

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav chovu a šlechtění zvířat



**ASPEKTY SPERMATOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ
NATIVNÍHO BOVINNÍHO EJAKULÁTU**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Martin Hošek Ph.D.

Vypracovala:

Gabriela Weberová

Brno 2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatelka: **Gabriela Weberová**
Studijní program: Zootechnika
Obor: Zootechnika
Název tématu: **Aspekty spermatologického vyšetření nativního bovinního ejakulátu**
Rozsah práce: 30-40 stran textu a přílohy

Zásady pro vypracování:

1. Studentka se zaměří na problematiku hodnocení kvality nativních ejakulátů býků.
2. Zaměří se na hodnocení kvality ejakulátu běžnými metodami makroskopického a mikroskopického vyšetření.
3. Dále se zaměří na speciální vyšetření ejakulátu a automatické systémy hodnocení jeho kvality.
4. Studentka se bude aktivně účastnit získávání a zpracování podkladů a dat nezbytných pro vypracování BP.

Seznam odborné literatury:

1. LOUDA, F. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. ČZU Praha, 2001. 225 s. ISBN 80-213-0702-1.
2. GAMČÍK, P. – KOZUMPLÍK, J. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. 3. vyd. Bratislava: Príroda, 1992. 299 s. ISBN 80-07-00540-4.
3. ŘÍHA, J. *Plemenitba hospodářských zvířat*. Výzkumný ústav chovu skotu Rapotín, 2003. 151 s.
4. ŘÍHA, J. *Reprodukce v proces šlechtění skotu*. Výzkumný ústav chovu skotu Rapotín, 2000. 144 s.
5. VĚŽNÍK, Z. *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. VÚVeL Brno, 2004. 197 s. ISBN 80-86895-01-7.

Datum zadání bakalářské práce: říjen 2013

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2015

Gabriela Weberová

Gabriela Weberová
Autorka práce



Ing. Martin Hošek, Ph.D.
Vedoucí práce

Ladislav Máchal

prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.
Vedoucí ústavu

Payel Ryant

doc. Ing. Payel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Aspekty spermatologického vyšetření nativního bovinního ejakulátu** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Brně dne: Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomohli uskutečnit dokončení bakalářské práce, zejména svému vedoucímu Ing. Martinu Hoškovi Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky.

Dále bych ráda poděkovala za velkou podporu všem svým blízkým a rodině.

SOUHRN A RESUMÉ, KLÍČOVÁ SLOVA

Název práce: Aspekty spermatologického vyšetření nativního bovinního ejakulátu

V bakalářské práci bylo popsáno pohlavní ústrojí býka, hormonální regulace, tvorba spermií a ejakulátu. Dále se zaměřuje na odběr a metody odběru ejakulátu. Práce se zabývala studii morfologicky změněných spermií a jejich vlivem na plodnost býků. U morfologických vad se nejvíce jednalo o popis primárně a sekundárně změněných spermií. Vyšetření nativního ejakulátu bylo rozděleno na makroskopické, mikroskopické, mikrobiologické a speciální. Na konci bakalářské práce byla uvedena kapitola o automatických systémech vyhodnocování ejakulátů. Z těchto systémů byl popsán systém vyhodnocování ejakulátu CASA a průtoková cytometrie.

Klíčová slova:

Spermie, ejakulát, inseminace, umělá vagina, morfologicky abnormální spermie, CASA, průtoková cytometrie

Název práce (Anglicky): Aspects spermatological of examination native bovine semen

In this bachelor thesis was described the reproductive system of a bull, hormonal regulation, sperm production and sperm, was also focused on the collection and sampling methods ejaculate. Work dealt with of studies of morphologically abnormal sperm and their influence on the fertility of bulls. At morphological defects been described primary and secondarily changed spermatozoa. Examination of native ejaculate was divided into microscopical, microbiological and special. At the end of this bachelor thesis was given the chapter on automated scoring systems ejaculates. Of those systems been described system for evaluating ejaculate CASA and flow cytometry.

Key words:

Sperm, ejaculate, insemination, artificial vagina, morphologically abnormal sperm, CASA, flow cytometry

Obsah:

1	Úvod.....	9
2	Cíl práce	10
3	Literární přehled.....	11
3.1	Samčí pohlavní orgány (<i>Organa genitalia masculina</i>).....	11
3.1.1	Pohlavní žlázy (gonády)	11
3.1.2	Vývodné cesty.....	18
3.1.3	Přidatné pohlavní žlázy (<i>glandulae genitales accesoriae</i>).....	19
3.1.4	Kopulační orgán.....	21
3.2	Hormonální regulace	22
3.2.1	Hypotalamus	22
3.2.2	Hypofýza.....	23
3.2.3	Gonadotropní hormony – sexageny	23
3.2.4	Testosteron.....	24
3.2.5	Inhibin	24
3.3	Ejakulát	25
3.3.1	Semenná plazma	25
3.3.2	Spermie	25
3.4	Odběr ejakulátu	27
3.5	Morfologické vyšetření spermií	30
3.5.1	Změny na hlavičkách spermií	32
3.5.2	Změny na akrozomu spermií	33
3.5.3	Změny ve vnitřní struktuře nukleoplasmy spermií	33
3.5.4	Změny na bičíku spermií	34
3.5.5	Nezralé spermie	35
3.5.6	Morfologicky abnormální spermie MAS.....	36
3.6	Vyšetření ejakulátu.....	39

3.6.1	Makroskopické.....	39
3.6.2	Mikroskopické	39
3.6.3	Mikrobiologické.....	43
3.6.4	Speciální vyšetření (biologické zkoušky).....	44
3.6.5	Automatické systémy hodnocení kvality ejakulátu	45
4	Diskuse	50
5	Závěr	52
6	Seznam použité literatury	54

Seznam tabulek

Tabulka 1: objem, pH, koncentrace, množství spermií a vzhled ejakulátu u jednotlivých druhů zvířat (Jelínek et al., 2003)	27
Tabulka 2: Základní ukazatele nativního býčího semene (Věžník et al., 2000).....	27
Tabulka 3: Odhad hustoty spermatu podle prostorového uspořádání spermií v zorném poli mikroskopického obrazu (Louda, 2001).....	42
Tabulka 4: Odhad hustoty spermatu podle prostorového uspořádání spermií v zorném poli mikroskopického obrazu podle Götze (Louda, 2001)	43

1 ÚVOD

Reprodukce a její neustálé zlepšování je vzhledem ke svému významu stále hlavním cílem všech chovatelů hospodářských zvířat. Reprodukce neboli plodnost je nejcennější vlastností v chovu skotu. Mimořádného významu nabývá především z hlediska ekonomického, kdy reprodukce souvisí s produkcí. Základním cílem chovatele by tedy měla být březí plemenice po co nejkvalitnějším býkovi a následné získání zdravého mláděte.

Plemenářský postup, kterým zajišťujeme reprodukci a tím tvorbu nového potomstva, se nazývá plemenitba. V chovu skotu se využívají dva základní způsoby plemenitby: přirozená plemenitba nebo inseminace, popřípadě se může využívat kombinace obou.

Přirozená plemenitba je metodou, která se uplatňuje téměř vždy výhradně v chovech masných plemen skotu. Jde o přirozený způsob páření, kdy dochází k pohlavnímu styku mezi samcem a samicí.

Inseminace je plemenářské opatření vedoucí ke zlepšení plemenných a užitkových vlastností zvířat. V dnešní době se jedná o hlavní způsob oplodňování v chovu, kdy se do rodidel samice vpraví inseminační dávka spermatu v čerstvém nebo po konzervaci upraveném stavu. Význam inseminace spočívá ve zvýšeném využití vynikajících plemeníků a předcházení pohlavních chorob.

Dobře řízená promyšlená inseminace zvyšuje ve srovnání s přirozeným pářením procento březosti, životnost a biologickou hodnotu potomstva. Základním předpokladem kladného výsledku inseminace je nezávadný odběr spermatu od naprosto zdravého, plemenářsky hodnotného a prověřeného býka, dále objektivní posouzení, správná konzervace a přeprava spermatu a konečně i jeho vhodné, technicky dokonalé vpravení do pohlavního ústrojí plemenice v říji.

Každý ejakulát sloužící k výrobě inseminačních dávek je posuzován jako samostatná biologická jednotka a je prověřován předepsanými laboratorními zkouškami, jako jsou mikroskopické, makroskopické, biologické a další vyšetření. Teprve po kladném vyhodnocení těchto zkoušek se z nativního ejakulátu může stát inseminační dávka.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je prostudování a porozumění problematice nativního bovinního ejakulátu. Práce se bude věnovat především studii rozmnožovacího ústrojí býků a hlavním metodám vyšetření nativního ejakulátu, jako jsou makroskopické, mikroskopické, mikrobiologické a speciální vyšetření. A dále se zaměří na posouzení kvality nativního ejakulátu a jejích parametrů.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Samčí pohlavní orgány (*Organa genitalia masculina*)

Hlavní částí jsou pohlavní žlázy – varlata (*testes*), jejich prvořadou funkcí je produkce pohlavních buněk – spermií. Tyto párové orgány jsou uloženy ve zvláštním prostoru, který u domácích savců tvoří šourek (*scrotum*). Totéž umístění platí i pro nadvarlata (*epididymis*), která jsou neoddělitelně spojena s varlaty a tvoří prostor pro dozrávání, uchování a transport spermií. Nadvarlata přechází do chámovodu (*ductus deferens*), který ústí do pánevní části močové trubice a spolu s močovody vytváří *canalis urogenitalis*. Kolem pánevní části *canalis urogenitalis* se seskupují přídatné pohlavní žlázy – semenné váčky (*glandulae vesiculares*), žláza předstojná neboli prostata (*glandula prostatica*) a bulbouretrální žlázy – žlázy Cowperovy (*glandulae bulbourethrales*). K přídatným pohlavním žlázám jsou též zařazovány části chámovodu obsahující drobné žlásky, případně ampuly chámovodu (*ampulae ductuli deferentes*). Všechny vývody těchto žláz ústí v pánevní část močové roury. Jejich sekrety se mísí s vylučovanými pohlavními buňkami a tvoří semeno, (sperma – ejakulát). Společný močový a semenný vývod je tvořen po opuštění pánevní dutiny samčím pohlavním údem (penis). Penis slouží k přenosu semene při kopulaci do pohlavních cest samice a k tomuto účelu je též tvarově přizpůsoben (Věžník et al., 2004). Pohlavní ústrojí býka je zobrazeno v příloze (Obrázek 1).

3.1.1 Pohlavní žlázy (gonády)

U samců tvoří pohlavní žlázy párové orgány (varlata) utvářené k sekreční a inkreční aktivitě. Varle (*testis, orchis*) je orgán tvaru rotačního elipsoidu s různou délkou dlouhé osy u různých druhů zvířat, rozdíly tvaru jsou i mezi plemeny. Velikost varlat přímo ovlivňuje potencionální produkci spermií (Foote, 1977). Varlata jsou uložena v šourku, který je zavěšen v oblasti třísel a skládá se z vnějších a vnitřních vrstev (Hopper, 2015).

Sekreční funkci varlat představuje produkce spermií a inkreční funkci tvorba specifických pohlavních hormonů – androgenů.

Parenchym varlat je stavěn podle typu tubulosních žláz. Varlata jsou obklopena vazivovým obalem, který se nazývá bělavá blána (*tunica albuginea*) (Reece, 1998), na kterou intimně nasedá viscerální obal serózy (*tunica vaginalis propria, epiorchium*). Přes tuto povrchovou blanitou strukturu je patrná cévní pletěň označovaná *stratum vasculare* a tvořená sítí *a. a v. testicularis*. Stočené semenotvorné kanálky, *tubuli* nebo

canaliculi seminiferi contorti tvoří vzájemně anastomozující lalůčky (Věžník et al., 2004). Ve stočených semenotvorných kanálcích se tvoří spermie a jedná se o největší součást parenchymu varlat (Reece, 1998). Semenné kanálky totiž obsahují spermatogonie, z nichž se vyvíjejí zralé spermie (Hopper, 2015). Stěna kanálků je tvořena bazální membránou, myoidními buňkami a lymfatickým endotelem tvořící blanku označovanou jako *membrána propria*, na tu nasedá zárodečný epitel. Zárodečný epitel je tvořen těmito druhy buněk: Sertolihovo podpůrnými buňkami, Leydigovými (intersticiálními) a pohlavními buňkami s jejich vývojovými stádii (Věžník et al., 2004).

V místě, kde na varle nasedá nadvarle, vytváří ztluštělá albuginea vazivový hřebenovitý útvar, *mediastinum testis, corpus Highmori*, nořící se do nitra varlete. Tímto útvarem probíhají cévy krevní i mízní spolu s nervy a prochází kol nepravidelných štěrbinovitých kanálků, *rete testis*, sem vyústí krátké terminální konce semenotvorných kanálků (*tubuli recti*). Z mediastina vystupují vazivové přepážky (*septula testis*), které rozdělují parenchym varlete na množství kuželovitých nebo pyramidovitých lalůček (*lobuli testis*), obsahujících vždy dva až tři semenotvorné kanálky (Věžník et al., 2004), vazivové přepážky dále zajišťují ochranu a integritu parenchymatózní tkáně (Reece, 1998). Z *rete testis* vycházejí v oblasti *extremitas capitata* vývodné kanálky *tubuli seu ductuli, canaliculi efferentes*. Počet těchto kanálků je rozličný jednak dle druhu zvířat, ale i jedinců (12 až 23) (Věžník et al., 2004).

Mnoho spermií, které se vytvoří ve varlatech, je fagocytováno ve vývodném systému, kterým procházejí, nebo odchází močí (Reece, 1998).

Spermatogenní vlny

Pokud by všechny části semenotvorných kanálků vykazovaly ve stejném čase stejnou aktivitu, nemohla by být zajištěna kontinuální produkce spermií, protože pro spermiogenezi (vývoj od spermatogonie po spermii) u býků je potřeba okolo 64 dnů. K mitotickému dělení kmenových buněk dochází u býků každých 14 dnů (cyklus), proto spermatogeneze v oddílu přilehlém k lumen (v adluminálním kompartmentu) vyžaduje 4,6 cyklů, (64/14). Cyklus může být zahájen v jednom dni v jednom segmentu semenotvorného kanálku, příští den v sousedním a tak proces nepřetržitě pokračuje. V případě býka trvá tento cyklus 14 dnů a zapojuje do spermatogeneze 14 segmentů kanálku. Adluminální kompartment uvnitř každého segmentu podstoupí 4 až 6 cyklů než je spermie uvolněna do lumen semenotvorného kanálku. Nové uvolnění spermií

nastává denně v každém z následných 14 segmentů. Toto kontinuální uvolňování spermií ze 14 segmentů tvoří spermatogenní vlnu a každý kanálek může prodělat více než 15 vln. Segmenty se aktivují z centra každého kanálku oběma směry k *rete testis*. Tak je naprogramováním činnosti sousedních segmentů do cyklu v různém čase zajištěna nepřetržitá produkce spermií (Reece, 1998).

Termoregulace varlat

Horečka, klimatické teplo, ukládání tuku v okolí šourku, omrzliny a mechanické poranění, všechny tyto vlivy mohou narušovat termoregulaci varlat. Vnitřní teplota šourku býka se udržuje v rozmezí 33 - 34,5°C. Dokonce malé zvýšení teploty nad toto rozmezí může způsobit závažné poruchy spermatogeneze. Co se týče hypoxie, zdá se, že varlata savců jsou schopná správně pracovat i na pokraji hypoxie. U býka je testikulární tepna stočená v cévní kužel a je obklopena žilním pletencem (plexus pampiniformis), který je 3,5 až 4,5 m dlouhý, jeho svinování vytváří protiproud, mechanismus výměny tepla a má za následek také zpomalení průtoku krve. Tím je snížen pulz a omezen přívod krve tepnami k testikulární tkáni. Po vzestupu teploty se zvýší i rychlost metabolismu, který potřebuje zásobit kyslíkem, i přes potřebu kyslíku se průtok nezvýší a nastane hypoxie varlat. Je zajímavé, že ptáci a savci s vnitrobřišními varlaty nemají problémy s testikulární hypoxií. Krev přichází do varlat přímo aortou, což má při normální teplotě varlat za následek prokrvení a okysličení krví teploty těla (Barth a Bowman, 1994).

Faktory ovlivňující činnost varlat

Puberta

Funkce varlat se začínají projevovat na počátku puberty. Předpokládá se, že puberta je závislá na poklesu citlivosti hypotalamu vůči testosteronu a tak je LH secernován ve větším množství. Zvýšení koncentrace LH stimuluje Leydigovy buňky k větší sekreci testosteronu a začínají se projevovat všechny jeho sekundární účinky. Pro začátek spermiogeneze v pubertě je nezbytný FSH (Reece, 1998). Kvalita semene se zlepšuje během několika prvních měsíců po pubertě a klesá ve stáří (Foote, 1977).

Ostatní faktory

Varlata jsou velmi citlivá na nejrůznější nepříznivé vlivy, jakými jsou například teplo, stres, toxicita, hypoxie, světelné záření, a genetické poruchy (Barth a Bowman, 1994).

Životní prostředí významně přispívá ke kolísání kvality spermatu, toto ovlivnění může být trvalé nebo dočasné.

Podvýživa a požití toxických látek může mít zásadní vliv na vývoj varlat a spermatogenezi, reprodukční systém má však značnou regenerační schopnost, pokud nejsou dietní nedostatky vážné a dlouhotrvající.

Zvýšená teplota životního prostředí má vliv na neúplné sestoupení varlat (*kryptorchismus*), vysoké teploty nebo záněty šourku jsou škodlivé pro spermatogenezi všech savců. Chladné teploty se zdají být neškodné, pokud nedojde k omrznutí tkání (Foote, 1977).

Podpůrné buňky Sertoliho

Jsou somatické buňky nasedající na bazální membránu a vmezeřující se mezi buňky spermiogenetického epitelu (Věžník et al., 2004). Sertoliho buňky poskytují „opatrovnickou péči“ (ochranu a výživu) vyvíjejícím se spermii (Reece, 1998).

Sertoliho buňky jsou bohatě vybaveny pro podporu spermiogeneze. Desmozomálním spojením s bazální membránou a těsným a volným spojením jednotlivých buněk mezi sebou dotváří hemospermatickou bariéru a podmínky pro difuzní látkovou buněčnou výměnu. Bariéra, kterou tvoří Sertoliho buňky, má především charakter imunologické bariéry k zabránění rekognoskace autoantigenů spermatocytů a spermatid. Průnik případných toxinů je možný přenosem z bazálních částí Sertoliho buněk do adluminárních částí, kde působí přímo na pokročilá stadia vyvíjejících se pohlavních buněk. Sertoliho buňky zabezpečují svou sekreční aktivitou tekutinu vyplňující lumen semenotvorných kanálků a současně její recirkulaci. Sertoliho buňky významně participují na spermiaci, což je komplexní proces dozrávání spermatid ve vazbě na Sertoliho buňky a jeho ukončení je uvolnění spermatid do lumen kanálků. Interakce těchto buněčných zástupců je významná, neboť ne všechny spermatidy musí být z této vazby uvolněny a potom jsou fagocytovány. Fagocytární aktivita Sertoliho buněk je významná, neboť je tak zabezpečena jednak fagocytóza degenerovaných spermatid a dále veškeré uvolněné cytoplazmy, organel a residuálních tělísek z pozůstatků spermiogenezise (Věžník et al., 2004). Sertoliho buňky rozdělují semenotvorné kanálky na dvě části (1) vnější bazální část umožňuje kontakt zárodečné epitelové buňky – tzv. bazální kompartment a (2) vnitřní část, ve které jsou prostory mezi

Sertoliho buňkami, komunikující centrálně s lumen kanálků – tzv. adluminální kompartment (Reece, 1998).

Stočené semenoplodné kanálky jsou důležité tím, že v nich vznikají spermie. Vyvíjejí se složitou přeměnou pohlavních buněk tvořících druhou buněčnou součást výstelky točitých kanálků. Proces, kterým se ze spermiogonie vyvíjí spermie, se označuje spermiogeneze (Věžník et al., 2004).

Spermatogeneze

Výraz spermatogeneze se vztahuje na celý proces zahrnující transformaci kmenových buněk (zárodečných epitelových buněk) na spermie. V procesu spermatogeneze se vyskytují dva typy dělení, a to mitóza (dělení buněk, při kterém každá nová buňka zůstává diploidní, neboli má $2n$ počet chromozomů) a meióza (dělení, kdy každá nová buňka má poloviční počet chromozomů). V počátečním stádiu prvního meiotického dělení vytváří každý chromozom z chromozomového páru dvě chromatidy, které zůstávají spojeny dohromady, a tak tyto chromozomy mají duplikované geny. Při rozdělení primárního spermatocytu na dva sekundární spermatocyty (první meiotické dělení) každý spermatocyt obsahuje jeden chromozom (což jsou dvě spojené chromatidy) příslušného chromozomového páru. Při druhém meiotickém dělení vznikají z každého sekundárního spermatocytu dvě spermatidy. Při tomto dělení se od sebe chromatidy uvolní a vytvoří se dva duplicitní soubory genů. Každý soubor potom přejde do jedné ze dvou vzniklých spermatid. Každá spermatida, která se nakonec utvoří, má pouze polovinu genů původní spermatogonie. Podobně i vzniklé vajíčko má poloviční počet chromozomů, takže zygota, vzniklá oplozením vajíčka spermií, má diploidní počet chromozomů (Reece, 1998).

Kmenové buňky (spermatogonie) jsou uloženy v bazální části semenotvorných kanálků. Při mitotickém dělení vznikne ze spermatogonie jedna stejná buňka, která zůstává uložena na původním místě a druhá, která se nazývá spermatogonie typu A (A-spermatogonie). Ta pak migruje přes Sertoliho buněčnou bariéru do vrstvy buněk blízko dutiny kanálku (adluminální kompartment). Spermatogonie typu A prodělávají mitotické dělení, které někdy zahrnuje několik generací buněk. Vzniká tak velké množství spermatogonií typu B (B-spermatogonie). Tyto buňky se naposledy mitoticky dělí a výsledkem je tvorba primárních spermatocytů s počtem chromozomů = $2n$. Primární spermatocyty se dále meioticky dělí a vznikají z nich sekundární

spermatocyty, ze kterých po druhém meiotickém dělení vznikají spermatidy (počet chromozomů = n). U býků vzniká 64 spermatid z jedné spermatogonie typu A. Spermatidy dozrávají v oblasti blízko lumen kanálku. Dozrávání zahrnuje sérii jaderných a cytoplazmatických změn nazývaných spermiogeneze (Reece, 1998).

Spermiogeneze

Při spermiogenezi nastupují za sebou dvě vývojové fáze: spermiocytogeneze a spermiogenezise. Při spermiocytogenezi lze od sebe oddělit tři za sebou následující periody: periodu rozmnožování, periodu růstu a periodu zrání. Při těchto pochodech postupují za sebou od bazální membrány směrem k lumen kanálků nové a nové buněčné útvary. Základem buněk semenných jsou *spermiogonie* (příp. *spermatogonie*), které v jejich vývojových stádiích označujeme jako typ A (příp. A_1, A_2, A_3) typ IM a typ B. Poslední se meiotickým dělením, nelišícím se od dělení ostatních somatických buněk, dělí na dva *spermiocyty I. řádu*, (příp. *spermatocyty I. řádu*), které narůstají a dělí se prvními fázemi redukčního dělení – *meiosou* – na dva *spermiocyty II. řádu* (příp. *spermatocyty II. řádu*). Tento typ buněk se označuje též jako *prespermatidy* a má relativně nejkratší dobu existence v průběhu spermiogenetického cyklu. Dělením prespermatid se ukončuje redukční dělení a vznikají dvě *spermatidy*. Vznikem tohoto typu semenných buněk je ukončena spermiocytogeneze a nastupuje proces metamorfózy označovaný jako spermiogenezise nebo též spermatelióza.

V průběhu spermiogenezise prochází sférická forma spermatidy strukturálními změnami, kterými se změní do formy zralé spermie. Jednotlivé vývojové kroky se týkají jednak transformace jádra spermatidy, které se mění postupně změnou jaderného chromatinu, ztrátou tekutiny a kondenzací do krystalické formy deoxyribonukleové kyseliny. Tento proces je provázen vytvořením akrozomálního (*cefalického*) aparátu, který má základ v Golgiho aparátu. Vakuoly a granula Golgiho aparátu vydělí zvětšující se vakuolou, která se vyplňuje homogenním materiálem z původních granulí, tato struktura se někdy označuje jako *idiosom*, pokud tuto část ztotožňujeme s atrakční funkční sférou. Základní vakuolu označujeme jako proakrozomální vakuolu a nahloučenou hmotu jako proakrozomální granulum. Vyvíjející se akrozom nasedá na dosud sférické jádro spermatidy a vytváří čepičkový útvar, který vnitřním listem kryje jadernou membránu a vnějším listem se přibližuje k plasmatické membráně spermatidy. Spermatida se ve svém postavení orientuje akrozomální částí k bázi kanálku a její tvar se protahuje do ovoidního nebo eliptického tvaru. Oproti této apikální části spermatidy

se začíná formovat manžeta tvořená endoplazmatickým retikulem. Toto vývojové stádium nese při typizaci i toto označení. V časové souslednosti se rozdělují centrioly do dvou uzlů, z nichž proximální se umísťuje v blízkosti jádra a distální z polohy vůči jádru, se dislokuje více k periférii buňky. Centriol je buněčná organela válcovitého tvaru na povrchu obdána devíti filamenti. Proximální centriol dá vznik implantační ploténce, resp. *nodulus anterior*, distální centriol se rozdělí na dvě části, z nichž proximálnější uložená se přiblíží k jádru a dá základ tvorbě bičíku. Distálnější uložená část vytvoří prstenec zakončující spojovací část bičíku a ukončení mitochondriální spirály, tento prstenec se označuje jako Jensenův prstenec (Věžník et al., 2004).

Mitochondriální spirála

Je tvořena sestavením mitochondrií do pravotočivé, základy bičíku obkružující, vrstvy spojovací části bičíku, která představuje zdroj ATP potřebného k pohybu spermií. Mitochondriální oddíl bičíku (spojovací část) je tvořena komplexem osových vláken s charakteristickým uspořádáním pro většinu kinocilií a bičíků. Střed této vlákenné soustavy tvoří dvě osová vlákna, která jsou obdána devíti páry vláken – dublet. Tato dvojvlákna představují strukturální spojení vlákna a mikrotubulu s propojovacími bílkovinnými výběžky, které zabezpečují pohyb bičíku. Vnější obkroužení tohoto osového základu tvoří devět masivnějších vláken, které představují tzv. hladké chordy. Na tento základ nasedá mitochondriální pochva. Za útvarem označovaným jako Jensenův prstenec začíná hlavní část bičíku, která ve svém základu má stejné složení. Na místě mitochondriální pochvy se v této části bičíku nachází fibrózní pochva, která je tenčí, jakož i celá hlavní část bičíku. Tato fibrózní pochva má střední, longitudinálně probíhající vlákna, podržující rovný tvar bičíku a vysílající hřebenovité výběžky obkružující celou strukturu. Tyto pochvy se s délkou bičíku zužují tak, že v terminální části zcela chybí. Terminální část bičíku tvoří jen fonéma a i ta je redukována. Celý bičík je pokryt povrchovou membránou, která však v celém rozsahu nemá původ v plasmatické membráně spermatidy (Věžník et al., 2004).

Akrozom

Jak již bylo uvedeno, vzniká ze souboru buněčných organel označovaných jako Golgiho aparát. Vakuola z části tohoto aparátu nalehne na proximální část jádra a vytvoří čepičkovitý útvar tvořený vnitřním listem akrozomu, přiléhajícím k membráně jádra a vnějším listem situovaným pod plasmatickou membránou. Mezi těmito dvěma listy je rozprostřena akrozomální hmota vzniklá z původního granula Golgiho aparátu a svým

složením připomínající lyzozóm. Velikost akrozomu, jakož i jeho terminální zakončení je odlišné u spermií jednotlivých představitelů hospodářských zvířat. U býka kryje akrozom proximální polovinu hlavičky spermie a zakončení obou listů intimně spojených s membránou jadernou je nerovnoměrné, takže tvoří v ekvatoriálním segmentu měsíčkovité vykrojení. U kance tvoří délka akrozomu asi dvě třetiny délky hlavičky a dolní listy vytváří vzhled ekvatoriálního segmentu ve formě půlkruhové klenby. Obdobný vzhled má akrozom u hřebce jen jeho báze je téměř rovná. Spodina akrozomu, především povrchový list, se vnořuje do tmelového materiálu kalíšku jádra. Akrozom je významnou funkční organelou spermie a stanovení jeho integrity je jedním z kritérií hodnocení kvalitativních ukazatelů ejakulátů. Povrch akrozomu je kryt plazmatickou membránou, která pokrývá celou hlavičku spermie. Na akrozomu a na povrchové membráně dochází k významným změnám v procesu kapacitace, který předchází fertilizaci.

Ductuli efferentes testis po výstupu z varlete se skládají v husté kličky a vzájemně se propojují. Tato část vývodů tvoří proximální část nadvarlete (*epididymis*) (Věžník et al., 2004).

3.1.2 Vývodné cesty

Nadvarle (epididymis)

Nadvarle shromažďuje a ukládá do zásoby spermie, které jsou dopravovány do nadvarlete proudem tekutiny ze semenotvorných kanálků. V nadvarleti spermie dozrávají a získávají schopnost pohybovat se přímo dopředu (na rozdíl od cirkulárního pohybu) a schopnost oplozovací. Dochází ke změnám na jaderném chromatinu (komplex DNA – protein) a změnám povrchové struktury plazmatické membrány. Nadvarle začíná na té části varlete, kde do něho vstupují cévy a nervy (Reece, 1998). Nadvarle je tvořeno jediným stočeným kanálkem (*ductus epididymis*), který má svůj základ ve Wolfově vývodu. Nadvarle přisedá intimně na povrch varlete a je tvořeno hlavou nadvarlete (*caput epididymidis*) (Věžník et al., 2004), do které se dostávají spermie a varletní tekutina vývodnými kanálky z rete testis (Reece, 1998), tělem nadvarlete (*corpus epididymidis*) a ocasem (*cauda epididymidis*) (Věžník et al., 2004).

Proximální část hlavy nadvarlete je významně aktivní jak sekreční, tak resorbční funkcí a zabezpečuje další postup spermií kinociliemi cylindrického epitelu bez dalších příměsí tekutin nebo buněčného detritu. Tuto část též označujeme jako *coni vanuli* (Věžník et

al., 2004). Podle novějších poznatků byl metodou fluorescenční mikroskopie v hlavě nadvarlete pozorován výrazný výskyt lipokalinu typu prostaglandin D syntáza, zatím co ve zbytku nadvarlete bylo středně slabé pozorování. Výrazný výskyt byl také na apikálním hřebeni akrozomu ejakulované spermie. Prostaglandin D syntáza má nejspíše význam v dozrávání spermií (Gerena et al., 2000).

Spermie se shromažďují a uchovávají zejména v ocasu nadvarlete. Soustřeďuje se jich zde okolo 70% celkové produkce (Reece, 1998). Spermie, které jsou uloženy v ocasu nadvarlete, jsou ve stavu anabiózy, který brání metabolismu spermií a ztrátám jejich energie (Věžník et al., 2004).

Před výstupem z ocasu nadvarlete se nadvarletní vývod rozšiřuje, napřimuje a pokračuje jako chámovod (*ductus deferens*) (Věžník et al., 2004). Mnoho spermií, které se vytvoří ve varlatech, je fagocytováno ve vývodném systému, kterým procházejí, nebo odchází močí (Reece, 1998).

Chámovod (ductus deferens)

Chámovod je pokračováním vývodného systému z ocasu nadvarlete do pánevního úseku močové trubice (Reece, 1998). Chámovod jako samostatný vývod je tvořen sliznicí, svalovinou a serózou. Po výstupu z ocasu nadvarlete prochází dutinou šourkovou, tříselným kanálem, dutinou břišní (Věžník et al., 2004), spolu s varletní tepnou, žílou, nervem, lymfatickými cévami a svalem vnitřním zdvihačem varlete (*musculus cremaster internus*) (Reece, 1998) a dostává se do dutiny pánevní až na dorzální plochu močového měchýře (Věžník et al., 2004). Tento celý útvar se nazývá semenný provazec (Reece, 1998). U hřebce a přežvýkavců se před vstupem do uretry chámovod rozšíří do větvenovitého útvaru a vytvoří ampulu chámovodu (*ampulla ductus deferentis*). Žlaznatá část ampuly chámovodu vylučuje sekret stimulující metabolismus spermií. Na semenném hrbolku (*colliculus seminalis*) vstupují chámovody jako *ductus ejaculatorius* společně s vývody semenných váčků do uretry. (Věžník et al., 2004).

3.1.3 Přídatné pohlavní žlázy (glandulae genitales accesoriae)

Jsou uloženy v pánevní oblasti u močové trubice (Věžník et al., 2004). Produkují sekrety, které jsou vyprazdňovány do pánevní části močové trubice v blízkosti uložení těchto žláz (Reece, 1998). Jejich sekrety tvoří semennou plazmu. Řízení sekrece je vázáno na hormonální aktivitu parenchymu varlat a produkci testosteronu, vyměšování

pak na dobu ejakulace.(Věžník et al., 2004). Při ejakulaci se sekrety přídatných pohlavních žláz (označované jako semenná plazma) smísí se spermatem a tekutinou nadvarlete a vytváří se semeno.

Žlázy jsou tvarově i velikostí druhově odlišné a některé mohou u určitých živočišných druhů chybět (Reece, 1998).

Váčky semenné (vesiculae s. glandulae seminales)

Jsou uloženy na horní ploše močového měchýře vedle ampulí chámovodu, s nimiž ústí buďto společně (býk a hřebec) nebo samostatně (kanec) do močové roury na semenném vrcholku. Semenné váčky jsou lalúčkovité žlázy výrazné velikosti, které u přežvýkavců a kance mají kompaktní strukturu a u hřebce jsou vakovité. U psa a kocoura nejsou vytvořeny. Sekret semenných váčků tvoří u býka 10 – 40% celkového objemu ejakulátu, u hřebce 25 – 35% a u kance 10 – 30%. Sekret semenných váčků obsahuje cukry, sloužící spermiím jako zdroj energie, bílkoviny, volné aminokyseliny, kyselinu mléčnou a citrónovou, z enzymů především alkalickou a kyselou fosfatázu a četné anorganické látky. Rozvoj a funkce semenných váčků, stejně jako i dalších přídatných pohlavních žláz jsou řízeny inkreční činností varlat, tj. úrovní produkce testosteronu (Věžník et al., 2004).

Žláza předstojná (prostata)

Je svalově žláznatý orgán, který obepíná začátek močové trubice (Věžník et al., 2004). Prostata se může vyskytovat v několika formách, které se odvíjí podle dvou hlavních částí prostaty: tělem a roztroušenou částí (Schillo, 2009). U býka, kance a malých přežvýkavců je tato žláza tvořena nepárovým útvarem a disseminovanou žláznatou strukturou podél močové trubice, kam ústí četnými vývody. U psa je relativně největší a obkružuje krček močového měchýře a část uretry. Párově je založena prostata u hřebce, kdy oba poměrně velké laterální laloky spojuje střední část mostu (*istmus prostatae*). Na celkovém objemu ejakulátu se sekrety prostaty podílí různou velikostí, u býka v rozsahu 4 – 6%, u hřebce 25 – 30%, u kance cca. 30% a u psa je podíl největší a tvoří 85 – 90%. Také pH sekretu je velmi rozdílné např. u psa a býka je poměrně kyselé a pohybuje se kolem pH 6,5, naproti tomu u hřebce je pH 7,0 – 7,2 a u kance je pH 7,0 – 8,0 (Věžník et al., 2004).

Na funkci prostaty negativně působí infekce nebo zánětlivé poruchy, které mohou mít vliv na její sekreční funkci a funkci semenných váčků. Infekce prostaty může způsobit

částečné nebo úplné ucpání ejakulačních kanálků a vede často k oligospermii a dokonce i azoospermii. Infekce semenných váčků často způsobuje podstatné snížení objemu ejakulátu a nízkou koncentrací semenné fruktózy (Mortimer, 1994).

Bulbouretrální žlázy (glandulae bulbourethrales, Cowperi)

Jsou párově založené žlázy u močové trubice v místě jejího východu z pánve. Sekret bulbouretrálních žláz je zásaditý, tvoří ochranu spermií neutralizací zbytků kyselé moči v uretře. Částečně se podílí i na lubrikaci. Největší podíl v ejakulátu tvoří sekrety bulbouretrálních žláz u kance, což odpovídá i jejich anatomickému vzhledu. Sekret Cowperových žláz u kance se při styku s ostatními sekrety mění v želatinózní hmotu, která se formuje v zrna šedo – bílé až nažloutlé barvy, jeho pH je 7,5. Vývojově odpovídají bulbouretrální žlázy Bartoliniho žlázám u samic. Bulbouretrální žlázy nejsou vytvořeny u psa (Věžník et al., 2004).

3.1.4 Kopulační orgán

Pyj (penis, fallus)

Pyj je samčí kopulační (pářící) orgán (Reece, 1998). Orgán, jehož anatomické uspořádání zabezpečuje přenos semene do pohlavních cest samice (Věžník et al., 2004). Vzhledem k této funkci má zvláštní stavbu, která umožňuje, že se při pohlavním podráždění napřímí a zvětší svůj objem, aby mohl být zasunut do pochvy samice (Komárek et al, 1964). Semeno prochází močovou trubicí, která je v něm uložena (Reece, 1998). Močová trubice vychází z hrdla močového měchýře a končí v otvoru na konci penisu (Schillo, 2009). Jeho morfologické a strukturální uspořádání je rozdílné u jednotlivých druhů zvířat (Věžník et al., 2004). Kořen penisu odstupuje pomocí dvou ramen od kaudální hrany sedací kosti. Na kořen navazuje tělo penisu, které je zakončeno žaludem (Reece, 1998). Nervové centrum pro erekci (*centrum genitospinale*) leží v nejkaudálnější části spinální míchy a je to právě erekce, která na základě funkčních změn na penisu rozděluje tento orgán do několika typů. Zvětšení a prodloužení penisu při erekci je založeno buďto na překrvení kavernózních - topořivých těles (hřbec, pes) nebo na vyrovnání esovitého zakřivení penisu bez jeho významného zbytnění (přežvýkavci) (Věžník et al., 2004). Kavernózní tkáň je tvořena souborem krevních sinusů, oddělených listy vazivové tkáně. Hřbec má značné množství kavernózní tkáně v poměru k vazivu, tím dosahuje při erekci většího zvětšení penisu než býk, kde poměr erektilní a pojivové tkáně je menší (Reece, 1998).

Rozmanitost tvarů pyje je též dána různým utvářením žaludu pyje (*glans penis*). Tento je nejvýrazněji vytvořen u hřebce a psa. Uprostřed žaludu pyje, tvořícího růžici, je jamka (*fossa glandis*), kde vyčnívá výběžek močové trubice (*processus urethrae*). U psa má *glans penis* dva úseky a oba jsou vyztuženy pyjovou kostí (*os penis*), kaudálněji uložená část žaludu tvoří uzly (*bulbus glandis*), které mohutně zduří pro kopulaci a napomáhají tak ke svázání. U býka a malých přežvýkavců je žalud pyje málo výrazný, přední část se označuje jako přilba žaludu (*galea glandis*) a zřejmě je vyústění močové roury (Věžník et al., 2004). U býka se penis stáčí v esovitém ohbí, což dává neztopořenému penisu esovitý tvar. Při erekcí pyje dochází k natažení (vyrovnaní) ohybu (Reece, 1998).

3.2 Hormonální regulace

Reprodukční funkce samců jsou řízeny souhrou nervového a endokrinního systému. Regulační mechanismy jsou součástí geneticky zafixovaného vnitřního řídicího systému, který je ovlivňován vnějším činitelem – časem, který je zodpovědný za druhově a individuálně typický průběh reprodukčních dějů.

Nadřazeným orgánem pro řízení pohlavní činnosti je centrální nervový systém (CNS). Centra vlastního řízení reprodukčních funkcí jsou umístěna v mezimozku a v zadních partiích míchy. Mechanismus neurohumorálního řízení začíná v oblasti mozkové kůry, kam jsou situovány podněty zrakové, čichové, hmatové a sluchové přicházející z vnějšího prostředí, ale i podněty vnitřní. Po jejich registraci a integraci jsou přesunuty do hypotalamu a hypofýzy. V hypotalamu jsou determinovány dvě lokality, které se podílí na řízení pohlavní činnosti. Přední tzv. rostrální sexuální centrum, odpovídá oblasti *area praeoptica medialis* a *nukleus suprachiasmaticus*, druhé kaudální centrum odpovídá lokalitě *nukleus infundibularis*, *nukleus ventromedialis* a *nukleus arcuatus*. Poslední jsou umístěny v blízkosti mediální eminence u odstupu hypofýzy. Hypofýza je s touto lokalitou v úzkém cévním spojení, které je součástí hypofyzárního portálního oběhu (Věžník et al., 2004).

3.2.1 Hypotalamus

Je nevýrazná část mozku, která však centruje významné funkční aktivity. Na kontrole sexuální aktivity se podílí sekrecí gonadoliberinu (GnRH – gonadotropin releasing hormon). Jde o dekaeptid, který zabezpečuje uvolnění obou gonadotropních hormonů z hypofýzy. Důležité je jeho pulzační uvolňování. Hlavním zdrojem sekrece je u samců tonické centrum, uložené v hypotalamu v bazální, mediální části kaudálně od

cyklického centra v oblasti *nucleus arcuatus* a *nucleus ventromedialis*. Funkce tonického centra je ovlivňována především zpětnovazebným působením produkovaných *sexagenů* – gonadálních steroidních hormonů. Jejich vyšší hladiny brzdí produkci GnRH, naproti tomu nízké tuto produkci zesilují (Věžník et al., 2004).

3.2.2 Hypofýza

Podvěsek mozkový – je řazen do žláz s vnitřní sekrecí, je součástí diencefala. Dělí se na přední a zadní lalok. Adenohypofýza (přední lalok) řídí celou řadu dalších žláz – mezi nimi i gonády. Zadní část – neurohypofýza – vylučuje některé hormony, které jsou do ní transportovány po vytvoření v jiné části mozku – hypotalamu. Hypofýza potencuje stimuly vycházející z hypotalamu produkcí gonadotropních hormonů (GnRH). Hlavní gonadotropiny uvolňované z hypofýzy po stimulaci GnRH jsou lutropin (LH, luteinizační hormon, označovaný též ICSH, intersticiální buňky stimulující hormon) a folitropin (FSH, folikuly stimulující hormon).

Uplatnění gonadotropinů v řízení reprodukčních funkcí: gonadotropiny jsou po chemické stránce glykoproteiny, které po navázání na receptory cílových tkání svou specifickou vazbou, úlohou prvního posla, vyvolávají prostřednictvím adenocyklázy zvýšenou tvorbu CAMP (cyklický adenosinmonofosfát), druhého posla, který uvolní z vazebných bílkovin proteokinázy, jejichž aktivitou dojde k specifické buněčné reakci a produkci steroidního hormonu. U samců jsou cílovým místem pro lutropin (LH) Leydigovy buňky v intersticiu parenchymu varlat a výše popsáním mechanismem dochází k produkci testosteronu. Folitropin (FSH) je glykoprotein, jehož vazebným místem u samců jsou receptory Sertoliho buněk. Funkce Sertoliho buněk je folitropinem stimulována podporou syntézy RNA k produkci proteinů, včetně specifického proteinu vázajícího androgeny (ABP – androgen binding protein) a k produkci inhibinu (Věžník et al., 2004).

3.2.3 Gonadotropní hormony - sexageny

Pod vlivem hypotalamických GnRH se ve specializovaných buňkách adenohypofýzy vytvářejí dva gonadotropní hormony – FSH a LH. Chemicky se jedná o vysokomolekulární glykoproteiny s poměrně vysokou molekulovou hmotností, které jsou pohlavně nespecifické.

Folikuly stimulující hormon (FSH, folitropin) u samců stimuluje růst semenotvorných kanálků a tvorbu spermií, činnost Sertoliho buněk a produkci hormonu inhibinu.

Luteinizační hormon (LH, lutropin) u samců také označovaný jako intersticiální buňky stimulující hormon (ICSH) působí na intersticiální buňky (Leydigovy) a stimuluje tvorbu specifického pohlavního hormonu testosteronu (Jelínek et al., 2003).

3.2.4 Testosteron

Leydigovy buňky jsou zodpovědné za produkci mužského hormonu testosteronu a jsou umístěny v intersticiálním prostoru mezi semennými kanálky (Hopper, 2015). Představují strukturální základ pro inkreční aktivitu parenchymu varlat. Zde se tvoří několik typů pohlavních hormonů (androgenů), z nichž je právě testosteron nejdůležitější. Biologické účinky tohoto samčího hormonu jsou generální pro rozvoj samce. Testosteron zajišťuje vývoj samčího typu genitálu u plodu, po sexuálním dozrání navozuje růst pohlavních orgánů, ovlivňuje rozvoj a funkci přídatných pohlavních žláz, působí na vývoj sekundárních pohlavních znaků, ovlivňuje metabolismus, má vliv na rozvoj kostí a kostry, stimuluje produkci erythropoetinu a spolu s inhibinem ovlivňuje zpětnou vazbou produkci gonadoliberinu a gonadotropinů (Věžník et al., 2004). Vysoké hladiny testosteronu jsou nezbytné pro běžnou funkci varlat a nadvarlat (Barth a Bowman, 1994). Testosteron je steroid, který se tvoří v intersticiálních buňkách varlat. Uvolněný testosteron přechází do semenotvorných kanálek a je vázán specifickými vazebnými proteiny (ABP) na recepčních místech Sertoliho buněk. Do krevní plazmy přechází ve vazbě na transportní protein β - globulin (TEBG) a dostává se tak k cílovým tkáním v organismu. Hladiny testosteronu jsou značně kolísavé, jednak pro epizodický rytmus uvolňování testosteronu, jednak pro sezónnost poměrně častou u některých druhů zvířat (Věžník et al., 2004).

3.2.5 Inhibin

Je peptid, který byl prokázán v parenchymu varlat – semenotvorných kanálcích, v lymfě a sekretech z rete testis. Jeho přítomnost byla též potvrzena i v ejakulátech. Místem jeho vzniku jsou Sertoliho buňky a jeho účinnost je řazena do zpětnovazebních mechanismů zacílených na kontrolu sekrece FSH. Lokálně se předpokládá jeho účast na mitotické inhibici a je proto řazen do látek s funkcí chalonů (Věžník et al., 2004).

3.3 Ejakulát

3.3.1 Semenná plazma

Semenná plazma vytváří v samičím pohlavním ústrojí vhodné prostředí pro přežití spermií (Reece, 1998) a obsahuje převážně sekrety přídatných pohlavních žláz. Je to tekutina druhově specifického množství a barvy, rozdílného pH (6,2 - 7,5) a konzistence (Jelínek et al., 2003). Je bohatá na elektrolyty, fruktózu, kyselinu askorbovou a další vitamíny. I když může dojít k oplození spermii, které se nesetkaly se semennou plazmou, mají spermie v semenné plazmě větší oplozovací potenciál. Jednotlivé druhy zvířat se ve složení semenné plazmy liší. Stálá a nekolísající složka mezi všemi druhy je fruktóza. Výhodou fruktózy jako energetického zdroje může být skutečnost, že pro vstup do spermie nepotřebuje energii.

V semenné plazmě je přítomno několik prostaglandinů. Má se za to, že pomáhají oplozování dvěma způsoby: (1) prostaglandiny reagují s hlenem sliznice krčku a upravují jej pro průchod spermií a (2) některé z přítomných prostaglandinů způsobují kontrakce hladké svaloviny a existuje názor, že je tím v děloze a vejcovodech napomáháno transportu spermií směrem k vaječnicím.

Většina spermií v ejakulátu nikdy nedosáhne vejcovodu. Ve skutečnosti pouze několik desítek spermií se přiblíží vajíčku a pouze jedna se nakonec účastní oplození (Reece, 1998).

Podíl semenné plazmy na celkovém objemu ejakulátu je rozdílný. Stejně tak je i rozdílný podíl sekretu jednotlivých přídatných pohlavních žláz na celkovém objemu ejakulátu. U býka činí podíl semenné plazmy 90% (Jelínek et al., 2003).

3.3.2 Spermie

Tvoří nejdůležitější složku ejakulátu. Jejich velikost a tvar jsou druhově rozdílné a společným hlavním znakem je pohyblivost a schopnost oplození. Jsou 50 – 80 μm dlouhé. Se zřetelem na přítomnost sexchromozomu jsou mezi nimi nepatrné hmotnostní rozdíly. Spermie s malým heterochromozomem Y (androspermie) jsou lehčí než spermie s větším heterochromozomem X (gynospermie). Hlavička spermie je 5-10 μm dlouhá a její utváření u jednotlivých druhů je rozdílné, jak je zobrazeno v příloze (Obrázek 2). Je ze stran oploštělá, oválného tvaru a její přední část je kryta čepičkou, která je dobře barvitelná – akrozom. Pokrývá přední část hlavičky spermie. Hlavičku spermie tvoří především jádro s kondenzovaným chromatinem a obsahujícím

deoxyribonukleovou kyselinu nesoucí genetické informace pro vlastnosti nového jedince. Bičík spermie je 50-70 μm dlouhý a představuje pohybové ústrojí spermie. Bičík je spojen s hlavičkou krčkem (centriolovou částí). Bičík spermie je tvořen spojovacím oddílem, hlavním oddílem a koncovým (terminálním) oddílem. Krček spermie je krátký (2-3 μm) a spojuje hlavičku s bičíkem spermie. Obsahuje dva za sebou uložené centrioly. Distální centriol je obklopen devíti příčně segmentovanými provazci neboli chordami. Z distálního centriolu pak vystupuje osově vlákno tvořené 9+2 duplety mikrotubulů. Spojovací (mitochondriální) oddíl bičíku navazuje na centriolový oddíl. Je charakterizován přítomností značného počtu mitochondrií (u býka 90). Hlavní oddíl bičíku je nejdelší (40-50 μm) a jeho podkladem podobně jako v předcházejícím mitochondriálním oddílu je osově vlákno obklopené nesegmentovanými chordami a obalené fibrózní pochvou z homogenní a silně kontrastní hmoty. Jejím úkolem je zabezpečovat soudržnost osových vláken a jejich pevnost a pružnost při kmitání bičíku. Koncový (terminální) oddíl bičíku měří cca 4 μm a je tvořen pouze osovým vláknem bez chord a fibrózní pochvy (Jelínek et al., 2003).

Celá spermie je pokryta nepřerušovanou dvouvrstevnou cytoplazmatickou membránou, která představuje základní ochranu spermie. Je acidorezistentní, vysoce permeabilní a citlivá na změny osmotického tlaku. Permeabilita membrány umožňuje látkovou výměnu spermií. Na základě poznatku, že cytoplazmatická membrána u živých spermií nepropouští některá barviva (eozin, fluorochromy), byla vypracována metoda vitálně letálního barvení, umožňující rozlišovat živé a mrtvé spermie. Poškození permeability membrán může nastat při dlouhodobé konzervaci spermií (při zmrazování) a stát se tak příčinou snížené oplozovací schopnosti spermií (Jelínek et al., 2003).

(Jelínek et al. 2003) dále uvádí tabulku, ve které porovnává ejakuláty jednotlivých druhů zvířat.

Tabulka 1: objem, pH, koncentrace, množství spermií a vzhled ejakulátu u jednotlivých druhů zvířat (Jelínek et al., 2003)

Druh	Průměrný objem ejakulátu (ml)	pH ejakulátu	Průměrná koncentrace spermií ³ (tis.)	Celkové množství spermií v ejakulátu (v miliardách)	Vzhled ejakulátu
býk	4	6,4 – 7,0	1000	4	bělavě nažloutlý, smetanovitý
beran	1	6,5 – 7,0	3000	3	nažloutlý, smetanovitý
kozel	1	6,2 – 7,0	3000	3	nažloutlý, smetanovitý
hřebeč	70	6,7 -7,8	120	8	šedavě bělavý, vodnatý
kanec	250	6,8 – 7,9	150	40	bělavý, mléčně vodnatý

Tabulka 2: Základní ukazatele nativního býčího semene (Věžník et al., 2000)

objem v ml	> 4
koncentrace spermií v mm ³	> 700 000
pH	6,9
procento pohyblivých spermií	> 70
rychlost pohybu spermií v μm.s ⁻¹	80
index endogenních reductáz	> 180
procento patologických spermií celkem	< 20
procento primárních změn	< 10

3.4 Odběr ejakulátu

Princip inseminace jako aktivního zásahu člověka do rozmnožování zvířat byl objeven podle pověstí již Araby ve 14. století. První vědecké zprávy o inseminaci se však začínají objevovat až v 16. století (Kovář a Sobek, 1965). Inseminace je aktivním cílevědomým zásahem do procesu rozmnožování hospodářských zvířat, při kterém nedochází k pářicímu aktu, aby se účelně zamezil přímý styk pohlavních partnerů (Polák, 1961). Inseminace se tedy od páření liší především tím, že mezi ejakulací

spermatu a jeho vpravením do pohlavního ústrojí plemence je určitá časová přestávka. Tato přestávka umožňuje nejen zhodnocení získaného ejakulátu, ale využíváme ji především k jeho úpravě, aby se mohl využít pro větší množství plemenic (Kovář a Sobek, 1965).

V dnešní době je velká většina dojnic Evropy, USA a Kanady oplodňována uměle. Umělé oplodnění u krav s tržní produkcí masa je také populární, ale zejména u čistokrevných stád. Výhodou umělého oplodnění oproti přirozenému oplodnění je to, že umožňuje rychlé genetické zlepšení tím, že umožňuje využití těch nejlepších býků (Rouge, 2002). Velký význam má také pro tlumení pohlavních nákaz a je výhodné i z hlediska ekonomiky kdy není zapotřebí velký počet plemenných býků (Kovář a Sobek, 1965).

Samčí plodnost je důležitým faktorem v reprodukci skotu, ve stádě krav se k chovu běžně využívá jeden býk (Contri et al., 2013). Někteří býci zplodili i více než 100 000 potomků přes umělé oplodnění. Semeno je nejčastěji odebíráno býkům pomocí umělé vagíny (Rouge, 2002). V průběhu let byly vyvinuty postupy pro maximální získání spermií, zachování vysoké kvality semene a minimalizaci kontaminace. Adekvátní sexuální stimulace, optimální teplota a tlak uvnitř umělé vagíny, optimální frekvence odběru na základě míry produkce spermií uvnitř varlat, to vše je klíčem k maximalizaci produkce spermií (Parks, 2006).

Nejčastěji se používá odběr semene do umělé vagíny, z dalších metod se může použít metoda elektroejakulace a v ojedinělých případech metoda masáže měchýřkovitých žláz (Gamčík et al., 1976).

K odběru ejakulátu se používají různé typy umělých vagín (Louda, 2001). Jedná se o zvláštní aparaturu, která je přizpůsobena fyziologickým poměrům jednotlivých druhů zvířat a respektuje i biologické vlastnosti spermatu (Kovář a Sobek, 1965). Konstrukce umělé pochvy se v průběhu let mírně změnila za účelem snížení ztrát spermií a rizika poškození penisu (Parks, 2006). V současné době se používají umělé vagíny zkrácené, dlouhé 30 cm vybavené jednorázovým sběračem kornoutovitého tvaru z polyetylénu.

Příprava umělé vagíny

Příprava umělé vagíny k odběru se provádí ve zvláštní, k tomu určené místnosti spojené s prostorem pro odběr. Před přípravou si technik pro odběr oblékne pracovní plášť, přezuje se a pečlivě si umyje ruce teplou vodou a mýdlem. Před každým odběrem se

překontroluje těsnost mezistěny vagíny. Mezistěna vagíny se naplní asi 100 cm³ vody o takové teplotě, aby při odběru uvnitř vagíny dosáhla 38 – 40 °C. Umělá vagína se opatří sběračem tak, že se mezi sběrač a vložku vkládá savý sterilní papír k zachycení povrchových nečistot z umělé vagíny. Takto připravené vagíny se mohou umístit před odběrem do termostatu o teplotě 40 °C. Před použitím se umělá vagína vymaže sterilní vazelinou pomocí sterilní skleněné tyče. Před odběrem se dofoukne mezi stěny umělé vagíny vzduch tak, aby tlak činil přibližně 530 kPa. K tepelné izolaci slouží obal z molitanu, který se před použitím nahřívá na teplotu asi 35°C. Navléká se na jednorázový sběrač. Po odběru se drží vagína ústím dolů tak, aby se zabránilo stékání nečistot do spermatu. V přípravné laboratoři se odstříhne obal se spermatem, který se předá do laboratoře k dalšímu zpracování a zapíše se registr býka. V laboratoři se obal se spermatem vkládá do zářezů v polystyrénové desce, která má laboratorní teplotu. Ze sběrače se odebere vzorek spermatu k laboratornímu posouzení. Ve sběrači se semeno ředí a probíhá v něm i ekvilibrace (postupné zchlazení). Sběrač je jednorázový.

Příprava atrapy

Zatím co technik odběru připravuje umělou pochvu, přivede ošetřovatel do připouštědla býka – atrapy, správně ji fixuje, dezinfikuje a pak osuší celou její zád'. Dezinfekce zádě býka atrapy se provádí po každém odběru a před dalším odběrem. Atrapa nahrazuje říjící se plemenci. Jako atrapy se vybírají býci klidného temperamentu a po čtyřech odběrech se střídají, jelikož jsou značně zatěžovány zadní končetiny, hlavně ve hleznech (Louda, 2001). Jako ekvivalent živé atrapy se mohou využívat také umělé fantomy rozličných typů, které mohou mít popřípadě i uvnitř různě upevněnou a seřízenou umělou pochvu (Polák, 1961).

K odběru jsou býci řádně očištěni s dokonale omytou předkožkou ve vlažné vodě a mýdlem. Bezprostředně před odběrem se býkům očistí předkožka a chvostek suchou buničitou vatou. Býk je přiváděn ošetřovatelem k atrapě a provádí se jeho vydražďování. Technik odběru je připraven na pravé straně atrapy, na levé ruce má navlečenou jednorázovou rukavici a v pravé ruce drží umělou vagínu skloněnou ústím dolů asi 35°. Způsob přípravy býka na odběr (tzv. pohlavní vydražďování) je závislý na individuálních vlastnostech. Býk je náležitě připraven k odběru tehdy, je-li pyj vysunut a odkapávají-li výměšky přídavných žláz pohlavních. Při skoku býka na atrapu uchopí technik odběru předkožku, odkloní ji poněkud k sobě, usměrní pyj k ústí umělé pochvy a nechá býka dorazit (Louda, 2001).

Býci se odebírají v obvyklou předem stanovenou dobu, nejdříve však 3 hodiny po nakrmení. Frekvence odběru se stanoví individuálně pro každého býka, přičemž se přihlíží k jeho věku, neurokonstitučnímu typu, kondici a zdravotnímu stavu. Optimální je 8 – 14 odběrů v měsíci. U mladých býků do 2 let je frekvence odběrů nižší 1x za týden (Louda, 2001).

Odběr spermatu elektroejakulací

Této metody se používá výjimečně, pouze u býků zlepšovatelů, kteří ze zdravotních důvodů nejsou schopni odběru pomocí umělé vagíny. Tímto způsobem se získá stejný objem ejakulátu, koncentrace spermií v ejakulátu se nemění, pH bývá zvýšené vlivem většího podílu sekretu uretrálních žláz (pH = od 7,0 do 7,4). Aktivita spermií a obsah fruktózy jsou nižší.

K odběru se používají bipolární elektrody, zdrojem proudu pro elektroejakulátor bývá baterie nebo elektrická síť. Napětí potřebné k vyvolání ejakulace se pohybuje od 3 do 20 V. Elektrody jsou tyčovitě a zavádí se rektem do krajiny pánevní na úroveň váčků semenných. Dalším typem jsou elektrody tzv. prstencové, které se navlékají na prsty ruky navlečené do gumové rukavice ošetřené parafinem (Louda, 2001).

U býka určeného k odběru se fixují zadní končetiny. Vyprázdní se rektální otvor. Předkožka se vypláchne 1 – 2 % roztokem NaCl. Ruka s elektrodou se zavede do rekta na úroveň váčků semenných a přístroj se uvede do chodu. Ejakulace probíhá při napětí proudu 10 – 30 V a jeho intenzitě 40 – 60 mA. Dráždění se provádí opakovaně 3 – 5x při délce 3 – 5 sekund. Erekcce pyje se dostaví při intenzitě proudu až 100 mA. Většinou probíhá ejakulace bez erekce pyje do prepucia (Louda, 2001).

Odběr spermatu masáží ampulí chámovodu

Masáž ampulí chámovodu se provádí rektálním způsobem. Kvalita spermatu získaného tímto způsobem je nižší. Odběr spermatu se touto metodou provádí výjimečně jen pro diagnostické účely (Louda, 2001).

3.5 Morfologické vyšetření spermií

Morfologie spermií odráží zdraví semenotvorných kanálků a do jisté míry i varlete. Význam morfologie spermií v býčí plodnosti byl dobře zdokumentován. Pochopení významu konkrétních typů abnormalit spermií v ejakulátu umožňuje diagnostikovat neplodnost a může pomoci při vyhledávání býků s produkcí abnormálních spermií

(Freneau et al., 2009). Spermatické abnormality jsou již dlouho spojovány se samčí neplodností a sterilitou. Obecně struktura spermií může hrát významnou roli jak v oplození, tak výsledku gravidity (Chenoweth, 2005).

Pokud provádíme morfologické vyšetření spermií, jedná se o zhodnocení jejich morfologické normality, u kterého mají být využívána striktní kritéria. Normální musí být hlavička, krček, spojovací část, střední část bičíku i koncová část bičíku (Weiss et al., 2010). Morfologicky abnormální spermie mohou ovlivnit plodnost vytvořením defektní zygoty anebo blokováním fertilizace normálních spermií. Morfologicky malformované spermie omezují, pohyb spermií (Gamčík et al., 1976).

Základním předpokladem pro získání objektivních výsledků při morfologickém vyšetření spermií je správná příprava nátěru vyšetřovaného ejakulátu. Nátěr má být jemný, souvislý a nepoškozený. Také je důležité, aby byla správně připravena sklíčka, která musejí být dokonale čistá a odmaštěná. Preparáty určené k morfologickému vyšetření mají být zhotovené do 30 minut po odběru. Je to potřebné z toho důvodu, že stárnutí semene bez použití konzervačních prostředků zapříčiňuje změnu hodnot pH. Postupné odumírání některých spermií zapříčiňuje morfologické změny (Gamčík et al., 1976).

Za normálních okolností nesmí frekvence malformovaných spermií u býka přesáhnout víc jak 15- 20% patologicky změněných spermií. Z celého množství patologických spermií nesmí degenerativní formy překročit 5%, tvarově změněné hlavičky 5% a změny na akrozomu 10%. Nezralé spermie (zadržaná protoplazmatická kapka na krčku nebo spojovacím oddíle) nesmí překročit 2% (Gamčík et al., 1974). Při hodnocení patologických spermií je nutno dodržovat zásadu, že z jednorázového vyšetření nelze vyvozovat konečné závěry a že je nutné vyšetření opakovat vždy v 3 – 5 denních intervalech. Výsledek pozorování se zapisuje do tabulky. Celkem se posuzuje při jednom vyšetření 300 – 500 spermií. Používá se olejové imerze a zvětšení 1000 – 1500 krát (Louda, 2001).

Při vzniku defektních spermií se uplatňuje vliv celé řady činitelů toxicko-infekčního, fyzikálně chemického, alimentárního a genetického původu. Podle místa vzniku změny na spermii lze rozdělit morfologické změny spermií na primární a sekundární (Gamčík et al., 1974)

Chenoweth a Lorton řadí morfologické změny spermií do klasifikačního systému pro abnormální spermie a rozdělují je takto: podle místa původu - primární nebo sekundární změny a dále změny funkčního významu - hlavní či vedlejší (podle závažnosti). Hlavní vady spermie jsou ty vady, u kterých bylo prokázáno, že poškozují plodnost a mezi vedlejší patří ty, které mají malý vliv na plodnost (Chenoweth a Lorton, 2014).

Primární změny vznikají během spermiogeneze až do příchodu spermií do ocasu nadvarlete. Tyto změny ukazují na poruchy semenotvorného a vývodného systému. Mezi primární změny se zařazují například degenerativní změny spermií, změny tvaru na hlavičce (např. hruškovitá, vejčitá, citrónovitá apod.), změny v nukleoplazmě spermií, změny na akrozomu, změny na spojovacím oddíle bičíku spermie, vývojové anomálie spermie a jiné.

Sekundární změny vznikají při delším pobytu spermií v ocase nadvarlete. Sem zařazujeme i změny, které vznikají v momentě ejakulačního reflexu až po posouzení semene a defekty vyvolané při nesprávném zhotovení preparátu, teploty prostředí (šok z chladu), jako i technologického postupu při odběru, ředění a chlazení ejakulátu nebo při zpracovávání na inseminační dávky. Mezi sekundární změny patří například změny na hlavičkách spermií – bobtnání, uvolnění, roztrhání akrozomu, některé dvojité formy, roztrhaný bičík, torze bičíku a nezralé formy spermií (Gamčík et al., 1976).

3.5.1 Změny na hlavičkách spermií

Odchylky od normálního tvaru hlaviček se hodnotí s přihlédnutím na funkci hlavičky jako nositelky genetické hmoty a penetračního útvaru. Změny se mohou projevit v tvaru a uspořádání akrozomu, v tvaru a velikosti hlavičky (při nesprávném obsahu DNK-deoxyribonukleové kyseliny) a změny na bázi hlavičky. Různé změny na hlavičkách spermií jsou zobrazeny v příloze (Obrázek 3-4).

Na nerovnoměrné rozdělení DNK poukazuje malá nebo abnormálně velká hlavička. Při některých virových pohlavních chorobách je možné pozorovat vyšší procento malformací hlaviček spermií, jako jsou zúžené, ovoidní a hruškovité (pyriformní) (Gamčík et al., 1976). Další známé změny na hlavičkách jsou kuželovité, kulaté, amorfní, vakuolizované, hlavičky s malými akrozomálními oblastmi, zdvojené hlavičky a kombinace výše uvedených defektů (Weiss et al., 2010). Celkově nemá výskyt těchto anomálií překročit hranici 5% (Louda, 2001).

3.5.2 Změny na akrozomu spermii

Mezi nejčastější malformace spermii patří rozličné anomálie akrozomu. Nejčastěji jde o svlečený akrozom, perzistenci ekvatoriálního segmentu a bobtnání akrozomu.

U svlečeného akrozomu je hlavička v přední části zúžená a rovnoměrně zbarvená. Někdy zůstává jako zbytek spermii po svlečeném akrozomu půlměsíčkovitý útvar nazývaný perzistence ekvatoriálního segmentu. Tato malformace vzniká sekundárně při stárnutí spermii v ocasu nadvarlete.

Bobtnání akrozomu vzniká při porušené propustnosti protoplasmatického obalu akrozomu (Gamčík et al., 1976). Jde o nejčastější anomálii. K této změně dochází i při manipulaci se spermatem, zejména když se dostane do sběrače voda. Akrozom obvykle praskne a akrozomová hmota se vylíje do prostředí (Louda, 2001).

Kondenzace akrozomové hmoty k propadlému okraji hlavičky vzniká nakupením akrozomové hmoty ve formě tmavě zbarveného pásu. Projevuje se i jako seskupení do tmavých granulí, které kontrastují s plošnými světle zbarvenými částmi nebo normálním zbarvením některých úseků akrozomu, mezi kterými jsou vidět světlé útvary. Akrozom má mapovitý nebo mramorovaný vzhled. Tyto anomálie vznikají při virových infekcích.

Perzistující akroblast bývá příčinou snížené fertility býků. Vyznačuje se specifickou anomálií, která se tvoří na apikální části hlavičky. Při mikroskopickém vyšetření semene se anomálie jeví jako knoflíkovitý útvar nebo kulička zasazená na předním okraji hlavičky, případně přesahující přes její přední okraj. Kromě perzistujícího akroblastu se mohou vyskytovat u býků se sníženou plodností tzv. měchýřkovité útvary na akrozomu. Anomálie mají tvar kráterovitých vyvýšenin, prohloubenin nebo výklenků (Gamčík et al., 1976).

3.5.3 Změny ve vnitřní struktuře nukleoplasmu spermii

Výskyt malformací nukleoplasmu na mikroskopické úrovni je méně častý. Patří sem spermie, které se tvarem odlišují od normálně formovaných spermii, například buňkové útvary s nedostatečně diferencovanou hlavičkou. Do skupiny morfologických změn nukleoplasmu se změnou obsahu DNK patří diploidní spermie, spermie s chybným obsahem DNK a současně s poruchou modelovacího mechanismu (hlavičky s hřebenem a jiné tvarové odchylky hlaviček), dvojité hlavičky – geminy a dvojité hlavičky, které se liší tvarovou změnou nebo stupněm vyžrání nukleoplasmu.

Diploidní spermie jsou spermie se silnější hlavičkou a dvěma bičíky. Hlavičky diploidních spermií se intenzivněji barví a mají dvojnásobný obsah DNK.

Některé tvarové defekty nukleoplasmy mají na řezech podobu písmen Y, U, V nebo O. Příčinou vzniku těchto defektů je nerovnoměrné rozložení jaderné hmoty během spermiogeneze. Podobnou změnou nukleoplasmy se vyznačují dvojité hlavičky (geminy).

Do skupiny změn ve vnitřní struktuře nukleoplasmy patří spermie s granulovanou nukleoplasmou, pravé vakuoly (invaginace nukleární membrány) a mikrovakuoly.

Vakuoly patří mezi primární změny nukleoplasmy a ve světelném mikroskopu jsou ostře ohraničené a bezbarvé. Velké množství vakuol se vyskytuje při poruchách spermiogeneze především zánětlivého původu. Mohou se vyskytovat i mikrovakuoly, které se zjišťují elektronovým mikroskopem. Jejich uložení je náhodné, nejčastěji je možné je najít na bázi hlavičky.

Odchylky může vykazovat také báze hlavičky spermie, např. plošná, proláklá, široká nebo úzká báze. Tyto malformace vznikají při konečné fázi spermiogeneze. (Gamčík et al., 1976).

3.5.4 Změny na bičíku spermií

Do komplexu změn je možné zahrnout rozličné degenerativní změny na jednotlivých částech bičíku spermií (Gamčík et al., 1976). Dále se uvádí například krátký, mnohočetný, vlásenkovitý nebo zlomený bičík, zahnutý o více než 90°, nerovnoměrně široký, stočený nebo vzájemné kombinace (Weiss et al., 2010). Různé druhy změn na bičíku spermií jsou zobrazeny v příloze (Obrázek 5). Důležité jsou především anomálie na spojovacím oddíle.

Anomálie, u které jsou hlavičky oddělené od bičíku, se nazývá dezintegrace spermií (dekapitace spermií) a vyvolává úplnou neplodnost. Tato anomálie vzniká při průchodu spermie hlavou nadvarlete a souvisí s migrací reziduální protoplazmy z krčku spermie na distální konec spojovacího oddílu bičíku. Volné bičíky jsou pohyblivé, takže sperma býků s uvolněnými hlavičkami vykazuje rozličný stupeň metabolické aktivity. Defekt dekapitovaných spermií je třeba posuzovat opatrně, protože může jít o artefakty, které vznikají při nesprávné přípravě preparátů.

Nejčastější malformací na spojovacím oddíle bičíku je jeho zkrácení, prodloužení, ztluštění, zúžení a přerušení. U normálně vyvinutých spermii je poměr délky hlavičky k délce spojovacího oddílu 1:1,5. Malformaci spojovacího oddílu je možné najít ve formě přerušení některého jeho úseku, dále jako holé osově vlákno nebo jako nitkovitě vyvinutá mitochondriální spirála. Všechny tyto anomálie porušují kinetické centrum a motilitu spermii a podle procenta postižení vyvolávají fertilizační poruchy.

Do skupiny tvarových změn bičíku patří zdvojený bičík, excentricky nasazený bičík, torze bičíku rozličného stupně, kličkovitě otočený bičík, nalomený bičík a některé další anomálie.

U zdvojeného bičíku bývá mitochondriální systém většinou zachovaný, mitochondrie reagují na endogenní reduktázy.

V úseku střední části (v místě spojení hlavičky a bičíku) se vyskytují anomálie spočívající v abnormálním spojení bičíku, v tzv. excentrickém nasazení bičíku. Bičík není umístěn centrálně v ose hlavičky, ale nachází se u jedné strany báze hlavičky spermie. Tato anomálie vyvolává neplodnost tím, že způsobuje změnu ve směru pohybu. Jde o pohyb do kruhu a způsobuje, že se spermie nemohou pohybovat směrem dopředu. Tato anomálie se vyskytuje zřídka a při výskytu vyššího procenta takovýchto spermii u býka vyvolává poruchy plodnosti.

Do skupiny anomálií mitochondriální spirály, které jsou dědičně podmíněné, patří vývrtkovitý defekt. U této malformace je spojovací oddíl nerovný (drsný) a mitochondriální materiál je v něm nepravidelně rozdělený (Gamčík et al., 1976).

3.5.5 Nezralé spermie

Do skupiny těchto malformací patří spermie se zadržovanou protoplasmatickou kapkou, které pocházejí z vývojového stádia spermiogenetického cyklu. Nezralé formy spermii mají protoplasmatickou kapku uloženou proximálně na krčku spermie. Postupným dozráváním se kapka posunuje distálně. Množství protoplasmatických kapek v proximální části může ovlivnit fertilitu plemeníka. U přežvýkavců s normální plodností se vyskytuje ve 2-3% (Gamčík et al., 1976). V normálním ejakulátu býka nesmí být více než 2% nezralých spermii. Při vyšším výskytu nezralých spermii v ejakulátu je třeba sledovat výskyt dalších vývojových vad (Louda, 2001).

Dalším projevem nezralých spermii je zvýšený výskyt vývojových spermiogenetických forem – spermiogonie, spermiocyty I. a II. řádu a spermatidy. Větší množství nezralých

a vývojových forem spermií poukazuje na poškození semenotvorného epitelu a poruchy v transformaci spermií. Tento náález provází také vyšší výskyt primárně malformovaných spermií (Gamčík et al., 1976).

Vztah morfologických změn k poruchám plodnosti

Jakákoliv odchylka od normálního tvaru a struktury spermie se pokládá za nenormální. Hodnotí se:

- a) rozdíly u jednotlivých druhů zvířat (například býk, beran, kozel, kanec, hřebec),
- b) přirozená variabilita mezi ejakuláty různých plemenů (v rámci druhu),
- c) přirozená variabilita mezi ejakuláty jednoho plemene,
- d) přirozená variabilita výskytu anomálií ve stejném ejakulátu.

Abnormality na spermiích mohou být příčinou bezsymptomatických poruch plodnosti. Průměrný počet patologických spermií velmi kolísá a závisí na mnoha činitelích. Za fyziologický výskyt můžeme pokládat 5-10% změn. Velmi přísně se hodnotí primární změny testikulárního původu (Gamčík et al., 1976).

Spermie s protoplazmatickou kapkou a ostatními možnými anomáliemi jsou zobrazeny v příloze (Obrázek 6).

3.5.6 Morfologicky abnormální spermie MAS

Pojem morfologicky abnormální spermie (MAS) zahrnuje všechny spermie, na kterých se vyskytují vady odlišující hodnocenou spermii od morfologicky normálního stavu. Zahrnuje v sobě jak vady běžně označované za patologické, tak vady, které lze označit za fyziologické.

Morfologické vyšetření spermií patří mezi neobjektivnější metody posuzování kvalitativní úrovně ejakulátů. Nicméně schopnost hodnotícího posoudit správně všechny vady má zásadní vliv na výsledek tohoto vyšetření. Při posuzování spermií je pozornost zaměřena na hlavičku, krček, spojovací část a bičík. Výskyt vad tak lze očekávat na všech částech spermie. Jak už bylo zmíněno, základní klasifikace změn na spermiích je podle původu vzniku. První skupina jsou vady vývojové (primární), druhá skupina jsou vady získané (sekundární). Primární vady zahrnují zejména období vývoje spermie. Sekundární změny vznikají až po definitivním morfologickým ukončení vývoje spermie, přičemž mohou vzniknout už při procesu dozrávání a uchovávání spermií v pohlavních vývodných cestách (Lipenský et al., 2014).

Hodnocení morfologického obrazu

Základním a nejjednodušším způsobem vyšetření preparátu je prosté počítání normálních a morfologicky abnormálních spermií (Lipenský et al., 2014). Do diferenciálního hodnocení spermií by měly být zahrnovány jen bezpečně rozpoznatelné spermie. Nezralé buňky, kulaté spermatidy, samostatné či ulomené hlavičky nejsou počítány a bývají zaznamenány zvlášť (Weiss et al., 2010). Rozměry hlavičky spermií býka jsou: délka 9,11 μm ; šířka 5,05 μm (Věžník et al., 2000). Bičík má být rovný, uniformní, nestočený (Weiss et al., 2010), spojovací část je velká cca 14,8 μm a hlavní část 45 – 50 μm (Věžník et al., 2000). Takovéto vyšetření je poměrně jednoduché, nicméně neposkytuje žádné informace o charakteru vad spermií a tím pádem ani o jejich závažnosti. Pro tento způsob hodnocení spermií stačí obyčejný papír, kde lze počty spermií průběžně zapisovat. Praktičtější řešení je použití některé formy elektronického počítadla.

V případě podrobného hodnocení je každá morfologicky abnormální spermie zaznamenána i s příslušnou vadou, přičemž je na závěr možné získat přehled o frekvenci výskytu těchto vad. Princip a současně i nevýhoda tohoto způsobu hodnocení spočívá v tom, že ke každé hodnocené MAS je pro zjednodušení přiřazena pouze jedna vada. Avšak na některých spermiích se může vyskytovat vad více. V takovém případě se do záznamu přednostně zapisuje vada podle předem stanovené priority (Lipenský et al., 2014). Ideálně by měla být morfologická hodnocení multiparametrová oproti staršímu způsobu popisu, kdy prioritu měl „majoritní“ defekt, s větší důležitostí hlavičky, vzhledem ke střední části a střední části k bičíku (Weiss et al., 2010). Nevýhodou tohoto řešení je ve srovnání se základním hodnocením vyšší časová náročnost, plynoucí z nutnosti zapsat každou spermii s vadou (Lipenský et al., 2014).

Striktní metoda hodnocení morfologie spermií přináší nejkompexnější možnost posouzení frekvence výskytu MAS ze všech tří uvedených metod hodnocení spermií. Striktní metoda hodnocení už bere v potaz všechny vady vyskytující se na jedné spermii. Nedochozí tak ke ztrátám jakýchkoli údajů o zachycených vadách. Z tohoto důvodu je v průběhu vyšetření nutné evidovat počet všech hodnocených spermií, počet MAS a počet jednotlivých zachycených vad. Na základě těchto údajů lze nejenom zjistit procentické zastoupení MAS, ale i tzv. index teratospermie neboli index počtu jednotlivých vad připadajících na jednu morfologicky abnormální spermii.

Využívaný software při morfologickém hodnocení

Detailní analýza morfologie spermií (DeSMA) je nástupcem dříve používaného programu SASMO. Jedná se o velice jednoduchý, hardwarově i uživatelsky nenáročný počítačový program disponující vstřícným uživatelským prostředím. Program DeSMA představuje významnou pomoc v oblasti objektivizace morfologického hodnocení kvality ejakulátů. A to jak v medicíně veterinární, tak humánní a ve všech inseminačních provozech a provozech asistované reprodukce. Jednou z jeho největších výhod je, že umožňuje současně vyhodnotit veškeré změny, které na spermii najdeme, což je zásadní předpoklad striktní analýzy. Všechny vypočtené ukazatele pak mají význam pro detailnější interpretaci získaných výsledků.

Software využívající propojení PC a mikroskopu

Základní programy umožňující zachycení obrazu a jeho následné hodnocení na monitoru jsou určeny ke zjednodušení klasického vyšetření preparátu. Jejich využití je výhodné především pro začátečníky, neboť zde mimo jiné odpadá problém s případnou nejistotou, která spermie už byla započítána a která ne. V uživatelském prostředí programu je možné každou spermii označit a přidat k ní zvolenou vadu. Celá tíha posuzování výskytu vad je ovšem stále na uživateli. V závěru program sám vyhotoví výsledný protokol. Pokročilejší programy již umožňují využití techniky analýzy obrazu. Programy disponující poloautomatickým systémem analýzy obrazu uživateli automaticky vyhledávají spermie na pořízeném obrazu a informují ho o dosažení požadovaného počtu spermií. Uživatel však stále musí ke každé z nich přiřadit odpovídající vadu z nabídky programu. Oba zmíněné přístupy jsou určeny především pro zjednodušení práce. Příliš mnoho dalších výhod oproti klasickému mikroskopickému hodnocení však nepřináší. Nejdokonalejší systémy umožňují plně automatickou detekci vizuálně dobře odhalitelných vad na spermii spolu s detailní morfometrií. Operátor zde zdánlivě nemusí disponovat přílišnou zkušeností s hodnocením spermií, neboť tu má primárně na starost daný program. Nezkušený uživatel však jen těžko pozná, zdali program neudělal v hodnocení chybu, jelikož ji sám nebude schopen odhalit. Některé vady nemusí být programem zachyceny vůbec a může se také stát, že vada bude přiřazena k analyzované spermii chybně. Navíc platí, že ne všechny vady jdou tímto způsobem hodnotit. Detekce mnoha vad tak bývá mimo možnosti těchto programů. Role kvalitního laboranta je tak stále nezastupitelná. Nevýhodou může být i skutečnost, že tyto programy pracují pouze s naprogramovanými

metodami barvení. V případě, že je použita metoda jiná, nemusí výsledky odpovídat skutečnému stavu (Lipenský et al., 2014).

3.6 Vyšetření ejakulátu

3.6.1 Makroskopické

Provádí se ihned po odběru ejakulátu, ještě ve sběrači. Hodnotí se objem nebo hmotnost, smyslové hodnocení zrnitosti – hustoty, barvy, pachu, čistoty nebo cizích přímísenin.

Objem ejakulátu je variabilní a značně kolísá. Zjišťuje se měřením v kalibrovaném válci nebo vážením na laboratorní automatické váze (v gramech).

Konzistence, zrnitost se u každého ejakulátu posuzuje ve sběrači v procházejícím nebo dopadajícím světle. Husté sperma dobré jakosti je vazká neprůhledná tekutina, zpravidla smetanového mírně zrnitého vzhledu, zrnité shluky spermatu se pomalu pohybují. Řídké sperma špatné jakosti je vodnaté, průsvitné, bez zrnitosti.

Barva se posuzuje proti světlu. Dobré sperma je bělavé barvy, v některých případech šedobílé nebo mírně nažloutlé. Špatné sperma, které se nehodí k inseminaci, bývá zbarveno žlutozeleně nebo zeleně přímísením hnisu, moče nebo nežádoucími mikroorganismy. Špatné je také sperma s příměsí krve (Louda, 2001). Projevující se načervenalou barvou kvůli výskytu červených krvinek, tento stav se nazývá hematospermie (Rajasingam, 2000). Žlutavé zbarvení může být způsobeno flavinovými barvivy obsaženými v krmivu.

Pach se posuzuje čichem ve sběrači. Dobré sperma má specifický slabý pach, připomínající pach kravského mléka. Nazelenalé sperma páchne močí. O přímíseninách hnisu svědčí hnilobný zápach.

Cizí přímíseniny bývají nejčastěji chlupy, vazelína, nečistota z předkožky nebo také prach nebo písek pokud se odběr provádí venku. Hnis se zjišťuje při zánětu semenných váčků, pyje nebo varlat a předkožky. Dobré sperma má být bez přímísenin (Louda, 2001).

3.6.2 Mikroskopické

Hodnocení aktivity

U hodnocení aktivity se jedná o zhodnocení charakteru pohybu, kdy se určuje směr a rozsah kmitů hlavičky spermie. Progresivní pohyb spermii vpřed za hlavičkou je

jedním z nevýznamnějších ukazatelů oplozovací neboli fertilizační schopnosti čerstvého ejakulátu. Přímý progresivní pohyb spermií je znakem jejich funkční plnohodnotnosti a vyjadřuje se v procentech. Ejakuláty určené k přímé inseminaci nebo určené ke konzervaci musejí vykazovat minimální aktivitu 70%. S prodlužující se dobou po odběru dochází v ejakulátu k tzv. vitální degeneraci spermií, při které se rychlost přímočarého pohybu zpomaluje a ten se mění na pohyb kruhový, postupně následuje pohyb přerušovaný a trhavý, později pohyb ustává.

Aktivita spermatu se posuzuje u každého ejakulátu. Ze sběrače se odebere kapka spermatu, která se promíchá v 1, 5 cm³ citrátu sodného zahřátého na teplotu 39°C± 1°C, přikryje se tenkým krycím sklíčkem a posuzuje se při 200 až 300 násobném zvětšení. Hodnotí se minimálně 3 zorná pole a odhadem se stanoví procentické zastoupení spermií pohybujících se vpřed za hlavičkou. Mikroskop je opatřen fázovým kontrastem a mikroskopický stolek je vyhříván destičkou na 39°C± 1°C. Vedle pohybu přímočarého vpřed za hlavičkou je třeba sledovat i ostatní druhy pohybu, které se hodnotí jako závadné (kolébavý, kruhový, na místě, zpětný). Nežádoucí je i shlukování spermií, tzv. aglutinace.

Hodnocení vířivosti pohybu ejakulátu

Hodnocení vířivosti pohybu ejakulátu vyjadřuje společné hodnocení hustoty a pohyblivosti spermií. Hodnotí se čerstvý, neředěný, tzv. nativní vzorek ejakulátu. Na vyhřáté podložní sklíčko s důlkem se nanese kapka neředěného ejakulátu. Přikryje se krycím sklíčkem. Preparát se umístí na vyhřívanou destičku mikroskopu a pozoruje se při zvětšení 100 nebo 200 násobném. V zorném poli kvalitního ejakulátu lze pozorovat pohyb ve vlnách, které se rychle střídají. U řídkého ejakulátu lze pozorovat pomalý pohyb bez výrazného vířivého pohybu. Ejakuláty se podle vířivosti pohybu hodnotí třemi stupni (1= ejakulát bez vířivého pohybu, 2 = pomalý vířivý pohyb, 3 = velmi rychlý vířivý pohyb).

Stanovení hustoty – koncentrace ejakulátu

Hustota je koncentrace spermií v ejakulátu a je dána funkční aktivitou semenoplodného epitelu varlat, věkem, zdravotním stavem plemeníka, připraveností a technikou odběru ejakulátu. Plemeníci s opakovaně nízkou koncentrací spermií v ejakulátu, tzv. oligospermií, která je geneticky podmíněná se vyřazují.

Stanovení hustoty se provádí několika způsoby:

Stanovení hustoty spermatu fotometricky, kdy přístroj zajišťuje objektivní přesnost, rychlost měření a malou spotřebu spermatu. Přesnost je závislá na dobré funkci přístroje a na přesně vypracované kalibrační křivce. V současné době se používá fotometr digitální. Na základě změřením stupně zakalení standardního roztoku, ve kterém je rozptýleno odměřené množství spermatu, se zjistí jeho hustota. Výchozí stupeň ředění je stanoven podle typu přístroje. Údaje na stupnici se přepočítávají podle tabulky sestavené pro každý fotometr na množství spermií v 1 mm^3 naředěného spermatu. Jednou za měsíc se kontroluje přesnost měření fotometru porovnáním výsledků s hodnotami zjištěnými počítáním v Bürkerově komůrce. Rozdíl nesmí být vyšší než 15%. Postačuje ověřit hustotu tří ejakulátů o rozdílné hustotě. Kontrolu přesnosti fotometru lze též provést pomocí tzv. standardů podle návodu ke kalibraci.

Stanovení hustoty spermatu hematocytometricky se stanovuje počítáním spermií v Bürkerově komůrce. Louda uvádí dva druhy počítání spermií. V prvním případě se počítají spermie ležící uvnitř čtverečku o velikosti $1/16 \text{ mm}^2$ a všechny spermie, jejichž hlavičky se dotýkají nebo leží na levé a horní straně čtverečku. Počítají se spermie v 10 čtverečcích. Výpočet se provede tak, že se součet počtu spermií z 10 čtverečků vynásobí 3200 a zjistí se tak počet spermií v 1 mm^3 . V druhém případě se počítají spermie v 10 menších čtverečcích o velikosti $1/25 \text{ mm}^2$ a všechny spermie, jejichž hlavičky se dotýkají nebo leží na levé a horní straně čtverečku. Počet spermií v 1 mm^3 se zjistí násobením průměrného počtu spermií v 1 čtverečku číslem 50 000. U obou metod se opakuje počítání s další kapkou ze stejného melanžéru (po protřepání a odkapání) a není-li rozdíl větší než 15%, vypočítá se průměrný počet spermií. Počítají se spermie ve čtverečcích ležících úhlopříčně, aby se lépe postihlo rozprostření vzorku po celé ploše.

Při stanovení hustoty spermatu spermiodenzimetrem podle Karrase se do Karrasova klínu odpipetuje $0,1 \text{ cm}^3$ 1% roztoku NaCl. Po opatrném promíchání obsahu se odečte na stupnici spermiodenzimetru hodnota, která je ještě dobře viditelná. Podle tabulky se stanoví koncentrace spermií v 1 cm^3 . Chyba se pohybuje kolem $\pm 5\%$ od skutečného počtu spermií.

Stanovení hustoty spermatu býků odhadem se využívá na inseminačních stanicích pouze ve výjimečných případech. Tento způsob hodnocení je vhodný v polních

podmínkách u býků využívaných v přirozené plemenitbě. Vyšetření ejakulátu se provádí před začátkem připouštěcího období (Louda, 2001).

Tabulka 3: Odhad hustoty spermatu podle prostorového uspořádání spermií v zorném poli mikroskopického obrazu (Louda, 2001)

Označení spermatu (hustoty)	Počet spermií (mil./mm ³)	Charakteristika mikroskopického obrazu
VH – velmi husté	Nad 1,5	V zorném poli jsou spermie natěsnané a pohybují se těsně vedle sebe tak, že mezi nimi nejsou žádné mezery
H – husté	1,0 – 1,5	V zorném poli se spermie pohybují hustě vedle sebe. Mezi jednotlivými spermii jsou pouze malé světlé proužky. Vzdálenost mezi spermii není větší, než šířka hlavičky spermie.
SH – středně husté	0,7 – 1,0	Mezi jednotlivými spermii jsou patrné mezery, vzdálenost mezi spermii dosahuje až do poloviny délky spermie
Ř - řídké	0,2 – 0,7	Mezi spermii v zorném poli jsou mezery velikosti poloviny až celé délky spermie. Jednotlivé spermie lze zřetelně rozlišit.
O – ojedinělé spermie	Do 0,2	V zorném poli jsou viditelné pouze ojedinělé spermie.
A – ejakulát bez spermií		V zorném poli jsou pouze výměšky přídatných pohlavních žláz, neobsahují ani živé ani mrtvé spermie.

Stanovení hustoty spermatu mikroskopicky odhadem podle Götze. Při této metodě se používá k odhadu hustoty neřaděné nebo řaděné sperma citrátem sodným v poměru 1:50 u býka. Hustota se stanoví na základě vzdálenosti mezi hlavičkami spermií u neřaděného spermatu, nebo na základě počtu spermií v zorném poli dle tabulky (Louda, 2001).

Tabulka 4: Odhad hustoty spermatu podle prostorového uspořádání spermíí v zorném poli mikroskopického obrazu podle Götze (Louda, 2001)

Plemeník	Stupeň hustoty	Nařaděné sperma (vzdálenost mezi hlavičkami spermíí)	Ředěné sperma (počet spermíí v zorném poli)	Stupni hustoty odpovídající počet spermíí (mil/mm ³)
Býk	0	žádná nebo ojediněle	0 - 1	0
	1	Ojedinělé spermie	2 - 8	Do 0,2
	2	½ až celá délka spermie	9 - 20	0,2 – 0,7
	3	½ délky hlavičky	21 - 40	0,7 – 1,0
	4	Délka hlavičky, malé světlé pruhy	42 – 80 a více	nad 1,0

3.6.3 Mikrobiologické

Plodnost a nezávadnost spermatu je často ovlivňována mikroby, kteří znečišťují sperma i při pečlivém odběru (Polák, 1961). Čerstvý ejakulát nesmí obsahovat patogenní zárodky ani plísně. Oborové normy připouští maximálně 5000 nepatogenních mikroorganismů v inseminační dávce. (Louda, 2001). Nejčastěji se sperma infikuje při odběru, kontaminací z předkožkového vaku býků a při zředování ejakulátu. V předkožce žije různý počet mikrobů, který je ovlivňován ustájením, ošetřováním a čistotou býků (Polák, 1961).

Mikrobiologické vyšetření spermatu se provádí ve Státním veterinárním ústavu. Odebraný vzorek spermatu pro bakteriologické vyšetření musí být doručen do 6 hodin po odběru, vzorky pro mykologické vyšetření do 3 hodin po odběru. Odběr vzorků 1-1,5 cm³ se provádí přímo ze sběrače sterilní pipetou. Vzorek se pipetuje do sterilní zkumavky uzavřené gumovou zátkou. Zkumavka musí být označena registrem býka a odesílá se s průvodním protokolem, který obsahuje číslo plemníka, majitele, datum a místo odběru a další údaje upřesňující důvod vyšetření. K vyšetření se nejčastěji používají tzv. „Mikrobiotesty“ (Louda, 2001).

Bakterie, mykoplazmata, chlamydie, viry, houby, protozoa mohou být nejen příčinou chorobných afekcí (chorobné postížení) na pohlavních orgánech samců zaviňujících impotentia coeundi (neschopnost pohlavního styku) nebo impotentia generandi (sterilita), ale některé z nich působí bezprostředně toxicky na spermie a poškozují je,

kontaminují zředěné semeno a rozkládáním ředidel a změnou prostředí, v němž jsou chovány spermie, omezují jejich přežívání.

Význam plemeníků při přenášení infekcí na plemence záleží na charakteru infekce. Při pohlavních nákazách, jejichž původci jsou přenášeni převážně pohlavním stykem nebo inseminací infikovaným semenem, je plemeník hlavním zdrojem infekce plemenic (Gamčík a Kozumplík et al., 1984).

3.6.4 Speciální vyšetření (biologické zkoušky)

V biologických testech se sleduje odolnost spermií vůči různým vnějším vlivům. Provádí se dlouhodobý chladový test, krátkodobý tepelný test, zjišťuje se odolnost spermií vůči chladovému šoku a odolnost spermií vůči působení 1% roztoku NaCl (Louda, 2001).

Testy přežitelnosti spermatu

Testy přežitelnosti spermatu jsou důležité pro posouzení biologické hodnoty a oplozovací schopnosti spermií. Mezi výsledky těchto testů a skutečnou plodností byla zjištěna vysoká korelace.

Krátkodobý tepelný test přežitelnosti

Při krátkodobém tepelném testu přežitelnosti se do zkumavky odměří 0,5 – 1 cm³ spermatu (ředěného nebo neředěného). Zkumavka se spermatem se vloží do vodní lázně a postupně zahřeje na 38°C. Po dosažení uvedené teploty se zaznamená začátek testu. V hodinových intervalech se ze zkumavky odebírají vzorky a provádí se posouzení aktivity spermií. Aktivita se zaznamenává ve zlomku, do jehož čitatele se uvede čas, který uplynul od začátku testu, a do jmenovatele aktivita v %. Doba trvání testu nebývá delší jak 6 hodin, jelikož se spermie v teplém prostředí rychle vyžívají a ztrácejí aktivitu. Ejakuláty s větší absolutní délkou životnosti jsou biologicky jakostnější a mají vyšší oplozovací schopnost (Louda, 2001).

Dlouhodobý chladový test přežitelnosti

Do malé zkumavky se odměří 3 cm³ naředěného spermatu, posoudí se aktivita spermií a vzorek se vloží do chladničky (teplota 1 - 3°C) a zapíše se čas. Každý den ve stejnou dobu sledujeme aktivitu spermií pod mikroskopem s vyhřívací destičkou a výsledky pečlivě zaznamenáváme. Dobré ejakuláty si zachovávají po dobu 96 hodin od odběru aktivitu alespoň 50% (Louda, 2001).

Zkouška rezistence spermatu

Rezistence spermatu je ukazatelem odolnosti spermií vůči působení 1% roztoku NaCl. Vyjadřuje se stupněm zředění zkoušeného spermatu tímto roztokem, který se v určitém časovém sledu přidává ke spermatu, a to až do okamžiku, kdy ustane přímočarý pohyb spermií vpřed za hlavičkou (Louda, 2001).

Zkouška živých spermií na odolnost vůči chladovému šoku

Touto zkouškou se posuzuje reakce spermií na rychlé zchlazení. Do kapiláry se nasaje 0,1 cm³ čerstvého spermatu, spodní konec se uzavře plastelínou nebo gumovou čepičkou a kapilára se ponoří na 10 minut do vodní lázně o teplotě 0°C. Pak se ze spermatu zhotoví roztěr, u něhož se provede barvení na živé spermie. Procento nezbarvených – živých spermií je výrazem odolnosti vůči chladovému šoku (Louda, 2001).

Stanovení procenta živých a mrtvých spermií barvením

Touto biologickou zkouškou se získá obraz o kvalitě ejakulátu. Je založena na rozdílné afinitě živých a mrtvých spermií k barvivům. Mrtvé nebo oslabené spermie přijímají barvivo, živé spermie nepropouštějí semipermeabilní membránou barvivo a zůstávají bílé. Málo životaschopné spermie se značně sníženým metabolismem se barví bledě růžově až červeně. Jednou z využívaných metod je například barvení eosínem, kdy jsou spermie v době barvení živé, mají bílou hlavičku a mrtvé spermie mají červenou hlavičku. Vypočte se procento odumřelých spermií (Louda, 2001).

Stanovení koncentrace vodíkových iontů – pH spermatu

Kyselost spermatu je výrazem činnosti a zdravého stavu přídatných pohlavních žláz. Má být stanovena do 15 minut po odběru, jelikož se životní pochody spermií mění, zejména u přežvýkavců. Ejakulát býků s pH pod 6,4 anebo nad 7,5 má sníženou oplozovací schopnost a k inseminaci se nesmí používat. Vodnatý ejakulát mívá pH nad 7,5. Pro měření pH se může využívat nitrazínový papírek, na kterém vznikne po namočení do spermatu barevný odstín, který se porovná s barevnou srovnávací stupnicí. Přesnější způsob stanovení pH je pomocí pH-metru (elektrometricky) (Louda, 2001).

3.6.5 Automatické systémy hodnocení kvality ejakulátu

Používání počítačových metod na analýzu ejakulátu, hodnocení fertility a sterility ve veterinární a humánní andrologii získává značnou pozornost v celosvětovém měřítku. Je množství způsobů a zařízení pro hodnocení kvality ejakulátu například: turbidimetricky,

spektrofotometricky, fotomikrografickými metodami. Dále jsou to přístroje, které jsou zahrnuté do skupiny pod společným názvem CASA (Computer – Assisted Semen Analysis) a také přístroje které se v současnosti ověřují, případně používají na experimentální úrovni, na bázi laserových spektroskopů (Lukáč et al., 2009).

K moderním a nejvíce využívaným způsobům automatického hodnocení ejakulátu patří dnes průtoková cytometrie a CASA. Tyto dvě metody přispěly ke zlepšení kvantifikace pohybu spermií. Tyto techniky umožňují lepší hodnocení morfologických znaků spermie a stavu akrozomu (Foote, 2002).

Přístroje skupiny CASA

Jedná se o přístroje v současnosti nejpoužívanější při vyšetřování kvality spermií u mužů nebo samců hospodářských a laboratorních zvířat (Lukáč et al., 2009). Cílem počítačové analýzy spermatu – CASA je stanovení kompletně standardizovaných objektivních a opakovatelných testů pro stanovení koncentrace, pohybu a morfologie. Zařízení se skládá ze speciálního zařízení s fázovým mikroskopem, video kamerou a rekordérem, monitorem, počítačem a tiskárnou, jak je vidět v příloze (Obrázek 7). Sperma je umístěno ve speciální komůrce, obraz je digitalizován a změny v obrazu jsou analyzovány a propočítávány do výstupních veličin. Při hodnocení pohybu se stanovuje například: lineární rychlost (straight-line velocity – VSL), průměrná rychlost na skutečné dráze (curvilinear velocity – VCL), parametry oscilace a mnoho dalších veličin. Tímto způsobem může být také detekován hyperaktivní pohyb spermie, který je považován za známku uvolnění spermie ze seminální plazmy a schopností fertilizovat (oplodnit) oocyt (Crha a Žáková, 2003).

K nejrozšířenějším přístrojům pro analýzu spermií, které patří do skupiny CASA, jsou analyzátoři spermií pod označením HTM (Hamilton Thorn Motility Analyzer) v různých verzích. V současnosti nejrozšířenější verzí je 10 nebo systém IVOS – HTM.

Ejakulát se hodnotí v kapce přenesené na speciálně upravené podložní sklíčko s mikrocelulami na vyhřívaném stolku. Toto podložní sklíčko se upevní na předeřtý výsuvný stolek. Samotná analýza probíhá automaticky na základě úvodem zadaných parametrů. Vyhodnocení probíhá na základě velikosti, pohyblivosti, světlosti, odrazu a zadržování světelných paprsků spermii. Analýza může probíhat při vlnové délce 660 nm nebo 882 nm. Přístroj si vybírá pole pro analýzu buď automaticky, nebo se může manuálně určit. Vstupní parametry jsou výrobcem přímo nastavené pro vybrané

druhy spermií, případně je možné tyto údaje nastavit pro vlastní účely. Při každém vyhodnocení spermií musí být zadané také výstupní parametry, podle kterých došlo k analýze vzorku. Samotná délka analýzy je závislá na zadaných hodnotících kritériích, ale trvá maximálně tři minuty. Výstupní údaje zaznamenává tiskárna. Údaje obsahují základní data a výsledky analýzy.

Výsledky analýzy jsou:

- Pohyblivost v (%)
- Celkový počet spermií (10^6 / ml, v celém vzorku, v inseminační dávce)
- Střední dráhová rychlost – VAP (mm / s)
- Progresivní pohyb ve vzorku, v dávce (%)
- Přímost pohybu – STR (%)
- Rychlost dráhy (mm / s)
- Progresivní rychlost (mm / s)
- Linearita – přímost pohybu (%)
- Laterální pohyb hlavičky (mm)
- Plocha hlavičky (mm^2)

Dané výsledky jsou přepočítané na objem vzorku, objem celého ejakulátu a přístroj je schopný zjistit množství ejakulátu, které je potřebné na kvalitní inseminační dávku podle kritérií.

Dalším přístrojem zahrnutým do skupiny CASA je přístroj CellSoft. Jedná se o kompaktní a velmi jednoduchý analyzátor spermií, který nabízí širokou škálu výsledků jako HTM. Princip analýzy je totožný jako u předcházejícího přístroje. Analyzátor hodnotí:

- Koncentraci spermií (10^6 / ml)
- Pohyblivost spermií (%)
- Progresivní pohyb (%)
- Laterální pohyb hlavičky (mm)
- Průměrná lineární rychlost ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)
- Průměrná linearita ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)
- Frekvence překřížení průměrné dráhy ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)

Tento přístroj pro svoji jednoduchost a finanční nenáročnost patří mezi nejvýhodnější pro laboratoře inseminačních stanic.

Dalším přístrojem ze skupiny CASA je přístroj s označením Sperm Quality Analyzer (SQA). Má jednoduchou obsluhu a vykazuje dobrou korelaci mezi indexem pohyblivosti, koncentrací spermií a množstvím jiných parametrů pro hodnocení spermií. Tento přístroj se využívá hlavně v humánní andrologii, přitom je kvalitou srovnatelný s HTM analyzátořem. SQA pracuje na systému, při kterém zachytává rozdílnou optickou denzitu jako souhrn pohyblivých částí. Na analýzu je potřebné malé množství ejakulátu. SQA vyhodnocuje tyto parametry:

- Index pohyblivosti spermií
- Objem (ml)
- Koncentraci (10^6 / ml)
- Pohyblivost (%)
- Koncentraci pohybujících se spermií (10^6 / ml)

I u tohohle přístroje je možné zadat parametry, podle kterých má analýzu vykonat a tím získat co nejlepší výsledky. Tento přístroj vykazuje vysokou spolehlivost, jen vznikají problémy mezi hodnoceními spermií a případnými nečistotami ve vzorku. Proto je využití možné jen v čistých prostorech (Lukáč et al., 2009).

O validitě výsledků vyšetření CASA se vedou stále odborné debaty. Přesnost vyšetření je menší při těžších patologiích spermatu nebo vysokém počtu spermií. Koncentrace je také ovlivněna použitým typem komůrky a ředěním (Crha a Žáková, 2003). S technologií CASA již bylo dosaženo spousty zajímavých výsledků, ačkoliv to bylo zejména u lidí, mnoho otázek zůstává a musejí být zodpovězeny pro další rozvoj této technologie ve veterinární medicíně (Verstegen et al., 2002).

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM) je v současné době považována za standardní metodu analýzy částic (většinou buněk) v suspenzi. V rámci klinické praxe je nejčastěji využívána při polychromatické imunofenotypizaci krevních leukocytů a buněk kostní dřeně, ale běžné jsou i další aplikace jako imunofenotypizace buněčných suspenzí izolovaných z jiných tělních tekutin (moč, likvor, výpotky) a také z orgánů a lymfatických tkání. Kromě technik založených na specifickém rozpoznávání antigenů protilátkami se v FCM používají i další přístupy, jako jsou kvantitativní analýza DNA

u fixovaných nebo dnes už i intaktních buněk, detekce apoptózy, biofyzikální a biochemická stanovení včetně kinetiky buněčných procesů, asociace a disociace makromolekul a v posledních letech se objevila celá řada dalších stanovení (Šinkorová a Zárýbnická, 2008).

Průtoková cytometrie je technika pro stanovení koncentrace spermií v čerstvém nebo rozmraženém spermatu. Je to technika s velkou přesností, opakovatelností, rychlostí a snadným používáním. Významnou výhodou této techniky je schopnost rozlišení mezi spermii a jinými částicemi (například somatickými buňkami, tukovými kapénkami nebo bakteriemi), které zasahují do jiných systémů počítání. Tento přístup počítání spermií poskytuje vynikající postup kontroly kvality a počtu spermií zpracovávaného spermatu (Evenson et al., 1993).

4 DISKUSE

Stanovení kvalitativních parametrů ejakulátu je důležité pro získání kvalitního spermatu a zařazení nebo vyřazení plemenných býků z plemenitby. Po odebrání ejakulátu se nativní dávka musí nejprve vyšetřit makroskopicky, mikroskopicky a je podrobena i mikrobiologickým a speciálním vyšetřením. V dnešní době existuje řada automatických systémů pro vyhodnocování kvality jednotlivých ejakulátů. Tyto systémy slouží k urychlení a zjednodušení práce, a mají se vyvarovat chybám, které může zapříčinit při vyhodnocování člověk.

Mezi jednu z automatických metod patří průtoková cytometrie, o které Evenson et al. (1993) uvádí, že je to technika s velkými výhodami, jako jsou: přesnost, opakovatelnost, rychlost a jednoduchost. Průtoková cytometrie dokáže rozlišit spermie od ostatních částic v ejakulátu. Gillan et al. (2005) uvádí, že při kombinaci s fluorescenčními sondami přístroj umožňuje rozsáhlejší analýzy vlastností spermií jako například životaschopnost a v budoucnu bude moci monitorovat mnoho potenciálně nových markerů funkce spermií.

Další automatickou metodou je CASA, která zahrnuje více přístrojů. Dle Footeho (2002) je to metoda, která přispěla ke zlepšení kvantifikace pohybu spermií. Tato technika umožňuje lepší hodnocení morfologických znaků spermie a stavu akrozomu. Dle Lukáče et al. (2009) se jedná o přístroje v současnosti nepoužívanější při vyšetřování kvality spermií u mužů nebo samců hospodářských a laboratorních zvířat. Crha a Žáková (2003) uvádí, že cílem počítačové analýzy spermatu – CASA je stanovení kompletně standardizovaných objektivních a opakovatelných testů pro stanovení koncentrace, pohybu a morfologie spermií. Verstegen et al. (2002) uvádí, že metodu analýzy spermatu CASA je potřeba dále rozvíjet pro využití ve veterinární medicíně. Crha a Žáková (2003) upozorňují na validitu výsledků vyšetření CASA, o které se vedou stále odborné debaty. Přesnost vyšetření je menší při těžších patologiích spermatu nebo vysokém počtu spermií. Koncentrace je také ovlivněna použitým typem komůrky a ředěním. Na tuto problematiku odkazuje také Contri (2010), který uvádí, že tato metoda je omezena hlavně koncentrací spermií ve vzorku a vzorek je nutné správně ředit.

Morfologické změny spermií mají významný vliv na oplodnění. Při morfologickém vyšetření se dle Lipenského (2014) může využívat obyčejného zápisu tužkou do formuláře, kam jsou zaznamenávány pouze spermie normální nebo morfologicky

změněné, ale nezapisují se konkrétní vady. Další metodou je podrobné hodnocení, kdy se zaznamenává každá morfologicky změněná spermie i s příslušnou vadou, ale každé spermii je přiřazena pouze jedna vada, i když jich spermie může mít více. Zapisuje se vada s vyšší prioritou. Podle Weise et al. (2010) by mělo být hodnocení multiparametrové. Lipenský (2014) dále uvádí modernizovanou možnost propojení mikroskopu a pc s poloautomatickými softwary, které usnadňují práci. Věžník et al. (2000) potvrzuje, že je takovéto elektornické počítadlo velice efektivní.

Gamčík a Kozumplík et al. (1984) uvádí rozdělení defektů spermií na primární a sekundární, jako je uvedeno v literární části bakalářské práce. Podle Chenowetha, (2014) se dají morfologické změny rozlišovat také na hlavní či vedlejší podle závažnosti, hlavní defekty jsou ty, u kterých bylo prokázáno, že poškozují plodnost a mezi vedlejší patří ty, které mají na plodnost malý vliv. Ajitkumar (2011) uvádí, že hlavní vady zahrnují většinou abnormality hlavičky spermií a střední části, dále proximální cytoplazmatické kapky a jednotlivé abnormality, které jsou zastoupeny vysokým procentem. Vedlejšími vadami jsou smyčky na bičíku, a distální cytoplazmatické kapičky.

Ferenau (2010), porovnával dvě metody zkoumání morfologie spermií u býků. První metodou byla světelná mikroskopie a barvení eosin-nigrosinem, která dokáže lépe rozlišovat méně závažné vady spermií. Druhou metodou bylo využití interferenčního kontrastu, u kterého bylo v jeho studii prokázáno, že je tato metoda účinnější pro zjištění závažných (hlavních) vad spermií.

5 ZÁVĚR

Analýza spermatu býků je odedávna nedílnou součástí v procesu šlechtění skotu. Je žádoucí, aby zvířata měla co nejlepší původ a tím byla do jisté míry zaručena jejich vysoká užitkovost. Býk, který vykazuje co možná nejlepší výsledky při spermatologickém vyšetření, potencionálně zaručuje dobrý genetický potenciál, maximální užitkovost a zachování dobrého zdraví a produkční dlouhověkost. Z takového býka se stává býk plemenný a pro zemědělský podnik se tak stává velkým ekonomickým přínosem.

Tato práce se zabývala vyšetřením nativního ejakulátu, které předchází samotné výrobě inseminačních dávek býka. Metodika odběru ejakulátu je po literární stránce dobře popsána a z technického hlediska se v průběhu času výrazně nezměnila. I nadále zůstává nejběžnější metodou odběru skok býka na atrapu nebo fantóm a odběr ejakulátu do umělé vagíny. Nativní ejakulát je následně prověřován předepsanými vyšetřovacími metodami, které prokáží, zda je ejakulát vhodný ke zpracování na inseminační dávky.

Makroskopicky se vyšetřuje objem ejakulátu, konzistence, barva, pach a cizí přímíseniny. U makroskopického vyšetření se posuzuje, zda jde o „dobré“ nebo „špatné“ sperma a normy uvádí pouze to, jak by měl ejakulát vypadat. Posouzení ejakulátu s výjimkou hodnocení objemu tak v podstatě závisí pouze na zkušenostech hodnotícího laboranta.

Mikroskopické vyšetření zahrnuje hodnocení aktivity spermií, kde by měl být pod mikroskopem vidět progresivní pohyb spermií vpřed za hlavičkou, který je jedním z nejvýznamnějších ukazatelů oplozovací schopnosti. Dále se hodnotí vířivost pohybu ejakulátu a hustota ejakulátu, které se stanovují více metodami. Vyhodnocení jednotlivých mikroskopických vyšetření se provádí dle přesně stanovených kritérií.

Neméně důležité je morfologické vyšetření spermií. Morfologie spermie a jakákoliv její změna má přímý vliv na plodnost plemeníka, proto je jejímu vyšetření věnována velká pozornost. Vědci se i nadále snaží posoudit, které změny spermií mají větší nebo menší vliv na oplozovací schopnost.

Největšího pokroku v posledních letech dosáhla počítačová technika, která je využívána jak v humánní, tak veterinární medicíně, a u které se dá i do budoucna očekávat vývoj a zdokonalování hlavně v oblasti automatických systémů vyhodnocování ejakulátu.

Počítá se s objevením nových markerů, softwarů a metod pro zjištění plodnosti s co největší přesností a v co nejkratším čase.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BARTH, A. D., BOWMAN P. A., 1994: The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *The Canadian Veterinary Journal* [online]. roč. 35, č. 2, s. 93-102[cit.2015-02-13].Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686741/>
2. CHENOWETH, P. J., 2005: Genetic sperm defects. *Theriogenology*, roč. 64, č. 3, 457–468, ISSN: 0093-691.
3. CHENOWETH, P. J., LORTON S. P., 2014: *Animal andrology: theories and applications*. Wallingford: CABI Publishing, 568 s. ISBN 17-806-4316-0.
4. CONTRI A., GLORIA A., ROBBE D., VALORZ C., WEGHER L., CARLUCCIO A., 2013: Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Animal Reproduction Science.*, roč. 136, č. 4, 252– 259. ISSN: 03784320. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012003739>
5. CONTRI, A., VALORZ C., FAUSTINI M., WEGHER L., CARLUCCIO A., 2010: Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* [online]. 2010, roč. 74, č. 3 [cit. 2015-03-21]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10001408>
6. CRHA I., ŽÁKOVÁ J., 2003: Základní vyšetření spermatu. *Urologické listy* [online]. č. 2 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z:http://www.prolekare.cz/pdf?ida=ul_03_02_05.pdf
7. EVENSON D. P., PARKS J. E., KAPROTH M. T., JOST L. K., 1993: Rapid Determination on Sperm Cell Concentration in Bovine Semen by Flow Cytometry. *Journal of dairy science* [online]. roč. 76, č. 1, s. 86-94 [cit. 2015-03-16]. Dostupné z:<http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302%2893%2977326-9/abstract>

8. FOOTE R. H., 1977: Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *Journal of Animal Science* [online]. roč. 47, č. 47, s. 1-11 [cit. 2015-02-10]. Dostupné z: [Http://europepmc.org/abstract/med/400773](http://europepmc.org/abstract/med/400773)
9. FOOTE R. H., 2002: The history of artificial insemination:. *Journal of animal science*. č. 80, s. 1-10. DOI: 10.2134/animalsci2002.80E-Suppl_21a. Dostupné z: <https://www.asas.org/docs/publications/footehist.pdf?sfvrsn=0>
10. FRENEAU G.E., CHENOWETH P. J., ELLIS R., RUPP G., 2009: Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Animal Reproduction Science*. roč. 118, 2-4, 176–181, ISSN: 0378-4320. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432009002322>
11. GAMČÍK P., KOZUMPLÍK J., SCHWARC F., ZIBRÍN M., VLČEK Z., 1984: *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Bratislava: Príroda, 344 s.
12. GAMČÍK P., SCHWARC F., VLČEK Z., ZIBRÍN M., 1976: *Umelá inseminácia a andrológia hospodárskych zvierat*. prvé vydanie. Bratislava: Príroda, 574 s. ISBN 64-025-76.
13. GERENA L. R., IRIKURA D., EGICHI N., URADE Y., KILLIAN J.G., 200: Immunocytochemical Localization of Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in the Bull Testis and Epididymis and on Ejaculated Sperm1. *Biology of Reproduction* [online]. roč. 62, č. 3, s. 547-556 [cit. 2015-02-10]. DOI: 10.1095/biolreprod62.3.547. Dostupné z: HYPERLINK "<http://www.biolreprod.org/content/62/3/547>.short"<http://www.biolreprod.org/content/62/3/547>.short
14. GILLAN L. EVANS G., MAXWELL W. M. C., 2005: Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*[online]. roč. 63, č. 2 [cit. 2015-03-21]. Dostupné z:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04003139>
15. HOPPER, R. M., 2015: *Bovine reproduction*. prvné. Mississippi, USA: Wiley-Blackwell, p. ISBN 978-111-8470-831.

16. JELÍNEK P., KOUDELA K., 2003: *Fyziologie hospodářských zvířat*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 409 s. ISBN 80-715-7644-1.
17. KOMÁREK V., 1964: *Anatomie a fyziologie hospodářských zvířat*. 2.vyd / . Praha: SZN, 387 s. příl.
18. KOVÁŘ V., SOBEK B., 1965: *Porodnictví a inseminace*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 233 s.
19. LIPENSKÝ J., LUSTYKOVÁ A., ROZKOT M., VÁCLAVKOVÁ E., PŘINOSILOVÁ P., ŠÍPEK J., KUNETKOVÁ M., KOPECKÁ V., 2014: *Certifikovaná metodika: Základy hodnocení morfologického obrazu spermií kance*. Brno: Výzkumný ústav veterinární, v.v.i., ISBN 978-80-7403-112-9. Dostupné z: http://www.vuzv.cz/sites/File/nabidka_publicace/metodika_lipensky_2014.pdf
20. LOUDA F., 2001: *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita - AF, 225 s. ISBN 80-213-0702-1.
21. LUKÁČ N., MASSANYI P., ŠŤASTNÝ P., 2009: Možnosti počítačového hodnotenia kvality spermií v súčasnosti. [online]. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, [cit. 2015-03-12]. Dostupné z: http://old.agroporadenstvo.sk/zv/ostatne/spermie_poc.htm?start
22. Medical Technology Vertriebs MedeaLAB, 2013: *CASA: Computer Aided Sperm Analysis* [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: <http://www.mtg-de.com/products/andrology/medealab-casa.html>
23. MENON A. G., BARKEMA H. W., WILDE R., KASTELIC J. P., THUNDATHIL J. C., 2011: Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research* [online]. roč. 75, č. 4, 241–247 [cit. 2015-03-21]. ISSN: 0830-9000 Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187629/>
24. MORTIMER D., 1994: *Practical laboratory andrology*. New York: Oxford University Press, xvi, 393 p. ISBN 01-950-6595-6.

25. PARKS J. E., 2006: Processing and Handling Bull Semen for Artificial Insemination. In: *Cornell university: Department of Animal Science* [online]. University in Ithaca, New York, [cit. 2015-02-14]. Dostupné z: <http://www.ansci.cornell.edu/pdfs/bullsemen.pdf>
26. POLÁK L., 1961: *Inseminace skotu. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 525, [10] s.
27. RAJASINGAM S. J., 2000: *Interpretation of Semen Analysis Results: A Practical Guide*. Anglie: Cambridge University Press, 112 s. ISBN 978-0521799577.
28. REECE W. O., 1998: *Fyziologie domácích zvířat. 1. vyd.* Praha: Grada, 1998, 449 s. ISBN 80-716-9547-5.
29. ROUGE M., 2002: Semen Collection from Bulls. In: <http://www.vivo.colostate.edu/> [online]. [cit. 2015-02-13]. Dostupné z: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/bull.html>
30. SCHILLO K. K., 2009: *The reproductive physiology of mammals: from farm to field and beyond*. Clifton Park, N.Y.: Delmar/Cengage Learning, xviii, 462 p. ISBN 14-180-3013-9.
31. ŠINKOROVÁ Z., ZÁRIBNICKÁ L., 2008: Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. *Vojenské zdravotnické listy* [online]. 2008, roč. 77, č. 3, s. 98-103 [cit. 2015-03-16]. ISBN: 9770372702000. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/vz13_2008/05-%C5%A1inkorov%C3%A1.pdf
32. VERSTEGEN J., IGUER-OUADA M., ONCLIN K., 2002: Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*[online]. roč. 57, č. 1 [cit. 2015-03-13]. ISSN: 0093-691X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01006641>

33. VĚŽNÍK Z., ŠVECOVÁ D., ZAJÍCOVÁ A., BENDOVÁ J., FALDÍKOVÁ L., ZRALÝ Z., NETOLICKÁ S., POSPÍŠIL L., DIBLÍKOVÁ L., ZUDOVÁ D., MATOUŠKOVÁ O., 2000: *Hodnocení semene pro asistivanou reprodukci a výběr plemenů: Striktní analýza spermatické morfologie SASMO*. VÚVL.
34. VĚŽNÍK Z., ŠVECOVÁ D., ZAJÍCOVÁ A., PŘINOSILOVÁ P., 2004: *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. Brno: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, [266 s., lxxv s. příl.]. ISBN 80-868-9501-7.
35. WEISS P., BRICHČÍN S., ČEPICKÁ B., ČEPICKÝ P., FIFKOVÁ J., HANUŠ M., JIRÁSEK J. E., JUSTINOVÁ J., KRATOCHVÍL S., KREJČA M., KUBÍČEK V., KUKLOVÁ I., LÍBALOVÁ Z., MITLIHNER M., MRÁZEK M., PASTOR Z., PROCHÁZKA I., SPILKOVÁ J., STÁRKA L., STRNAD P., JANÁČKOVÁ L., ŠRÁMKOVÁ T., ŠULOVÁ L., TROJAN O., UZEL R., VÁLKA J., VRHEL F., ZÁMEČNÍK L., ZIKMUNDOVÁ M., ZVĚŘINA M., ŽOURKOVÁ A., 2010: *Sexuologie*. Vyd. 1. Praha: Grada, xiii, 724 s. ISBN 978-802-4724-928.