

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra speciální zootechniky**



**ODOLNOST SPERMIÍ VŮČI CHLADU A JEJICH PŘEŽITELNOST**

**Diplomová práce**

Praha 2013

**Vedoucí diplomové práce:**

doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

**Vypracovala:**

Bc. Monika Illichová

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Odolnost spermií vůči chladu a jejich přežitelnost“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém soupisu literatury. Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně ČZU v Praze a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Praze dne 12.4.2013.....

Podpis diplomanta.....

## PODĚKOVÁNÍ

---

Ráda bych poděkovala, vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Ludřkovi Stádníku, Ph.D. za umožnění zpracování velmi zajímavého a přínosného tématu o přežitelnosti spermií. Za možnost zorientovat se v dané problematice reprodukce skotu a podrobně se seznámit s možnostmi jeho využití. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za pomoc s vedením práce, analýzou laboratorních a statistických dat.

## SOUHRN

---

Cílem práce bylo určit vliv typu ředidla na odolnost spermií vůči chladovému šoku a jejich přežitelnost v průběhu dlouhodobého chladového testu. Hypotézou byl předpoklad, že odlišné složení ředidla, především přítomnost vaječného žloutku, resp. LDL cholesterolu pozitivně ovlivní odolnost spermií vůči chladovému šoku a zajistí vyšší přežitelnost spermií v průběhu dlouhodobého chladového testu přežitelnosti.

Byli použiti 4 býci různých plemen i věku, z jedné inseminační stanice. Celkem se provedlo 8 odběrů. Každý ejakulát byl rozdělen na 15 dílů (6 kontrol a 9 vzorků). K ředění byla použita 3 komerčně vyráběná ředidla, AndroMed, Bioxcell a Triladyl. Každé ředidlo se přimíchalo ke 2 kontrolám a 3 pokusným variantám s ejakulátem. Kontroly byly ponechány ve složení ředidlo + ejakulát a pokusné varianty byly obohaceny o LDL v koncentraci 4 - 6 - 8 % u AndroMedu a Bioxcellu a 6 - 8 - 10 % u Triladylu.

Všechny vzorky byly hodnoceny testem odolnosti spermií vůči chladovému šoku a stanovilo se procento živých a mrtvých spermií pomocí barviv Eosin-nigrosin.

Výsledky ukázaly vliv individuality býka jako důležitý faktor. Z použitých ředidel lze doporučit AndroMed s přídavkem LDL cholesterolu o koncentraci 8 %, jehož přežitelnost byla 69,3 % na začátku testu a 57,22 % po 2 hodinách inkubace.

**Klíčová slova:** býk, sperma, LDL, Triladyl, AndroMed, test přežitelnosti spermií

## SUMMARY

---

The aim of thesis was to determine the effect of diluents on the resistance of spermatozoa to cold shock and of their long-term survivability during cold test. The hypothesis was the assumption that the composition of different diluters, especially the presence of egg yolk, respectively of LDL cholesterol will positively affects sperm resistance to cold shock and ensures a higher survivability of spermatozoa during long term cold survival test.

Were used four bulls of different breeds and ages, from one AI station. A total of eight samples were carried out. Each ejaculate was divided into 15 parts (6 controls and 9 samples). The dilutions used three commercially produced diluters, AndroMed, Bioxcell, and Triladyl. Any diluter was added to the 2 control samples and 3 trial samples with fresh ejaculate. Control samples were left in the composition diluter + ejaculate and trial samples were enriched by LDL concentration of 4 - 6 - 8 % for AndroMed and Bioxcell and 6 - 8-10 % for Triladyl. All samples were evaluated by sperm test resistance to cold shock and set the percentage of live and dead sperm using dyes Eosin-Nigrosine. The results showed the influence of bull individuality as an important factor. The diluents used is recommended AndroMed with added LDL cholesterol concentration of 8 %, which survivability was 69,3 % at the beginning of the test, and 57,22 % after 2 hours of incubation.

**Key words:** bull, sperm, LDL, Triladyl, AndroMed, sperm survival test

# OBSAH

---

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>11</b>
3.1	Reprodukce skotu	11
3.2	Činitelé ovlivňující oplozovací schopnost spermií v ejakulátu	11
3.3	Neurohumorální řízení reprodukčních funkcí samců	13
3.3.1	Pohlavní reflexy býka	14
3.4	Výběru plemenných býků	15
3.4.1.1	Naskladnění OPB	16
3.4.1.2	Organizace	16
3.4.1.3	Ustájení a krmení	17
3.4.1.4	Tělesná hmotnost a tělesné rozměry	18
3.4.1.5	Ošetřování paznehtů	18
3.4.1.6	Příprava na základní výběr	18
3.4.1.7	Evidence na OPB	19
3.4.1.8	Hodnocení zkoušky vlastní užitkovosti	19
3.5	Anatomie a fyziologie samčího pohlavního ústrojí	19
3.5.1	Posouzení vnějších pohlavních orgánů	21
3.5.1.1	Histologické vyšetření	21
3.5.1.1.1	Biopsie	21
3.5.1.1.2	Nekropsie	22
3.5.1.2	Bakteriologické a parazitologické vyšetření	22
3.5.1.3	Rentgenologické a ultrasonografické vyšetření	22
3.5.1.4	Endokrinologické vyšetření	22
3.5.2	Funkční testy	23
3.5.2.1	Testikulární biometrie	23
3.5.2.2	Tenzimetrie varlat	23
3.6	Semeno	23

3.6.1	Spermie	24
3.6.2	Spermatogeneze	24
3.6.3	Morfologie spermií	26
3.6.4	Akrozomální reakce	27
3.6.5	Metabolismus spermií	28
3.6.6	Motilita spermií	29
<b>3.7</b>	<b>Inseminace</b>	<b>30</b>
3.7.1	Odběr ejakulátu u býků	32
3.7.1.1	Umělá pochva	32
3.7.1.2	Elektroejakulace	33
3.7.1.3	Masáž ampulí chámovodu	33
3.7.1.4	Odběr ejakulátu krvavým způsobem	34
3.7.2	Hodnocení spermatu	34
3.7.2.1	Makroskopické hodnocení	35
3.7.2.2	Mikroskopické hodnocení	36
3.7.2.3	Biologické zkoušky ejakulátu	37
3.7.2.4	Biochemické zkoušky ejakulátu	37
3.7.2.5	Morfologické změny spermií	37
3.7.2.6	Mikrobiologické vyšetření ejakulátu (Mikrobiotesty)	38
3.7.3	Ředidla	38
3.7.4	Konzervace ejakulátu	40
3.7.4.1	Typy konzervace ejakulátů	41
3.7.5	Biologické zkoušky ejakulátu	43
3.7.5.1	Krátkodobý tepelný test přežitelnosti	43
3.7.5.2	Dlouhodobý chladový test přežitelnosti	43
3.7.5.3	Zkouška rezistence spermatu	43
3.7.5.4	Zkouška živých spermií na odolnost vůči chladovému šoku	43
3.7.6	Metody barvení	44
3.7.6.1	Stanovení podílu živých a mrtvých spermií	44
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakteristika býků</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Příprava ředidel</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>Odběr a zpracování spermatu</b>	<b>47</b>
<b>4.4</b>	<b>Hodnocení odolnosti k chladovému šoku</b>	<b>47</b>

4.5	Statistické vyhodnocení výsledků	48
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>49</b>
5.1	Celkový počet živých a mrtvých spermií	49
5.2	Výsledky statistiky dle býků	49
5.3	Výsledky statistiky dle užitkového typu	49
5.4	Výsledky statistiky vlivu ředidla bez ohledu na koncentraci	50
5.4.1	AndroMed	50
5.4.2	Bioxcell	50
5.4.3	Triladyl	51
5.5	Výsledky statistiky vlivu koncentrace LDL v ředidle	51
5.6	Vliv ukazatelů na přežitelnost spermií	52
5.6.1	Korelační analýza	52
5.6.2	Vliv býka a vzorku (GLM Procedure)	52
5.6.3	Vliv býka	52
5.6.4	Vliv vzorku dle koncentrace	53
5.6.4.1	Čas 0	53
5.6.4.2	Čas 2	53
5.6.4.3	Rozdíl	54
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCE</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>71</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	<b>72</b>
10.1	Seznam tabulek	72
10.2	Seznam grafů	72
10.3	Seznam obrázků	72



# 1 ÚVOD

---

V chovu skotu stále přetrvává snižování početních stavů od roku 2006 (Kvapilík a kol., 2012). K 1.1.2012 je celkový stav skotu 1 371 414 ks, z toho 373 044 ks krav mléčných plemen a 176 334 KBTPM (krávy bez tržní produkce mléka). Většina skotu, přesně 82,9 % se chová v hospodářstvích, jejichž kapacita přesahuje 100 000 ks.

Již dlouhé desítky let se chovatelé zabývají možnostmi zlepšení reprodukce jedinců živočišné říše, ale i rostlinné. Snaží se tím zajistit druhovou rozmanitost a zamezení vyhybnutí některých jedinců. V mé práci se zaměřuji na přežvýkavce, přesněji skot. Jsou hlavním producentem mléka a jedním z hlavních producentů masa. Bez jejich cílené reprodukce by nebyla obrátkovost těchto produktů tolik efektivní. Tudíž můžeme říci, že reprodukční schopnost je základním parametrem stád. Aby byla zajištěna kvalitní úroveň reprodukce, musí chovatelé a šlechtitelé dokonale znát jejich reprodukční funkce a jsou tedy významným činitelem (Věžník a kol., 2004; Bouška a kol., 2006). To je odrazem plodnosti, jak samic, tak samců, jelikož bez produkce životaschopných mláďat by nebyla produkce mléka a nebyly by býčci na výkrm. Důležitým ukazatelem plodnosti samic je natalita a mezidobí. U býků to je oplozovací schopnost spermií a libido (Louda a kol., 2007).

Z tohoto důvodu se kladou vysoké nároky na kvalitní vyšetření ejakulátu. Potřebujeme totiž vybrat nejlepší plemeníky, kteří v našem chovu budou zvyšovat ekonomickou efektivitu, šlechtitelský pokrok a budou zkvalitňovat celkový zdravotní stav stáda, jsou důležitým genetickým potenciálem (Věžník a kol., 2004; Louda a kol., 2007).

Cílem šlechtitelů je, aby špičkoví plemenní býci byli co nejvíce využíváni v plemenitbě, naopak lze v dnešní době konstatovat, že se snižuje reprodukční kapacita, tím i doba využití. To vše je i odrazem daného prostředí. Nevhodnou přípravou plemenných býčků dochází k poruchám plodnosti a vývoje spermií, ke zhoršení kvality ejakulátu, především semenné plazmy a sniží se i produkovaný objem (Věžník a kol., 2004).

Při pohledu na masný skot je zřejmé, že větší využití přirozené plemenitby se u nich velmi osvědčilo, avšak jsou výjimky, kdy chovatel využije inseminace. Ta se provádí především u nejlepších plemenic před začátkem připouštěcího období. Výsledkem by mělo být získání býků pro inseminaci, plemenné jalovice, které zlepší genetický potenciál vlastního stáda, případně i tvorba výkonnějších potomků. Naopak u dojeného skotu je prvořadá inseminace (Louda a kol., 2007).

## 2 CÍL PRÁCE

---

Cílem práce je určit vliv typu ředidla na odolnost spermií vůči chladovému šoku a jejich přežitelnost v průběhu dlouhodobého chladového testu. Hypotézou je předpoklad, že odlišné složení ředidla, především přítomnost vaječného žloutku, resp. LDL cholesterolu pozitivně ovlivní odolnost spermií vůči chladovému šoku a zajistí vyšší přežitelnost spermií v průběhu dlouhodobého chladového testu přežitelnosti.

K vypracování mnou zvoleného tématu mne vedla myšlenka stejného využití LDL cholesterolu v dlouhodobém chladovém testu, jelikož u kryokonzervace měla tato metoda kladné výsledky. S tím souvisí i možnosti dalšího využití v inseminaci, zkvalitnění inseminačních dávek a z toho vyplývající vyšší procento zabřezávání plemenic. Proto je důležité co nejvíce přizpůsobit složení ředidla, ve kterém se spermie (ejakulát) budou uchovávat po dobu transportu k plemenicím.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

---

### 3.1 Reprodukce skotu

Nejdůležitější biologickou a užitkovou vlastností zvířat, jež zajišťuje rozmnožování a tím i zachování druhu, je plodnost. Projevem plodnosti je tvorba pohlavních, oplození-schopných buněk. Plemenice musí pravidelně říjit a zabřezávat a ziskem je životaschopné tele (Kliment a kol., 1983). Plodnost se však za posledních 5 desetiletí rapidně snížila, naopak mléčná produkce vzrostla, největší příčinou je negativní energetická bilance (Walsh et al., 2011). Býci zase musí projevovat libido a produkovat kvalitní oplození-schopný ejakulát. Pokud jsou jedinci cílevědomě využíváni v příhodných chovatelských a prostředí-vhodných podmínkách, tak je u nich vyšší pravděpodobnost dlouhodobé plodnosti. Čím se zvyšuje koncentrace zvířat ve stáji, tím se zvyšují poruchy plodnosti (Kliment a kol., 1983).

Úroveň reprodukce limituje rentabilitu chovu, proto je velmi důležitým hodnoceným ukazatelem (Hofírek a kol., 2009).

Z roku 2011 jsou doloženy optimální hodnoty pro dobrou plodnost a to: inseminčního intervalu (do 75 dnů), SP (servis periody do 100 dnů), MD (mezidobí do 385 dnů (400 dnů při užitkovosti nad 7000 kg mléka)) a zabřezávání po 1. inseminaci (nad 50 %). Pokud se první inseminace provede v průměru o 10 dní dříve tak se nám zvýší zabřezávání o 5 – 10 % a SP a MD se zkrátí o 10 - 20 dní (Kvapilík a kol., 2012).

I když se počet inseminací zvyšuje, zabřezávání se od roku 2006 stále snižuje. Neplodnost je z 60 % způsobena nedostatky v managementu a 40 % nedostatky ve výživě a krmení (Kvapilík a kol., 2012). Pokud se v čerstvém spermatu vyskytují apoptotické spermie snižuje se jejich oplozovací schopnost (Anzar et al., 2002).

### 3.2 Činitelé ovlivňující oplozovací schopnost spermií v ejakulátu

Pouze jedinec s dobrým zdravotním stavem a kondicí vykazuje dobrou plodnost. Je-li jedinec nadměrně využíván a nedodrží-li se jeho základních životní potřeby, může být neplodný (Kliment a kol., 1983). Je všeobecně známo, že na kvalitu spermatu mají vliv vnitřní (endogenní) i vnější (exogenní) činitelé. Mezi vnější řadíme zejména roční období, kli-

matické podmínky, světlo, teplo. Úroveň výživy a ustájení, sociální hierarchie ve stádě, zdravotní stav a reprodukční zatížení jedince jsou naopak vnitřními vlivy (Louda a kol., 2007; Marvan a kol., 2007; Bhoite et al., 2008). Mandal et al. (2000) uvádí kromě těchto vlivů i vliv vnějšího prostředí během odběru ejakulátu. Pokud působí vnější podmínky na exteroceptory smyslových orgánů, dojde k podráždění hypotalomohypofyzárního systému, na němž je závislá pohlavní činnost (Louda a kol., 2007).

Mezi endogenní vlivy řadíme nervový typ, plemeno, stáří a zdravotní stav (Hofírek a kol., 2009). Jedinci, kteří mají dědičně stabilní neuroendokrinní systém, jsou oplození schopnější než zvířata labilní. Dispozice genotypu určuje reprodukční potenciál na požadovanou úroveň (Kliment a kol., 1983). Ideální býci mají nervový typ silný, vyrovnaný a živý či mírný (Hofírek a kol., 2009).

Plemena prošlechtěná mývají lepší libido a lehce vyšší objem a koncentraci spermií než neprošlechtěná a masná plemena (Hofírek a kol., 2009). Reprodukce může probíhat až u pohlavně dospělých zvířat a vzrůstá až do 5 - 7 let, poté začne klesat (Kliment a kol., 1983). Dle Bhakata et al. (2011) lze kvalitní sperma získat až do věku 5 let. Začneme-li předčasně, sníží se u býka libido a kvalita ejakulátu i délka využití býka v plemenitbě (Hofírek a kol., 2009).

Každá nemoc (infekční i neinfekční) či zranění (především pohybového aparátu) může negativně ovlivnit plodnost býka, zejména infekce pohlavního ústrojí (Hofírek a kol., 2009).

Exogenní vlivy můžeme také rozdělit na infekční (pohlavní nákazy) a neinfekční (výživa, klima, ošetřování, způsob chovu) (Hofírek a kol., 2009). Do klimatických podmínek zařadíme kromě teploty, intenzity světla a slunečního záření i tlak, vlhkost a proudění vzduchu (Louda a kol., 2007). Teplota ovlivňuje stav membrán a fyzikální vlastnosti spermií (Carruthers a Melchior, 1988b). Optimální teplota pro správnou oplozovací schopnost je 12 – 15 °C, v kombinaci s odpovídající vlhkostí a prouděním vzduchu (Kliment a kol., 1983). To u jedinců ovlivní reprodukci jako celek.

Naopak výživou korigujeme nástup pohlavní a chovatelské dospělosti a během celého života i pohlavní činnost (Louda a kol., 2007). Je jedním z nejdůležitějších faktorů a to kvantitativně i kvalitativně. Strava musí být pestrá, s vyváženými živinami a biologicky a energeticky vyvážená (Kliment a kol., 1983). Výsledkem výživy je tělesná kondice, ta se však více hlídá u plemenic než u býků (Louda a kol., 2007). Nejdůležitější složkou výživy s vlivem na reprodukci jsou bílkoviny a aminokyseliny (Kliment a kol., 1983).

Ustájení je důležité pro zachování správného zdravotního stavu. Nejvhodnější pro plemeny je volné či boxové ustájení s podestýlkou (Kliment a kol., 1983).

Intenzita využívání býka (*exploatace*) se liší věkem, kondicí a zdravotním stavem. Nadměrným využíváním se sníží libido, objem i koncentrace ejakulátu, zhorší se prežitelnost i rezistence spermií. Naopak nedostatečným využíváním býka setrvávají spermie příliš dlouho v nadvarleti a tím dochází k jejich degradaci a snižování rezistence a odolnosti (Hofírek a kol., 2009).

### **3.3 Neurohumorální řízení reprodukčních funkcí samců**

Neurohumorální řízení pohlavní aktivity je zajištěno prolínáním nervového a endokrinního systému (Bouška a kol., 2006). Věžník (2004) uvádí ve své publikaci 2 hlavní oblasti (mezimozek a zadní část míchy), kde se nachází centrum pro vlastní řízení reprodukčních funkcí. Částí neurohumorálního řízení je hypotalamus a hypofýza. Kaskádovitě jsou hypotalamus a hypofýza napojeny na gonády (Bouška a kol., 2006). Vliv na sexuální aktivitu má hormon gonadoliberin (GnRH - *gonadotropin releasing hormon*) pocházející z hypotalamu. Vyšší hladina sexagenů (gonadálních steroidních hormonů) zpomaluje produkci GnRH a naopak jejich nízká hladina produkci GnRH podporuje (Věžník a kol., 2004). Hypofýza produkuje látky stimulující gonadotropiny. Jedním z hlavních stimulů je lutotropin (LH-luteinizační hormon = ICSH-intersticiální buňky stimulující hormon) a foliotropin neboli folikulostimulační hormon (FSH).

Lutotropin, u samců, působí v Leydigových buňkách (intersticiální buňky varlat), kde dochází k produkci steroidu testosteronu (Věžník a kol., 2004). Sekrece LH se zvýší, pokud dojde k poklesu hladiny testosteronu. Testosteron se následně stabilizuje, když jeho zvýšením dojde k pozastavení produkce LH. Při opětovném snížení množství testosteronu se opět začne sekretovat LH a proces tzv. negativní zpětné vazby se opakuje. Úkolem testosteronu je udržování meiotického dělení. (Reece, 1998).

Hlavní úkol FSH v Sertoliho buňkách je podpora syntézy RNA a má vliv na produkci proteinu vázajícího androgeny a testosteron. Také jimi ovlivňuje produkci estrogenu a inhibinu (Reece, 1998). Estrogeny mají výrazný proliferační účinek, díky němuž dochází k nepřetržité tvorbě pohlavních buněk (Bouška a kol., 2006). Také se syntetizuje specifický protein, který na sebe váže androgeny - pohlavní hormony (ABP- *androgen binding protein*) (Věžník a kol., 2004).

Inhibin potlačuje tvorbu FSH. FSH je nutný pouze pro začátek spermatogeneze, naopak LH je důležitý po jeho celou dobu trvání (Reece, 1998). Inhibin se vyskytuje v semennotvorných kanálcích varlat, v lymfě a v sekretech z *rete testis*, ale také byl nalezen v ejakulátu. Tvoří se však v Sertoliho buňkách a jak již bylo zmíněno, zaujímá své postavení ve zpětnovazebných mechanismech sekrece FSH (Věžník a kol., 2004).

Testosteron je nejvýznamnější androgen, čili gonadální hormon, neboli sexagen. Je produkován vmezeřenými buňkami za vlivu hormonu ICSH (intersticiální buňky stimulující hormon). Má nepřehledné množství funkcí: zajišťuje vývoj a dozrávání samčího pohlavního ústrojí už od plodu, rozvíjí funkci přídatných pohlavních žláz, sekundárních pohlavních znaků (samčí vzhled a fyzická síla) a temperamentu. Jeho funkce má vliv i na metabolismus, tvorbu kostí a kostry, produkci erythropoetinu. V neposlední řadě ovlivňuje produkci gonadoliberinu a gonadotropinů a to zpětnou vazbou ve spolupráci s inhibinem (Věžník a kol., 2004; Bouška a kol., 2006; Louda a kol., 2007).

### **3.3.1 Pohlavní reflexy býka**

Plemenný býk musí projevovat určité reprodukční reflexy od vybavování přes nástup až po celkovou plynulost a plnohodnotnost. Atrapa musí v plemeníkovi vyvolat aktivní a intenzivní zájem, aby mohly následovat pohlavní reflexy (lokomoční, objímací, erekční a kopulační), tzv. pohlavní pud. Bez nich by plemeník nemohl být zařazený do plemenitby. Reflexy, které jsou viditelné ještě před úplným přiblížením k plemenici, se nazývají reflexy distančními a poté dojde k reflexům po přímém kontaktu (samotný pohlavní akt). Avšak u býků je největším iniciátorem optický kontakt, po kterém dojde k aktivaci pohlavních reflexů (Věžník a kol., 2004; Louda a kol., 2007). Hofírek a kol. (2009) klade důraz jak na zrakové a čichové vjemy tak i na sluchové. Kdežto při přirozené plemenitbě Kliment a kol. (1983) staví na první místo vyhledávání plemenice čichem a reakci plemenice v době říje. Býk není schopný bez náznaků plemenice určit fázi její říje a nejprve provádí testovací vzeskoky. Po několika pokusech teprve dojde k úspěšnému vzeskoku a spáření. Zrak a akustické signály řadí až za čich.

Libido býků dělíme do 5 skupin, L0 (nedostatečná pohlavní aktivita) - L4 (silná a prudká pohlavní aktivita) (Hofírek a kol., 2009).

Tyto všechny reflexy, o kterých jsem psala, jsou reflexy nepodmíněné, tedy geneticky zakódované, které se spouští vlivem gonadotropních pohlavních hormonů. Můžeme je rozdělit na několik fází: lokomoční (sbližovací-vyhledání říjící plemenice pomocí feromonů),

objímací (vizualizace plemenice či atrapy), erekční (nastupuje téměř současně s objímacím reflexem, způsobují je receptory na konci pyje), kopulační-frikční (zasunutí pyje) a ejakulační reflex (u býků má krátkou dobu trvání jen 2-4 sec.) (Věžník a kol., 2004; Louda a kol., 2007).

Vyskytují se však i reflexy podmíněné a to díky pravidelnému opakování jedné a té samé činnosti nebo souboru činností, př. odběr pro inseminaci. Oba typy reflexů mohou probíhat zároveň. Někdy bohužel může dojít k negativnímu ovlivnění pohlavních reflexů a to vznikem podmíněných, které je mohou narušovat (Věžník a kol., 2004).

### **3.4 Výběru plemenných býků**

Odchov plemenných býčků se provádí rozdílně dle typu jejich užitkovosti. Na konci se však musí každý býček, odchovaný u chovatele či v OPB (odchovně plemenných býků), podrobit testu ověření původu akreditovanou laboratoří, neboť je to základní podmínka jejich testace (Louda a kol., 2007).

Oproti roku 2010 se v roce 2011 snížil počet odchovaných plemenných býků českého strakatého plemene o 31 % a k inseminaci bylo použito o 10 % býků méně. Celkově za posledních několik let došlo ke stabilizaci počtu býčků v OPB (Kvapilík a kol., 2012).

Plemenný býček se získává cíleným připárováním rodičovského páru, tzv. „matek býků“ a „otců býků“ jež vykazují vyšší plemennou hodnotu (PH) než je průměr daného plemene (Bouška a kol., 2006; Louda a kol., 2007). Odchov býčků pro produkci ID probíhá v chovatelských svazech daných plemen. U býčků zaměřených na zlepšování produkce mléka je odchov prováděn chovatelem nebo odchovnou plemenných býků a nezjišťuje se jejich vlastní růstová schopnost (užitkovost). V centrálních odchovnách s kontrolou vlastní užitkovosti, včetně spotřeby krmiv, se odchovávají býčci kombinovaných plemen, u nichž se provádí ve věku 10 - 12 měsíců zkouška kvality spermatu a pohlavní aktivity. Naopak zkouška kvality spermatu se neprovádí u býčků masných plemen, tento názor vyvrací Zahradková a kol. (2009). Provádí se u nich kontrola vlastní užitkovosti a spotřeba krmiv (Louda a kol., 2007).

Pokud býk produkuje minimálně 50 milionů spermií s aktivitou nad 10 % (jež stačí k oplodnění plemenice) mluvíme o období puberty, nejčastěji mezi 7. - 10. měsícem věku. V tomto období dochází k rychlejšímu růstu pohlavních orgánů (varlat) a hormonálním

změnám (zvyšování hladiny testosteronu), které podporují spuštění spermatogeneze a vyšší produkci a kvalitu ejakulátu stupňující se zhruba do 2 let věku býka (Louda a kol., 2001).

Plemenní býci nesmějí být agresivní, pro snazší manipulaci se pravidelně provádí (Louda a kol., 2007).

Chovatelé zaměřeni na produkci plemenných býků s cíleným šlechtitelským programem využívají převážně inseminaci. Naopak přirozená plemenitba se preferuje u skotu na masnou-jatečnou produkci. Tyto dvě metody se však také často kombinují, a to: z jara se využívá inseminace a po přechodu na pastvu se připouští přirozeně (Zahrádková a kol., 2009).

Pro býčky masných plemen je hlavním kritériem vlastní růstová schopnost, dále spotřeba krmiva a kvalita spermatu a to ve standardních podmínkách. Od roku 2004 se hodnotí nejen vlastní růstová schopnost a růstová schopnost jeho potomstva, ale také odhad plemenné hodnoty pro přírůstek v testu (Zahrádková a kol., 2009). A to z důvodu zvyšování počtů OPB.

#### 3.4.1.1 Naskladnění OPB

Naskladnění býčků na odchovnu se provádí po odstavu, zjišťuje se hmotnost ve 120 a 210 dnech (dle KUMP-A a podmínek příslušného chovatelského sdružení). Celkový odchov probíhá v turnusech (Louda a kol., 2007; Zahrádková a kol., 2009). Zahrádková a kol. (2009) specifikuje OPB přibližně takto: Nestačí ověřit původ býka a dát mu nosní kroužek, zjistit dostatečnou hmotnost ve 120 a 210 dnech a dále se o býka nestarat, býk musí být na přesun na OPB připraven celkově. Ideální je naplánovat plynulý přesun po odstavu na odchovnu bez výraznějšího poklesu přírůstku.

#### 3.4.1.2 Organizace

Přípravné období – během něj se zvíře adaptuje na podmínky OPB a provedou se zooloogicko-veterinární opatření. Trvá minimálně 30 - 31 dnů. Může být brána jako karanténa. Býčci jsou rozděleni do skupin dle hmotnosti, věku a plemene a v nich probíhá vlastní test. Nutností je zavedení nosní kroužek (Louda a kol., 2001; Zahrádková a kol., 2009).

Období testu vlastní užitkovost – standardní doba trvání je 120 dnů (Louda a kol., 2007; Zahrádková a kol., 2009). Louda a kol. (2001) uvádí 32. až 110. den jako období přípravné, na něž navazuje vlastní zkouška užitkovost a to v období 111 - 365 dnů věku. Zřejmě se bude jednat o plemena dojeného skotu, jelikož Louda a kol. (2007) uvádí v jiné publikaci začátek vlastního testu od 121. dne věku u kombinovaných a masných plemen.



V tomto období dochází k postupnému přírůstku bez zjevného kolísání růstu. Základem je správná konverze krmiva. V rámci zjišťování vlastní užitkovosti se u býčků zjišťuje hmotnost, vždy 2 po sobě jdoucí dny a to ve věku 121 dnů a 365 dnů s relevancí 3 dny. Na odchovně se váží v měsíčních či čtvrtletních intervalech. Na konci testu, tj. ve věku 365 dnů se také určuje výška v kohoutku, šikmá délka těla, obvod hrudníku, střední šířka pánve, délka pánve, výška v kříži a den před zařazením do plemenitby i kohoutková výška (Louda a kol., 2007).

Je nežádoucí dohánět horší přírůstek po 210. dnu věku nebo jakýmkoliv nestandardním způsobem mimo toto období v plynulém nárůstu. Např. vysoký přírůstek na začátku testu a poté už moc ne nebo naopak (Zahrádková a kol., 2009).

Období po skončení testu vlastní užitkovosti – během tohoto období se býk připravuje již na základní výběr. Po dobu minimálně 20 dnů se býkům upravují paznehty, provádí se zdravotní vyšetření a připravují na předvedení k základnímu výběru (Louda a kol., 2007; Zahrádková a kol., 2009).

#### 3.4.1.3 Ustájení a krmení

Býčci jsou ustájeni volně ve skupinách max. 10 (až 15) jedinců a to po celou dobu trvání testu vlastní užitkovosti. Využívá se stejné či obdobné technologie, také po celou dobu testu (Louda a kol., 2007; Zahrádková a kol., 2009). Louda a kol. (2007) také pojednává o volném individuálním ustájení ve stlaných kotcích.

Při tvorbě technologie krmení a napájení se musí brát na zřetel nutnost volného přístupu ke krmení a celodenní přísun nezávadné pitné vody.

Již v době odstavu musí chovatel přizpůsobit krmnou dávku na pozdější období v OPB, tomu předchází i přípravné období, ve kterém je krmná dávka taktéž uzpůsobena potřebám a k nastartování býčka pro optimální přírůstek a jeho úspěšnost v testu. Začíná se krmit mléčnou krmnou směsí (Laktosan) a druhý den se přechází na krmnou směs pro časný odstav telat (ČOT). Po 110. dnu začínáme býčky navykat na doplňkovou krmnou směs pro odchov plemenných býků (BO). Cílem je dosáhnout denního přírůstku 1200 g. V období testu vlastní užitkovosti je hlavní složkou krmné dávky objemná píce (seno) a normovaná potřeba jadrných krmiv (kukuřičná siláž, úsušky a krmné okopaniny). Eviduje se spotřeba krmiv a živin. O kvalitě krmné dávky rozhoduje rozbor krmiv, který se provádí min. 2x za testační období (Louda a kol., 2007; Hofírek a kol., 2009; Zahrádková a kol., 2009).

Po ukončení vlastního testu se krmná dávka upravuje dle dalšího využití býka v plemenitbě. Mladému býku by mělo být přiřazeno max. 10 - 15 plemenic a tomu musí odpovídat i výživa (Zahrádková a kol., 2009).

#### 3.4.1.4 Tělesná hmotnost a tělesné rozměry

Hmotnost – s relevancí 1 kg se býci váží v 5 etapách (po naskladnění na OPB, na začátku přípravného období, na začátku testu vlastní užitkovosti, dále v měsíčních intervalech a na konci testu vlastní užitkovosti). Nakrmenostní srážky se neprovádí. Na začátku i na konci testu se býk váží dvakrát, a to přibližně po 24 hodinách, výsledné hodnoty se poté zprůměrují. Se souhlasem uznaného chovatelského sdružení provede první vážení odchovna a další již pracovník chovatelského sdružení (dle kontroly růstové schopnosti – ICAR = mezinárodní organizace pro kontrolu užitkovosti = „International Committee for Animal Recording“ = zastoupení v ČR - ČMSCH, a.s.) (Zahrádková a kol., 2009).

Tělesné rozměry – měří se ve 3 obdobích výška v kříži v cm, a to první den testu, ve věku 365 dní (s tolerancí +/- 15 dnů) a v poslední den testu. Na konci testu se současně měří i obvod šourku v cm. Měření opět provádí pracovník uznaného chovatelského sdružení současně s lineárním popisem v prvním dni testu (Zahrádková a kol., 2009).

#### 3.4.1.5 Ošetřování paznehtů

Paznehty se musí pravidelně ošetřovat. Přerůstání má negativní vliv na stav končetin. Může k němu docházet následkem nevhodného ustájení v OPB nebo může být založen geneticky, takoví býci by se měli vyřadit z plemenitby (Zahrádková a kol., 2009).

#### 3.4.1.6 Příprava na základní výběr

Přípravou býka na základní výběr se myslí spolehlivé a bezpečné ovládání býka (vodící tyč v nosním kroužku), případně i ověření kvality ejakulátu (Zahrádková a kol., 2009).

Již zmíněná zkouška kvality spermatu konaná ve věku 10 – 12 měsíců se opakuje v týdenních intervalech společně s otestováním odběru schopnosti umělou vaginou. Dále se hodnotí temperament býka, průběh odběru ejakulátu, vysouvání pyje, vývin varlat a nadvarlat a konzistence parenchymu varlat. U odebraného ejakulátu se zjišťuje objem, koncentrace a výskyt patologických spermií. Navíc se hodnotí velikost a vyklenutí varlat, jejich délka, šířka a horizontální obvod šourku, který úzce koreluje s růstovou schopností býka, u plemenných býků. Pro použití v plemenitbě se z odchovaných býků vybírá 40 – 50 % (Louda a kol., 2001).

#### 3.4.1.7 Evidence na OPB

OPB poskytne veškerou evidenci o nákupu plemenných býků příslušnému uznanému chovatelskému sdružení. V evidenční kartě jsou zaznamenány údaje o hmotnosti, tělesných rozměrech, spotřebě krmiv a zdravotním stavu (Zahrádková a kol., 2009).

#### 3.4.1.8 Hodnocení zkoušky vlastní užitkovosti

Matematicko-statistickými metodami hodnotí uznané chovatelské sdružení růstovou schopnost a zevnějšek spolu s tělesnými rozměry.

Selekčními kritérii jsou: splnění požadavků standardu plemene, RPH pro přírůstek v testu, hmotnost a výška v kříži ve věku 365 dnů, posouzení exteriéru během základního výběru a průměrný denní přírůstek býka od narození do ukončení testu vlastní užitkovosti. Kritéria určuje Rada PK příslušných plemen a vyhláší Grémium PK (Zahrádková a kol., 2009).

Ve věku 365 - 420 dnů, kdy dochází k dokončení základního výběru, se býci prodávají nejčastěji na tzv. „aukci plemenných býků“ a začíná se s pravidelným odběrem spermatu v inseminační stanici (Louda a kol., 2001).

Plodnost býka lze otestovat několika způsoby. Testem nepřeběhlých plemenic, procentem telených plemenic po první inseminaci a inseminačním indexem (Kliment, 1983).

### 3.5 Anatomie a fyziologie samčího pohlavního ústrojí

Tvorba spermií a následná doprava do samčího pohlavního ústrojí je hlavní činností samčího pohlavního ústrojí. Místem vzniku spermií jsou semenotvorné kanálky varlat, z nich se přemísťují varletními kanálky do nadvarlete, kde se ukládají a dozrávají. Jakmile samec dovrší pohlavní dospělosti, začne nepřetržitá tvorba spermií (Reece, 1998).

Samčí pohlavní ústrojí, v němž se vyvíjí a dozrává spermie, se skládá z 6 hlavních částí: varle, nadvarle, chámovod, šourek, přídatné pohlavní žlázy a pyj (Reece, 1998).

Varlata (*testis*) jsou párovým orgánem, v němž se v již zmíněných stočených semenotvorných kanálkách tvoří spermie (Najbrt a kol., 1982). Zde spermiím zajišťují ochranu a výživu Sertoliho buňky neboli podpůrné buňky. Tento název mají z funkce úzkého kontaktu všech vývojových stádií spermie. Ve varlatech se vyskytují také buňky Leydigovy neboli intersticiální. Varlata jsou uložena v kožním vaku zvaný šourek (*scrotum*). Šourek má za úkol pomocí hladkosvalové vrstvy buněk přitahovat varlata k břišní stěně při chladných

vnějších podmínkách. Varlata jsou nejprve uložena v břišní dutině, ale postupem vývoje sestupují do šourku, pokud však nesestoupí jedno či obě varlata do šourku označíme vadu za kryptorchismus (Kliment a kol., 1983; Reece, 1998).

V nadvarletí (*epididymis*) se spermie ukládají, dozrávají, až nabudou schopnosti se pohybovat dopředu a získávají oplozovací schopnost. Nadvarle má 3 části: hlavu, tělo a ocas. Doprava spermií do hlavy nadvarlete se uskutečňuje pomocí tekutiny ze semenotvorných kanálků, která se zde částečně vstřebá. Přibližně 70 % vyprodukovaných spermií se ukládá v ocasu nadvarlete. Jejich velká část každodenně odchází spolu s močí (Najbrt a kol., 1982; Kliment a kol., 1983; Reece, 1998).

Chámovod (*ductus deferens*) tvoří spojnici mezi ocasem nadvarlete a pánevní částí močové trubice, tudíž slouží k převodu spermií z nadvarlete do močové trubice (Najbrt a kol., 1982; Reece, 1998). Během ejakulace se peristalticky smršťuje (Kliment a kol., 1983). Je ukončen žláznatým rozšířením zvaných ampule chámovodu. Je součástí tzv. semenného provazce, spolu s ním jej tvoří i varletní tepna a žíla, nerv, lymfatické cévy a sval vnitřního zdvihače varlete. Společně jsou obaleny útrobním listem poševního obalu, kterým jsou obklopeny také varlata a nadvarle (Reece, 1998).

Přídavné pohlavní žlázy (*glandulae genitales accessoriae*) jsou složeny z několika částí. Již zmíněná ampule chámovodu, měchýřkovité žlázy, prostata (předstojná žláza) a bulbouretrální žlázy (Cowperovy žlázy). Všechny žlázy produkují sekrety. Jejich směs se nazývá semenná plazma. Ta se při ejakulaci promísí se spermatem a tekutinou z nadvarlete a tvoří semeno. Bez semenné plazmy by spermie nebyla schopna v prostředí samičího pohlavního ústrojí přežít a získávají tím větší oplozovací schopnost. Je složena z velkého množství elektrolytů, fruktózy, kyseliny askorbové a mnoha dalšími vitamíny. Nedílnou úlohu zde hrají prostaglandiny, je jim přisuzována dvojitá oplozovací schopnost. A to reakce s hlenem děložního krčku a jeho uzpůsobení k průniku spermií a druhou funkcí je iniciace kontrakcí hladké svaloviny pro posun spermií přes dělohu a vejcovody k vaječnům. Závěrem lze konstatovat, že pouze pár desítek spermií se přiblíží k vajíčku, ale úspěšného oplození dosáhne jen jedna jediná spermie (Kliment a kol., 1983; Reece, 1998).

Kopulační orgán, jenž dopravuje sperma do samičího pohlavního ústrojí, se nazývá pyj (*penis*). Sperma prochází močovou trubicí stejně jako moč. Přednostně je vyplněn tkání zvanou topořivé těleso, což je seskupení krevních sinusů oddělených listy vazivové tkáně způsobující erekci neboli ztopoření. Za klidného stavu je penis esovitě ohnutý a při erekci se vyrovná na délku až 1m u býka. Na ztopoření mají vliv také autonomní a stydké míšní

nervy končící v žaludu penisu. Reflexní centra jsou jak v žaludu penisu, tak i v bederní oblasti páteřní míchy. Výživa a přísun kyslíku je zajišťován pyjovou tepnou. Konec pyje jeho volná část je obklopena a chráněna vchlípenou kožní duplikaturou tzv. předkožkou (*preputium*) (Najbrt a kol. 1982; Kliment a kol., 1983; Reece, 1998).

Na rozvoj samčího pohlavního ústrojí a jemu příbuzné má vliv hormon testosteron. Vytváří a udržuje libido, má vliv na sekreci přídatných pohlavních žláz a vývin sekundárních samčích pohlavních znaků (typické znaky a chování) (Reece, 1998).

### **3.5.1 Posouzení vnějších pohlavních orgánů**

K vyšetření vnějších pohlavních orgánů se používají 2 metody, adspekce a palpace (Hofírek a kol., 2009). Při palpaci se musíme zaměřit i na citlivost orgánů, jelikož tím odhalíme případnou bolestivost a zánět. Veškeré patologické stavy mají negativní vliv na plodnost samce. Například zánět na šourku narušuje jeho termoregulační schopnost a průběh spermiogeneze (Věžník a kol., 2004). Zprvu se společně zkontrolují varlata a nadvarlata, jejich tvar, velikost, uložení v ose a symetričnost. Jak jistě víme, varlata a nadvarlata jsou uložena vně těla v šourku. Palpací zjistíme volnost jejich uložení, stejnorodost parenchymu varlat a okraje nadvarlat. Za obvyklých podmínek je parenchym varlat elastický s odpovídajícím napětím (tenze). Poměr spermiogenetického epitelu (svou vrstevnatostí je kritériem maxima) a intersticia (svou strukturou je kritériem minima) určuje tenzi nebo turgor varlat (Věžník a kol., 2004). Taktéž nadvarlata se kontrolují palpačně, jejich velikost a náplň. Podobně i semenné provazce, ty se však mohou posuzovat i adspektivně.

Vyšetření penisu a sliznice předkožkového vaku se provádí adspektivně pouze po vzeskoku na fantom, v krajním případě se za použití anestetik provede arteficiální prolaps penisu (Věžník a kol., 2004; Hofírek a kol., 2009). Kontroluje se povrch penisu, sliznice předkožky a přechod předkožky ve vnitřní slizniční list.

#### **3.5.1.1 Histologické vyšetření**

Histologický rozbor pomáhá diagnostikovat příčiny neplodnosti samců. Používají se 2 metody, biopsie a nekropsie. Umožňuje porovnání klinického nálezu, endokrinologického a spermiologického vyšetření s obecnou morfologií (Věžník a kol., 2004).

##### **3.5.1.1.1 Biopsie**

Vzorky parenchymu varlat se získávají *in vivo*. Více využívanou metodou je excise poněvadž nedochází k narušení cévního řečiště jako u punkce, kde bývá získaný vzorek

poškozen. Při punkci se zavede speciální kanyla s jehlou do parenchymu varlat. Naopak u excise se otevře povrch varlete a speciálním řezem se vzorek odejme. Zjistíme tak, zda k aspermii a těžkým oligospermii došlo poruchou spermiogeneze nebo obliterací vývodných cest (Věžník a kol., 2004).

#### 3.5.1.1.2 Nekropsie

Vzorek tkáně se odebírá po smrti zvířete při současném patologickém vyšetření. Aby došlo ke správné analýze je třeba vzorek vložit do fixační tekutiny do 20 min po porážce zvířete. Po této době může dojít ke změnám a ztížení diagnostiky (Věžník a kol., 2004).

#### 3.5.1.2 Bakteriologické a parazitologické vyšetření

Výsledkem je potvrzení, že ejakulát není infekční a že neobsahuje nežádoucí mikroby, jež by negativně působili na funkci spermií. Vyvarujeme se tak možnosti vytvoření zánětu a přenosu na plemeni. Poznáme tak i kvalitu hygieny chovu a odběru spermatu. Příkladem nežádoucích-patogenních mikroorganismů jsou: *Campylobacter fetus*, *Trichomonas fetus* (IBR), dále *chlamydia*, *mykoplasma*, *ureaplazma* apod. (Věžník a kol., 2004). Ejakulát nesmí obsahovat mnoho dalších patogenů, včetně plísňů.

Vzorek nabraný přímo ze sběrače do sterilní pipety s objemem 1 - 1,5 ml ihned odešleme do laboratoře, kde provedou mykologickou analýzu do 3 hodin a bakteriologickou do 6 hodin po odběru vzorků (Věžník a kol., 2004).

#### 3.5.1.3 Rentgenologické a ultrasonografické vyšetření

Pro vyšetření býka se používá zřídka, při výskytu neplodnosti se býk stejně vyřazuje z plemeni a provádí se posmrtné vyšetření. Je však praktický pro vyšetření cystických či abcesdujících nálezů v pohlavních orgánech (Hofírek a kol., 2009).

#### 3.5.1.4 Endokrinologické vyšetření

Hodnotí se úroveň samčích pohlavních hormonů, především testosteronu (androgenů). Kvalifikovat můžeme dle vyvinutí pohlavních orgánů, sekrece přídatných pohlavních žláz a kvalita ejakulátu. Stanovuje se v kombinaci s koncentrací LH a FSH. Množství testosteronu v periferní krvi se několikrát mění během dne od 0,5 do 10 ng/ml, v průměru je koncentrace testosteronu 6,7 ng/ml (Hofírek a kol., 2009).

### 3.5.2 Funkční testy

Pokud je jedinec pohlavně dospělý vyskytuje se u něj pohlavní pud a je schopen uskutečnit pohlavní akt. Období puberty, kdy je jedinec schopen produkovat ejakulát a kdy dojde i k jeho stabilizaci je pro každý živočišný druh rozdílný. Pohlavní dospělost býka nastává ve věku 8 – 10 měsíců, ale na ejakulát s ustálenými hodnotami musíme počkat ještě min. 2 měsíce do věku 12 měsíců (Věžník a kol., 2004).

#### 3.5.2.1 Testikulární biometrie

Díky této diagnostice lze zavčas detekovat vrozené i získané změny varlat, kvůli kterým býka vyřadíme z plemenitby. Každý býk by měl být před jeho zařazením do plemenitby takto vyšetřen. Hodnotí se délka varlat včetně nadvarlat, délka varlat a hlavy nadvarlat, délka varlat, tloušťka varlat (kranio-kaudální osa), šířka varlete (medio-laterální osa), duplikatura kůže *skorta*. Standardní rozměry býčích varlat jsou: šířka 7 - 7,4 cm, délka 10,5 - 11,4 cm. Rozměry se postupně věkem mění a až v dospělosti se téměř ustálí (Věžník a kol., 2004).

#### 3.5.2.2 Tenzimetrie varlat

Pro objektivní měření turgoru parenchymu varlat se používají tonometry. Věžník a kol. (2004) uvádí průměrné napětí 85,3 V u býků používaných v inseminační stanici. V přítomnosti většího množství patologických spermií dochází ke snížení tenze.

## 3.6 Semeno

Semeno neboli sperma či ejakulát lze obecně popsat jako tekutinu, jež tvoří semenná plazma s obsahem buněčné složky tj. spermií. U býka tvoří semenná plazma 90 – 95 % z celkového objemu ejakulátu a je produkována především přídatnými pohlavními žlázami. Na konci kopulace nejprve sekret z bulbouretrálních žláz změní pH v samičím pohlavním ústrojí a poté je jednorázově vypuzeno sperma. Poprvé se spermie objevují u býka v pohlavní dospělosti, což je věk 8 - 10 měsíců (Kliment a kol., 1983; Marvan a kol., 2007) nebo v širším horizontu 7 - 12 měsících věku (Louda a kol., 2007).

Jak již bylo řečeno, tvorbu spermií zajišťují semenotvorné kanálky ve varlatech. Na tuto funkci i na funkci přídatných pohlavních žláz mají vliv vnější i vnitřní činitelé jako

například roční období, světlo, teplo, věk, úroveň výživy a ustájení, zdravotní stav a reprodukční zatížení jedince (Marvan a kol., 2007).

### 3.6.1 Spermie

Poprvé v roce 1824 Prevost a Dumas prokázali, že spermie není pouze zárodek a je schopná fertilizace. Tomu však předcházela rok 1677, kdy Ham jako první objevil spermie v ejakulátu, ale považoval je za parazitující zárodky. Detailněji byla spermie popsána až s příchodem elektronového mikroskopu na přelomu 19. a 20. století. Nevyužité spermie, neproběhne-li ejakulace, degenerují, odumírají a následně se resorbují (Kliment a kol., 1983).

Dají se stanovit 3 základní funkce spermie, dopravit se na místo oplození, proniknout přes *zonu pellucidu* a *coronu radiatu* a předat otcovský genetický materiál. (Kliment a kol., 1983).

### 3.6.2 Spermatogeneze

Výsledkem spermatogeneze, k níž dochází v semenotvorném kanálku, je spermie (Louda a kol., 2007; Zemanová a kol., 2005). Dochází k přeměně kmenových buněk, tzv. zárodečných epitelových buněk na spermie (Reece, 1998). Proces spermatogeneze je velmi citlivý na vlivy (látky a faktory), jež ji mohou ovlivnit, které se na jiném orgánu v těle nemusí projevit. Přitom varle se samotné snadno regeneruje a adaptuje (Zemanová a kol., 2005).

Pro spermatogenezi je potřebná nižší teplota, než je teplota těla. Ta je zajišťována těsným kontaktem žíly a tepny (meandrovitě stočené) vycházející z varlete – jinak řečeno, žilná krev vycházející z varlete ochlazuje tepennou krev vstupující do varlete a tím ochlazuje varlata (Reece, 1998). Pokud je teplota okolí po delší dobu nad 25 °C nebo pod 6 °C tak dochází k poruchám spermiogeneze (Louda a kol., 2007). Pokud je býk starší 2 - 6 let, dochází u něj ke snížení spermatogeneze (Hahn a kol., 1969).

Stručně lze charakterizovat spermatogenezi jako proces dvou druhů dělení. Prvním je mitóza, při tomto dělení u nově vzniklých buněk setrvává diploidní počet chromozomů (2n počet chromozomů). Naopak u meiózy, druhého typu dělení, má nově vzniklá buňka haploidní (poloviční) počet chromozomů (n počet chromozomů) než buňky při mitotickém dělení (Reece, 1998).



Jak již bylo zmíněno, na začátku dělení buňka obsahuje jeden pár chromozomů. Každý z chromozomu je složen z 2 chromatid spolu spojených a tím mají duplikované geny (Reece, 1998). Mateřské semenné buňky tzv. spermiogonie jsou výchozím stádiem spermatogeneze, které vznikají mitotickým dělením ze zárodečných buněk - gonocytů. Ze spermiogonie, u bazální membrány kanálků, je oddělena spermatogonie A, která migruje Sertoliho buňkami do vrstvy buněk u dutiny kanálku, se dělí a vzniká několik spermiogonií typu B (Reece, 1998; Věžník a kol., 2004). Z jediné spermatogonie A u býků vzniká 64 spermatid (Reece, 1998). Dalším dělením se tvoří mladé primární spermioocyty I. řádu s diploidním počtem chromozomů. Probíhající meiotická profáze (má stádia: preleptotenní, leptotenní, zygotenní, pachytenní a diplotenní) je po ukončení nahrazena diakinezí a buňka se začíná vřetenovitě dělit. Tyto stádia dělení se nazývají: premetafáze, metafáze, anafáze a telofáze, na jejichž konci vzniknou dva sekundární spermioocyty s haploidním počtem chromozomů (dvě spojené spermatidy příslušného chromozomového páru (Reece, 1998)) a jedním sexchromozomem. Jeden s X a druhý s Y chromozomem (Věžník a kol., 2004).

Pokračující druhá fáze meiotického dělení spermioocytů II. řádu má stádia: interkineze, profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Konečným dělením vzniknou dvě spermatidy, ty se dále nedělí, naopak u nich dochází k morfologické přeměně, tzv. spermiohistogenezi nebo spermatheliózi (Věžník a kol., 2004). Dojde k oddělení chromatid a vytvoření dvou duplicitních souborů genů. Z tohoto faktu lze diagnostikovat, že z mateřské spermatogonie má každá nově vzniklá spermatida polovinu genů. Tento proces změn můžeme nazvat spermioogenezi. Jelikož dochází k dozrávání spermie, vytváří se u ní bičík (flagellum) jež bude posléze zajišťovat spermii pohyb. Zatím jsou ještě nepohyblivé, přesunovány jsou tekutinou ze semenotvorných kanálků a *rete testis* a pohyby varlete do nadvarlete (Reece, 1998).

Aby došlo k finální podobě spermie, musí spermatidy projít následujícími stádii:

- iniciální (SI) - téměř bezezměn
- golgi-fáze (SG) - akrozóm vzniká aktivací golgiho aparátu
- Cap-fáze (SK) - fáze tvorby čepičky
- stádium akrozómu (SA) - současně se uvolní zbylá cytoplazma, vytvoří se spojovací část bičíku a dojde ke konečné morfologické přeměně. V lumen kanálku bičíky vytváří kompaktní kartáčový lem (Věžník a kol., 2004).

Frekvence iniciace germinativního cyklu trvá u býka 13,5 dne, podle Reece (1998) tento cyklus trvá 14 dní. Průměrná délka spermiogeneze u býka trvá 42 dnů, podle Věžníka

a kol. (2004) a podle Reece (1998) trvá 64 dnů. Býk denně produkuje přibližně  $6 \times 10^9$  spermií (Reece, 1998).

Ke spermatogenním cyklům dochází kontinuálně a to střídáním celkem 14 segmentů semenotvorných kanálků. Tímto procesem jsou tvořeny tzv. spermatogenní vlny, jež můžou v každém z kanálků proběhnout minimálně 15x (Reece, 1998).

### 3.6.3 Morfologie spermií

Spermie je díky své stavbě schopna samostatně žít, její funkce v přenosu genetického materiálu z plemeníka do plemenice (na potomka), která je uložena v jádře, má vliv i na konečný tvar hlavičky spermie (Věžník a kol., 2004). Zajímavý názor má Freneau et al. (2010), že morfologie spermií je odrazem zdraví semenných váčků.

Tvar hlavičky je, z pohledu zředu jako vajíčko a z profilu připomíná hrot psacího pera, v bázi široká, postupně se klínovitě zužující k apikální části a apikální část opět širší (Kliment a kol., 1983; Věžník a kol., 2004). Jádro hlavičky je vyplněno nukleoplazmou a je nositelem otcovského dědičného materiálu tzv. DNA (Kliment a kol., 1983). Hlavička je nasazená na krčku s předním uzlíkem (proximální centriol), na zadní uzlík nasedá spojovací část bičíku (distální centriol), na jejímž konci je umístěný prstenec. Bičík je vnořen do tzv. implantační rýhy na bazální části hlavičky. Slouží jako jakýsi kloubek. Od prstence pokračuje jen hlavní část bičíku se zúženým zakončením. Bičík je tvořen stočenými dutými vlákny. I když se tvar hlavičky liší mezi jednotlivými druhy zvířat, taktéž se liší i v rámci druhu, jeho základní tvar je v každém samci geneticky zakódován (Kliment a kol., 1983; Věžník a kol., 2004). Morfologii spermií zdokumentovalo již mnoho autorů např. Barth a Oko (1989), Freneau et al. (2000), Holroyd et al. (2002).

Na hlavičce je akrozóm čepičkovitého tvaru, který obklopuje přední část jádra a udává tvar hlavičky (Kliment a kol., 1983). Vzniká z komplexu buněčných organel, tzv. Golgiho aparátu. Je složen z 2 vrstev, jedné přiléhající k membráně jádra a vnější ležící pod plazmatickou membránou. Prostor mezi těmito dvěma vrstvami vyplňuje akrozomální hmota. U každého živočišného druhu se liší velikost a zakončení akrozómu. Býčí spermie má akrozómem pokrytou proximální část hlavičky (pokrývá přibližně 52 % dlouhé osy hlavičky) a je zakončena nerovnoměrným spojením obou vrstev akrozómu do měsíčkovi-  
tého tvaru (Kliment a kol., 1983; Věžník a kol., 2004). Zbytek hlavičky, její zadní část je pokryta postakrozómovou čepičkou nazývanou kalíšek. Za normálního stavu není akrozóm téměř viditelný. To se však změní, pokud dojde k narušení jeho cytoplazmatické membrá-

ny: začne absorbovat vodu a zvětší svůj objem (Kliment a kol., 1983). Roberts et al. (2010) hodnotili faktory, jež ovlivňují morfologii spermií, sperma bylo odebráno ve 320 dnech věku a hodnotili normální a patologické stavy. Množství patologických spermií stanovil Lagerlöf (1934) na 18 %, Goetz (1949) na 20 % a Anderson (1945) určil rozmezí 20 – 25 % patologických spermií a Eibl (1959) o něco méně 15 – 20 %. Výskyt změn na spermiích je velmi diskutovaným tématem mnoho let, jedním z prvních badatelů, kteří sestavili klasifikační kategorie je Lagerlöf (1936).

Z převážné části je spermie tvořena bílkovinami. Nejvíce argininem a menší zastoupení má histidin, lyzin, tryptofan, fenylalanin, metionin, treonin, isoleucin, valin, tyrozin, cystin, serin, kyselina glutamová a asparagová. Minerální látky tvoří 2 % z celkové hmotnosti, obsahuje také některé enzymy. Téměř jednu čtvrtinu (20 – 25 %) obsahu spermie zaujímá sušina (Kliment a kol., 1983).

Rozměry spermií dle Věžníka a kol. (2000) s porovnáním od Klimenta a kol. (1983) jsou následovné: délka hlavičky je 9,11 / 8 - 10  $\mu\text{m}$  a šířka 5,05 / 4,25  $\mu\text{m}$ . Délka spojovací části bičíku je 14,8 / 14,84  $\mu\text{m}$  a hlavní části je 45 - 50  $\mu\text{m}$ , udávají oba autoři shodně. Celková délka bývá v rozmezí 68,9 - 73,9 / 72  $\mu\text{m}$ .

#### **3.6.4 Akrozomální reakce**

Čerstvě ejakulované spermie savců nejsou schopny ihned oplodnit vajíčko. Musí nejdříve nějaký čas setrvat v děloze nebo ve vejcovodu. Poté, po několika hodinách dochází ke kapacitaci spermií. Kapacitace neboli schopnost pohybovat se vpřed (progresivním pohybem) umožňuje spermiím dosáhnout akrozomální reakce a tím oplodnit vajíčko (Yanagimachi, 1994). K penetraci dochází při kontaktu s vajíčkem (Kliment a kol., 1983) a to přímo na *zoně pellucidě* nebo mimo oocyt, kde vznikne prvotní vazba (Louda a kol., 2007). Reakce pokračuje vnořením spermie do oocytu, dojde k rozpadu akrozomové membrány a uvolní se akrozomální enzymy (Kliment a kol., 1983). Aby mohla spermie vniknout přes *zonu pellucidu*, musí obohatit progresivní pohyb o otáčení kolem své podélné osy. K oplození dochází v horní části vejcovodu, kde se také progresivní pohyb ustálí a změně se na kruhový (Louda a kol., 2007).

Stanovení akrozomální integrity (celistvosti) je součástí kritérií hodnocení kvalitativních ukazatelů ejakulátů. Právě na akrozómu dochází k fertilizaci a následně ke kapacitaci spermií, tedy na jejich membráně (Věžník a kol., 2004; Louda a kol., 2007). Průběh akrozomální integrity hodnotil i Correa et al. (1997). Yanagimachi a Usui (1974) zjistili, že

ke kapacitaci není potřebný  $\text{Ca}^{2+}$  v mediu, avšak po jeho přidání do média nastoupila akrozomální reakce do 10 minut. Podobně i přidavkem heparinu došlo ke zefektivnění kapacity u býčích spermií (Parrish a kol., 1988; Park a kol., 1989).

V průběhu kapacity a akrozomové reakce se uvolňují některé bílkoviny a dále migrují. Jejich lokalizaci a identifikaci Valentovičová a kol. (2005) testovali pomocí monoklonálních protilátek (mAbs). Současně s tím testovali vliv daných protilátek na akrozomální reakci býčích spermií. Výsledky ukázali, že žádná z protilátek nestimuluje akrozomovou reakci u kapacitovaných býčích spermií. Pouze jediná protilátka inhibovala úroveň akrozomové reakce na 20 %. Závěrem lze konstatovat, že vliv protispermiových protilátek na akrozomovou reakci pravděpodobně závisí na konkrétní molekule rozpoznané protilátkami a její význam v procesu kapacity a akrozomové reakce.

K poškození akrozómu dojde velmi snadno, například patologickými změnami pohlavního ústrojí, změnou tlaku, teploty a pH, dále ředěním a konzervací. Za těchto okolností ztratí oplozovací schopnost (Kliment a kol., 1983).

### **3.6.5 Metabolismus spermií**

Spermie tvoří buněčnou složku semene. Její předností je schopnost žít mimo své „domácí“ prostředí. Výsledkem metabolismu spermií je energie, jež je potřebná pro motilitu spermií (Věžník a kol., 2004). Postupně se autoři zabývali myšlenkou, odkud se bere ta energie. Zjistili, že ji vytváří mitochondrie oxidací (Hogenboom, 1955). Vzniklá energie je potřebná v různých částech buňky, proto je potřeba transportní látky, která ji bude přenášet. Nejdůležitější je kyselina adenosintrifosforečná (ATP), vytváří tzv. makroergickou vazbu, což jsou snadno se štěpící chemické vazby s velkým obsahem energie. V buňce jsou místa, kde je značná potřeba ATP, proto se na nich vyskytují mitochondrie, jelikož zastávají hlavní funkci v syntéze ATP. Samotný přenos energie spočívá v přeměně hydrolýzou ATP na ADP (adenosindifosfát). Spouštěčem této vratné reakce je enzym adenosintrifosfátáza (ATPasa), která se vyskytuje v bičíku spermie (Věžník a kol., 2004).

Věžník a kol. (2004) stanovuje dvě stěžejní metabolické reakce, z nichž spermie získává energii, jsou jimi fruktolýza a respirace. Aerobní přeměna (oxidace) je závislá na mitochondriích naopak anaerobní štěpení glukózy může probíhat nespecificky. Vzniklá energie se schraňuje do makroergických vazeb během vzniku ATP z ADP a následným štěpením ATP se energie popustí a může být dále využita spermii, například aktivace pohybu bičíku. Jednoduché slovní schéma koloběhu ATP a ADP v buňce: v mitochondriích oxida-

tivní fosforylací vznikne z ADP ATP, to prostupuje do buněčných částí, jako je jádro a ribozomy, kde je energie spotřebována, zpětně dojde k defosforylaci a ATP se změní na ADP a to, navracené v mitochondriích, opakuje celý proces. Z bičíku se také uvolňuje mastná kyselina, jejíž oxidace dává spermii možnost respirace a pohybu (Kliment a kol., 1983).

Druhou možností jak nabýt energie je respirace (dýchání). Principem je přeměna kyseliny mléčné na kyselinu pyrohroznovou a následně na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Krajiní možností je oxidace intracelulárního zásobního materiálu (Věžník a kol., 2004).

### **3.6.6 Motilita spermií**

Smyslem tohoto vyšetření je zjistit množství pohybujících se spermií. Výsledné hodnoty udáváme v procentech, buďto z výpočtu pohybujících se spermií nebo bodovým odhadem. Ejakulát je nutno před stanovením naředit. Pro býky je používám fyziologický roztok pufrovaný fosfátovým pufrem na hodnotu pH 6,8 a na koncentraci 100 000 spermií/ml. Hodnocení musí probíhat na předem vyhřátém podložním sklíčku, o teplotě 35 – 37 °C (38,5 °C), kde kapičku ejakulátu pozorujeme pod krycím sklíčkem při zvětšení 200 - 400x. Pro větší přesnost se sledují 3 zorná pole, na každém se sleduje i charakter pohybu a to ve smyslu směru a velikosti kmitu hlavičky spermie. Pro nás prvořadý je progresivní pohyb vpřed. Kolem své podélné osy vykoná spermie 3 - 15 otáček/s (Kliment a kol., 1983; Hofírek a kol., 2009). U býka je minimální mezní hodnota pro použití v inseminaci 70 %. Toleruje se 60 % motilita u začínajících mladých býků (Hofírek a kol., 2009). Za nežádoucí pohyby považujeme: kruhový, trhavý či přerušovaný, oscilační (na místě) a případně protisměrný (Věžník a kol., 2004). Avšak pro oplozovací schopnost není důležitá pouze rychlost pohybu, ale spíše jeho trvanlivost. Průměrná rychlost býčí spermie je 7,3 mm/min. (Kliment a kol., 1983). Motilitu narušuje tzv. aglutinace (shlukování) spermií (Hofírek a kol., 2009).

Možností stanovení motility je také pomocí trajektorie zvané LUCIA. Systém využívá snímání 10 obrazů v odstupech 2,4 s a následně vyhodnotí množství pohyblivých a nepohyblivých spermií. Minimálně musí být zhodnoceno 200 spermií (Věžník a kol., 2004).

Další objektivní analýzou je poloautomatická počítačová metoda CASA. Ta se začala přibližně od roku 1986 více využívat pro hodnocení kvality spermií (Holt, 1996). Obraz je snímán opticky a v digitální formě je přenášen do počítače ve formě pixelů. Kromě pohyblivosti je analyzována také dráha spermie. Stanovuje se 8 parametrů pohybu a podle nich

se rozdělují do 3 kategorií na nepohyblivé, lokálně pohyblivé a pohyblivé. Pohyblivé se ještě dělí na nelineárně pohyblivé, hyperaktivní spermie a cirkulárně pohyblivé (Věžník a kol., 2004). Tuto stejnou metodu zkombinovali Penfold et al. (1998) s průtokovou cytometrií spermie X a Y. Pohyb se lišil dle koncentrace, při nižší hodnotě byl sledován pohyb rychlejší a rovnější vpřed. I když je chromozom X větší než chromozom Y, tudíž obsahuje více DNA, nezjistilo se, že by měli rozdílnou rychlost pohybu (Johnson et al., 1989). Ale dříve než došli k tomuto závěru, předpokládali, že se rychleji bude pohybovat menší spermie s chromozomem Y (Johnson, 1992). Poprvé popsal separaci X a Y chromozomu dle obsahu DNA Cran et al. (1993). Nakonec zjistili, že spermie s chromozomem Y se nepohybují rychleji než spermie X (Penfold et al., 1998).

Pomocí Thomovy komůrky se zjišťuje rychlost pohybu spermií, tzv. test propulsivity. Smyslem této analýzy je doba, za kterou se promigruje 100 spermií oběma směry měřeným prostorem (0,05 x 0,02 mm). Opět je používána koncentrace 100 000 spermií/ml, včetně pufru a hodnoty pH jako v základní metodě (fosfátový pufr a pH 6,8). Průměrná rychlost spermií pro býky je  $80 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  (Věžník a kol., 2004; Hofírek a kol., 2009).

### 3.7 Inseminace

Historie umělého oplodnění sahá až do 14. století do arabských zemí, kde byl proveden první přenos semene do několika klisen (Kliment a kol., 1983). Další klisna byla uměle oplodněna v 17. století S. Wammerdamem. Posléze se Leeuwenhoek zajímal o samotný oplozovací děj, ale specifikován byl až o 150 - 200 let později. V 18. století proběhly další úspěšné inseminace klisen Hunterem. Nenechal se dlouho čekat do 19. století a metodu umělého oplodnění začali bádát i humánní lékaři. Na začátku 20. století v Dánsku odebrali sperma do speciálního kondomu vyrobeného z močového měchýře prasat a následně jej stříkačkou importovali do dělohy klisny v době říje. O 3 roky později byla první zmínka o ředění, Hofmann začal ředit sperma čerstvým mlékem. Předchůdce umělé vagíny vymyslel Amantea v roce 1914. Prvním významným vědcem a průkopníkem s prokazatelnými výsledky inseminace byl Ivanov. Od této doby se začala velmi rychle rozšiřovat a především v posledních 30 letech 20. století a rozšířila se u většiny druhů hospodářských zvířat (Kliment a kol., 1983). A v roce 1947 byly založeny první inseminační stanice (Hofírek a kol., 2009).

V Československu v roce 1919 profesor Sigmund inseminoval klisny a později vydal knihu "Umělé oplozování savců". Krávy byly poprvé inseminovány v roce 1936 Kloboukem a poté Příbylem. Až po roce 1949 došlo v Československu k celostátnímu rozvoji inseminace (Kliment a kol., 1983).

Pro rozvoj užítkovosti hospodářských zvířat je důležitá řízená reprodukce (management). Přes 50 let se po celém světě umělá inseminace využívá ke zlepšení genofondu užítkových vlastností zvířat a veterinární péče o reprodukční proces a využívání biotechnologických metod řízení reprodukce (Zemanová a kol., 2005). Proto je inseminace mrazeným spermatem velmi rozšířená v chovu skotu (Iritani, 1980).

Kladný ekonomický význam má inseminace především ve snížení počtu býků, potřebných pro danou úroveň reprodukce, dále zamezení pohlavních nákaz, tedy zlepšení zdravotního stavu (Hofírek a kol., 2009). Dříve byla inseminace považována za drahou a časově náročnou metodu, ale jelikož byla velkým přínosem pro chovatelskou činnost, snažili se vymyslet co nejjednodušší přesnou a spolehlivou metodu posuzování (*in vitro*) potenciální plodnosti býků, jako je tomu dnes (Gillan et al., 2008). Přesto se s inseminací více setkáváme u stád s mléčnou produkcí nežli u stád bez tržní produkce mléka (BTPM), kde převládá přirozená plemenitba, pokud se nejedná o šlechtění plemenných býků. První odběr lze u býka provést ve věku 10 - 12 měsíců věku a do plemenitby se může zařadit ve věku 14 - 16 měsíců. U dojeného skotu se přirozená plemenitba používá u problémových krav (Louda a kol., 2007).

Podle zákon č. 154/2000 Sb. O šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat musí každý býk mající působit v plemenitbě, ať přirozené či inseminací, po základním výběru, být bonitačně ohodnocen speciální výběrovou komisí, jež je určena příslušným svazem chovatelů. Takovému býku bude udělena licence – „státní registr plemenného býka“ jako celoživotní označení, které se zaznamenává na ID a do karty plemenic. Ejakulát může být zpracován, splňuje-li požadavky vyhlášky Mze ČR 471/2000 Sb. (Hofírek a kol., 2009).

Při vymezování šlechtitelského programu by měla být podmínka využít 20 – 25 % (30 %) ID (inseminační dávka) od mladých býků, tzv. testovací připarování. Mladí býci nesmí být starší 24 měsíců (Urban a kol., 1997). Pokud má býk nižší oplozovací schopnost, tak v přirozené plemenitbě zplodí méně potomků nežli v inseminaci, ale jejich plodnost bude také nižší. Tomuto se děje především u dojených plemen, u masných se sleduje natalita (Louda a kol., 2007).

ID se dávkuje do pejet o objemu 0,25 nebo 0,5 cm<sup>3</sup>, na které musí být zaznamenáno plemeno, jméno býka, státní registr, datum odběru, zkratka země a číslo stanice. Z jednoho odběru lze vyrobit i 300 ID. Aktivita spermií by neměla být nižší než 40 % a uchovávají se v tekutém dusíku -196 °C. Toto je způsob použití mrazeného sperma. Může se však inseminovat i čerstvé sperma (spotřeba ihned) nebo chlazené (krátkodobé uchování, např. pro převoz k plemenici) (Louda a kol., 2007).

Metody inseminace jsou rektální, vaginorektální či vaginální (Kliment, 1983).

### **3.7.1 Odběr ejakulátu u býků**

Při odběru ejakulátu je důležité získat celý objem v čistém stavu, neporušit životnost spermií, jejich morfologii a plodnost, zabezpečit zdravotní stav a plodnost plemeníka vlivem nepříznivých vlivů a přerušením přirozené plemenitby snížit možnost šíření pohlavních nákaz. Bylo nutné vynalézt nejlepší technologii odběru, která by se přizpůsobila individualitě plemeníka. V historii "vybírali" sperma ručně z pochvy samice, nástupcem byla suchá a čistá mořská houba, ale nebyly zajištěny kvalitativní podmínky (Kliment a kol., 1983).

Důležité je dbát na hygienu prostředí, ve kterém se odběr provádí, i na pomůcky pro odběr, jelikož ovlivňují kvalitu odebraného spermatu (Hofírek a kol., 2009).

Dnes známe 3 způsoby odběru ejakulátu u býků a to pomocí zkrácené umělé vagíny, elektroejakulací a masáží ampulí chámovodu.

#### **3.7.1.1 Umělá pochva**

V dnešní době nejčastěji používá metoda odběru ejakulátu je zkrácená, 30 cm dlouhá umělá vagína s jednorázovým sběračem (Louda a kol., 2007). Musí kopírovat fyziologické prostředí pochvy samice (teplotu, tlak a kluznost). První prototyp umělé vagíny zkonstruoval Milovanov v roce 1931 (Kliment a kol., 1983).

V době odběru by měla mít umělá vagína vnitřní teplotu 38 – 40 °C, Hofírek a kol. (2009) uvádí teplotu 39 – 42 °C, proto se do mezistěny vagíny nalije přibližně 100 cm<sup>3</sup> vody o něco vyšší než je daná teplota. Uvnitř vložený savý sterilní papír slouží k zachycení povrchových nečistot z umělé vagíny. Ještě se na dobu před použitím vkládá do 40 °C termostatu. Nakonec se vnitřek umělé vagíny vymaže sterilní vazelínou pomocí sterilní tyče a dofouknutím se vnitřní tlak upraví na hodnotu cca 530 kPa a na jednorázový sběrač se nasadí molitanová izolace o teplotě 35 °C (Kliment a kol., 1983; Bouška a kol., 2006; Louda a kol., 2007).



Pro zamezení znečištění spermatu po odběru ústí vagíny směřujeme dolů. V laboratoři poté dochází k posouzení kvality. Ještě ve sběrači se semeno naředí a postupně se zchladí (provede se tzv. ekvilibrace) (Louda a kol., 2007).

Pro vlastní odběr se používá atrapa (klidní býci střídající se po 4 odběrech nebo fantom), která nahrazuje říjící se plemenici, případně plemenice či jiný býk (Kliment a kol., 1983; Louda a kol., 2007). Před i po každém odběru se desinfikuje zád' atrapy a pečlivě se osuší. Předkožka musí být také pečlivě omyta vlažnou vodou a mýdlem a osušena buničinou. Při dostatečném vydráždění se nechá býk skočit a dorazit (Louda a kol., 2007). Doraz trvá přibližně 1 s, ale je silný a odběrový technik si musí dát pozor, aby mu býk umělou pochvu nevyrazil z ruky (Hofírek a kol., 2009). Odběry se provádějí v předem určenou dobu minimálně 3 hodiny po nakrmení. Četnost odběrů je optimálně 8 – 14x za měsíc, zohledňuje se však věk, neurokonstituční typ, kondice a zdravotní stav. Mladí býci do 2 let věku se odebírají 1x za týden (Louda a kol., 2007).

Postup řádného vyčištění umělé vagíny po každém použití popisuje profesor Louda a kol. (2007). Nejprve se propláchnou horkou vodou, vykartáčují ve 2 – 3 % sodného roztoku a vydezinfikují se. Následuje opětovný proplach horkou vodou a vysušení. Nakonec se vnitřek vydezinfikuje 96 % alkoholem a na 5 minut se ozáří germicidní zářivkou 15 W.

### 3.7.1.2 Elektroejakulace

Je to pasivní způsob odběru drážděním míchy (Kliment a kol., 1983). Nejčastější použití této metody je v případě, že zlepšující býk není ze zdravotních důvodů schopen odběru umělou vagínou. Při tomto způsobu odběru dochází ke zvýšení pH na 7,0 – 7,4 (zvýšením produkce uretrálních žláz), snižuje se aktivita spermií obsahem fruktózy (Louda a kol., 2007) a nemusí ani dojít k erekci (Kliment a kol., 1983).

Do rekta do oblasti semenných váčků zavedené tyčové elektrody o napětí 3 – 20 V a intenzitě 40 - 60 mA vyvolávají ejakulaci (Louda a kol., 2007). Dle Hofírka a kol. (2009) může být napětí maximálně do 100 V a intenzita až do 150 mA (začíná se na intenzitě 50 mA po dobu 10 s), což je oproti údajům Loudy a kol. (2007), dvou až tří násobek. Případně se dá využít i prstencových elektrod. Proces se opakuje 3 – 5x po dobu 3 – 5 sekund (Louda a kol., 2007).

### 3.7.1.3 Masáž ampulí chámovodu

Je to nejméně využívaná, rektální metoda odběru spermatu u býků a to pouze pro diagnostické účely. Odebrané sperma je méně kvalitní (Louda a kol., 2007). Lze vyvrátit ná-

zor, že by byl ejakulát méně kvalitní, jeho objem je vyšší než při odběru umělou vagínou, ale koncentrace spermií je nižší. Ideální je pro bakteriologické vyšetření či vyšetření poruch plodnosti (Hofírek a kol., 2009).

#### 3.7.1.4 Odběr ejakulátu krvavým způsobem

Tuto metodu popisuje Kliment a kol. (1983) jako chirurgický zákrok. Ze vzniklé píštěle se skleněnou nádobkou odebere čisté semeno z nadvarlat bez příměsí přídatných pohlavních žláz.

Pro experimentální účely se používá odběr ejakulátu punkcí z ocasu nadvarlete (Kliment a kol., 1983).

### 3.7.2 Hodnocení spermatu

Jedním slovem spermatoanalýza, díky níž zjistíme i funkční úroveň pohlavních orgánů. Zároveň si zkontrolujeme zdravotní stav a poruchy plodnosti jedince i stáda (Věžník a kol., 2004). Toto základní spermilogické vyšetření je důležité pro následné použití ejakulátu pro tvorbu ID (Kliment a kol., 1983).

Je skutečností, že se v mléčné populaci skotu zvýšil zájem o hodnocení býčích spermií, tedy plodnosti, a to z důvodu klesající úspěšnosti inseminace (Karoui et al., 2011).

Barva, konzistence, pach a další složky hodnocení jsou druhově specifické. Přežvýkavci mývají menší objem ejakulátu s vyšší koncentrací spermií oproti všežravcům a liškopytníkům (Marvan a kol., 2007).

Pro hodnocení kvality čerstvého ejakulátu se používají laboratorní metody (Kliment a kol., 1983). Žádná z nich však není spolehlivá k posouzení plodnosti býka, proto se používá komplex zkoušek (Hofírek a kol., 2009). Provádí se před zařazením býka do plemnitby. Dělíme je na makroskopické, mikroskopické, biologické a biochemické hodnocení. Součástí jsou i morfologické změny spermií, mikrobiologické vyšetření a fyzikálně-chemické zkoušky (Kliment a kol., 1983; Louda a kol., 2001; Bacinoglu et al., 2008). Životaschopnost hodnotil Januskauskas et al. (2000).

Tato vyšetření jsou důležitá pro vyloučení nákaz a chorob u plemeníků. Musíme se řídit požadavky na kvalitu dle normy ČSN 46 7111 „Sperma býka“ datovanou k srpnu 1996 a dle Státní veterinární správy ČR ze dne 5. 5. 1994 v metodických pokynech č. 4 (Věžník a kol., 2004; Hofírek a kol., 2009).

Čerstvý ejakulát nesmí obsahovat patogenní zárodky ani plísň (max. 5000 nepatogenních mikroorganismů v ID). Hodnocení provádí Státní veterinární ústav. Vzorek ve

sterilní pipetě o objemu 1 - 1,5 cm<sup>3</sup> musí být pro bakteriologické vyšetření doručen do 6 hod po odběru, pro mykologické vyšetření do 3 hod po odběru. Pro identifikaci se uvádí registr býka a protokol obsahující č. plemeníka, majitele, datum a místo odběru, důvod vyšetření (Louda a kol., 2001).

Věžník a kol. (2004) taktéž rozděluje analýzu na tyto kategorie:

- Orientační revize semene (pro zjištění objemu, barvy, pachu, obsahu přímísenin, hustoty, aktivity a morfologického obrazu).
- Funkční vyšetření spermií (porovnávají se hodnoty z momentální doby a poté po 120 minutách – testem přežitelnosti a to: aktivita, procento živých spermií, rychlost pohybu, aktivita endogenních reductáz a barvení).
- Test produkce testosteronu (porovnání základní hladiny testosteronu s hladinou po 90 minutách při aplikaci GnRH).
- Funkční posouzení pohlavních orgánů (opakované vyšetření hladiny testosteronu v rozmezí 14 dnů postupem jako předchozí test).

Tradiční posouzení *in vitro* kvality ejakulátu zahrnuje subjektivní posouzení motility, odhad podílu spermií s normální morfologií a odhad koncentrace spermií v 1 dávce. Jsou základními standarty pro ID (Rodriguez-Martinez, 2000).

### 3.7.2.1 Makroskopické hodnocení

Provádí se ihned po odběru ve sběrači pomocí smyslového hodnocení. Hodnotí se následující (shrnutí názorů Louda a kol., 2001 a 2007; Věžník a kol., 2004; Bouška a kol., 2006 a Marvan a kol., 2007):

- **Objem** – je velmi variabilní dle množství semenné plazmy, měří se v kalibrovaném válci na automatické laboratorní váze – v gramech (1 g odpovídá 1 ml ejakulátu (Hofírek a kol., 2009)) (Kliment a kol., 1983; Louda a kol., 2001) a v dělené pipetě pro malé objemy. Minimální mezní hodnota pro býka je objem 4 ml a stanovuje se z celého získaného množství, na rozdíl od jiných živočišných druhů (Věžník a kol., 2004). Hodnotu 4 ml udává Marvan a kol. (2007) jako průměrnou naopak Bouška a kol. (2006) a Kliment a kol. (1983) zmiňuje minimální objem 3 ml. Hodnotu 3 ml by měl vykazovat býk starší 2 let, mladší zatím jen 2 ml ejakulátu. Kdežto průměrný objem dospělého býka by podle Hofírka a kol. (2009) měl být 6 ml a rozmezí udává stejně jako Louda a kol. (2007) a to 3 - 12 cm<sup>3</sup>.

- **Konzistence, zrnitost**- zjišťuje se skrz procházející či dopadající světlo, husté – dobré kvality, neprůhledné, smetanového, mírně zrnitého vzhledu, shluky se pomalu pohybují,

shrnuto: hustá a zrnitá. Řídké- špatné kvality, vodnaté, průsvitné, bez zrnitosti (Kliment a kol., 1983; Louda a kol., 2001; Bouška a kol., 2006).

- Barva - proti světlu, dobré- bělavá – šedobílá či mírně nažloutlá (flavinová barviva v krmivu), jednoduše řečeno mléčná až smetanová barva, špatné je pokud je zbarvení žlutozelené či zelené, značí to příměs hnisu, moče a nežádoucích mikroorganismů či krve (Kliment a kol., 1983; Louda a kol., 2001; Bouška a kol., 2006).

- Pach - čichem ve sběrači, dobré – slabý specifický pach (kravské mléko-čerstvě nadojené), nazelenalé – moč, hnis-hnilobný (Louda a kol., 2001; Bouška a kol., 2006).

- Cizí příměsky - ideálně bez-chlupy, vazelína, nečistoty z předkožky, prach písek, neměli by být vůbec (Louda a kol., 2001; Bouška a kol., 2006). Jakékoliv příměsi jsou nepřijatelné (Hofírek a kol., 2009).

- pH – přežvýkavci mají mírně kyselé sperma, standardně 6,4 (6,5) – 7. Sníží-li se pH pod 5,5 spermie odumřou. Proto sekrety z přídatných pohlavních žláz musí vyrovnat kyselost v pohlavním ústrojí samice (Kliment a kol., 1983; Louda a kol., 2007).

### 3.7.2.2 Mikroskopické hodnocení

Mikroskopické posouzení ejakulátu se provádí již v laboratoři.

- Aktivita - Při hodnocení aktivity se klade důraz na progresivní pohyb. Je to pohyb směřující za hlavičkou, tzv. fertilizační schopnost čerstvého ejakulátu. Posuzuje se směr a rozsah kmitů hlavičky). Louda a kol. (2001) i Bouška a kol. (2006) stanovují stejnou minimální pohybovou aktivitu, která by měla být 70 %, při použití v inseminaci či konzervaci. Ovšem Louda a kol. (2007) také zmiňuje aktivitu již od 45 %. Vitální degenerace spermií je, pokud se zpomalí přímočarý pohyb a změní se na kruhový, poté na přerušovaný až pohyb ustane úplně. Mikroskopicky se určí procento spermií s progresivním pohybem. Nežádoucími pohyby jsou: kolébavý, kruhový, na místě-zpětný a shlukování (aglutinace) (Kliment a kol., 1983). Schopnost pohybovat se progresivně hodnotili také jiní autoři (Zhang et al., 1998; Januskauskas et al., 2000).

- Vířivost - se zjišťuje z nativního vzorku. Je to rychle se střídající pohyb ve vlnách. Pohyb může být velmi rychlý, pomalý nebo bez vířivého pohybu (Louda a kol., 2001).

- Hustota - koncentrace je množství milionů spermií v 1 mm<sup>3</sup>. Liší dle druhu zvířete i věku. Závisí také na funkční aktivitě semenoplodného epitelu varlat, zdravotním stavu pleménika, jeho připravenosti a na technice odběru. Zjišťuje se pomocí Bürkerovy komůrky (hemocytometricky (Věžník a kol., 2004; Hofírek a kol., 2009)), fotometricky nebo

odhadem. Odhad se využívá v polních podmínkách při přirozené plemenitbě. Dle hustoty se dělí na velmi husté, kde obsah spermií v  $\text{mm}^3$  je nad 1,5 mil., husté: 1 - 1,5 mil. spermií/ $\text{mm}^3$ , středně husté: 0,7 (0,5) - 1 mil./ $\text{mm}^3$  (hodnota 700 000 spermií/ml slouží jako základní ukazatel koncentrace pro inseminaci (Věžník a kol., 2004; Bouška a kol., 2006; Hofírek a kol., 2009)), řídké: 0,2 - 0,7 (0,5) mil./ $\text{mm}^3$ , oligospermie (ojedinělé) pokud je opakovaně nízká koncentrace spermií do obsahu 0,2 mil./ $\text{mm}^3$ . V poslední řadě se může vyskytovat i ejakulát bez spermií (aspermie), ani živých ani mrtvých, obsahující pouze výměšky (Kliment a kol., 1983; Louda, 2001). Marvan a kol. (2007) udává množství souhrnně (rozmezí 0,2 - 2 mil./ $\mu\text{l}$ ) a tudíž se z výše uvedenými autory shoduje, taktéž i Louda a kol. (2007) s hodnotami 0,8 - 2 mil./ $\mu\text{l}$ . Celkové množství spermií v ejakulátu býka se pohybuje mezi 4 - 10 miliardami a Louda a kol. (2007) stanovuje rozmezí o něco vyšší na 5 - 15 miliard.

- Osmotický tlak - popisuje se vysoká citlivost spermií na změny osmotického tlaku. Semenná plazma je isotonická, pokud se však zvýší tlak, ustane pohyb spermie. Dojde k bobtnání cytoplazmy a torzi bičíku. Proto se při ředění musí volit ředidla stejného tlaku a charakteru jako je plazma.

Jednoduchou a rychlou metodou k posuzování osmotické rezistence spermatu by dle Revell a Mrode (1994) mohla být následující: pokud čerstvé sperma inkubujeme 40 - 60 min při teplotě 35 °C ve fruktóze či citrátu sodném, bude výsledná osmolalita 150 mOsm/kg. Naopak naředěný ejakulát s odstředěným mlékem či žloutkem s přídavkem glycerolu bude mít osmolalitu 100 mOsm/kg.

### 3.7.2.3 Biologické zkoušky ejakulátu

Budou dále popsány jako samostatná kapitola.

### 3.7.2.4 Biochemické zkoušky ejakulátu

S využitím dehydrogenační zkoušky se posuzuje rychlost fruktolýzy k počtu pohyblivých spermií (Louda a kol., 2001).

### 3.7.2.5 Morfologické změny spermií

Morfologické změny způsobují poruchy plodnosti. Zemanová a kol. (2005) při svém pokusu stanovili hranici fyziologických změn na 20 %. Patologické změny by však podle Loudy a kol. (2007) neměly být vyšší než 5 %, výjimečně až 20 %. Chceme-li sperma po-

užit, nesmí dle Klimenta a kol. (1983) i Hofírka (2009) obsahovat víc než 20 % morfologicky abnormálních spermií.

Mikroskopicky byly hodnoceny vzorky od skupiny býků, beranů a hřebců. Z výsledků vyplývá, že všechny sledované skupiny zvířat mají kvalitní ejakulát. Procento patologických spermií u býků jim vyšlo v hodnotě 10,98 %, což odpovídá nejnižší průměrné hodnotě ze sledovaných skupin. Jako nejčastější patologickou změnu Zemanová a kol. (2005) uvádí oddělení hlavičky od trupu (bičíku). Další nejčastější změny jsou: retence cytoplazmatické kapky, torze bičíku, zlomený bičík, svinutý bičík a malá nebo velká hlavička.

Při morfologickém vyšetření musí mít veškeré pracovní náčiní přibližně stejnou teplotu jako vyšetřované sperma. Fyziologický roztok určený k ředění by neměl vyvolávat druhotné změny, ideální je roztok NaCl. Poměr ředění se určuje dle hustoty spermatu a to v poměru od 1:1 až do 1:20 (Louda a kol., 2001).

Změny vznikající během spermatogenního cyklu nazýváme změnami primárními. Dochází při nich k degenerativním formám spermií, změnám tvaru hlavičky, na akrozómu, v nukleoplazmě, změnám tvaru bičíku apod. (Louda a kol., 2001). Dále vývojové a tvarové anomálie degenerativního charakteru, patologické formy ve tvaru hlaviček, změny na akrozómu, změny v zadní části hlavičky, změny na spojovací části, patologické změny, nezralé spermie, změny v nukleoplazmě (Věžník a kol., 2004).

K sekundárním změnám dochází, pokud spermie delší dobu pobývá v ocasu nadvarlete, během ejakulace, při nevhodné manipulaci se vzorkem a příprava preparátu. Mění se: tvar hlavičky, akrozóm a vzniká torze bičíku (Louda a kol., 2001).

#### 3.7.2.6 Mikrobiologické vyšetření ejakulátu (Mikrobiotesty)

Provádí se, pokud dojde ke kontaminaci při odběru (Louda a kol., 2001).

#### 3.7.3 Ředidla

Ředidla musí splňovat podmínky prostředí vhodné pro spermie, aby se nesnížila jejich oplozovací schopnost a to po dlouhou dobu a mohla být použita pro větší množství plemenic (Kliment a kol., 1983). Veškerá hodnocení a testy kvality nám vyselektují kvalitní sperma, od kvalitních plemeniků. To se dále ředí různými ředidly, aby se navodilo vhodné prostředí k jejich uchování a výživě (Bouška a kol., 2006) a také pro získání více inseminačních dávek. U býků je požadovaná koncentrace spermií v 1 ml spermatu 10 miliónů spermií (Reece, 1998). Ředit se může pouze sperma o minimálním objemu 3 cm<sup>3</sup> u dospě-

lých býků nebo 2 cm<sup>3</sup> u býků mladých (Kliment a kol., 1983). Aby mohly být spermie uchovávány *in vitro*, vymysleli Phillips a Lardy (1940) žloutko-fosfátový pufr.

Za průkopníky ředidel se považují tělní tekutiny jako je lymfa, krevní sérum, sekret semenných váčků a ze sklivce oka, dále mléko a tekutý bílek. Dle jejich charakteristik byly Milovanovem v roce 1962 rozděleny do tří skupin. Na extendor (pro zvětšení objemu v čerstvém stavu s využitím 0,9 % roztoku NaCl), protektor (zvětšení objemu, zajištění výživy a ochrany), implementor (protektor + příznivě ovlivňující pohlavní orgány samic a oplození samotné). Další úspěšná ředidla měla základ v glukóze s různými přísadami. (Kliment a kol., 1983).

Ředidla mají hlavní úkol v ochraně spermií při chladovém šoku a podporují kryokonzervaci. Pro první účinek je důležitý obsah slepičího vaječného žloutku, mléka nebo přísadky Tris (hydroxymethyl aminomethan) (Foote, 1970). Použití kravského mléka pro zachování spermií uvedli i Thacker and Almquist (1951). V mléce má tlumivý účinek, na ztrátu lipidové membrány, kasein (Bergeron et al., 2007). Pro zjednodušení mikroskopického pozorování, byl ze žloutku oddělen cholesterol LDL (lipoprotein o nízké hustotě), jelikož má méně složité chemické složení než žloutek a samostatně je používán na ředění a udržení přežitelnosti spermií (Amirat et al., 2004).

Naopak kryokonzervace se neobejde bez glycerolu a cukrů (kryoprotektiva) (Hofírek a kol., 2009), jelikož glycerol chrání spermie před poškozením (Garner et al., 1999). Jako ideální pro zmrazování ejakulátu uvádí Rodriguez et al. (1975) koncentraci glycerolu 7 – 9 %. Awad (2011) se pokusil zaměnit glycerol za kryoprotektanty s nízkou molekulovou hmotností (methanol a ethylenglykol). Po kryokonzervaci pomocí analýzy CASA nezjistil rozdíl v použití methanolu nebo ethylenglykolu. Přesto se Mocé a Graha, (2006) pokusili otestovat účinek CLC (kombinace cholesterolu + cyklodextriny), jež přidali do nezředěného, čerstvého ejakulátu a tím potvrdili jeho kladný vztah pro vyšší přežitelnost spermií. A pro zvýšení obsahu glycerolu v membráně (Christian et al., 1997). Za ideální ředidlo však Takahashi et al. (2012) považuje standardní kombinaci žloutku či mléka s glycerolem.

Nejvíce využívaná komerční ředidla pro dlouhodobou konzervaci jsou Triladyl a Optidyl (Hofírek a kol., 2009). A Glen et al. (1956) zveřejňuje další organický pufr a to citrát sodný. Složení je z Tris přísadky, fruktózy, kyseliny citrónové, slepičího žloutku, glycerolu a přísadky antibiotik (např. linkomycin, spektinomycin, linkospektin...) (Hofírek a kol., 2009). Bylo zjištěno, že antibiotika zvyšují fertilitu ejakulátu, při využití pro inseminaci (de Jarnette et al., 2004). Přídavek antibiotik je zkoumán mnoha autory, Akhter et al.

(2007) testovali vliv GTLS (gentamycin + tylosin + linco-spectin) na plodnost býka. Své výsledky porovnávali s tradičně používanými antibiotiky streptomycin a penicilin (SP), které dříve zkoumala řada vědců (Hussain et al., 1990; Ali et al., 1994; Sansone et al., 2000; Andrabi et al., 2001). Ve výsledku nezjistili vyšší plodnost při použití GTLS oproti SP. Celeghini et al. (2008) porovnali komerční ředidla Bioxcell® s Botu-Bov® u nějž prokázali vyšší pohyblivost spermií. Autoři Gacitua a Arav (2005) neprokázali zlepšení plodnosti ani použitím ředidla Andromed do promytého ejakulátu. Taktéž promytý ejakulát byl naředen přídávkem Tris, jež prodloužit přežitelnost spermií při pokojové teplotě (Bomstein a Steberi, 1959).

Hotové ředidlo se otestuje s kapkou spermatu, zda nedojde ke snížení motility, poté se postupným přimícháváním naředí celý ejakulát a opět se zkontroluje motilita. Je-li vše v pořádku, dávka se automaticky naplní do pejet (Hofírek a kol., 2009).

Bousseau et al. (1998) se zabývali možností kontaminace ejakulátu bakteriemi nebo mykoplazmou při použití komerčních ředidel s přísadami živočišného původu (vaječný žloutek, mléko). Porovnávali 3 ředidla, 1. bez živočišného přídávku (Biociphos Plus), 2. s přídávkem vaječného žloutku a 3. s přídávkem vaječného žloutku a mléka. Z výsledků je patrná mírná kontaminace ředidel s živočišnými přídávky, naopak ředidlo bez přídávku nebylo vůbec kontaminováno.

Stupeň naředění (objem) nám udává aktuální koncentrace spermií s progresivním pohybem. Stanovíme jej, pokud počet spermií s progresivním pohybem v ml vynásobíme s objemem čerstvého ejakulátu v ml a s objemem ID v ml a vše vydělíme 40 000 000 (Hofírek a kol., 2009).

#### **3.7.4 Konzervace ejakulátu**

První zmínky o zmrazování spermatu v ČSSR bylo začátkem 60. let s použitím nejdříve tekutého, později tuhého CO<sub>2</sub>. V roce 1964 vynalezli hluboké zchlazení semene tekutým dusíkem na -196 °C a o 5 let později byly dávky mraženy v peletách. Smyslem konzervace je udržet energetický potenciál spermií a jejich elektrický náboj, aby v době použití mělo sperma funkci jako při odběru, tudíž prodloužit dobu jeho použitelnosti (Kliment a kol., 1983). Dle Hofírka a kol. (2009) se hluboké chlazení dusíkem připisuje až k roku 1972.



Kliment a kol. (1983) charakterizuje 4 metody mrazení: suchým ledem (-79 °C), kapalným kyslíkem (-183 °C), kapalným dusíkem (-196 °C) a příležitostně tekutým heliem (-296 °C).

Jelikož pokusy o hluboké mrazení spermatu tekutým dusíkem byly testovány již dříve, zaměřili se vědci také na látky, které budou chránit spermie proti zmrznutí, jedním z nejpoužívanějších je glycerin. Je schopen ovlivňovat tvar ledových krystalů, uložení a jejich pozdější nástup. Tyto látky jsou schopné zamezit nadměrné koncentraci elektrolytů a jiných látek, jež by negativně mohly působit na spermie. Doba absorbování glycerinu do spermie (ekvilibrace) je 4 – 18 hodin (Kliment a kol., 1983).

Sperma se aplikuje čerstvé nebo krátkodobě či dlouhodobě uchované. Pro spermie není typická změna teplot, jako se tomu děje při kryokonzervaci (Kliment a kol., 1983). I Vishwanath a Shannon (2000) potvrdili pokles plodnosti, jelikož mrazení přežije pouhá polovina spermií v ejakulátu. Poněvadž v průběhu chlazení i rozmrazování, nejčastěji při teplotě 0 až -40°C dochází k odumírání spermií (Kliment a kol., 1983). Současně Watson (1995) zařazuje teplotu jako jeden z hlavních stresorů konzervace, druhým je tvorba a rozpouštění ledových krystalů. Také Celeghini et al. (2008) potvrdili, že kryokonzervace zhoršuje funkci buněk, což může vést ke snížení plodnosti. Na Novém Zélandě zjistili, že lze skladovat čerstvý ejakulát až 3 dny při 5 °C v ředidle Caprogen 1 aniž by došlo ke snížení plodnosti, jako u mrazení (Verberckmoes et al., 2005). Na zlepšení zmrazení má vliv kombinace kyseliny linolové s albuminem (LAA) (Takahashi et al., 2012).

#### 3.7.4.1 Typy konzervace ejakulátů

Ejakulát můžeme zmrazovat buďto v peletách (pilulky zchlazené na suchém ledu o obsahu 0,1 cm<sup>3</sup> a skladované v tekutém dusíku), nebo dnes nejvíce využívaných pejetách (slámky-dutinky) (Kliment a kol., 1983). Saragusty et al. (2009) zjistil, že při použití skleněných kuliček, pro zamrazení spermatu, bude větší objem (1 - 1,25 mm) působit méně destruktivně na pohlavní buňky než běžně využívané objemy. Provádíme-li dlouhodobou konzervaci, ID jsou uchovávány o objemu 0,1 - 1 ml, nejčastěji v 0,25 ml hluboce chlazených pejetách (Hofírek a kol., 2009) či o objemu 0,5 - 0,25 cm<sup>3</sup>. Každá pejeta je označena registrem býka (kód plemene, číslo a značka registru; jméno býka, IBR status; kód země, č. býka v uchu; datum odběru ejakulátu; kód inseminační stanice). K rychlému zchlazení se využívá tekutého dusíku, kde nejprve se teplota snižuje o 5 °C za minutu do -10 °C a poté o 60 °C za minutu. V dnešní době se využívá k hlubokému mrazení žloutko-citrátové a

glycerinové ředidlo. Minimální aktivita nesmí klesnout pod 60 % a koncentrace pod  $10 - 12 \cdot 10^6$  spermií (Kliment a kol., 1983). Také Hofírek a kol. (2009) popisuje minimální koncentraci spermií v době inseminace 10 miliónů, což je aktuální norma v ČR. Tudíž v době mrazení musí 40 % spermií vykazovat progresivní pohyb.

Zmrazované sperma prochází postupnými fázovými změnami (Schneider a Mazur, 1984; Schneider, 1989). Sperma se nasaje do dutinek až do výšky 2 - 2,5 cm od kraje, kde se zanechá vzduchová bublina pro případné zamezení odzátkování. Po 2 - 6 hodinové (Hofírek a kol., 2009) nebo dle Klimenta a kol. (1983) po 12 - 16 hodinové ekvibrace (rozšíření a průnik kryoprotektiv do buněk) při 1 - 3 °C se vloží do speciálních košíků zátkami dolů, 7 minut se nechají zmrazit na hladině dusíku, poté se na 5 min úplně ponoří do tekutého dusíku. Následně se v individuálních kelímkách skladují v kanystrech v kontejnerech s dusíkem. Po 30 sekundovém rozmrazení pejety v 38 °C vodní lázni se osuší a inseminují (Kliment a kol., 1983). Hofírek a kol. (2009) uvádí postup částečně rozšířený a to takto: po zchlazení na 3 °C se vloží do mrazícího tunelu a v parách kapalného dusíku se zchladí na -80 až -130 °C do 10 minut. Tyto zmrazené dávky se uloží do zásobníků do tekutého dusíku o teplotě -196 °C. Kontrolní test motility se uskuteční 2. až 3. den po uskladnění, minimální požadovaná aktivita je 30 %. Při kladném výsledku se dávky uloží na 28 dní do karantény, kdyby u býka vzešly příznaky nebezpečného onemocnění, poté se může expedovat.

Roy et al. (1990) popisuje průběh zmrazování jako děj, při kterém dochází ke změně buněčného objemu. Jelikož všechny kroky (ředění, balení, zmrazení, skladování, rozmrazování, inseminace) mají specifický vliv na buněčnou membránu. Například teplota je nejznámějším faktorem ovlivňujícím fyzikální vlastnosti membrán spermií (Mc Elhaney, 1986; Carrutjers a Melchior, 1988a,b; Quinn, 1989). Na druhém místě je změna objemu, především přidáním glycerolu (Armitage a Mazur, 1984; Armitage, 1986; Fiser a Fairfull, 1989). V neposlední řadě dojde ke změně struktury membrány spermie (Knox et al., 1980; Steponkus a Lunch, 1989).

Nově testovanou metodou bylo v posledních letech dvojí zmrazení ejakulátu, kdy se nejprve zmrazil celý objem ejakulátu, následně rozmrazil, nadávkoval do pejet a opět zamrazil. V porovnání s klasickou metodou mrazení byl u dvojího mrazení pouze 1 býk lepší. Ale je hodnocena jako do budoucna vhodnou metodou pro uskladnění ID (Saragusty et al., 2009a). Shoduje se s Gacitua a Arav (2005), podle nich je tato metoda vhodná k udržení biologické rozmanitosti. Zmrazili stejným způsobem 8 ml ejakulátu a poté jimi insemino-

vali plemenice. Úspěšnost oplodnění byla 45 % oproti 60 % úspěšnosti inseminace čerstvým ejakulátem.

### **3.7.5 Biologické zkoušky ejakulátu**

Při těchto testech záleží na porušenosti cytoplazmatické membrány. Hodnotí se odolnost vůči různým nepříznivým vnějším vlivům, biologická hodnota a oplozovací schopnost (Bacinoglu et al., 2008). Jelikož kryokonzervace zahrnuje fáze změn teplot, je vhodné provádět testy na odolnost vůči tepelnému i chladovému šoku (Watson, 1995).

#### **3.7.5.1 Krátkodobý tepelný test přežitelnosti**

V teplém prostředí spermie rychle ztrácí aktivitu (Louda a kol., 2001). Dochází k postupnému zahřívání zkumavky, s obsahem ředěného či neředěného ejakulátu na 38 °C ve vodní lázni. V intervalu 1 hodina (nejčastěji 6x opakované) odebíráme ze zkumavky vzorek, z něhož vyhodnotíme aktivitu. V teplém prostředí dochází k rychlému vyžití spermií a snížení aktivity. Za biologicky hodnotnější považujeme ejakuláty s delší absolutní životností s lepší oplozovací schopností. Tepelný test zkoumali i např. Januskauskas et al. (2000); Maurya a Tuli (2003); Gillan et al. (2008); Beran et al. (2012).

#### **3.7.5.2 Dlouhodobý chladový test přežitelnosti**

Principem metody je ve 24 hodinových intervalech kontrolovat aktivitu spermií z naředěného spermatu, jež je uložený v chladničce při teplotě 1 – 3 °C. Používá se mikroskopu s vyhřívanou destičkou. U dobrého spermatu je přežitelnou min. 50 % i po 96 hodinách (Januskauskas et al., 2000; Louda a kol., 2001; Gillan et al., 2008).

#### **3.7.5.3 Zkouška rezistence spermatu**

Postupným přidáváním 1 % NaCl se snižuje progresivní pohyb, dokud neustane (Louda a kol., 2001).

Hodnocen může být stupeň naředění (metoda vzestupného ředění) nebo časová jednotka v minutách (metoda konstantního ředění do okamžiku, kdy ustane přímočarý pohyb v před za hlavičkou). Rezistenci testoval na býčím a beraním spermatu Blackshaw (1953).

#### **3.7.5.4 Zkouška živých spermií na odolnost vůči chladovému šoku**

Reakce na rychlé zchlazení - % živých (nezabarvených) spermií vyjadřuje odolnost (Obr. 1, 2) (Louda a kol., 2001). Tuto metodu testovali také Januskauskas et al. (2000) a

Gillan et al. (2008). Citlivost spermií závisí také na složení fosfolipidové membrány a obsahu cholesterolu ve fosfolipidech (Holt, 2000).

Chladový šok způsobuje nezvratnou ztrátu motility, tomu se dá předejít přidáním kryoprotektiv (ochranných látek), např. vaječný žloutek (Chantler et al., 2000). Další možností je přídavek glycerolu. Jelikož spermie s přirozeně vyšším obsahem glycerolu (králík, člověk) jsou více odolné vůči chladovému šoku, nežli spermie s nižším obsahem glycerolu (hřebeč, beran, býk) (Watson, 1981; Parks a Lunch, 1992; White, 1993).

### 3.7.6 Metody barvení

Množství živých a mrtvých spermií se stanovuje pomocí barvicích metod. Principem je narušení nebo změna povrchové membrány hlavičky spermie a její celistvost. Permeabilita se zvýší, pokud spermie odumře, tudíž mrtvé spermie budou obarvené (Kliment a kol., 1983; Věžník a kol., 2004). Při barvení je důležitá kvalita barviv, dodržení technologického postupu a uložení barviv. Hlavní barvicí metody jsou: barvení Giemsou (formalinový fixační roztok + Giemsky roztok a Sörensův fosfátový pufr = modrofialové zbarvení akrozóm a světlá zadní část hlavičky), metoda Wels X (brilantní či Janusová zeleň = zjištění dědičných akrozomálních defektů) a barvení dle Karrassa (metachromová žluť + Viktoriánská modř = akrozóm je blankytně modrý a bičík světle žlutý) (Kliment a kol., 1983). Další používanou metodou je barvení fluorochromy. Lze použít barviva Primulin nebo Propidium jodid v určitých koncentracích. Při použití prvního barviva se hlavičky mrtvých spermií zbarví fluorescenčně žlutě a živé jsou tmavě-černé jakoby podsvícené. Naopak u druhého barviva jsou mrtvé spermie zbarveny červeně a živé mají jemnou autofluorescenci. Výsledek taktéž vyjádříme procentem živých a mrtvých spermií (Věžník a kol., 2004; Hofírek a kol., 2009).

#### 3.7.6.1 Stanovení podílu živých a mrtvých spermií

V našem případě bylo využito kombinace barviv eosin - nigrosin. Eosin je 1 % (0,5 % dle Hofírka a kol. (2009)) roztok s fosfátovým pufrem o pH 6,8 pro býka. Naopak nigrosin se ředí s destilovanou vodou na 10 % roztok (Věžník a kol., 2004). Tuto metodu barvení doporučuje k hodnocení morfologie spermií i Hancock (1951).

Postup této metody je velmi snadný a proto je často používána (Tanghe et al., 2002) a je dále popsán v metodice práce. Objem ejakulátu z kapiláry smícháme s jednou kapkou (20  $\mu$ l) eosinu, po dobu 30 s promísíme a poté přidáme 2 kapky (40  $\mu$ l) nigrosinu. Pokud necháme působit eosin déle, může na spermie působit degeneračně. Z této směsi dáme ka-

pičku na podložní sklíčko a vytvoříme roztěr. Necháme zaschnout a poté sledujeme pod světelným mikroskopem. Živé spermie mají hlavičku bílou, buďto celou nebo její spodní část. Mrtvá spermie má celou hlavičku zbarvenou nebo její spodní část. Výsledek vyjádříme procentem živých spermií. Býk může vykazovat maximálně 30 % mrtvých spermií (Věžník a kol., 2004; Hofírek a kol., 2009).

## 4 MATERIÁL A METODY

---

### 4.1 Charakteristika býků

K pokusům byli vybráni 4 býci různých plemen chovaných na jedné inseminační stanici:

1. NEO 178, ORTY, Holštýnské plemeno, nar. 3. 9. 2010, (3 vzorky ejakulátu).
2. NEO 141, CHOICE, Holštýnské plemeno, nar. 16. 6. 2010, (3 vzorky ejakulátu).
3. ZAA 729, ROCKY, Aberdeen Angus, nar. 1. 4. 2008, (1 vzorek ejakulátu).
4. ZGA 400, XAVER, Galloway, nar. 6. 3. 2009, (1 vzorek ejakulátu).

Datum odběru, aktivita, hustota a množství zjištěné při odběru je znázorněno v Tabulce 1.

### 4.2 Příprava ředidel

Byl hodnocen vliv složení komerčních ředidel AndroMed, Triladyl (obě od firmy Minütube Germany) a Bioxcell (od firmy IMV France) dostupných na českém trhu a přídavku LDL cholesterolu o různých koncentracích.

K přípravě ředidel byl použit čistý dialyzovaný LDL z vaječného žloutku, komerčně vyráběná ředidla (Triladyl, Bioxcell, AndroMed) a deionizovaná voda.

Nejprve se přes filtrační papír přefiltroval vaječný žloutek, který se použil na přípravu kontrolních vzorků ředidla Triladyl. Zbylé vzorky byly namíchány se stanovenou koncentrací LDL. Triladyl byl namíchán v poměru 1 (koncentrát): 3 (voda) : 1 (žloutek či LDL). Ředidla AndroMed a Bioxcell byly namíchány v poměru 1 (koncentrát) : 4 (voda) pro kontrolní vzorky, do zbylých byla přidána stanovená koncentrace LDL. Zpracování ředidel a ejakulátu probíhalo v prostorách chladicího boxu.

Ředidla byla připravena dle návodu výrobce a rozdělena na 3 díly a do každého se přidal cholesterol LDL o určité koncentraci (Tab. 2).

### 4.3 Odběr a zpracování spermatu

V průběhu 8 týdnů byly odebírány vzorky ejakulátů od vybraných býků standardním postupem do umělé vagíny. Bylo použito celkem 8 vzorků ejakulátů (viz výše), které splnily vstupní požadavky k následné konzervaci. Vstupní hodnocení bylo prováděno školeným personálem laboratoře inseminační stanice dle standardní metodiky. Ejakulát byl nejprve zhodnocen senzoricky na přítomnost nežádoucích přímísenin a zápachů. Dále byla na fotometru SPEKOL II. změřena hustota ejakulátu, zvážením na digitální automatické váze Scout Pro od firmy OHAUS bylo stanoveno jeho množství a aktivita byla hodnocena pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem MEOPTA subjektivní metodou. K dalšímu zpracování bylo použito pouze sperma o hustotě minimálně  $0,7 \times 10^6$  v  $\text{mm}^3$ , s minimální aktivitou 70 % (přímočarý pohyb za hlavičkou, odpovídající rychlosti).

Pozitivně hodnocené ejakuláty byly transportovány při 4 °C do laboratoře Katedry veterinárních disciplín k dalšímu zpracování.

Vzorky ejakulátu byly rozpipetovány pomocí sterilní pipety do sterilních na 4 °C vychlazených a popsaných zkumavek (Tab. 2). Připravená ředidla byla před vlastním použitím vložena na 10 min. do chladničky (4 °C). Dané množství ředidla bylo aplikováno sterilní injekční stříkačkou přímo do zkumavky se vzorkem. Poté byly zkumavky uzavřeny sterilní zátkou, jemně promíchány a vloženy do chladicího boxu (4 °C).

### 4.4 Hodnocení odolnosti k chladovému šoku

Z každého vzorku byly postupně naplněny 3 kapiláry o objemu 0,1 ml, které byly na jednom konci uzavřeny pomocí plastelíny. Poté byly kapiláry uloženy na deset minut do chlazené lázně (No Ice od firmy Fischer Scientific®) o teplotě 0 °C. Po uplynutí inkubace byl smíchán na předehřátém hodinovém skle obsah kapiláry s 20  $\mu\text{l}$  eosinu, krouživými pohyby byl jemně promícháván po dobu 30 s a poté bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  nigrosinu. 20  $\mu\text{l}$  vzniklé suspenze se nanoslo na předehřáté podložní sklíčko a byl vyhotoven nátěr. Uvedený postup byl zopakován po 2 hodinách inkubace vzorků ve vodní lázni při 37°C.

Barvivo eosin prostupuje buněčnými stěnami mrtvých spermií (ty jsou pak celé červené), oslabené spermie jsou částečně červené (či narůžovělé). Živé spermie zůstávají bílé. Touto metodou byl stanoven procentuelní podíl živých (včetně oslabených) a mrtvých spermií ve vzorcích.

Po zaschnutí byly nátěry mikroskopicky zhodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem při zvětšení 1000x za použití olejové imerze. Celkem bylo hodnoceno 720 preparátů. Z každého preparátu bylo napočítáno 100 spermií, ze kterých se procentuálně vyjádřila přežitelnost (procento živých a mrtvých spermií a rozdíl mezi nimi v čase 0 a po 2 hodinách).

#### 4.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Získané údaje sem průběžně zapisovala do programu MS Excel, tím byly připraveny ke statistickému zhodnocení. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu SAS (SAS/STAT® 9.1., 2009), za použití metod MEANS, CORR a GLM.

Pomocí modelu byly hodnoceny vlivy jednotlivých faktorů na zvolené ukazatele přežitelnosti.

$$Y_{ijk} = \mu + B\acute{Y}K_i + VZOREK_j + e_{ijk}$$

$Y_{ijk}$ .....naměřená hodnota závisle proměnné (procento živých spermií v čase 0 a 2 hod. testu, rozdíl mezi těmito dvěma hodnotami)

$\mu$  .....průměrná hodnota závisle proměnné

$B\acute{Y}K_i$ .....vliv fixního efektu i-tého plemenného býka (i = 1 - Býk 1, n = 3; 2 - Býk 2, n= 3; 3 - Býk 3, n= 1; 4 - Býk 4, n= 1)

$VZOREK_j$  .....vliv fixního efektu j-tého vzorku (j =1 – EA4, n = 48; 2 - EA6, n = 48; 3 – EA8, n = 48; 4 – EB4, n = 48; 5 – EB6, n = 48; 6 – EB8, n = 48; 7 – ET10, n = 48; 8 – ET6, n = 48; 9 – ET8, n = 48; 10 – K1A, n = 48; 11 – K1B, n = 48; 12 – K1T, n = 48; 13 – K2A, n = 48; 14 – K2B, n = 48; 15 – K2T, n = 48)

$e_{ijk}$ .....reziduální chyba

Statistická průkaznost byla hodnocena následovně:

- \* statisticky nízce významný rozdíl - 95% ( $P \leq 0,05$ );
- \*\* statisticky vysoce významný rozdíl - 99% ( $P \leq 0,01$ );
- bez významnosti.



## 5 VÝSLEDKY

---

### 5.1 Celkový počet živých a mrtvých spermií

Z každého vzorku byly vytvořeny 3 preparáty, celkem tedy v čase 0 bylo vytvořeno 360 vzorků (24 vzorků od každé pokusné varianty). Stejným způsobem bylo po 2 hodinách vytvořeno také 360 vzorků. Celkový počet vzorků byl 720 ks za 8 odběrových dnů. V čase 0 vyšla minimální přežitelnost 23,27 % a maximální 93,20 % s průměrnou životaschopností 74,19 %. Po 2 hodinové inkubaci byla minimální hodnota 0 %, maximální 89,25 % a průměrná hodnota 52,91 %. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou v čase 0 a po 2 hodinách je 21,27 % (Tab. 3).

### 5.2 Výsledky statistiky dle býků

Nejlepších výsledků, bez ohledu na typ ředidla dosáhl býk č. 1. V čase 0 měl min. hodnotu přežitelnosti 45 %, max. 93,2 % a v průměru 81,6 %. Po 2 hod. dosahoval max. hodnoty 89,25 % a v průměru 57,43 %. S velmi malým rozdílem vyšly hodnoty 2. býka. V čase 0 měl min. přežitelnost 62,28 % a max. 92 %, v průměru 80,61 %. Po 2 hod klesla max. přežitelnost na 80,34 % s průměrnou hodnotou 56,47 %. Býk č. 3 měl min. přežitelnost v čase 0 56,36 %, max. 79,52 % s průměrnou hodnotou 70,35 %. Po 2 hod došlo opět ke snížení min. na 48,42 %, max. na 71,3 % a v průměru byla přežitelnost 61,26 %. Nejhůře dopadl býk č. 4. Procento přežitelnosti na začátku testu bylo 23,27 % a po 2 hod. 5,98 %. Maximum na začátku vyšlo 56,09 % a o 2 hod. 33,96 %. Průměrná hodnota na začátku byla 36,44 % a po 2 hod. 20,32 %. Osa v grafu 1 naznačuje postupný pokles průměrných hodnot.

### 5.3 Výsledky statistiky dle užitkového typu

Hodnotilo se 540 vzorků od mléčných plemen a 180 vzorků od masných plemen. Mléčná plemena mají vyšší přežitelnost spermií než plemena masná. Minimální hodnota v čase 0 vyšla pro mléčná plemena 45 %, maximum 93,2 % s průměrem 81,12 %. Po 2 hod inkubace byly hodnoty nižší, a to: minimum 0 %, maximum 89,25 % s průměrnou hodno-

tou 56,95 %. Masná plemena měla v čase 0 minimální hodnotu 23,27 %, maximální 79,52 % s průměrem 53,40 %. Po 2 hodinách kleslo minimum na 5,98 %, maximum na 39,81 % a průměr pouze na 12,61 % (Graf 2, 3).

## **5.4 Výsledky statistiky vlivu ředidla bez ohledu na koncentraci**

Každé ředidlo se hodnotilo obecně bez ohledu na koncentraci daného vzorku. Vzorky s různými koncentracemi byly hodnoceny společně a kontrolní vzorky byly zvlášť (Tab. 4).

### **5.4.1 AndroMed**

Vzorků se hodnotilo 144. Na začátku testu byla minimální přežitelnost vzorků 26,53 %, maximální však 91,89 % a v průměru 75,61 %. Po 2 hod inkubace kleslo minimum na 0 %, maximum se naopak udrželo na 80,55 % a průměr byl 57,01 %.

Kontrolních vzorků č. 1 (K1A) bylo celkem hodnoceno 48. Minimum bylo 30,43 %, maximum 93,2 % a průměrně hodnota činila 71,68 %. Po 2 hod došlo opět ke snížení přežitelnosti. Minimum 24,52 %, maximum 89,25 % a průměr byl 59,54 %.

Kontrolních vzorků č. 2 (K2A) bylo celkem také 48 kusů. Minimum bylo o něco vyšší než u K1A, tedy 33,03 %, maximum 91,67 % a průměrná přežitelnost byla 75,45 %. Po 2 hod inkubace kleslo minimum na 12,26 %, maximum na 70,34 %, s průměrem 51,89 %.

### **5.4.2 Bioxcell**

Počet vzorků i kontrol byl stejný jako u ředidla AndroMed. U vzorků, čase 0 byla minimální přežitelnost 30,90 %, maximum 92,38 %, s průměrem 75,63 %. Po 2 hod bylo minimum 0 %, maximum 81,03 % a průměr 54,72 %.

Kontrolní vzorky č. 1 (K1B) měly minimum na hodnotě 35,15 %, maximum na 88 % a průměr 72,55 %. Po 2 hod bylo minimum přežitelnosti 13,86 %, maximum 69,30 % a průměr 50,20 %.

Kontrolní vzorky č. 2 (K2B) vykazovaly minimální hodnotu 24,07 %, maximální 91,17 %, s průměrem 73,35 %. Po 2 hod došlo k mírnému snížení minima na 21 %, maxima na 73,94 % a průměru na 52,51 %.

### 5.4.3 Triladyl

Počet vzorků i kontrol byl opět stejný jako u ředidla AndroMed a Bioxcell. Vzorky měly na počátku testu minimum na hodnotě 23,27 %, maximum na 88,24 %, s průměrem 72,37 %. Po 2 hod bylo minimum 5,98 %, maximum 75,52 % a průměr 46,15 %.

Kontrolní vzorky č. 1 (K1T) měly minimum na hodnotě 40,18 %, maximum na 91,80 % a průměr na 74,34 %. Po 2 hod inkubace kleslo minimum na 14,95 %, maximum bylo 77,38 % a průměr 55,45 %.

Kontrolní vzorky č. 2 (K2T) měly na počátku testu minimum o 34,14 %, maximum 89,52 %, s průměrem 74,61 %. Po inkubaci 2 hod bylo minimum 7,89 %, maximum 75 % a průměr 50,47 %.

## 5.5 Výsledky statistiky vlivu koncentrace LDL v ředidle

Z grafu č. 4 je patrný průběh poklesů a vzestupů přežitelnosti vlivem koncentrace LDL v ředidle. Minimální hodnoty na začátku testu jsou v rozsahu od 23,27 % do 40,18 %. Významný pokles je u vzorku ET10 a od vzorku ET8 až k K1T dochází k vzestupu hodnot. Po 2 hodinách vzorky EA6 a EB4 klesly na 0 %, celkově došlo k velkému kolísání, včetně vzorku K1T, klesl na 14,95 %. Nejmenšího poklesu dosáhly vzorky EA8 (z 26,53 % na 24,19 %), EB8 (z 33,58 % na 24,5 %) a K1A (z 30,43 % na 24,52 %).

Maximálních hodnoty na začátku testu byly velmi vyrovnané, nejnižší maximální přežitelnost měl vzorek ET8 (86,84 %), nejvyšší maximum měl vzorek K1A (93,2 %). Druhý nejvyšší vzorek je EB8 (92,38 %). Nejvíce hodnot bylo v rozpětí 88 – 89 % a 91 – 92 %. Po 2 hodinové inkubaci došlo k největšímu poklesu u vzorku ET8 na 63,8 %, naopak nejméně poklesl vzorek K1A (89,25 %). Maximální hodnoty po 2 hodinách nekopírují křivku maximálních hodnot na začátku testu, ale kolísají různě.

Průměr na začátku testu byl velmi vyrovnaný u všech vzorků a to v rozmezí 71,68 % až 76,87 %. V průměru byl tedy v čase 0 nejlepší vzorek EB8, naopak nejhorší K1A. Po 2 hodinách hodnoty průměru už více kolísaly. Zajímavé, že vzorek K1A, měl na začátku testu nejnižší průměrnou přežitelnost a po 2 hodinách u něj došlo k druhému nejnižšímu poklesu jen na 59,54 %. Nejvyšší přežitelnost měl po 2 hodinách vzorek EA8 (61,27 %), naopak nejnižší 44,16 % měl vzorek ET8.

## 5.6 Vliv ukazatelů na přežitelnost spermií

### 5.6.1 Korelační analýza

V Tabulce 5 jsou uvedeny Pearsonovy korelační koeficienty mezi hodnocenými ukazateli kvality spermií a přežitelnosti spermií. Statisticky významné závislosti ( $P < 0,01$ ) byly detekovány mezi všemi hodnocenými ukazateli: býkem a typem užitkovosti, mezi býkem a počátečním časem testu a býkem a časem po 2 hodinách inkubace.

Mezi typem užitkovosti a dobou inkubace (na začátku testu i na konci) byla také detekována statisticky významná závislost. Taktéž i mezi počátečním časem testu a časem po 2 hodinové inkubaci.

Mezi býkem a typem užitkovosti a časem 0 s časem 2 byla korelační závislost kladná.

### 5.6.2 Vliv býka a vzorku (GLM Procedure)

Vztahy mezi sledovanými faktory a časem, mající vliv na přežitelnost spermií byly determinovány pomocí výše uvedené modelové rovnice. Průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů tohoto modelu jsou uvedeny v Tabulce 6. Koeficient determinace se pohyboval v rozmezí  $r^2 = 0,24$  až  $0,84$ .

Z této tabulky vyplývá, že vliv býka byl vysoce statisticky významný ( $P < 0,01$ ) na všechny sledované znaky.

Vliv vzorku, respektive přídavku LDL byl statisticky vysoce významný ( $P < 0,01$ ) na přežitelnost spermií po 2 hodinách testu a na rozdíl mezi přežitelností v čase 0 a 2 hod. testu. Na přežitelnost spermií v čase 0 hod. byl vliv vzorku statisticky nevýznamný ( $P > 0,05$ ).

### 5.6.3 Vliv býka

Výsledky vyhodnocení vlivu býka na přežitelnost spermií v čase 0 jsou uvedeny v Tabulce 7. Nejvyšší přežitelnost měl býk č. 1, 81,62 %, tudíž byl statisticky významně vyšší než statisticky průkazně nejhorší býk č. 4 s 36,44 % přežitelnosti. Mezi všemi býky byla statistická významnost na hladině významnosti  $P < 0,01$ .

Výsledné hodnoty času 2 jsou uvedeny v Tabulce 7. Kdy nejvyšší přežitelnosti dosáhl býk č. 3 (61,25 %) a nejnižší býk č. 4 (20,32 %), byl tedy opět průkazně nejhorší. Rozdíl průkaznosti byl mezi býkem č. 2 a č. 3 na hladině významnosti  $P < 0,05$ . Ostatní býci byli průkazní na hladině významnosti  $P < 0,01$ .

Rozdíl hodnot času 0 a času 2 je uveden v Tabulce 7. Všechny průkaznosti býků jsou na hladině významnosti  $P < 0,01$ . Čím má rozdíl nižší hodnotu, tím je býk lepší. Nejlepších výsledků dosáhl průkazně býk č. 3. Rozdíl jeho hodnot byl 9,09 %.

#### 5.6.4 Vliv vzorku dle koncentrace

Výsledky vyhodnocení vlivu koncentrace vzorku na přežitelnost spermií je znázorněno v Tabulce 8. Na začátku testu byla nejvyšší přežitelnost u vzorku EB8 (69,94 %), nejnižší měl vzorek K1A s 64,75 %. Po inkubaci měl nejvyšší přežitelnost vzorek EA8 s 57,22 % a nejnižší hodnoty 40,12 % dosáhl vzorek ET8. Rozdíl mezi začátkem testu a inkubací byl největší u vzorku ET8 (25,32 %), tudíž je průkazně dán jako nejhorší. Naopak za nejlepší vzorek byl detekován s 9,25 % K1A.

##### 5.6.4.1 Čas 0

Výsledky průkaznosti, na hladině významnosti  $P < 0,05$  byla detekována mezi vzorky EA4 : ET6 a ET8. Mezi EA8 : ET6, ET8 a K1A. Dále mezi EB6 : ET6, K1A, mezi EB8 : ET10, ET8, K1B a mezi K1A : K2A. Na hranici této významnosti se pohybovaly 2 páry vzorků a to: EA8 a K1B a mezi EB6 a ET8.

Výsledky průkaznosti, na hladině významnosti  $P < 0,01$  byly zjištěny mezi vzorky EB8 a ET6 a mezi EB8 a K1A. Ostatní vzorky nebyly statisticky průkazné.

##### 5.6.4.2 Čas 2

Výsledky průkaznosti, na hladině významnosti  $P < 0,05$  byly detekovány mezi vzorky EA4 : EA6, EB4, K1B, K2T, mezi EA6 : ET8, K1A. mezi EA8 : K2B a EB4 : EB6, EB8. Dále mezi EB6 : ET10; EB8 : ET10, K1B, K2T; ET8 : K2A, K2B a mezi K1A : K2A a K2B. Na hranici této významnosti byly detekovány korelace mezi vzorky ET10 a K1T, ET6 a K2B a K1B : K2B.

Výsledky průkaznosti, na hladině významnosti  $P < 0,01$  byly detekovány mezi vzorky EA4 : ET10, ET6, ET8, mezi EA6 a EA8, dále EA8 : ET10, ET8, ET6, K1B, K2A, K2T. Mezi EB4 : K1A; EB6 : ET6, ET8; EB8 : ET6, ET8; ET10 : K1A; ET6 : K1A, K1T; ET2 : K1A, K1T; K1A : K1B a K2T. Ostatní vzorky nebyly statisticky významné.

#### 5.6.4.3 Rozdíl

Výsledky průkaznosti, na hladině významnosti  $P < 0,05$  byly detekovány mezi vzorky EA4 : EB4, ET10, ET6; EA6 : EA8; EA3 : K1B a K2A. Dále byly korelace zaznamenány mezi vzorky EB6 : ET8; EB8 : ET8, K1A; ET6 : K1T mezi ET8 : K2B a K1A : K2B. Na hranici této průkaznosti byly detekovány korelace mezi vzorky EA4 : K2T; EB6 : ET6 a K1A.

Výsledky průkaznosti, na hladině významnosti  $P < 0,01$  byly detekovány mezi vzorky EA4 : ET8; EA6 : K1A mezi EA8 : EB4, ET10, ET6, ET8, K2T. Dále mezi EB4 a K1A; ET10 a K1A; ET6 a K1A; ET8 : K1A, K1T a mezi K1A : K1B, K2A a K2T. Ostatní vzorky nebyly statisticky významné.

## 6 DISKUZE

---

Provedený experiment přinesl do oblasti inseminace zajímavé výsledky. Použití extra-hovaného cholesterolu LDL z vaječného žloutku bylo již zkoumáno na různá ředidla, o různých koncentracích a potvrzováno tepelným testem či testem kryokonzervace, nýbrž použití testu chladového šoku bylo v tomto pokusu použito poprvé. Je důležité otestovat vliv tepla i chladu jako to stanovil Watson (1995) při svém pokusu kryokonzervace a Chantler et al. (2000) potvrdil ztrátu motility spermií, pokud nedošlo k přidání kryoprotektiva (vaječného žloutku) do ejakulátu. Chladový šok byl zkoumán i u přežitelnosti kančích spermií, za použití vaječného žloutku. Kladný výsledek připisují vlivu složení vaječného žloutku, tedy přirozenému obsahu LDL (Hu et al., 2006).

Celkové procento přežitelnosti spermií, ze všech odebraných vzorků bylo na začátku testu nad požadovaných 70 % a po inkubaci nad 40 %. Býci by tedy mohli být použiti k inseminaci.

To, který býk byl vyhodnocen z experimentu nejlépe, nebylo jeho smyslem, ale pro všeobecnou objektivitu se hodnotil vliv býka v čase. Na začátku testu byl nejlepší býk č. 1 (LSM 91,62 %  $\pm$  0,56 %), naopak po 2 hodinách měl nejlepší přežitelnost býk č. 3 (61,25 %  $\pm$  1,82 %), včetně nejmenšího rozdílu mezi prvním a druhým hodnocením (9,09 %  $\pm$  1,84 %). Mezi jednotlivými býky a časem byla vzájemná korelace, pouze mezi býkem 1 a 2 nebyla zaznamenána v žádném čase. Proto se dá říct, že rozdíl mezi býkem 1 a 2 nebyl po celou dobu testu nijak rozdílný. Ale že vliv býka je významný, především jeho individualita. To se nám potvrdilo testem průkaznosti, jehož hodnota byla statisticky vysoce významná ( $P < 0,01$ ) na všechny sledované znaky. Důvodem může být stejná plemenná příslušnost či stejný způsob odchovu. Jako tomu uvádí Hofírek a kol. (2009), i vliv prostředí na plodnost býků je významný.

Vliv býka, typu užitkovosti i času testu je důležitým faktorem přežitelnosti spermií. Veškeré ukazatele jsou statisticky významné a je mezi nimi zjištěná vzájemná korelace. Naopak interakce mezi býkem a ředidlem a ředidlem a extenderem nebyla statisticky významná, jak uvádí Muiño et al. (2007).

Pro test přežitelnosti spermií byly odebrány vzorky od mléčných i masných plemen. Pokus nám potvrdil vyšší přežitelnost u plemen mléčných. Tento výsledek se dá podložit i faktem, že u masných plemen je více využívána přirozená plemenitba, zajišťuje totiž bře-

zost ve stádě (lepší zabřezávání), ale použitím inseminací se může zvýšit genetický pokrok ve stádě (Zahrádková a kol., 2009).

Metodika pokusu tohoto testu byla stanovena dle standardních norem, proto ekvilibrace trvala 2 hodiny. Nedá se však usoudit, zda tato doba měla kladný nebo záporný vliv na výslednou přežitelnost spermií. Například Herold et al. (2006) testoval různé doby ekvilibrace, ale žádná neměla výrazný vliv na výsledný efekt, ale dospěl k závěru, že až 9 hodin může ekvilibrace probíhat, než bude ejakulát zpracován. Ale Leite et al. (2010) vyhodnotil za nejlepší ekvilibraci dobu 4 hodiny (oproti 0 či 2 hod).

Pokud se zaměříme na vliv určitého ředidla, bez ohledu na použitou koncentraci, tak by se dalo uvažovat, že Triladyl, jehož přidanou složkou je vaječný žloutek, tedy i LDL bude detekován jako nejlepší. Tomu tak však v našem testu nebylo. Na začátku testu měly nejlepší průměrné výsledky AndroMed (75,61 %) a Bioxcell (75,63 %) a nejhůře dopadl Triladyl se 72,37 %. Po 2 hodinách inkubace byla průměrná přežitelnost spermií u Triladylu podstatně nejhorší (46,15 %). Jediným vzestupem Triladylu je kontrolní vzorek K1T v čase 0. Kde dosáhl nejlepšího výsledku (74,34 %). Výsledky AndroMedu a Bioxcellu se ve všech hodnotách příliš neliší, pouze jen kontrolní vzorek K1A v čase 2 je o 9 % vyšší než u K1B.

Naše výsledky tedy dokazují, že po 2 hodinách inkubace Triladyl dosahuje nejhorších výsledků, při použití chladového testu. Naopak při kryokonzervaci se u něj potvrdila lepší přežitelnost po 2 hodinách po rozmrazení, pokud k němu byla přidána homogenní semenná plazma, než tomu bylo u AndroMedu s homogenní semennou plazmou (Herold et al., 2003). Přesto Triladyl dosahuje nejlepší životaschopnosti a nejhorší motility v porovnání s AndroMedem a Bioxcellem (Janett et al., 2005). Srovnáním Triladylu a AndroMedu bez přidané semenné plazmy se zdá, že vychází Triladyl jako nejlepší ředidlo, ale vzniká větší pravděpodobnost kontaminace, proto Herold et al. (2004) uvádí za vhodnější ředidlo AndroMed.

Rozdíl mezi Bioxcellem a Triladylem je detekován jako znatelný i po přidání LDL, bez rozdílu koncentrace. Triladyl se jevil nejhůře. Můžeme tento výsledek porovnat s Vera-Mouze et al. (2009), který udává zanedbatelný rozdíl mezi ředidly, ale významný vliv má obsah cholesterolu LDL.

Celkově tedy výsledky chladového šoku udávají jako nejvhodnější ředidlo AndroMed. Téměř ve všech testech u něj byly zjištěny nejlepší hodnoty. Zhodnocení daných koncentrací LDL se příliš neliší od výsledků účinnosti kontrolních variant ředidel. Za ideální kon-



centraci ředidla AndroMed, která dosáhla nejlepších výsledků, je 8 % přídavek LDL. Jeho hodnota LSM v čase 0 je o 0,6 % ( $\pm 1,36$  %) nižší než byla nejvyšší hodnota u EB8 (69,94 %  $\pm 1,36$  %) a v čase 2 dosáhl podstatně vyšší přežitelnosti než ostatní vzorky. Potvrzení, že nejvhodnějším ředidlem je pokusná varianta EA8 je rozdíl LSM mezi prvním a druhým měřením, který činil pouze 12,08 % ( $\pm 2,56$  %). To potvrzuje teorii Hu et al. (2010), že největší přežitelnost byla dosažena u koncentrace LDL 8 %, naopak k poklesu došlo u koncentrace 10 %. LDL se jeví jako vhodnější při použití těchto koncentrací, než aplikace 20 % obsahu vaječného žloutku. Hu et al. (2006), také při chladovém šoku u kančího ejakulátu, zjistil nejlepší koncentraci LDL 9 %, bez specifikace typu ředidla. Dá se tedy usuzovat, že koncentrace přídavku LDL vhodné pro býky budou vhodné i pro kance?

Naopak k největšímu propadu životaschopnosti došlo u pokusných variant Triladyly, u všech testovaných koncentracích (ET6, 8, 10). Bude to zřejmě z důvodu, že LDL u AndroMedu a Bioxcellu byl přidán jako kryoprotektant navíc do komplexního ředidla, zatímco u Triladyly byl chybějící žloutek nahrazen LDL a v podstatě tak Triladyl s LDL neobsahoval žádnou složku navíc.

Významný výsledek je minimální pokles přežitelnosti u kontrolního vzorku K1A. Po 2 hodinách inkubace u něj klesla přežitelnost pouze o necelá 4 %. U ředidla Bioxcell byly vzorky vyhodnoceny s lepší přežitelností než kontrolní vzorky. AndroMed byl na tom velmi podobně, pouze vzorek EA6 byl o 0,9 % horší než kontrolní vzorky. A u Triladyly byly zjištěny významně vyšší hodnoty LSM u kontrol než u vzorků, zhruba o 1,6 %. Po 2 hodinách byly výsledky téměř stejné, pouze vzorek EB4 byl o 0,8 % horší než kontroly. Při porovnání rozdílů mezi časem 0 a časem 2, jak již bylo uvedeno, byl celkově nejlepší výsledek u vzorku EA8 (12,07 %  $\pm 2,56$  %) a nejhůřší byl vzorek ET8 (25,32 %  $\pm 2,56$  %). U Bioxcellu byly vzorky EB6 a EB8 vyrovnané. Naše teorie ideální koncentrace 8 % LDL je podložena výzkumem Moussa et al. (2002). Z kontrol dopadla nejlépe K1A (9,25 %  $\pm 2,56$  %) a nejhůře K2T (21,25 %  $\pm 2,56$  %). Z těchto výsledků je tedy zřejmé, že obsah žloutku v kontrolních vzorcích Triladyly zvyšuje jejich přežitelnost oproti variantám bez žloutku a s LDL a je tedy jeho důležitou složkou.

Mezi většinou vzorků, především v čase 2, byly detekovány statistické průkaznosti (Tab. 8). Korelovaly mezi sebou na hladině významnosti ( $P < 0,01$  i  $0,05$ ). V čase 0, jich bylo však zaznamenáno nejméně.

Vliv vzorku, nebo spíše přídavku LDL byl statisticky vysoce významný, ale pouze v čase 2 a v rozdílu mezi časem 0 a 2 a to na hladině významnosti ( $P < 0,01$ ). Vliv LDL je

velmi významný, potvrzuje to i Vera-Munoz et al. (2011), při použití LDL bez a s přídavkem glycerolu. Oba tyto vzorky vykazovaly lepší motilitu, integritu plazmatické membrány i po 8 dnech inkubace. A přesto u nich nebyla pozorována žádná toxicita, jako tomu bylo například u ředidla Tris. Podobně, při chladovém testu zjistil Amirat et al. (2005), že po 4 hodinách inkubace při 4 °C bylo nejnižší poškození spermií při použití LDL (3 % poškození), ale nejvíce poškozeny (z 80 %) byly spermie naředěné Triladylem. Biociphos měl poškozeno 47 % spermií. A po rozmrazení byla u Triladyly 2x horší přežitelnost než u LDL a Biociphosu.

## 7 ZÁVĚR

---

Použití LDL protektoru je již velmi rozšířenou metodou pro lepší zachování životaschopnosti spermií. Většina experimentů však byla prováděna při kryokonzervaci. Naším cílem bylo zhodnotit stejné účinky i u použití dlouhodobého chladového testu přežitelnosti. Kombinací stanovených koncentrací LDL s komerčně vyráběnými ředidly se dosáhlo průkazných výsledků vhodnosti použití LDL jako kryoprotektantu. Jelikož kontrolní vzorky AndroMedu a Bioxcellu, bez přidaného množství LDL měly nižší životaschopnost než vzorky s obsahem 4 - 6 - 8 (10) % koncentrací LDL. Ale kontrolní vzorky Triladylu, s přídavkem žloutku, měly přežitelnost vyšší než u testovaných vzorků s LDL koncentracemi. Dá se tedy konstatovat, že přídavek vaječného žloutku je důležitým faktorem pro udržení přežitelnosti spermií, přesto použití pouze extraktu z vaječného žloutku (LDL, tedy cholesterolu o nízké hustotě) je vhodnější. Ředidla jej lépe přijímají, zřejmě z důvodu jednodušší chemické stavby, než má celý vaječný žloutek. Pro praxi je i vhodnější manipulovat s ampulkou koncentrovaného LDL než s vajíčky. I z důvodu sterility, která je vyšší u LDL (97 %) a tím je menší pravděpodobnost kontaminace ejakulátu.

Naše testy potvrdily lepší přežitelnost spermií během chladového testu u vzorků s použitím LDL protektoru. Zejména při koncentraci 8 %. Z použitých ředidel, 2 komerčních a 1 s přídavkem vaječného žloutku, je nejlepší pro budoucí použití aplikovat AndroMed. Na závěr našich výsledků lze konstatovat, že použití AndroMedu s přídavkem 8 % LDL by mělo zajistit nejvyšší přežitelnost býčích spermií v testu dlouhodobého chladového šoku. Tím se potvrdila námi stanovená hypotéza, že LDL bude mít kladný vliv na odolnost vůči chladovému šoku a zajistí lepší přežitelnost v průběhu dlouhodobého chladového testu.

V dalších pokusech by bylo příhodné se zaměřit na stanovené koncentrace LDL a potvrdit jejich vliv na specifických skupinách býků, například dle plemene, typu užitkovosti či způsobu odchovu. Zajímavý výzkum by se mohl odehrávat na porovnání vlivu LDL u mladých testovaných býků (první odběr) a porovnat s již prověřenými kvalitními býky (daného stejného věku či určitého odběru).

## 8 REFERENCE

---

AKHTER, S., SAJJAD, M., ANDRABI, S.M.H., ULLAH, N., QAYYUM, M., 2007: Effect of liquid buffalo bull semen. *Pakistan Vet. J.*, 27 (1), s. 13-16.

ALI, H., ALA-UD-DIN, SAMAD, H.A., ALI, S., SARBI, M.A., 1994: Comparative effects of combiotic, ampicillin and gentamycin sulphate on motility percentage liveability and absolute index of liveability in the buffalo bull semen. *Pakistan Vet. J.*, 14, s. 223-227.

AMIRAT, L., ANTON, M., TAINTURIER, D., CHATAGNON, G., BATTUT, I., COURTENS, J.L., 2005: Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low-density lipoproteins and triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129 (4), s. 535-545.

AMIRAT, L., TAINTURIER, D., JEANNEAU, L., THORIN, C., GERARD, O., et al., 2004: Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61, s. 895-907.

ANDERSON, J.A., 1945: The Semen of animals and its use for A.I. Inap. *Bur. Anim. Breed. Genet*, Edinburgh, s. 151.

ANDRABI, S.M.H., AHMAD, N., ABBAS, A., ANZAR, M., 2001: Effect on two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. *Pakistan Vet. J.*, 21, s. 166-169.

ANZAR, M. et al., 2002: Sperm apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull. Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biology of reproduction*, 66, s. 354-360.

ARMITAGE, W.J., 1986: Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiol.*, 23, s. 116-125.

ARMITAGE, W.J., MAZUR, P., 1984: Toxic and osmotic effects of glycerol on human granulocytes. *A. J. Psysiol.*, 247, s. C382-C389.

AWAD, M.M., 2011: Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 123, s. 157-162.

BACINOGLU, S., TAS, M., CIRIT, U., OZDAS, O.B., AK, K., 2008: The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and modified cervical mucus penetration test in the bovine. *Anim. Reprod. Sci.*, 104, s. 38-46.

BARTH, A.D., OKO, R.J., 1989: *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*, first ed. Iowa State University Press, Ames, IA.

BERAN, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J., LOUDA, F., ČÍTEK, J., DUCHÁČEK, J., 2012: Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bull's fresh ejaculate and AI doses after thawing. *Archiv Fur Tierzucht/Archives of Animal Breeding*, 55, s. 207-218.

BERGERON, A., BRINDLEY, Y., BLODNIN, P., MANJUNATH, P., 2007: Milk caseins decrease the binding of the major, bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.*, 77, s. 120-126.

BHAKAT, M., MOHANTY, T.K., RAINA, V.S., GUPTA, A.K., KHAN, H.M., MAHAPATRA, R.K., SARKAR, M., 2011: Effect of age and season on semen quality parameters in Shival bulls. *Trop Animal Health Prod.*, 43, s. 1161-1168.

BHOITE, U.Y., SUTAR, D.A., ULMEK, E.R., 2008: Studies on semen quality of crossbred bulls. *Indian Veterinary Journal*, vol.85, issue 4, s. 53-55.

BLACKSHAW, A.W., 1953: The motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension. *J. Gen. Physiol.*, 36, s. 449-462.

BOMSTEIN, R.A., STEBERI, E.A., 1959: Preservation of washed bovine spermatozoa in synthetic medium at room temperature. *Exp. Cell Res.*, 18, s. 217.

BOUSSEAU, S., BRILLARD, J.P., MARQUANT-LE GUIENNE, B., GUÉRIN, B., CAMUS, A., LECHAT, M., 1998: Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk source and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50, s. 699-706.

BOUŠKA, J., DOLEŽAL, O., JÍLEK, F., KUDRNA, V., KVAPILÍK, J., PŘIBYL, J., RAJMON, R., SEDMÍKOVÁ, M., SKŘIVANOVÁ, V., ŠLOSÁRKOVÁ, S., TYROLOVÁ, Y., VACEK, M., ŽIŽLAVSKÝ, J., 2006: *Chov dojeného skotu*, Profi Press, s.r.o., Praha, s. 186. ISBN 80-86726-16-9.

CARRTHERS, A., MELCHIOR, D.L., 1988a: Effects of lipid environment on membrane transport. The human erythrocyte sugar transport protein/lipid bilayer system. *An. Rev. Physiol.*, 50, s. 257-271.

CARRTHERS, A., MELCHIOR, D.L., 1988b: Role of bilayer lipids in governing membrane transport processes. In: ALOIA, R.C., CURTIN, C.C., GORDON, L.M., eds. *Lipid domains and the relationship to membrane function*. New York: Liss, s. 201-225.

CELEGHINI, E.C.C., PAES de ARRUDA, R., CESAR de ANDRADE, A.F., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F., RODRIGUES, P.H.M., 2008: Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reprod. Sci.*, 104, s. 119-131.

CORREA, J. R., PACE, M. M., ZAVOS, P. M., 1997: Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an AI program. *Theriogenology*, 4, s. 721-731.

CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., MILLER, N.G.A., COCHRANE, D., POLGE, C., 1993: Production of calves following separation of X and Y chromosome bearing sperm and in vitro fertilization, *Vetřev*, 132, s. 40-41.

Česko. Vyhláška MZe ČR, č. 471/2000 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) ve znění pozdějších předpisů. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2000. částka 135. Dostupné také z [http://www.pravnipredpisy.cz/predpisy/ZAKONY/2000/471000/Sb\\_471000\\_-----\\_.php](http://www.pravnipredpisy.cz/predpisy/ZAKONY/2000/471000/Sb_471000_-----_.php) >

de JARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E., LENZ, R.W., MONKE, D.R., AYARS, W.H., SATTLER, C.G., 2004: Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: The role of the artificial insemination industry. *J. Dairy Sci.*, 87 (E suppl.), s. E93-E104.

EIBL, K., 1959: *Lehrbuch der Rinderbesamung*, Berlin-Hamburg.

FISER, P.S., FAIRFULL, R.W., 1989: The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiol.*, 26, s. 64-69.

FOOTE, R.H., 1970: Fertility of bull semen at high extension rates in Tris buffered extenders. *J. Dairy Sci.*, 53, s. 1475-1477.

FRENEAU, G.E., CHENOWETH, P.J., ELLIS, R., RUPP, G., 2010: Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Anim. Reprod. Sci.*, 118, s. 176-181.

FRENEAU, G.E., PUOLI, J.R., BORJA, A.L.R., 2000: Índice de capacidade andrológica por pontos (ICAP) em touros Nelore: Estudo de estação de acasalamento em Mato Grosso do Sul. 2000. In: 37 th Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia Viçosa-MG. Anais, vol. V, s. 177-181.

GACITUA, H., ARAV, A., 2005: Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, 63, s. 931-938.

GARNER, D.L., THOMAS, C.A., GRAVANCE, C.G., 1999: The Effect of Glycerol on the Viability, Mitochondrial Function and Acrosomal Integrity of Bovine Spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, 34, s. 399-404.

GILLAN, L., KROETSCH, T., MAXWELL, W.M.C., EVANS, G., 2008: Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 103, s. 201-214.

GLEN, D., O'DELL, HURST, V., 1956: The effect on glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk, podium citrate and skim milk semen extenders. *J. Dairy Sci.*, 39, s. 1156-1160.

GOETZ, R., 1949: *Besammung und Unfruchtbarkeit der Haustiere*. Verlag Schaper Hannover.

HAHN, J., FOOTE, R.H., SEIDEL, JR, G.E., 1969: Testicular growth and related sperm out put in dairy bulls. *Journal of animal science*, 29, s. 41-47.

HANCOCK, J.L., 1951: A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature*, 167, s. 323-324.

HEROLD, F.C., GERBER, D., AURICH, J.E., 2003: Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl or AndroMed. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 90 (3), s. 58-61.

HEROLD, F.C., AURICH, J.E., GERBER, D., 2004: Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed and Triladyl but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology*, 61 (4), s. 715-724.

HEROLD, F.C., De HAAS, K., COLENBRANDER, B., GERBER, D., 2006: Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl or AndroMed. *Theriogenology*, 66 (5), s. 1123-1130.

HOFÍREK, B., DVOŘÁK, R., NĚMEČEK, L., POSPÍŠIL, Z. a kol., 2009: Nemoci skotu. Česká buiatrická společnost, Brno, s. 1149. ISBN 978-80-86542-19-5.

HOGENBOOM, G.H., 1955: The isolation and biochemical properties of liver mitochondria. Sbor. „Fine structure of cells“. Groningen.

HOLROYD, R.G., DOOGAN, V.J., De FAVERI, J.D., FORDYCE, G., Mc GOWAN, G.R., BERTRAM, R.G., VANKAN, D.M., FITZPATRICK, L.A., JAYAWARDHANA, G.A., MILLER, R.G., 2002: Bull selection and use in northern Australia 4: calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 71, s. 67-79.

HOLT, W.V., 1996: Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Repros Domest Anim.*, 31 (suppl 1), s. 17-24.

HOLT, W.V., 2000: Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, s. 47-58.

HU, J.H., LI, Q.W., LI, G., CHEN, X.Y., HAI, Y., ZHANG, S.S., WANG, L., 2006: The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-australian Journal of Animal Science*, 19 (4), s. 486-494.

HU, J.H., LI, Q.W., ZAN, L., JIANG, Z.L., AN, J.H., WANG, L.Q., JIA, Y.H., 2010: The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, 117 (1-2), s. 11.

HUSSAIN, S.S., AHMAD, N., ALA-UD-DIN, CHAUDHRY, N.A., 1990: Effect of different antibiotics on motility and liveability of spermatozoa and viable bacterial count in buffalo semen. *Pakistan Vet. J.*, 10, s. 171-174.

CHANTLER, E., ABRAHAM-PESKIR, J.V., LITTLE, S., Mc CANN, C., MEDERWALDT, R., 2000: Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology*, 41, s. 125-134.

CHRISTIAN, A.E., HAYNES, M.P., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G.H., 1997: Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.*, 38, s. 2264-2272.



IRITANI, A., 1980: Problems of freezing spermatozoa of different species. Ninth Int. Congr. Anim. Art. Insem., 1, s. 115-132.

JANETT, F., KEO, S., BOLLWENIN, H., HÄSSIG, M., THUN, R., 2005: Comparison of AndroMed, Bioxcell and Triladyl extender for cryopreservation of bull semen. Schweiz Arch Tierheilk, 147, s. 62.

JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., SÖDERQUIST, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2000: Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. Theriogenology, 53, s. 859-875.

JOHNSON, L.A., 1992: Gender preselection in domestic animal using flow cytometrically sorted sperm. J. Anim Sci., 70 (suppl 1), s. 8-18.

JOHNSON, L.A., FLOOK, J.P., HAWK, H.W., 1989: Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting, Biol Repris, 41, s. 199-205.

KAROUI, S., DÍAZ, C., SERRANO, M., CUE, R., CELORRIO, I., CARABAÑO, M.J., 2011: Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. Anim. Repris. Sci., 124, s. 28-38.

KLIMENT, J., HINTNAUS, J., NOVÁK, M., ROB, O., ŠŤASTNÝ, P., 1983: Reprodukcia hospodárskych zvierat. Príroda, vydavateľstvo kníh a časopisov, n.p. Bratislava, s. 376. ISBN 64-020-83.

KNOX, J.M., SCHWARTZ, G.S., DELLER, K.R., 1980: Volumetric changes in cells during freezing and thawing. J. Biomech. Eng., 102, s. 91-97.

KVAPILÍK, J., RŮŽIČKA, Z., BUCEK, P. a kol., 2012: Ročenka. Chov skotu v České Republice. Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2011, Českomoravská společnost chovatelů, a. s., Praha; Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha-Uhřetěves; Svaz chovatelů českého strakatého skotu; Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, o. s., Český svaz chovatelů masného skotu. Praha, s. 91. ISBN 978-80-87633-02-1.

LAGERLÖF, N., 1934: Morphologische Untersuchungen über Veränderungen im Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit Verminderter oder aufgehobener Fertilität. Uppsala. In: VĚŽNÍK, Z. a kol., 2004: Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy, Brno, s. 249. ISBN 80-86895-01-7.

LAGERLÖF, N., 1936: Sterility of bulls. *Vet. Record*. In: VĚŽNÍK, Z. a kol., 2004: Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy, Brno, s. 249. ISBN 80-86895-01-7.

LEITE, T.G., do VALE FILHO, V.R., de ARRUDA, R.P., de ANDRADE, F.C., EMERICK, L.L., ZAFFALON, F.G., MARTINS, J.A.M., de ANDRADE, V.J., 2010: Effect of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, 120, s. 31-38.

LOUDA, F. a kol., 2001: Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod, Praha: ČZU-AF, s. 225. ISBN 80-213-0702-1.

LOUDA, F., BJELKA, M., JEŽKOVÁ, A., PODZDÍŠEK, J., STÁDNÍK, L., BEZDÍČEK, J., 2007: Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín, s. 41. ISBN 978-80-87144-01-05.

MANDAL, D.K., NAGPAUL, P.K., GUPTA, A.K., 2000: Seasonal variation in seminal attributes and sexual behaviour of Murrah buffalo bulls. *Indian Journal of Dairy Science*, 53, s. 278-283.

MARVAN, F., HAMPL, A., HLOŽÁNKOVÁ, E., KRESAN, J., MASSANYI, L., VERNEROVÁ, E., 2007: Morfologie hospodářských zvířat. Česká zemědělská univerzita v Praze, 4. vydání, s. 304. ISBN 978-80-213-1658-4.

MAURYA, V.P., TULI, R.K., 2003: Post-thaw thermal resistance test on motility and acrosomal integrity of filtered and non-filtered frozen semen of Murrah buffalo bulls. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 16, s. 1424-1428.

Mc ELHANEY, R.N., 1986: Differential scanning calorimetry studies of lipid-protein interaction in model system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 864, s. 361-421.

MOCÉ, E., GRAHAM, J.K., 2006: Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal of Anim. Sci.*, 84, s. 826-833. ([www.asas.org](http://www.asas.org)).

MOUSSA, M., MARTINET, V., TRIMECHE, A., TAINTORIER, D., ANTON, M., 2002: Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57, s. 1695-1706.

MUIÑO, R., FERNÁNDEZ, M., PEÑA, A.I., 2007: Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk- based or two egg-yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. *Reprod. Dom. Anim.*, 42, s. 305-31.

NAJBRT, R., BEDNÁŘ, K., ČERVENÝ, Č., KAMAN, J., MIKYSKA, E., ŠTARHA, O., 1982: *Veterinární anatomie 2. Státní zemědělské nakladatelství v Praze*, s. 596. ISBN 07-006-82-04.

PARK, C., OHGODA, O., NIWA, K., 1989: Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J.Reprod.Fert.*, 86, s. 577-582.

PARKS, J.E., LYNCH, D.V., 1992: Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29, s. 255-266.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M.A., FIRST, N.L., 1988: Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Repris.*, 38(5), s. 1171-1180.

PENFOLD, L., HOLT, C., HOLT, W.V., WELCH, G.R., CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., 1998: Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting. *Molecular reproduction and development, USA*, 50 (3), s 323-327.

PHILLIPS, P.H., LARDY, H.A., 1940: A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, 23, s. 399-404.

QUINN, P.J., 1989: Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 21, s. 3-19.

REECE, O. W., 1998: *Fyziologie domácích zvířat*. Praha, Grada Publishing, spol. s.r.o., s. 456. ISBN 80-7169-547-5.

REVELL, S.G., MRODE, R.A., 1994: An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 36, issue 1-2, s. 77-86.

ROBERTS, C.A. et al., 2010: Factors affecting spermatozoa morphology in beef bulls. *Proceedings, Western Seelio, American Society of Animal Science*, vol. 61, s. 122-125.

RODRIGUEZ, O.L., BERNDTSON, W.E., ENNEN, B.D., PICKETT, B.W., 1975: Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.*, 41, s. 129-136.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2000: Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: Chenoweth, P.J., (Ed.), Topics in Bull Fertility: International Veterinary Information Service., <http://www.ivis.org>.

ROY, H. H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P., 1990: Cryopreservation on Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. Journal of Andrology, vol. 11, s. 73-88.

SANSONE, G., NASTRI M.J.F., FABBROCINI, A., 2000: Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim. Reprod. Sci., 62, s. 55-76.

SARAGUSTY, J., GACITUA, H., ROZENBOIM, I., ARAV, A., 2009: Do Physical Forces Contribute to Cryodamage? Biotechnol. Bioeng., 104, s. 719-728.

SARAGUSTY, J., GACITUA, H., ZERON, Y., ROZENBOIM, I., ARAV, A., 2009a: Double freezing of bovine semen. Anim. Reprod. Sci., 115, s. 10-17.

SCHNEIDER, U., 1986: Cryobiological principles of embryo freezing. J. In Vitro. Fert. Embryo. Trans., 3, s. 3-9.

SCHNEIDER, U., MAZUR, P., 1984: Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relationship to the survival of frozen-thawed embryo. Theriogenology, 21, s. 68-79.

STEPONKUS, P.L., LYNCH, D.V., 1989: Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects on cold acclimations. J. Bioenerg. Biomembr., 21, s. 21-41.

TAKAHASHI, T., ITOH, R., NISHINOMIYA, H., KATOH, M., MANABE, N., 2012: Effect of Linoleic Acid Albumin in Dilution Solution and Long-term Equilibration for Freezing of Bovine Spermatozoa with Poor Freezability. Reprod. Dom. Anim., 47, s. 92-97.

TANGHE, S., VAN SOOM, A., STERCKX, V., MAES, D., KRUIF, A., 2002: Assessment of different sperm parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. Reprod. Domest. Anim., 37, s. 127-132.

THACKER, D.L., ALMQUIST, J.O., 1951: Milk and milk-products as diluters for bovine semen. J. Anim. Sci., 10, s. 1082 (abstr).

URBAN, F. a kol., 1997: Chov dojeného skotu, Natural, s.r.o. -Apros Praha, s. 289. ISBN 80-901100-7-X.

VALENTOVIČOVÁ, J., SIMON, M., ANTALÍKOVÁ, J., 2005: VI. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov: Vplyv monoklonových protilátok na akrozómovú reakciu býčích spermíí. Vydavateľské a edičné stredisko Slovenské poľnohospodárske university v Nitre, s. 350. ISBN 80-8069-526-1.

VERA-MOUZ, O., AMIRAT-BRIAND, L., BENCHARIF, D., ANTON, M., DESHERCES, S., SHMITT, E., THORIN, CH., TAINTURIER, D., 2011: Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4°C. *Asian Journal of Andrology*, 13, s. 281-286.

VERA-MOUZ, O., AMIRAT-BRIAND, L., DIAZ, T., VÁSQUEZ, L., SCHMIDT, E., DESHERCES, S., ... and TAINTURIER, D., 2009: Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender, Comparison to Triladyl and Biocell. *Theriogenology*, 71 (6), s. 895-900.

VERBERCKMOES, S., SOOM, A.V., DEWULF, J., de KRUIF, A., 2005: Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, 63, s. 912-922.

VĚŽNÍK, Z. a kol., 2000: Hodnocení semene pro asistovanou reprodukci a výběr plemeníků: Striktní analýza spermatické morfologie SASMO, Brno, s. 141.

VĚŽNÍK, Z., ŠVECOVÁ, D., ZAJÍCOVÁ, A., PŘINOSILOVÁ, P., 2004: Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy, Brno, s. 249. ISBN 80-86895-01-7.

VISHWANATH, R., SHANNON, P., 2000: Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, s. 23-53.

WALSH, S.W., WILLIAMS, E.J., EVANS, A.C.O., 2011: A review of the cause of poor fertility in high milk producing dairy cos. *Snímal Reproduction Science*, s. 127-138.

WATSON, P.F., 1981: The effects of cold shock on sperm cell membranes., s. 189-218. In *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. MORRIS, G.J., CLARKE, A., ed. Academic Press, London, UK.

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

WHITE, I.G., 1993: Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. A review. Repris. Fertil. Dev., 5, s. 639-658.

YANAGIMACHI, R., 1994: Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E, NEILL, JD (eds), Physiology of Reproduction., New York. Raven Press, s. 189-317.

YANAGIMACHI, R., USUI, N., 1974: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp Cell Res., 89 (1), s. 161-174.

ZAHRÁDKOVÁ, R. a kol., 2009: Masný skot od A do Z. Praha: Český svaz chovatelů masného skotu, s. 397. ISBN 978-80-254-4229-6.

ZEMANOVÁ a kol., 2005: VI. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov: Stanovenie výskytu patologických spermii býkov, baranov a žrebčov. Vydavateľské a edičné stredisko Slovenské poľnohospodárske university v Nitre, s. 350. ISBN 80-8069-526-1.

ZHANG, B.R., LARSSON, B., LUNDEHEIM, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 1998: Sperm characteristics and *zona pellucida* binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. Int. J. Androl. 21, s. 207-216.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

---

K1A – ejakulát + kontrolní vzorek AndroMed

K1B – ejakulát + kontrolní vzorek Bioxcell

K1T – ejakulát + kontrolní vzorek Triladyl + žloutek

EA8 – ejakulát + ředidlo AndroMed + 8 % LDL

EA6 – ejakulát + ředidlo AndroMed + 6 % LDL

EA4 – ejakulát + ředidlo AndroMed + 4 % LDL

EB8 – ejakulát + ředidlo Bioxcell + 8 % LDL

EB6 – ejakulát + ředidlo Bioxcell + 6 % LDL

EB4 – ejakulát + ředidlo Bioxcell + 4 % LDL

ET10 – ejakulát + ředidlo Triladyl + 10 % LDL

ET8 – ejakulát + ředidlo Triladyl + 8 % LDL

ET6 – ejakulát + ředidlo Triladyl + 6 % LDL

K2A – ejakulát + kontrolní vzorek Andromed

K2B – ejakulát + kontrolní vzorek Bioxcell

K2T – ejakulát + kontrolní vzorek Triladyl + žloutek

Čas 0 – stav přežitelnosti spermií na začátku testu

Čas 2 – stav přežitelnosti spermií po 2 hodinách inkubace ve vodní lázni 37,5 °C

N – počet vzorků

A – vzorky s ředidlem AndroMed bez ohledu na koncentraci

B – vzorky s ředidlem Bioxcell bez ohledu na koncentraci

T – vzorky s ředidlem Triladyl bez ohledu na koncentraci

\*  $P > 0,05$  – vzorky na hladině významnosti 0,05 (95 %)

\*\*  $P > 0,01$  – vzorky na hladině významnosti 0,01 (99 %)

\*\*\*  $P > 0,05$  – vzorky na hranici hladiny významnosti 0,05 (95 %)

- bez významnosti

LSM – Leas Squares Means (LSMEAN)

SE – standardní chyba

Maximum, Minimum, Průměr 0 – hodnoty na začátku testu

Maximum, Minimum, Průměr 2 – hodnoty po 2 hodinách inkubace ve vodní lázni 37,5 °C

## 10 PŘÍLOHY

---

### 10.1 Seznam tabulek

Tabulka 1. Hodnocení ejakulátů býků po odběru	46
Tabulka 2. Typ ředidla a koncentrace LDL	46 - 47
Tabulka 3. Základní statistiky sledovaných proměnných (%)	49
Tabulka 4. Vliv ředidla bez ohledu na koncentraci LDL	50
Tabulka 5. Pearsonovy korelační koeficienty $r$ a související statistické významnosti $P$ mezi ukazateli kvality ejakulátu a přežitelnosti spermií	52
Tabulka 6. Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu	52
Tabulka 7. Vliv býka v čase na přežitelnost spermií	52
Tabulka 8. Vliv koncentrace vzorku na přežitelnost spermií	53

### 10.2 Seznam grafů

Graf č. 1 Vliv býka na přežitelnost spermií	49
Graf č. 2 Vliv mléčného užitkového typu na přežitelnost spermií	49 - 50
Graf č. 3 Vliv masného užitkového typu na přežitelnost spermií	49 - 50
Graf č. 4 Vliv koncentrace LDL na přežitelnost spermií	51

### 10.3 Seznam obrázků

Obrázek 1. Živá spermie	43
Obrázek 2. Živé a mrtvé spermie	43



Tabulka 1. Hodnocení ejakulátů býků po odběru

Datum odběru	Registr býka	Jméno býka	Aktivita [ % ]	Hustota [ 10 <sup>6</sup> / mm <sup>3</sup> ]	Množství [ g ]
30.10.2012	NEO 178	ORTY	90	1,3	9,3
8.11.2012	NEO 141	CHOICE	85	1,3	11,1
13.11.2012	NEO 178	ORTY	90	1,8	11,8
16.11.2012	ZAA 729	ROCKY	85	1,3	8,5
20.11.2012	NEO 141	CHOICE	90	1,3	10,1
23.11.2012	ZGA 400	XAVER	80	0,9	6,2
27.11.2012	NEO 141	CHOICE	90	0,9	10,8
30.11.2012	NEO 178	ORTY	90	1,4	10,4

Tabulka 2. Typ ředidla a koncentrace LDL

vzorek	ejakulát	ředidlo	žloutek	LDL
K1A	ejakulát	kontrola AndroMed		
K1B	ejakulát	kontrola Bioxcell		
K1T	ejakulát	kontrola Triladyl	se žloutkem	
EA8	ejakulát	AndroMed		8% LDL
EA6	ejakulát	AndroMed		6% LDL
EA4	ejakulát	AndroMed		4% LDL
EB8	ejakulát	Bixcell		8% LDL
EB6	ejakulát	Bixcell		6% LDL
EB4	ejakulát	Bixcell		4% LDL
ET10	ejakulát	Triladyl	bez žloutku	10% LDL
ET8	ejakulát	Triladyl	bez žloutku	8% LDL
ET6	ejakulát	Triladyl	bez žloutku	6% LDL
K2A	ejakulát	kontrola AndroMed		
K2B	ejakulát	kontrola Bioxcell		
K2T	ejakulát	kontrola Triladyl	se žloutkem	

Tabulka 3. Základní statistiky sledovaných proměnných (%)

Proměnná	N	Min.	Max.	Průměr	Std. odchylka	Std. chyba	Variační koeficient
Čas 0h	360	23,27	93,20	74,18	16,14	0,85	21,76
Čas 2h	360	0,00	89,25	52,91	17,92	0,94	33,87
Rozdíl	360	0,00	86,60	21,27	13,86	0,73	65,15

Tabulka 4. Vliv ředidla bez ohledu na koncentraci LDL (%)

	N	Min.	Max.	Průměr	Std. odchylka	Std. chyba	Variační koeficient
<b>A</b>	72	26,53	91,89	75,61	17,35	2,05	22,95
	72	0,00	80,55	57,01	19,64	2,31	34,44
	72	0,82	84,55	18,60	14,26	1,68	76,66
<b>K1A</b>	24	30,43	93,20	71,68	17,98	3,67	25,09
	24	24,52	89,25	59,54	18,59	3,80	31,23
	24	0,00	37,42	12,14	10,14	2,07	83,52
<b>K2A</b>	24	33,03	91,67	75,45	16,30	3,33	21,60
	24	12,26	70,34	51,89	16,10	3,29	31,03
	24	4,59	50,90	23,56	10,53	2,15	44,69
<b>B</b>	72	30,90	92,38	75,63	15,48	1,82	20,47
	72	0,00	81,03	54,72	17,74	2,09	32,43
	72	0,61	86,60	20,92	15,85	1,87	75,78
<b>K1B</b>	24	35,15	88,00	72,55	15,53	3,17	21,41
	24	13,86	69,30	50,20	16,02	3,27	31,92
	24	2,85	46,30	22,34	11,39	2,32	50,96
<b>K2B</b>	24	24,07	91,17	73,35	15,96	3,26	21,76
	24	21,00	73,94	52,51	16,64	3,40	31,69
	24	1,74	53,30	20,85	12,60	2,57	60,45
<b>T</b>	72	23,27	88,24	72,37	16,48	1,94	22,77
	72	5,98	74,52	46,15	16,18	1,91	35,07
	72	0,95	54,62	26,22	12,87	1,52	49,08
<b>K1T</b>	24	40,18	91,80	74,34	13,70	2,80	18,43
	24	14,95	77,38	55,45	17,64	3,60	31,81
	24	4,06	54,41	18,89	12,38	2,53	65,54
<b>K2T</b>	24	34,14	89,52	74,61	15,92	3,25	21,34
	24	7,89	75,00	50,47	17,90	3,65	35,47
	24	1,28	54,36	24,14	14,87	3,04	61,62

Tabulka 5. Pearsonovy korelační koeficienty **r** a související statistické významnosti **P** mezi ukazateli kvality ejakulátu a přežitelnosti spermií

	Býk	Užitkovost	Čas 0	Čas 2
Býk	1	0,86603	-0,78783	-0,49175
		<,0001	<,0001	<,0001
Užitkovost		1	-0,74449	-0,39115
			<,0001	<,0001
Čas 0			1	0,67349
				<,0001
Čas 2				1

Tabulka 6. Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu

ZNAK	MODEL		Býk		Vzorek	
	r <sup>2</sup>	P	F-test	P	F-test	P
Čas 0h	0,84	< 0,0001	598,33	< 0,0001	1,58	0,0813
Čas 2h	0,56	< 0,0001	123,48	< 0,0001	4,18	< 0,0001
rozdíl	0,24	< 0,0001	21,97	< 0,0001	2,94	0,0003

Tabulka 7. Vliv býka v čase na přežitelnost spermií (%)

	Býk 1		Býk 2		Býk 3		Býk 4		P
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	
Čas 0	81,62	0,56	80,61	0,56	70,34	0,98	36,44	0,98	** 1: 3,4; 2:3,4; 3: 4
Čas 2	57,43	1,05	56,47	1,05	61,25	1,82	20,31	1,82	* 2:3 ** 1:4; 2:4; 3:4
Rozdíl	24,18	1,06	24,14	1,06	9,09	1,84	16,12	1,84	** 1: 3,4; 2: 3,4; 3:4

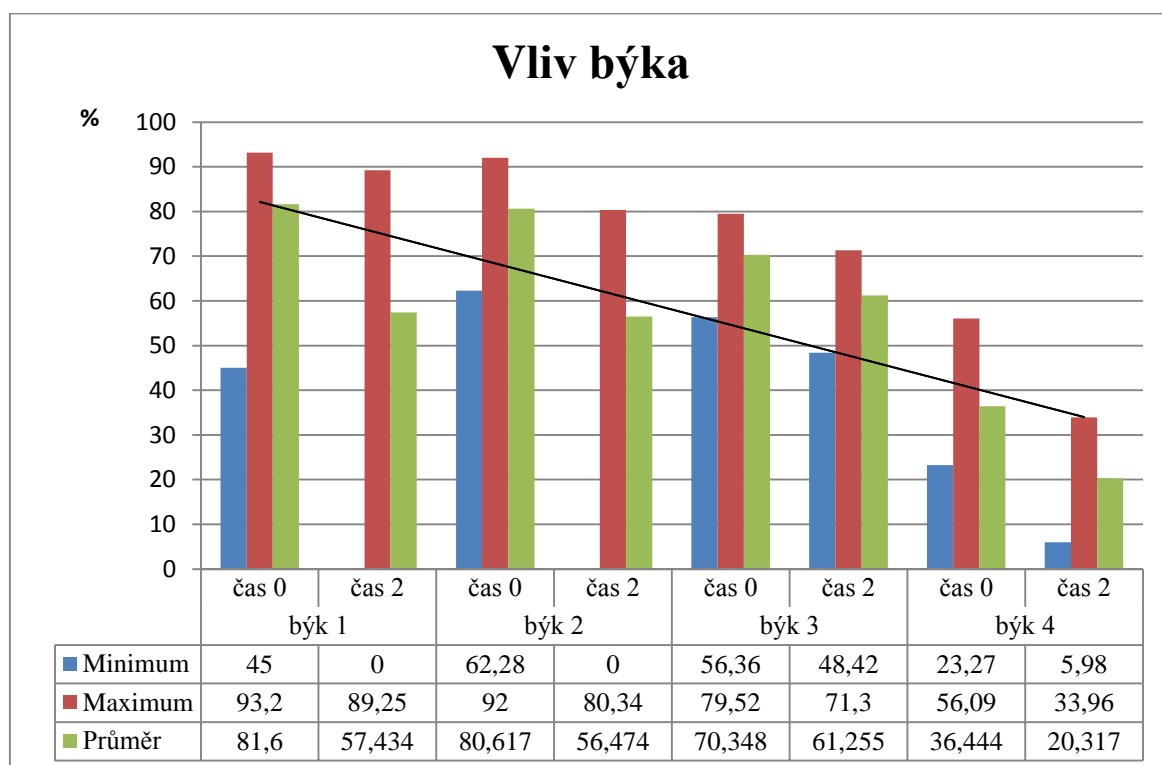
Vysvětlivky: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

Tabulka 8. Vliv koncentrace vzorku na přežitelnost spermií (%)

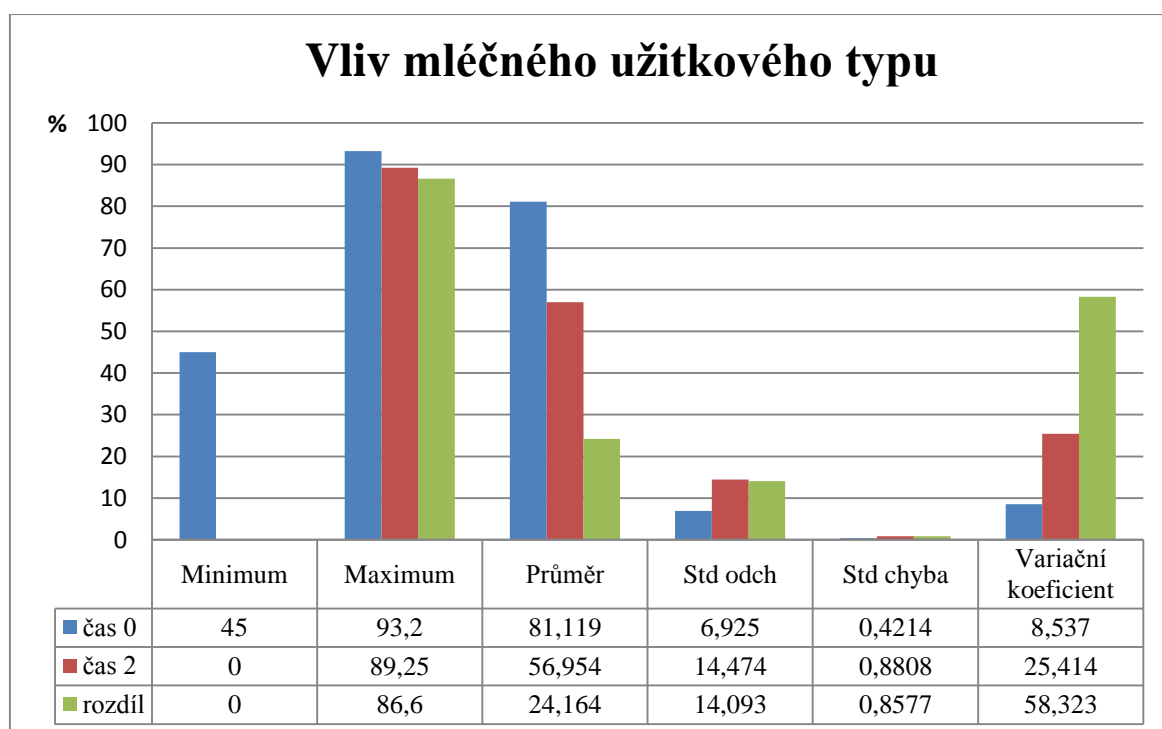
Vzorky	Č.	Čas 0		Čas 2		Rozdíl	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
EA4	1	68,88	1,36	54,56	2,52	14,31	2,56
EA6	2	67,86	1,36	47,12	2,52	20,74	2,56
EA8	3	69,30	1,36	57,22	2,52	12,08	2,56
EB4	4	66,99	1,36	45,67	2,52	21,32	2,56
EB6	5	69,17	1,36	52,94	2,52	16,23	2,56
EB8	6	69,94	1,36	53,41	2,52	16,53	2,56
ET10	7	65,97	1,36	44,53	2,52	21,44	2,56
ET6	8	64,91	1,36	41,67	2,52	23,24	2,56
ET8	9	65,44	1,36	40,12	2,52	25,32	2,56
K1A	10	64,75	1,36	55,49	2,52	9,25	2,56
K1B	11	65,61	1,36	46,16	2,52	19,46	2,56
K1T	12	67,41	1,36	51,40	2,52	16,01	2,56
K2A	13	68,52	1,36	47,85	2,52	20,67	2,56
K2B	14	66,42	1,36	48,47	2,52	17,96	2,56
K2T	15	67,68	1,36	46,43	2,52	21,25	2,56
P		* 1:8,9; 3:8,9,10; 5:8,10; 6:7,9,11; 10:13 ** 6:8, 10 *** 3:11; 5:9		* 1:2,4,11,15; 2:9,10; 3:14; 4:5,6; 5:7; 6:7,11,15; 9: 13,14; 10: 13,14 **1:7,8,9;2:3;3:7,8,9,11,1 3,15; 4:10; 5:8,9; 6:8,9; 7:10; 8:10,12; 9:10,12; 10:11,15 *** 7:12; 8:14;11:14		* 1:4,7,8; 2:3; 3:11,13; 5:9; 6:9,10; 8:12; 9:14; 10:14 **1:9;2:10; 3:4,7,8,9,15; 4:10;7:10;8:10;9:10,12;10:11,13,1 5 *** 1:15; 5:8,10	

Vysvětlivky: \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* na hranici P < 0,05, - bez významnosti. Počet každého vzorku je 24.

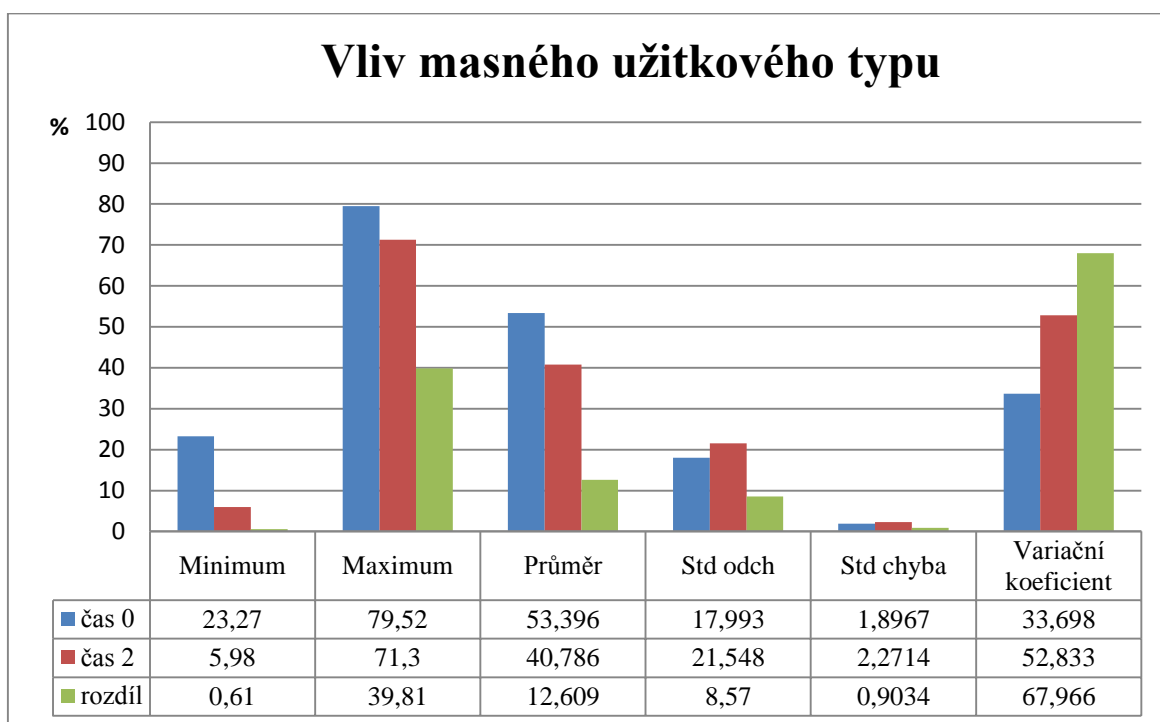
Graf č. 1 - Vliv býka na přežitelnost spermií



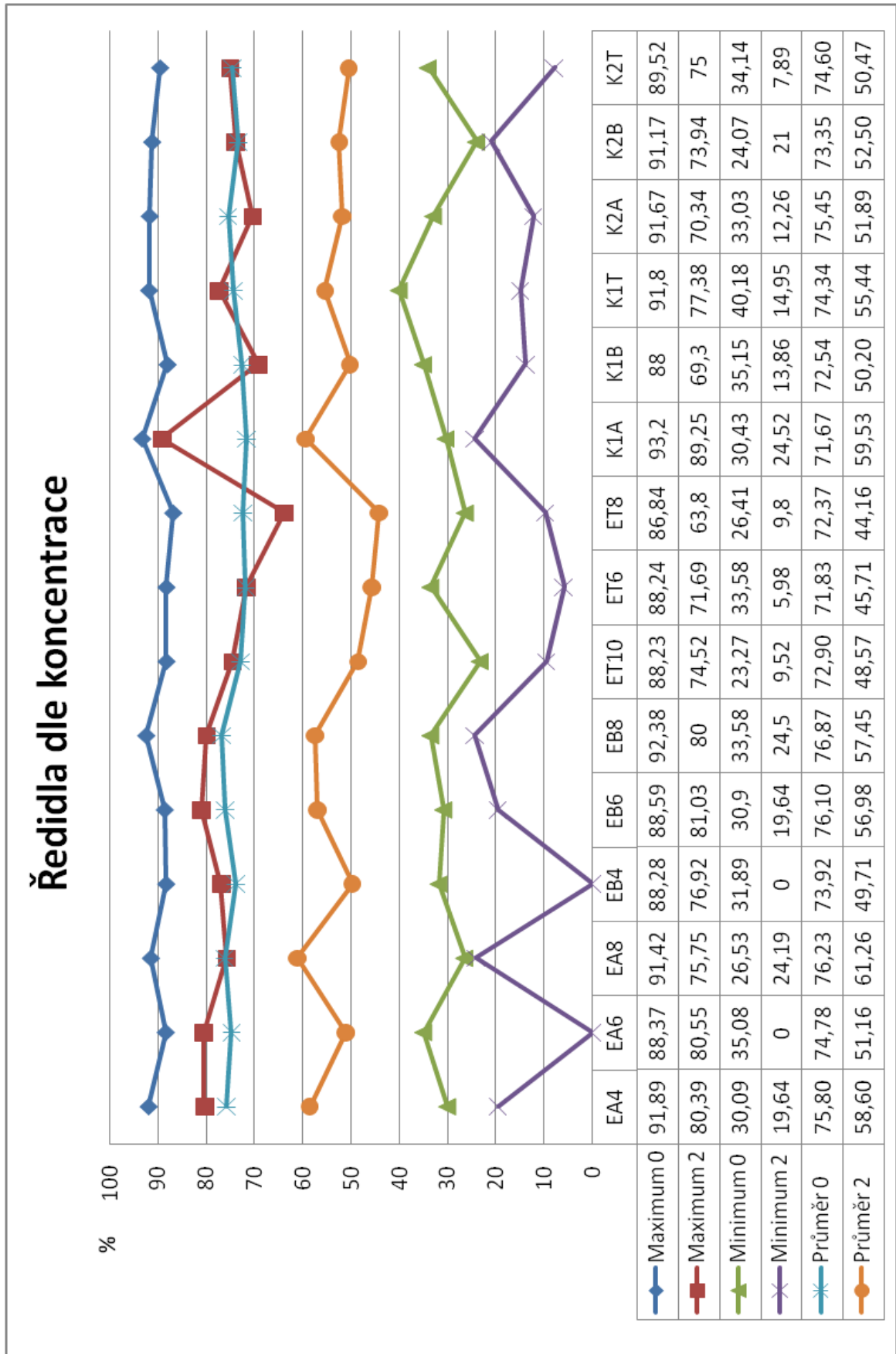
Graf č. 2- Vliv mléčného užitkového typu na přežitelnost spermií



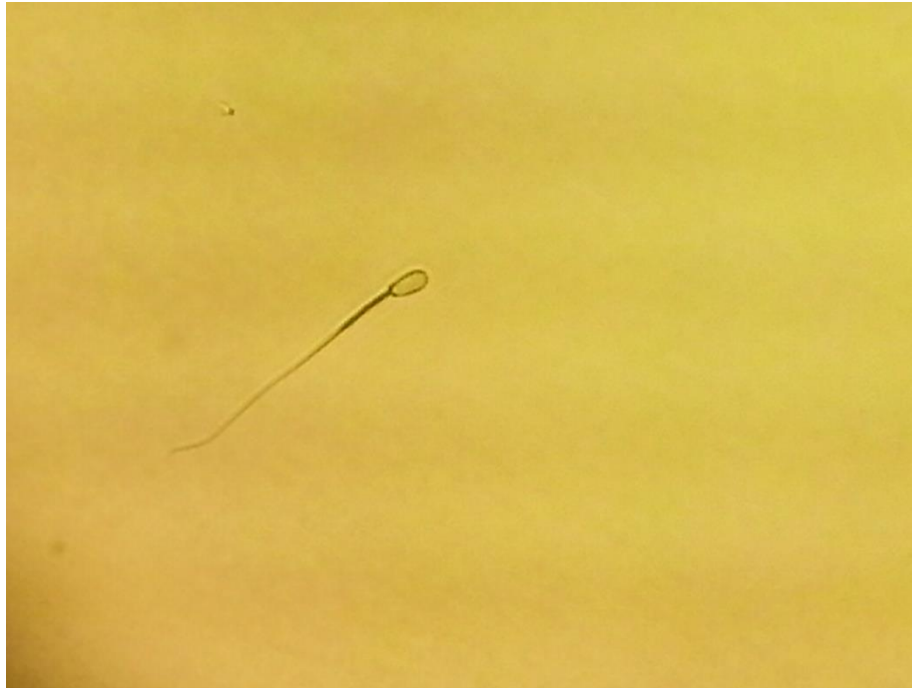
Graf č. 3- Vliv masného užitkového typu na přežitelnost spermií



Graf č. 4 - Vliv koncentrace LDL na přežitelnost spermií (%)



Obrázek 1. Živá spermie



Obrázek 2. Živé a mrtvé spermie

