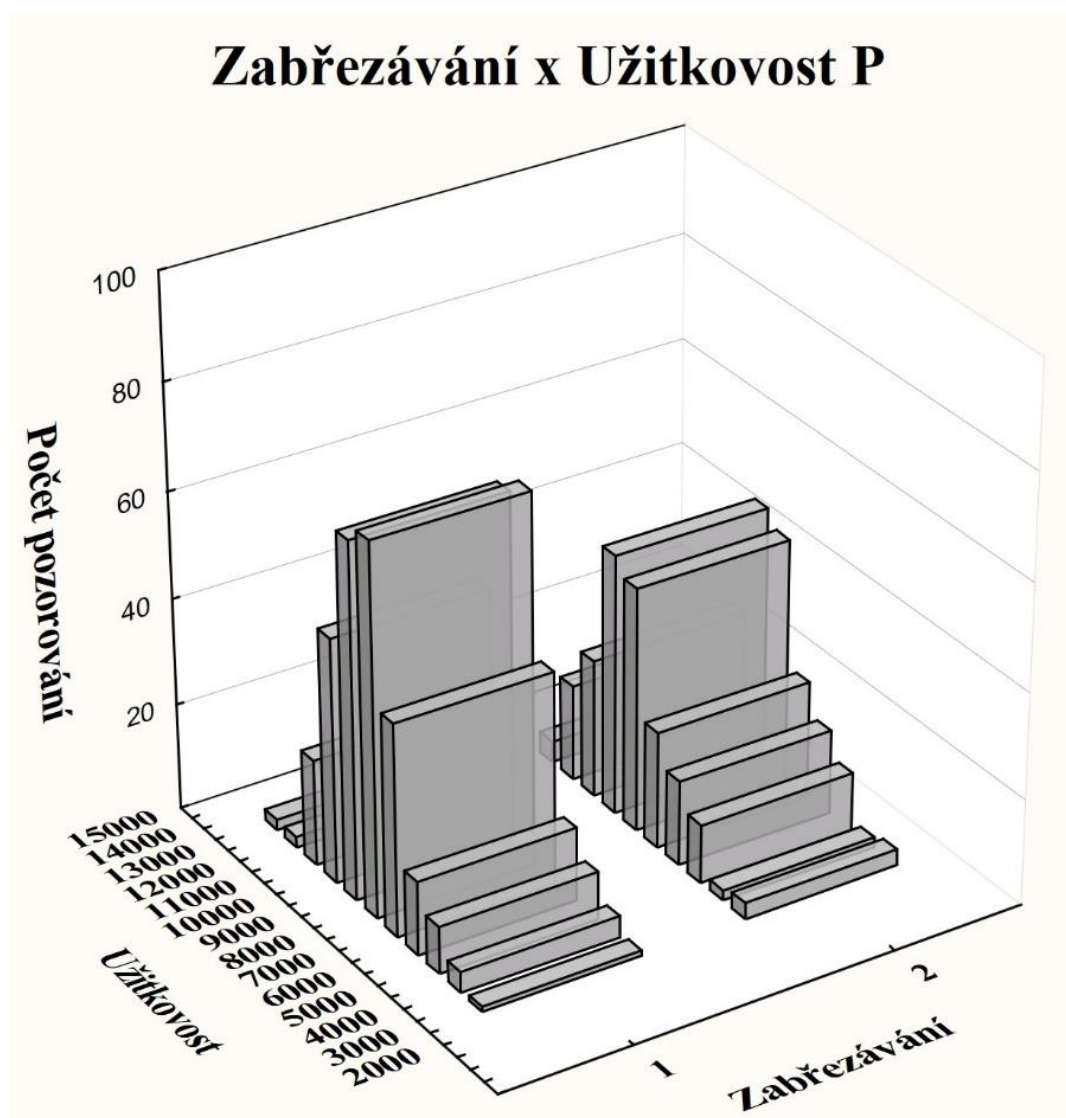
Graf 5.4 představuje kontrolní skupinu dojníc. Z obou grafů je patrné, že dojnice s nižší užitkovostí zabřezaly lépe. Tento fakt souvisí s metabolickým stavem dojníc. Výdej energie na zvýšenou užitkovost připadá na úkor nižší reprodukční schopnosti a následného zabřezávání. Tato korelace je aplikovatelná i v opačné situaci, kdy je pozorováno zvýšené procento zabřezávání, ale úroveň mléčné užitkovosti klesá. V případě grafu 5.5, tedy pokusné skupiny dojníc, je tento rozdíl výrazně znatelnější.

Graf 5.4: 3 D graf korelace zabřezávání a užitkovosti



Měřítko užitkovosti je uvedeno v kg. Zabřezávání dojníc zančí 1 = jalová, 2 = březí v kontrolní skupině K.

Graf 5.5: 3 D graf korelace zabřezávání a užitkovosti

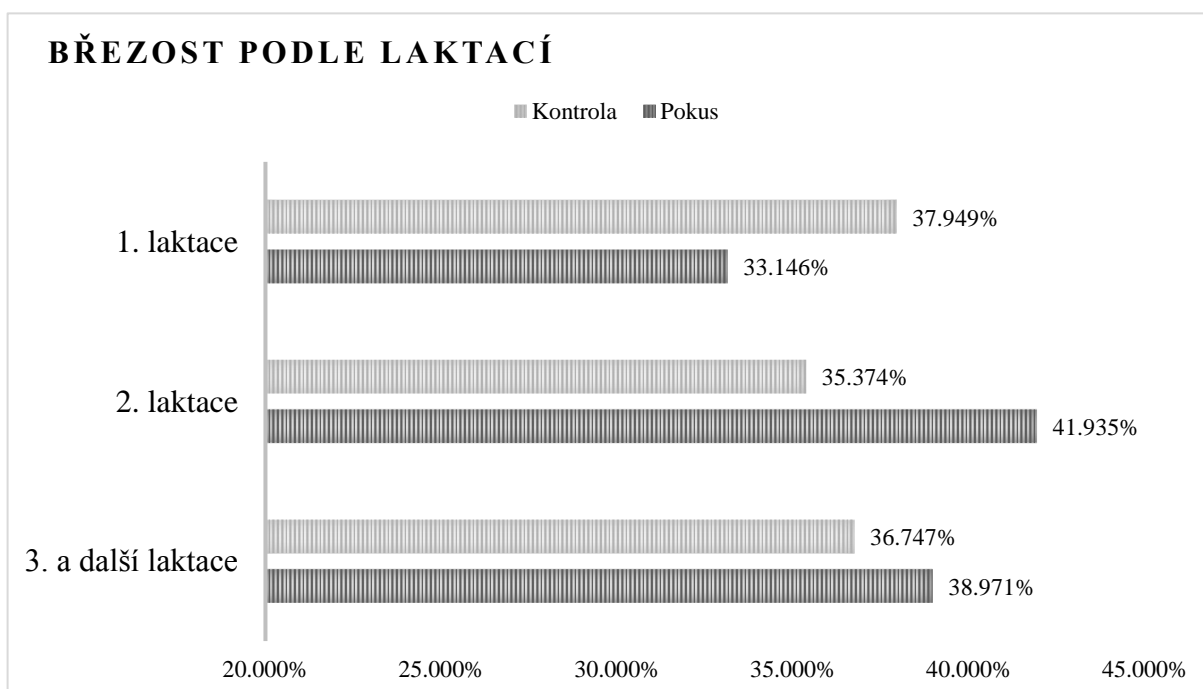


Měřitko užitkovosti je uvedeno v kg. Zabřezávání dojníc zančí 1 = jalová, 2 = březí v pokusné skupině P.

5.3 Vyhodnocení zabřezávání dojnic

V následujících grafech je znázorněno vyhodnocení míry zabřezávání v rámci kontrolní skupiny a dojnic zařazených pokusu. V první řadě je hodnoceno zabřezávání v souvislosti s pořadím laktace, následuje samostatné vyhodnocení zabřezávání jalovic a na závěr této kapitoly je představeno celkové vyhodnocení zabřezávání vybraných podniků i celého výzkumu zaměřeného na efekt přidavku LDL cholesterolu do ředidel inseminačních dávek.

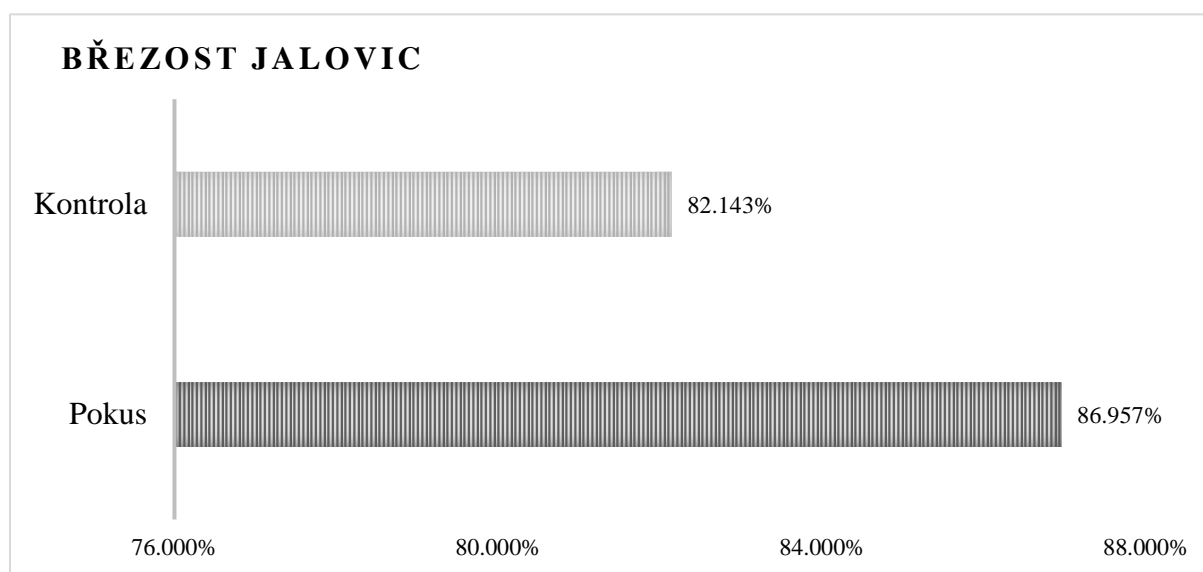
Graf 5.6: Znázornění míry zabřezávání dojnic podle pořadí laktace.



Z grafu 5.6 je patrné, že procento zabřezávání dojnic podle laktací v kontrolní skupině se pohybovalo od 35,374 % do 37,949 %. Nejlépe zabřezávaly plemence na první laktaci. Naproti tomu nejnižší procento zabřezávání bylo pozorováno u dojnic na druhé laktaci.

V pokusné skupině dojnic inseminovaných dávkami obohacenými o LDL cholesterol s míra březosti pohybovala mezi 33,146 % a 41,935 %. Nejvyšší procento březosti překvapivě vykazovaly dojnice na druhé laktaci. Největší rozdíl v zabřezávání mezi pokusnou a kontrolní skupinou byl také zaznamenán u dojnic na druhé laktaci, a to 6,561 %. U krav na první laktaci bohužel nebyl prokázán pozitivní efekt LDL cholesterolu.

Graf 5.7: Znárodnění míry zabřezávání jalovic.

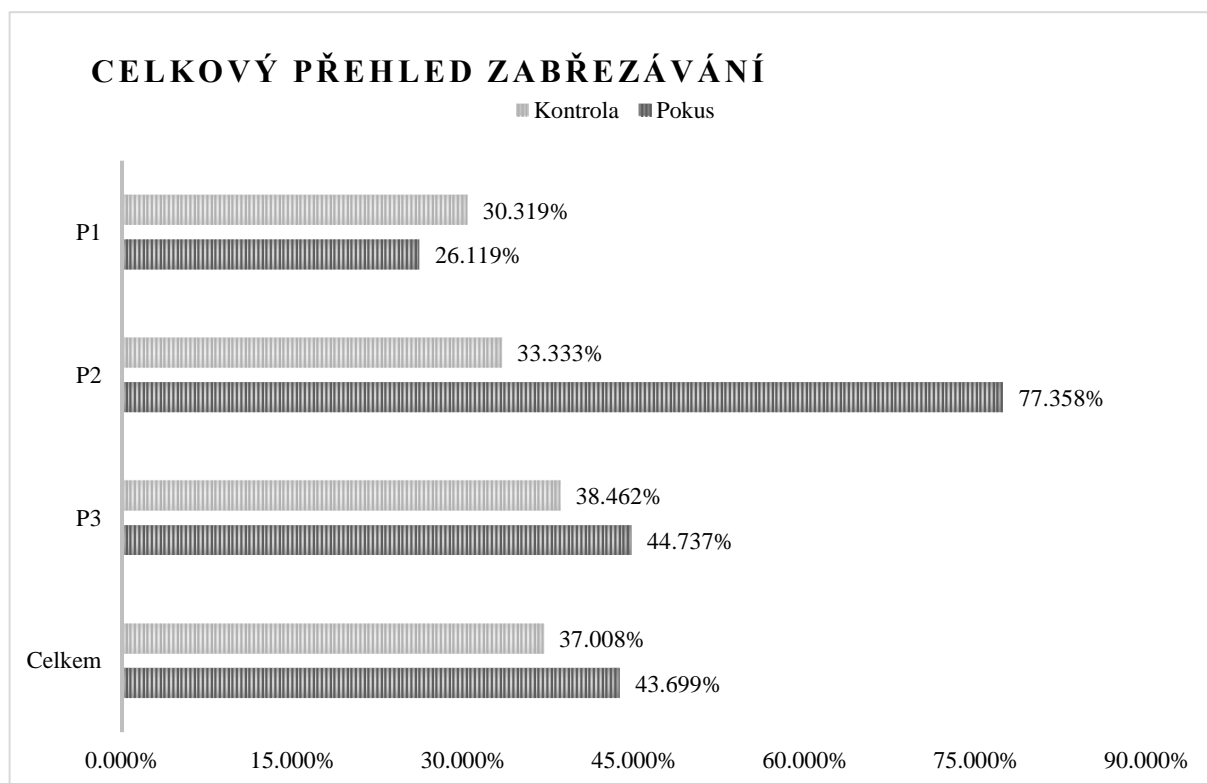


V případě grafu 5.7 je možné pozorovat míru zabřezávání jalovic. Je patrné že přidavek LDL cholesterolu do inseminačních dávek měl pozitivní vliv na procento březosti. Z celé kontrolní i pokusné skupiny dojníc mají jalovice nejvyšší procento zabřezávání po inseminaci, a to 82, 143 % v kontrole a 86,957 % v pokusu. Procentuální rozdíl tedy činí 4, 814 %. Jalovice mají vysokou reprodukční schopnost, jelikož jejich metabolismus není nucen vynaložit energii na vlastní užítkovost.

Graf 5.8 zobrazuje celkový výsledek pokusu. Je porovnána míra zabřezávání kontrolní skupiny a dojníc v pokusu, a to jak v rámci vybraných podniků P1 až P3, tak i celková míra zabřezávání po inseminaci s a bez přidaného LDL cholesterolu. Míra březosti kontrolní skupin podniků se pohybovala od 30,319 % do 38,462 %. Celkově bylo procento březosti v kontrole stanoveno na 37,008 %. Pokusná skupina podniků vykazovala míru zabřezávání mezi 26,119 % a 77,358 %. Největší rozdíl mezi skupinami byl zaznamenán v případě podniku P2, a to zejména z důvodu vysokého počtu jalovic zařazených do sledování. Tento rozdíl činí 44,025 %. Hypotéza pokusu se bohužel nepodařila prokázat v případě podniku P1, kde byla míra zabřezávání nižší než v kontrolní skupině. Procento březosti všech dojníc po inseminaci obohacenými dávkami bylo vyhodnoceno na 43,699 %.

Ve výsledku lze tedy říci, že byl prokázán pozitivní efekt LDL cholesterolu na míru zabřezávání dojníc. Rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou plemenic činil 6,691 % a to ve směru zlepšení úrovně zabřezávání dojníc.

Graf 5.8: Znáznornění celkového přehledu úrovně zabřezávání dojnic kontrolní a pokusné skupiny.



P1 – P3 značí vybrané podniky, Celkem = shrnutí populace dojnic v pokusu.

6 Diskuze

Sledovaná populace plemenic Holštýnského skotu, ČESTR, Red Holštýn a jejich kříženek byla hodnocena v rámci mléčné užitkovosti, reprodukčních ukazatelů a úrovně zabřezávání po inseminaci dávkami obohacenými o LDL cholesterol. Jejich zastoupení se lišilo v rámci podniků P1, P2 a P3 i celé sledované skupiny. Rozdílné bylo i procentuální zastoupení dojnic v pořadí laktací a jalovic. Podniky P1 a P3 žádné jalovice do výzkumu nezahrnuly. V porovnání s průměrem populace dojnic zařazených do sledování kontroly užitkovosti byly skupiny sledovaných plemenic pod jejím průměrem. Kontrolní skupina vykazovala průměrnou užitkovost 8908 kg a pokusná skupina 8896 kg mléka za laktaci. Dle Asociace chovatelů Holštýnského skotu v ČR a jejích výsledků kontroly užitkovosti podle plemen za kontrolní rok 2016/2017 byly pro Holštýnský skot publikovány hodnoty průměrné užitkovosti 9875 kg mléka za laktaci. Teoretický vliv nižší užitkovosti na výslednou hodnotu užitkovosti celého stáda dojnic zařazeného do výzkumu mohlo mít plemeno ČESTR, jehož průměrná hodnota užitkovosti za kontrolní rok 2016/2017 byla 7307 kg mléka za laktaci.

Při pohledu na hodnocení reprodukčních ukazatelů byla sledována délka servis periody a inseminačního intervalu. Hodnoty obou těchto ukazatelů jsou jedním z nejdůležitějších aspektů při hodnocení celkové reprodukční schopnosti stáda a mají vliv i na ekonomickou efektivitu chovu mléčného skotu.

V případě podniku P1 dosahovala délka servis periody v průměru od 204,5 dnů u kontrolní skupiny dojnic až do 212,4 dnů u pokusné skupiny. Tato hodnota značí o neefektivním a nesprávném managementu reprodukce podniku, jelikož průměr populace v roce 2016 byl dle ročenky ČMSCH, a.s. 116,6 dnů. Inseminační interval populace za rok 2016 byl 74,2 dnů. V případě našeho podniku je tato hodnota téměř dvojnásobná (135 dnů). Tento stav se odrazil i na hodnocení míry zabřezávání dojnic na této farmě, které je diskutováno níže.

U podniků P2 a P3 byly reprodukční ukazatele na znatelně lepší úrovni než u předchozího podniku. P2 s užitkovostí 10109 kg mléka za laktaci vykazovala SP 142 dnů a inseminační interval 79 dnů. V tomto případě může být podnik hodnocen jako jedna z lépe prosperujících farem v ČR. u podniku P3 může být vyzdvihnuta délka inseminačního intervalu kontrolní skupiny dojnic, jelikož je dokonce pod průměrem populace a to 73,6 dne. Ovšem délka servis periody již není tak převratná, neboť činila 156 dnů. Tento fakt značí potencionální potíže s

rannou embryonální mortalitou, jelikož rozdíl mezi inseminacním intervalem a servis periodou poukazuje na dobu, ve které dojnice nezabřezla první inseminaci, nebo zmetala.

Korelace mezi užítkovostí a reprodukční schopností byla sledována i v této práci a jejím výsledkem bylo prokázáno, že čím vyšší je mléčná užítkovost dojnic, tím menší je kvalita reprodukce a tím i následné zabřezávání. Ke stejným výsledkům došel i Stádník a kol. (2006)

V rámci vyhodnocení zabřezávání dojnic po inseminaci dávkami obohacenými o LDL cholesterol – v našem případě 6 % byly sledovány opět podniky P1 až P3 a také celková populace dojnic zařazených do tohoto výzkumu. Nejvyšší průměrná hodnota míry zabřezávání byla pozorována u jalovic, jejichž vysoké zastoupení v pokusné skupině podniku P2 výrazně zvedlo procento výsledku zabřezávání, a to až na 77,358 %. Jak už bylo zmíněno výše, míra zabřezávání pokusné skupiny plemenic podniku P1 byla velice nízká – pouze 26,119 %.

Ve srovnání s výsledky ČMSCH, a.s. za rok 2016, kde byla průměrná hodnota procenta březosti po první inseminaci u Holštýnských dojnic 44,1 % a ČESTR 50,7 % byly podniky P2 a P3 po inseminaci s dávkami obohacenými o LDL cholesterol nad průměrem populace. Hodnoty dosahovaly 44,7 % a 77,358 %. Celková míra zabřezávání pokusné skupiny (s přídatkem 6 % LDL) oproti kontrolní se zlepšila o 6,691 %. Finální procento březích krav bylo lehce pod průměrem populace a to 43,699 %. Tento výsledek je v souladu s následujícími studii a bude finálně porovnán.

Cílem studie Berana et al. (2013), bylo zjistit nejlepší vhodnou koncentraci přídatku LDL cholesterolu. V tomto případě byla využita komerčně vyráběná ředidla Bioxcell® a AndroMed® s přídatkem LDL 4 %, 6 % a 8 %, poté ředidlo Triladyl® s 6 %, 8 % a 10 % LDL. Kontrolní varianty byly vyrobeny bez přídatku LDL. Nejvyšší průměrné hodnoty procentuálního podílu živých spermií vykazovala na začátku tepelného testu přežitelnosti ředidla Bioxcell® a AndroMed® (71,88 %; 71,65%). Po 120 minutách inkubace byla nejvyšší průměrná míra živých spermií zaznamenána u ředidla AndroMed® (54,25 %), současně i pokles v průběhu celé doby trvání testu byl nejnižší. Nejvyšší podíl živých spermií na začátku testu byl vyhodnocen u 8 % přídatku LDL do stejného ředidla (72,18 %). Naopak nejnižší hodnoty podílu živých spermií na začátku testu byly vyhodnoceny ve variantách bez přídatku LDL (69,87 %). Zároveň bylo dosaženo i nejnižšího poklesu podílu živých spermií v průběhu testu (20,12 %). Na základě zjištěných výsledků byla doporučena ředidla AndroMed® a Bioxcell® a přídatvek LDL pro lepší efekt na rezistenci spermií vůči chladovému šoku. Přesná

koncentrace nejvhodnějšího obohacení LDL však nebyla dostatečně statisticky prokázána, a proto bylo třeba dalšího výzkumu.

Stádník et al. (2015) publikoval výsledky odolnosti spermií vůči chladovému šoku v průběhu krátkodobého chladového testu (0 °C) trvajících 10 minut po výrobě vzorků z čerstvého ejakulátu býků. Následně byl podíl živých spermií zaznamenán po zahřátí vzorku a 120 minutách doby trvání tepelného testu přežitelnosti. Použité vzorky byly vyrobeny ředěním spermatu ředidly Bioxcell®, AndroMed®, Triladyl®. Zároveň byly vyrobeny stejné varianty a ke každému z nich byla přidána frakce vaječného žloutku LDL cholesterol o různých koncentracích 4–10 %. Nejvyšší podíl živých spermií byl zaznamenán na začátku testu u ředidel Bioxcell® (71,46 %) a AndroMed® (71,22 %). Nejmenší podíl živých spermií byl zaznamenán u ředidla Triladyl® (69,46 %). Nejvyšších hodnot podílu živých spermií po 2 hodinové inkubaci bylo dosaženo u ředidla AndroMed®, u kterého byl také současně zaznamenán nejnižší pokles podílu živých spermií v průběhu inkubace. Pozitivní vliv LDL na odolnost spermií vůči chladovému šoku se projevil v celkovém průměrném poklesu podílu živých spermií v průběhu tepelného testu přežitelnosti, kdy byl pokles hodnot nižší při přidavku LDL do ředidel o 2,42 %.

V případě sledování přežitelnosti spermií Berana et al, (2016) bylo statisticky prokázáno, že vedle paternálního efektu býků na přežitelnost spermií má vliv i přídavek LDL cholesterolu. Byla porovnáována motilita spermií po rozmrazení inseminačních dávek a následně hodnocena jejich schopnost přežití po 2 hodinách. Rozptyl hodnot paternálního efektu se pohyboval od 9 do 26 % ve směru pozitivního efektu na přežitelnost u 4 různých býků.

V případě hodnocení vlivu LDL na resistenci spermií vůči chladovému šoku Beran et al (2016) prokázal největší pozitivní dopad u typu ředidla obohaceného o 6 % LDL, stejně jako je tomu v této práci. Stejných výsledků dosáhl i při hodnocení spermatu po dvou hodinách od rozmrazení, tehdy měl také nejvyšší naměřené hodnoty vzorek s 6 % LDL. Je zajímavé, že v případě vyšší koncentrace LDL v ředidlech inseminačních dávek nebyl pozitivní vliv na přežitelnost a odolnost vůči chladovému šoku prokázán.

Již dříve byl zkoumán vliv extrahovaného LDL cholesterolu z vaječného žloutku v různých ředidlech inseminačních dávek (Vera-Munoz et al., 2009) a v různých koncentracích (Moussa et al. 2002) potvrzen teplotními testy přežitelnosti a kryokonzervací. V případě posuzování přežitelnosti chladového šoku byla tato studie publikována jako jedna z prvních. V případě Antona et al. (2003) a Šimoníka et al. (2016) byly prokázány pozitivní

kryokonzervační účinky vaječného žloutku, a to z důvodu kde látky obsažené ve vaječném žloutku zlepšují reakci lipidů a vody extracelulárním prostředí a podporují tím stabilizaci membrány a její následnou odolnost vůči chladovému šoku při kryokonzervaci.

Je známo, že vaječný žloutek obsahuje mnoho fosfolipidů. Nejvíce zastoupenou složkou je LDL cholesterol, který zajišťuje kryoprotekci spermií během zmrazení nebo rozmrazování zvýšením stability plazmatické membrány (Moussa et al., 2002). Watson (1995) uvedl a testoval jak účinek tepla, tak i chladu nap přežití spermií. Chantler a kol. (2000) potvrdil ztrátu motility spermatu, v případě že kryoprotektivní látky (např. vaječný žloutek) nebyly přidány k ejakulátu. Odolnost spermií v korelaci s přidavkem vaječného žloutku vůči chladovému šok byla zkoumána také u kanců a bizonů (Singh et al., 2012). Pozitivní výsledky jsou v těchto případech připisovány složení vaječného žloutku, jakožto přirozeného zdroje LDL cholesterolu (Hu a kol., 2006).

V případě hodnocení vlivu ekvibrace na lepší motilitu spermií a integritu plazmatické membrány byl efekt ředidel obohacených o LDL cholesterol prokázán hlavně u ekvibrace trvající dvě hodiny. Vera-Munoz et al. (2011) tento fakt ve své práci také potvrdil. Zároveň uvedl pozitivní vliv 8denní doby inkubace a podobně Amirat et al. (2005) zjistil nejmenší poškození spermií obohacených o LDL v případě 4 hodin inkubace.

Na základě výsledků Berana et al (2016) můžeme říci, že vzorky ředidel AndroMed® a Bioxcell® obohacené LDL dosahovali vyváženého nebo vyššího přežití spermií ve srovnání s kontrolními vzorky. Ředidlo Triladyl® obsahovalo 20 % vaječného žloutku a dosahovalo vyšší úroveň přežití spermií během testu, než přidavek 10 % LDL cholesterolu jako náhražky vaječného žloutku. Současně se Bioxcell® s přidavkem 6 % LDL jevil jako nejlepší varianta ředidla pro zajištění rezistence spermií vůči chladovému šoku. V případě tohoto ředidla byly naměřeny nejvyšší hodnoty živých spermií na počátku (69,17%) a po 2 hodinách inkubace (52,94%) ve srovnání s ředidly Triladyl® a AndroMed®. Kombinace Bioxcell® s koncentrací 6 % LDL byla tedy považována za nejvhodnější pro přežitelnost spermií díky nejnižším poklesům motility ve srovnání s jinými experimentálními variantami ředidel.

Ve studii Doležalové et al. (2016) byl testován vliv přidavku LDL do různých typů ředidel v rámci odolnosti spermií vůči chladovému šoku. V tomto případě byla použita ředidla AndroMed® a Bioxcell® bez a s 6 % přidavkem LDL, následně pak Triladyl® bez a s 10 % obohacením o LDL. V rámci tohoto výzkumu bylo dosaženo nejnižšího poklesu podílu živých spermií v průběhu krátkodobého chladového testu při použití ředidla Triladyl® bez přidaného LDL (16,01 %) naopak nejvyššího poklesu podílu živých spermií v průběhu tepelného testu

přežitelnosti spermií trvajících 120 minut bylo dosaženo u stejného ředidla s 10 % přídavkem LDL (21,44 %). Nejvyššího průměrného podílu živých spermií bylo na začátku testu dosaženo při ředění Bioxcell® na koncentraci 6 % LDL a to 69,17 % a po 120minutové inkubaci 52,94 %. I v tomto případě se výsledky shodují s prací Berana et. al (2016), kdy se jako nejlepší varianta ředidla jeví Bioxcell® s 6 % LDL cholesterolu.

Z výše zmíněných studií tedy plyne, že obohacení ředidel o LDL cholesterol obecně zvyšuje odolnost spermií vůči chladovému šoku, jejich životaschopnost a motilitu. Ředidla AndroMed® a Bioxcell® přispívají k zajištění vyšší životaschopnosti spermií, zejména se jako vhodná ukázala 6 % koncentrace LDL v ředidle Bioxcell®. Při přípravě a ředění byl zařazen proces chlazení a ekvilibrace, kde bylo u délky ekvilibrace 120 minut a déle zaznamenána vyšší hodnota motility spermií a podíl živých spermií po rozmrazení.

V rámci této studie sice nebyly hodnoceny různé typy koncentrací přídavku LDL a ředidel, ale byla použita 6 % LDL jako přídavek k inseminačním dávkám. Nicméně byl sledován pozitivní vliv na zvýšení míry zabřezávání, což souvisí s větší motilitou, životaschopností a oplození schopností spermií, které je zajištěno přídavkem LDL.

7 Závěr

Hodnocení reprodukce mléčných farem zahrnuje několik ukazatelů. Mezi hlavní řadíme míru zabřezávání po inseminaci, servis periodu, inseminační interval a mezidobí. Na tyto ukazatele má vliv mnoho faktorů, jako například zdravotní stav zvířat, užitkovost, výživa, vnější enviromentální podmínky, věk dojnic a pořadí laktace, management detekce říje i samotná inseminace. V případě inseminace jsou limitujícími prvky především plnohodnotnost a pravidelnost ovariálních cyklů plemenic – související s celkovým zdravotním stavem, technika a načasování inseminace a kvalita inseminační dávky. V rámci zlepšování úrovně kvality inseminačních dávek byl prokázán pozitivní účinek přídatku Low Density Lipoprotein – LDL cholesterolu do určených ředidel ID. Tento přídatek LDL cholesterolu simuluje kryokonzervační efekt živočišného vaječného žloutku, od jehož použití, jako komerčně dostupného kryoptotektiva, se ustupuje z důvodu možného přenosu infekčních onemocnění.

Vedle pozitivního vlivu cholesterolu na fertilitu a přežitelnost spermií (prokazatelný z předchozích studií) byla i v případě dopadu na zabřezávání dojnic prokázána kladná odezva doplňku 6 % LDL k ředidlům ID. V rámci pokusu bylo u Holštýnských dojnic s průměrnou užitkovostí okolo 8900 kg mléka za laktaci pozorováno zlepšení míry zabřezávání o 6.691 % oproti kontrolní skupině. Nejlepší míra zabřezávání byla pozorována zejména u jalovic a dojnic na druhé laktaci. V rámci vybraných podniků P1 – P3 vyšlo hodnocení zabřezávání nejlépe u podniku P2, a to zejména díky vysokému počtu zařazených jalovic v pokusu. Míra zabřezávání v tomto podniku dosahovala až 77.4 % po inseminaci s LDL cholesterolem. V případě reprodukčních ukazatelů SP a inseminačního intervalu byly nejlépe hodnoceny podniky P2 a P3, servis perioda P2 byla v průměru 128 dnů a inseminační interval 79 dnů. P3 vyhodnotil SP na 137 dnů a inseminační interval 76 dnů. Úroveň zabřezávání v těchto podnicích se po použití LDL cholesterolu v ID zlepšila v průměru o 6,275 % u P3 a 44,025 % u P2

8 Seznam použité literatury

AHMED, K.U. et al. 2014. Influence of breed, age and collection interval on semen quality of AI dairy bulls in Bangladesh. *Bangladesh Research Publications Journal*. Volume: 10. Issue: 3. Page: 275-282. ISSN: 1998-2003

AMIRAT, L. et al. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. Elsevier Inc. *Theriogenology*. Vol 61. pp 895-907.

AMIRAT, L. et al. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. Society for Reproduction and Fertility. *Reproduction*, 129(4): 535–543 ISSN 1470-1626

AMIRAT-BRIAND, L. et al. 2010. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. Elsevier B. V. *Animal Reproduction Science*. Vol. 122. pp 282-287

ANTON, M., et al. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem.*, 83(2): 175–183.

BALL, P.J.H., PETERS, A.R. 2004. *Reproduction in Cattle*. 3rd edition. Blackwell Publishing. 250 p. ISBN 1-4051-1545-9

BERAN, J. et al. 2013. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. LXI (6)*. pp 1575-1581.

BERAN, J. et al. 2011. Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. LIX, No. 6, pp. 37–44

BERAN, J. et al. 2016. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64(2). pp 395–399

BERAN, J. et al. 2012. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Leibniz Institute for Farm Animal Biology. Arch Tierz* 55. 3. pp 207-218

- BERNDTSON W, FOOTE R. 1972. The freezability of spermatozoa after minimal prefreezing exposure to glycerol or lactose. *Cryobiology*. Vol. 9. pp 57-60.
- CHANTLER, E., ABRAHAM-PESKIR, J. V., LITTLE, S., MCCANN, C., MEDENWALDT, R. 2000. Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology*, 41(2): 125–134
- Českomoravská společnost chovatelů, a.s. 2017. Ročenka. Chov Skotu v České republice. Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2016. 106 s
- Českomoravská společnost chovatelů, a.s. 2017. Výsledky kontroly užítkovosti v České republice kontrolní rok 2016/2017. 120 s
- DAHLEN, S., BLACK, D., CROSSWHITE, M. 2015. Maximizing pregnancy rates when using artificial insemination. North Dakota State University. AS1794. 8 p
- DOLEŽEL, R., VINKLER, A. 2004. Zajištění intenzivní reprodukce v chovech skotu. Produkční a preventivní medicína v chovech skotu. Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno. Brno. s 79-90. ISBN 80-7305-501-5
- EKLUNDH, C. 2013. The use of artificial insemination in dairy farms in urban/peri-urban Kampala, Uganda – a study of knowledge, attitude and practices. Swedish University of Agricultural Sciences. pp 5-6
- FEINGOLD, K. R., GRUNFELD, C. 2015. Introduction to lipids and lipoproteins. San Francisco VA Medical Center. PMID: 26247089. Dostupný také z: <MDText.com>
- FERGUSON, J.D., SKIDMORE A. 2012. Reproductive performance in a select sample of dairy herds. *Journal of dairy science*. 96(2): 12269-89
- FLEISCH, A. et al. 2016. Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristic of cryopreserved bull semen. Elsevier. Inc. *Theriogenology*. Vol. 89. pp 255-262
- FOOTE, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. Department of Animal Science. Cornell University. Ithaca. NY 14853-480. pp 1-10
- FORERO-GONZALES, R. A. et al. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. Blackwell Verlag GmbH. *Andrología*. Vol. 44. pp 154-159.

GORDON, I.R. 2004. Reproductive technologies in Farm Animals. Department of Animal Science and Production. University College Dublin. Ireland. pp 140-163. ISBN 0-45199-862-3

HEGEDŮŠOVÁ, Z. a kol. 2010. Detekce říje v chovech skotu – cesta ke zlepšení úrovně reprodukce. Agrovýzkum s.r.o. Rapotín. 26 s. ISBN 978-80-87144-21-3

HINSCH, E. et al. 1997. Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-yolk Free and Egg-yolk Containing Extenders. Blackwell Wissenschafts-Verlag. Reproduction in Domestic animals. Vol. 32. pp 143-149. ISSN 093-6768

HOLT, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Elsevier B.V. Animal Reproduction Science 62. pp 3–22

HU, J. H., LI, Q. W., GANG, L., CHEN, X. Y., HAI, Y., ZHANG, S. S., WANG, L. Q. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. Asian Australas. J. Anim. Sci., 19(4): 486–494.

LAYEK, S. S. et al. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. Elsevier B.V. Animal Reproduction Science. Vol. 177. pp 1-9

LEITE, T. G. et al. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. Elsevier B. V. Animal Reproduction Science. Vol. 120. pp 31-38.

LEMMA, A. 2011. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. Artificial Insemination in Farm Animals. INTECH. pp 192-216. ISBN 978-953-307-312-5

LEROY, C. N. S., WALTON, J. S., LEBLANC, S. J. 2017. Estrous detection intensity and accuracy and optimal timing of insemination with automated activity monitors for dairy cows. American Dairy Science Association. Journal of Dairy Science. Vol. 101. pp 1638-1647

LÓPEZ-GATIUS, F., HUNTER, R.H.F. 2011. Intrafollicular insemination for the treatment of fertility in the dairy cow. University of Lleida. University of Veterinary Medicine Hannover. Elsevier Inc. Theriogenology 75: 1695–1698

LOUDA, F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat: se základy biotechnických metod. Česká Zemědělská univerzita v Praze. Praha. 225 s. ISBN 80-213-0702-1

- LOUDA, F. a kol. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. Výzkumný ústav pro chov skotu. Rapotín. ISBN: 978-80-87144-05-3. 60 s
- MICHEL, G., CHAIGNEAU, A., GUYONNET, B. 2016. Effects of equilibration time on post thaw moility and fertility bull semen. Elsevier. Inc. Animal Reproduction Science. Vol. 169. pp 102
- MORRELL, J.M. 2010. Artificial Insemination: Current and Future Trends. Swedish University of Agricultural Sciences. Intech. Uppsala. pp 2-10
- MOUSSA, M., MARTINET, V., TRIMECHE, A., TAINTURIER, D., ANTON, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozenthawed bull semen. Theriogenology, 57(6): 1695–1706.
- MURPHY, E.M. et al. 2017. Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate. Elsevier. Inc. Theriogenology. Vol. 108. pp 217-222
- MURPHY, E.M. et al. 2018. Comparison of plant - and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen - thawed bull semen. Elsevier B.V. Animal Reproduction Science. Vol 191. pp 70-75
- NOWAK, R. 1997. Walker's Mammals of the World 5.1. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press. 2015 p. ISBN: 9780801857898
- PAAR, M.H. et al. 2015. The concurrent and carry over effects of long term changes in energy intake before insemination on pregnancy per artificial insemination in heifers. Animals and Grassland Research and Innovation centre. Dublin. Elsevier Inc. Animal Reproduction Science 157 (2015) 87–94
- RAJORIYA, J. S. et al. 2016. Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa. Elsevier V.B. Animal Reproduction Science. Vol 164. pp 72-81
- REHMAN, F. et al. 2013. Semen extenders and artificial insemination in Ruminants. Veterinaria. vol 1. pp 1-8. ISSN 0936-6768
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia? Blackwell Verlag. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 38. pp 312-318

RUTTEN, C. J. et al. 2016. A prognostic model to predict the success of artificial insemination in dairy cows based on readily available data. Utrecht University. Journal of Dairy Science. 99:6764–6779

ŘÍHA, J., JAKUBEC, V., JÍLEK, F., ILLEK, J., KVAPILÍK, J., HANUŠ, O., ČERMÁK, V. 2000. Reprodukce v procesu šlechtění skotu. Rapotín. Grafotyp Šumperk. 144 s. ISBN 80-903143-5

SAACKE, R. G. 2008. Insemination factors related to timed AI in cattle. Virginia Polytechnic Institute and State university. Elsevier Inc. Theriogenology 70 (2008) 479–484

SCHÜLLER, L.-K., BURFEIND, O., HEUWIESER, V. 2016. Effect of short- and long-term heat stress on the conception risk of dairy cows under natural service and artificial insemination breeding programs. Journal of Dairy Science. Vol. 99:2996–3002

SIEME, H., OLDENHOF, H., WOLKERS, W. F. 2015. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. Reproduction in Domestic Animals. 50 (Suppl. 3), pp 20–26. ISSN 0936–6768

SINGH, A.K., et al. 2012. Comparative Quality Assesment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen Chilled (5 °C) in Egg Yolk – and Soya Milk-Based Extenders. Reproduction of Domestic Animals, Vol 47. pp 596-600

STÁDNÍK, L., VACEK, M., NĚMEČKOVÁ, A. 2006. Změny tělesné kondice dojnic a mléčná užitkovost a reprodukce. Sborník referátů z mezinárodní konference „Den mléka 2006“. ČZU Praha, 22.5.2006, s 142-144. ISBN 80-213-1498-2

STÁDNÍK, L. et al. 2015. Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. Acta Vet. Brno. Vol. 84. pp 125-131

STANDERHOLEN, F. B. et al. 2015. Use of immobilized cryopreserved bovine semen in a blind artificial insemination trial. Elsevier Inc. Theriogenology. Vol. 84. pp 413-420

ŠIMONÍK, O. et al. 2016. Effect of low-density lipoprotein addition to soybeanlecithin-based extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing – preliminary results. Czech Journal of Animal Science. Vol. 61. pp 560-567

TICHÁČEK, A. a kol. 2007. Poradenství jako nástroj bezpečnosti v prvovýrobě mléka. Ministerstvo zemědělství České republiky. Agritec, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk. 90 s. ISBN 978-80-903868-0-8

VERA-MUNOZ, O., AMIRAT-BRIAND, L., BENCHARIF, D., ANTON, M., DESHERCES, S., SHMITT, E., THORIN, C., TAINTURIER, D. 2011. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 degrees C. *Asian J. Androl.*, 13(2): 281–286.

VISHWANATH, R. 2002. Artificial insemination: the state of the art. Livestock Improvement Corporation. Hamilton. New Zealand. *Theriogenology* 59. pp 571-584

WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7(4): 871-891.

WEST, J.W. 2003. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. Animal and Dairy Science Department, University of Georgia Coastal Plain Experiment Station. *Journal of Dairy Science*. Vol 86: 2131-2144