



**Vliv antioxidantů (selen, vitamin C a E) na
biochemické ukazatele ejakulátu kanců**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Pavel Horký, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. Dušan Vaněk

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Vliv antioxidantů (selen, vitamin C a E) na biochemické ukazatele ejakulátu kanců** vypracoval 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 vědom, 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

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Pavlu Horkému, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a návrhy při zpracování mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval mé přítelkyni a rodině za morální podporu při studiu.

ABSTRAKT

Vaněk, D.: Vliv antioxidantů (selen, vitamin C a E) na biochemické ukazatele ejakulátu kanců, Diplomová práce, MENDELU, Brno, 2015, 83 s.

Cílem diplomové práce bylo vypracovat rešerši odborné literatury zabývající se významem selenu, vitamínu C a vitamínu E pro organismus a jejich vlivu na antioxidační mechanismy v organismu. Následně byl selen, vitamín C a E experimentálně aplikován do výživy *Sus scrofa f. domestica* a poté byl sledován a zhodnocen vliv na biochemické ukazatele ejakulátu (antioxidační kapacita, koncentrace selenu, aktivita enzymů). Do pokusu bylo zařazeno 10 kanců plemene *Duroc*. Všem zvířatům bylo zkrmováno 3,3 kg základní krmné směsi, která obsahovala 0,02 mg selenu, 9,9 mg vitamínu E a 16 mg vitamínu C na kilogram krmné směsi. Experimentální skupině kanců bylo do krmné dávky přidáváno 0,5 mg selenu (selenomethionin); 70 mg vitamínu E (alfa-tokoferol) a 350 mg vitamínu C (kyselina askorbová) na kilogram krmiva.

Doplnění organického selenu, vitamínu C a E mělo na sledované biochemické ukazatele vliv. Zvýšila se antioxidační kapacita organismu, hladina GSH-Px a superoxiddismutázy. Hladina metalothionenu a hladina selenu zůstaly relativně nezměněny. Výsledky použitých metod ukázaly, že suplementace antioxidantů do krmiva kanců ovlivní antioxidační mechanismy organismu zvířat.

Klíčová slova: selen, vitamin C, vitamin E, antioxidanty, kanci

ABSTRACT

Vaněk, D.: The influence of antioxidants (selenium, vitamin E and C) on biochemical parameters of boar semen. Diploma Thesis, MENDELU, Brno, 2015, 83 pp.

The aim of this thesis was to create a research of scientific literature and then experimentally determine the influence of selenium, vitamin C and E on biochemical indicators of boars ejaculate (antioxidant capacity, selenium concentrations, enzyme activity). Ten boars of the Duroc breed were used and they were divided into 2 groups. All animals were feeding 3.3 kg basic feed mixture that contained 0.02 mg of selenium, 9.9 mg of vitamin E and 16 mg of vitamin C per kilogram of compound feed. The experimental group of boars was added of 0.5 mg selenium (selenomethionine); 70 mg of vitamin E (alpha-tocopherol) and 350 mg of vitamin C (ascorbic acid) per kilogram of diet.

Biochemical parameters were positively influenced by an addition of organic selenium, vitamin C and E. Antioxidant capacity of the organism, the level of GSH-Px and superoxide dismutase increased. Level of metallothionenin and selenium were relatively unchanged. The results of the methods used in our experiment showed, that supplementation of feed affects antioxidant mechanisms of the animals.

Key words: selenium, vitamin C, vitamin E, antioxidants, boars

OBSAH

ÚVOD.....	8
1 HISTORIE CHOVU PRASAT	9
1.1 Produkce vepřového masa	10
2 ŽIVINY.....	11
2.1 Minerální látky a jejich význam.....	12
2.1.1 <i>Zdroje minerálních látek</i>	12
2.1.2 <i>Organické zdroje minerálních látek</i>	13
2.1.3 <i>Anorganické zdroje minerálních látek</i>	14
2.2 Selen.....	15
3 VITAMINY	18
3.1 Vitamin C (kyselina askorbová).....	18
3.2 Vitamin E - tokoferol, antisterilní vitamin	20
4 VOLNÉ RADIKÁLY	23
5 ANTIOXIDANTY	24
6 REPRODUKCE PRASAT	30
6.1 Reprodukční vlastnosti.....	30
6.1.1 <i>Faktory ovlivňující plodnost kanců</i>	31
6.2 Ejakulát kance	32
6.2.1 <i>Kvalita spermatu</i>	33
6.2.2 <i>Objem ejakulátu a počet spermií</i>	33
6.2.3 <i>Pohyblivost spermií</i>	33
6.2.4 <i>Morfologie spermií</i>	33
7 CÍL PRÁCE	35
8 MATERIÁL A METODIKA.....	36
8.1 Statistika.....	40
9 VÝSLEDKY	41
10 DISKUZE	56
11 ZÁVĚR.....	63
12 LITERATURA.....	65
13 SEZNAM ZKRATEK	78
14 SEZNAM GRAFŮ	79
15 PŘÍLOHY	80

ÚVOD

Práce se zabývá vlivem selenu, vitamínu C a vitamínu E na biochemické ukazatele ejakulátu kanců. Vepřové maso patří ve světě na přední příčky konzumu a prasata patří mezi hospodářská zvířata, u kterých dochází k nejefektivnější produkci. Požadavky na vysokou užitkovost prasat vyvolávají potřebu optimalizace nejen množství, ale i vzájemných poměrů esenciálních živin krmné dávky. Minerální látky jsou nezbytné pro správné funkce všech fyziologických pochodů. Konkrétně selen můžeme označit jako látku, která má mimořádný význam v řadě katalytických, enzymatických a regulačních procesů ve všech buňkách, tkáních i tekutinách živočichů. V několika desítkách prací byl zkoumán vliv selenu na kvalitu spermií a význam při reprodukčních procesech. Navíc je selen nedílnou součástí glutathionperoxidázy, která jako antioxidantní enzym vycytává v organismu škodlivé volné radikály, čímž se snižuje oxidační stres organismu. Volné radikály sice plní v organismu řadu důležitých fyziologických funkcí. Avšak tvoří – li se v nadměrném množství nebo nejsou dostatečně rychle likvidovány, stávají se pro svou reaktivitu nebezpečné, narušují buněčné membrány a mohou být příčinou rozvoje patologických projevů. Mezi antioxidanty můžeme zařadit také některé vitamíny. V práci jsou zmíněny především vitamin C a vitamin E, které působí na snížení oxidačního poškození buněk. Byl prokázán jejich pozitivní účinek v prevenci poruch plodnosti u obojího pohlaví. Kančí sperma je velmi citlivé na teplotní šok a na peroxidační poškození díky vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin (PUFA) v plazmatické membráně a relativně nízké antioxidantní kapacitě semenné plazmy.

Cílem práce tedy je posouzení, zda suplementace krmné směsi kanců pomocí selenu, vitamínu C a E může mít vliv na biochemické ukazatele ejakulátu kanců (antioxidantní kapacitu, koncentraci selenu, aktivitu enzymů).

Díky tomu by následně bylo možné uplatnit získané poznatky v praxi, kdy by mohly přispět k dosažení optimálních krmných směsí, které by byly pro zvířata prospěšné a umožnily by zajistit kvalitní a konkurenceschopné chovy.

1 HISTORIE CHOVU PRASAT

Významným živočišným produktem pro lidský konzum je maso zvířat. Jeho spotřeba kvantitativní i druhová se celosvětově velmi liší. Možnost chovu zvířat vznikala v období, kdy se člověk již stal z lovce zemědělcem a alespoň část roku se zdržoval na jednom místě. V první fázi šlo o zajetí zvířat, kdy se člověk začal seznamovat s vlastnostmi zvířat a jejich nároky. Poté mohlo začít jejich ochočování, tj. aktivní ovlivňování jejich chování a využití jejich vlastností ve svůj prospěch. Následovalo období vlastní domestikace, kdy člověk začal ovlivňovat reprodukci zvířat. U celé řady druhů bylo v průběhu vlastní domestikace dosaženo vynikající užitkovosti. Proces domestikace pokračuje neustále, například u druhů, jejichž domestikace není prozatím tak vysoká (př. husa berneška, bažant, antilopy, delfini) -(ŽIŽLAVSKÝ a kol., 2002).

Až donedávna se předpokládalo, že prase domácí pochází ze dvou divokých forem. Dnes převládá názor, že jako předek přichází v úvahu jen jeden druh, a to prase divoké (*Sus scrofa*). Až do 18. století se život evropského domácího prasete podstatně neodlišoval od divokého prasete, forma ustájení prasata příliš nechránila proti nepřízní klimatických podmínek. Byla to dlouhonohá, štíhlá zvířata s dlouhou, přímou linií hlavy, s výrazným hřebenem štětín na hřbetu. Ještě okolo roku 1800 byl v Německu věk prasat při porážce 1,5 roku a jejich porážková hmotnost okolo 50 kg. Koncem 18. století se začalo se šlechtěním prasat, a to nejdříve v Anglii. Zde byly splněny tři předpoklady: 1. Začínající industrializace zvyšovala životní úroveň obyvatel a tím se zvyšovala i poptávka po mase a tuku. 2. Rostoucí znalosti vedly k lepšímu obdělávání půdy a tím i k vyšším výnosům. Prasata bylo možné lépe krmit. 3. Rozsáhlý zámořský obchod umožnil Angličanům dovézt prasata z východní Asie do Anglie a křížit je s anglickými prasaty. Ke konci padesátých let 20. století se v krátké době změnila požadavky spotřebitelů. Ti začali požadovat jemné, šťavnaté maso s malým množstvím tuku. Spotřebitel byl ochoten zaplatit více za kvalitní masité části - šunku, plec, kotletu a panenskou pečení. Proto se začala prasata šlechtit tak, aby se podíl hlavních masitých částí v jatečném trupu co nejvíce zvýšil. Ve světě se chová téměř 800 milionů prasat. (SAMBRAUS, 2014).

1.1 Produkce vepřového masa

Vepřové maso je ve světě na přední příčce konzumu. Tvoří 37% veškerého spotřebovaného masa (110 mil. t⁻¹), před hovězím (67 mil. t⁻¹) a kuřecím masem (104 mil. t⁻¹). V roce 2011 vlastnila Čína zhruba polovinu světové produkce vepřového masa (50 mil. t⁻¹) a USA byly druhým největším producentem a to pouze s jednou pětinou (10 mil. t⁻¹) produkce Číny. Na třetím místě bylo Německo s 5 mil. t⁻¹. Více než 80% světové vepřového masa se produkuje v Asii, EU a Severní Americe (MC GLONE, 2013). Ve střední Evropě je pořadí spotřeby vepřové-drůbeží-ostatní, např. v Severní Americe je pořadí spotřeby hovězí-drůbeží-vepřové-ostatní. Na Blízkém východě pak ovčí-hovězí-drůbeží-ostatní. Největší spotřebu masa vykazuje oblast Severní Ameriky. Nejeftivněji dochází k produkci u monogastričních zvířat (drůbež, prasata), menší efektivnost je dosahována u zvířat se složitým žaludkem (ŽIŽLAVSKÝ a kol., 2002).

Mezi hospodářskými zvířaty neexistuje jiné zvíře přibližně stejné velikosti, které by se svou plodností blížilo prasati. Prasnice jsou pohlavně dospělé ve věku 5-7 měsíců a mohou 2krát ročně porodit 8-14 selat. Také v ČR je chov prasat důležitým odvětvím chovu hospodářských zvířat, přestože zejména v posledních letech jsme svědky poklesu stavů prasat a tím i výroby vepřového masa. Je to způsobeno vlivem nepříznivých vnějších i vnitřních ekonomických podmínek pro naše zemědělství. Klesá rovněž i spotřeba vepřového masa, přesto je hodnotou 41,1 kg na obyvatele na úrovni průměru spotřeby EU a na celkové spotřebě masa na obyvatele (80,5 kg) se podílí 51 %. Plemena prasat chovaná v současnosti v ČR odpovídají požadavkům trhu na libové maso. Plemena české bílé ušlechtilé, české výrazné masné, česká landrase a bílé otcovské jsou masného užitkového typu, přeštické černostrakaté jako genová rezerva je typu sádelnomasného. Chovají se také specializovaná masná plemena světového sortimentu pro účely hybridizace, a to duroc, hampshire a pietrain (SAMBRAUS, 2014). V článku HAJKOA (2013) byly sledovány příslušné trhy pro různé druhy masa v České republice v období 2006-2010. Výsledkem bylo zjištění, že významná část domácí dodávky vepřového masa byla nahrazena dovozy vepřového masa. Vedoucí postavení dovozce do ČR získalo Dánsko, které je jedním z předních světových vývozců vepřového masa v Evropě, následované Německem. Ve druhém čtvrtletí roku 2008 bylo pozorováno náhlé zvýšení cen vepřového masa a tato situace byla způsobena růstem ceny kukuřice,

což se promítlo do ceny krmiva pro prasata. Tento pokračující nárůst nákladů byl nerentabilní pro mnohé zemědělce. Ke zlepšení odbytu jatečných prasat na domácím i zahraničním trhu by mohlo přispět vyšší organizovanost výrobců v odbytových společnostech a zlepšení vztahů s nákupními organizacemi (PŮLKRÁBEK a kol., 2005).

2 ŽIVINY

Základem výživy prasat jsou biologicky významné látky nazývané živiny, zejména jejich stravitelné a využitelné části, které živočišný organizmus potřebuje k pokrytí všech životních procesů, spojených se zachovou pro trávení, vstřebávání, vyměšování, metabolismus, dýchání, termoregulaci, pohybovou aktivitu a produkci, tedy přírůstky masa, tuku, potomstva, mléka, semene a další (STUPKA, 2009). Hlavní krmiva (obiloviny a soja) a živiny (proteiny, tuky, oleje) používané pro krmení prasat musí dohromady tvořit kompletní krmnou dávku tak, aby vyhovovala požadavkům na přívod živin (PŮLKRÁBEK a kol., 2005). Charakteristickým znakem prasete je jednoduchý žaludek a méně prostorný trávicí trakt. Ten je v poměru k délce těla, oproti přežvýkavcům, téměř o polovinu kratší, což má za následek omezenou možnost zpracovávat a zužitkovávat objemná krmiva. Výše uvedené skutečnosti napomáhá rovněž hltavý způsob přijímání potravy prasat a stavba jejich chrupu, kterým nelze důkladně zpracovat krmivo v ústní dutině. Oproti jiným hospodářským zvířatům je výživa a krmení prasat založeno na bázi vysoce stravitelných krmiv s nízkým obsahem vlákniny (do 4% krmné dávky).

Z funkčního hlediska se živiny dělí na

- stavební - ze kterých si organizmy vytvářejí novou tělní hmotu, případně náhradu za spotřebované či opotřebované buňky a tkáně; mezi ně především náleží dusíkaté látky, makroprvky a voda,
- energetické - při jejichž odbourávání se uvolňuje energie využívaná k metabolickým procesům, pohybu a tvorbě tělního tuku. Řadí se k nim sacharidy, nadbytečné dusíkaté látky a náhodné zdroje energie, jako jsou například alkoholy,
- neenergetické - voda a minerální látky,
- specifické - které katalyzují, regulují, chrání a stimulují látkový a energetický metabolismus v buňkách; mezi ně patří například vitaminy, enzymy, hormony, mikroprvky.

Z hlediska významu se živiny dělí na

- esenciální - k životu nezbytné, nepostradatelné v krmivu, které zvíře neumí syntetizovat,
- neesenciální - v krmivu postradatelné (STUPKA, 2009).

2.1 Minerální látky a jejich význam

Minerální prvky existují v buňkách a tkáních živočichů v nejrůznějších chemických a funkčních formách a kombinacích i v charakteristických koncentracích typických pro určitý prvek a tkáň. Jednotlivé minerální prvky nepůsobí v organismu samostatně, ale vždy ve vzájemných souvislostech. Pro fyziologickou funkci a strukturální integritu tkání musí být zachována optimální koncentrace a poměr minerálních látek (JELÍNEK a kol., 2003). Minerální látky jsou v živočišném organismu zastoupeny v množství 3-5% tělní hmoty. Jsou to látky, které mají významný vliv na průběh metabolických procesů, na užitkovost, dlouhověkost a zdraví zvířat a v neposlední řadě i na jejich reprodukci (ZEMAN, 2006). Požadavky na vysokou užitkovost prasat vyvolávají potřebu optimalizace nejen množství, ale i vzájemných poměrů esenciálních živin krmné dávky, tedy sacharidů, tuků, bílkovin, včetně vitaminů, vody a minerálních látek, které jsou důležitou složkou z pohledu správného růstu, vývoje kostry a celkového metabolismu. Jedná se tedy o udržení acidobazické rovnováhy, stálosti vnitřního prostředí, kontrakce svalů, citlivosti nervové soustavy, tvorby hormonů, enzymů a vitaminů. Nedostatek minerálních látek organismus eliminuje omezeným výdejem a úhradou z rezerv těla, tedy endogenně. Imbalance minerálních látek vyvolává poruchy metabolismu projevující se navenek poklesem užitkovosti, zdravotními poruchami s možným úhynem. U všech kategorií prasat je potřeba minerálních látek v kompletních krmných směsích kryta cca z 70% základními komponenty krmné dávky (pšenice, ječmen, sója) a cca z 30 % ve formě premixů krmných přísad (STUPKA, 2009).

2.1.1 Zdroje minerálních látek

Minerální prvky obsažené v těle živočichů v relativně velkém množství jako je vápník, fosfor, hořčík, sodík, draslík, síra a chlor jsou označovány jako hlavní prvky nebo makroprvky či makroelementy. Minerální látky, jejichž koncentrace je v těle

živočichů nízká, jsou označovány jako mikroprvky - mikroelementy nebo stopové prvky (železo, mangan, měď, zinek, molybden, kobalt, selen, jod, fluor, nikl, chrom, cín, křemík, vanad (JELÍNEK a kol., 2003).

Využitelnost minerálních látek u prasat závisí z pohledu

- krmiva na fyzikální strukturu, chemických vazbách, zastoupení prvků, poměrech mezi živinami,
- zvířete na věku, fázi reprodukčního cyklu, velikosti potřeby.

Obecně platí, že využití jednotlivých prvků

- klesá s jejich zvýšenou dotací do krmné dávky a s věkem,
- stoupá s pořadím laktace
- kolísá v průběhu reprodukčního cyklu (STUPKA, 2009).

2.1.2 Organické zdroje minerálních látek

Správné nastavení komerční výživy prasat spočívá v kombinování nejnižších nákladů na krmné přísady při splnění nutričních potřeb zvířete pro jeho věk, genetické dispozice, velikost a fyziologické stadium. Tradičně bývají přidávány anorganické soli minerálních látek, jako jsou oxidy, sulfáty a uhličitany ke krmivu, aby se získala dostatečná úroveň výživy, zabránilo se deficitům nebo aby bylo přispěno ke zlepšení výkonu (GOWANLOCK, 2013). V poslední době se klade při výrobě minerálních sloučenin důraz na vysokou využitelnost a zároveň na nízké vylučování nevyužitelných částic do okolního prostředí. Čelní místo mezi těmito výrobky zauímají chaláty neboli proteináty. To jsou sloučeniny některých kovů s protoporfyny. Jde se o dvojmocné železo, trojmocné železo, zinek, hořčík, nikl, kobalt, chrom a měď. Tyto zdroje minerálních prvků mají velmi vysokou biovyužitelnost, což znamená kvantitativní měřítko využití živin v definovaných podmínkách k podpoře normálních struktur a fyziologických procesů organismu (ZEMAN, 2004). Rostliny a mikroorganismy přijímají minerální látky, které pocházejí převážně z anorganické formy. Následně jsou tyto prvky převáděny na organické sloučeniny. U zvířat jsou to především sacharidy, aminokyseliny a kyselina mléčná. Mezi nejvýznamnější vlastnosti prvků a zejména kovů, patří katalytická aktivita, která se znásobuje vytvářením aktivních komplexů – bioplexů s organickými sloučeninami (ŠIMEK, 2001). Ve studii CREECHTY (2004) je zmíněno, že se selenem není možná žádná chelátová forma. Selen je v organické vazbě k dispozici pouze z kvasnic. Chelátové sloučeniny mohou být vytvořeny hlavně

z minerálních prvků, jako je železo, mangan, zinek, měď a kobalt. Jsou to dipeptidy, které po přidání kovových iontů mění svou elektronovou konfiguraci a tím napomáhají hydrolýze a uvolňování kovových iontů v organismu (ZEMAN, 2004). V poslední době se zvýšila snaha rozšířit ve výživě zvířat používání organických zdrojů mikroprvků, konkrétně již zmíněných chelátů. Vzhledem k tomu, že je to však velmi nové a neprozkoumané odvětví, problém zatím není uspokojivě vyřešen, a proto se odběratel musí nadále spoléhat především na informace výrobce, nebo distributora a na jeho odbornou pověst. Zpětnou kontrolou pro něj mohou být pouze reference konečného uživatele. Tato studie dále říká, že zdaleka ne všechny sloučeniny vyskytující se na trhu odpovídají svým charakterem chelátům (FRYDRYCH, 2007). Minerální látky jako je mangan, zinek, měď, selen a chrom v organické formě (vazba na organickou matici – aminokyseliny, peptidy, kvasinky) mají významný vliv na produkci, reprodukci, zdraví a ekonomiku chovu všech druhů a kategorií zvířat (GREGER a BAIER 2000; cit. NRC 2005). Při praktické aplikaci organické formy stopových prvků můžeme předpokládat především lepší využitelnost mikroelementů. Efektivní je nižší dávkování v porovnání s adekvátním dávkováním těchto prvků v anorganické formě. Tento postup bývá nejčastěji aplikován u zvířat s vysokou produkcí, u mláďat, nemocných zvířat a zvířat s vysokou sportovní zátěží. Snižování obsahu stopových prvků ve výkalech přispívá ke zlepšování životního prostředí a k eliminaci reziduální zátěže potravinového řetězce (ZEMAN, 2006).

2.1.3 Anorganické zdroje minerálních látek

Využití anorganických zdrojů minerálních látek je problematické, protože v kyselém prostředí žaludku dochází ke změnám jejich chemické struktury ionizací na anionty a kationty a ve střevech je využitelná jen malá část. Ve střevech se převážná většina zpětně interaguje s anionty a vznikají nerozpustné sloučeniny (fytáty, fosfáty, oxaláty atd.), které jsou vyloučeny ve výkalech. Organismem je kompletně využito pouze 3 - 15 % stopových prvků přijatých v anorganické formě. Anorganické minerální soli jsou tedy závislé na změně pH a také na přítomnosti transportních proteinů, které přepravují prvky proti koncentračnímu spádu (ASHMEAD a kol., 1985; cit. WAGNER a kol., 2011). Anorganické zdroje stopových prvků, zejména oxidové, chloridové, síranové a uhličitanové formy minerálních iontů, bývají primárními zdroji dietních minerálních doplňků. (BAKER a AMMERMAN 1995, cit. WAGNER a kol., 2011). Dlouhodobé užívání anorganických minerálních látek v chovech drůbeže a prasat mělo

za následek zvýšenou akumulaci zinku a mědi v půdním i vodním prostředí. V těchto oblastech byl zaznamenán výrazný pokles produkce zemědělských komodit. Je běžné, že jsou v praxi používány vyšší dávky minerálních látek, než uvádí norma NRC 1998 (TUCKER, 1997; cit. CREECH, 2004). Podle KIMA a MAHANA (2003) jsou některé stopové prvky v anorganické podobě toxické. Jako příklad uvádí seleničitan sodný, který působil ve vyšších dávkách, narozdíl od jeho organické formy, cytotoxicky. Selen (Se), který je jedním z prvků, na které je zaměřena tato práce, je stopový prvek, který získal značnou pozornost ve výživě zvířat. Obecně platí, že organický a anorganický selen mají rozdílnou absorpci a metabolické dráhy u zvířat (BURK, 1976; SUNDE, 1984, cit. SUN, 2013). Bylo zjištěno, že koncentrace pro toxicitu, biologická dostupnost a reaktivita selenu závisí na jeho chemických formách a koncentracích (BESSER, CANFIELD, a LA POINT, 1993; cit. SUN, 2013). Obecně jsou anorganické formy selenu toxičtější než organické formy (GANGHER, LEVANDER, a BAUMANN, 1966, cit. SUN, 2013). Organické formy selenu jsou více biologicky dostupné pro člověka, než anorganické druhy selenu (RAYMAN, INFANTE, a SARGENT, 2008, cit. SUN, 2013). Proto je mnohem důležitější určit koncentraci organických a anorganických forem selenu než stanovení celkové koncentrace selenu.

2.2 Selen

Mezi mikroprvky, které mají mimořádný význam v řadě katalytických, enzymatických a regulačních procesů patří právě selen, který je obsažen ve všech buňkách, tkáních i tekutinách živočichů. Je nezbytný pro mnoho biochemických funkcí v organismu na celulórní i subcelulórní úrovni a nemůže být nahrazen jinými prvky (JELÍNEK a kol., 2003). Tento stopový prvek je obvykle přítomen ve velmi nízkých koncentracích v krmivu hospodářských zvířat. Má však zásadní roli i v mnoha fyziologických procesech (HILL, SPEARS, 2001). Kromě toho, že je součástí nejméně 25 selenoproteinů (KRYUKOV a kol., 2003), je selen navíc nedílnou součástí glutathion peroxidázy (GSH-Px) - (FLOHE' a kol., 1973; ROTRUCK a kol., 1973; cit. LOPEZ a kol., 2009). Selen se prostřednictvím glutathionperoxidázy podílí na ochraně cytoplazmy buněk, chrání buněčnou strukturu před peroxinitráty, omezuje toxické účinky některých těžkých kovů (arsen, rtuť, olovo), ovlivňuje metabolismus prostaglandinů a esenciálních mastných kyselin. Je významný pro imunitní systém organismu a buněčnou imunitu. Významně působí na plodnost samic i samců. Ovlivňuje

morfologickou strukturu a metabolismus spermií i tvorbu testosteronu. Je nezbytný pro optimální intrauterinní vývoj mlád'at. V organismu živočichů se nachází selen v mnoha sloučeninách - selenoproteinech, které mají enzymatickou aktivitu (JELÍNEK a kol., 2003). U prasnic se nedostatky selenu týkají malé velikosti vrhu, slabšího potomstva, delšího trvání porodu a nízké frekvence spouštění mléka (VAN VLEET a kol., 1973; MAHAN a kol., 1974; cit. LOPEZ a kol., 2009).

Pokud jde o samčí reprodukci, selen byl nalezený ve vysokých koncentracích ve varlatech a nadvarlatech kanců, a proto je pravděpodobné, že je důležitý pro výrobu a zrání spermií. Nízké hladiny selenu v krmné dávce prasat snižují populaci Sertoliho buněk, což vede k nižším počtu dozrávajících spermatid a menším testikulárním rezervám spermatu. Když je Se adekvátně doplněn v potravě, počet Sertoliho buněk a zralých spermií se zvýšil. Dieta nedostatečná na selen a vitamín E podávaná po delší dobu, může mít vliv na reprodukční výkonnost kanců. Testikulární tkáň má vysokou náchylnost pro uchovávání a využívání selenu ve srovnání s játry. Svědčí o tom poměrně vysoký obsah selenu a GSH-Px aktivity varlete, i když dieta nebyla obohacena o tyto živiny po delší dobu. Když byla zvířata krmena nízkou hladinou selenu a vitamínu E, klesala pohyblivost spermatu a procento abnormálních spermií bylo zvýšené. Kanci krmení nízkou selenovou dietou produkovali vyšší procento abnormálních spermií, především s narušenou ocasní morfologií, měli spermie s nižší schopností dosažení a proniknutí do zona pellucida, což by mohlo mít vliv na oplodňovací schopnost. (MARIN-GUZMAN a kol., 1997, 2000; LASOTA a kol., 2004). Další studie však uvádějí, že krmná směs pro kance doplněná selenem ve formě Na_2SeO_3 (0,10 a 0,25 mg Se/kg diety) má za následek snížení libida a velikosti varlat ve srovnání s dietou chudou na selen (0,005 mg/kg diety) - (HENSON a kol. 1983). KIM a MAHAN (2001) naznačují, že organický Se dodávaný během delší doby má také pozitivní účinky na březí a kojící prasnice, než anorganický selen. Byly také provedeny pokusy účinku přidání Se na ultrastrukturu spermií, koncentraci ATP ve spermiích a účinky na pohyblivost spermií po přidání seleničitanu sodného do extenderu. Při podávání nízkých dávek selenu nebyl akrozom nebo jádra spermií porušena, ale mitochondrie v ocasní střední části byly více oválné s širšími mezerami mezi organelami. Plazmatická membrána v této části spermie nebyla tak pevně vázána, jako když byla prasata krmena vyšší dávkou selenu. Bylo také přítomno více nezralých spermií. Celkově tyto výsledky naznačují, že nízké dávky selenu přidané do diety prasat mají za následek abnormální spermatozoální mitochondrie, nižší koncentrace ATP ve

spermatu, snížení pohyblivosti, změny v ocasní části a snížení počtu spermií s cytoplasmatickými kapkami (MARIN-GUZMAN, 2000). Skutečná fertilizační schopnost spermií se jevila být zvýšena přidáním organického selenu (SPEIGHT, 2012).

SHI (2010) zaměřil svůj výzkum na účinky nanoselenu v krmivu na testikulární ultrastruktury, kvalitu spermatu a GSH-Px aktivitu u kozlů. Výsledky ukázaly, že testikulární úroveň Se, spermatická glutathion peroxidáza a aktivita ATP ve skupině suplementované nanoselenem se výrazně zvýšily. Kvalita spermatu (objem, hustota, pohyblivost a pH) nebyla ovlivněna. Transmisní elektronová mikroskopie varlat ukázala, že u Se-deficitních kozlů byla poškozena membrána spermií a vyskytly se abnormality v mitochondriích spermií. Tvrdí tedy, že nedostatek selenu má za následek abnormální spermatozoální mitochondrie a suplementace nano-Selenem zvýšila obsah selenu ve varlatech, GSH-Px aktivitu a chránila mitochondriální strukturu spermií. MARTINS a kol. (2015) ve své nové studii hodnotili účinky krmení organickým selenem na morfologii spermií, pohyblivost, membránovou integritu a lipidovou peroxidaci, a také na spermatickou ATP a fosfolipidový hydroperoxid a GSH-Px v čerstvém spermatu dospělých kanců. Organický selen způsobil celkově vyšší počet spermií, ve srovnání s anorganickou dietou; avšak nebyl pozorován žádný rozdíl, pokud jde o objem, koncentraci spermií, počet buněk s akrozomální integritou membrány, membránový mitochondriální potenciál a koncentraci selenu v semenné plazmě. Přídavek organického selenu tak neovlivnil žádnou z analyzovaných charakteristik spermatu, kromě GSH-Px a celkového počtu spermií.

Potřeba selenu u zvířat je nízká a činí 0,1 až 0,3 mg.kg⁻¹ sušiny krmné dávky. Je ovlivněna věkem zvířat, intenzitou růstu, produkcí a graviditou. Potřeba selenu je ovlivněna i příjmem vitamínu E. Projevy nedostatku selenu jsou u zvířat velmi rozmanité. Jedná se o svalovou dystrofii u skotu, ovci, koz, prasat a drůbeže. Dále se vyskytují poruchy reprodukce, ovariální cisty, degenerativní procesy varlat, zadržení lůžka a následné endometritidy. Častý je výskyt degenerace a nekrózy jater u prasat (JELÍNEK a kol., 2003). Selen lze do krmiva přidávat např. v seleničitanu sodném, selenanu sodném a selenomethioninu (ZEMAN, 2006).

3 VITAMINY

Vitaminy jsou obecně definovány jako organické složky potravy nezbytné pro život, zdraví a růst a nejsou zdrojem energie (ZEMAN, 2006).

Charakteristickým znakem vitaminů je jejich strukturální specifita. Každá změna ve struktuře jejich molekuly vede ke změně aktivity nebo dokonce k objevení antagonistických vlastností. V současnosti je známo velké množství přírodních i syntetických antivitaminů. V buňkách jsou vitaminy buď volné, fosforylované nebo vázané na bílkoviny. Mnohé vitaminy slouží k syntéze koenzymů a prostetických skupin bílkovin, některé jsou výchozím materiálem pro syntézu hormonů, a tím se podílejí na řízení metabolických procesů. Na základě fyzikálně chemických vlastností se vitaminy dělí na rozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Potřeba vitaminů je velmi malá a závisí na druhu zvířat, pohlaví, věku, fyziologickém stavu, úrovni produkce, technologických podmínkách chovu, obsahu vitaminů v těle, schopnosti vlastní syntézy příslušného vitamínu i schopnosti organismu využívat daný vitamin (JELÍNEK a kol., 2003).

3.1 Vitamin C (kyselina askorbová)

Kyselina askorbová (KA) - Vitamin C - je ve vodě rozpustný vitamin s funkcí pohlcovače reaktivních forem kyslíku s nízkou toxicitou a vysokou účinností (ROLF a kol., 1999). Může zachytit a eliminovat volné radikály během řetězových reakcí, což zastaví peroxidační proces. Často bývá označován jako antioxidační vitamin, působí totiž na snížení oxidačního poškození buněk u člověka, a tím snížení rizika některých chronických onemocnění, jako jsou např. kardiovaskulární onemocnění (KORISH, 2008). Má silné redukční síly, které poskytují přímou reakci s volnými radikály (FREI, 1989). Jeho antioxidační vlastnosti z něj tvoří potenciálně atraktivní látku, která může bránit ateroskleróze, do které jsou zapojeny volné radikály jak v počáteční fázi endoteliální dysfunkce a později, během oxidace lipoproteinů (VAN DER LOO, 2003). Působení vitamínu C a vitamínu E bylo prospěšné při prevenci nebo snížení některých komplikací diabetes mellitus (SUN, 1999). Výsledky několika studií ukazují, že snižuje poškození DNA indukované H_2O_2 , recykluje neaktivní vitamin E a snižuje peroxidaci lipidů (SIERENS a kol., 2002). Člověk a někteří primáti jsou téměř

jediní citliví na nedostatek tohoto vitamínu, protože postrádají konečné enzymy nutné pro jeho syntézu. Potřeba KA je druhově rozdílná, závisí na věku, pohlaví, roční době a úrovni výživy. Zvyšuje se za gravidity a kojení, při infekčních onemocněních a parazitózách, při poškození jater a za stresových reakcí. Je nezastupitelná pro vývoj, růst, tvorbu kolagenu, kostí, krve, pevnost skořápky, obranyschopnost organismu, hojení ran, zlomenin i popálenin, regeneraci nervů, metabolismus železa, kyseliny listové i pro zvládnutí stresových reakcí. Nedostatek přívodu KA vyvolává skorbut, který je sice historicky známý u člověka, vyskytuje se však také u selat a psů. Pro postižená zvířata je příznačné zaostávání v růstu, výskyt poruch ve vývoji zubů, kostry, jsou pozorovány otoky dásní, viklání zubů a anémie. Při déle trvající hypovitaminóze se objevují kapilární krváceniny v dutině ústní, nosní, ve střevech, v močovém měchýři, v ledvinách a pod okosticí. V praktických chovatelských podmínkách se doporučuje dávat KA gravidním samicím, především prasnicím a sajícím selatům (JELÍNEK a kol., 2003).

Zvýšená koncentrace plazmatické KA po perorálním podání jemně práškového vitamínu C byla zaznamenána i u ovcí (HIDIROGLOU a kol., 1997) a skotu (HIDIROGLOU, 1999). Tato pozorování podporují myšlenku, že nechráněný vitamin C je částečně zničen v batoru. V práci (JAFAROGHLI, 2014) navázali na tyto úvahy stanovením účinku dietárního rybího oleje a suplementací vitamínu C na vlastnosti semene, spermatu, složení lipidů v krvi a metabolitů u Moghani beranů. Dietní efekt byl významný pro zvýšení objemu spermatu, procenta pohyblivých spermií a progresivní motility. Existují studie, že kyselina askorbová má ochranný účinek na metabolickou aktivitu a životaschopnost kryoprezervovaného spermatu i u prasat (PENA a kol., 2003; 2004). Přídavek kyseliny askorbové do kryokonzervačního média potlačil škodlivé účinky reaktivní formy kyslíku a zvýšil pohyblivost spermií a integritu membrány spermií a integritu akrozomu (HU a kol., 2010). MIRZOYAN a kol. (2006) také uvedl, že doplnění kyseliny askorbové snižuje generování reaktivních forem kyslíku po rozmrazení. Kyselina askorbová je nestabilní, když je vystavena vysoce oxidačnímu prostředí, v němž se rychle oxiduje na neaktivní dehydroaskorbát (LINSTER a VAN SCHAFTINGEN, 2007). YAMMAMOTOVI a kol. (1990) se podařilo syntetizovat stabilní derivát vitamínu C, kyselinu 2-glukosid askorbovou (AA-2G), která se vyznačuje vysokou odolností proti tepelné a oxidační degradaci v neutrálních roztocích a při neredukujících podmínkách. JENKINS a kol. (2011) uvádějí, že AA-2G má ochranný účinek také pro lidské spermie a jejich pohyblivost při procesu zmrazování

a rozmrazování. YOSHIMOTO a kol. (2008) prokázali, že po přidání AA-2G během kryokonzervace účinně chrání sperma proti peroxidaci lipidů a poškození buněk způsobené oxidačním stresem a tím zlepšuje vlastnosti membrán rozmrazeného kančího spermatu.

3.2 Vitamin E - tokoferol, antisterilní vitamin

Vitamin E je termín, který zahrnuje skupinu silných, v tucích rozpustných antioxidantů. Strukturální analýzy ukázaly, že molekuly, které mají antioxidační aktivitu vitaminu E, jsou čtyři tokoferoly (α -, β -, γ -, δ -tokoferol) a čtyři tokotrienoly (α -, β -, γ -, δ - tokotrienol). Jedna forma, alfa-tokoferol, je v přírodě nejhojněji zastoupena a má nejvyšší biologickou aktivitu. Jako přirozeně se vyskytující antioxidant se vitamin E nachází v biologických membránách, kde působí na ochranu membrány a zmírňuje oxidační poškození buněčných membrán (SUGIYAMA, 1992). BURTON a INGOLD (1986) a ESTERBAUER a kol. (1991) zjistili, že vitamin E je účinný v prevenci peroxidace lipidů a dalších radikálně řízených oxidačních akcí. Vitamin E byl poprvé izolován v roce 1922 ze zelené listové zeleniny Herbertem Evansem a Katherine Bishop, dvěma významnými výzkumnými pracovníky z Berkeley a byl popsán jako faktor plodnosti, poté byl v roce 1924 pojmenován jako tokoferol a v roce 1938 byl syntetizován (AGGARWAL a kol., 2010).

I přes přetrvávající označení vitaminu E jako antisterilní vitamin, snad nejvýznamnější je jeho antioxidační účinek. Ten spočívá v ochraně molekul, které podléhají oxidaci jako polynenasycené mastné kyseliny buněčných membrán. Za přítomnosti kyslíku tyto složky buněčných membrán podléhají progresivní peroxidaci. Volné radikály a kovové ionty mohou tyto reakce urychlovat. Tokoferol dodává vodík k redukci volných radikálů. Enzymy cyklooxygenázy a lipoxygenáza působí na polynenasycené mastné kyseliny buněčných membrán za vzniku škodlivých peroxidů a volných radikálů, které musí být neutralizovány, jinak dochází k autokatalytické řetězové reakci, nazývané lipidová peroxidace. Vitamin E tudíž stabilizuje polynenasycené mastné kyseliny tím, že inhibuje tvorbu toxických lipoperoxidů a tak přispívá k normální funkci buněčných membrán. Na tomto principu spočívá jeho pozitivní účinek v prevenci poruch plodností u obojího pohlaví, kde má vitamin E ochranný vliv na zárodečný epitel varlat a děložní sliznici, kde působí protidegenerativně. Stejně tak zabraňuje poškození cévních stěn a jejich zvýšené

propustnosti (JELÍNEK a kol., 2003). Alfa-tokoferol může porušit kovalentní vazby, které reaktivní formy kyslíku vytvářejí mezi postranními řetězci mastných kyselin v membránových lipidech (DAD a kol., 2006) a tím chrání membránové komponenty bez vlivu vznikajících reaktivních forem kyslíku (LINSTER a VAN SCHAFTINGEN, 2007). Vitamin E jako antioxidant je funkčně synergicky spojen s enzymem glutathionperoxidázou, jež obsahuje selen. Tento enzym zajišťuje antioxidační aktivity v buňce, buněčné membráně i extracelulárním prostoru a tak chrání buňky před poškozením. Proto je přítomnost přiměřeného množství selenu k udržení tohoto enzymu v plné funkci důležitým mechanismem doplňujícím účinek vitaminu E. Při nedostatku vitaminu E a selenu dochází vlivem zvýšené tvorby toxických peroxidů k destrukci buněčných membrán (buněk), což má za následek degeneraci zejména kosterní a srdeční svaloviny, jater, mozku a cév. U prasat ve výkrmu dochází při karenci vitaminu E rovněž ke svalové dystrofii, nekróze jater i k syndromu „morušového srdce“ (JELÍNEK a kol., 2003).

Úloha vitaminu E v reprodukční schopnosti je významná ve zvyšování celkového objemu spermií a koncentrace spermií u kanců (BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA a kol., 1995), králíků (YOUSEF a kol., 2003), a beranů (LUO a kol., 2004, YUE a kol., 2010). Obecně platí, že všechny tokoferoly a tokotrienoly, stejně jako jejich esterifikované formy, jsou absorbovány střevními slizničními buňkami spolu s jinými hydrofobními živinami v krmivech (CHEESEMAN a kol., 1995, ALTMANN a kol., 2004). Existuje důkaz, že absorpce vitaminu E je saturovatelná (zajišťuje malé riziko předávkování) a je ovlivněna koexistencí dalších rozpustných lipidových látek v krmivu. Vysoké dávky alfa-tokoferolu jsou absorbovány mnohem efektivněji, pokud jsou ve směsi s vysokým obsahem tuků v potravě lidí (DIMITROV a kol., 1996; IULIANO a kol., 2001). Podobný trend se očekává také u ostatních živočišných druhů.

Ochranné účinky vitaminu E proti oxidačnímu poškození spermií jsou ještě významnější, pokud jsou špatně řízeny hygienické podmínky při chovu. Jsou totiž spojeny se zvýšeným výskytem infekce a záněty reprodukčního aparátu. V průběhu zánětu, může antioxidační stres ovlivnit funkci varlat a negativně ovlivňuje charakteristiky spermatu (O'BRYAN a kol., 2000). Vzhledem k vysokému obsahu polynenasycených membránových lipidů je testikulární tkáň jedním z cílů pro oxidativní stres (MISHRA a ACHYRYA, 2004). Některé studie ukázaly, že vitamin E měl významné účinky na reprodukční orgány. MARIN-GUZMAN a kol. (1997) zjistili, že délka a šířka varlat kanců byla větší ve skupině dietně doplněné vit. E než ve skupině

bez suplementace. SOLEIMANI a kol. (2009) zjistili, že objem varlat u skupiny kryš léčených vit. E byl větší než v kontrolní skupině a tloušťka zárodečného epitelu a průměru semenných kanálků byla také vyšší. Nedostatky vitamínu E způsobily testikulární degenerace u kryš a křečků (SIDNEY a kol., 1975) a měly za následek snížení počtu zárodečných buněk a snížení produkce spermií (COOPER a kol., 1987). WU a kol. (1973) a WILSON a kol. (2003) zjistili, nedostatek vit. E může vést k reprodukčnímu poškození orgánů, jako jsou degenerace spermatogonií, testikulární poškození a degenerace semenných kanálků.

V poslední době byly popsány některé další biologické aktivity vitamínu E včetně regulace buněčné signalizace a genové aktivity, modulace imunitní funkce a indukce apoptózy (AZZI a kol., 2002). Dietní doplnění vitamínu E je nezbytné hlavně v období růstu domácích zvířat, a proto může nutriční deficit vitamínu E nastat častěji u mladších domácích zvířat. Důsledky takového nedostatku zahrnují svalovou dystrofii u odstavených mláďat králíků (CHAN a kol., 1979) a slepic (SHIH a kol., 1977) a neurologické léze u potkanů (SOUTHAM a kol., 1991). Klinické účinky nedostatku vitamínu E se mohou ještě vážnější projevit, jestliže jsou spojeny s absencí selenu nebo vitamínu C (HILL, 2003).

Je známo, že inhibitory lipidové peroxidace biologických membrán působí jako lapače lipidových peroxylových [LOO-] a alkoxylových [LO-] radikálů (ERNSTER a kol., 1992), a brání oxidačnímu poškození kryoprezervovaného spermatu skotu (O'FLAHERTY a kol., 1997), jakož i poškození kapalného spermatu kanců udržovaného při 19 °C (CEROLINI a kol., 2000). Během kryokonzervace kančího spermatu má ve vodě rozpustný analog vitamínu E (Trolox neboli kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 karboxylová) pozitivní vliv na pohyblivost spermií, mitochondriální membránový potenciál a membránovou integritu (PENA a kol., 2003).

Kančí sperma je velmi citlivé na teplotní šok a na peroxidační poškození díky vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně a relativně nízké antioxidační kapacitě semenné plazmy. Účinek doplnění alfa-tokoferolu o různých koncentracích na sperma kanců během kryokonzervace a na charakteristiku pohyblivost spermií byl při pokusech následující. Celková pohyblivost a míra životaschopnosti suplementovaných rozmražených vzorků byla signifikantně nižší než u čerstvých spermií. V nesuplementované skupině rozmražených vzorků byla míra životaschopnosti také výrazně nižší než u suplementované skupiny. Suplementovaná skupina měla také vyšší akrozomální integritu (JEONG, 2009). Ačkoli nízké hodnoty

vitaminu E (4,4 IU / kg potravy) neovlivní počet Sertoliho buněk nebo spermatid, vysoká hladina vitaminu E (220 IU / kg) snižuje koncentrace PGF₂ (prostaglandin F₂) v prostatě a semenných váčcích dospělého kance (MARIN-GUZMAN, 2000). Suplementace pitné vody antioxidanty - kyselinou askorbovou, vitamínem E a jejich kombinací, snižuje tvorbu volných radikálů a může zlepšit kvalitu králičího spermatu, přičemž nejlepší výsledky měl právě vitamin E (YOUSIF, 2003). Přidání alfa-tokoferol acetátu do extenderu zlepšilo funkčnost plasmalemy a životaschopnost rozmražených spermií u býků Zebu. Výsledky této studie ukazují, že vyšší úroveň α -tokoferol acetátu byla ale škodlivá pro pohyblivost spermií (BATOOL, 2012). S ohledem na výše uvedené, Vitamin E může snížit oxidační poškození pohlavních orgánů a účinky vitaminu E na reprodukční účinnost byly popsány u několika živočišných druhů.

4 VOLNÉ RADIKÁLY

Volné radikály vznikají v buňkách jako vedlejší produkt látkové výměny. Plní v organismu řadu důležitých fyziologických funkcí. Avšak tvoří – li se v nadměrném množství nebo nejsou dostatečně rychle likvidovány, stávají se pro svou reaktivitu nebezpečné, narušují buněčné membrány a mohou být příčinou rozvoje patologických projevů – degradace a stárnutí buněk, narušení obranyschopnosti (JORDÁN, 2001). Jejich toxické působení spočívá v reakci s dvojnými vazbami nenasycených mastných kyselin a přeměně této vazby na peroxidickou (JELÍNEK, 2003). Proto organismus využívá ke své ochraně proti molekulám volných radikálů látky obsažené v potravě – antioxidanty (JORDÁN, 2001). Pro organismus jsou nejdůležitější volné radikály kyslíku a dusíku; dalšími přeměnami z nich mohou vznikat jiné reaktivní látky, které však již nemají nepárový elektron (peroxid vodíku, kyselina chlorná). Tyto látky se spolu s volnými radikály označují společným názvem reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species - ROS) či dusíku (reactive nitrogen species - RNS) - (RACEK, HOLEČEK, 1999). Fyziologické koncentrace reaktivních forem kyslíku jsou nutné pro normální funkce buněk (NORDBERG a ARNE'R 2001), výrobu energie, fagocytózu a mezibuněčné regulace (POLI a kol., 2004), přičemž nadměrné množství ROS může způsobit poškození DNA, bílkovin a lipidů (DIZDAROGLU a kol., 2002; LYKKESFELDT a SVENDSEN 2007). Negativní účinky reaktivních forem kyslíku mohou být dány antioxidačními obrannými mechanismy, které obsahují antioxidační

enzymy, jako je superoxid dismutáza, kataláza a glutathionperoxidáza, stejně jako neenzymatické antioxidanty, jako je například glutathion, kyselina askorbová, alfa-tokoferol a β -karoten (KIRSCHVINK a kol., 2002; VALKO a kol., 2006). Abnormality v antioxidantním obranném systému mohou zvýšit citlivost prasat na stres, což má za následek sníženou tělesnou výkonnost a snížení imunitní funkce (DUTHIE a kol., 1989, LAURIDSEN a kol., 1999). Několik *in vivo* studií prokázalo, že některé kmeny laktobacilů mohou zlepšit oxidační stav krys a lidí (KAIZU a kol., 1993, KULLISAAR a kol., 2003). Oxidační stres může být spojen s výskytem různých druhů patologických stavů: kardiovaskulární dysfunkce, například vysoký krevní tlak, cévní mozkové příhody a srdeční selhání; reprodukční dysfunkce; septický šok; rakovina a mnoho onemocnění související s věkem, chronická onemocnění, včetně aterosklerózy; diabetes mellitus; revmatoidní artritidy a neurodegenerativního onemocnění. Oxidační stres nepříznivě ovlivňuje buněčné funkce a může souviset s rozvojem testikulárních dysfunkcí. Antioxidanty zachovávají adekvátní funkce buněk proti poruchám homeostázy, včetně procesů zahrnujících oxidační stres. Kromě toho, antioxidantní suplementace by teoreticky mohla chránit či zabránit peroxidačnímu poškození struktur varlat a může být užitečná při léčbě mužské neplodnosti (APRIOKU, 2013).

5 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty (například, glutathion, arginin, citrulin, taurin, kreatin, selen, zinek, vitamín E, vitamín C, vitamín A, a polyfenoly) a antioxidantní enzymy (např, superoxid dismutáza, glutathion reductáza, katalasa a glutathion peroxidáza) vyvíjejí synergické akce ve vychytávání volných radikálů. V průběhu posledních tří desetiletí se ukazuje, že podvýživa (například dietní nedostatky bílkovin, selenu a zinku), nebo nadbytek určitých živin (například železo a vitamín C) vede k oxidaci biomolekul a poškození buněk. Velké množství literatury podporuje představu, že dietní antioxidanty jsou užitečné radioprotektory a hrají důležitou roli v prevenci mnoha onemocnění (např, rakovina, ateroskleróza, mrtvice, revmatoidní artritida, neurodegenerace, a diabetes) - (FANG, 2002). Od objevu glutathion peroxidázy v roce 1973, byl selen identifikován jako esenciální kofaktor pro selenoprotein P a další selenoproteiny (ARUOMA, 1998). Významné je, že nedostatek selenu v potravě výrazně snižuje tkáňovou hladinu glutathion peroxidázy o 90% a působí na peroxidační poškození a mitochondriální dysfunkci (XIA, 1985). Stejně tak, dietní nedostatek selenu

poškozuje funkci dalších selenoproteinů, které zahrnují iodothyronin deiodinasi a thioredoxin reduktasu (EVANS, 2001). Zásadní roli sehrál selen při objevu Keshanské choroby. Toto onemocnění (pojmenované podle vesnice v oblasti Keshan v provincii Heilongjiang v severovýchodní Číně, kde byla hlášena většina původních případů), bylo výsledkem závažného nedostatku selenu v potravě (YANG, 1983). V posledních letech se zvýšil počet experimentálních dat vhodných jako materiál pro výzkum působení oxidativního stresu v rozvoji mnoha nemocí. U hospodářských zvířat se může oxidativní stres podílet na řadě patologických jevů včetně těch, které jsou významné pro zdraví zvířete a živočišnou výrobu (LYKKESFELDT a SVENDSEN, 2007). Reaktivní formy kyslíku (ROS) mají biologické funkce nezbytné pro normální fyziologii, a produkce ROS může být podstatně zvýšená v reakci na různé podněty (MACHLIN, BENDICH, 1987). Tyto podněty zahrnují extracelulární faktory působící přes plasmatickou membránu receptorů, jako jsou hormony, prozánětlivé cytokiny a fyzikální a environmentální faktory jako UV stres, drogy a patogenní invaze (BASHAN a kol., 2009). Nedostatek antioxidačních látek nebo nadměrná produkce ROS může mít za následek oxidační stres, definovaný jako poškození homeostázy mezi oxidanty a antioxidanty na buněčné úrovni (FINKEL, HOLBROOK, 2000). Oxidační stres může být měřen přímo pomocí detekce volných radikálů, nebo nepřímo detekcí antioxidačních molekul nebo biomarkery oxidačního poškození. Obecně platí, že vznik volných radikálů může být snadno detekován, ale je velmi obtížné posoudit in vivo celkovou antioxidační aktivitu. Antioxidanty mohou být přítomny v buňkách, buněčných membránách a v extracelulárních tekutinách. Mezi intracelulární antioxidanty patří glutathion, který může rozložit volné radikály a enzymy, jako jsou kataláza, glutathion peroxidáza a superoxiddismutáza. Membránou vázané antioxidanty jsou alfa-tokoferol, β -karoten a ubiquinon (HALLIWELL a GUTTERIDGE, 1989). Antioxidační systém v plazmě je většinou realizován prostřednictvím nízké molekulové hmotnosti antioxidantů (kyselina askorbová, glutathion, tokoferoly, fenolové sloučeniny) dietního původu (EVANS, HALLIWELL, 2001). Koncentrace jednotlivých antioxidantů obecně není reprezentativní pro celkovou antioxidační aktivitu v důsledku synergických a antagonistických interakcí mezi antioxidanty. Takže celková antioxidační aktivita může dát více biologicky relevantní informace, než jen měření koncentrace jednotlivých antioxidantů (SOMOGYI a kol., 2007).

Vitamíny také přímo vychytávají ROS a působí na zvýšení činnosti antioxidačních enzymů. Vitamin E je uznáván jako jeden z nejdůležitějších

antioxidantů. Inhibuje ROS indukovanou tvorbu lipidových peroxy radikálů, čímž chrání buňky před peroxidací v membránových fosfolipidech, před oxidačním poškozením plazmy velmi nízkou hustotou lipoproteinů, chrání buněčné proteiny, v DNA působí proti membránové degeneraci (TOPINKA, 1989). V důsledku toho, dietní nedostatek vitamínu E snižuje činnosti jaterní katalázy, GSH-Px a glutathion reductázy, indukuje jaterní peroxidaci lipidů a způsobuje neurologické a kardiovaskulární poruchy (MULLER, 1990; CARR, 2000). XIA, 2012 uvádí, že antioxidant AA-2G (kyselina 2-glukosid askorbová) je vhodnější antioxidant ve srovnání s vitamínem E nebo glutathionem. Studie se zabývá zkoumáním životaschopnosti, neporušenosti akrozomu, kapacitační rychlosti a četnosti březosti při použití antioxidantně upravených spermií. Výsledkem je zjištění, že AA-2G suplementace může zlepšit kvalitu kančích spermií a stanovuje optimální koncentraci AA-2G na 0,068 mg / ml (XIA, 2012).

Studie SZCZESNIAK - FABIANCZYK (2003) se zabývala stanovením vlivu možných antioxidantů (adenosin, L-cystein-hydrochlorid, kyselina askorbová, fumarát hořečnatý a prolaktin- kterými se doplňuje kančí sperma v extenderu), na dobu přežití spermatu a jeho chromatinovou strukturu. Byla hodnocena motilita spermatu a náchylnost chromatinové struktury k denaturaci. Přidání fumarátu hořečnatého zvýšilo přežití spermií, ale vyústilo v nejvyšší přírůstek podílu spermií s poškozením chromatinové struktury. Přidání 200 mg L-cysteinu-hydrochloridu přineslo nejlepší výsledky v přežití spermií. Je možné předpokládat, že nižší koncentrace této složky by přinesla ještě lepší výsledky.

Doplňování organického selenu, vitamínu E a zinku pro zvýšení kvality čerstvého spermatu (motilita a příznivý vliv na buňky v průběhu spermatogeneze nebo zrání v nadvarleti) bylo zkoumáno také u koní. Výsledky uvedené v této studii ukazují, že doplnění diety antioxidanty má za následek vyšší antioxidační vlastnosti semenné plazmy. Dietní suplementace selenu, zinku a vitamínu E vedla ke zvýšení motility a životaschopnosti spermií. Zároveň však ukazují, že suplementace zvýší kvalitu spermatu, ale po dosažení optimální úrovně již další zlepšení nenastalo (CONTRI, 2011). Jako další z lapačů volných radikálů byl zkoumán přídatek alginátu do diety kanců. Cílem tohoto výzkumu bylo zhodnotit účinek různých koncentrací alginátu přidaných do spermatu před zmrazením. Doplnění extenderu různými dávkami alginátu zvýšilo celkovou motilitu spermatu, zlepšilo integritu plazmatické membrány spermií a mitochondriální aktivitu. Mrazení za přítomnosti alginátu vedlo k vyšší hladině

superoxiddismutázy a vyšší aktivitě GSH-Px a nižší hladině malondialdehydu. Alginát je tedy efektivní při kryokonzervaci spermatu (HU, 2014).

Současné metody kryokonzervace kančího spermatu mají za následek snížení pohyblivosti spermií a jejich životaschopnosti. To může být částečně způsobeno produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Vznik ROS je normální důsledek oxidativního metabolismu. Nicméně, zvýšení produkce ROS má za následek peroxidaci lipidů a ROS vyvolané membránové poškození vedoucí k ztrátě pohyblivosti spermií, poškození akrozomální membrány a oxidaci DNA. Antioxidanty, jako je kyselina askorbová a alfa-tokoferol mají ochranný účinek jak na metabolickou aktivitu a buněčnou životaschopnost kryoprezervovaného spermatu skotu. Kyselina askorbová působí jako antioxidant a brání oxidačnímu poškození DNA ve spermatu. Alfa-tokoferol je uznávaným inhibitorem peroxidace lipidů v biologických membránách a vykazuje ochranný účinek na plazmatické membrány kryokonzervovaného spermatu (GOLDEN, 2002). Výsledkem studie GOLDEN, (2002), která testovala přidání těchto dvou složek do krmiva v koncentracích 0; 0,1; 1; a 10 mM bylo, že přidání 10 mM kyseliny askorbové a 1 mM alfa-tokoferol, může mít za následek příznivé zvýšení pohyblivosti spermií, životaschopnosti a neporušené akrozomy, při současném snížení oxidativní úrovně (GOLDEN, 2002).

Na kvalitu spermatu po rozmrazení byly zaměřeny i práce, které využívaly působení dalších přídatných látek. Ve studii MALO (2010) byly vzorky spermatu kryoprezervovány a doplněny různými koncentracemi cysteinu (0,5 a 10 mM). Cílem bylo zjistit, jaká koncentrace cysteinu je schopna produkovat během kryokonzervace ochranný účinek. Kvalita semene (celkové zlepšení pohyblivosti, progresivní zlepšení pohyblivosti, životaschopnost, integrita akrozomu a test hypoosmotické bobtnavosti) byla hodnocena po zmrazení a následném rozmrazení a pak každou hodinu po dobu 3 hodin. Ve druhé části experimentu se ejakuláty uchovávaly ve zmrazeném stavu s nebo bez těchto antioxidantů: cystein, rozmarýn (*Rosmarinus officinalis*) a cysteinu plus rozmarýnu. Opět byla hodnocena kvalita semene po rozmrazení. Poslední část experimentu byla zaměřena na fertilizační kapacitu spermatu. Celkem 2232 oocytů bylo in vitro oplodněno rozmraženým spermatem. V souhrnu, účinná koncentrace cysteinu v mrazícím nástavci byla 10 mM; přidání exogenního rozmarýnu nebo cysteinu do mrazícího nástavce pozitivně ovlivňuje životaschopnost a integritu akrozomu po rozmrazení. Doplnění samotného rozmarýnu zlepšilo celkovou pohyblivost. Zahrnutí

rozmarýnu do nástavce bylo účinné pro průnik a rychlost štěpení oocytů a také na účinnost oplození (MALO, 2010).

Efektivní kryokonzervace kančího spermatu může zvýšit produktivitu stáda, napomáhá při udržování biologické bezpečnosti, podporuje mezinárodní výměny genetického materiálu, usnadňuje technologie genového výběru, a umožňuje racionální genové bankovníctví. V článku ZHANG, 2012 je uvedeno, že pro odstranění reaktivních forem kyslíku a snížení jejich negativního působení v průběhu kryokonzervace kančího spermatu je vhodné doplnění určitých antioxidantů (zkoumán byl přírůdek glutathionu, superoxidodismutázy, katalázy, L-glutaminu a L-cysteinu, doplnění přírodních bylin a také přírůdek kyseliny askorbové) do mrazících extenderů. To také napomůže zlepšení kvality rozmrazeného spermatu. Centrifugace je dalším nezbytným krokem při zmrazování kančího spermatu v kryoprezervačním protokolu. Použití optimálního centrifugačního protokolu by mohlo maximalizovat využití spermií a jejich přežití po rozmrazení (ZHANG, 2012).

Kančí spermie jsou velmi citlivé na peroxidační poškození kvůli vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin ve fosfolipidech v plazmatické membráně spermií (CEROLINI, 2000, PARKS, 1992) a korelaci nízké antioxidační kapacity kančí semenné plazmy a lipidové peroxidace (BREZEZINSKA - SLEBODZINSKA, 1995). Byly popsány změny zmrazených lidských spermií (ALVAREZ, 1992), býčích (O'FLAHERTY, 1997) a myších (MAZUR, 2000), který byly spojeny s hladinami ROS a oxidačním stresem. Kromě toho, proces zmrazení a rozmrazení spermií skotu může generovat ROS (CHATTERJEE, 2001), poškození DNA (LOPES, 1998), cytoskeletární změny (HINSHAW, 19861) a může mít vliv na pohyblivost spermií (DE LAMIRANDE, 1992).

Z novějších prací se působením antioxidantů na zmrazené sperma zabývá SARIÖZKAN (2014). Tvrdí, že antioxidanty snížily u rozmrazeného spermatu poškození akrozomů a abnormality spermií. Kromě toho, suplementace cysteinu poskytuje lepší integritu DNA. SCHMID-LAUSIGK, (2014) zkoumal dietní suplementaci hřebců pomocí lněného oleje v kombinaci s antioxidanty. Tato kombinace snížila pokles pohyblivosti a membránovou integritu chlazeného spermatu hřebců. Další z publikovaných prací se zaměřila na koncentraci alfa-tokoferolu schopného zlepšit kvalitu kryokonzervovaného spermatu prasat. Kančí spermie zmrazené s 200, 500 nebo 1000 mg / mL alfa-tokoferolu se rozmrazily a byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 4 hodin. Byly hodnoceny rutinní parametry kvality spermatu, náchylnost

k peroxidaci lipidů a spotřeba kyslíku. Byla zjištěna interakce mezi ošetřením vzorků a dobou inkubace ($P < 0,05$). Všechny koncentrace alfa-tokoferolu zlepšily podíl pohyblivých spermií v prvních 2 h inkubace. Během inkubace však došlo k postupnému poklesu životaschopnosti a integrity (neporušenosti) akrozómu. Nejlepší ochranu plazmatické membrány spermií před lipidovou peroxidací zajistilo přidání 200 mg / mL alfa-tokoferolu. Toto zlepšení pohyblivosti ve vzorcích může být vysvětleno nižší účinností reaktivní formy kyslíku na membrány spermií v důsledku antioxidační kapacity alfa-tokoferolu. (BREININGER, 2005). Pro posouzení účinnosti dietní antioxidační suplementace (vitamín E a extrakt rostlin) může být využit například KRL test. Kit Radical Libres (KRL) test je biologický test, který hodnotí antioxidační status organismu testováním antioxidační obranných systémů jak v plasmě, tak u červených krvinek (PROST, 1992). KRL test hodnotí celkovou antioxidační aktivitu krve měřením času potřebného k hemolyse 50% červených krvinek vystavených řízenému útoku volných radikálů. První pokus studie (ROSSI, 2013) probíhal po odstavu selat (40 selat/skupina) dietní suplementací vitamínu E po dobu 60 dnů. Výsledkem zde byla vyšší celková antioxidační aktivita krve a červených krvinek než u kontrolní skupiny prasat. Druhá část studie ukázala, že dlouhodobá suplementace ve vodě rozpustného rostlinného extraktu (20 prasat/skupina) z listů Verbenaceae má sklon ke zvýšení antioxidační aktivity krve. Tyto výsledky naznačují, že by mohl být KRL test významný jako jeden z účinných prostředků pro hodnocení antioxidační aktivity při dietní suplementaci prasat (ROSSI, 2013).

6 REPRODUKCE PRASAT

Ve vztahu k dosahované užitkovosti můžeme prasata zařadit mezi nejvýkonnější hospodářská zvířata. Je to dáno zejména vysokou schopností syntézy proteinů a tukových rezerv v těle, což se projevuje značnou intenzitou růstu. K dalším příznivým vlastnostem prasat patří ranost, výborná plodnost, mléčnost, krátké období březosti a můžeme zahrnout i příznivou jatečnou výtěžnost.

V procesu zušlechťování chovu prasat je snaha o dosažení požadovaných parametrů užitkovosti, které odpovídají především požadavkům konzumentů, ale i zpracovatelů při důrazu na potravinovou bezpečnost, kvalitu produktu a ekonomiku výroby.

Užitkové vlastnosti prasat dělíme do dvou základních skupin, a to:

- vlastnosti reprodukční – plodnost, mléčnost
- vlastnosti produkční - výkrmnost, jatečná hodnota (STUPKA, 2009).

6.1 Reprodukční vlastnosti

Plodnost je základní biologickou a užitkovou vlastností zvířat, která umožňuje jejich rozmnožování, zachování druhu a zároveň zlepšování jejich užitkových vlastností. V chovu prasat je plodnost chápána jako schopnost konců vykonávat koitus a produkovat sperma do vysokého věku. U prasnic zahrnuje reprodukční schopnost pravidelné zabřezávání a produkci životaschopného potomstva. Hlavní přednosti prasete z hlediska rozmnožování jsou především multiparita, krátká doba březosti, rané pohlavní dospívání, krátké trvání involuce pohlavních orgánů po porodu, rychlý nástup plnohodnotné říje a schopnost turnusové produkce (STUPKA, 2009). Reprodukční systém kance je tvořen ze dvou pohlavních žláz (varlat), přídatných pohlavních žláz (váčky semenné, žláza předstojná, žlázy Cowperovy), vývodných cest (nadvarle a chámovod) a z úseku společného i pro močové cesty, který probíhá ve vlastním kopulačním orgánu tj pyji. V šourku, který je tvořen vychlípáním měkké stěny břišní jsou uložena varlata. Varlata obsahují lalůčky, které jsou tvořeny kanálky, v nichž se v období pohlavní dospělosti tvoří spermie, které jsou po dozrání vyplavovány do nadvarlete. V hlavě nadvarlete dojde ke zhuštění spermií a k poslední fázi jejich dozrávání (KOZUMPLÍK, 1980). Tvorba spermií probíhá za snížené teploty při 4 -

7 °C, proto je třeba dbát na čistotu kůže šourku, aby nebyl narušen termoregulační systém. Příznaky pohlavního dospívání se projevují začátkem 4. měsíce, vrcholí v 5. a 6. měsíci. K zařazování kanců do plemenitby dochází okolo 9. až 10. měsíce. Nejvyšší plodnost můžeme pozorovat ve věku 18-30 měsíců (ŽIŽLAVSKÝ a kol., 2002). Denní produkce spermií kanců ve věku 10 měsíců se pohybuje v rozmezí 10 až 39 miliard (LOUDA, 2001).

6.1.1 Faktory ovlivňující plodnost kanců

Faktory vnitřní

- pohlavní dospělost – ta se projevuje funkčností pohlavních žláz, schopností páření, viditelnými sekundárními pohlavními znaky a vytvořením pohlavního reflexu.
- pohlavní potence - je kritérium schopnosti k plemenitbě. Hodnotí se stupněm vyjádření libida, důsledností a tempem průběhu sexuálních reflexů. Dále počtem skoků za časovou jednotku při vyrovnané kvantitě a kvalitě ejakulátu
- období narození kance - nejlepších parametrů dosahují kanci narození na podzim
- plemeno

Faktory vnější

- výživa - má nesporný vliv. Pro dospělého kance (220 - 230 kg) je postačující k zajištění normální produkce 37 MJ metabolizované energie a 500 g N látek na den. Nepříznivě působí nedostatek vitaminů, především A a E a stopových prvků (Co, Mn), který může vést k poruchám funkce pohlavních žláz. Při větší absenci proteinu v krmné dávce dochází k omezení spermiogeneze. Výrazně negativně působí i toxické látky z krmiva, včetně plísňových toxinů
- vliv ročního období - Obecně můžeme říci, že zvýšení teploty prostředí se průkazně projevuje v biochemickém složení plazmy spermatu, zhoršuje se kvalita spermatu a snižuje se oplozovací schopnost spermií.
- metody plemenitby, z nichž jsou významné především příbuzenská plemenitba a křížení (STUPKA, 2009).

Sperma by mělo odpovídat těmto požadavkům:

- musí být barvy mléčně bílé až šedobílé a musí mít ostatní charakteristické vlastnosti spermatu (konzistenci, bez zápachu)
- nesmí obsahovat cizí přímíseniny (krev, moč, hnis atd.)

- objem filtrovaného spermatu nesmí být nižší než 100 cm³, u mladých kanců do věku 12 měsíců nesmí být nižší než 80 cm³
- hustota spermatu nesmí být nižší než 150 000 v mm³
- aktivita spermií musí být nejméně 70%
- morfologicky normálních spermií musí být nejméně 75 %
- nesmí obsahovat patogenní zárodky ani masivní nález nepatogenních zárodků (LOUDA, 2001)

Citlivost semenoplovného epitelu varlat na změnu kvality biologických složek krmiva a na dráždivé či toxicky působící látky je značná. Může dojít k nepříznivému ovlivnění procesu spermiogeneze a tím ke snížení kvality ejakulátu a fertility spermií. Přímé pozitivní či negativní působení je patrné na rozvoji semenoplovných kanálků a žláz pro tvorbu semenné plazmy. Nepřímo pak může být ovlivněna činnost endokrinních žláz, které mají přímý vztah k rozvoji pohlavních orgánů. Pro kance je velmi důležitá i skladba vitaminů v krmivu. Velká část vitaminů je součástí koenzymů, čímž mají blízký vztah k enzymům. K přeměně vitaminů v koenzymy dokází při složitých enzymatických reakcích, které mohou být součástí dalších metabolických pochodů. Vitamin E se považuje za antioxidant vitaminu A, takže jeho nedostatek se projevuje ve formě A – avitaminozy. Vitamin E působí také jako antistresový faktor a dává se do spojitosti s obsahem selenu v krmivu. Úloha vitaminu C není zcela objasněna, je však jedním z etiologických faktorů při epifyziolýze, obecně zlepšuje rezistenci při intenzivním využívání plemených kanců (KOZUMPLÍK, 1980). Z hlediska výživy kanců není rozhodující pro kvalitu spermatu množství přijatého krmiva ale kvalita krmiva. Denní krmná dávka kompletní krmné směsi by měla být řízena podle kondice, která má být chovná (ŽIŽLAVSKÝ a kol., 2002).

6.2 Ejakulát kance

Ejakulát kance je viskózní šedavá nebo bílá tekutina, složená z části tekuté (tvořena sekrety uretrálních žláz, prostaty, semenných váčků a obsahu nadvarlete) a rosolovité (tvořena sekterem Cowperových žláz) - (KOZUMPLÍK, 1980). Žluté, zelené, růžové nebo hnědé zbarvení znamená přimísení moči, hnisu, krve apod. Bílá barva spolu s vodnatou konzistencí svědčí o nízké koncentraci spermií (LOUDA, 2001). Celý ejakulát je tvořen z 96-98% sekrety přídatných pohlavních žláz a 2 - 4% tvoří

spermie. Biologickým znakem spermií v ejakulátu je pohyblivost, schopnost přežít a schopnost oplození. Semenná plazma podněcuje pohyblivost, poskytuje zdroj energie pro metabolismus, poskytuje ochranu proti nepříznivým vlivům prostředí a zvyšuje celkový objem ejakulátu. Objem semene kance může být ovlivněn věkem, způsobem chovu, plemenem či genetickým založením (KOZUMPLÍK, 1980).

6.2.1 Kvalita spermatu

Oplozovací schopnost spermatu je odhadována na základě kvality (pohyblivost, morfologie, funkční integrita, mikrobiální kontaminace) a kvantity spermií (počet vysoce kvalitních spermií v dávce) - (SMITAL, 2001).

6.2.2 Objem ejakulátu a počet spermií

Objem ejakulátu u plemenných kanců se může pohybovat ve značně širokých hranicích (80 –900 ml). Nejčastěji je to však v rozmezí kolem 250 – 300 ml (KOZUMPLÍK, 1980). Koncentrace spermií v 1 mm³ mezi 250 – 400 tis. Celkový počet spermií 50 až 90 miliard (LOUDA, 2001).

6.2.3 Pohyblivost spermií

Progresivní pohyb spermií je ukazatelem neporušeného buněčného metabolismu a membrán. Jelikož kančí spermie vykazují vyšší procento cyklického pohybu než jiné druhy, je doporučeno odhadovat rozdílné formy pohyblivosti a nejen podíl progresivních spermií, tj. těch, které se pohybují přímočaře (tzv. aktivita spermií). Uskladněné sperma by mělo být hodnoceno každý den a za přijatelný můžeme považovat podíl pohyblivých spermií kolem 60 % (SMITAL, 2001).

6.2.4 Morfologie spermií

Morfologické vyšetření spermií se provádí periodicky, zpravidla 1 x za měsíc, u kanců s vyšším výskytem morfologicky abnormálních spermií poté častěji. Morfologicky abnormální spermie sice může penetrovat „vajíčko" ovšem nemusí být nakonec schopna aktivace v pronukleu. Defekty na akrozómu a pohybovém aparátu (deformace bičíku) vylučují penetrační schopnost (LOUDA, 2001). Nejběžnější

morfologickou změnou kančích spermií je výskyt cytoplazmatické kapky. Cytoplazmatická kapka je primární defekt, mající původ ve varleti, a je důležitý zejména při dlouhodobém uskladnění spermatu, jelikož snižuje rezistenci spermií na in vitro stárnutí. Doporučuje se, aby celkový podíl cytoplazmatických kapek v ejakulátech používaných pro inseminaci nepřesáhl 15 %. Uvádí se, že celkový výskyt morfoloicky abnormálních spermií ve spermatu určeného pro inseminaci by neměl přesáhnout 20 % (SMITAL, 2001). Dále se mohou vyskytnout morfoloické změny na membránách, na akrozómu, spirále mitochondrií, ireverzibilní ztráta aktivity, uvolnění zejména glykolytických enzymů, omezení metabolismu glycidů, pohyb iontů skrz membrány, především příjem Na a Zn a ztráta K a Mg jakož i akumulace Ca doprovázená charakteristickým zhroucením membránových bariér (LOUDA, 2001). Sperma se hodnotí makroskopicky a mikroskopicky. Makroskopicky se hodnotí obsah cizích příměsí (krev, moč, hnis, částice steliva, štětiny a jiné nečistoty). Normální správně odebraný ejakulát (sperma) má neutrální vůni charakteristickou pro vaječný bílek. Ostrý pach nebo druhově specifický kančí pach může značit znečištění spermatu močí, prepuciálním sekretem, případně obsahem předkožkového divertikula. Mikroskopické vyšetření nativního spermatu se provádí po odběru ve vzorcích spermatu – aktivita (motilita), koncentrace spermií atd. (LOUDA, 2001)

7 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo ověřit v krmném pokusu minerální a vitaminózní výživu u plemenných kanců přidavkem selenu (organická forma selenomethionin), vitamínu E (alfa-tokoferol) a vitamínu C (kyselina askorbová) na biochemické ukazatele ejakulátu kanců z pohledu antioxidačního statusu.

8 MATERIÁL A METODIKA

Experiment byl proveden na inseminační stanici kanců ve Velkém Meziříčí (Česká republika). Do pokusu bylo zařazeno 10 kanců plemene *Duroc*. Průměrný věk byl 2 ± 0.3 roky a průměrná hmotnost kanců byla 250 ± 20 kg. Pokusná zvířata byla ustájena individuálně (2,5 x 2,5 m) a měla ad-libitní přístup k vodě. Všem zvířatům bylo zkrmováno 3,3 kg základní krmné směsi (Tab. 1 a 2). Obsah metabolizované energie (MEp) byl 12,6 MJ/kg diety. Základní krmná dávka obsahovala 0,02 mg selenu, 9,9 mg vitamínu E a 16 mg vitamínu C na kilogram krmné směsi. Kanci byli rozděleni do dvou skupin. První experimentální skupině kanců (n=5) bylo do krmné dávky přidáváno 0.5 mg selenu (selenomethionin); 70 mg vitamínu E (alfa-tokoferol) a 350 mg vitamínu C (kyselina askorbová) na kilogram diety. Druhá skupina kanců (n=5) sloužila jako kontrolní. Této skupině nebylo množství selenu, vitamínu E a C navýšeno. Premix byl kancům dávkován individuálně při ranním krmení pomocí přesného dávkovače.

Pokus trval 90 dní. První odběr byl proveden v 0. den. Následné odběry pro experiment byly provedeny vždy po 30. dnech. Kanci byli v klasickém režimu inseminační stanice, kdy byli odebíráni dle požadavku odběratele na sperma, minimálně jednou týdně.

Příprava vzorků pro analýzy

V prvním kroku bylo napipetováno 0,5 ml nativního rozmraženého ejakulátu s následným přidáním 2 ml kapalného dusíku a 0,5 ml fosfátového pufru. Následně se vzorek homogenizuje na ULTRA-TURRAX T8 homogenizeru (IKA, Königswinter, Německo) při 3000 otáčkách za minutu po dobu 2 minut. Po homogenizaci se přidá 1 ml fosfátového pufru. Vzorek takto upravený se homogenizuje (Vortex - 2 Genie, Scientific Industries, New York, NY, USA) při 2000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Následně se vzorek centrifuguje v odstředivce Universal 32 R (Hettich-Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, Německo) při 16000 otáčkách za minutu při 4 ° C, po dobu 20 minut. Nakonec se odpipetovala část supernatantu (1,5 ml) a ten byl použit pro analýzu.

Stanovení antioxidační aktivity

Roztoky, použité pro stanovení antioxidační aktivity pomocí antioxidačních metod FRAP, FR, ABTS, byly připraveny podle práce Sochor a kol., (2010). Bylo nutné provést přepočítání na ekvivalent kyseliny galové (GAE - Gallic Acid Equivalents).

Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Metoda FRAP je založena na redukci železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým (FeCl₃). Metoda však má určité limity, mezi které patří, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6) a také nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly.

Příprava reagentů:

1. 10 mM roztok TPTZ, doplnit po rysku 40 mM kyselinou chlorovodíkovou (HCl);
2. roztok 20 mM FeCl₃ ;
3. acetátový pufr 20 mM, pH 3,6;

tyto tři roztoky se smíchají v poměru TPTZ: FeCl₃: acetátový pufr 1:1: 10.

Reagencie je použitelná týden při uskladnění v temném prostředí a teplotě 4°C. Objem 150 µl této reagentury se vstříkla do plastové kyvety s následným přidáním 3 µl vzorku. Absorbance se měřila při 605 nm po dobu 12 minut. Pro výpočet antioxidační aktivity byl použit rozdíl mezi absorbancí při poslední (12.) minutě a při druhé minutě průběhu měření.

Stanovení antioxidační aktivity metodou volných radikálů (Free Radicals)

Tato metoda je založena na schopnosti chlorofylinu (sodno-měďnatá sůl chlorofylu) přijmout a uvolnit elektrony při stabilní změně absorpčního maxima. Tento efekt je podmíněn alkalickým prostředím a přidáním katalyzátoru. Reakční činidlo (R1 - 0,1 M HCl, extrakt chlorofylinu, reakční pufr, katalyzátor) o objemu 150 μ l bylo vstříknuto do plastové kyvety s následným přidáním 6 μ l vzorku. Absorbance byla měřena při $\lambda=450$ nm ve druhé minutě průběhu měření a poslední (12.) minutě. Rozdíl mezi těmito dvěma absorbancemi byl považován za hodnotu výstupu a sloužil pro výpočet antioxidační aktivity.

Stanovení antioxidační kapacity pomocí testu ABTS

Jedním z nejvíce používaných testů na stanovení koncentrace volných radikálů je ABTS metoda. Principem je neutralizace radikálkationtu vzniklého jednoelektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS e- ABTS e+. Tato reakce se následně monitoruje spektrofotometricky, pomocí měření změny absorbance. Reakční činidlo R1 (7 mM ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina a 4.95 mM peroxidisíran draselný) o objemu 150 μ l (SOCHOR a kol., 2010b) se smíchá s 3 μ l vzorku. Absorbance byla měřena při $\lambda=660$ nm. Pro výpočet antioxidační aktivity byl použit rozdíl absorbancí při poslední (12.) minutě a ve druhé minutě průběhu měření.

Stanovení glutathionperoxidázy (GSH-Px)

Pro stanovení glutathion peroxidázy byla použita nepřímá metoda stanovení aktivity GSHPx. Principem této metody je oxidace redukovaného glutathionu (GSH) na oxidovaný glutathion (GSSG) katalyzovaný GSH-Px. Tato reakce je spojena s glutathion recyklující reakcí, při které byl GSSG redukován na GSH pomocí NADPH a glutathion reductázy (GR). Pro stanovení glutathion peroxidázové aktivity byl použit kit (CGP1, Sigma Aldrich, USA), stanovení bylo provedeno v nativním ejakulátu. Byl použit automatizovaný spektrofotometr BS 400 (Mindray, Čína). Experimentální protokol byl následující: Reakční činidlo R1 (0,3 mM NADPH v GSH-Px pufru) o objemu 260 μ l bylo pipetováno do plastové kyvety s následným přidáním 10 μ l vzorku a po promíchání se přidal objem 30 μ l reakčního činidla R 2 (3 mM tert-butylhydroperoxid) do kyvety. Absorbance bylo měřeno při $\lambda = 340$ nm a měřila se reakční kinetika po dobu 126 sekund. Přístroj vypočítal průměrný pokles absorbance za minutu

(ΔA). Následně byla podle kalibrační rovnice vypočtena aktivita GSH-Px u měřených vzorků.

Stanovení superoxiddismutázy (SOD)

Pro stanovení obsahu superoxiddismutázy (SOD, EC 1.15.1.1.) byla použita souprava 19160 SOD (Sigma Aldrich, USA). Reakční činidlo R1 (WTS roztok zředěný 20 krát pufrem) o objemu 200 μl se odpipetuje do plastové kyvety a činidlo se inkubuje při teplotě 37 ° C po dobu 108 s. Poté bylo 20 μl vzorku odpipetováno a v 378. sekundě byla zahájena reakce přidáním 20 μl činidla R2 (enzymového roztoku 167 krát zředěného pufrem). To bylo inkubováno po dobu 72 sekund a poté byla změřena absorbance při $\lambda = 450 \text{ nm}$. Reakční kinetika byla měřena po dobu 180 s a absorbance byla odečtena každých 9 s.

Stanovení metalothioneinu (MT)

Při této metodě byla provedena diferenční pulsní voltametrická měření pomocí plně automatizované aparatury (747 VA Stand, 693 VA Procesor, 695 Autosampler, Metrohm, Švýcarsko). Byl použit standardní potenciomet s tříelektrodovým zapojením a chlazeným držákem vzorku až do 4 ° C (Julabo F25, JulaboDE). Rtuťová kapková elektroda (HMDE) s kapkou ploše 0,4 mm² byla pracovní elektroda. Ag / AgCl / 3M KCl elektroda byla referentní a skleněná uhlíková elektroda byla pomocná. Pro zpracování dat byla použita VA databáze 2,2; Metrohm CH. Analyzované vzorky byly před měřením zbaveny přebytečného kyslíku propláchnutím proudem argonu (99,999%) po dobu 120 s. Byl použit Brdičkův pomocný elektrolyt, obsahující 1 mM Co (NH₃)₆Cl₃ a 1 M amoniakového pufru (NH₃ (aq) + NH₄Cl, pH = 9,6). Nosný elektrolyt byl vyměněn po každé analýze. Parametry měření byly následující: počáteční potenciál -0,7 V, koncový potenciál -1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 2 mV, modulační amplituda -250 mV, Eads = 0 V, objem vstříkovaného vzorku: 10 μl , objem měřicí buňky 2 ml (10 μl vzorku, 1990 μl Brdičkova elektrolytu) - (Křížková a kol, 2008).

Stanovení koncentrace selenu v ejakulátu

Koncentrace selenu byla stanovena pomocí diferenční pulsní voltametrie pomocí 797 VA Computrace a 889 IC Sample Center (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit standardní potenciomet s tříelektrodovým zapojením. Rtuťová kapková elektroda

(HMDE) s kapkou ploše 0,4 mm² byla pracovní elektroda. Ag / AgCl / 3M KCl elektroda byla referentní a skleněná uhlíková elektroda byla pomocná. Analyzované vzorky byly před měřením zbaveny přebytečného kyslíku propláchnutím proudem argonu (99,999%) po dobu 120 s. Parametry měření byly následující: depoziční potenciál -0,6 V, akumulací čas 200 s, pulsní amplituda 0,03 V, doba pulzu 0,05 s, krokové napětí 0,006 V, čas krokového napětí 0,1 s, sweep rate 0,06 V / s, čas dosažení rovnováhy 30 s. Celkový objem měřicí nádoby byl 2 ml (1980 µl elektrolytu a 20 µl vzorku). Elektrolyt pro selen byl připraven za použití 0,015 mM síranu amonného s přídavkem síranu měďnatého; konečná koncentrace CuSO₄ v roztoku byla 0,05 mM. pH tohoto elektrolytu se upraví na 2,2 pomocí kyseliny sírové. Skenování bylo v rozmezí potenciálů -0,4 V do -0,9 V a charakteristický pík (vrchol) selenu byl zaznamenán při potenciálu -0,7 V.

8.1 Statistika

Údaje byly zpracovány statisticky pomocí programu STATISTICA.CZ, verze 10.0 (Česká republika). Výsledky byly vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (SD). Statistická významnost byla stanovena v rámci zkoumání základních rozdílů mezi jednotlivými vzorky pomocí ANOVA a Schéffeho metody metody (dvoufaktorová analýza) pro parametry FRAP, FR, ABTS, GSH-Px, SOD, MT a koncentrace selenu. První odběr vzorků byl proveden před začátkem experimentu a byl považován za kontrolní. Rozdíly s $P < 0,05$ byly považovány za významné.

9 VÝSLEDKY

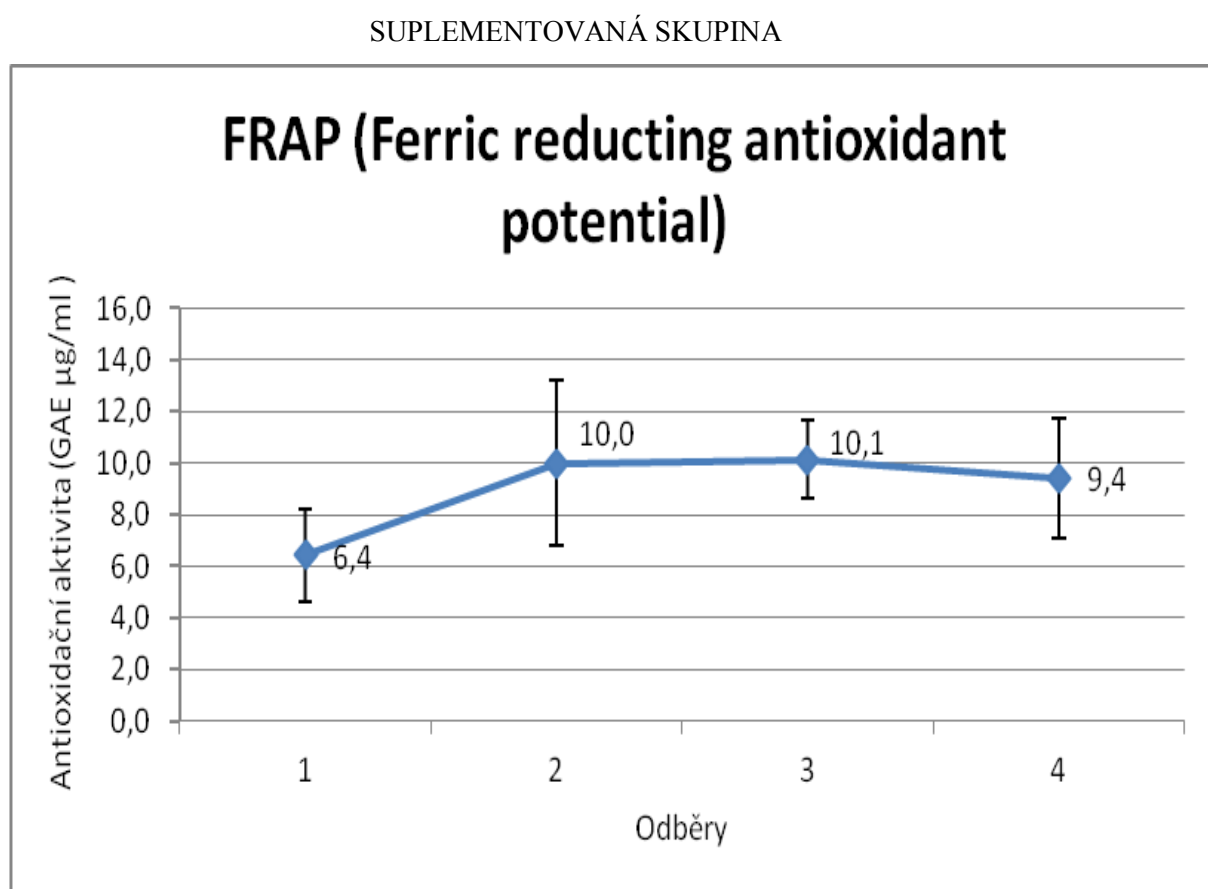
V průběhu experimentu byli kanci krmeni 3,3 kg základní krmné směsí. Kanci byli rozděleni do dvou skupin. První experimentální skupině kanců bylo do krmné dávky přidáváno 0,5 mg selenu (selenomethionin); 70 mg vitamínu E (alfa-tokoferol) a 350 mg vitamínu C (kyselina askorbová) na kilogram diety. Druhá skupina kanců sloužila jako kontrolní. Této skupině nebylo množství selenu, vitamínu E a C navýšeno.

V průběhu pokusu jsme zaznamenávali data z laboratorních rozborů semene pokusných kanců. Výsledky sledování vlivu na biochemické ukazatele ejakulátu (antioxidační kapacita, koncentrace selenu, aktivita enzymů) při jednom odběru jsou níže zobrazeny na grafech č. 1 – 14. Na osách x jsou vyobrazeny jednotlivé odběry. První odběr byl odběr kontrolní. Tento odběr byl proveden před podáváním suplementované krmné směsi. Další tři odběry znázorňují, jak doplnění diety ovlivnilo biochemické ukazatele ejakulátu. U třetího odběru pěti suplementovaných kanců byl jeden vzorek ejakulátu znehodnocen a nebylo možné jej zařadit do experimentu. Pro hodnocení pomocí zmíněných metod byly tedy použity pouze 4 vzorky ejakulátu.

FRAP

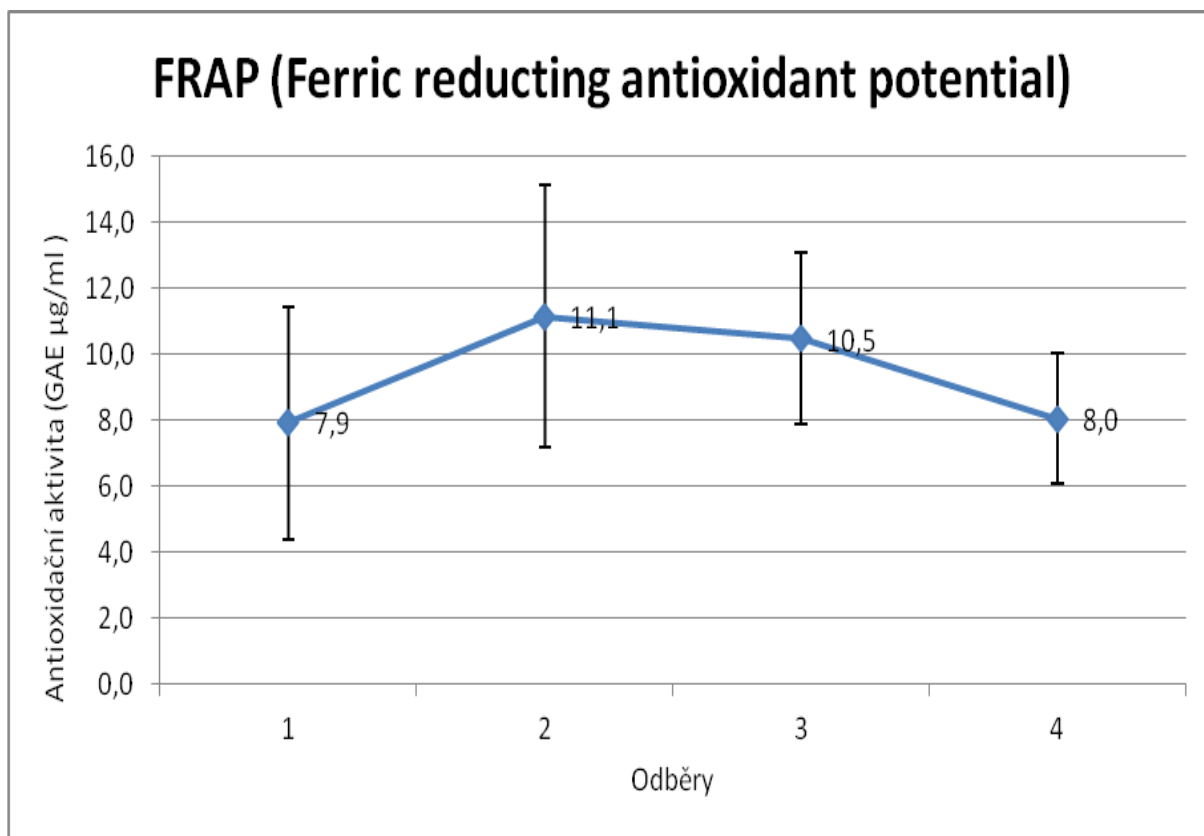
Graf č. 1 vyobrazuje výsledky 1. sk. kanců (suplementování kanci) a zhodnocení antioxidační aktivity pomocí metody FRAP. V grafu č. 1. vidíme, že se antioxidační aktivita ejakulátu zvýšila ihned při druhém pokusném odběru. Antioxidační kapacita se zvýšila i v třetím odběru, tento odběr byl statisticky průkazný ($P < 0,05$). Na konci pokusu došlo k mírnému poklesu antioxidační aktivity.

Použitá data pro výpočet nalezneme v příloze v Tab. č. 3.



Graf č. 1 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FRAP u suplementované skupiny

NESUPLEMENTOVANÁ SKUPINA



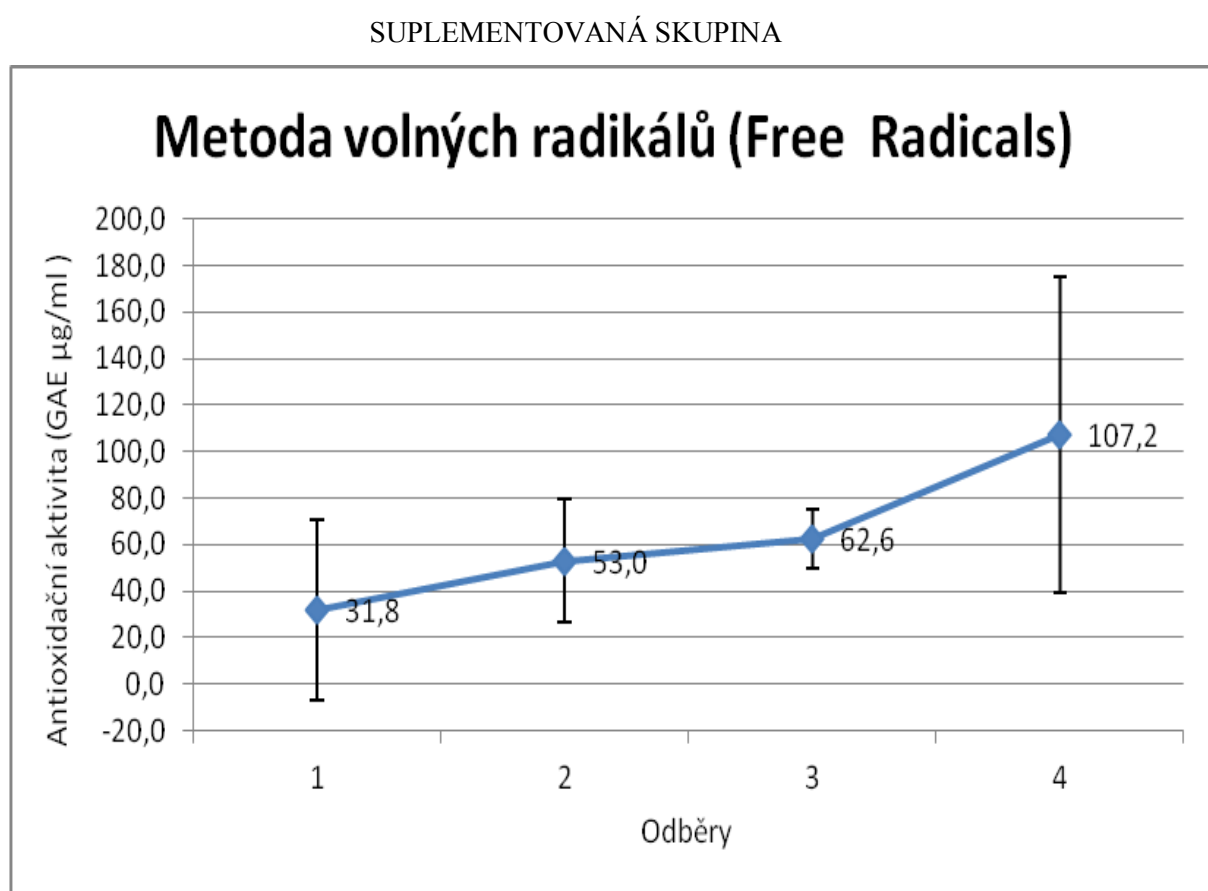
Graf č. 2 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FRAP u nesuplementované skupiny

Při porovnání skupiny prasat s příkrmem a bez příkrmu je vidět vliv prostředí. Nárůst antioxidační aktivity je při druhém odběru u obou skupin podobný. Konečný pokles při 4. odběru je u skupiny s doplněnou dietou nižší. Můžeme tedy usuzovat, že doplnění diety vitamínem C, E a selenem zlepší antioxidační potenciál organismu na zvyšování teplot v začátku letních měsíců. Tyto hodnoty však nejsou dostatečně statisticky průkazné.

FR

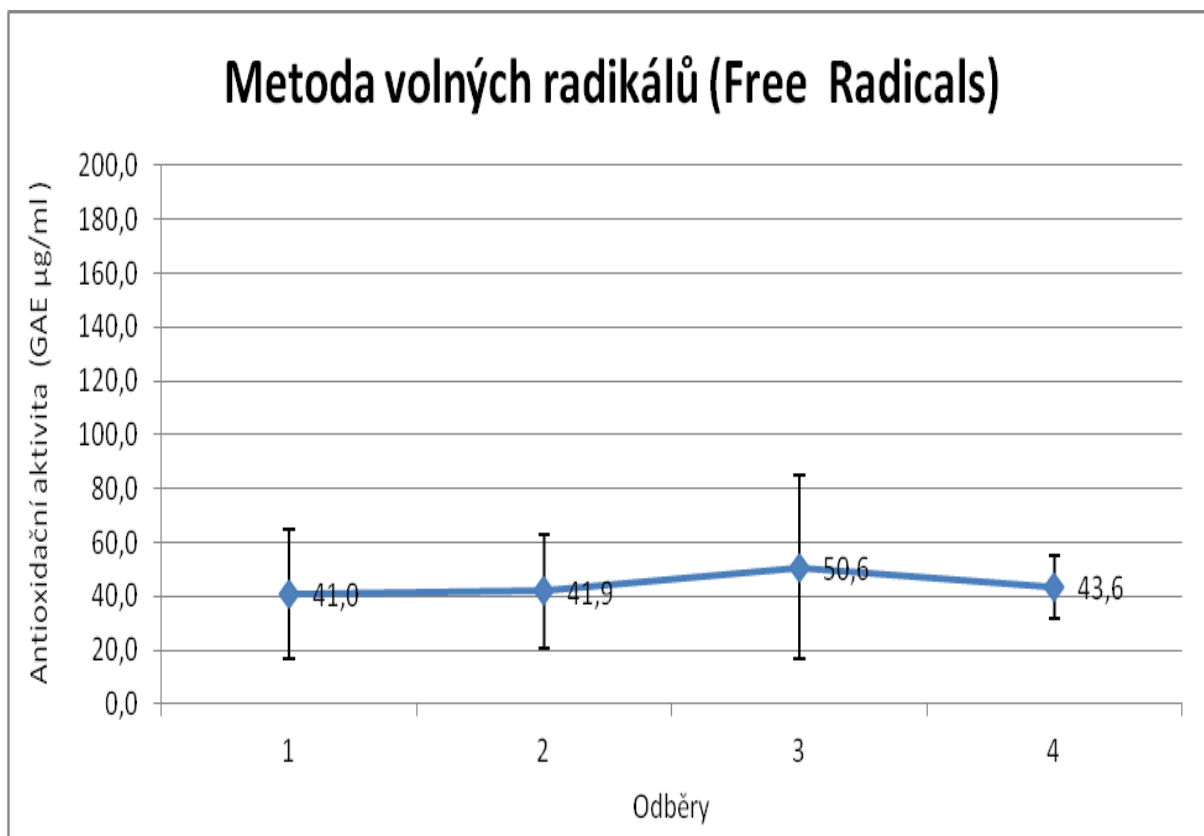
Graf č. 3 vyobrazuje výsledky 1. sk. kanců (suplementování kanci) a zhodnocení antioxidační aktivity pomocí metody volných radikálů. V grafu č. 3 vidíme, že se antioxidační aktivita ejakulátu zvyšovala při každém dalším odběru. Nejvyšší antioxidační aktivita byla sledována při 4. odběru. Na konci pokusu se antioxidační aktivita neprůkazně zvýšila o více než dvakrát oproti prvnímu odběru. Můžeme z grafu vidět, že podávání vitamínu C, E a selenu mělo v tomto případě (hodnocení metodou FR) příznivý vliv na zvyšování antioxidační aktivity ejakulátu.

Použitá data pro výpočet nalezneme v příloze v Tab. č. 3.



Graf č. 3 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FR u suplementované skupiny

NESUPLEMENTOVANÁ SKUPINA



Graf č. 4 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FR u nesuplementované skupiny

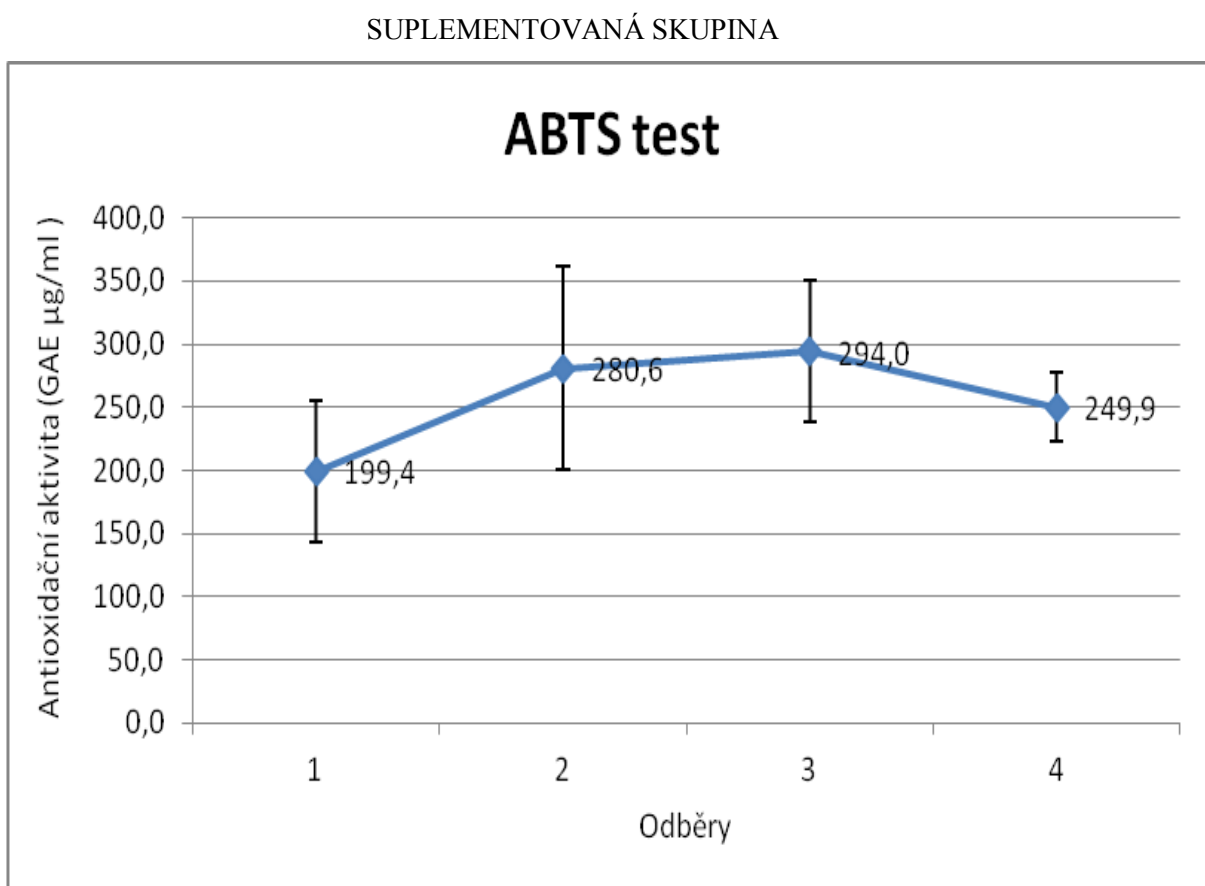
Při porovnání skupiny prasat s příkrmem a bez příkrmu je také vidět vliv prostředí. U obou skupin dochází k postupnému mírnému zvyšování antioxidační aktivity v jarních měsících. Suplementovaná skupina zvířat však při 4. odběru lépe reagovala zvýšením antioxidační aktivity. Můžeme předpokládat, že to může být způsobeno vlivem přídavku vitamínu C, E a selenu do krmiva. Tyto hodnoty však nejsou dostatečně statisticky průkazné.

ABTS test

Graf č. 5 vyobrazuje výsledky 1. sk. kanců (suplementovaní kanci) a zhodnocení antioxidační aktivity pomocí ABTS testu. V grafu č. 5 vidíme, že se antioxidační aktivita ejakulátu zvýšila ihned při druhém pokusném odběru, tento trend následoval i při třetím odběru a na konci pokusu došlo k poklesu antioxidační aktivity.

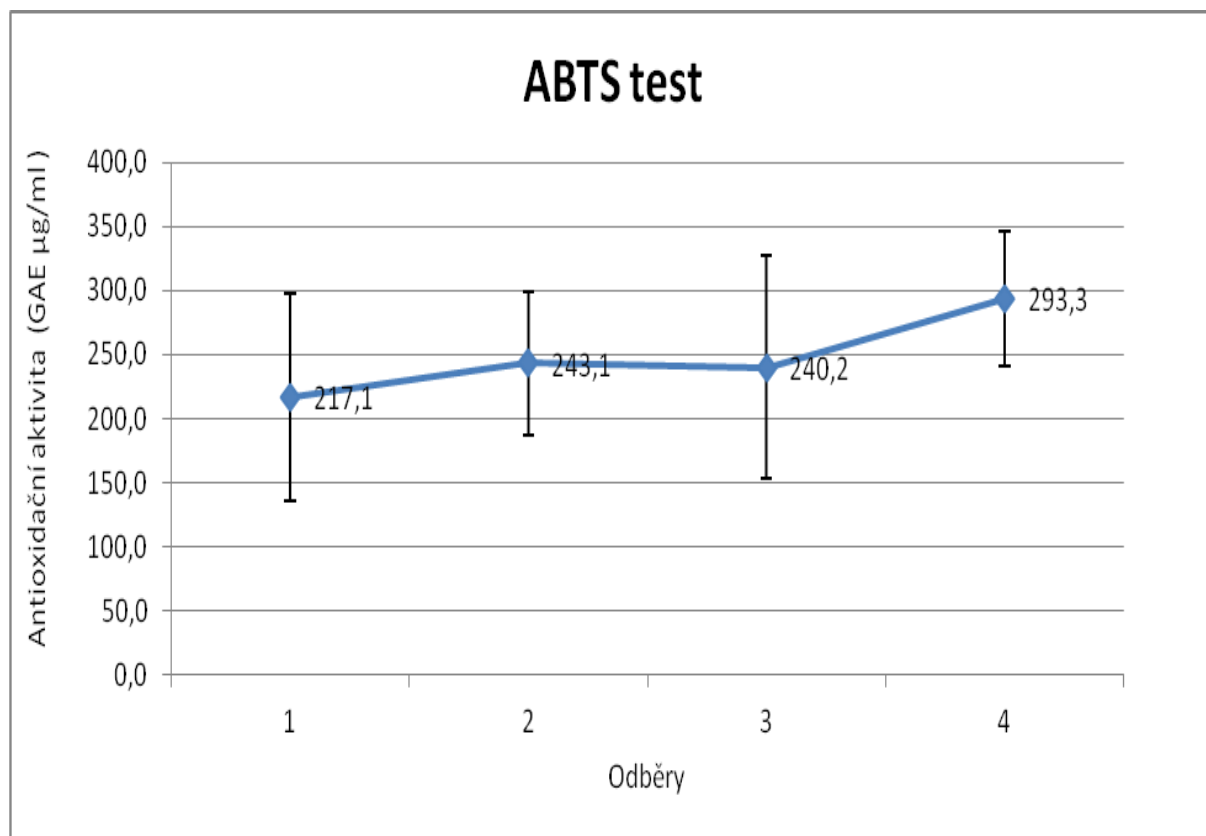
Na konci pokusu se antioxidační aktivita neprůkazně zvýšila o 25%.

Použitá data pro výpočet nalezneme v příloze v Tab. č. 3.



Graf č. 5 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí ABTS testu u suplementované skupiny

NESUPLEMENTOVANÁ SKUPINA



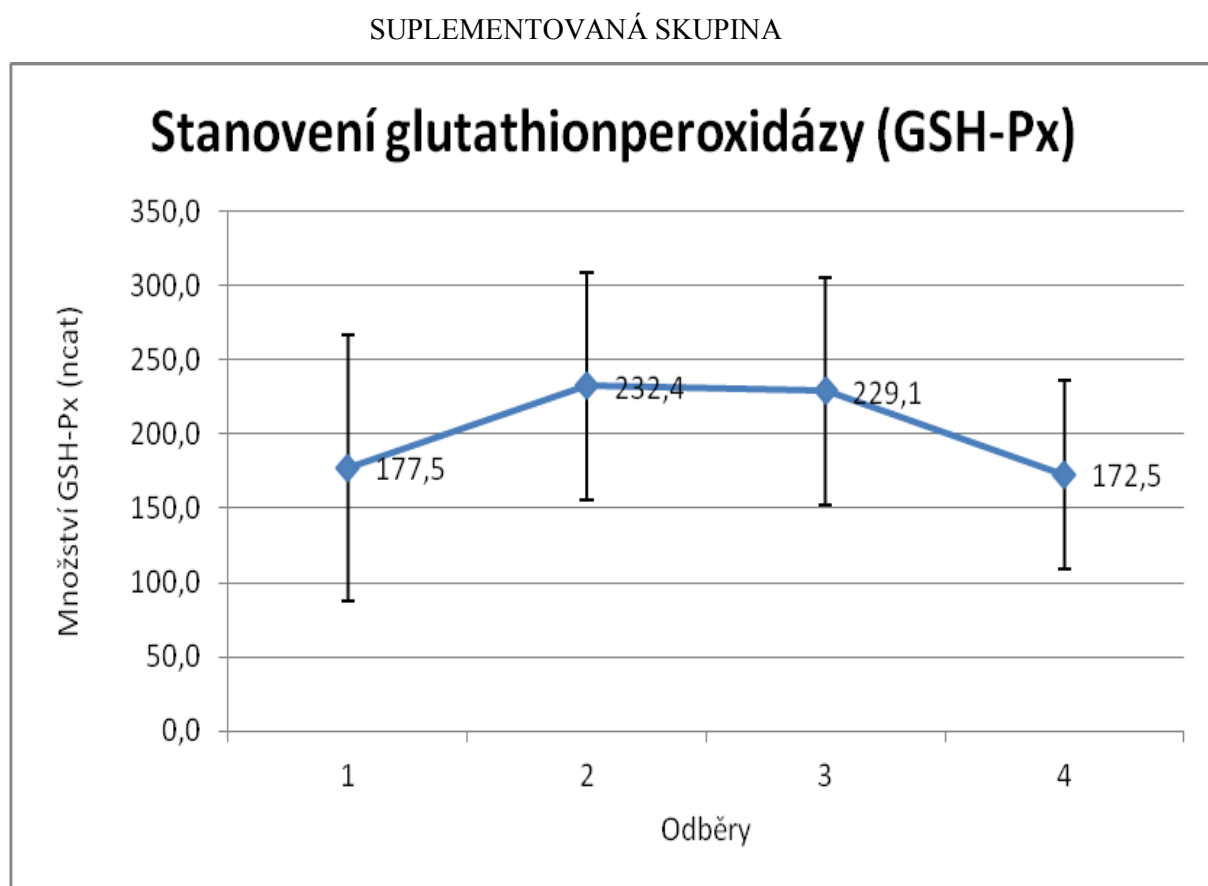
Graf č. 6 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí ABTS testu u nesuplementované skupiny

Při porovnání skupiny prasat s příkrmem a bez příkrmu je patrný vliv prostředí. U obou skupin prasat je viděn nárůst antioxidační aktivity. U suplementované skupiny je tento nárůst vyšší v 2. a 3. odběru. Opět můžeme usuzovat na vliv doplněné krmné dávky. U nesuplementované skupiny je ve 4. měření viditelný nárůst. Toto můžeme připisovat tomu, že zvířata bez příkrmu se hůře přizpůsobili zvyšujícím teplotám na začátku letních měsíců a zvyšují antioxidační aktivitu organismu, jako obranu před teplotním stresem. Dále to přičíst tomu, že jsme měli k dispozici velmi malou skupinu pokusných zvířat (n=5). Je to nejspíš dáno také individualitou organismu zvířat. Tyto hodnoty však nejsou dostatečně statisticky průkazné.

Stanovení glutathionperoxidázy

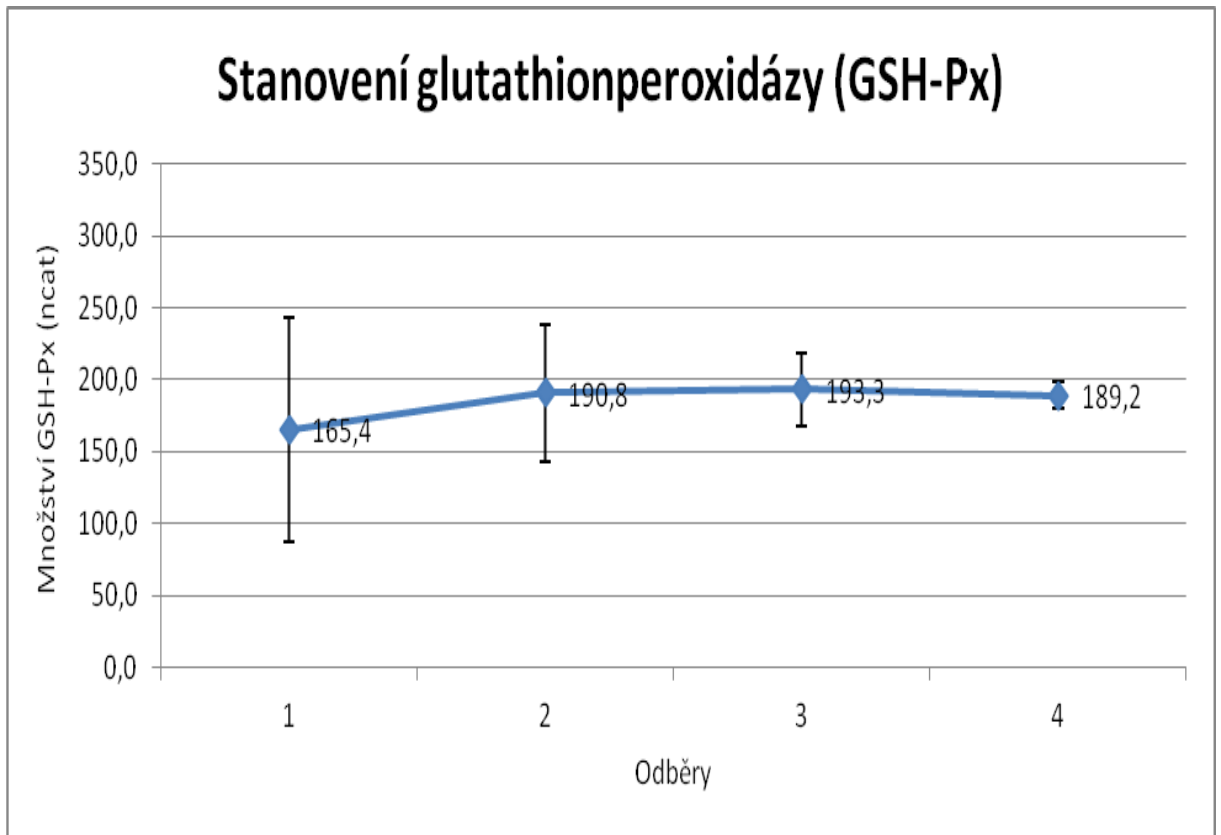
Graf č. 7 vyobrazuje výsledky 1. sk. kanců (suplementování kanci) a zhodnocení koncentrace glutathionperoxidázy. V grafu č. 7 vidíme, že hladina glutathionperoxidázy se zvýšila ve 2. a 3. odběru v průměru o 30%. Na konci pokusu se množství glutathionperoxidázy snížilo oproti prvnímu odběru o 3%. Nebyl zde zjištěn statisticky průkazný rozdíl.

Použitá data pro výpočet nalezneme v příloze v Tab. č. 3.



Graf č. 7 Stanovení množství glutathionperoxidázy u suplementované skupiny

NESUPLEMENTOVANÁ SKUPINA



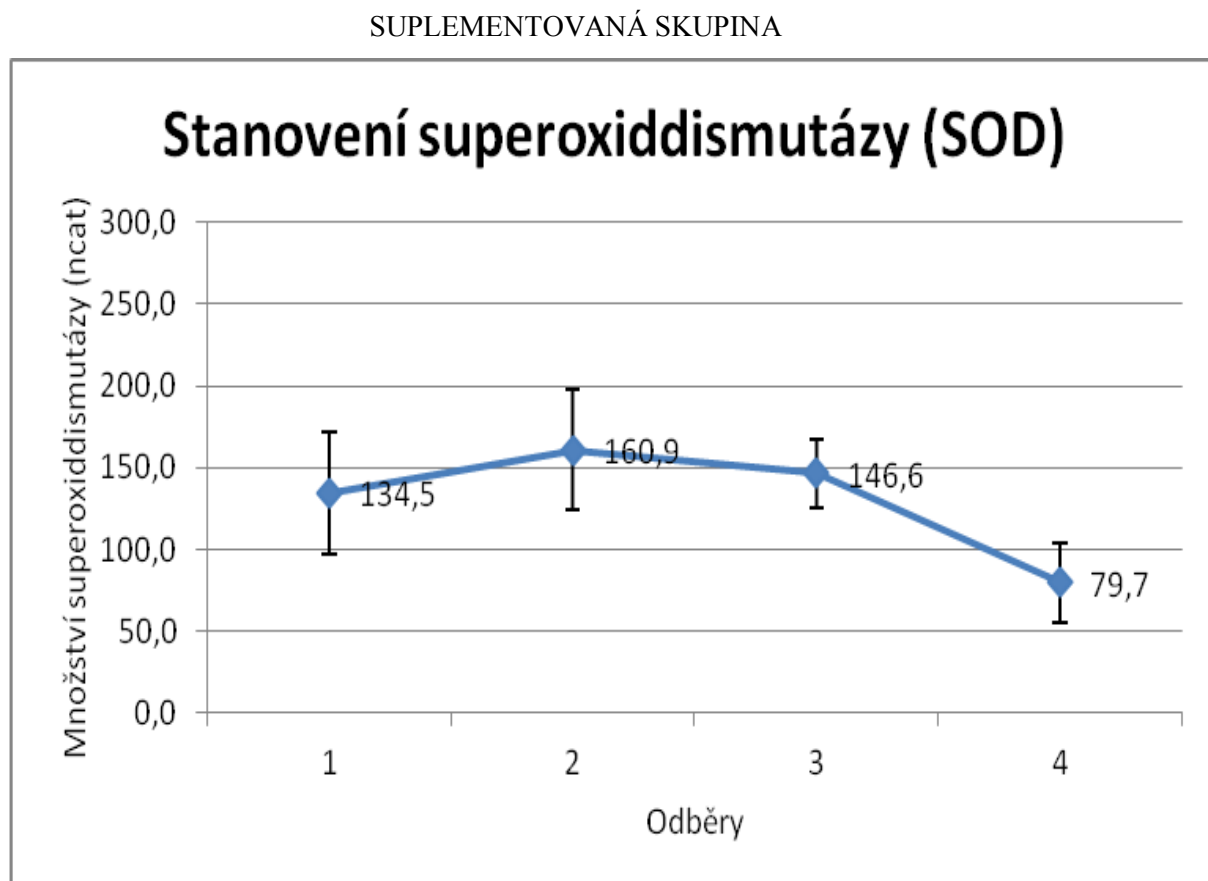
Graf č. 8 Stanovení množství glutathionperoxidázy u nesuplementované skupiny

Při porovnání skupiny prasat s příkrmem a bez příkrmu je vidět vliv příkrmu. U obou skupin prasat je viděn nárůst množství glutathionperoxidázy. U suplementované skupiny je tento nárůst vyšší v 2. a 3. odběru, můžeme usuzovat na vliv doplněné krmné dávky. U nesuplementované skupiny je nárůst v 2. 3. a 4. odběru pozvolnější. U nesuplementované skupiny ve 4. odběru nenastal pokles. Toto můžeme připisovat tomu, že zvířata bez příkrmu se hůře přizpůsobili zvyšujícím se teplotám na začátku letních měsíců a zvyšují antioxidační aktivitu organismu, jako obranu před teplotním stresem. Dále to můžeme přičíst tomu, že jsme měli k dispozici velmi malou skupinu pokusných zvířat (n=5). Je to nejspíš dáno také individualitou organismu zvířat. Tyto hodnoty však nejsou dostatečně statisticky průkazné.

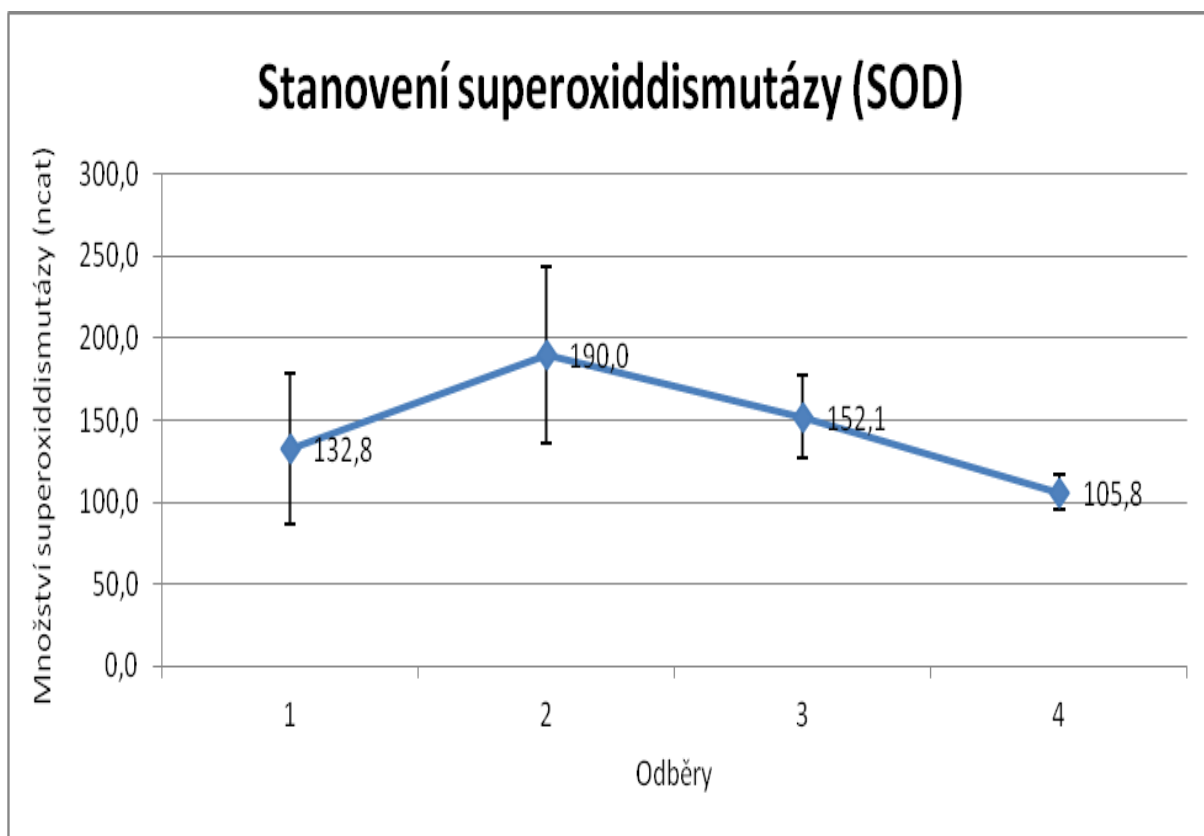
Stanovení superoxiddismutázy

Graf č. 9 vyobrazuje výsledky 1. sk. kanců (suplementování kanci) a zhodnocení stanovení superoxiddismutázy. V grafu č. 9 vidíme, že hladina superoxiddismutázy zvýšila ve 2. a 3. odběru. Na konci pokusu se množství superoxiddismutázy snížilo oproti prvnímu odběru o 41%. Nebyl zde zjištěn statisticky průkazný rozdíl.

Použitá data pro výpočet nalezneme v příloze v Tab. č. 3.



Graf č. 9 Stanovení množství superoxiddismutázy u suplementované skupiny



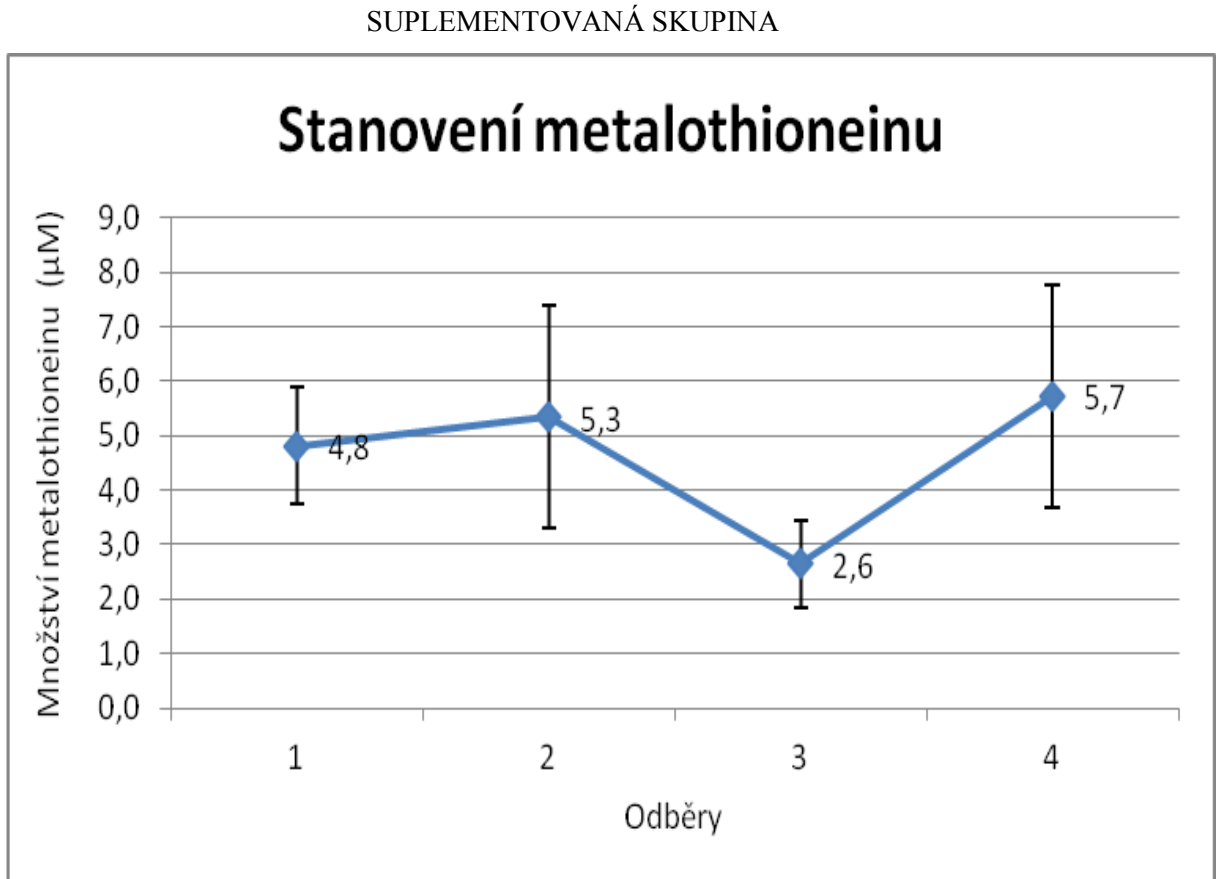
Graf č. 10 Stanovení množství superoxiddismutázy u nesuplementované skupiny

Při porovnání skupiny prasat s příkrmem a bez příkrmu je vidět vliv prostředí. U obou skupin je viditelná nárůst ve 2. a 3. měření hladiny SOD. Pokles u suplementované skupiny ve 3. odběru je nižší než u nesuplementované skupiny, přičítáme to vlivu krmné dávky. U 4. odběru je vidět pokles u obou skupin, u nesuplementované skupiny je pokles nižší, nejspíše vlivem individualit zvířat, tento trend vidíme i u předchozích metod ABTS a GSH-Px. Můžeme předpokládat, že je to způsobeno tím, že jsme měli k dispozici velmi malou skupinu pokusných zvířat ($n=5$). Tyto hodnoty však nejsou dostatečně statisticky průkazné.

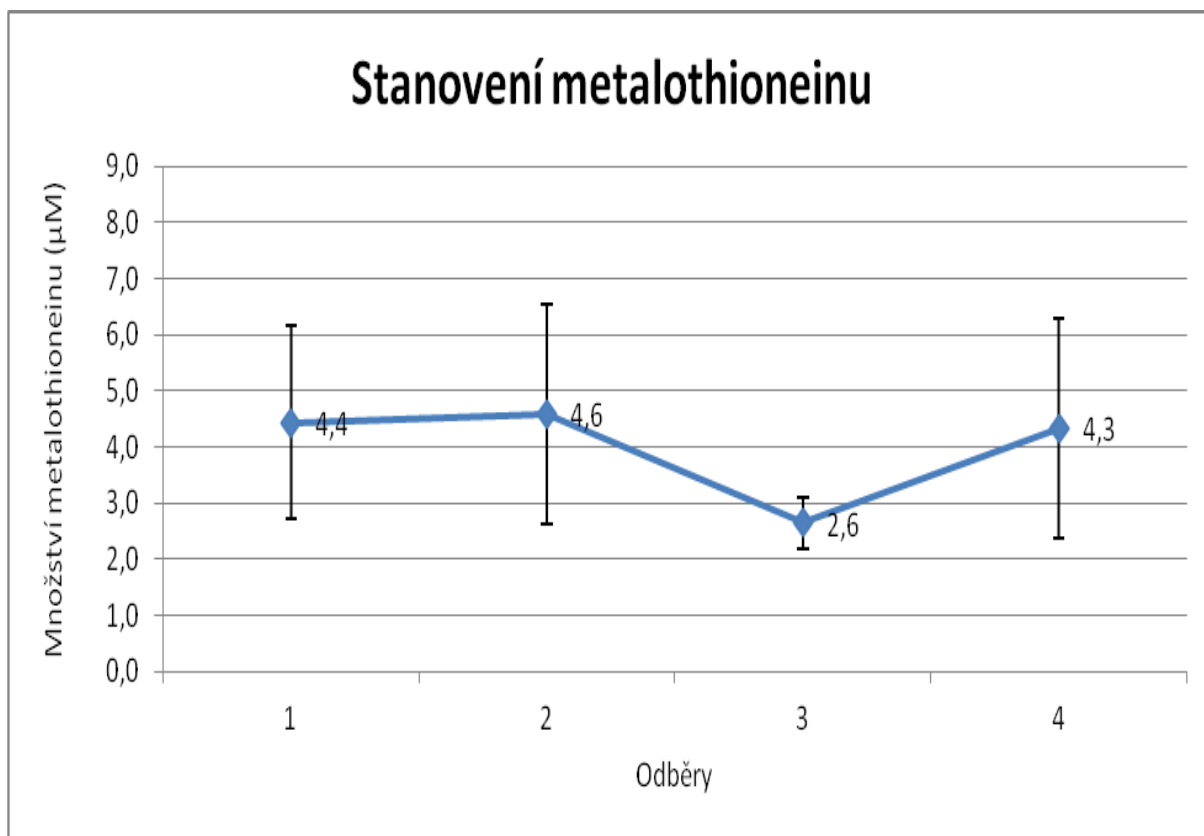
Stanovení metalothioneinu

Graf č. 11 vyobrazuje výsledky 1. sk. kanců (suplementovaní kanci) a zhodnocení stanovení metalothioneinu. V grafu č. 11 vidíme, že ve 2. a 4. odběru došlo ke zvýšení koncentrace metalothioneinu. Ve 4. odběru bylo zvýšení oproti 1. odběru o 18%.

Použitá data pro výpočet nalezneme v příloze v Tab. č. 3.



Graf č. 11 Stanovení množství metalothioneinu u suplementované skupiny



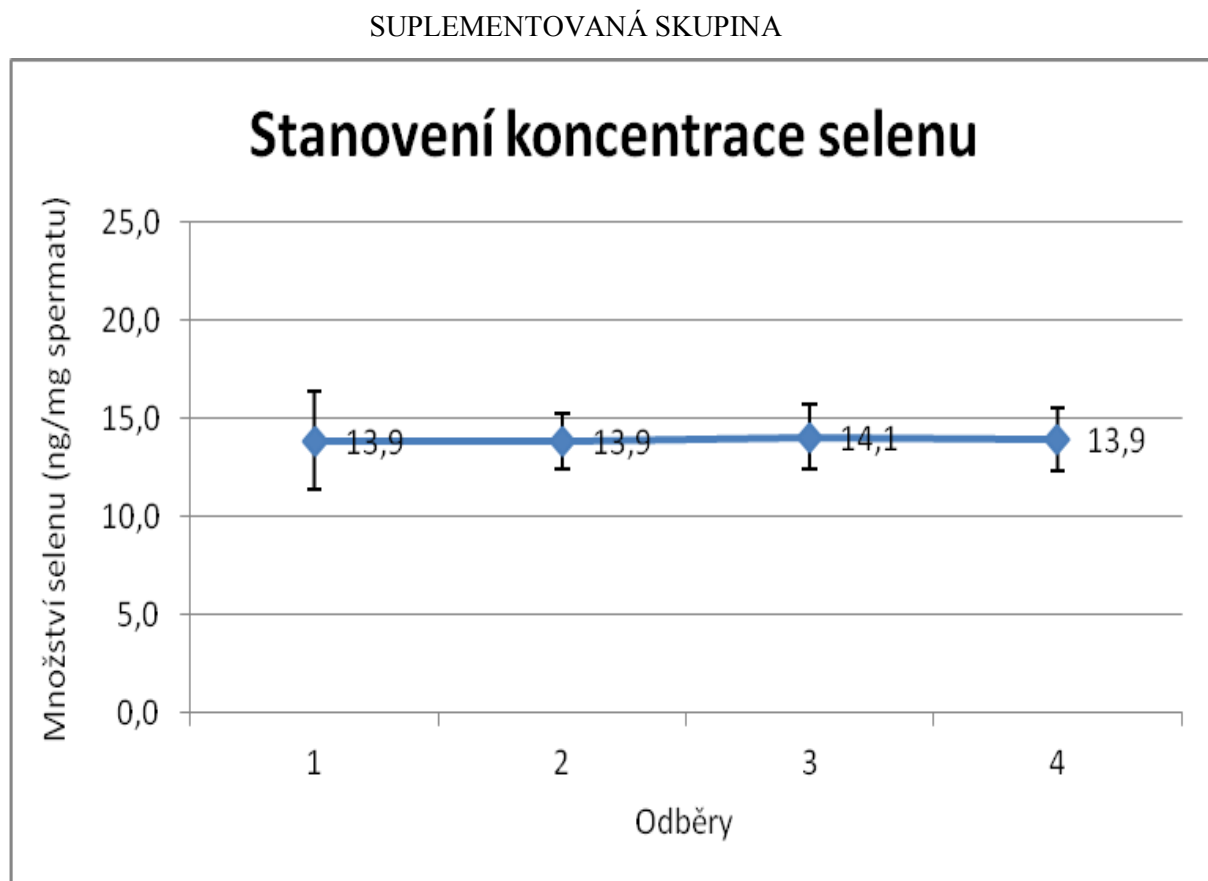
Graf č. 12 Stanovení množství metalothioneinu u nesuplementované skupiny

Při porovnání skupiny prasat s příkrmem a bez příkrmu není zřejmý vliv prostředí ani vliv příkrmu u suplementované skupiny. Křivka hodnot je přibližně stejná, rozdíly mezi jednotlivými měřeními v daných skupinách jsou podobné. Můžeme říci, že v tomto případě suplementace krmiva nijak výrazně neovlivnila hodnoty metalothioneinu a ani tyto výsledky nejsou statisticky průkazné stejně jako u předchozích metod.

Stanovení koncentrace selenu

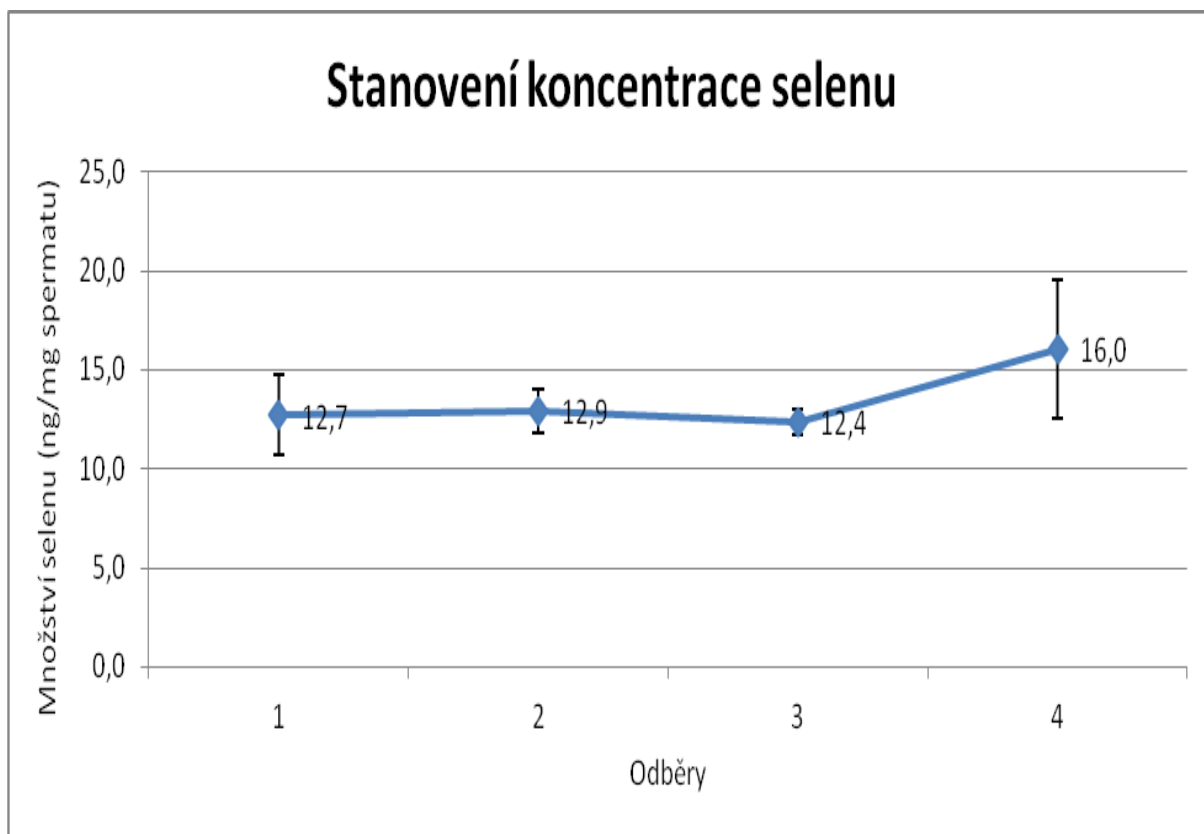
Graf č. 13 vyobrazuje výsledky 1. sk. kanců (suplementování kanci) a zhodnocení stanovení koncentrace selenu. V grafu č. 13 vidíme, že při podávání selenu v dané dávce se koncentrace selenu v ejakulátu výrazně neměnila. Pouze ve třetím odběru došlo k mírnému zvýšení pouze o 1,4%.

Použitá data pro výpočet nalezneme v příloze v Tab. č. 3.



Graf č. 13 Stanovení koncentrace selenu u suplementované skupiny

NESUPLEMENTOVANÁ SKUPINA



Graf č. 14 Stanovení koncentrace selenu u nesuplementované skupiny

Při porovnání měření jsme nezaznamenali vliv prostředí ani vliv suplementované krmné dávky. Křivka hodnot je přibližně stejná, rozdíly mezi jednotlivými měřeními v daných skupinách jsou podobné. U nesuplementované skupiny byl ve 4. měření viditelný nárůst hladiny selenu, což přisuzujeme opět pouze individualitám organismu zvířat. Vzhledem k tomu, že pokus byl proveden i v letních měsících (především 4. odběr), je možné počítat s výskytem teplotního stresu u zvířat. Tento teplotní stres mohl ovlivnit naše výsledky. Ani zde nejsou naměřené hodnoty statisticky průkazné.

10 DISKUZE

Významem selenu a dalších doplňků krmiv prasat se zabývala již celá řada studií. Naše experimentální skupina zvířat dostala přídavek selenu v organické formě jako selenomethionin, vitamínu E (alfa-tokoferol) a vitamínu C (kyselina askorbová). Pokus byl zahájen na jaře a vrcholil v letním období, kdy byl zaznamenán nárůst teplot, ale sledováním teploty stáje nebyl narušen welfare zvířat.

Z prací zabývajících se působením selenu na ejakulát kanců můžeme zmínit práci KOŁODZIEJ a JACYNO (2005), kteří sledovali vliv selenu na reprodukční výkonnost mladých kanců. Při chovu kanců bylo prokázáno, že vyšší hladiny organického selenu a vitamínu E v krmné dávce (0,5 mg Se + 60 mg vitamínu E ve srovnání s 0,2 mg Se + 30 mg vitamínu E/ kg) zlepšují kvalitu spermatu. Kanci z experimentální skupiny vykazovali významně vyšší koncentraci spermií ve srovnání s kontrolní skupinou. Avšak aktivita GSH-Px byla vyšší v kontrolní skupině pokusu. V našem případě aktivita GSH-Px narostla naopak u suplementované skupiny ve 2. a 3. odběru o 30 % a můžeme usuzovat na vliv doplněné krmné dávky. U nesuplementované skupiny je nárůst v 2., 3. a 4. odběru pozvolnější. U nesuplementované skupiny ve 4. odběru nenastal pokles. Toto můžeme připisovat tomu, že zvířata bez příkrmu se hůře přizpůsobila zvyšujícím se teplotám na začátku letních měsíců a zvyšují antioxidační aktivitu organismu, jako obranu před teplotním stresem. Také můžeme říci, že i pomocí dalších metod určení antioxidační aktivity organismu (FRAP, FR, ABTS test) a pomocí stanovení superoxiddismutázy a metalothioneinu jsme došli k závěru, že suplementace diety zvýší antioxidační aktivitu oproti kontrolní skupině zvířat, především v koncových odběrech, kdy suplementovaná skupina vykazovala nižší pokles aktivity.

Závěry LOVERCAMPA (2013) ukazují, že dlouhodobé doplňování bazální diety organickým nebo anorganickým selenem neovlivní množství spermatu nebo kvalitu spermií u čerstvého semene, ani nemá žádné pozitivní účinky na skladované sperma. Suplementace neovlivnila objem, koncentraci, počet všech spermií v ejakulátu, motilitu spermií, progresivní motilitu, morfologii, peroxidaci lipidů, ani aktivitu glutathionperoxidázy. Suplementace diety organickým zdrojem selenu, ve srovnání s anorganickým zdrojem, pozitivně ovlivnila pohyblivost spermií u kanců vystavených častému inseminačnímu režimu a schopnost spermií zůstat životaschopnými během dlouhodobého skladování. V našem případě doplnění organického selenu mělo vliv na

aktivitu GSH-Px, která narostla u suplementované skupiny ve 2. a 3. odběru o 30 % a můžeme usuzovat na vliv doplněné krmné dávky.

Při pokusech s krmením organického selenu a kyseliny listové na zlepšení kvality spermatu, antioxidační stav a reprodukční znaky králíků během tepelného stresu se ukázalo, že organický selen a kyselina listová se zdají být zásadní pro reprodukční výkonnost králíků pod silným stresem z horka v průběhu letní sezóny. Zlepšila se kvalita spermatu, biochemické znaky seminální plazmy a antioxidační status (KAMEL, 2012). Můžeme říci, že vzhledem k tomu, že poslední odběry našeho experimentu probíhaly v letních měsících a u suplementované skupiny byl v tomto odběru většinou pokles aktivity nižší, než u kontrolní skupiny, může mít doplnění diety organickým selenem, vitamínem E a C vliv na zlepšení antioxidační aktivity organismu zvířat.

YOUSEF (2003) zjišťoval účinky suplementace kyseliny askorbové, vitamínu E a jejich kombinace v pitné vodě na vlastnosti spermatu, peroxidaci lipidů a enzymy v semenné plazmě dospělých samců králíků. Ve výsledku se zvýšil objem ejakulátu, koncentrace spermatu, celková produkce spermatu, index pohyblivosti spermií, počáteční koncentrace vodíkových iontů (pH), a počáteční koncentrace fruktózy ve spermatu. U léčených zvířat se významně snížil počet abnormálních spermií. Výsledky z této studie vyplývá, že suplementace pitné vody antioxidanty - kyselinou askorbovou, vitamínem E a jejich kombinací snižuje tvorbu volných radikálů a může zlepšit kvalitu králíčího spermatu. Doplnění diety vitamínem E a C, může mít také u kanců pozitivní dopad na antioxidační aktivitu organismu zvířat. V našem experimentu jsme při porovnávání hladiny antioxidantů několika metodami došli k závěru, že suplementovaná skupina zvířat zvýšila svou antioxidační aktivitu. Ve většině pokusů došlo k nárůstu aktivity ihned při druhém odběru a koncový čtvrtý odběr vykazoval nižší pokles než u nesuplementované skupiny.

Z novějších prací se působením antioxidantů na zmražené sperma zabývá např. SARIÖZKAN (2014). Tvrdí, že antioxidanty snižují u rozmraženého spermatu poškození akrozomů a snižují počet abnormálních spermií. V našem pokusu došlo ke zvýšení antioxidační aktivity, tedy můžeme předpokládat, že při hodnocení kvality ejakulátu bychom mohli dojít k pozitivním výsledkům, co se morfologických ukazatelů týče.

Studie KUMAR a kol. (2014) byla provedena za účelem zkoumání účinků suplementace zinku a selenu na kvalitu spermatu dvanácti koz s prokázanou plodností. Experimentální zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin po šesti bez

suplementace (kontrolní skupina), nebo se suplementací 150 mg/L síranu zinečnatého a 0,50 mg/L, selenanu sodného (testovací skupina). Sperma bylo odebíráno ve dnech 0, 60, 75, 90 a 105. V kontrolní skupině se neprokázala žádná významná změna, nebyla pozorována změna kvality spermatu v průběhu sledovaného období. V testované skupině se kvalita spermatu zlepšila, významně ($P < 0,05$) se zvýšil objemu ejakulátu, progresivní pohyblivosti, počet spermií, procento živých spermií, akrozomálního integrity a poklesl počet abnormálních spermií při odběru v 60. dni experimentu. Významné ($P < 0,05$) zvýšení motility bylo pozorováno jen při odběru ve 105. dni ve srovnání s odběrem 0. dne. Usuzují tedy, že suplementace zinku a selenu může zlepšit kvalitu spermatu u koz. Doplnění selenu v našem případě výrazně nezměnilo koncentraci selenu v ejakulátu u kanců v průběhu experimentu. Vzhledem k tomu můžeme usuzovat, že stálá hladina selenu v souvislosti se zjištěnou zvýšenou schopností antioxidační aktivity bude mít příznivý dopad na kvalitu ejakulátu, antioxidační kapacitu a aktivitu enzymů.

Ve studii PETRUJKIĆ (2014) bylo cílem zjistit, jak doplnění diety pomocí anorganického a organického selenu ovlivňuje koncentrace selenu a glutathion peroxidázy v krvi a spermatu pohlavně zralých kanců. Bylo použito 24 prasat (plemena Large White, Landrace, Pietrain a Duroc) optimálního chovného věku (v průměru 2,5 rok staré). Studie trvala 90 dnů. Tyto kanci byli náhodně rozděleni do jedné ze tří dietních skupin: T1 = kontrolní; bez přídavku selenu ($n = 8$ kanců), T2 = přidáno 0,3 mg/L anorganického selenu (seleničitan sodný, Microgran® Se 1% BMP) - ($n = 8$ kanců), a T3 = přidáno 0,3 mg/L organického selenu (selenem obohacené kvasnice, sel-Plex 2000®) - ($n = 8$ kanců). Koncentrace selenu byla stanovena v krvi a spermatu, zatímco aktivita glutathion peroxidázy (GSH-Px) byla měřena v krevní plazmě a spermatu. Za účelem měření aktivity GSH-Px v spermatu, byla provedena reaktivace enzymatické aktivity GSH-Px. Stanovená koncentrace selenu v krvi byla nejnižší v nesuplementované skupině kanců. GSH-Px aktivita v krevní plazmě byla vyšší u kanců krmených organickým selenem než u kanců bez suplementovaného selenu. Zatímco doplnění seleničitanu sodného výrazně zvýšilo PHGPx aktivitu kančího spermatu. Nejvyšší koncentrace selenu ve spermatu na konci studie byla stanovena ve skupině kanců suplementovaných organickým selenem, o něco nižší byla u kanců suplementovaných anorganickým selenem, a nejnižší ve skupině kanců bez suplementovaného selenu. Jediný podstatný rozdíl mezi doplněním seleničitanu a selenu obohaceným kvasnicemi byl zaznamenán v koncentraci selenu ve spermatu. Doplnění

selenu ovlivnilo kvalitu spermatu kvality a organický selen zlepšil progresivní pohyblivost spermií a zvýšil jejich odolnosti v hypoosmotický a tepelných testech. Schopnost uchování krátkodobě konzervovaného spermatu byla zlepšena přidáním organického selenu. Organický selen spolu s vitamínem C a E v našem experimentu také pozitivně ovlivnil sledované ukazatele. Při porovnání skupiny prasat s příkrmem a bez příkrmu byl poznat vliv příkrmu. U suplementované skupiny je nárůst GSH-Px vyšší ve 2. a 3. odběru o 30%, můžeme usuzovat na vliv doplněné krmné dávky. U nesuplementované skupiny je nárůst GSH-Px ve 2. 3. a 4. odběru pozvolnější. U nesuplementované skupiny ve 4. odběru nenastal pokles. To můžeme připisovat tomu, že zvířata bez příkrmu se hůře přizpůsobila zvyšujícím teplotám na začátku letních měsíců a zvyšují antioxidační aktivitu organismu, jako obranu před teplotním stresem. Dále to můžeme přičíst tomu, že jsme měli k dispozici velmi malou skupinu pokusných zvířat (n=5). Je to nejspíš dáno také individualitou organismu zvířat. Tyto hodnoty však nejsou dostatečně statisticky průkazné.

Z letošních prací můžeme ještě zmínit GIARETTA a kol. (2015), jehož cílem bylo zhodnotit, jak doplnění redukovaného glutathionu (GSH) a kyseliny l-askorbové (KA) ovlivní kvalitativní parametry rozmraženého kančího spermatu. Za tímto účelem byly použity vzorky spermatu 12 ejakulátů pocházejících od 12 kanců. Každý ejakulát byl rozdělen do sedmi stejných částí, do kterých bylo přidáno 5 mM GSH a 100 μ M KA a to buď samostatně, nebo společně ve dvou různých krocích. Byly hodnoceny různé parametry spermií (hladiny volných zbytků cysteinu ve spermatu, životaschopnost spermatu, akrozomální membránová integrita, úroveň ROS (reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku) a celková motilita. Tyto parametry byly hodnoceny před zmrazením a ve 30. a 240. minutě po rozmrazení. Jak GSH tak KA výrazně zlepšily cryotoleranci kančích spermií, pokud byly odděleně přidány do médií. Avšak největší zlepšení bylo zaznamenáno, když bylo doplněno 5 mM GSH a navíc 100 μ M KA. Toto zlepšení bylo pozorováno u životaschopnosti spermií a akrozomální integrity, pohyblivosti spermií a nukleoproteinové struktury. Tato kombinace výrazně snížila intracelulární hladiny peroxidu, ale neměla žádný dopad na úroveň superoxidu. Podle výsledků můžeme konstatovat, že doplnění GSH a KA kombinovaně, má příznivý vliv na rozmražené kančí sperma. V pokusu, který jsme zkoumali, jsme došli také k závěru, že podávání kyseliny askorbové (v kombinaci s vitamínem E a selenem), zvýší antioxidační status organismu zvířat a tím tedy může napomoci k zachování či dokonce zlepšení kvality ejakulátu.

Další aktuální studie (MARTINS, 2015) hodnotila účinky krmení organickým selenem na morfologii spermií, pohyblivost, membránovou integritu a lipidovou peroxidaci a také na spermatickou ATP a fosfolipidový hydroperoxid a GSH-Px v čerstvém spermatu dospělých kanců. Dvanáct kanců bylo rozděleno do tří skupin: Kontrolní skupina; 0,3 mg/L seleničitanu sodného, anorganická skupina; 0,5 mg/L seleničitanu sodného a organická skupina; 0,5 mg/L selenem obohacenými kvasnicemi po dobu 11 týdnů. Organická forma prezentovala vyšší celkový počet spermií ($P < 0,05$) ve srovnání s anorganickou skupinou. Nicméně nebyl zaznamenán žádný rozdíl, pokud jde o objem, koncentraci spermií, membránový potenciál, mitochondriální ATP test a koncentraci selenu v semenném a krevním objemu. Rovněž nebyl pozorován žádný rozdíl v motilitě, morfologii a membránové peroxidaci. PHGPx (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) byla ovlivněn ($P < 0,05$) pouze v organické suplementaci. Shrňme-li výsledky, organický selen neovlivnil žádnou z analyzovaných klíčových vlastností ve spermatu, s výjimkou PHGPx a celkového počtu spermií. Taktéž můžeme porovnat, že i u nás organický selen (v podobě selenomethioninu) způsobil nárůst množství GSH-Px oproti kontrolní skupině. Při většině testů se zvýšila hladina zkoumaných antioxidantů a celkově zvířata lépe reagovala na teplotní stres vlivem začátku letních měsíců.

SHI (2010) zaměřil svůj výzkum na účinky nanoselenu na testikulární ultrastrukturu, kvalitu spermatu a GSH-Px aktivitu u kozlů. Výsledky ukázaly, že testikulární úroveň Se, spermatická GSH-Px a aktivita ATP ve skupině suplementované nanoselenem se výrazně zvýšily. Kvalita spermatu (objem, hustota, pohyblivost a pH) nebyla ovlivněna. Byla poškozena membrána spermií a vyskytly se abnormality v mitochondriích spermií. Skupině kozlů byla podávána směs suplementovaná selenem v dávce 0,3 mg/kg. Kontrolní skupina kozlů přijímala nesuplementovanou krmnou směs (pouze s přirozeným množstvím selenu 0,06 mg/kg). Pokus trval celkem 12 týdnů. Vidíme, že i zde doplnění selenu ovlivnilo příznivě spermatickou GSH-Px, k čemuž došlo i v našem případě. Nesuplementovaná skupina se hůře přizpůsobovala změnám teplot za začátku léta. Suplementovaná skupina tedy dosáhla průměrného zvýšení antioxidační aktivity během 2. a 3. odběru a přesto, že při posledním odběru došlo k mírnému poklesu, nebyl tak výrazný, jako u nesuplementované skupiny.

Několik studií zabývajících se experimenty se selenem provedli také MARIN-GUZMAN a kol. (1997, 2000). V roce 1997 hodnotili vliv selenu v doplnění diety kanců na kvalitu ejakulátu, koncentraci spermií a aktivitu GSH-Px. Pro experiment bylo

použito 192 kanců (kříženci Landrace x Yourkshire x Duroc), kteří byli rozděleni do dvou skupin. První kontrolní skupině zvířat nebyl selen v krmné dávce navýšen. Pokusné skupině byl přidáván do krmné dávky organický selen v koncentraci 0,5 mg/kg krmné směsi (kvasnice obohacené selenem). Pokus byl prováděn po dobu 16 týdnů. Suplementované skupině kanců se zvýšila koncentrace spermií o 15 % a aktivita GSH-Px vzrostla o 114 % v porovnání s kontrolní skupinou kanců ($P < 0,01$), u seminální plazmy o 306,5 % ($P < 0,01$) a spermie měly o 68,7 % vyšší aktivitu v porovnání s kontrolní skupinou kanců. Koncentrace selenu byla v celkovém ejakulátu u pokusné skupiny zvířat více než čtyřikrát vyšší ($P < 0,01$). Dle výsledků autoři usoudili, že se množství GSH-Px u kanců v seminální plazmě zvyšuje s věkem pokusných zvířat. V našem pokusu bylo výsledkem zjištění, že u suplementované skupiny také vzrostla aktivita GSH-Px ve 2. a 3. odběru v průměru o 30%. Na konci pokusu se množství glutathionperoxidázy snížilo oproti prvnímu odběru o 3%. Při porovnání měření jsme nezaznamenali vliv prostředí ani vliv suplementované krmné dávky. U nesuplementované skupiny byl ve 4. měření viditelný nárůst hladiny selenu, což přisuzujeme opět pouze individualitám organismu zvířat. Vzhledem k tomu, že pokus byl proveden i v letních měsících (především 4. odběr), je možné počítat s výskytem teplotního stresu u zvířat. Tento teplotní stres mohl ovlivnit naše výsledky. Ani zde nejsou naměřené hodnoty statisticky průkazné.

V roce 2000 navázali s podobným experimentem, kdy doplňovali prasatům do krmné směsi selen o koncentraci 0,5 mg/kg KS v organické formě a kontrolní skupina měla směs bez přídavku selenu. Celkem bylo do pokusu zařazeno 61 kanců a selen byl dodáván již od 28. dne věku. Hlavním cílem bylo pozorování, jaký bude mít tato krmná sestava vliv na spermatogenezi v průběhu života kanců. V 5. a 6. měsíci byl u suplementovaných prasata pozorován zvýšený počet spermií, avšak nebyl statisticky průkazný. Průkazné zvýšení koncentrace spermií bylo prokázáno až v 9. měsíci ($P < 0,05$) a 18. měsíci ($P < 0,01$) u suplementované skupiny.

Pro zajímavost můžeme zmínit i pokus s účinkem suplementace selenu a vliv na kvalitu ejakulátu u lidí. Tento problém zkoumali ve své studii SCOTT a kol. (1998). Pokus byl proveden na 69 pacientech, kteří byli rozděleni do tří skupin. První skupina byla kontrolní, druhá skupina přijímala dietu obohacenou selenem a poslední skupina přijímala dietu s přídavkem selenu, vitamínu A, C a E. Pokus trval celkem 3 měsíce. U obou skupin doplněných selenem se zvýšila plazmatická koncentrace selenu

a pohyblivost spermií. Koncentrace spermií nebyla ovlivněna. Schopnost vitaminů ovlivnit výsledky nebyla prokázána.

11 ZÁVĚR

V experimentu, který jsme provedli, byly sledovány biochemické ukazatele ejakulátu (antioxidační kapacita, koncentrace selenu, aktivita enzymů) kanců plemene Duroc. V průběhu pokusu jsme zaznamenávali data z laboratorních rozborů semene. Vzorky byly hodnoceny metodami FRAP, FR, ABTS test, a byla stanovena hladina glutathionperoxidázy, superoxiddismutázy, metalothioneinu a koncentrace selenu.

Kanci byli krmeni 3,3 kg základní krmné směsi a byli rozděleni do dvou skupin. První experimentální skupině kanců bylo do krmné dávky přidáváno 0,5 mg selenu (selenomethionin); 70 mg vitamínu E (alfa-tokoferol) a 350 mg vitamínu C (kyselina askorbová) na kilogram diety. Druhá skupina kanců sloužila jako kontrolní. Této skupině nebylo množství selenu, vitamínu E a C navýšeno.

Při hodnocení metodou FRAP se antioxidační kapacita se významně zvýšila ve třetím odběru ($P < 0,05$). Při hodnocení metodou FR se antioxidační aktivita ejakulátu zvyšovala při každém dalším odběru. Nejvyšší antioxidační aktivita byla sledována při 4. odběru. Na konci pokusu se antioxidační aktivita neprůkazně zvýšila více než dvakrát oproti prvnímu odběru. Pomocí ABTS testu jsme došli k výsledkům, kdy se antioxidační aktivita ejakulátu zvýšila ihned při druhém pokusném odběru, tento trend následoval i při třetím odběru a na konci pokusu se antioxidační aktivita neprůkazně zvýšila o 25%. Stanovení glutathionperoxidázy ukázalo, že hladina glutathionperoxidázy se zvýšila ve 2. a 3. odběru v průměru o 30%. Na konci pokusu se množství glutathionperoxidázy snížilo oproti prvnímu odběru o 3%. Při stanovení superoxiddismutázy se její hladina zvýšila ve 2. a 3. odběru. Na konci pokusu se množství superoxiddismutázy snížilo oproti prvnímu odběru o 41%. Pomocí stanovení metalothioneinu jsme zjistili, že ve 2. a 4. odběru došlo ke zvýšení jeho koncentrace. Ve 4. odběru bylo zvýšení oproti 1. odběru o 18%. Nakonec, při stanovení koncentrace selenu, jsme zaznamenali, že při podávání selenu v dané dávce se koncentrace selenu v ejakulátu výrazně neměnila. Pouze ve třetím odběru došlo k mírnému zvýšení pouze o 1,4%.

Můžeme tedy usuzovat, že doplnění diety vitamínem C, E a selenem zlepší antioxidační potenciál organismu na zvyšování teplot v začátku letních měsíců. Můžeme předpokládat, že sledovaný pokles aktivity při koncových odběrech by bez suplementace mohl být ještě větší. Můžeme usuzovat, že zvířata bez příkrmu se hůře

přizpůsobila zvyšujícím se teplotám na začátku letních měsíců a ve většině případů sama zvyšují antioxidační aktivitu organismu, jako obranu před teplotním stresem. Což je ale také závislé na individualitě organismu zvířat. Doplnění diety jim tedy pomůže zlepšit antioxidační aktivitu organismu. Do sledovaných veličin, které suplementace diety nijak výrazně neovlivnila, můžeme zařadit metalothionein a hladinu selenu. Křivka hodnot byla přibližně stejná, rozdíly mezi jednotlivými měřeními v daných skupinách jsou podobné. Naměřené hodnoty však většinou nebyly statisticky průkazné.

Zjištěné skutečnosti by mohly být dobrým počátečním krokem pro širší zkoumání dané problematiky. Jak z odborné literatury, tak z našich výsledků vidíme, že suplementace diety zvířat může mít pozitivní dopad na organismus. Toho by následně mohlo být využito pro další zkvalitnění chovu hospodářských zvířat a optimalizaci produkce.

12 LITERATURA

- AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; PRASAD, S.; KANNAPPAN, R.: Tocotrienols, the Vitamin E of the 21st Century: It's Potential Against Cancer and Other Chronic Diseases. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(11), 1613–1631.
- ALTMANN, S. W.; DAVIS JR., H. R.; ZHU, L. J.; YAO, X.; HOOS, L. M.; TETZLOFF, G.; IYER, S. P.; MAGUIRE, M.; GOLOVKO, A.; ZENG, M.; WANG, L.; MURGOLO, N.; GRAZIANO, M. P.: Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 2004, 303(5661), s. 1201–1204.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T.: Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*. 1992, 13(3), s. 232–41.
- APRIOKU, J. S.: Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *Journal of Reproduction*. 2013, 14(4), s. 158–172.
- ARUOMA, O. I.: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Chemical Society*. 1998, 75(2), s. 199–212.
- AZZI, A.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M.: Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Letters*. 2002, 519(1–3), s. 8–10.
- BASHAN, N.; KOVSAN, J.; KACHKO, I.; OVADIA, H.; RUDICH, A.: Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological Review*. 2009, 89(1), s. 27–71.
- BATOOL, A.; MEHBOOB, K.; QADEER, S.; ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; ULLAH, N.; ANDRABI, S. M. H.; AKHTER, S.: Effect of α -Tocopherol Acetate and Ascorbic Acid in Extender on Quality of Zebu Bull Spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology*. 2012, 44(6), s. 1487–1491.
- BREININGER, E.; BEORLEGUI, N. B.; O'FLAHERTY, C. M.; BECONI, M. T.: Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 2005, 63(8), s. 2126–2135.
- BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, AB.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G.: Antioxidant effect of Vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research*. 1995, 47 (1–3), s. 69–74

- BURTON, G.W.; INGOLD, K. U.: Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*. 1986, 19(7), s. 194–201.
- CARR, A. C.; ZHU, B. Z.; FREI, B.: Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research*. 2000, 87(5), s. 349-54.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R.: Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 2000, 58(1–2), s. 99–111.
- CONTRI, A., DE AMICIS, I.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A.; MOLINARI, A.; FAUSTINI, M.; GRAMENZI, A.: Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*. 2011, 75(7), s. 1319–1326.
- COOPER, D. R.; KING, O. R.; CARPENTER, M. P.: Effect of Vitamin E deficiency on serum concentrations of follicle stimulating hormone and testosterone during testicular maturation and degeneration. *Endocrinology*. 1987, 120(1), s. 83–90.
- CREECH, B. L.; SPEARS, J. W.; FLOWERS, W. L.; HILL, G. M.; LLOYD, K. E.; ARMSTRONG, T. A.; ENGLE, T. E.: Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. *Journal of Animal Science*. 2004, 82(7), s. 2140–2147.
- DAD, S.; BISBY, R. H.; CLARK, I. P.; PARKER, A. W.: Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free Radical Research*. 2006, 40(3), s. 333–338.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.: Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*. 1992, 13(5), s. 368–378.
- DIMITROV, N. V.; MEYER, C.; GILLILAND, D.; RUPPENTHAL, M.; CHENOWETH, W.; MALONE, W.: Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996, 53(3), s. 723–729.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCI OGLU, M.; RODRIGUEZ, H.: Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002, 32(11), s. 1102–15.

- DUTHIE, G. G.; ARTHUR, J. R.; NICOL, F.; WALKER, M.: Increased indices of lipid peroxidation in stress-susceptible pigs and effects of vitamin E. *Research in Veterinary Science*. 1989, 46(2), s. 226–230.
- ERNSTER, L.; FORSMARK, P.; NORDENBRAND, K.: The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biofactors*. 1992, 3(4), s. 241–248.
- ESTERBAUER, H.; DIEBER-ROTHENEDER, M.; STRIEGL, G.; WAEG, G.: Role of Vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, 53(1 Suppl), s. 314–321
- EVANS, P.; HALLIWELL, B.: Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Journal of Nutrition*. 2001, 85(2), s. 67–74.
- FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G.: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002, 18(10), s. 872–879.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000, 408(6809), s. 239–47.
- FREI, B.; ENGLAND, L.; AMES, B. N.: Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989, 86(16), s. 6377–6381.
- FRYDRYCH, Z.: Organické zdroje mikroprvků a jejich vlastnosti (komplexy, cheláty). *Krmivářství*. 2007, 11, 5, s. 10–13.
- GIARETTA, E.; ESTRADA, E.; BUCCI, D.; SPINACI, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; YESTE, M.: Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*. 2015, 83(3), s. 399–407.
- GOLDEN, C.; ROSENKRANS, C.; JOHNSON, Z.: Effects of ascorbic acid and alpha tocopherol on cryopreserved boar sperm. *AAES Research Series*, 2002, 499, s. 120–123.
- GOWANLOCK, D. W.; MAHAN, D. C.; JOLLIFF, J. S.; MOELLER, S. J.; HILL, G. M.: Evaluating the NRC levels of Cu, Fe, Mn, and Zn using organic minerals for grower-finisher swine. *Journal of Animal Science*. 2013, 91(12), s. 5680–5686.
- HAJKO, V.; BIL, J.: The Relevant Markets for Meat Production and Processing in the Czech Republic: Analysis of the Price Movements. *The Czech Economic Review*, Univerzita Karlova, 2013, 7(3), s. 178–197.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.: Free Radicals in Biology and Medicine. Second edition, Clarendon Press, Oxford, 1989. 543 s.
- HENSON, M. C.; KATTESH, H. G.; HITCHCOCK, J. P.; KINCAID, S. A.: The effects of dietary selenium on growth and selected reproductive parameters in young boars. *Animal Production*. 1983, 37(3), s. 401–407.
- HIDIROGLOU, M.: Technical note: forms and route of vitamin C supplementation for cows. *Journal of Dairy Science*. 1999, 82(8), s. 1831–1833.
- HIDIROGLOU, M.; BATRA, T. R.; ZHAO, X.: Comparison of vitamin C bioavailability after multiple or single oral dosing of different formulation in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, 1997, 37(4), s. 443–448.
- HILL, G. M.; SPEARS, J. W.: Trace and ultra trace elements in swine nutrition. In: Lewis AJ, Southern LL (eds), Swine Nutrition, 2nd edn. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 2001. s. 229–262.
- HILL, K. E.; MONTINE, T. J.; MOTLEY, A. K.; LI, X.; MAY, J. M.; BURK, R. F.: Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003, 77(6), s. 1484–1488.
- HINSHAW, D. B.; SKLAR, L. A.; BOHL, B.; SCHRAUFSTATTER, I. U.; HYSLOP, P. A.; ROSSI, M. W.; SPRAGG, R. G.; COCHRANE, C. G.: Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *The American Journal of Pathology*. 1986, 123(3), s. 454–64.
- HU, J.; LI, Q.; SUN, X.; CAO, H.; LIU, Y.; GENG, G.: Effects of alginate on frozen-thawed boar spermatozoa quality, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities. *Animal Reproduction Science*. 2014, 147(3-4), s. 112–118.
- HU, J. H.; TIAN, W. Q.; ZHAO, X. L.; ZAN, L. S.; WANG, H.; LI, Q. W.; XIN, Y. P.: The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science*. 2010, 121(1-2), s. 72–77.
- CHAN, K. H.; ALLEN, C. E.; HEGARTY, P. V.: The effects of vitamin E and indomethacin on blood creatine phosphokinase and fatty acid composition of tissues from young rabbits. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1979, 32(7), s. 1454–1461.
- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C.: Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 2001, 59(4), s. 451–458.

- CHEESEMAN, K. H.; HOLLEY, A. E.; KELLY, F. J.; HUGHES, L.; BURTON, G.: Biokinetics in humans of RRR- α -tocopherol: the free phenol, acetate ester and succinate ester forms of vitamin E. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995, 19(5), s. 591–598.
- IULIANO, L.; MICHELETTA, F.; MARANGHI, M.; FRATI, G.; DICZFALUSY, U.; VIOLI, F.: Bioavailability of vitamin E as function of food intake in healthy subjects: effects on plasma peroxidescavenging activity and cholesterol-oxidation products. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001, 21(10), s. 34–37.
- JAFAROGHLI, M.; ABDI-BENEMAR, H.; ZAMIRI, M. J.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; SHADPARVAR, A. A.: Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. *Animal Reproduction Science*. 2014, 147(1/2), s. 17–24.
- JELÍNEK, P.; KOUDELA, K.: *Fyziologie hospodářských zvířat*. Vyd. 1. Brno: Mendelova lesnická a lesnická univerzita v Brně, 2003. 414 s.
- JENKINS, T. G.; ASTON, K. I.; CARRELL, D. T.: Supplementation of cryomedium with ascorbic acid-2-glucoside (AA2G) improves human sperm post-thaw motility. *Fertility and Sterility*. 2011, 95(6), s. 2001–2004.
- JEONG, Y. J.; KIM, M. K.; SONG, H. J.; KANG, E. J.; OCK, S. A.; MOHANA KUMAR, B.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. J.: Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*. 2009, 58(2), s. 181–189.
- JORDÁN, V.; HEMZALOVÁ, M.: *Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. Vyd. 1. Brno: Jota, 2001, 153 s.
- KAIZU, H.; SASAKI, M.; NAKAJIMA, H.; SUZUKI, Y.: Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *Journal of Dairy Science*. 1993, 76 (9), s. 2493–2499.
- KAMEL, K. I.: The effect of dietary organic selenium and folic acid supplementation on productive and reproductive performance of male rabbits under heat stress conditions. *Egyptian Poultry Science*. 2012, 32, s. 43–62.
- KIM, Y. Y.; MAHAN, D. C.: Biological aspects of selenium in farm animals. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 2003, 16(3), s. 435–444.

- KIM, Y. Y.; MAHAN, D. C.: Prolonged feeding of high dietary levels of organic and inorganic selenium to gilts from 25 kg body weight through one parity. *Journal of Animal Science*. 2001, 79, s. 956-966.
- KIRSCHVINK, N.; FIEVEZ, L.; BOUGNET, V.; ART, T.; DEGAND, G.; SMITH, N.; MARLIN, D.; ROBERTS, C.: Effect of nutritional antioxidant supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Veterinary Journal*. 2002, 34(7), s. 705-712.
- KOŁODZIEJ, A.; JACYNO, E.: Effect of selenium and vitamin E supplementation on reproductive performance of young boars. *Archiv Tierzucht*. 2005, 48, s. 68-75.
- KORISH, A. A.; ARAFAH, M. M.: Catechin combined with vitamins C and E ameliorates insulin resistance (IR) and atherosclerotic changes in aged rats with chronic renal failure (CRF). *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2008; 46(1), s. 25-39.
- KOZUMPLÍK, J.; KUDLÁČ, E.: Reprodukce prasat ve velkochovech. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1980. 296 s.
- KRIZKOVA, S.; FABRIK, I.; ADAM, V.; KUKACKA, J.; PRUSA, R.; CHAVIS, G. J.; TRNKOVA, L.; STRNADEL, J.; HORAK, V.; KIZEK, R.: Utilizing of adsorptive transfer stripping technique Brdicka reaction for determination of metallothioneins level in melanoma cells, blood serum and tissues. *Sensors*. 2008, 8(5), s. 3106-3122.
- KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V.; ZEHTAB, O.; GUIGÓ, R.; GLADYSHEV, V. N.: Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 30, 2003, 300(5624), s. 1439-1443.
- KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; MIKELSAAR, M.; ZILMER, K.; VIHALEMM, T.; ZILMER, M.: Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Journal of Nutrition*. 2003, 90(2), s. 449-456.
- KUMAR, P.; YADAV, B.; YADAV, S.: Effect of zinc and selenium supplementation on semen quality of barbari bucks. *Indian Journal of Animal Research*. 2014, 48(4), s. 366-369.
- LASOTA, B.; BLACZSZIK, B.; SEREMAK, B.: Selenium Status and GSH-Px Activity in Semen and Blood of Boars at Different Ages Used for Artificial Insemination. *Reproduction Domestic Animals*. 2004, 39, s. 309-314.
- LAURIDSEN, C.; HOJSGAARD, S.; SORENSEN, M. T.: Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E, and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. *Journal of Animal Science*. 1999, 77(4), s. 906-916.

- LINSTER, C. L.; VAN SCHAFTINGEN, E.: Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*. 2007 274(1), s. 1–22.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J. G.; CASPER, R. F.: Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 1998, 13(4), s. 896–900.
- LOPEZ R. A.; RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; LEROY, J.; DE CLERCQ, J.; BOLS, P.: Effect of organic selenium in the diet on sperm quality of boars. *Reproduction in domestic animals*. 2010, 45(6), s. 297–305.
- LOUDA, F.: Inseminace hospodářských zvířat: se základy biotechnických metod. 1.vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2001, 225 s.
- LOVERCAMP, K. W.; STEWART, K. R.; LIN, X.; FLOWERS, W. L.: Effect of dietary selenium on boar sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 2013, 138(3-4), s. 268 - 275.
- LUO, HL.; JIA, ZH.; ZHU, S. E.; DING, JZ.: Effect of Vitamin E on the qualities of fresh and frozen thawed ram semen. *China Herbivores*. 2004, 5, s. 14–16.
- LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O.: Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*. 2007, 173(3), s. 502–11.
- MACHLIN, L. J., BENDICH, A.: Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*. 1987, 1(6), s. 441–445.
- MALO, C.; L. GIL, N.; GONZALEZ, F.; MARTÍNEZ, R.; CANO, E.; ESPINOSA, E.; DE BLAS, I.: Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*. 2010, 61(1), s. 142–147.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; CHUNG, Y. K.; PATE, J. L.; POPE, W. F.: Effects of Dietary Selenium and Vitamin E on Boar Performance and Tissue Responses, Semen Quality, and Subsequent Fertilization Rates in Mature Gilts. *Journal of Animal Science*. 1997, 75, s. 2994–3003.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; PATE, J. L.: Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *Journal of Animal Science*. 2000, 78, s. 1537–1543. ISSN 00218812.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D. C.; WHITMOYER, R.: Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *Journal of Animal Science*. 2000, 78(6), s. 1544–1550.

- MARTINS, S. M. M. K.; DE ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; BRESSAN, F. F.; PUGINE, S. M. P.; MELO, M. P.; CHIARATTI, M. R.; MARINO, C. T.; MORETTI, A. S.; ARRUDA, R. P.: Organic selenium supplementation increases PHGPx but does not improve viability in chilled boar semen. *Andrologia*. 2015, 47(1), s. 85–90.
- MAUEY, S. I.; MASON, K. E.: Antisterility Activity of d- α -Tocopheryl Hydroquinone in the Vitamin E-deficient Male Hamster and Rat. *Journal of Nutrition*. 1975, 105(4), s. 491–494.
- MAZUR, P.; KATKOV, I. I.; KATKOVA, N.; CRITSER, J. K.: The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*. 2000, 40(3), s. 187–209
- MCGLONE, J.: The Future of Pork Production in the World: Towards Sustainable, Welfare-Positive Systems. *Animals*. 2013, 3(2), s. 401–415.
- MIRZOYAN, A. V.; NEBESIKHINA, N. A.; VOYNOVA, N. V.; CHISTYAKOV, V. A.: Preliminary results on ascorbic acid and lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). *International Journal of Refrigeration*. 2006, 29(3), s. 374–378.
- MISHRA, M.; ACHARYA, U. R.: Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *The Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2004, 18 (2), s. 173–178.
- MULLER, D. P. R.: Antioxidant therapy in neurological disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1990, 264, s. 475.
- NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J.: Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001, 31(11), s. 1287–312.
- NRC (National Research Council). *Mineral tolerance of animals*. Vyd. 1. Washington, D. C.: The National academi press, 2005. 496 s.
- O'BRYAN, M. K.; SCHLATT, S.; PHILLIPS, D. J.; DE KRETZER, D. M.; HEDGER, M. P.: Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology*. 2000, 141(1), s. 238–246.

- O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N.: Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*. 1997, 29(5), s. 269–275.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K.: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 1992, 38(2), s. 209–222
- PENA F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIQUEZ MARTINEZ, H.: Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions the ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 2003, 78 (1-2), s. 85–98.
- PENA F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIQUEZ MARTINEZ, H.: Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*. 2004, 12(02), s. 117–124.
- PETRUJKIĆ, B. T.; ŠEFER, D. S.; JOVANOVIĆ, I. B.; JOVIČIN, M.; JANKOVIĆ, S.; JAKOVLJEVIĆ, G.; BEIER, R. C.; ANDERSON, R. C.: Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. *Animal Feed Science*. 2014, 197, s. 194–205.
- POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E.: Oxidative stress and cell signaling. *Current Medicinal Chemistry Journal*. 2004, 11(9), s. 1163–82.
- PROST, M.: Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of a living organism or potentially aggressive agents. U. S. Patent 5, 135, 850.
- RACEK, J.; HOLEČEK, V.: Enzymy a volné radikály. *Chemické listy*. 1999, 93, s. 774–780.
- ROLF, C.; COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; NIESCHLAG, E.: Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoas-thenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: arandomized, placebo-controlled, double-blind study. *Human Reproduction*. 1999, 14(4), s. 1028–1033.
- ROSSI, R.; PASTORELLI, G.; CORINO, C.: Application of KRL test to assess total antioxidant activity in pigs: Sensitivity to dietary antioxidants. *Research in Veterinary Science*. 2013, 94(2), s. 372 –377.
- SAMBRAUS, H. H.: Atlas plemen hospodářských zvířat: skot, ovce, kozy, koně, osli, prasata: 250 plemen. Vyd. v češtině 1. Praha: Brázda, 2014, 295 s.

SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; CANTÜRK, F.: Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. *Cryobiology*. 2014, 68(1), s. 129–133.

SCOTT, R.; MACPHERSON, A.; YATES R. W.; HUSSAIN, B.; DIXON J.: The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *BJUI International*. 1998, 1(82), s. 76-80.

SHI, L.; YANG, R. J.; YUE, W. B.; XUN, W. J.; ZHANG, C. X.; REN, Y. S.; SHI, L.; LEI, F. L.: Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Animal Reproduction Science*. 2010, 118, s. 248–254.

SHIH, J. C.; JONAS, R. H.; SCOTT, M. L.: Oxidative deterioration of the muscle proteins during nutritional muscular dystrophy in chicks. *Journal of Nutrition*. 1977, 107(10), s. 1786–1791.

SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C.: Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. *Theriogenology*. 2014, 81(7), s. 966–973.

SIERENS, J.; HARTLEY, J. A.; CAMPBELL, M. J.; LEATHEM, A. J.; WOODSIDE, J. V.: In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide induced DNA damage in sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 2002, 22(3), s. 227–234.

SMITAL, J.: Faktory působící na efektivitu a skladování kančího spermatu v kapalném stavu. *Náš chov*. 2001, 12, s. 34-37.

SOCHOR, J.; RYVOLOVA, M.; KRYSTOFOVA, O.; SALAS, P.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; HAVEL, L.; BEKLOVA, M.; ZEHNALÉK, J.; PROVAZNIK, I.; KIZEK, R.: Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. *Molecules*. 2010, 15(12), s. 8618–8640.

SOLEIMANI, M. M.; NOORAFSHAN, A.; MOMENI, H. R.; ABNOSI, M. H.; MAHMOODI, M.; ANVARI, M.; HOSEINI, S. M.: Stereological study of the effects of Vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian Journal of Andrology*. 2009, 11(4), s. 508–16.

SOMOGYI, A.; ROSTA, K.; PUSZTAI, P.; TULASSAY, Z.; NAGY, G.: Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*. 2007, 28(4), s. 41–55.

- SOUTHAM, E.; THOMAS, P. K.; KING, R. H.; GOSS-SAMPSON, M. A.; MULLER, D. P.: Experimental vitamin E deficiency in rats. Morphological and functional evidence of abnormal axonal transport secondary to free radical damage. *Brain*. 1991, 114(2), s. 915–936.
- SPEIGHT, S. M.; ESTIENE, M. J.; HARPER, A. F.; CRAWFORTH, W. J.; KNIGHT, J. W.; WHITAKER, B. D.: Effects of dietary supplementation with an organic source of selenium on characteristics of semen quality and in vitro fertility in boars. *Journal of Animal Science*. 2012, 90(3), s. 761–770.
- STUPKA, R.; ŠPRYSL, M.; ČÍTEK, J.: *Základy chovu prasat*. 1. vyd. Praha: PowerPrint, 2009, 180 s.
- SUGIYAMA, M.: Role of physiological antioxidants in chromium (VI)-induced cellular injury. *Free Radical Biology and Medicine* 1992. 12(5), s. 397–407.
- SUN, F; IWAGUCHI, K; SHUDO, R; NAGAKI, Y; TANAKA, K; IKEDA, K; TOKUMARU, S; KOJO, S.: Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science*. 1999, 96, s. 185–190.
- SUN, M.; LIU, G.; WU, Q.; Speciation of organic and inorganic selenium in selenium-enriched rice by graphite furnace atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, *Food Chemistry*, 2013, 141(1), s. 66–71,
- SZCZESNIAK-FABIANCZYK, B.; BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; RYSZKA, F.: Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reproductive Biology*. 2003, 3(1), s. 81–87.
- ŠIMEK, M.: *Organické zdroje minerálních látek a zatížení životního prostředí*. Vyd. 1. Praha: ústav zemědělských a potravinářských informací, 2001. 37 s.
- TOPINKA, J.; BINCOVA, B.; SRAM, R. J.; ERIN, A. N.: The influence of alpha-tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutation Research*. 1989, 225(3), s. 131–136.
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, M.; MAZURA, M.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006, 160(1), s. 1–40.
- VAN DER LOO, B.; BACHSCHMID, M.; SPITZER, V.; BREY, L.; ULLRICH, V.; LIISCHER, T.F.: Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in a rat model of aging; implications for antioxidative defense. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, 303, s. 483–487.

WAGNER, E. L., POTTER, G. D.; GIBBS, P. G.; ELLER, E. M.; SCOTT, B. D.; VOGELSANG, M. M.; WALZEM, R. L.: Copper and Zinc balance in exercising horses fed 2 forms of mineral supplements. *Journal of Animal Science*. 2011, 89(3), s. 722–728.

WILSON, M. J.; KAYE, D.; EDWARD, S. W.; QUACH, H. T.; SINHA, A. A.; VATASSERY, G. T.: Effect of Vitamin E deficiency on the growth and secretory function of the rat prostatic complex. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003, 74(3), s. 267–275.

WU, S. H.; OLDFIELD, J. E.; WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H.: Effect of selenium, Vitamin E and antioxidants on testicular function in rats. *Biology of Reproduction*. 1973, 8 (5), s. 625–629

XIA, C.; XIA, W.; YANG, S.; AN, L.; LI, X.; WU, Z.; ZHANG, J.; WANG, Z.; TIAN, J.: Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2012, 136(1-2), s. 108–114.

XIA, Y.; HILL, K. E.; BURK, R. F.: Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-induced glutathione release from the isolated perfused rat heart. *Journal of Nutrition*. 1985, 115(6), s. 733–742.

YAMAMOTO, I.; MUTO, N.; NAGATA, E.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, Y.: Formation of a stable l-ascorbic acid alpha-glucoside by mammalian alpha-glucosidase-catalyzed transglucosylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990, 1035(1), s. 44–50.

YANG, G. Q.; WANG, S. Z.; ZHOU, R. H.; SUN, S. Z.: Endemic selenium intoxication of humans in China. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1983, 37(5), s. 872–81.

YOSHIMOTO, T.; NAKAMURA, S.; YAMAUCHI, S.; MUTO, N.; NAKADA, T.; ASHIZAWA, K.; TATEMOTO, H.: Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic 2-O-alpha-glucoside. *Cryobiology*. 2008, 57(1), s. 30–36.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I.: Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*. 2003, 76(1-2), s. 99–111

YUE, DB.; YAN, LY.; LUO, HL.; JIN, XX.; XU, X.: Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science*. 2010, 118(2-4), s. 217–222.

ZEMAN, L. DOLEŽAL, P.; KOPŘIVA, A.; MRKVICOVÁ, E.; PROCHÁZKOVÁ, J.; RYANT, P.; SKLÁDANKA, J.; STRAKOVÁ, E.; SUCHÝ, P.; VESELÝ, P.; ZELENKA, J.: *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. 1. Praha: Profi Press, 2006. 360 s.

ZEMAN, L.: *Výživa a krmení prasat*. Vyd. 1. Brno: Ediční středisko MZLU v Brně, 2004. 98 s.

ZHANG, W.; YI, K.; CHEN, CH.; HOU, X.; ZHOU, X.: Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal reproduction science*. 2012, 132(3-4), s. 123–128.

ŽIŽLAVSKÝ, J.: *Chov hospodářských zvířat*. 1.vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002, 209 s.

13 SEZNAM ZKRATEK

Se - selen

GSH-Px - glutathionperoxidáza

ATP – adenosintrifosfát

KA - kyselina askorbová

DNA - deoxyribonukleová kyselina

AA-2G - kyselina 2-glukosid askorbová

ROS - reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku

RNS - reactive nitrogen species reaktivní formy dusíku

KRL - kit radical libres

FRAP - Ferric reducing antioxidant power

FR - Free Radicals

NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

SOD - superoxiddismutáza

MT - metalothionein

PHGPx - phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase

14 SEZNAM GRAFŮ

- Graf č. 1 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FRAP u suplementované skupiny*
- Graf č. 2 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FRAP u nesuplementované skupiny*
- Graf č. 3 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FR u suplementované skupiny*
- Graf č. 4 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí metody FR u nesuplementované skupiny*
- Graf č. 5 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí ABTS testu u suplementované skupiny*
- Graf č. 6 Stanovení antioxidační aktivity ejakulátu pomocí ABTS testu u nesuplementované skupiny*
- Graf č. 7 Stanovení množství glutathionperoxidázy u suplementované skupiny*
- Graf č. 8 Stanovení množství glutathionperoxidázy u nesuplementované skupiny*
- Graf č. 9 Stanovení množství superoxiddismutázy u suplementované skupiny*
- Graf č. 10 Stanovení množství superoxiddismutázy u nesuplementované skupiny*
- Graf č. 11 Stanovení množství metalothioneinu u suplementované skupiny*
- Graf č. 12 Stanovení množství metalothioneinu u nesuplementované skupiny*
- Graf č. 13 Stanovení koncentrace selenu u suplementované skupiny*
- Graf č. 14 Stanovení koncentrace selenu u nesuplementované skupiny*

15 PŘÍLOHY

Tabulky

Tabulka č. 1: Složení krmné směsi pro kance

Tabulka č. 2: Složení premixu pro kance (0,5%)

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty suplementované skupiny při jednotlivých odběrech

Tabulka č. 4: Naměřené hodnoty nesuplementované skupiny při jednotlivých odběrech

Komponenta	% zastoupení
Ječmen zrno	36,00
Pšenice zrno	20,36
Oves zrno	20,00
Sojový extrahovaný šrot	14,50
EKPO T	3,00
Bergafat	2,10
Uhlícitan vápenatý	1,50
Monodikalciumpfosfát	1,20
Minerálně vitaminózní premix (0,5 %)	0,50
Chlorid sodný	0,40
Oxid hořečnatý	0,15
L-Lyzin HCl	0,14
L - Threonin	0,09
Methionin DL	0,06

Bergafat (Berg + Schmidt, Německo, www.berg-schmidt.de) – palmový olej; EKPO T (Delika – Pet, Česká Republika, www.delikapet.cz) – biskvitová moučka

Tab. 1: Složení krmné směsi pro kance

Parametr	Jednotka	Množství
Vit. A	m.j.	3 000 000
Vit. D ₃	m.j.	400 000
Alfatokoferol	mg	20 020
Vit. B ₁	mg	500
Vit. B ₂	mg	1 200
Vit. B ₆	mg	800
Vit. B ₁₂	mg	6
Vit. K ₃	mg	600
Vit. C	mg	16 000
Biotin	mg	70
Kyselina listová	mg	200
Niacinamid	mg	8 000
Pentotenan vápenatý	mg	4 000
Cholin-chlorid	mg	55 200
Betain	mg	26 500
Butylhydroxy-toluen	mg	400
Ethoxyquin	mg	180
Cu - ve formě síranu měďnatého pentahydrátu	mg	2 883
Zn - ve formě oxidu zinečnatého	mg	19 976
Mn - ve formě oxidu manganatého	mg	19 760
Fe - ve formě uhličitanu-železnatého	mg	23 625
I - ve formě jodidu draselného	mg	229
Co - ve formě síranu-kobaltnatého heptahydrátu	mg	91
Se - ve formě selenomethioninu	mg	60
Lyzin ve formě L-Lyzin monohydrochlorid	g	226
nosič ad. - pšeničná krmná mouka, uhličitan vápenatý	kg	1

Tab. 2: Složení premixu pro kance (0,5%)

Kanec	skupina	odběr	FRAP (GAE µg/ml)	Free Radicals (GAE)	ABTS (GAE µg/ml)	GPx (ncat)	SOD (ncat)	MDA (µM)	selen (ng/mg spermatu)
8A	A	1	7,7	24,8	212	184	151,1	6,3	14,0
15A	A	1	5,4	6,9	150	154	144,4	4,9	11,5
22A	A	1	8,9	99,4	284	326	151,1	4,9	17,7
13A	A	1	5,2	23,8	205	89	157,7	4,7	11,8
21A	A	1	4,9	4,2	146	134	68,1	3,2	14,3
14A	A	2	11,3	63,1	310	273	195,1	6,9	11,5
3A	A	2	5,2	59,6	241	256	173,3	4,6	14,4
8B	A	2	12,3	73,6	326	326	183,7	4,6	14,4
15B	A	2	12,8	62,4	365	161	151,0	7,8	15,2
22B	A	2	8,4	6,3	161	147	101,3	2,7	13,8
21B	A	3	8,9	49,0	250	251	150,4	2,1	14,4
18B	A	3	8,8	68,4	376	188	173,9	3,7	13,7
14B	A	3	11,3	77,3	268	325	138,2	1,9	12,1
3B	A	3	11,6	55,6	281	151	123,9	2,9	16,1
15C	A	4	11,1	222,3	264	130	97,0	3,6	11,6
22C	A	4	11,1	103,1	287	136	104,4	4,9	13,1
13C	A	4	11,1	44,7	226	240	76,8	6,0	15,5
21C	A	4	6,9	89,9	251	242	79,5	9,0	15,2
14C	A	4	6,9	75,9	221	114	40,5	5,1	14,3

Tab. 3: Naměřené hodnoty suplementované skupiny při jednotlivých odběrech

Kanec	skupina	odběr	FRAP (GAE µg/ml)	Free Radicals (GAE)	ABTS (GAE µg/ml)	GPx (ncat)	SOD (ncat)	MDA (µM)	selen (ng/mg spermatu)
8D	B	1	4,3	9,3	274	232	127,8	3,4	10,3
15D	B	1	12,5	39,4	171	108	174,3	3,8	13,2
22D	B	1	4,5	39,8	98	267	64,7	3,0	15,2
13D	B	1	9,6	39,6	290	121	176,0	7,2	13,8
21D	B	1	8,8	76,9	252	99	121,2	4,9	11,0
17A	B	2	7,8	37,0	240	161	189,0	7,9	13,2
16A	B	2	9,3	10,2	148	159	122,7	2,9	11,9
20A	B	2	9,2	41,0	264	248	260,8	4,7	12,8
19A	B	2	11,6	63,1	276	236	157,2	3,9	14,7
11A	B	2	17,8	58,5	288	150	220,4	3,5	12,0
10B	B	3	10,0	20,9	92	169	141,1	2,1	13,3
2B	B	3	10,8	49,9	280	198	152,8	2,7	12,4
6B	B	3	12,3	40,6	254	228	149,8	2,5	12,3
7B	B	3	6,3	108,5	256	167	125,1	3,3	12,3
5B	B	3	12,9	32,8	319	205	191,9	2,6	11,6
19B	B	4	11,2	39,4	377	201	95,2	2,7	10,2
1B	B	4	6,6	39,1	286	186	119,6	3,4	15,5
11B	B	4	7,4	56,8	294	193	104,6	6,5	18,4
9B	B	4	8,6	28,6	275	175	96,2	6,4	18,6
10C	B	4	6,4	54,0	234	191	113,3	2,6	17,6

Tab. 4: Naměřené hodnoty nesuplementované skupiny při jednotlivých odběrech