

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



Odolnost spermií býků vůči chladu a jejich přežitelnost

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Helena Zvolská

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

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Odolnost spermií býků vůči chladu a jejich přežitelnost" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé práce doc. Ing. Luďkovi Stádníkovi, Ph.D. za umožnění zpracování zajímavého tématu a příjemnou spolupráci. Dále velmi děkuji Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za významou pomoc při vedení vlastní práce, korekci literární rešerše a hlavně jeho ochotu. Nemalé díky patří i mé rodině, která mi umožnila studovat.

SOUHRN

Cílem práce bylo vyhodnocení vlivu individuality plemenného býka a použitého ředidla na přežitelnost spermií v průběhu chladového testu. Hypotézou byl předpoklad, že definovaný chladový šok vyvolá změny v přežitelnosti spermií, které se budou lišit mezi sledovanými plemennými býky a mezi jednotlivými typy vybraných komerčních ředidel.

Pro zjištění vlivu individuality býka bylo sledováno pět plemenných býků z inseminační stanice Natural, spol. s. r. o. Hradištka pod Medníkem. Ejakulát těchto býků byl standardním postupem naředěn komerčním ředidlem AndroMed®. K hodnocení vlivu použitého ředidla byli vybráni čtyři různí býci z téže inseminační stanice. Všechny čtyři ejakuláty byly standardním postupem naředěny šesti různými ředidly: AndroMed®, BIOXcell®, Optidyl®, Steridyl®, Triladyl® a BULLXcell.

Před vlastním ředěním byl odebrán vzorek pro první chladový test, následovalo ředění a test v čase 0, který se po hodinovém intervalu opakoval celkem třikrát (čas 1, čas 2, čas 3), u hodnocení ředidel jen jednou (čas 1). Vždy byl nejprve vyhotoven jeden roztěr před chladovým testem a tři po chladovém testu, který spočíval v inkubaci vzorku při 0 °C po dobu 10 minut. Následovalo barvení eosinem a nigrosinem, roztěr suspenze na podložní sklíčko a hodnocení pod mikroskopem. Z každého vzorku bylo zhodnoceno min. 100 spermií a byl vyjádřen procentický podíl spermií živých.

Výsledky ukázaly, že mezi býky jsou ve výsledných hodnotách procent živých spermií statisticky významné rozdíly, tudíž byl prokázán vliv individuality býka. Pokud ale budeme brát jako efekt chladového šoku rozdíl v procentu živých spermií před a po chladovém testu, tak mezi býky není statistický rozdíl a vliv individuality je vyvrácen. Hodnocení vlivu ředidel dopadlo v obou případech stejně. Mezi komerčními ředidly nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl a nebyl tedy prokázán vliv typu komerčního ředidla na přežitelnost spermií v průběhu chladového testu. Jak uvádí jiné práce, pro ochranu před chladovým testem je klíčový obsah LDL (low density lipoprotein) v ředidle.

Klíčová slova: chladový test, aktivita, motilita, oplozovací schopnost, ředidlo

SUMMARY

The aim of this thesis was to evaluate the impact of individuality of a breeding bull and used extender on the survivability of sperms during the cold test. Our hypothesis was that defined cold shock causes changes in the survivability of sperms, which would vary between the observed breeding bulls and between various types of chosen commercial extenders.

To find out the impact of individuality of a bull, five breeding bulls from the insemination station Natural, spol. s. r. o. Hradištko pod Medníkem was observed. Ejaculate of these bulls was diluted according to the standard method using commercial extender AndroMed®. For the evaluation of the impact of used extender, four different bulls from the same insemination station was chosen. The four ejaculates was also diluted according to the standard method, but this time using six different extenders: AndroMed®, BIOXcell®, Optidyl®, Steridyl®, Triladyl® and BULLXcell.

Before the dilution itself, a sample for the first cold test was taken, followed by dilution and test in time 0, which was repeated three times with time period one hour (time 1, time 2, time 3), in the case of thinner evaluation just once (time 1). It was always made one sample before the cold test and three samples after it. The cooling test consists in the incubation of sample at 0 °C for 10 minutes. Then came colouring using eosin and nigrosin, spreading of the suspension on the slide and finally evaluating under the microscope. From each sample, at least 100 sperms was evaluated and the percentage of the living sperms was calculated.

The results showed that there are statistically relevant differences in the percentages of the living sperms between the bulls, so the impact of the individuality of the bull was proved. But if we considered the difference between the percentage of the living sperms before and after the cooling test as a result of the cold shock, there is no statistically relevant difference between the bulls and the impact of the individuality of the bull is disprove. The impact of the extendres was the same in both cases. There was no statistically relevant differences between the commercial extenders, so the impact of the type of commercial extenders on the survivability of sperms during the cold test was not proved. Another literature

dealing with this topic reports that for protection before the cold test, the content of LDL (low density lipoprotein) in the extender is crucial.

Keywords: cold test, activity, motility, fertilization ability, extender

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍL.....	2
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3. 1. Anatomie pohlavní soustavy býka.....	3
3. 2. Fyziologie pohlavní soustavy býka	13
3. 2. 1. Erekcce a ejakulace	13
3. 2. 2. Spermatogeneze	14
3. 2. 3. Neurohumorální řízení pohlavních funkcí býka.....	17
3. 3. Spermie	19
3. 3. 1. Morfologie	19
3. 3. 2. Metabolismus a motilita	21
3. 3. 3. Kapacitace.....	22
3. 3. 4. Akrozomální reakce.....	23
3. 4. Zpracování ejakulátu	24
3. 4. 1. Odběr ejakulátu.....	24
3. 4. 2. Hodnocení ejakulátu	26
3. 4. 2. 1. Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu.....	27
3. 4. 3. Ředění ejakulátu	30
3. 4. 5. Konzervace ejakulátu.....	34

3. 5. Chladový šok	36
4. MATERIÁL A METODY	38
4. 1. Charakteristika býků	38
4. 2. Ředidla.....	38
4. 2. Odběr ejakulátu a jeho zpracování	40
4. 3. Chladový test a hodnocení odolnosti spermií.....	40
4. 4. Statistická analýza	41
5. VÝSLEDKY	42
5. 1. Základní statistiky – býci.....	42
5. 2. Základní charakteristiky – ředidla	45
5. 3. ANOVA - vliv býka.....	47
5. 4. ANOVA – vliv použitého ředidla.....	48
6. DISKUZE	48
7. ZÁVĚR.....	53
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
9. PŘÍLOHY	68

1. ÚVOD

Chov skotu je jedno z nejvýznamnějších odvětví živočišné výroby, které zajišťuje produkci mléka, masa a chlévské mrvy. V důsledku zdokonalení šlechtitelské práce dochází k postupnému zvyšování užitkových vlastností skotu, což vede k poklesům stavů. V současné době jsou počty chovných krav tak nízké, že znemožňují další šlechtitelský posun a selekci. Z toho důvodu, je hlavní komponentou genetického pokroku práce s otcovskou populací býků.

Jak už tedy vyplývá z předchozího textu, vyhodnocení kvality býčí plodnosti je velmi důležité po dosažení chovatelského úspěchu. Výsledný reprodukční potenciál býka je složen z několika aspektů, v němž je každý prvek podstatný. Vzhledem ke snižující se úspěšnosti umělé inseminace u některých populací mléčného skotu, je třeba se zaměřit na vlivy, které mohou ovlivňovat výsledky reprodukce (Bath, 1997). Plodnost krav byla již předmětem mnoha studií, ale faktorům ovlivňující oplozovací schopnost spermií není věnováno zdaleka tolik pozornosti. Kromě genetických vlivů zde hrají velkou roli i vlivy vnější (Lucy, 2001).

Umělá inseminace je zcela běžně užívaná biotechnologická metoda, která je v chovu mléčného skotu prakticky výhradně používaným reprodukčním postupem. Umožňuje efektivní využití těch nejkvalitnějších samců a díky kryokonzervaci semene je možný transport inseminačních dávek i na velké vzdálenosti. Umožněno je mimo jiné i uchování ejakulátu po řadu let (Phillis et al., 2004).

Pro úspěšnost použití mrazených inseminačních dávek je důležitá nejen vstupní kvalita ejakulátu, ale také znalost postupů a materiálů, které tlumí negativní dopad chlazení a mrazení na spermie. Během tohoto procesu je nutné zachovat vlastnosti spermií potřebné pro oplození v maximální možné míře. Jen tak může být dosaženo vysoké koncepce po použití kryokonzervovaného semene (Hoflack et al., 2006).

Jako kritická část procesu zpracování inseminačních dávek se jeví právě ekvilibrace, během které se naředěný ejakulát chladí z tělesné teploty na teplotu 1 – 3 °C. Může zde docházet k chladovému šoku, který vede k ireverzibilní ztrátě

pohyblivosti, narušení akrozomu a membrán, což vede ke snížení doby přežitelnosti a oplozovací schopnosti spermií. Hlavním komponentem ředidel, který zajišťuje ochranu před chladovým šokem, je LDL (low density lipoprotein; Zeng a Terada, 2000).

2. CÍL

Hypotézou této diplomové práce je předpoklad, že definovaný chladový šok vyvolá změny v přežitelnosti spermií, které se budou lišit mezi sledovanými plemennými býky a mezi jednotlivými typy vybraných komerčních ředidel.

Cílem práce je vyhodnocení vlivu individuality plemenného býka a použitého ředidla na přežitelnost spermií v průběhu chladového testu.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3. 1. Anatomie pohlavní soustavy býka

Funkcí samčího pohlavního aparátu je produkce spermií, vytvoření vhodných podmínek pro jejich přežití a transport do pohlavní soustavy samice. Neméně důležitou funkcí je tvorba hormonu testosteronu (Najbrt, 1982). Pohlavní soustava je jediná část organismu, která neslouží k zachování jedince nýbrž druhu (Černý, 2004).

Samčí pohlavní žlázy – varlata, jsou uložena v šourku. Na ně navazují nadvarlata a dále chámovod, který v dutině pánevní vstupuje do močové trubice. Ta je po výstupu z pánve vedena penisem, orgánem zajišťujícím vlastní kopulaci (König, 2002). V pánevní dutině se ještě nachází tzv. přídatné pohlavní žlázy, v případě býka mezi ně patří měchýřkovité žlázy, žláza předstojná (prostata), Cowperovy (bulbouretrální) žlázy a ampule chámovodu (Marvan et al., 2007). Některé zdroje se zmiňují i o dalších drobných žlázách v průběhu chámovodu (Věžník et al., 2004; Obr.: 1).

Varlata (*orchis, testis*)

Varlata jsou párové tubulózní žlázy tuhoelastické konzistence, vejčitého tvaru (Marvan et al., 2007) se sekreční funkcí - tvorbou spermií a inkreční funkcí – produkcí androgenů (Věžník et al., 2004). U býka je jejich relativní velikost oproti jiným druhům hospodářských zvířat (kanec, beran, kozel) malá. Měří 14 – 16 cm a hmotnost se pohybuje okolo 500– 600 g (Marvan et al., 2007), Najbrt (1982) dokonce uvádí pouhých 250 – 300 g.

Embryonálně jsou založena v bederní oblasti z genitálních lišt. Odtud v 5. měsíci prenatalního vývoje (Marvan et al., 2007) sestupují tříselným kanálem do slepého výběžku *peritonea* (pobřišnice) a následně ven z dutiny břišní do kožovitého vaku – šourku (*scrotum*). Vedení varlete je zajištěno vazivovým pruhem označovaným jako varletní kormidlo (*gubernaculum testis*). Tento proces sestupu je nezbytný pro správný vývoj spermií, neboť v šourku je o 3 – 4 °C nižší

teplota než v dutině břišní (König, 2002). U přežvýkavců jsou varlata uložena svou dlouhou osou svisle, hlava nadvarlete směřuje dorzálně a ocas nadvarlete ventrálně (Marvan et al., 2007).

Scrotum býka je dlouhé a u báze zřetelně zaškrcené. Nesvrchnější vrstvou je tedy kůže, která obsahuje četné mazové a potní žlázy a je lehce ochlupena. Také se na obou polovinách vyskytují rudimentální pastruky (Frandsen et al., 2009). Podkožní svalová vrstva kůže (*tunica dartos*) tvoří mediálně mezi varlaty přepážku (*septum*). Dále se zde vějířovitě zakončuje odštěp vnitřního šikmého svalu (*musculus obliquus internus abdominis*), tzv. *musculus cremaster* (zvedač varlete; König, 2002). Tyto dva útvary mají významnou termoregulační funkci. Při nízkých teplotách hladkosvalové buňky smršťují povrch šourku a příčná svalovina přitahuje varlata dorzálně k tělu, při vysokých teplotách vnějšího prostředí je tomu naopak (Marvan et al., 2007). Další vrstva je díky sestupu tvořena vychlípeninou příčné břišní povázky, která přechází v povázku varlete (*fascia spermatica*). Též se přes tříselný kanál vychlipuje peritoneum (pobřišnice), respektive jeho část označovaná jako poševní obal (*processus vaginalis peritonei*; Frandsen et al., 2009). Ten je tvořen ze dvou listů: zevního a vnitřního (*lamina parietalis, lamina visceralis*), mezi nimi je poševní dutina (*cavum vaginalis*), která je spojena s pobřišnicovou dutinou a je též vyplněna serózní tekutinou (Marvan et al., 2007).

Vlastní povrch varlat tvoří kolagenní *tunica albuginea* (bělavý obal) s velmi bohatou cévní pletení (*stratum vasculare*; Věžník et al., 2004). Z tohoto obalu vycházejí do žlutohnědého parenchymu vazivové přepážky (*septula testis*), které jej dělí asi na 100 – 300 lalůček (*lobuli testis*) jehlanovitého tvaru. Přepážky se v podélné ose varlete opět setkávají a tvoří vazivový pruh, tzv. *mediastinum* (Marvan et al., 2007). Tím je zajištěna ochrana a integrita gonády (Reece, 1998). Právě pevnost a intenzivní inervace bělavého obalu vede k vysoké bolestivosti při zvětšení objemu varlete (např. při zánětech; König, 2002).

Sledováním vývoje varlat a přídatných pohlavních žláz pomocí ultrasonografie a endokrinologickým profilem u dospívajících býků se zabýval Chandolia et al.

(1997). Na základě těchto parametrů by při diagnostice u mladých býků bylo možné včasné detekovat vývojové abnormality a potenciálně zhoršenou plodnost.

Vzhledem k tomu, že existuje korelace mezi různými rozměry varlat (šourku) a plodností, byla vyvinuta tzv. testikulární biometrie, která by měla včas odhalit vrozené změny varlat a jejich funkční odchylky (Věžník et al., 2004). Hoflack et al. (2006) hodnotili kvalitu ejakulátu u holštýnského a belgického modrého skotu. Zjistili, že parametry u masného plemene jsou výrazně horší a to především u inbredních linií. U těchto býků byly pozorovány menší rozměry šourku, takže jeho velikost se zdá být objektivním parametrem pro zařazení do plemenitby.

Lalůčky parenchymu varlete jsou vyplněny 2 – 5 semenotvornými kanálky (*tubuli semineferi contorti*), které začínají slepě při bázi lalůčku (König, 2002) a tvoří 73 – 81% z celkového parenchymu (Sharpe, 1994). Jsou výrazně stočené a vzájemně mezi sebou anastomózují. Na vrcholu lalůčku se spojují v krátký přímý kanálek (*tubuli semineferi recti*), který dále vede do mediastina a síťovitě se propojuje s dalšími přímými kanálky (Frandsen et al., 2009). Vzniká tak varleční síť (*rete testis*), ze které na hlavovém konci vystupuje 15 – 20 odvodných kanálků (*ductuli efferents testis*) procházejících přes tunicu albugineu do hlavy nadvarlete (Marvan et al., 2007).

Histologicky jsou semenotvorné kanálky tvořeny různými vývojovými stádii spermií, kterým se budu podrobněji věnovat v kapitole spermiogeneze, a dále podpůrnými Sertoliho buňkami. Ty svým širším koncem nasedají na okraj kanálku a jejich vrchol dosahuje až do lumenu (Reece, 1998). Jsou cípaté, protože stěny tvoří dutinky pro vyvíjející se spermie (Marvan et al., 2007). Desmozomním spojením s bazální membránou (bazální kompartment) a volným a těsným spojením sousedních buněk (adluminární kompartment) tvoří tzv. haemospermatickou bariéru, která kontroluje prostředí vně kanálku a zabraňuje prostupu spermií do intersticia. Další jejich funkcí je sekrece tekutiny, která zajišťuje výživu vznikajících spermií. Sertoliho buňky mají i fagocytární aktivitu nutnou pro recyklaci neuvolněných spermií a reziduálních částí ze spermiogeneze. Také jsou potřebné pro proces dozrávání spermatid a jejich uvolnění do lumenu kanálku (Russel et al., 1993). Zprostředkovávají také působení folikulostimulačního hormonu (FSH; Shrape, 1994)

a jejich prostřednictvím je možný i přenos potencionálních toxinů, které se dostávají z bazální části do adluminárního prostou a působí tak přímo na pokročilá vývojová stádia spermií (Věžník et al., 2004).

Prostor mezi semenotvornými kanálky je vyplněn intersticiální tkání s Leydigovými buňkami, jejichž funkcí je tvorba androgenů (testosteronu). Zaujímají asi 4,8% varletního parenchymu (Sharpe, 1994). Vývodné cesty varlete vystýlá epitel s kinociliemi, mikroklky a buňky s nižší sekreční aktivitou: kinocilie posouvají nepohyblivé spermie do nadvarlete, mikroklky resorbují metabolity z metamorfózy a sekreční buňky vylučují pro spermie živiny (Marvan et al., 2007).

Nadvarlata (*epididymis*)

Nadvarle je tvořeno ze třech částí: hlavy (*caput epididymis*), těla (*corpus epididymis*) a ocasu (*cauda epididymis*). Hlava je pevně spojena s varletem. Ústí do ní 15 – 20 odvodných kanálků varlete, které se na přechodu hlavy a těla spojují v jednotný vývod nadvarlete (*ductus epididymis*). V této části spermie dozrávají a získávají schopnost pohybu. Tělo je podlouhlé a z boku přiléhá na testis, se kterým je volně spojeno. U ventrálního konce se postupně rozšiřuje a přechází v ocas (Frandsen et al., 2009).

Ductus epididymis je zprohýbán v meandrovité kličky spojené řídkým vazivem. Celková délka u býka dosahuje až 50 m (Najbrt, 1982). Epitel je díky mikroklkům schopný resorbovat sekret varlat (především v hlavě) a neejakulované spermie. Zároveň vyměšuje sekret vlastní, který je mírně kyselý (pH = 5,6 – 6,6), obsahuje malé množství kyseliny citrónové, fruktózy, volných aminokyselin a nebílkovinného dusíku, antioxidanty, zajišťuje imunní obranu (Robaire a Viger, 1995). Velmi významnou roli zde hraje i vitamin E, jak prokázali Bensoussan et al. (1998). Je nutný pro udržení životaschopnosti spermií a má vliv i na funkci a strukturu epiteliálních buněk nadvarlete.

Sekret také blokuje motilitu (nízká koncentrace chloridových iontů a sodíku, vysoká koncentrace draslíku) a tím i vyčerpání energetických zásob (Robaire a Viger, 1995). Metabolismus spermií je dále tlumen i nižší teplotou a nižší hladinou kyslíku,

za současně vyšší koncentrace oxidu uhličitého (Věžník et al., 2004), což vede k udržení životnosti a oplozovací schopnosti spermií po dobu 2 – 3 týdnů (Marvan et al., 2007). Tento stav se označuje jako anabióza (Věžník et al., 2004).

V ocasu nadvarlete se *ductus* postupně rozšiřuje a slouží jako rezervoár pro spermie připravené k ejakulaci (Věžník et al., 2004). Transport zajišťuje svalová vrstva stěny vývodu. Peristaltické stahy hladkosvalových buněk vypuzují gamety do chámovodu (König, 2002).

Bialy and Smith (1958) zjišťovali procentické zastoupení spermií v různých částech nadvarlete u 46 býků. Zjistili, že hlava obsahuje 36,24 %, tělo 18,34 % a ocas 45,42 % (8 806 milionů spermií).

Chámovody

Chámovod (*ductus deferens*) je silnostěnná párová trubička, která pomocí svalové vrstvy transportuje spermie z ocasu nadvarlete do močové trubice (Marvan et al., 2007). Její délka se u býka pohybuje okolo 13 – 15 cm, šířka v rozmezí 12 – 15 mm (Najbrt, 1982). Do ocasu nadvarlete do úrovně poloviny varlete má klikatý průběh, poté se napřimuje a stoupá tříselným kanálem dorzálně do dutiny břišní (König, 2002). Chámovod v této oblasti prochází tzv. semenným provazcem (*funiculus spermaticus*), což je kuželovitý útvar, který svou rozšířenou základnou začíná na hlavně nadvarlete (Frandsen et al., 2009). V něm je *ductus deferens* doprovázen varleční tepnou, žílou a nervem, lymfatickými cévami a zdvihačem varlete (Reece, 1998). Vše je spojeno řídkým vazivem a obaleno útrobním listem poševního obalu (Marvan et al., 2007). Varleční žíla je zde bohatě rozvětvena a svými jemnými cévami objímá kličky varleční tepny. Tento mechanismus má velký význam pro ochlazování arteriální krve putující do varlete, tedy pro zajištění optimální teploty pro spermiogenezi (König, 2002).

Po vstupu do břišní dutiny semenný provazec končí. Cévy a nervy pokračují dorzálním směrem po stěně dutiny až k jejímu stropu, zatím co *ductus deferens* se stáčí dorzokaudálně k pánvi (Frandsen et al., 2009). Před pánevním vstupem oba chámovody mediálně konvergují a přes dorzální plochu močového měchýře kaudálně

pokračují k močové trubici (*urethra*). U přežvýkavců se před vstupem do urethry chámovody rozšiřují v ampule (König, 2002). Jejich ztlustělá sliznice obsahuje četné rozvětvené tubulózních žlázy, které produkují viskózní hlenovitý sekret. Ten je součástí ejakulátu (Frandsen et al., 2009) a stimuluje metabolismus spermií (Věžník et al., 2004). Obsahuje vysokou hladinu fruktózy, kyseliny citrónové, sodík, draslík a vápník (Hafez a Hafez, 2000). Za ampulemi se chámovody opět zužují, probíhají tělem předstojné žlázy (prostaty) a spojují se s vývody měchýřkovitých žláz, čímž vzniká krátký ejakulační kanálek (*ductus ejaculatorius*). Ten se na slizniční vyvýšenině močové trubice - semenném hrbolku otevírá a vstupuje do močové trubice ihned po jejím vyústění z močového měchýře (Marvan et al., 2007).

Přídavné pohlavní žlázy (*glandule genitales accesoriae*)

Mezi přídavné pohlavní žlázy patří měchýřkovité žlázy, žláza předstojná (prostate), Cowperovy (bulbouretrální) žlázy a již zmiňované ampule chámovodů (Reece, 1998). Funkcí těchto orgánů je sekrece semenné plazmy. Ta je důležitá z několika důvodů: ředí spermie a napomáhá jejich transportu, upravuje prostředí v močové trubici samce a v pohlavním aparátu samice (Marvan et al., 2007), brání předčasné kapacitaci (Věžník et al., 2004) a díky obsahu fruktozy spermie vyživuje. Tento cukr je výhodný především proto, že pro jeho přechod do spermatické buňky není třeba energie (Reece, 1998). Produkce semenné plazmy je závislá na hormonální aktivitě varlat (hladina testosteronu) a její sekrece na době ejakulace (Věžník et al., 2004).

Měchýřkovité žlázy (*glandule vesicularis*)

Měchýřkovité žlázy jsou párové a vznikají jako vychlípenina kaudálního konce chámovodu, proto se také nachází přímo vedle ampulí (Frandsen et al., 2009). Mají tvar tupého trojúhelníku a u býka jsou značně rozsáhlé (König, 2002). Měří 10 – 13 cm (Marvan et al., 2007), takže je možné je rektálně napalповat (Najbrt, 1982). Struktura je kompaktní a lalůčkovitá (Věžník et al., 2004). Vně žlázy jsou zřetelné dutinky ve nitrolalůčkových a mezilalůčkových vývodech, kde se shromažďuje bělavý sekret (Marvan et al., 2007). Ten je aktivně vylučován pomocí hladkosvalových vláken v intersticiálním pojivu (Frandsen et al., 2009).

Sekret měchýřkovitých žláz tvoří u býka 10 – 40 % celkového objemu ejakulátu. Obsahuje cukry, bílkoviny, volné aminokyseliny, kyselinu mléčnou a citrónovou, kyselou a alkalickou fosfatázu a anorganické látky (Věžník et al., 2004; Hafez a Hafez 2000). Je mírně zásaditý: pH=8 (Marvan et al., 2007).

Žláza předstojná (*prostate*)

Prostate je svalově žláznatý nepárový orgán, který prstencovitě objímá dorzální část močové trubice (Marvan et al., 2007). Skládá se z těla (*corpus prostaticus*) a roztroušené části (*pars disseminata prostaticae*, (Frandsen et al., 2009), která je u býka ve stěně urethry (König, 2002).

Předstojná žláza produkuje řídký mlékovitý sekret charakteristického zápachu, který je odváděn četnými vývody do močové trubice (Najbrt, 1982). Na celkovém objemu ejakulátu skotu se podílí ze 4 – 6% a je kyselějšího charakteru: pH = 6,5. Obsahuje adrenalin a prostaglandiny (Věžník et al., 2004), které interagují s hlenem děložního čípku a zlepšují tak jeho průchodnost. Dále mají vliv na kontrakce svaloviny dělohy a vejcovodů, což napomáhá transportu spermií k oocyту (Reece, 1998). Také obsahuje zinek, který stabilizuje chromatin (Björndahl a Kvist, 2010).

Bulbouretrální (Cowperovy) žlázy

Tyto párové žlázy jsou uloženy na rozšířené části uretery, tj. v místě jejího přechodu přes sedací hrbol (Marvan et al., 2007). Mají kulovitý tvar, jsou hladké, u býka 2 – 3 cm velké a v centru se nachází sběrná dutinka. Jedním vývodem ústí do močové trubice (Najbrt, 1982). Sekret bulbouretrálních žláz slouží k neutralizaci zbytků moči v uretře a částečně se podílí na lubrikaci. pH je zásadité: 7,5 (Věžník et al., 2004).

V semenné plazmě byl také potvrzen výskyt těchto hormonů: prostaglandiny, estrogeny, androgeny, FSH, LH, inzulin, glukagon, prolaktin, relaxin aj. (Mann a Lutwak-Mann, 1981). Z anorganických látek je významný i hydrogenuhličitan, který je nezbytný pro pohyblivost spermií a zúčastňuje se kapacitace (Rodriguez-Martinez, 2011).

Semenná plazma vytváří pro spermie zcela nové prostředí. Nejvýznamnější funkční roli hrají především proteiny, které tvoří až 90% objemu (Maujunath et al., 1994). Některé se vážou přímo na povrch spermií (Leahy a Gadella, 2011). Mezi funkce semenných proteinů patří: regulace kapacity, vazby na ovidukální epitel před hyperaktivací, modulace imunitní odpovědi v děloze a interakce spermie-oocyt a jejich fúze (Rodriguez-Martinez et al., 2011).

Skupina proteinů, které se vážou na povrch spermie, aby stabilizovaly její průchod samičím reprodukčním traktem, zároveň inhibují oplození. Označují se proto jako dekapacitační faktory (Gibbons et al., 2005). Neméně podstatou roli hrají i proteiny nutné k navázání na oocyt, bez kterých by nemohlo dojít k oplodnění (Lu et al., 2011).

V semenné plazmě je nejvíc zastoupen (50-70 %) BSP (bovinní spermie vázající protein; Fan et al., 2006). Vylučuje se v sekretu semenných váčků a mezi jeho základní biochemické vlastnosti patří vazba na heparin, cholin, glykosaminoglykany a lipoproteiny o nízké a vysoké hustotě (LDL – low density lipoprotein, HDL – high density lipoprotein; Manjunath et al., 1989). Díky tomu zajišťuje cholesterolový a fosfolipidový odtok z membrány spermie během kapacity (Desnoyes a Manjunath, 1992).

Mechanismus je následující: BSP se naváže na cholinové fosfolipidy membrány a zlepšuje tak průchod spermie pohlavní soustavou samice. Při styku s ovidukální tekutinou dochází k charakteristickým změnám na membráně a následné kapacitaci (Manjunath a Trérien, 2002). Bylo prokázáno, že právě HDL obsažený ve vejcovodném sekretu je nezbytný pro iniciaci tohoto děje (Thérien et al., 1997). V *in vitro* prostředí má obdobnou funkci heparin (Thérien et al., 1997).

Manjunath et al. (2002) předpokládají, že žloutková ředidla zabraňují negativním dopadu BSP na spermie, které jsou určeny pro další uchování. Změny na membráně mohou být pro kryokonzervaci fatální. Žloutek obsahuje LDL, se kterým je BSP také schopen vazby. To znamená, že vazba BSP-spermie je nahrazena vazbou BSP-LDL a tím je funkce tohoto proteinu vyblokována.

Tannert et al. (2007) ve své práci prokazuje výskyt proteinu PDC-109, který je funkčně podobný BSP. Thepparat et al. (2012) zase zkoumali tektin-4 a potvrdili jeho vliv na motilitu spermií. Zdá se, že tento protein by mohl být využit jako marker neplodnosti býků. Další proteinové sloučeniny korelují s krevní plazmou: albuminy, globuliny, transferiny, cytokiny aj. (Manjunath et al., 1988).

Semenná plazma ještě obsahuje exosomy, které modelují imunitní odpověď a jsou důležité pro inhibici imunitní reakce v děloze a tím zvyšují její toleranci a oplozovací schopnost spermií (Sostaric et al., 2008).

Pyj (penis)

Vlastní kopulační orgán (penis) slouží k dopravě semene do pohlavního aparátu samice, proto má zvláštní strukturu, která při pohlavním vzrušení umožňuje jeho vysunutí a zpevnění tak, aby mohlo dojít ke koitu (Reece, 1998). Pyj býka měří až 1 metr a průměr se pohybuje okolo 3 cm (Najbrt, 1982). Má válcovitý tvar a skládá se z kořene, těla a žaludu (König, 2002).

Kořen penisu (*radix penis*) je pomocí dvou ramen připevněn k sedacím kostem (Marvan et al., 2007). Ramena se spojují v tělo (*corpus penis*) a v krajině hráze se kraniálně stáčí do mezinoží (König, 2002). V oblasti kaudálně za šourkem se prohýbá a tvoří tzv. esovitou kličku (Frandsen et al., 2009). Pokračuje po ventrální straně dutiny břišní a v krajině pupku přechází ve volnou část (König, 2002), která v klidovém stavu končí v kaudální třetině předkožky (Frandsen et al., 2009). Pyj samotný je zakončen nevýrazným žaludem (*glans penis*), ten je od těla penisu zřetelně oddělen zúženým krčkem (*collum glandis*, Věžník et al., 2004). Na něj nasedá korunka (přilbice, *corona glandis*) s hrotem viditelně stočeným doleva. Dále je zřetelná prohlubeň (*fossa glandis*), ve které ústí močová trubice (König, 2002). Ta už od úrovně krčku, po pravé straně žaludu, vystupuje na povrch (Marvan et al., 2007).

Vnitřní struktura penisu je tvořena topořivými tělesy (*corpora cavernosa*), která jsou již součástí ramen kořene a posléze též splývají (König, 2002). Srůst není úplný a tak je na jejich dorzální straně zřetelný mělký žlab, kterým procházejí cévy

a nervy a na ventrální straně hluboký žlab, do kterého se vkládá houbovitě těleso (*corpora spongiosum*) obalující močovou trubici (Frandsen et al., 2009). Býk má penis fibroestického typu (König, 2002), to znamená, že převládá vazivová tkáň nad erektilní. Takový penis má tuhou konzistenci i v ochablém stavu (Najbrt, 1982). Topořivá tělesa pyje jsou totiž obalena *tunicou albugineou*, ze které vystupují četná septa a tvoří tak hustou vazivovou síť (Reece, 1998). Vzniklé dutinky uvnitř těles jsou vystlány endotelem a představují vlastní topořivou tkáň. Houbovitě těleso má strukturu podobnou ale bělavý obal je slabší a přepážky tenčí (Marvan et al., 2007).

Volná část pyje je uložena v kožní duplikatuře - předkožce (*praeputinum*, Reece, 1998). Jedná se o 25 – 40 cm dlouhý vak (Najbrt, 1982), jehož vnější list je výrazně ochlupený, především v oblasti předkožkového otvoru (König, 2002). Vnitřní list má charakter růžové sliznice (Marvan et al., 2007), která u přežvýkavců neobsahuje žlázy tvořící smegma (výměšek s lubrikační funkcí). Po obvodu se upínají párové předkožkové svaly: kaudální, které stahují při erekci předkožku z penisu a kraniální, které ji po koitu zase přetahují zpět (Frandsen et al., 2009).

Vlastní penis má také pomocné svaly: napřimovače pyje, zatahovače pyje a svaly močové trubice (Reece, 1998). Napřimovač pyje (*musculus ischiocavernosus*), je párový příčně pruhovaný sval odstupující od sedacího oblouku k ramenům a kořenu penisu. Při smrštění stahuje radix ke spodině pánevní, což vede k uzavření žil penisu a následné erekci. Zatahovač pyje (*musculus retractor penis*) je též párový hladký sval, který odstupuje od ocasních obratlů, vede po stěnách anu (konečníku) a upíná se na esovitou kličku těla penisu (König, 2002). Funkcí těchto svalů je zatažení ochablého penisu zpět do předkožky (Reece, 1998) a uvedení pyje do správné polohy pro páření (Marvan et al., 2007). Mezi svaly močové trubice patří vlastní sval močové trubice (*musculus urethralis*) a sval bulvy močové trubice (*musculus bulbospongiosus*), který u býka končí v proximální třetině penisu. Tyto svaly svými peristaltickými pohyby napomáhají transportu semene močovou trubicí (Reece, 1998).

3. 2. Fyziologie pohlavní soustavy býka

3. 2. 1. Erekcce a ejakulace

Erekcce je děj, který řídí nervový systém. Vlivem vyhodnocení vnitřních a vnějších podmětů je spuštěna řada reflexů potřebných k uskutečnění páření (Najbrt, 1982). Nervové centrum pro erekci a ejakulaci je umístěno v nejkaudálnější oblasti bederní míchy (Věžník et al., 2004). Kromě autonomních nervových vláken zakončených ve varlatech, penisu a přídatných pohlavních žlázách jsou v žaludu penisu přítomna zakončení stydkých míšních nervů. Senzorické dráždění penisu tedy vede k přenosu signálu aferentní nervovou dráhou do reflexního centra erekce a ejakulace (Reece, 1998).

Mechanismus ztopoření penisu, respektive jeho vysunutí v důsledku vyrovnání esovité kličky, je založen na naplnění kavernózní dutinek topořivých těles krví (Frandsen et al., 2009). Průtok krve je regulován svalovými polštářky ve stěnách přívodných tepen, které svou dilatací rozšiřují lumen (Marvan et al., 2007). Městnáním tekutiny v kavernách dochází ke zvýšení tlaku a stlačení žil, takže je zároveň zamezeno odtoku (Reece, 1998). I houbovitě těleso se postupně naplňuje, což je významné pro udržení otevření močové trubice a následné ejakulace (Marvan et al., 2007). Ta je zajištěna pomocí svalových buněk ve stěnách vývodných cest (König, 2002). Po vysemenění penis opačným procesem zase ochabuje a zasunuje se do předkožky (Marvan et al., 2007).

Při ejakulaci nejprve dochází k uvolnění prespermatické frakce, sekretu bulbouretrálních žláz. Následuje transport spermií z ocasu nadvarlete do močové trubice za současného uvolnění prostatického výměšku a výměšku ampulí chámovodu. V konečné fázi se objevuje sekret semenných váčků (Rodriguez-Martinez, 2011) a výrazně klesá obsah spermií (Rodriguez-Martinez et al., 2009). Celkový objem ejakulátu u býka je minimálně 4 ml (Věžník et al., 2004).

3. 2. 2. Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces v semenotvorných kanálcích varlete, při němž vznikají ze zárodečných kmenových buněk spermatogonií (gonocytů) spermie. Začíná během pohlavního dospívání, u býka je to ve věku asi 7. – 9. měsíců. První část, zahrnující především přeměnu jádra a růst buňky, označujeme jako spermatocytogenezi. Ta se ještě dělí do tří fází: rozmnožování, růst a zrání, kdy buňky postupně migrují od bazální membrány k lumenu kanálu (Mravan et al., 2007; Věžník et al., 2004; Reece, 1998). Toto období trvá u býka 21 dní, samotná meióza pak dalších 23 dní (Johnson, 1994). Po ní následuje metamorfóza kulaté spermatické buňky ve spermii neboli spermiohistogeneze trvající 17 dní (Johnson, 1994). Autoři se ale v tomto dělení rozcházejí. Dle Sharpa (1994) je cyklus členěn takto: premeiotická fáze 60% doby trvání (36,5 dní), meiotická fáze 12,8% (7,8 dne) a postmeiotická fáze 27,2% (16,5 dní; celkem 60,8 dní).

Spermatogonie A (kmenové buňky) jsou uloženy u bazální membrány semenotvorných kanálků a mají diploidní počet chromozomů v jádře. Ve fázi množení se tyto buňky mitoticky rozdělí (A_1 , A_2 , A_3). Jedna dceřiná buňka zůstává u membrány jako základ pro další dělení a druhá, více diferencovaná intermediální (IM) spermatogonie pak putuje do adluminárního kompartmentu. Po posledním z mnoha mitotických dělení vzniká z IM spermatogonie spermatogonie typu B (B_1 ; Sharpe, 1994). Na proliferaci, diferenciaci a také apoptóze spermatogonií se podílejí tyto faktory: GDNF (neurotrofický faktor odvozený od gliální buněčné linie), SCF (faktor kmenových buněk), kyselina retinová, p53 (protein regulující expresi genů pro růst a apoptózu buněk), Bax (proapoptický faktor), Bcl-XL (protiapoptický faktor; De Rooji a Russell, 2000).

Fáze růstu je charakteristická růstem B-spermatogonií (B_2). Výsledkem jsou primární spermatocyty neboli spermatocyty I. řádu, které se nacházejí ve střední vrstvě. Po dosažení finální velikosti je zahájena fáze zrání a s ní první meiotické dělení. Z jednoho spermatocytu I. řádu vznikají 2 spermatocyty II. řádu (sekundární spermatocyty, prespermatidy). Následuje druhé meiotické dělení a vznik spermatid s haploidním jádrem (Mravan et al., 2007; Věžník et al., 2004; Reece, 1998).

Během spermiogenezise se sférická spermatida díky změnám v jádře a v cytoplazmě mění na potencionálně pohyblivou spermii. V prvním stádiu dochází k aktivaci Golgiho aparátu (GA), ze kterého vzniká akrozom, proto se tato část přeměny označuje jako Golgiho fáze. GA se mění v jednu celistvou vakuolu (proakrozomální vakuola) vyplněnou homogenní hmotou z původních granul (proakrozomální granulum). Postupným růstem akrozom nasedá na jádro a svým vnitřním listem kopíruje jadernou membránu, zatímco vnější listem se přibližuje k plazmatické membráně. Centrioly a mitochondrie se přesouvají na opačný pól jádra (Mravan et al., 2007; Věžník et al., 2004; Reece, 1998).

Stádium akrozomové čapky zahrnuje další růst proakrozomálního váčku, až se z něj stává vlastní akrozom s hydrolytickými enzymy. Oplošťuje se a pokrývá celou proximální polovinu jádra. To se protáhlo do ovoidního tvaru. Jeden z centriolů (proximální) přikládá k jeho druhé straně a druhý (distální) centriol se orientuje více k periférii buňky (na téže pólu). Proximální centriol tvoří implantační ploténku a segmentované chordy hlavice bičíku. Z distálního centriolu roste osová vlákna bičíku (Marvan et al., 2007; Věžník et al., 2004; Reece, 1998).

Fáze tvorby kaudální manžety probíhá současně s předchozím stádiem. Od nukleárního prstence se organizují mikrotubuly a stahují cytoplazmu směrem od akrozomu. Cytoplazma se tím postupně přesouvá k budoucímu bičíku, buňka se prodlužuje. I jádro se protahuje, dorzoventálně oplošťuje a kondenzuje. Histony jsou nahrazeny kyselými protaminy (Ward, 2011).

Konečnou fází je stádium zrání. Mitochondrie se spirálovitě přikládají k osovému vláknu bičíku a vzniká mitochondriální oddíl. Dochází ke ztrátě kaudální manžety, dokončuje se vývoj akrozomu (dehydratace) a bičíku (Tanaka and Baba, 2005). Redundantní cytosol a organely (Golgiho komplex, endoplazmatické retikulum, ribozomy, lysozomy, peroxizomy) jsou odloučeny, Sertoliho buňky tyto odpadní části fagocytují. Vzhledem ke ztrátě jmenovaných organel není spermie schopna *de novo* produkce proteinů (Gadella et al., 2008). Na bičíku však zůstává tzv. protoplazmatická kapka, která obsahuje přebytečné mitochondrie a zbytky z GA. Tento cytoplazmatický můstek je v syncytiu potřebný pro komunikaci s podpůrnými buňkami (Weber

a Russell, 1987). Následně je spermie uvolněna ze Sertolihových buněk. Vzhledem k tomu, že je sama spermie zatím nepohyblivá, je do nadvarlete odplavena tekutinou a kontrakcemi kanálků, které zajišťují sympatická vlákna autonomního nervového systému (Hodson, 1965, Obr.: 2)

Při průchodem nadvarletem je protoplazmatická kapka posouvána po bičíku až dojde k její úplné ztrátě (Sutovsky and Lovercamp, 2010). Spermatická buňka mění metabolické dráhy a získává tak schopnost přímočarého pohybu, bez něhož není schopna přirozeného oplození (Dacheux et al., 2005). Bylo zjištěno, že k zajištění této schopnosti je třeba, aby se spermie vyskytovala v hlavě a těle nadvarlete minimálně 2-3 dny a v ocasu 3,6 – 5,2 dne (Amann and Schanbacher, 1983).

Dalším kritériem, pro dozrání spermie a získání schopnosti oplození, je příprava akrozomálních molekul zapojených do akrozomální reakce a interakce zona pellucida-spermie. Vzhledem k tomu, že tyto úpravy probíhají v nadvarleti, nejsou již pod kontrolou Sertolihových buněk ale dochází k nim v důsledku působení sekretu kanálků (Dacheux et al., 2003).

Okolo 70% celkové produkce spermií je dále uloženo v ocasu nadvarlete. Bylo zjištěno, že až 80% vytvořených spermií je posléze fagocytováno vývodním systémem nebo odchází do močové trubice, ze které jsou vyloučeny močí (Reece, 1998).

Celková délka spermatogeneze u býka je tedy 61 dní (Johnson, 1994). Kontinuální produkci spermií zajišťuje tzv. spermatogenní cyklus. U býka dochází k mitotickému dělení monocytů každý 13,5 dní (Johnson et al., 1994). Semenotvorný kanálek je rozdělen přibližně na 14 segmentů a každý tento segment má postupně posunutý vývoj spermií cca o jeden den, takže dochází k neustálé produkci spermií v tzv. spermatogenních vlnách. Aktivace segmentů probíhá z centra kanálku směrem k *rete testis*, kde je aktivita nejvyšší (Reece, 1998). Spermatoogenní vlnu lze rozdělit do 8 fází dle Amana (1970) nebo do 12 dle Berndtsona a Desjardina (1974), a to podle histologických nálezů různých vývojových fází spermatogenních buněk v semenotvorném kanálku.

Pro uvolnění spermií ze Sertoliho buněk je třeba 4,5 cyklu, každý kanálek je schopný prodělat více než 15 vln (Sharpe, 1994). Denní produkce spermií na gram varletního parenchymu se pohybuje okolo 12×10^6 ($11 - 13 \times 10^6$; Aman, 1976). Celková produkce spermií se odvíjí od počtu Sertoliho a kmenových buněk a délky cyklu, efektivita spermatogeneze pak podle poměru spermatogonií B a počtu konečných spermií (Johnson, 1986). Na gram varlat býka připadá asi 28 milionů Sertoliho buněk (Sharpe, 1994), celková efektivnost je oproti jiným druhům malá ale větší než u člověka (Johnson et al, 2000). S věkem se denní produkce zvyšuje a maxima býk dosahuje přibližně v 7 letech stáří (Reece).

3. 2. 3. Neurohumorální řízení pohlavních funkcí býka

Pohlavní funkce býka jsou řízeny pomocí nervové a hormonální složky. Regulační mechanismy jsou geneticky podmíněné ale částečně ovlivněné vnějšími faktory. Nadřízeným centrem celého systému je centrální nervová soustava (CNS). Řízení pohlavních funkcí začíná v mozkové kůře, která zpracovává nejen smyslové vjemy z vnějšího prostředí ale i vnitřní podněty. Tyto signály jsou poté nervovými drahami přeneseny do hypotalamu (Věžník et al., 2004; Reece, 1998, Amann, 1970).

Hypotalamus na základě impulzů z nadřazeného centra produkuje GnRH (gonadotropin releasing hormon). Jedná se o dekaeptid, který se vylučuje pulzačně a je portálním krevním systémem transportován do adenohipofýzy, kde podněcuje uvolňování gonadotropních hormonů. Hladina GnRH je ovlivňována zpětnými vazbami (feedback) steroidních gonadálních hormonů. Jejich nízká hladina brzdí uvolňování GnRH a vysoká naopak tlumí (Reece, 1998).

Adenohipofýza (přední lalok hypofýzy) působením GnRH sceneruje glykoproteinové gonadotropní hormony: ICSH (intersticiální buňky stimulující hormon) u samic označovaný jako LH (luteinizační hormon) a FSH (folikuly stimulující hormon; Frandson et al., 2009).

ISCH se krevním oběhem dostává k Leydigovým buňkám intersticiálního parenchymu varlat. Zde se váže na receptory a prostřednictvím adenocyklázy vyvolá zvýšení tvorby cAMP (cyklický adenosinmonofosfát). Ten aktivuje vazebné proteiny odštěpením proteokinázy, čímž je vyvolána produkce androgenů. FSH se obdobným způsobem váže na receptory Sertoliho buněk. Výsledek buněčné reakce je ale podpora syntézy RNA a následná produkce proteinu vázajícího androgeny (ABP – androgen binding protein) a inhibinu (Věžník et al., 2004).

Inhibin je peptid, který se pravděpodobně lokálně zúčastní meiotické inhibice. Dále zpětnou vazbou koriguje uvolňování FSH. ISCH je pro spermiogenezi vyžadován nepřetržitě kvůli testosteronem podporované meióze. O'Donnell et al. (1996) na myších prokázali, že při vyblokování testosteronu nejsou spermatidy schopné dokončit spermiogenezi, pravděpodobně kvůli ztrátě adheze mezi Sertoliho buňkami a spermatidami.

FSH je nutný pro zahájení (znovu obnovení) spermiogeneze, jak bylo prokázáno u primátů (Plant a Marshall, 2001) neboť působí jako meiotický faktor pro Sertoliho buňky (Heckert a Griswold, 2002). V této souvislosti lze zmínit i působení T3 (trijódthronin, hormon štítné žlázy) a IGF (insulin growth factor) - látky, které mají velký význam v metabolismu a růstu organismu (França et al., 1995). Autoři se však shodují, že pouze testosteron je potřebný ke kompletnímu udržení spermiogeneze (McLachlan et al., 1995; Singh et al., 1996), avšak FSH může napomáhat stimulaci během spermiogeneze. Např. Baccetti et al. (1997) prokázali zvýšení cytostrukturálních parametrů spermií neplodných samců při exogenním podávání FSH. Naopak u myši s knocautovanou produkcí FSH byly zjištěny poruchy obměny histonů za protaminy, což vedlo ke špatné kondenzaci jádra (Krishnamurthy et al., 2000). FSH tedy udržuje fyziologický průběh spermatogeneze kvalitativně, kdežto testosteron kvantitativně (Russell et al., 1993).

Jak už bylo řečeno, Leydigovy buňky produkují androgeny, z nichž nejvýznamnější je testosteron. Ten přechází do semenotvorných kanálků v receptorech Sertoliho buněk se váže na ABP. Tento komplex se uvolňuje do lumenu kanálku a podporuje meiotický proces během spermiogeneze. Do krevní

plazmy testosteron přechází navázaný na transportní protein β -globulin (TEBG). Za 15 – 30 minut se testosteron opět uvolňuje a váže se na cílové tkáně nebo je degradován v játrech a vyloučen (Věžník et al., 2004)

Účinky testosteronu jsou pro samčí pohlaví nezbytné. Již embryonálně determinuje vývoj a růst pohlavních orgánů, řídí sestup varlat, rozvoj sekundárních pohlavních znaků (býčí šije, širší čelo, hlubší hlasový projev atd.), ovlivňuje sekreční aktivitu přídatných pohlavních žláz, udržení libida a sexuálního chování. Metabolický účinek je anabolický, což vede k výraznějšímu osvalení, zvýšenému růstu kostí, silnější kůži, lepší konverzi živin a nižšímu ukládání tuků (Saez, 1994)

Carreau et al. (2011) tvrdí, že významnou úlohu při vývoji spermií během spermiogeneze mají i estrogény. Ve své práci publikují, že buňky varlete obsahují funkční aromatázy, které ireverzibilně konvertují androgeny na estrogény. V pokus byly použity myši s knocautovaným genem pro aromatázu. Výsledkem byla sterilita nebo porušená spermiogeneze ale zatím přesně není znám mechanismus. Při nadměrné expresi aromatázy byla naopak zjištěna hyperplazie Leydigových buněk a abnormální spermiogeneze.

Estrogény mají podle Hess et al. (2001) také důležitý vliv na resorpční funkci epitelu nadvarlete. U lidí a králíků byly v kanálcích nadvarlete objeveny receptory na oxytocin, sloužící ke spuštění kontrakcí hladkosvalových buněk. Tyto receptory jsou pravděpodobně také regulovány estrogény. Při změnách hladin steroidů u myši byly prokázány v transportu spermií (Filippi et al., 2002).

3. 3. Spermie

(Obr. 3, Obr. 4)

3. 3. 1. Morfologie

Samčí pohlavní buňka se skládá ze tří základních částí: hlavičky, krčku a bičíku. Hlavička má přibližně tvar tenisové rakety, u býka je asi 9,11 μm dlouhá a 5,05 μm široká. Základem je jádro s haploidním počtem kondenzovaných

chromozomů a vlastní membránou bez pórů. Na tu nasedá čepičkovitý útvar označovaný jako akrozom, zasahující do 52% délky hlavičky (anteriorní část hlavičky). Je tvořen vnitřní a vnější membránou, mezi kterými se nachází akrozomální hmota. Na kaudálním konci se akrozom zužuje, tudíž obsahuje menší množství hmoty. Tato oblast je po barvení výrazně světlejší a označuje se jako ekvatoriální segment a je charakteristická měsíčkovitým vykrojením. Zbývající plocha hlavičky se nazývá postakrozomální kalíšek. Vzhledem k tomu, že je celá hlavička pokryta cytoplazmatickou membránou, dochází zde přes tmelovou hmotu k jejímu spojení s jadernou membránou. Díky tomu je posteriorní oddíl pevnější a odolnější (Barth a Oko, 1989).

Akrozom v apikální části prominuje a tvoří tzv. štítové tělísko (apical body). Ve stejné úrovni se nad jádrem vytváří štítová vakuola. Akrozomální hmota pochází z granul Golgiho aparátu. Obsahuje proteolytické enzymy jako např. hyaluronidázu a akrozin, které jsou důležité pro penetraci vajíčka při oplození (Meyers a Rosenberger, 1999).

Implantační rýha je bazální část hlavičky, která je konkávně vchlípena a zapadá do ní hlavice bičíku s implantační ploténkou, tvořenou proximální centriolem. Ten je plně zachován a dává vzniknout segmentovaným, později hladkým chordám. Axonema (soubor osových vláken) vzniká z přední části distálního tubulu, který je u zralých spermií už jen rudimentální. Komplex těchto útvarů se jmenuje krček spermie. Segmentované chordy nepřesahují oblast krčku a jsou tupě zakončeny. Příkladají se k hladkým chordám, se kterými jsou klínovitě spojeny (Barth a Oko, 1989).

Spojovací část neboli mitochondriální oddíl navazuje na krček. Centrálně vede dvojice mikrotubulů, která je obklopena devíti dvojicemi (dublety) filament, skládajících se z elementu A (plné vlákno) a elementu B (mikrotubul – duté vlákno). Ze všech elementů A vystupují dvě dyneinová raménka k elementu B sousedního dubletu. Periferně axonemu obíhá 9 hladkých chord. Spojovací část je typická uložením mitochondrií buňky, proto je tato část bičíku nejsilnější. Býčí spermie obsahuje asi 90 mitochondrií, které se spirálovitě vinou právě podél hladkých chord.

Distálně je mitochondriální oddíl morfoloficky ukončen trojbokým Jensenovým prstencem, druhé části distálního tubulu (Barth a Oko, 1989).

Hlavní oddíl bičíku je nejdelší úsek. Plynule zde pokračuje axonema a hladké chordy, které se ale postupně zužují, až zhruba ve $\frac{3}{4}$ délky končí. Povrch je kryt fibrinózní pochvou se dvěma protáhlými podélnými útvary, tvořící jakousi žebrovitou strukturu, zajišťuje pružnost během pohybu (Barth a Oko, 1989).

V koncové části ztrácí axonema své typické uspořádání. V dubletech jsou obě vlákna dutá a v druhé polovině jedno z dvojice úplně zaniká. Ramena též zanikají a počet a uspořádání vláken není konstantní (Barth a Oko, 1989).

3. 3. 2. Metabolismus a motilita

K oplození je nutný transport spermií až do vejcovodu, čili je nutný přísun ATP (adenosintrifosfát) pro dodání energie na pohyb. Kritické je také období kapacitace, kdy byly prokázány zvýšené potřeby tohoto energetického nosiče pro fosforylaci tyrosinu a následnou hyperaktivaci (Miki, 2007).

Tvorbu ATP, který je zdrojem makroergických vazeb zajišťují mitochondrie. Důležitost mitochondrií potvrzuje i fakt, že během maturace kulaté spermatidy v protáhlou spermii, dochází k výraznému snížení objemu buňky, ale mitochondrie jsou zachovány a to přímo v oblasti bičíku (Ruiz-Pesini et al, 2007).

Syntéza ATP může probíhat dvěma procesy: anaerobní glykolýzou nebo oxidativní fosforylací. Tyto dvě cesty od sebe nelze jednoznačně oddělit, neboť produkty glykolýzy jsou substrátem pro respiraci. Jsou na sobě tedy závislé a jejich poměr vychází z funkčního stavu spermií a okolního prostředí. Respirace je ale 15x účinnější než glykolýza, takže při dostatku kyslíku je preferována. Glykolýza ale převládá v období anabiózy, kdy je hladina kyslíku nižší (Miki, 2007).

Výzkumy na knocautovaných myších prokázaly, že glykolýza je pro oplození nepostradatelná, zatím co u oxidativní fosforylace tomu tak není. Z toho vyplývá,

že glykolýza může kompenzovat nedostatečnou respiraci a může tak činit spermii flexibilnější (Ford, 2006).

ATP je z mitochondriálního oddílu transportován do celého bičíku. ATPázová aktivita kontraktilních proteinů zajišťuje odštěpení fosfátu a tím i uvolnění chemické energie. Ta je využita k prodlužování a zkracování tubulinu v dubletech, čímž dochází k přeměně na energii mechanickou – pohybu bičíku. V samotném ejakulátu je motilita spermii nahodilá, až při proudění tekutiny vykazují typický přímočarý, progresivní pohyb za hlavičkou, při kterém rotují kolem své vlastní osy s frekvencí 3 – 15 otáček za sekundu. Při poškození spermie se spirálový pohyb postupně mění v plochý a kruhový až nakonec úplně ustává. U přežvýkavců byl popsán i tzv. hromadný nebo masový pohyb většího počtu spermii (Věžní et al., 2004).

3. 3. 3. Kapacitace

Spermie po ejakulaci nejsou ihned schopné oplodnění. K tomu je zapotřebí soubor biochemických a fyziologických změn na povrchu i vně spermie označovaných jako kapacitace (Abou-Halia a Tulsiani, 2009). Jen tak je spermie schopna rozeznat oocyt a vyvolat akrozomální reakci. Tyto změny spočívají především v odstranění proteinů semenné plazmy, glykoproteinů a molekulární reorganizaci v rámci cytoplazmatické membrány (Eddy a O'Brien, 1994). Tyto procesy byly poprvé popsány v roce 1951 Ausitnem a Changem (Abou-Halia a Tulsiani, 2009).

Pro kapacitaci je nezbytné specifické mikroprostředí, které umožní již zmíněné procesy. V *in vivo* prostředí je neúčinnější sekret vejcovodů říjné samice (Yanagimachi, 1994). Kapacitace lze dosáhnout i v *in vitro* prostředí a to v médiu s definovaným obsahem energetických látek, elektrolytů a albuminu, který vyváže cholesterol (Dow a Bavister, 1989).

Začátek kapacitace je druhově rozdílný ale nejdůležitější je prostředí vejcovodu, kde spermie přichází do kontaktu s řasinkovým epitelem a jeho sekretem (Sostaric et al., 2008b). Nejprve na spermie působí tzv. prekapacitační faktory.

Ty odstraňují dekapacitační faktory semenné plazmy a odhalují povrchové receptory, které umožňují vazbu na oocyt (Henkel a Schill, 2003).

Mezi molekuly regulující kapacitaci patří: hydrogenuhličitan, vápenaté kationty a albumin. Hydrogenuhličitan je v nižších koncentracích přítomný již v nadvarletí a semenné plazmě ale zásadní je jeho koncentrace v oviduktu (Rodriguez-Martinez, 2007). Aktivuje adenylcyklázy, které potencují produkci cAMP (cyklický anedosinmonofosfát), což vede k aktivaci PKA (proteinkináza A). Ta spouští signální kaskádu, která zvyšuje tyrosinovou fosforylaci bičíku a vede k hyperaktivaci spermie (Visconti et al., 2002). Tyto změny doprovází intenzivnější glykolýza (Arcelay et al., 2008). Později hydrogenuhličitan reorganizací lipidů membrány také zvyšuje její tekutost (Harrison a Gadella, 2003).

Funkcí extracelulárních vápenatých kationtů je redistribuce transmembránových proteinů (Aguas a Pinto da Sliva, 1983). Po aktivaci iontových kanálů se u skotu zvyšuje hladina intracelulárního vápník až 6x. Následuje interakce s kalmodulinem a přes kalmodulin dependentní ATPázu změny v motilitě spermie (Abou-Halia and Tulsiani, 2009). Albumin je významný pro vychytávání efluxovaného cholesterolu, má tedy vliv na potřebné změny v rámci membránové reorganizace (van Gestel et al., 2007).

Během ovulace získává oviduktální epitel potenciál pro masivní sekreci. To způsobuje uvolnění spermií, které zde byly navázány a probíhala u nich kapacitace. Hyperaktivace spermie brání zpětné adhezi na vejcovod (Henkel a Schill, 2003). Také je nepostradatelná pro penetraci oocytu, a její udržení je závislé na hladině extracelulárního vápníku (Carlson et al., 2007).

3. 3. 4. Akrozomální reakce

Akrozomální reakce probíhá na apikální špičce spermie, kdy fúzuje vnější akrozomální membrána s cytoplazmatickou membránou a uvolňují se proteolytické enzymy akrozomální hmoty potřebné k průniku spermie do vajíčka (van Gestel et al.,

2007). Pro průběh je nezbytné zvýšení hladiny vápenatých kationtů v cytosolu, které zahajují celou reakci (Baldi et al., 2009).

Bylo prokázáno, že nárůst vápníku ve spermii indukuje progesteron a EGF (epidermální růstový faktor), obě tyto látky se vyskytují v blízkosti kumulárních buněk oocyty (Wang et al., 2013). Meizel (1985) uvádí, že pro fyziologický průběh akrozomální reakce je nutné navázání spermií s ZP3 (zonulární protein) a vylití enzymů v místě vazby. To samé potvrzuje i Gadella (2012). Inoue et al. (2011) ale vyvrací nutnost interakce se zónou pellucidou, neboť na myším modelu k ní došlo i pouze v přítomnosti kumulární hmoty. Mezi další potvrzené faktory spouštějící reakci patří i komponenty ovidukální tekutiny a kumulárních buněk: prostaglandiny (Murase a Roland, 1996), glykosaminoglykany (Lenzet al., 1983) a glykoproteiny (Benoff et al., 1997). Co je také zajímavé, že k spontánní reakci došlo i při ochlazení spermií z 38° C na pokojovou teplotu (Flesch et al., 2001).

Jak už bylo řečeno předpokladem pro průběh reakce je dokončená kapacitace spermií, během které dochází ke změnám na membráně. Po zvýšení hladin vápníku a pH (Arnoult et al., 1996) v ně buňky následuje nejprve vezikulace způsobená lysofosfatidilcholinem (Tarin a Trounson., 1994) a poté docking (těsná adheze) membrán. To nakonec vede k úplné fúzi membrán a uvolnění části enzymů do prostředí. Na vnitřní akrozomální membráně se pak začnou tvořit mikrotubuly větvičkovité struktury a na svém vrcholu nesou zbylé rezervy enzymů (Tsai et al., 2010).

3. 4. Zpracování ejakulátu

3. 4. 1. Odběr ejakulátu

Základním předpokladem pro odběr je získání celého objemu hygienicky nezávadného ejakulátu, při zachování kvality a oplozovací schopnosti a bez ohrožení zdraví a plodnosti býka. Odběr je možný třemi způsoby. V praxi nejrozšířenější je

odběr pomocí umělé vaginy. Výjimečně se lze setkat s elektroejakulací a masáží ampulí chámovodu (Hofírek et al., 2009, Kliment et al., 1983, Louda et al., 2001)

Umělé vaginy existují v různých provedeních, avšak nejběžnější je tzv. zkrácený typ (30 cm dlouhý). Před použitím je vagina omyta, vydesinfikována, vysterilizována v autoklávu a ozářena germicidní zářivkou. Z hygienických důvodů má každý býk na inseminační stanici svou vlastní umělou vaginu. Před samotným odběrem je mezistěna vyplněna vodou o teplotě 38 – 40 °C. Opatří se sběračem a je případně ještě uložena do termostatu, aby dosáhla hodnot tělesné teploty. V závěru příprav je vnitřek vymazán sterilní nespermicidní vazelínou a nafouknuta vzduchem tak, aby vnitřek simuloval tlak pohlavního ústrojí samice (Hofírek et al., 2009, Kliment et al., 1983, Louda et al., 2001). Flick a Merilan (1986) zkoumali rozdíly v kvalitě odběru při použití klasické pryžové a plastové vložky umělé pochvy. Z jejich práce vyplývá, že neexistují rozdíly v objemu při odběru, ale gumová výstelka se jeví jako více efektivní.

Vlastní odběr probíhá ve speciální místnosti splňující bezpečnostní parametry (připouštědlo) nebo ve venkovním prostředí. Před zahájením je býkovi omyta předkožka a očištěn chvostek. Náhrada říjící se plemence je zajištěna umělou (též čistou a vydesinfikovanou) atrapou nebo jiným býkem klidné povahy. Ten je ale vždy nezbytný pro pohlavní vydražďování před samotnou ejakulací. Je-li vysunut pyj, je býk připraven. Během náskoku technik nasměruje penis k umělé vagině. Pár vteřin po zasunutí dochází k ejakulaci. Jednorázový sběrač s ejakulátem je odstřižen a předán do laboratoře k dalšímu zpracování (Hofírek et al., 2009, Kliment et al., 1983, Louda et al., 2001, Obr.: 5).

Elektroejakulace se využívá pouze u kvalitních býků, kteří nejsou schopni odběru do umělé pochvy. Rektum je nejprve zbaveno výkalů a vypláchnuto 1 - 2 % roztokem NaCl (Louda et al., 2001). Na úroveň semenných váčků jsou pak zavedeny sondy s ventrálně orientovanými elektrodami. Elektroejakulátor má naprogramovaný cyklus během kterého se zvyšuje napětí od 0 do 13 V. Louda et al. (2001) obecně popisuje odběr při napětí 10 – 30 V, 3 – 5 opakování po dobu 3 – 5 sekund.

K ejakulaci dojde většinou bez erekce. Sperma vykazuje nižší aktivitu a obsah fruktózy, objem a koncentrace jsou identické s odběrem do vaginy.

Masáž ampulí chámovodu je využívána pouze pro diagnostické účely (bakteriologie, poruchy plodnosti). Stimulace probíhá transrektálně, průměrná doba trvání je okolo 4 minut (Palmer et al., 2005) Ale u spousty jedinců během této metody k ejakulaci ani nedojde. Cílem masáže je pomocí palce a ukazováčku vytlačit spermie obsažené v ampulích do močové trubice (Palmer et al., 2004) Kvalita odebraného spermatu je nižší. Bialy and Smith (1958) stanovili počet spermií v ampulích na 418 milionů a v chámovodech na 340 milionů.

Kliment (1983) také zmiňuje odběr chirurgickou cestou přímo z nadvarlete. Tyto spermie jsou odebrány bez semenné plazmy pro vědecké účely.

Palmer et al. (2005) porovnával kvalitu odebraného ejakulátu mezi elektroejakulací a rektální masáží. Z výsledku je zřejmé, že po odběru elektroejakulací byla vyšší koncentrace spermií, vyšší procento živých spermií a vyšší aktivita než po masáži. Morfologické změny byly shodné.

3. 4. 2. Hodnocení ejakulátu

Do června 2005 podléhalo vyšetření ejakulátu normě ČSN 46 7111 „sperma býka“, která ale byla zrušena bez náhrady. I nadále se na inseminačních stanicích stanovují tyto parametry: objem, barva, pach, obsah cizích příměsí, hustota, aktivita a morfologické změny (Věžník et al., 2004).

Minimální objem ejakulátu býka je 4 ml. Tento parametr se hodnotí v odměrných nádobách nebo vážením. Množství semene je ovlivněno geneticky, užitkovostí, intenzitou odběrů, ročním obdobím, technikou odběru, výživou a zdravotním stavem (Louda, 2001; Věžník et al., 2004).

Pohledem se subjektivně stanovuje barva a cizí příměsí, čichem pach. Barva by měla být mléčná nebo našedlá. Žluté zbarvení může odpovídat množství flavonidů

v krmivu. Kvalitní ejakulát je prostý cizorodých částic, jako je hnis, moč, krev, chlupy atd. Pach má být specifický, lehce mléčný (Louda, 2001; Věžník et al., 2004).

Hustota (koncentrace) ejakulátu je jedním z nejdůležitějších parametrů určující kvalitu a stupeň ředění. Měří se nejčastěji spektrofotometricky, ale může se využít i počítání v Bürkerově komůrce (hematocytometricky), spermiodenzimetrem, CASA nebo průtokovou cytometrií (Prathalingam et al., 2006). Koncentrace by neměla klesnout pod 700 000 spermií v mm³ (Louda, 2001; Věžník et al., 2004).

Aktivita spermií se hodnotí subjektivní nebo objektivní metodou. Subjektivní hodnocení se dělá pod mikroskopem s vyhřátou destičkou (38 °C). Kapku ejakulátu je nutné nejprve naředit buď předeřátým citrátem sodným, nebo fyziologickým roztokem. Následně se odhadem určuje procento spermií s přímočarým pohybem za hlavičkou minimálně ve 3 zorných polích. K objektivnímu posouzení slouží počítačový program CASA (computer asisted semen analysis; Garner, 1997). Dobrý ejakulát obsahuje minimálně 70 % spermií s přímočarým pohybem (Louda, 2001; Věžník et al., 2004).

Morfologické hodnocení se v praxi nedělá při každém odběru ale pouze v určitých časových intervalech (např. 1x měsíčně; Louda, 2001). Před hodnocením je nutné spermie obarvit. Existuje více metodik barvení např. dle Hancocka, dle Farellyho aj. Pak se pod mikroskopem hodnotí procento morfologických změn, které by neměly přesáhnout 20 %. Primární změny, tj. změny získané ve varleti, max. u 10 % spermií (Barth a Oko, 1989).

3. 4. 2. 1. Faktory ovlivňující kvalitu ejakulátu

Obecně lze činitele ovlivňující kvalitu ejakulátu rozdělit na endogenní (vnitřní) a exogenní (vnější). Mezi vnitřní patří stáří býka, zdravotní stav, plemenná příslušnost a genetické faktory, reprodukční aktivita (intervaly mezi odběry) a nervový typ. Do vnějších pak spadá teplota prostředí, délka světelného dne, výživa, typ ustájení, stres, zoohygienická opatření, hierarchie ve stádě, prostředí a nástroje použité

při odběru, způsob zpracování ejakulátu (např. doba mezi odběrem za zmrazením), manipulace s ejakulátem (Louda, 2007; Hofírek 2009; Bhoite et al., 2008).

Bylo prokázáno, že věk býka ovlivňuje všechny parametry kvality semene, nejvýznamněji objem a počet spermií (Fuerst-Waltl et al., 2006). U mladých býků po dosažení pohlavní dospělosti se teprve formují fyziologické funkce a tak se zvyšujícím věkem zvyšuje i objem odebraného ejakulátu a jeho koncentrace. U starých býků zase opačně začne produkce spermií postupně klesat (Mathevon et al., 1998). Bhakat et al. (2011) tvrdí, že nejlepších výsledků dosahují býci okolo 4. – 5. roku.

Balić et al. (2012) porovnával hladiny látek, vznikajících při oxidativním stresu v důsledku vyšších teplot prostředí. Býky plemene simentál rozdělil do dvou skupin: 2 – 4 roky staré a 5 – 10 let staré. Prokázal, že mladí býci jsou mnohem náchylnější k oxidativnímu stresu. Biochemické produkty se měřily v krevní a semenné plazmě a jejich hladiny korelovaly se sníženou motilitou a kvalitou spermií. Nejhorší výsledky byly naměřeny u mladší skupiny v období léta.

Masná a primitivnější plemena obecně vykazují horší kvalitu než mléčná a prošlechtěná plemena (Hofírek, 2009). To dokazují práce zaměřené na srovnání základních parametrů ejakulátu u belgického modrého a holštýnského skotu. Belgické modré má statisticky významně horší výsledky, především zvýšený počet spermií s protoplazmatickou kapkou a poškození středového oddílu (Hoflack et al., 2006). Důvodem je vysoká citlivost na stres např. v důsledku teplot prostředí přesahujících 30 °C, přesun do jiné stáje, kulhání atd. (Bellinge et al., 2005). Také byl u belgického modrého pozorován vyšší podíl kolagenních vláken v intersticiální tkáni varlat. Prakticky se jedná o mírnou testikulární hypoplazii, díky které jsou varlata náchylnější k degeneracím. U imbredních linií tohoto plemene zhoršená plodnost koreluje s menší velikostí šourku (Hoflack et al., 2007).

Určení koeficientu heritability pro jednotlivé vlastnosti ejakulátu je v rámci různých studií dost variabilní, od nízké dědivosti až po střední (Karoui et al., 2011). U holštýnského skotu Mathevon et al. (1998) stanovil hodnoty 0,24 pro objem, 0,25 pro koncentraci, 0,31 pro motilitu, 0,38 pro počet spermií a 0,49 pro procento živých spermií u mladých býků a u dospělých 0,44 pro objem, 0,36 pro koncentraci, 0,01

pro motilitu, 0,54 pro počet spermií a 0,64 pro procento živých spermií. Pro plemeno motbeliard zase Mathevon et al. (1997) vypočítali tyto hodnoty: objem 0,08, koncentrace 0,32 a počet spermií 0,15 u mladých býků a u dospělých býků objem 0,49, koncentrace 0,08 a počet spermií 0,12. Korelaci mezi genetikou a prostředím stanovili na 0,55 u objemu semene, 0,61 u koncentrace a 0,46 u počtu spermií.

Intervaly mezi odběry se zabýval Fuerst-Valtl et al. (2006). Dospěli k závěru, že pauza 4 – 6 dní působí nekoncentraci příznivěji než přestávka 1 – 6 dní. S tím se ztotožnil i Mathevon et al. (1998), který říká, že ideální interval mezi odběry je 4 – 5 dní. Při vícečetném odběru během jednoho dne je nejvyšší koncentrace při prvním skoku (Fuerst-Valtl et al., 2006).

Že vysoká teplota prostředí (šourku) negativně ovlivňuje spermatogenezi, již bylo zmíněno. Poškození se týká hlavně membrán a fyzikálních vlastností spermií (Carruthers a Melchior, 1988), vede ke snížené motilitě, nižšímu počtu živých spermií a zvýšenému výskytu morfologických abnormalit (Setchell, 1998). Pro správný průběh spermatogeneze je potřeba o 4 – 5 °C nižší teplota, než je tělesná (Brito et al., 2004). Ideální teplota prostředí byla Fuerst-Valtl et al. (2006) stanovena na 5 – 15 °C.

Významnou termoregulační funkci varlat mají varletní žíly, které nasedají na varletní tepny a tím je ochlazují. Co všechno ovlivňuje tuto funkci, zkoumal Brito et al. (2012). Vývoj varletních cév býků monitoroval pomocí USG, měřením teploty šourku a hodnocením spermií. Výsledky ukazují, že důležitá je délka a průměr tepny, plocha povrchu, která je v kontaktu s žilami a vzdálenost arteriální krve od venózní. Celkový průměr kužele se díky postupnému ukládání tuku s věkem zvětšuje, zhoršuje mechanismus chlazení a vzdaluje od sebe i průtok tepenné a žilní krve. Průměrná teplota šourku se zvyšuje a s ní i vady spermií (hlavně hlavičky) a procento spermií s protoplazmatickou kapkou.

Vliv na teplotu šourku má nejen teplota prostředí samotná, ale i nadmořská výška. Ve výše položených oblastech rostou nároky na kyslík a dochází ke zvyšování teploty metabolismu. Snižuje se průtok testikulární krve vedoucí až k mírné hypoxii a klesá kvalita spermatu (Setchell, 1998).

Přestože skot není považován za druh s pohlavní sezóností má fotoperioda vliv na změnu parametrů ejakulátu. Větší rozdíly byly pozorovány u plemen vyšlechtěných z *bos indicus* (asijská plemena) než u plemen původem z *bos taurus* (evropská plemena; Bhakat et. al., 2011). Studie sbírající data 31 let od celkem 694 býků (71 983 odběrů) čtyřech různých plemen (holštýnské, švýcarské hnědé, charolais a limousine) říká, že nejkvalitnější ejakulát mají býci v létě, horší během jara a podzimu a nejhorší v zimě (Snoj et. al, 2013). Ke stejným výsledům se dopracovali i Teixeira et al. (2011). Fuente et al. (1984) naopak tvrdí, že právě v zimě je ejakulát nejkvalitnější. Další výzkumy vliv fotoperiody úplně vyvrací (Brito et al., 2004). Důležité je ale brát v potaz geografickou polohu. V oblasti rovníku jsou změny délky světleného dne jen velmi malé (Snoj et. al, 2013).

Korelace mezi výživou a kvalitou ejakulátu byla vypočtena na 0,7 (Humbolt et al., 1993). Endokrinologické parametry též významně ovlivňují produkci spermií, jedná se hlavně o hladiny testosteronu a kortizolu (hierarchie, stres; Snoj et al., 2013).

3. 4. 3. Ředění ejakulátu

Ředění ejakulátu je nezbytné pro vytvoření podmínek umožňujících přežití spermie při konzervaci. Během dlouhodobého uchování je třeba uvést spermie do stavu jakési anabiózy, neboť metabolické produkty mají na spermie negativní vliv. Metabolickými procesy vzniklá kyselina mléčná zvyšuje pH prostředí. To nepříznivě působí na motilitu a metabolickou aktivitu. Pokud pH klesne pod 5,5, probíhá ireverzibilní denaturace enzymů (Norman et al., 1958). Jako inhibitor motility působí i oxid uhličitý (Shettles, 1940).

Abychom mohli spermie zamrazit, musí ředidla splňovat jisté funkční parametry, které jsou zajištěny obsahem těchto komponentů: iontové či neiontové látky k udržení osmotického tlaku a pH, zdroj lipoproteinu pro eliminaci chladového šoku, glycerol jako kryoprotektivum, glukóza nebo fruktóza jako zdroje energie a další přísady jako např. enzymy, antibiotika zajišťující nezávadnost (Vishwanath a Shannon, 2000).

Gamčík a Kozumplík (1992) dělí ředidla dle Milovanova (1962) do 3 funkčních skupin: protektory, zajišťující výživu a ochranu, extendory zvyšující objem a implementory usnadňující průchod samičím pohlavním ústrojím (uterotonika).

Pro udržení osmotického tlaku se nejčastěji používá roztok chloridu sodného (Amirat et al., 2005). Mezi pufrální látky patří fosfát, citrát sodný, kyselina citrónová nebo TRIS (hydroxymethylaminomethan). Antibiotika se mohou používat pouze taková, která jsou pro spermie nezávadná (Bousseau et al., 1998). Akhter et al. (2007) tvrdí, že ATB zlepšují i fertilizační vlastnosti semene.

Dosud nejlepší objevené kryoprotektivum je glycerol. Zabraňuje tvorbě ledové krystalické mřížky a tím zvyšuje viskozitu ředidla (Nicolajsen and Hvidt, 1994). Při přechodu přes teplotně kritická místa (bod mrazu) během konzervace stabilizuje membrány a to vazbou na polární skupiny místo vody (Woelders, 1997). Další používanou alternativou kryoprotektiv jsou etylenglykol a dimetylformaldehyd. Ale při použití glycerolu bylo prokázáno vyšší procento motility a integrity membrán. Přesto až 85% spermií po mražení vykazuje nějaký stupeň poškození (Forero-Gonzalez et al., 2012). Koncentrace glycerolu v ředidlech je závislá na ostatních komponentech ale obvykle se pohybuje okolo 7% (De Leeuw et al. 1993). Koncentrace nad 9 % se ukázala jako toxická (Fahy, 1986).

Přítomnost cukrů v ředidle je také nezbytná. Jednoduché sacharidy zajišťují energetický zdroj pro spermie. Běžně se používá fruktóza nebo glukóza, lze využít i jiné cukry ale rychlost jejich metabolizace je rozdílná. Laktóza z mléčných ředidel je využívána velmi omezeně (Parkinson et al., 2001). Watson (1979) upozorňuje i na ovlivnění osmotického tlaku.

V minulosti se k ředění hojně používalo kravské mléko. Od jeho využití se ale ustupuje z důvodů nebezpečí kontaminace. Díky typickému zakalení bylo také obtížně hodnotit spermie pod mikroskopem z důvodů snížené viditelnosti (Vishwanath and Shannon, 2000). Funkčně mléko zastávalo ochranu před chladovým šokem. Bergeron et al. (2007) stanovil, že pro tyto vlastnosti je nejvýznamnější obsah kaseinu.

Již v roce 1940 Philips and Lardy doporučili ředit ejakulát vaječným žloutkem. Všimli si totiž, že díky němu se spermie stávají odolnější vůči chladovému šoku. Problémem je, stejně jako u mléka, riziko bakteriální nebo mykoplazmatické kontaminace. Bousseau et al. (1998) porovnával ředidla bez živočišných komponentů, se žloutkem a se žloutkem a mlékem. Jejich výsledky potvrzují, že při přidání žloutku a mléka se objevuje mírná kontaminace zatím co u ředidla bez živočišných složek ne. Vajíčko může být také zdrojem toxinů poškozující spermie a jeho složení může významně kolísat.

Jones (1976) se zabýval studiem jednotlivých komponentů vaječného žloutku. V té době už vznikaly myšlenky nahradit celý žloutek pouze funkčně významnými složkami a zajistit tím mikrobiologickou nezávadnost. Jako nejdůležitější se ukázaly lecitin a LDL. Lecitin působí jako ochrana před chladem a mrazem. Jeho nevýhodou je ale špatná rozpustnost ve vodě, takže tvoří nestabilní suspenze. Při intenzivním míchání se rozkládá na lysolecitin, který je po spermie toxický. Bylo prokázáno, že lecitin izolovaný ze sójového extraktu má negativní vliv na respiraci spermií. Avšak v pokusu byla míra fertilizace krav po použití inseminačních dávek s lecitem srovnatelná jako při použití žloutkových ředidel (Bousseau et al., 1998).

LDL se váže na membránu, čímž jí stabilizuje. V kritických teplotních zónách působí jako izolant (Vishwanath et al., 1992). Lze ho přidávat i samostatně ale zatím neexistují ředidla, která by byla založena jen na bázi LDL. V minulosti se ekonomicky nevyplatilo izolovat LDL pro komerční použití ale s vývojem metody, která zajišťuje až 67% výtěžnost a 97 % čistotu by to mohlo být možné. Problematická by mohla být jeho stabilita během skladování (Moussa et al., 2002).

Moussa et al. (2002) porovnával žloutkové ředidlo a ředidlo s LDL. Po rozmrazení se posuzovala motilita, integrita membrán a osmolarita. Výsledky ukazují, že samotný LDL poskytuje spermii lepší ochranu před chladovým šokem než použití celého žloutku. Procento pohyblivých spermií bylo dokonce dvakrát vyšší. Déle byla stanovena ideální koncentrace LDL na 8% (Moussa et al., 2002).

Amirat et al. (2004) zase porovnával žloutková ředidla a ředidla s rostlinnými zdroji fosfolipidů. Lepší hodnoty po rozmrazení vykazoval ejakulát mrazený

s vaječným žloutkem. Jak dokázal De Leeuw et al. (1993) ani syntetické lipozomy nejsou tak účinné v ochraně před mrazením jako žloutek. Takahashi et al. (2012) dokonce stále považují za ideální ředidlo takové, které obsahuje glycerol a žloutek nebo mléko. Ideální koncentrace vaječného žloutku v ředidlech je 15 – 30 % (Van Demark et al., 1957).

Množství ředidla přidaného k ejakulátu vychází z předpokladu, že inseminační dávka musí po rozmrazení obsahovat minimálně 10×10^6 aktivních spermií. Pro ředění tedy musíme znát tyto hodnoty: objem ejakulátu, hustota (počet spermií v miliardách/ cm^3) a předpokládaná aktivita pro rozmrazení. Výpočet množství se řídí tímto vzorcem:

$$P_d = V \times H \times A / P_s$$

$$R = \{ (P_d \times V_d) - 25\% \} - V$$

P_d = počet ins. dávek

V = objem ejakulátu (cm^3)

H = hustota (mld/ cm^3)

A = aktivita po rozmrazení (%)

P_s = počet aktivních spermií v dávce

R = množství přidaného ředidla (cm^3)

V_d = objem pejetý (cm^3)

-25%: 20% ztráta při vytlačení obsahu ins. dávky + 5% přirozená ztráta

Ředidlo je před mícháním nahřáto na teplotu ejakulátu (38 °C). Následně je buď postupně, rovnoměrně přilíváno k ejakulátu za současného míchání na oscilačním stolku nebo je rovnou celý objem nalit ke spermiím, které svým přirozeným pohybem ejakulát promísí. Během tohoto procesu se ejakulát ochlazuje na pokojovou teplotu.

Vše by mělo proběhnout do 15 minut od odběru. V praxi se používají průmyslově vyráběná ředidla na žloutkové bázi: Triladyl®, Optidyl®, Tris® a nebo bezžloutková: Bioxcell®, AndroMed®, Biociphos Plus® (Louda et al., 2001).

3. 4. 5. Konzervace ejakulátu

Býčí ejakulát můžeme konzervovat dvojím způsobem: krátkodobě (chlazením) nebo dlouhodobě (mrazením). Krátkodobá konzervace se běžně nepoužívá. Ejakulát smíchaný s ředidlem na bázi vaječného žloutku, mléka nebo citrátu sodného (či jejich kombinací) se uchovává při teplotě 2 – 4 °C. Doba použití je maximálně 2 dny, při použití citrátu sodného se sníženým pH 3 – 4 dny (Louda et al., 2001).

Skladování ejakulátu při 5 °C snižují metabolickou aktivitu spermií. Ale tyto změny mohou být i škodlivé. Například se snižuje aktivita sodíko-draslíkových pump a zvýšená koncentrace intracelulárního sodíku je pro spermie fatální (Swadner and Goldin, 1980). Lepší je uchování za vyšších teplot, kdy je základním požadavkem přidavek média blokujícího metabolické dráhy. Optimální teplota byla stanovena na 18 – 24 °C. Skladování při vyšších teplotách snižuje plodnost víc, jak při uchování v 5 °C (Shannon a Cruson, 1984).

Mrazení býčího ejakulátu je velmi významná metoda konzervace, která pozastavuje vývoj spermie, ale zároveň zachovává oplozovací potenciál na dlouhou dobu (Watson, 1995). Při správném uskladnění (konstantní teplota) teoreticky na neomezenou dobu (Salisbury and Hart, 1970). Pro rozvoj kryokonzervace byl nejdůležitější objev kryoprotektivních účinků glycerolu v roce 1949 (Polge et al.). Nejprve se začínalo s mrazením na suchém ledě (-79 °C), později se přešlo na tekutý dusík (-196 °C), který také ovlivnil úspěšnost této metody (Watson, 1995).

V současnosti se pro skladování spermatu používá tzv. francouzská metoda neboli pejety o objemu 0,25 ml (Obr. 6). Výhodou je možnost nátisku identifikačních údajů a zamezení kontaminace. Plastová dutinka s naředěným ejakulátem je na jednom

konci zatavená a na druhém je vatová zátka (Cassou, 1964). Japonská metoda – pelety se v ČR nepoužívají od roku 1990 (Louda et al., 2001).

Mezi stresové faktory působící na spermie během kryokonzervace patří: chlazení, vystavení médií potřebných pro ochranu před mrazem a rozmrazením. Při chlazení je klíčová rychlost, během které se dostává voda ven z buňky. Při pomalém chlazení odchází velké množství vody ze spermie a tím se mění osmolarita a pH (tzv. solution effect), což buňku poškozuje. Naopak je-li ejakulát ochlazen rychle, voda buňku nestihne opustit a při mrazení se tvoří intracelulární led ničící spermii (Mazur a Liebo, 1972).

Proto bylo nutné optimalizovat míru a dobu ekvibrace pro přežití buněk (Mazur, 1977). Robbins et al. (1976) navrhl optimální rychlost chlazení 26 – 52 °C/ min. Watson (1979) a Woelders et al. (1997) se ale shodují na hodnotách 80-120 °C/ min. Woelders et al. (1997) dále našli vztah mezi osmolaritou média a rychlostí chlazení. Rychlejší zchlazování je tolerováno při vyšší osmolaritě, v médiu obsahující sacharózu nebo trehalózu.

V našich podmínkách se používá ekvibrace pelet rozprostřených na rampách po dobu 2 – 3 hodin při teplotě 1 – 3 °C. Následné mrazení probíhá v mrazících boxech s programovatelnou mrazicí křivkou. Výchozí teplota je -70 °C a doba mrazení je 8 – 10 minut. V parách tekutého dusíku je proveden přesun pejet do globet a ty zasunuty do kontejnerů s tekutým dusíkem (Louda et al., 2001).

Jak už bylo řečeno, dalším kritickým bodem je rozmrazení pejety. Mazur (1984) zjistil, že rychle rozmrazení brání rekrytalizaci vody, která poškozuje membránu. Dalším problémem při pomalém rozmrazování je rychlé vniknutí vody zpět do buňky a následné změny v osmotickém tlaku vedoucí k poškození (Curry a Watson, 1994). Za optimální rozmrazovací proces je považováno ponoření pejety do vodní lázně o teplotě 38 °C po dobu 20 sekund (Louda et al., 2001). I přes použití nejlepších konzervačních technik je přežitelnost po rozmrazení pouze něco málo nad 50% (Polge et al., 1949).

3. 5. Chladový šok

Negativní účinek chladového šoku byl znám už před více než 70 lety (Philips a Lardy, 1940). Obecně tento fyzikální faktor vede k destabilizaci membrán podobající se fyziologické kapacitaci (Fuller a Whittingham, 1997), po které se výrazně snižuje doba přežitelnosti spermie (Yanagimachi, 1994). Konkrétně dochází k bobtnání cytoplazmatické a akrozomální membrány (Jones a Stewart, 1979), ke změnám v jejich fluiditě (Holt and North, 1986), disregulaci influxu intracelulárního kalcia (Robertson et al., 1990) a ke změnám v enzymové aktivitě (Watson, 1981) a metabolismu (White, 1993).

Almquist (1993) tvrdí, že chladový šok má větší vliv na akrozomální integritu než na motilitu. Integrita membrán je narušena v důsledku vyplavení lipidů. Z toho vyplývá, že samotné složení membrány (obsah fosfolipidů a cholesterolu) hraje významnou roli v odolnosti vůči šoku. Další faktor odolnosti je obsah nenasycených mastných kyselin, které mohou být degradovány peroxidací. To negativně ovlivňuje motilitu, metabolismus, ultrastrukturu a plodnost spermií (White, 1993). Integritu membrán po chladovém šoku lze detekovat barvením (Januskauskas et al., 1999).

White (1993) popisuje vliv snížení teploty na nárůst absorpce vápenatých kationtů spermií, především při rychlém zchlazení. Vysoký obsah vápníku v médiu, který může být spermií pohlcen, vede ke snížení pohyblivosti a metabolismu. Fosfolipidy vaječného žloutku tomuto ději pravděpodobně zabraňují.

Spermie izolované přímo z nadvarlete mají vůči chladovému šoku větší odolnost než spermie ejakulované. To potvrzuje fakt, že během průchodu nadvarletem se mění vlastnosti membrány (Hammerstedt et al., 1982). U beranů a kanců se zvyšovala odolnost i po *in vitro* inkubaci. Složení média a jeho pH hrálo významnou roli. Autoři si takové zjištění vysvětlují změnou membránového složení nebo zvýšením stability integrálních bílkovin během inkubace (Pursel and Johnson, 1975).

Dalším poznatkem je, že u ptáků chladový šok nemění vlastnosti spermií. Tento rozdíl by mohl souviset s aktivitou angiotensin konvertujícího enzymu (ACE).

Výsledky měření ukazují, že u býků je aktivita výrazně vyšší ve spermiích než v semenné plazmě. Oproti tomu u ptáků jsou aktivity vyrovnané (Mohan et al., 1992).

U beranů bylo také prokázáno, že pozitivní vliv na odolnost vůči chladu mají seminální proteiny, které jsou po navázání schopny zvrátit změny na membráně. V pokusu se hodnotil vliv chladu na spermie zbavené semenné plazmy, přičemž k jedné skupině byly dodány semenné proteiny. Ve všech vzorcích se potvrdil pozitivní vliv proteinů v závislosti na koncentraci. Čím byla vyšší, tím byly výsledky lepší. Dále se zjistilo, že příznivý vliv má i přídavek kyseliny linolové, olejové nebo vitamínu E, které s proteiny interagují (Pérez et al., 2001).

Na kančích spermiích se zjišťoval vliv 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu (HBCD). Po jeho ho přidání, byl ve vzorcích vystavených chladovému šoku, zjištěn vyšší podíl pohyblivých spermií s intaktní akrozomovou membránou a vyšší integritou cytoplazmatické membrány. V případě, že byl přidán i cholesterol-3-sulfát (analog cholesterolu) došlo ve všech parametrech ke zhoršení. HBCD totiž pracuje na principu vyvázání cholesterolu z membrány, čímž zvyšuje její odolnost. V případě dodání cholesterolu jsou vazebná místa HBCD blokována (Zeng a Terada, 2000). K obdobným závěrům na býčích spermiích došel i Visconti et al. (1999).

Při komerčním zpracování ejakulátu jsou z hlediska chladového šoku kritické dva okamžiky: chlazení a rozmrazení. Dahami a Sabini (1993) tvrdí, že pro dobrou motilitu spermií po rozmrazení je vhodný přechod z teploty 35 °C na 5 °C během 2 hodin. Dobrých výsledků je ještě dosaženo při ochlazení na 10 °C během 30 minut. Rozmrazování je lepší provádět rychle, nejlépe pár vteřin při teplotě 38 °C (Almquist, 1993).

Church and Graves (1976) elektroforeticky detekovali ztrátu alkalické proteinázy akrozinu a dalších bílkovin akrozomu po 4 hodinové inkubaci při 5 °C, 21 °C a 37 °C. Pouze při inkubaci v 37 °C 45% spermií ztrátu bílkovin nevykazovalo. Ztráty akrozinu byly výrazně tlumeny přítomností vaječného žloutku nad 15%.

4. MATERIÁL A METODY

4. 1. Charakteristika býků

Všichni plemenní býci pochází ze stáji inseminační stanice NATURAL, spol. s. r. o., Hradištko pod Medníkem. Ejakulát byl odebrán konkrétně těmto býkům:

býk A: ZBA-621, Polled REX, plemene blond d'Aquitaine, narozen 13.4.2008

býk B: NEO-267, Polledstar P, holštýnský skot, narozen 24.8.2011

býk C: NXA-873, Fame, holštýnský skot, narozen 10.9.2009

býk D: RAD-390, Imir, český strakatý skot, narozen 30.3.2009

býk E: NXA-863, Nucleus, holštýnský skot, narozen 7.4.2009

býk A_f: ZAU-9, Usse, Aberdeen Angus, narozen 15.4. 2012

býk B_f: ZAI-043, Vizigot, Aberdeen Angus, narozen 3.6.2012

býk C_f: EG-32, Enthorner, český strakatý skot, narozen 24.10. 2003

býk D_f: NXA-841, Mafioso, holštýnský skot, narozen 14.12.2008

Naměřené hodnoty kvality ejakulátu po odběru (aktivita, hustota, objem) jsou uvedeny v Tabulce 1.

4. 2. Ředidla

Pro prvním pokus, kde se hodnotil vliv individuality býka, bylo použito ředidlo AndoMed®. Druhá část práce, která se změřovala na typ použitého ředidla, byly použity tyto komerční přípravky: AndroMed® (Minitube, Německo), BIOXcell® (IMV Technologies, Francie), Optidyl® (BIO-VET, Francie), Steridyl® (Minitube, Německo), Triladyl® (Minitube, Německo) a BULLXcell (IMV Technologies, Francie).

AndroMed®

AndroMed je bezžloutkové ředidlo ejakulátu obsahující rostlinné fosfolipidy. Používá se nejen u býků ale také u malých přežvýkavců. Před samotným ředěním se musí do koncentrátu přidat deionizovaná, sterilní voda v poměru 1 : 4.

BIOXcell®

Toto ředidlo také neobsahuje žádné živočišné komponenty jako vaječný žloutek nebo mléko. Koncentrát se ředí s bisdestilovanou vodou v poměru 1 : 4.

Optidyl®

Ředidlo Optidyl je složeno z TRIS, ionizovaného vaječného žloutku, glycerolu a antibiotik. Před použitím se koncentrát smíchá s neionizovanou vodou v poměru 2 : 3.

Steridyl®

Ředidlo obsahující ionizovaný vaječný žloutek a TRIS. Lze použít nejen na ejakulát velkých a malých domácích přežvýkavců ale i exotických druhů. Ředění s redestilovanou vodou v poměru 2 : 3.

Triladyl®

Triladyl je koncentrát s obsahem TRIS pro jehož přípravu je nutný přídavek nejen deionizované vody a ale také vaječného žloutku. Čerstvý žloutek je pro přípravu ředidla nutné přefiltrovat přes filtrační papír. Poměr je 1 : 1 : 3 (koncentrát: žloutek: voda).

BULLXcell®

Toto ředidlo je velmi podobné Triladylu®, také obsahuje TRIS a před použitím se přidává čerstvý žloutek a voda v poměru 1 : 1 : 3 (voda). Nevýhodou této přípravy je zvýšená pravděpodobnost bakteriální kontaminace semene. Žloutek není ionizovaný jako je tomu u Optidylu® nebo Steridylu®.

4. 2. Odběr ejakulátu a jeho zpracování

Ejakulát byl u výše uvedených býků odebrán ve 4 odběrových dnech na inseminační stanici Natural, spol. s r. o. v Hradištku pod Medníkem, za použití umělé vaginy a jednorázového sběrače. Následně bylo proškoleným personálem stanice provedeno vatupní hodnocení kvality ejakulátu dle předepsané metodiky. Po sensorickém zhodnocení zápachu a výskytu cizích příměsín byla pomocí SPEKOLu II fotometricky zjištěna hustota ejakulátu. Následovalo jeho zvážení na digitální automatické váze pro stanovení množství. Pod mikroskopem s fázovým kontrastem byla poté subjektivně (odhadem) určena aktivita spermií.

Pomocí automatické pipety se sterilní špičkou byl odebrán vzorek čerstvého ejakulátu pro první pokus (hodnocení odolnosti vůči chladovému šoku před naředěním). Ejakulát byl následně rozdělen na šest dílů do jednorázových sběračů a každý z dílů naředěn jedním z předem připravených a nahřátých ředidel. Na oscilačním stolku pak došlo k vzájemnému promísení ejakulátu a ředidla. Po desetiminutovém promíchávání se z každého sběrače odebral vzorek spermatu pro druhý pokus (hodnocení odolnosti vůči chladovému šoku po naředění) a zbylý obsah ve sběrači byl uložen do chladicího boxu o teplotě 4 °C.

4. 3. Chladový test a hodnocení odolnosti spermií

Při každém pokusu byl zhotoven jeden roztěr spermatu, který nebyl vystaven chladovému šoku a tři roztěry spermatu, které podstoupily samotný test. Ten byl proveden tak, že se ejakulátem naplnily tři kapilárky přibližně do 4/5 délky (cca 20 µl). Pomocí plastelíny byl jeden konec uzavřen, a kapiláry se vzorky se ponořily na 10 minut do chlazené lázně (No Ice firmy Fischer Scientific®), které udržovalo teplotu 0 °C. Spermie, které nepodstoupily chladový test a spermie testované na chladový šok (po uplynutí inkubační doby) byly barveny na živé/ mrtvé spermie.

Barviva i hodinová a podložní sklíčka byla před barvením umístěna na vyhřívací desku o teplotě 37 °C. Zde probíhal i celý proces barvení: semeno o objemu 20 µl bylo z kapiláry či pipety přeneseno na hodinové sklíčko a přidáno 20 µl eosinu. Následujících 30 sekund se obě složky krouživými pohyby mísily. Po této době bylo

přidáno 40 µl nigrosinu a ještě vše krátce promícháno. 20 µl vzniklé suspenze bylo odebráno a přemístěno na podložní sklíčko. Pomocí dalšího podložního sklíčka byl tahem zhotoven roztěr (Obr. 7). Pokus se opakoval vždy po hodině od předchozího (čas 0, 1, 2, 3). Tímto způsobem bylo vyhotoveno 308 preparátů.

Samotné vyhodnocení roztěrů probíhalo v laboratoři katedry speciální zootechniky. Zaschlé preparáty byly posouzeny pod mikroskopem s fázovým kontrastem při zvětšení 1000x za použití olejové imerze. Z každého vzorku bylo napočítáno min. 100 spermií a zhodnoceno, zad v době barvení byla spermie živá či nikoliv. Konečné výstupy testu vyjadřují procentický podíl živých spermií ve vzorku.

Živá spermie s funkční cytoplazmatickou membránou nepropustí eosin do buňky a spermie zůstane nenabarvená, zatím co mrtvá spermie barvivo přijme. Je-li přítomen akrozom, barví se růžově. Bílá barva v této oblasti značí jeho ztrátu. Nigrosin má funkci kontrastního barviva (Obr. 8).

4. 4. Statistická analýza

Pro potřeby vyhodnocení vlivu individuality býka byli hodnoceni býci A, B, C, D a E, jejichž ejakuláty byly naředěny AdroMedem®. Test byl prováděn v čase 0, 1, 2 a 3. V rámci vyhodnocení vlivu použitého ředidla byli vybráni býci A_f, B_f, C_f a D_f, u kterých se k ředění použila tato komerční ředidla: AndoMed®, BIOXcell®, Optidyl®, Steridyl®, Triladyl® a BULLXcell®. Test se po čase 0 opakoval pouze jednou (čas 1).

Údaje jako označení býka, ředění, čas a procento živých spermií byly postupně zaznamenávány do tabulky v programu MS Office Excel. Před samotným statistickým vyhodnocením byl dále vyjádřen rozdíl mezi přežitelností před a po chladovém testu.

K výpočtu výsledků byl použit program Statistica 12, konkrétně funkce vyjádření základních statistik a ANOVA test na hladině významnosti 0,05.

Pro hodnocení vlivu individuality býka to byl konkrétně jednofaktorový ANOVA test pro průměrné procento živých spermií, a pro průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu. Dále byl použit vícefaktorový ANOVA test pro výsledná procenta živých spermií před a po chladovém testu v čase, a pro rozdíl v procentech živých spermií mezi hodnotami před a po chladovém testu v čase.

Pro zjištění vlivu použitého ředidla na přežitelnost spermií vystavených chladovému šoku bylo nejprve provedeno porovnání ejakulátu nenaředěného a naředěného v čase 0 jednofaktorovým ANOVA testem. Stejně jako u hodnocení vlivu býka byl použit vícefaktorový ANOVA test pro výsledná procenta živých spermií před a po chladovém testu v čase, a pro rozdíl v procentech živých spermií mezi hodnotami před a po chladovém testu v čase.

5. VÝSLEDKY

5. 1. Základní statistiky – býci

Největší podíl živých spermií u nenaředěného ejakulátu, před chladovým testem, měl býk C: 79,82% a nejnižší býk D: 72,38 %. Po chladovém testu byla nejvyšší hodnota naměřena také u býka C: 78,03% a nejnižší u býka D: 42,86 %. Největší rozdíl mezi přežitelností před a po chladovém testu, u neředěného ejakulátu, byl zaznamenán u býka D, kde podíl živých spermií klesl průměrně o 24,28 %. Nejvyšší odolnost vůči chladovému šoku byla zjištěna u býka C, kde podíl klesl průměrně pouze o 4,39 % (Tab. 2).

Po naředění byla v čase 0 a před testem naměřena nejvyšší přežitelnost spermií u býka A: 76,7 % a nejnižší u býka E: 63,96 %. Po chladovém testu byly nejlepší výsledky detekovány opět u býka A: 76,32%, nejhorší u býka E: 54,12 %. Průměrný rozdíl v přežitelnost před a po chladovém šoku byl největší u býka C: 4,26 % a nejnižší u býka A: 0,75% (Tab. 3).

V čase 1 byla u ředěného ejakulátu nejvyšší hodnota před chladovým šokem u býka A: 76,07 % a nejnižší u býka E: 56,52 %. Po testování na chlad vykazoval

nejlepší hodnoty přežitelnosti býk A: 72,51 % a nejhorší býk E: 51,82 %. Nejvyšší průměrný rozdíl v podílu živých spermií před a po chladovém šoku byl naměřen u býka D: 6,98 % a nejnižší u býka B: 1,77 % (Tab. 4).

V čase 2 a před testem byla naměřena nejvyšší přežitelnost spermií u býka C: 65,05 % a nejnižší u býka E: 49,52 %. Po chladovém testu byly nejlepší výsledky opět detekovány u býka C: 64,65 %, nejhorší u býka E: 45,05 %. Průměrný rozdíl v přežitelnosti před a po chladovém šoku byl největší u býka B: 5,04 % a nejnižší u býka C: 2,49 % (Tab. 5).

Nejvyšší podíl živých spermií v čase 3, před chladovým testem, měl býk A: 62 % a nejnižší býk E: 41,18 %. Po chladovém testu byla nejvyšší hodnota naměřena také u býka A: 60,19 % a nejnižší u býka B: 29,09 %. Největší rozdíl mezi přežitelností před a po chladovém testu byl zaznamenán u býka B, kde podíl živých spermií klesl průměrně o 13,16 %. Nejvyšší odolnost vůči chladovému šoku byla zjištěna u býka D, kde podíl klesl průměrně pouze o 0,37 % (Tab. 6)

Pokles přežitelnosti spermií u býka A probíhal následovně: v čase 0 u neřaděného ejakulátu, před testováním byl podíl živých spermií 77,37 %. Po testu průměrně klesl o 7,14 %. Po naředění v čase 0 bylo procento živých spermií 76,7 %. Po chladovém testu se dále průměrně snížilo, ale o pouhých 0,75 %. Po hodinové inkubaci byly hodnoty živých spermií 76,07 % před testem, a po testu průměrně klesly o 3,01 %. V čase 2 byly vstupní hodnoty podílu živých spermií 64,47 %, po chladovém šoku spadly o 4,89 %. V posledním měření bylo procento živých spermií před testem přesně 62 % a chladem se průměrně snížilo o 2,4 % (Graf 1, Graf 4). Průměrný pokles procenta živých spermií vlivem chladového šoku u řaděného ejakulátu byl 2,76 %.

U býka B pokles přežitelnosti spermií probíhal následovně: v čase 0 u neřaděného ejakulátu, před testováním byl podíl živých spermií 74,85 %. Po testu průměrně klesl o 23,47 %. Po naředění v čase 0 bylo procento živých spermií 64,86. Po chladovém testu se dále průměrně snížilo o 2,4 %. Po hodinové inkubaci byly hodnoty živých spermií 58,56 % před testem, a po testu průměrně klesly o 1,77 %. V čase 2 byly vstupní hodnoty podílu živých spermií 52,48 %, po chladovém šoku

spadly o 5,04 %. V posledním měření bylo procento před testem 48,31 % a chladem se průměrně snížilo o 13,16 % (Graf 1, Graf 5). Průměrný pokles procenta živých spermií vlivem chladového šoku u ředěného ejakulátu byl 5,59 %

Býk C: v čase 0 u neředěného ejakulátu, před testováním byl podíl živých spermií 79,82 %. Po testu průměrně klesl o 4,39 %. Po naředění v čase 0 bylo procento živých spermií 75,89 %. Po chladovém testu se dále průměrně snížilo o 4,26 %. Po hodinové inkubaci byly hodnoty živých spermií 69,03 % před testem, a po testu průměrně klesly o 2,59 %. V čase 2 byly vstupní hodnoty podílu živých spermií 65,05 %, po chladovém šoku spadly o 2,49 %. V posledním měření bylo procento před testem 55,45 % a chladem se průměrně snížilo o 9,69 % (Graf 1, Graf 6). Průměrný pokles procenta živých spermií vlivem chladového šoku u ředěného ejakulátu byl 4,75 %.

Býk D: v čase 0, u neředěného ejakulátu, před testováním byl podíl živých spermií 72,38 % a po testování klesl o 24,28 %. V čase 0 ale naředěný měl hodnotu 69,92 % a pokles byl o 2,12 %. V první opakování (čas 1) bylo procento živých spermií 64,95 %, chladovým šokem se snížilo o 6,98 %. Před chladovým testem v čase 2 byl podíl živých 53,48 % a zaznamenán byl pokles o 4,95 %. V čase 3 bylo před testem procento živých 46,61 % a po něm kleslo o 3,68 % (Graf 1, Graf 7). Průměrný pokles procenta živých spermií vlivem chladového šoku u ředěného ejakulátu byl 4,43 %.

A pokles přežitelnosti spermií u býka E probíhal takto: v čase 0 u neředěného ejakulátu, před testováním byl podíl živých spermií 72,41 %. Po testu průměrně klesl o 6,75 %. Po naředění v čase 0 bylo procento živých spermií 63,96 %. Po chladovém testu se dále průměrně snížilo, ale o pouhých 6,7 %. Po hodinové inkubaci byly hodnoty živých spermií 56,52 % před testem, a po testu průměrně klesly o 2,88 %. V čase 2 byly vstupní hodnoty podílu živých spermií 49,52 %, po chladovém šoku spadly o 3,38 %. V posledním měření bylo procento před testem přesně 41,18 % a chladem se průměrně snížilo o 3,68 % (Graf 1, Graf 8). Průměrný pokles procenta živých spermií vlivem chladového šoku u ředěného ejakulátu byl 4,16 %.

Dále byli býci za základně plemenné příslušnosti rozděleni do skupin dle užitkového typu: mléčný (n=3), masný (n=1) a kombinovaný (n=1). U mléčného typu byla nevyšší naměřená hodnota podílu živých spermií před chladovým testem 79,82 % (býk B, čas 0 – nenařazený, Tab. 2) a po testu 78,03 % (býk B, čas 0 – nenařazený, Tab. 2), a nejnižší hodnota před testováním 41,18 % (býk E, čas 3, Tab. 6) a po testování 29,09 % (býk E, čas 3, Tab. 6). Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu byl u nenařazeného ejakulátu: 11,53 %, v čase 0: 4,45 %, v čase 1: 2,41 %, v čase 2: 3,64 % a v čase 3: 7,93 % (Graf 2).

U masného užitkového typu jsou hodnoty následující: nejvyšší naměřená hodnota podílu živých spermií před chladovým testem 77,37 % (býk A, čas 0 – nenařazený) a po testu 73,91 % (býk A, čas 0 – nenařazený). Nejnižší hodnota před testováním 62 % (býk A, čas 3) a po testování 58,33 % (býk A, čas 3). Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu byl u nenařazeného ejakulátu: 7,14 %, v čase 0: 0,75 %, v čase 1: 3,01 %, v čase 2: 4,89 % a v čase 3: 2,4 % (Graf 2).

U kombinovaného typu byla nevyšší naměřená hodnota podílu živých spermií před chladovým testem 72,38 % (býk D, čas 0 – nenařazený) a po testu 51,96 % (býk D, čas 0 – nenařazený), a nejnižší hodnota před testováním 46,61 % (býk D, čas 3) a po testování 42,86 % (býk D, čas 3). Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu byl u nenařazeného ejakulátu: 24,26 %, v čase 0: 2,12 %, v čase 1: 6,98 %, v čase 2: 4,95 % a v čase 3: 0,37 % (Graf 2).

5. 2. Základní charakteristiky – ředidla

Největší podíl živých spermií u nenařazeného ejakulátu, před chladovým testem, měl býk D_f: 82,14 % a nejnižší býk B_f: 65,21 %. Po chladovém testu byla nejvyšší hodnota naměřena u býka A_f: 71, 69 %, a nejnižší u býka C_f: 47,63 %. Největší rozdíl mezi přežitelostí před a po chladovém testu, u neřazeného ejakulátu, byl zaznamenán u býka C_f, kde podíl živých spermií klesl průměrně o 24,98 %.

Nejvyšší odolnost vůči chladovému šoku byla zjištěna u býka A_r, kde podíl klesl průměrně pouze o 7,63 % (Tab. 7)

Při použití ředila AndroMed® byla v čase 0 průměrná počáteční hodnota podílu živých spermií 70,08 %, která vlivem chladového testu klesla průměrně o 8,29 %. V čase 1 byl průměrný výchozí podíl živých spermií 62,1 % s průměrným poklesem živých spermií po vystavení chladu o 5,2 % (Tab. 7).

Ve variantě, kdy bylo ředěno BIOXcellem® byla v čase 0 průměrná počáteční hodnota podílu živých spermií 67,72 %, která vlivem chladového testu klesla průměrně o 6,55 %. V čase 1 byl průměrný výchozí podíl živých spermií 43,87 % s průměrným poklesem živých spermií po vystavení chladu o 5,17 % (Tab. 8).

Ředidlo Optidyl® mělo v čase 0 průměrnou počáteční hodnota podílu živých spermií 62,78 %, které vlivem chladového testu kleslo průměrně o 8,69 %. V čase 1 byl průměrný výchozí podíl živých spermií 57,09 % s průměrným poklesem živých spermií po vystavení chladu o 4,26 % (Tab. 9).

Při použití ředila Steridyl® byla v čase 0 průměrná počáteční hodnota podílu živých spermií 56,03 %, která vlivem chladového testu klesla průměrně o 7,66 %. V čase 1 byl průměrný výchozí podíl živých spermií 53,3 % s průměrným poklesem živých spermií po vystavení chladu o 7,75 % (Tab. 10).

V pokusu, kdy bylo ředěno Triladylem® byla v čase 0 průměrná počáteční hodnota podílu živých spermií 57,14 %, která vlivem chladového testu klesla průměrně o 8,01 %. V čase 1 byl průměrný výchozí podíl živých spermií 52,32 % s průměrným poklesem živých spermií po vystavení chladu o 6,78 % (Tab. 11).

Při použití ředila BULLXcell® byla v čase 0 průměrná počáteční hodnota podílu živých spermií 54,22 %, která vlivem chladového testu klesla průměrně o 5,83 %. V čase 1 byl průměrný výchozí podíl živých spermií 52,35 % s průměrným poklesem živých spermií po vystavení chladu o 5,24 % (Tab. 12).

5. 3. ANOVA - vliv býka

Pro hodnocení vlivu individuality býka na přežitelnost spermií vystavených chladovému šoku byly vyhotoveny 4 analýzy. Jednalo se o jednofaktorový ANOVA test pro průměrné procento živých spermií, a pro průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu. Dále byl použit vícefaktorový ANOVA test pro výsledná procenta živých spermií před a po chladovém testu v čase, a pro rozdíl v procentech živých spermií mezi hodnotami před a po chladovém testu v čase.

Jednofaktorový ANOVA test pro průměrné procento živých spermií souhrnně porovnává výsledné hodnoty procenta živých spermií u jednotlivých býků. Výsledky ukazují, že na hladině významnosti $P < 0,05$ se statisticky shodují býci A, C a D. Býci B a E jsou také statisticky shodní mezi sebou ale ne s býky A, C a D (Graf 9).

Jednofaktorový ANOVA test pro průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu vyjadřuje efekt chladového šoku a porovnává ho mezi plemenými býky. Výsledkem analýzy je potvrzení nulové hypotézy, která tvrdí že, na hladině významnosti $P < 0,05$ jsou rozdíly v přežitelnosti spermií, v důsledku chladového šoku, u všech býků statisticky shodné (Graf 10).

Vícefaktorový ANOVA test pro výsledná procenta živých spermií před a po chladovém testu v čase, počítá oproti jednofaktorovému testu i s vlivem časových intervalů mezi opakováními testů. Časové intervaly totiž významně ovlivňují vstupní hodnoty (před chladovým testem) procenta živých spermií jak je zřejmé z Grafu 11. Výsledky toho testování ukazují, že pouze býci B a E jsou na hladině významnosti $P < 0,05$ statisticky shodní, jinak mezi všemi ostatními býky existuje statistická odlišnost (Graf 12).

Rozdíl v procentech živých spermií mezi hodnotami před a po chladovém testu v čase, který byl hodnocen vícevýběrovým ANOVA testem, kombinuje hodnoty vlivu chladového šoku na spermie s vlivem časových intervalů (Graf 13). Vyhodnocení ukazuje, že stejně jako v případě jednofaktorového testu, jsou všichni býci na hladině významnosti $P < 0,05$ statisticky shodní (Graf 14).

5. 4. ANOVA – vliv použitého ředidla

Pro zjištění vlivu použitého ředidla na přežitelnost spermií vystavených chladovému šoku bylo nejprve provedeno porovnání ejakulátu nenaředěného a naředěného v čase 0 (rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu). Výsledky potvrzují předpoklad, že je statisticky významný rozdíl v přežitelnosti spermií po vystavení chladovému šoku, u ejakulátu, který byl naředěn a který nikoliv. Na hladině významnosti $P < 0,05$ jsou rozdíly shodné u všech použitých ředidel, ale nejsou shodné s ejakulátem nenaředěným (Graf 15).

V dalším testu jsem se zaměřila na hodnoty podílu živých spermií u jednotlivých ředidel spolu s faktory, které na ně působí: individualita býka, čas testu a provedení chladového testu (Graf 16, Graf 17). Celkové hodnocení vypadá následovně: na hladině významnosti $P < 0,05$ je statisticky shodný AndroMed® s BIOXcellem® a Optidylem®, Steridyl® je shodný s Triladylem® a BULLXcellem® a Triladyl® s BULLXcellem®. Mezi všemi ostatními ředidly, existuje statisticky významný rozdíl (Graf 18).

Jako posledním byl opět vyhodnocen průměrný rozdíl mezi hodnotami podílu živých spermií před chladovým testem a po testu. Také se zde bral v potaz účinek vlivů působících na konečnou hodnotu: individualita býka a času testu (Graf 19). Výsledky ukazují, že na hladině významnosti $P < 0,05$ jsou mezi sebou všechna použitá ředidla shodná (Graf 20).

6. DISKUZE

Základní statistické charakteristiky, které vyjadřovaly procento živých spermií, v průběhu testování u neředěného ejakulátu, ukazují, že spermie býka C byly nejvíce odolné vůči chladovému šoku. Tento býk měl nejen nejvyšší procento přežitelnosti spermií před chladovým testem (79,82 %) ale i po něm (78,03 %) a výsledný průměrný rozdíl mezi těmito hodnotami, byl také nejnižší ze všech pozorovaných býků (4,39 %).

Úplným opakem je býk D. Ten měl na počátku testování nejnižší podíl živých spermií (72,38 %), který v průběhu testu klesl průměrně o 24,28 %, a na konci testování byla jeho přežitelnost nejnižší ze všech býků. V rámci hodnocení odolnosti neředěného ejakulátu vůči chladovému šoku ho ale nemohu označit jednoznačně za nejhoršího, neboť rozdíl mezi přežitelností spermií před a po chladovém testu se výrazně nelišila od býka B. U něho byl podíl živých spermií před testem 74,85 % a průměrně klesl o 23,47 %.

Býci A a E byli u hodnocení neředěného ejakulátu relativně vyrovnaní. Průměrný pokles procenta živých spermií vlivem chladového šoku u neředěného ejakulátu byla u býka A 7,14 % a u býka B 6,75 %.

Ejakulát, který byl u býků A, B, C, D a E naředěn stejným ředidlem - AndroMedem®, také vyjadřoval jistou variabilitu v odolnosti vůči chladovému šoku mezi jednotlivými plemennými býky, ale hodnoty jsou velmi vyrovnané. Průměrný pokles podílu živých spermií ve všech časech byl u býka A: 2,76 %, u býka B: 5,59, u býka C: 4,75, u býka D: 4,43 % a u býka E: 4,16 %.

Na základě těchto výsledků vzniká předpoklad, že použitím ředidla se vliv chladového šoku na přežitelnost spermií snižuje a vyrovnává se variabilita v přežitelnosti spermií, která vzniká vlivem individuality býka. Je ale třeba brát v potaz, že u neředěného ejakulátu bylo provedeno pouze měření v čase 0, oproti ejakulátu ředěnému, kde se test opakoval v po hodinových intervalech třikrát. Tento fakt může zásadně ovlivňovat právě zmíněné předpoklady.

Pokud jsme plemenné býky rozdělili do skupin dle užitkového typu, byl rozdíl v podílu živých spermií před a po chladovém testu u neředěného ejakulátu nejvyšší u kombinovaného typu: 24,26 % a nejnižší u masného: 7,17 %. U mléčného mléčného užitkového typu byl zaznamenán pokles o 11,53 %. Průměrné hodnoty poklesu podílu živých spermií u naředěného ejakulátu byly o mnoho vyrovnanější. U mléčného užitkového typu to bylo o 4,61 %, u masného o 2,76 %, a u kombinovaného o 3,61%.

Výsledky opět nabádají ke stejnému závěru jako u jednotlivých býků, že mezi užitkovými typy existuje jistá variabilita, která je při použití ředidla snižována, tak

jako rozdíl v procentu živých spermií mezi hodnotami před a po chladovém testu. I zde lze toto tvrzení zpochybnit faktem, že test byl u neřaděného ejakulátu opakován jen jednou a u řaděného čtyřikrát. Navíc je ve skupině masného a kombinovaného užitkového typu pouze jeden býk. Mléčný typ sice zastupují býci tři, ale všichni mají stejnou plemennou příslušnost (holštýn).

Při testování analýzy odlišností (ANOVA) se nejprve pracovalo se všemi hodnotami procenta živých spermií. V prvním testu nebyl brán zřetel na vlivy působící na konečnou hodnotu, jen individualita býka. Vyšších výsledků dosáhli býci A, C a D, kteří, jsou statisticky shodní. Statisticky nevýznamné rozdíly ukazují, že nejlepší odolnost spermií vykazuje býk A poté býk C a nakonec býk D. Horší výsledky můžeme pozorovat u býků B a E, kteří mají hodnoty staticky významně nižší než předchozí býci. Spermie býka B jsou o málo odolnější než spermie býka E.

Protože tato analýza neřeší vliv chladového šoku v různém čase, byl proveden vícefaktorový test. Ten potvrdil statistickou shodnost odolnosti spermií býka B a E ale vyvrátil shodu mezi býky A, C a D. Dle křivek Grafu 12 lze říci, že spermie býků A a C mají lepší konečné výsledky než ostatní, ale nelze jednoznačně určit, který je nejlepší i přes jejich statistickou neshodu. Následuje býk C a po něm býci B a E, které opět nelze vlivem času rozlišit.

Abych přímo vyjádřila efekt chladového šoku, tak jsem v dalších analýzách pracovala s rozdílem mezi procentem živých spermií před chladovým testem a po něm. Zde jsou výsledky jednofaktorového testu a vícefaktorového testu, který počítá i s vlivem časového sledu, totožné. Mezi býky je statistická shoda. Z Grafu 10 lze vyčíst, že největšího rozdílu dosáhl býk B, následuje ho býk E, jen s nevýrazným rozdílem oproti býkovi C, poté je býk D a nejnižší rozdíl vidíme u býka A. Tento sled je prakticky shodný s předchozím testováním.

Na základě těchto výsledků je možné říci, že v rámci mé práce byl potvrzen vliv individuality býka na procento přežitelnosti spermií, které postupovaly chladový test. Na efekt chladového šoku, který byl definován jako rozdíl v procentu živých spermií před chladovým testem a po něm, vliv individuality býka potvrzen nebyl. Vzhledem k nízkému počtu zkoumaných býků ($n=5$) mohou být výsledky zkresleny,

avšak se shodují s výzkumem Muiño et al. (2007), který tvrdí, že vliv býka není statisticky významný.

Před samotným zahájením analýzy prokazující vliv ředidla na přežitelnost spermií, jsem nejprve porovнала hodnoty ředěného a neředěného ejakulátu v čase 0. Výsledky potvrzují předpoklad, že přítomnost ředidla pozitivně ovlivňuje odolnost vůči chladovému šoku. Tyto výsledky jsou shodné s výzkumem Chantler et al. (2000).

Pokud v základních statistických charakteristikách ředidel srovnáme průměrné procento rozdílů živých spermií před a po chladovém šoku, bez ohledu na čas a býka, můžeme si všimnout poměrně vysoké vyrovnanosti. Nejlépe dopadlo ředidlo BULLXcell®, které mělo pokles o 5,54 %, těsně následoval BIOXcell®: 5,86 %, za ním Optidyl® s poklesem o 6,48 %, který je velmi blízko AndroMedu®: 6,75 %, následuje Triladyl®: 7,4 % a Steridyl®: 7,71 %.

Při porovnání hodnot podílu živých spermií při použití jednotlivých ředidel, kdy se jako součást testu bere vliv individuality býka, čas testu a provedení chladového šoku jsem dospěla k těmto závěrům: statisticky shodná jsou ředidla AndroMed®, BIOXcell® a Optidyl®. Nejlepší je AndroMed® ale BIOXcell® se od něj liší téměř nepostřehnutelně. Následuje Optidyl® a skupina statisticky shodných ředidel, z nichž je nejlepší Steridyl®, poté Triladyl® a nejhůře dopadl BULLXcell®.

Tyto výsledky se shodují s tvrzením Herold et al. (2004), že nejvhodnější používané ředidlo je AndroMed®. A částečně také s tím, že Triladyl je v ochraně před chladovým šokem ředidlem nejhorším. Nicméně po přidání semenné plazmy dosahuje u kryokonzervovaného ejakulátu nejlepší přežitelnost po rozmrazení (Herold et al., 2003).

Stejně jako u vlivu individuality býků na přežitelnost spermií jsem se u i vlivu použitých ředidel zabývala efektem chladového šoku, čili vyjádřením rozdílu mezi procentem živých spermií před chladovým šokem a po něm, s ohledem na jedince, kterému byly spermie odebrány. I v tomto případě jsou všechna ředidla statisticky shodná. Nejlépe dopadl BULLXcell®, o něco hůře BIOXcell®, poté Optidyl®,

následuje AndroMed®, Triladyl a nejhorsí výsledky má Steridyl®. V tomto případě se tedy s Heroldem et al.(2004) na výsledcích neshodujeme.

Při posuzování vlivu ředidla tedy nemůžeme jednoznačně tvrdit, že typ použitého ředidla má vliv na konečnou přežitelnost spermií po chladovém šoku. Jak tvrdí Vera-Munoz et al. (2009), není významný rozdíl mezi ředidly ale obsah LDL v ředidle. Statisticky významně se od sebe neliší ani ředidla na bázi vaječného žloutku a sójového extraktu jak tvrdí Amirat et al. (2004). Výsledky mohou být zkreslené nízkým počtem opakování (n=4).

7. ZÁVĚR

Hypotézou diplomové práce byl předpoklad, že chladový šok vyvolá změny v přežitelnosti spermií, které se budou lišit mezi sledovanými plemennými býky a mezi jednotlivými typy použitého ředidla.

Pokud se zaměříme na vliv individuality býka, který byl hodnocen v první části práce, musíme stanovenou hypotézu vyvrátit. Býci sice vykazovali statistické odlišnosti v naměřených hodnotách ale po zjištění efektu chladového šoku, čili po vyjádření procentického rozdílu v přežitelnosti spermií před chladovým testem a po něm, se všichni býci statisticky shodovali.

Ani v případě vlivu použitého komerčního ředidla, jehož prokázání bylo náplní druhé části mé práce, nemůžeme stanovenou hypotézu přijmout. Statistická shodnost ředidel byla zjištěna jak u naměřených hodnot přežitelnosti, tak po vyjádření efektu chladového šoku.

Závěrem lze tedy říci, že jistá individualita se mezi býky i mezi ředidly vyskytuje, ale nemá v rámci mé práce na přežitelnost spermií zásadní vliv. Jak už bylo zjištěno v jiných pracích, nejvýznamnější vliv na přežitelnost spermií v průběhu chladového šoku má obsah LDL v ředidle.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abou-Halia A., Tulsiani D. R. P. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and acrosome reaction. *Archive of biochemistry and biophysics* 485. p. 72 – 81
- Aguas A. P., Pinto da Silva P. 1983. Regionalization of transmembrane glycoproteins in the plasma membrane of boar sperm head is revealed by fracture-label. *J Cell Biol* 97. p. 1356–64
- Akhter S., Sajjad M., Andrabi S. M. H., Ullah N., Qayyum M. 2007. Effect of liquid buffalo bull semen. *Pakistan Vet. J.* 27/1. p. 13-16
- Almquist J. O. 1976. Effect of cold shock after thawing on acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in plastic straws. *Journal of dairy science.* 59/10. p. 1825-1829
- Amann R. P. 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A. D., Gomes, W. R., VanDemark, N. L., *The Testis Vol. 1 Academic Press, New York.* p. 433–482
- Amann R. P., Johnson L. Thompson D. L. Jr., Pickett B. W., 1976. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. *Biol. Reprod.* 15. p. 586–592
- Amann R. P. 1983. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of dairy science.* 66 /12. p. 2606–22
- Amann R. P., Schanbacher B. D. 1983 *Physiology of male reproduction.* *J Anim Sci Suppl* 57. p. 380–403
- Amirat L., Anton M., Tainturier D., Chatagnon G., Battut I., Courtens J. L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 4. P. 535-543
- Amirat L., Tainturier D., Jeanneau L., Thorin C., Gerard O., Courtens J. L., Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl (R), a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 5. 895-907
- Arcelay E., Salicioni A. M., Wertheimer E., Visconti P. E. 2008. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 52. p. 463–72

- Arnoult C., Zeng Y., Florman H. M. 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels ferulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.*134. p. 637–645
- Baccetti B., Strehler E., Capitani S., Colloodel G., De Santo M., Moretti E., Piomboni P., Wiedeman R., Sterzik K. 1997. The effect of follicle stimulating hormone therapy on human sperm structure (*Notulae seminologicae II*), *Hum. Reprod.* 12. p. 1955–1968
- Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol* 308. p. 39–46
- Balić M. I., Milinković-Tur S., Samardžija M., Vince S. 2012. Effect of age and enviromental factors on semen quality, glutatione peroxidase aktivty and oxidative parametres in simmental bulls. *Theriogenology.* 78. p. 423 – 431
- Barth A. D., 1997. Evulation of potencial breeding soundness of the bull. In: Youngquist RS, editor. *Current therapy in large animal theriogenology.* Philadelphia: WB Saunders (chepter 28). p. 222 - 236
- Barth A. D., Oko R. J. 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa* Ames, Iowa: Iowa State University Press
- Belling R. H. S., Liberles D. A., Iaschi S. P. A., O'Brien P. A., Tya G. K. 2005. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Anim Gen.* 36. p. 1 -6
- Benoff S., Hurley I. R., Mandel F. S., Cooper G. W., Hershlag, A. 1997. Potential role for kadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Mol. Hum. Reprod.* 3. p. 827–837
- Bensoussan K., Morales C. R., Hermo L. 1998. Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat. *J Androl* 19. p. 266–88
- Bergeron A., Brindley Y., Blodnin P. Manjunath P. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major, bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77. p. 120-126
- Berndtson W. E., Desjardins C. 1974. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am. J. Anat.* 140. p. 167–180
- Bhakat M., Mohanty T. K., Raina V. S., Gupta A. K., Khan H. M., Mahapatra R. K.. 2011. Effect of age and season on semen quality parametres in Sahiwal bulls. *Trop Anim Health Prod.* 43. p. 1161 - 1168

- Bhoite, U. Y., Stuar, D. A., Ulmek, E. R. 2008. Studies on semen quality of crossbred bulls. *Indian Veterinary Journal*. 85/ 4. p. 53-55
- Bialy G., Smith V. R. 1958. Number of spermatozoa in the different parts of the reproductive tract of the bull. *Journal of diary science*. 59/10. p. 1781-1786
- Björndahl L., Kvist U. 2010. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Human Reprod* 16. p. 23–29
- Bousseau S., Brillard J. P., Marquant-Le Guienne B., Guerin B, Camus A., Lechat M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 5. p. 699-706
- Brito L. F., Silva A. E., Rodrigues L. H., Vieira F. V., Deragon L. A., Kastelic J. P. 2002. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in bos indicus and bos taurus AI bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci*. 70. p. 181 -190
- Carlson A. E, Hille B, Babcock DF. 2007. External Ca^{2+} acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol* 312. p. 183–92
- Carreau S., Bouraima-Lelong H., Delalande C. 2011. Estrogens: new players in spermatogenesis. *Reprod Biol* 11/3. p. 174- 93
- Cassou R. 1964. La methode de paillettes en plastique adaptee a la generalisation de la congelation. *Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Trento Italy* 4. p. 540–546
- Curry M. R., Watson P. F. 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology* 31. p. 39–46
- Černý H. 2004. *Vetereinární anatomie pro studium a praxi*, 2. vydání. Noviko. Brno s. 528
- Dacheux J. L., Castella S., Gatti J. L., Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63. p. 319–41
- Dacheux J. L., Gatti J. L., Dacheux F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 61. p. 7–17
- De Leeuw F. E., De Leeuw A. M., Den Daas J. H. G. 1993. Colenbrander, B., Verkleij A. J. Effects of various cryoprotective agents and membráně stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30. p. 32–44

- De Rooij D. G., Russell L. D. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 21 p. 776–98
- Desnoyers L., Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J. Biol. Chem.* 267. P. 10149–10155
- Dhama A. J., Sabni K. L. 1993. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of tamme bull spermatozoa. *Theriogenology* 40. P. 1269-1280
- Dow M. P., Bavister B. D. 1989. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Res* 23 p. 171-180
- Eddy E. M., O'Brien D. A. 1994. *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York. p. 29–77
- Fahy G. M., 1986. The relevance of cryoprotectant 'toxicity' to cryobiology. *Cryobiology* 23. p. 1–13
- Fan J., Lefebvre J., Manjunath P. 2006. Bovine seminal plasma proteins and their relatives: A new expanding superfamily in mammals. *Gene* 375. p. 63-74
- Filippi S., Vignozzi L., Vannelli G. B., Ledda F., Forti G., Maggi M. 2002. Role of oxytocin in the ejaculatory process. *J Endocrinol Invest* 26 p. 82–6
- Flesch F. M., Brouwers J. F., Nievelstein P. F., Verkleij A. J., van Golde L. M. 2001. Colenbrander B, et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* 114. p. 3543–55
- Flick D. L., Merila C. P. 1986. Semen collection efficiency using an artificial vagina plastic liner. *Theriogenology* 25/6. p. 821-82
- Ford W. C. 2006. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help tje flagellim go round? *Hum Reprod Update* 12/3. p. 269 – 274
- Forero-Gonzalez, R. A., Celeghini E. C. C., Raphael C. F., Andrade A. F. C., Bressan F. F., Arruda R. P. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia* 1. 154-159
- França L. R., Hess R. A., Cooke P. S., Russell L. D. 1995. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec* 242. p. 57–69
- Frandson R. D., Wilke W., Fails A. D. 2009 *Anatomy and phisiology of farm animals*, 7. vydání. Wiley-Blackwell. Ames. p. 512

- Fuente L. F., Sanchez Garcia L., Vallejo M. 1984 Reproductive performance of Rubia Gallega breed I. characteristics of semen used in artificial insemination. *Angales de la Facultad de veterinaria de Leon*. 30. p. 119 – 125
- Fuerst-Waltl B., Schwarzenbacher H., Perner Ch., Sölkner J. 2006. Effects of age and enviromental factors on semen producton and semen quality of Australian Simmental bulls. *Anim Reprod Sci*. 95. p. 27-37
- Fuller S. J., Whittingham D. G. 1997. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol Reprod Dev* 46. p. 318-324
- Gadella B. M. 2012. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reprod Fertil Dev* 25. p. 26–37
- Gadella B. M., Tsai P. S., Boerke A., Brewis I. A. 2008. Sperm head membráně reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* 52. p. 473–80
- Gamčík P., Kozumplík J. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat* . 299 s. *Príroda*. Bratislava
- Garner D. L. 1997. Ancillary tests of bull semen quality. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13. p. 313–30
- Gibbons R., Adeoya-Osiguwa S. A., Fraser L. R. 2005. A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolaminebinding protein 1. *Reproduction* 130. p. 497–508
- Hafez B., Hafez E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 509 p. Lippincott Williams & Wilkins
- Hammerstedt R. H., Hay S., Amann R. E. 1982 Modification of ram sperm membranes during epididymal transit. *Biol Reprod* 27. p. 745-750
- Harrison R. A., Gadella B. M. 2005. Bicarbonate-induced membráně processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63. p. 342–51
- Heckert L. L., Griswold M. D. 2002. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 57. p. 129–48
- Henkel R. R., Schill W. B. 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 1. p. 108
- Herold, F.C., Gerber, D., Aurich, J. E. 2003: Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl or AndroMed. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 90 (3). p. 58-61

- Herold, F.C., Aurich, J.E., Gerber, D. 2004: Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed and Triladyl but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology*. 61 (4). p. 715-724
- Hess R. A., Zhou Q., Nie R., Oliveira C., Cho H., Nakai M. 2001. Estrogens and epididymal function. *Reprod Fertil Dev* 13. p. 273–83
- Hodson N. 1965. Sympathetic nerves and reproductive organs in the male rabbit. *J Reprod Fertil* 10. p. 209–20
- Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Pospíšil, Z. 2009. *Nemoci skotu*. Česká buiatrická společnost, Brno. p. 1149
- Hoflack G., Opsomer G., Van Soom A., Maes D., de Kruif A., Deuchateau L. 2006. Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. *Theriogenology* 66. p. 1834-1846
- Holt W. V., North R. D. 1986. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 78. p. 447-457
- Chandolia R. K., Honaramooz A., Omeke B. C., Pierson R., Beard A. P., Rawlings N. C. 1997. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology* 48/1. p. 119-132
- Chantler, E., Abraham-Peskir, J.V., Little, S., Mc Cann, C., Mederwaldt, R., 2000: Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology*. 41, p. 125-134.
- Church K. E., Graves C. N. 1976. Loss of acrosin from bovine spermatozoa following cold shock: Protective effects of seminal plasma. *Cryobiology* 13/3. p. 341 – 346
- Inoue N., Satouh Y., Ikawa M., Okabe M., Yanagimachi R. 2011. Acrosomereacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 108. p. 20008–11
- Januskauskas A., Gil J., Söderquist L., Haard M., C., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52/4. p. 641-658
- Johnson L. 1986. Review article: spermatogenesis and aging in the human. *J. Androl.* 7. p. 331–354

- Johnson L., Varner D. D., Roberts M. E., Smith T. L., Keillor G. E., Scrutchfield W. L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* 60–61. p. 471–480
- Johnson L., Wilker C. E., Cerelli J. S. 1994. Spermatogenesis in the bull. *Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.* 15. p. 9–27
- Jones R. C. 1976. The nature of ultrastructural changes induced by exposure of spermatozoa to lysolecithin. *Theriogenology* 6. 656
- Jones R. C., Stewart D. L. 1979. The effects of cooling to 5° C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 56. p. 233–238
- Kliment J. a kol. 1983. *Reprodukcia hospodárskych zvierat. Príroda, vydavateľstvo kníh a časopisov*, n.p. Bratislava, p. 376
- König H E. 2002. *Anatomie domácich savců 2: Splanchnologie, cévní a nervová soustava*. Hajko & Hajková. Bratislava. p. 416
- Krishnamurthy H., Danilovich N., Morales C. R., Sairam M. R. 2000 Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol. Reprod.* 62 p. 1146–1159
- Leahy T., Gadella B. M. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 142. p. 759–78
- Lenz R. W., Ball G. D., Lohse J. K., First N. L., Ax, R. L. 1983. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, elektron microscopy and in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 28. p. 683–690
- Louda F., Čeřovský J., Jeřková A., Stádník L. 2001. *Inseminace hospodárskych zvierat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita v Praze- AF*
- Lu C. H., Lee R. K., Hwu Y. M., Chu S. L., Chen Y. J., Chang W. C., 2011. SERPINE2, a serine protease inhibitor extensively expressed in adult male mouse reproductive tissues, may serve as a murine sperm decapacitation factor. *Biol Reprod* 84. p. 514–25
- Manjunath P., Marcel Y. L., Uma J., Seidah N. G., Chretien M., Chapdelaine A. 1989. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasmaproteins. *J. Biol. Chem.* 264. p. 16853–16857
- Manjunath P., Chandonnet L., Leblond E., Desnoyers L. 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology of reproduction* 49. p. 27–37

- Manjunath P., Nauc V., Bergeron A., Ménerd M. 2002a. Major protein of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 67. p. 1250-8
- Manjunath P., Therien I. 2002b. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53. p. 109–119
- Mann T., Lutwak-Mann C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*, 1st edn. New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Marvan F., Hampl A., Hložánková E., Kresan J., Massanyi L., Vernerová E. 2007. *Morfologie hospodářských zvířat*, 4. vydání. Brázda. Praha. p. 304
- Mathevon M., Buhr M. M., Dekkers J. C. M., 1998. Environmental, management and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *Journal of dairy science.* 81. p. 3321 - 3330
- Mazur P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14. p. 251–272
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247. p. 125–142
- Mazur P., Liebo S. P., Chu E. H. Y. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell Res.* 71. p. 345–355
- McLachlan R. I., Wreford N. G., deKretser D. M., Robertson D. M. 1995. The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 136. p. 4035–4043
- Meyers S. A., Rosenberger A. E. 1999. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol. Reprod.* 61. p. 444–451
- Miki K., 2007. Energy metabolism and sperm function. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65. p. 309–325
- Mohan J., Moudgal R. P., Panda J. N., Mohan G. 1992. Effects of cold shock treatment on angiotensin-converting enzyme activity and on semen characteristics in roosters and bulls. *Theriogenology* 37/5. p. 1147-1154
- Muiño, R., Fernández, M., Peña, A.I., 2007: Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk- based or two egg-yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. *Reprod. Dom. Anim.* 42, p. 305-31
- Moussa M., Martinet V., Trimeche A., Taintorier D., Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57. p. 1695-1706

- Murase T., Roldan E. R. 1996. Progesterone and the zona pellucida activate different transducing pathways in the semence of events leading to diacylglycerol generation during mouse sperm acrosomal exocytosis. *Biochem.* 320. p. 1017–1023
- Najbrt R. 1982. *Veterinární anatomie díl 2.* SZN. Praha. p. 594
- Nauc V., Manjunath P. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol. Reprod.* 63. p. 1058–1066
- Nicolajsen, H., Hvidt, A., 1994. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl–water. *Cryobiology* 31. p. 199–205
- Norman C., Johnson C. E., Porterfield I. D., Dunbar R. S. 1958. Effect of pH on the lifespan and metabolism of bovine sperm kept at room temperatures. *J. Dairy Sci.* 41. p. 1803–1812
- O'Donnell L., McLachlan R. I., Wreford N. G., de Kretser D. M., Robertson D. M. 1996. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium, *Biol. Reprod.* 55. p. 895–901
- Palmer C. W., Amundson S. D., Brito L. F. C., Waldner C. L., Barth A. D. 2004. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 80. p. 213-222
- Palmer C. W., Brito L. F. C., Arteaga A. A., Söderquist L., Persson Y., Barth A. D. 2005. Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 87. p. 25 – 31
- Parkinson T. J., Noakes D. E., England G. C. W., Arthur G. H. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics.* W. B. Saunders. p. 849
- Pérez-Pé R., Cebrihn-Pérez J. A., Muifio-Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 37/5. p. 1147 – 1154
- Phillips N. J., McGowan M. R., Johnston S. D., Mayer D. G. 2004. Relationship between théty post-thaw spermatozoal characteristics and filed fertility of 11 hihg-use Australian diary AI sires. *Anim Reprod Sci.* 81. p. 47 - 61
- Phillips P. H., Lardy H. A. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* 23. p. 399–404
- Plant T. M., Marshall G. R. 2001. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev* 22. P. 764–86

- Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature London* 164. p. 166
- Polge C., Smith A. U., Parkes A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature London* 164. p. 166
- Prathalingam N. S., Holt W. W., Revell S. G., Jones S., Watson P. F. 2006. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl* 27. p. 257–62
- Pursel V. G., Johnson L. A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* 40. p. 99-102
- Reece O. W. 1998: *Fyziologie domácích zvířat*. Praha, Grada Publishing, spol. s.r.o. p. 456
- Robaire B, Viger R. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 52. p. 226–36
- Robbins R. K., Saacke R. G., Chandler P. T. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. *J. Anim. Sci.* 42. p. 145–154
- Robertson L., Bailey J. L., Buhr M. M. 1990. Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol Reprod Dev.* 26. p. 143-149
- Rodriguez-Martinez H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68. p. 138–46
- Rodriguez-Martinez H., Kvist U., Ernerudh J., Sanz L., Calvete J. J. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 66. p. 11–22
- Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Peña FJ, Martinez EA, Roca J, Vazquez JM, Calvete JJ: The physiological roles of the boar ejaculate. *In Control of Pig Reproduction VIII*. Nottingham, UK, Nottingham University Press, 2009, p. 1–21
- Ruiz-Pesini E., Díez-Sánchez C., López-Pérez M. J., Enríquez J. A., 2007. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr. Top. Dev. Biol.* 77. p. 3–19
- Russell L. D, Corbin T. J, Borg K. E, Franc, a L. R, Grasso P, Bartke A. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology* 1993;133:2062–70

- Russell L. D., Griswold M. D., Russell L. D., Griswold M. D. 1993. The Sertoli cell. Clearwater: Cache River Press; 1993
- Saez J. M. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocrine Reviews* 15. p. 574-626
- Salisbury G. W., Hart R. G. 1970. Gamete aging and its consequences. *Biol. Reprod.* 2. p. 1–13
- Setchell B. P. 1998. The Parkes lemur. Heat and the testis. *J Reprod Sci.* 114. p. 179 - 194
- Shannon P., Curson B. 1984. Effect of storage temperature on the viability and fertility of bovine sperm diluted and stored in Caprogen. *N. Z. J. Agric. Res.* 27. p. 173–177
- Sharpe R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press. p. 1363–434
- Shettles L. B. 1940. Carbon dioxide tension and its relation to the quiescence of spermatozoa in vivo. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 45. p. 318–322
- Singh J., Handelsman W. 1996. The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice, *J. Androl.* 17. p. 382–393
- Snoj T., Kobal S., Majdic G. 2013. Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* Leedes in a 31-year retrospective study. *Theriogenology.* 79. p. 847 - 852
- Sostaric E, Dieleman S. J., van de Lest C. H., Colenbrander B., Vos P. L., Garcia-Gil N. 2008a. Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Mol Reprod Dev* 75. p. 60–74
- Sostaric E., Aalberts M., Gadella B. M., Stout T. A. 2008b. The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 107. p. 237–48
- Strauss C. S., Votta T. J., Suarez S. S. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of hamster zona pellucida. *Biology of reproduction.* 53/6. p. 1280-1285
- Sutovsky P., Lovercamp K. 2010. Molecular markers of sperm quality. *Soc Reprod Fertil Suppl* 67. p. 247–56
- Sweadner K. J., Goldin S. M. 1980. Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation. *N. Engl. J. Med.* 302. p. 777–783

- Takahashi T., Itoh R., Nishinomiya H., Katoh M., Manabe, N., 2012: Effect of Linoleic Acid Albumin in Dilution Solution and Long-term Equilibration for Freezing of Bovine Spermatozoa with Poor Freezability. *Reprod. Dom. Anim.* 47. p. 92-97
- Tanaka H., Baba T. 2005. Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 62. p. 344–54
- Tannert A., Topfer- Petersen E., Herrmann A., Muller K., Muller P., 2007. The lipid composition modulates the influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on membrane stability. *Biochemistry* 41. p. 11621-11629
- Tarin J. J., Trounson A. O. 1994. Inducers of the acrosome reaction. *Reprod Fertil Dev* 6:33–5; discussion 35–6
- Teixeira H. C., Nascimento N. V., McManus C., Egito A. A., Mariante Ada S., Ramos A., F. 2011. Seasonal influence on semen trans and freezability from local adapted Curraleiro bulls. *Anim Reprod Sci.* 125. p. 56 - 61
- Thepparat T., Katawatin S., Vongpralub T., Duangjinda M., Thammasirirak S., Utha A. 2012. Separation of bovine spermatozoa proteins using 2D-PAGE revealed the relationship between tektin-4 expression patterns and spermatozoamotility. *Theriogenology* 9. P. 1816-1821
- Thérien I., Soubeyrand S., Manjunath P., 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57. p. 1080–1088
- Thérien I., Bleau G., Manjunath P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.* 52. p. 1372–1379
- Tsai P. S., Garcia-Gil N., van Haefen T., Gadella B. M. 2010. How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane. *PLoS One.* p. 11204
- van Demark N. L., Miller W. J., Kinney W. C. Jr., Rodriguez C., Friedman M.E. 1957. The preservation of bull semen at sub-zero temperatures. *Agric. Exp. Stn., Bull.* p. 621
- van Gestel R. A., Brewis I. A., Ashton P. R., Brouwers J. F., Gadella B. M. 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol Hum Reprod* 13. p. 445–54
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM. 2007. Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol Hum Reprod* 13. p. 445–54

- Vera-Mouz, O., Amirat-Briand, L., Diaz, T., Vásquez, L., Schmidt, E., Desherces, S., Tainturier, D. 2009: Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender, Comparison to Triladyl and Bioxcell. *Theriogenology*. 71 (6). p. 895-900
- Věžník Z., Švecová D., Zajícová A., Přinosilová P. 2004. *Repetitorium - spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. VÚVeL. Brno. 87 s.
- Visconti P. E., Galantino-Homer H., Ning X. P., Moore G. D., Valenzuela J. P., Jorgez C. J., Alvarez J. G., Kopf G. S. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. *Dev Biol*. 274. p. 3235-3242
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 53. p. 133–50
- Vishwanath R., Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Rep. Sci.* 62. p. 23-53
- Vishwanath R., Shannon P., Curson B. 1992. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilising ability of bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 29. p. 185–194
- Wang Y, Kong N, Li N, Hao X, Wei K, Xiang X. 2013. Epidermal growth factor receptor signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and meiotic resumption in mouse oocytes. *Endocrinology* 154. p. 3401–9
- Ward W. S. 2011. Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biol Reprod* 84. p. 841–3
- Watson P. F. 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 1. p. 283–350
- Watson P. F. 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 1. p. 283–350
- Watson P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7. p. 871–891
- Watson P.F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. London: Academic Press. p. 189-218
- Weber J. E., Russell L. D. 1987. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat. *Am J Anat* 180. p. 1–24

- White I. G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in to cold and preservation. *Reproduction, fertility and development* 5/6. p. 639-658
- Woelders H., Mathijis A., Engel B. 1997. Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35. p. 93–105
- Woelders, H., 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet. Q.* 19. p. 135–138
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd. 189-315
- Yanagimachi R. 1994. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York. p. 189–317
- Zeng W. X., Terada T. 2000. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* 55/2. p. 615-627

9. PŘÍLOHY

Seznam příloh

Tabulky

Tab. 1: Hodnocení kvality ejakulátu býků

Tab. 2: Hodnoty podílu živých spermií v neředěném ejakulátu, čas 0

Tab. 3: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 0

Tab. 4: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 1

Tab. 5: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 2

Tab. 6: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 3

Tab. 7: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla AndroMed®

Tab. 8: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla BIOXcell®

Tab. 9: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla Optidyl®

Tab. 10: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla Steridyl®

Tab. 11: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla Triadyl®

Tab. 12: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla BULLXcell®

Grafy

Graf 1: Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu u různých plemenných býků

Graf 2: Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu dle typu užitkovosti

Graf 3: Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu dle typu použitého ředidla

Graf 4: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk A

Graf 5: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk B

Graf 6: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk C

Graf 7: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk D

Graf 8: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk E

Graf 9: Průměrné procento živých spermií u jednotlivých býků

Graf 10: Průměrný rozdíl procenta živých spermií před a po chladovém testu u jednotlivých býků

Graf 11: Pokles procenta živých spermií v čase

Graf 12: Procento živých spermií v čase u jednotlivých býků

Graf 13: Rozdíl v poklesu procenta živých spermií v čase

Graf 14: Rozdíl v poklesu procenta živých spermií v čase u jednotlivých býků

Graf 15: Rozdíl v přežitelnosti spermií neředěného a ředěného ejakulátu a mezi ředidly

Graf 16: Procento živých spermií u jednotlivých býků ejakulátu při použití různých ředidel (čas 0)

Graf 17: Procento živých spermií u jednotlivých býků ejakulátu při použití různých ředidel (čas 1)

Graf 18: Porovnání procenta živých spermií při použití různých ředidel

Graf 19: Rozdíl v procentu živých spermií před a po chladovém šoku u jednotlivých býků, v čase 0 a 1, při použití různých ředidel

Graf 20: Rozdíl v procentu živých spermií před a po chladovém šoku při použití různých ředidel

Obrázky

Obr. 1: Pohlavní soustava býka

Obr. 2: Spermatogeneze

Obr. 3: Spermie býka

Obr. 4: Morfologie spermie

Obr. 5: Odběr ejakulátu u býka

Obr. 6: Pejety

Obr. 7: Roztěr

Obr. 8: Spermie nabarvené eosinem a nigrosinem

Býk	Objem [ml]	Hustota [10^6 / ml]	Aktivita [%]
A	16,3	1,3	90
B	6,3	1,8	80
C	10,8	1,8	80
D	6,9	1,6	80
A _f	7,8	1,1	50
B _f	10	0,9	50
C _f	4,5	0,8	80
D _f	4	1,6	80

Tab. 1: Hodnocení kvality ejakulátu býků

Býk	Hodnoty naměřené před chladovým testem [%]	Hodnoty naměřené po chladovém testu [%]		Průměrný rozdíl v přežitelnosti před a po testu [%]
		nejvyšší	nejnižší	
A	77,37	73,97	67,54	7,14
B	74,85	51,93	50,83	23,47
C	79,82	78,03	74,59	4,39
D	72,38	51,96	42,85	24,28
E	72,41	62,96	65,51	6,75

Tab. 2: Hodnoty podílu živých spermií v neředěném ejakulátu, čas 0

Býk	Hodnoty naměřené před chladovým testem [%]	Hodnoty naměřené po chladovém testu [%]		Průměrný rozdíl v přežitelnosti před a po testu [%]
		nejvyšší	nejnižší	
A	76,7	76,32	74,19	0,75
B	64,86	64,44	61,01	2,4
C	75,89	75,01	62,61	4,26
D	69,92	68,75	64,95	2,12
E	63,96	60,39	54,12	6,7

Tab. 3: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 0

Býk	Hodnoty naměřené před chladovým testem [%]	Hodnoty naměřené po chladovém testu [%]		Průměrný rozdíl v přežitelnosti před a po testu [%]
		nejvyšší	nejnižší	
A	76,07	72,51	68,57	3,01
B	58,56	58,23	54,47	1,77
C	69,03	67,52	64,60	2,59
D	64,95	63,3	54,86	6,98
E	56,52	56,91	51,82	2,88

Tab. 4: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 1

Býk	Hodnoty naměřené před chladovým testem [%]	Hodnoty naměřené po chladovém testu [%]		Průměrný rozdíl v přežitelnosti před a po testu [%]
		nejvyšší	nejnižší	
A	64,47	62,28	57,14	4,89
B	52,48	49,53	45,87	5,04
C	65,05	64,65	61,48	2,49
D	53,48	50,96	45,53	4,95
E	49,52	47,92	45,05	3,38

Tab. 5: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 2

Býk	Hodnoty naměřené před chladovým testem [%]	Hodnoty naměřené po chladovém testu [%]		Průměrný rozdíl v přežitelnosti před a po testu [%]
		nejvyšší	nejnižší	
A	62	60,19	58,33	2,4
B	48,31	38,46	29,09	13,16
C	55,45	46,49	52,38	6,96
D	46,61	45,9	42,86	0,37
E	41,18	40,47	32,35	3,68

Tab. 6: Hodnoty podílu živých spermií v ředěném ejakulátu, čas 3

Býk	Neředitelný ejakulát (čas 0) Živé spermie [%]		Čas 0 Živé spermie [%]	Čas 1 Živé spermie [%]
	Před testem			
A _f	Před testem	78,57	77,09	56,52
	Průměrný pokles po testu	7,63	8,4	9,1
B _f	Před testem	65,21	60,93	63,03
	Průměrný pokles po testu	12,14	7,63	6,54
C _f	Před testem	74,78	69,07	66,94
	Průměrný pokles po testu	24,98	9,52	3,16
D _f	Před testem	82,14	73,21	61,9
	Průměrný pokles po testu	18,69	7,61	2
Celkové průměrné hodnoty		Před testem	70,08	62,1
		Průměrný pokles po testu	8,29	5,2

Tab. 7: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla AndoMed®

Býk	Neředitelný ejakulát (čas 0) Živé spermie [%]		Čas 0 Živé spermie [%]	Čas 1 Živé spermie [%]
	Před testem			
A _f	Před testem	78,57	73,68	60,05
	Průměrný pokles po testu	7,63	7,33	3,57
B _f	Před testem	65,21	63,23	41,66
	Průměrný pokles po testu	12,14	8,07	7,88
C _f	Před testem	74,78	69,69	64,53
	Průměrný pokles po testu	24,98	8,55	7,28
D _f	Před testem	82,14	64,28	61,24
	Průměrný pokles po testu	18,69	2,24	1,95
Celkové průměrné hodnoty		Před testem	67,72	43,87
		Průměrný pokles po testu	6,55	5,17

Tab. 8: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla BIOXcell®

Býk	Neředitelný ejakulát (čas 0) Živé spermie [%]		Čas 0 Živé spermie [%]	Čas 1 Živé spermie [%]
	Před testem			
A _f	Před testem	78,57	65,61	60,62
	Průměrný pokles po testu	7,63	8,2	5,63
B _f	Před testem	65,21	48,97	35,39
	Průměrný pokles po testu	12,14	13,15	5,32
C _f	Před testem	74,78	70,15	66,89
	Průměrný pokles po testu	24,98	8,47	4
D _f	Před testem	82,14	66,38	65,46
	Průměrný pokles po testu	18,69	4,92	1,91
Celkové průměrné hodnoty		Před testem	62,78	57,09
		Průměrný pokles po testu	8,69	4,26

Tab. 9: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla Optidyl®

Býk	Neředitelný ejakulát (čas 0) Živé spermie [%]		Čas 0 Živé spermie [%]	Čas 1 Živé spermie [%]
	Před testem			
A _f	Před testem	78,57	54,12	60
	Průměrný pokles po testu	7,63	9,19	12,83
B _f	Před testem	65,21	38,09	29,21
	Průměrný pokles po testu	12,14	6,14	3,54
C _f	Před testem	74,78	65,81	66,38
	Průměrný pokles po testu	24,98	10,45	5,25
D _f	Před testem	82,14	66,1	57,62
	Průměrný pokles po testu	18,69	4,87	9,39
Celkové průměrné hodnoty		Před testem	56,03	53,3
		Průměrný pokles po testu	7,66	7,75

Tab. 10: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla Steridyl®

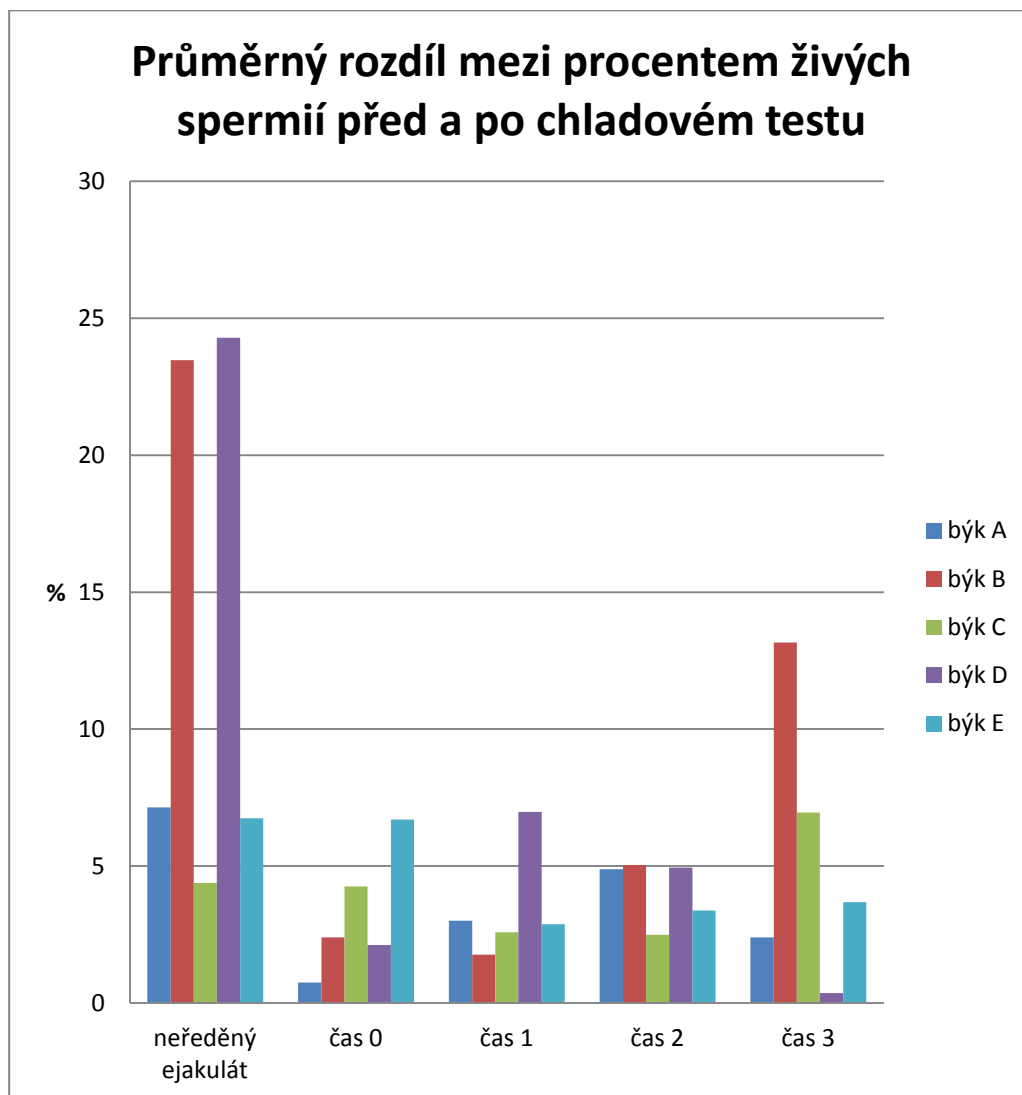
Býk	Neředitelný ejakulát (čas 0) Živé spermie [%]		Čas 0 Živé spermie [%]	Čas 1 Živé spermie [%]
	A _f	Před testem	78,57	56,87
Průměrný pokles po testu		7,63	9,25	1,95
B _f	Před testem	65,21	38,46	28,31
	Průměrný pokles po testu	12,14	7,91	2,02
C _f	Před testem	74,78	69,92	64,78
	Průměrný pokles po testu	24,98	10	10
D _f	Před testem	82,14	63,3	61,24
	Průměrný pokles po testu	18,69	4,88	13,02
Celkové průměrné hodnoty		Před testem	57,14	52,32
		Průměrný pokles po testu	8,01	6,78

Tab. 11: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla Triladyl®

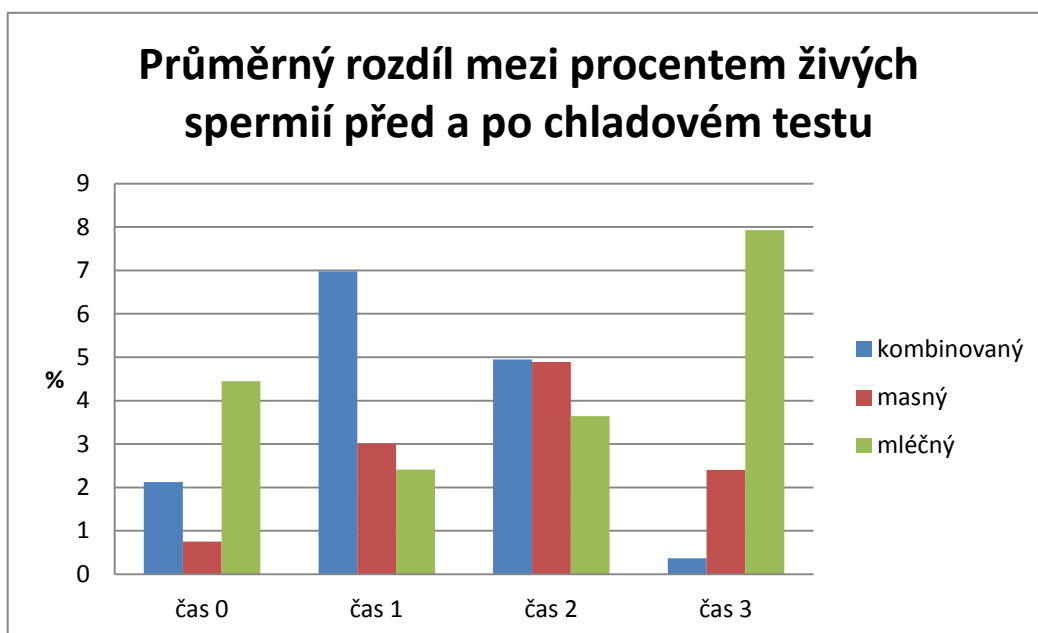
Býk	Neředitelný ejakulát (čas 0) Živé spermie [%]		Čas 0 Živé spermie [%]	Čas 1 Živé spermie [%]
	A _f	Před testem	78,57	47,91
Průměrný pokles po testu		7,63	1,9	2,72
B _f	Před testem	65,21	37,73	34,78
	Průměrný pokles po testu	12,14	4,73	7,2
C _f	Před testem	74,78	69,69	65,21
	Průměrný pokles po testu	24,98	10,48	5,44
D _f	Před testem	82,14	61,53	59,9
	Průměrný pokles po testu	18,69	6,19	5,59
Celkové průměrné hodnoty		Před testem	54,22	52,35
		Průměrný pokles po testu	5,83	5,24

Tab. 12: Souhrnné hodnoty podílu živých spermií při použití ředidla BULLXcell®

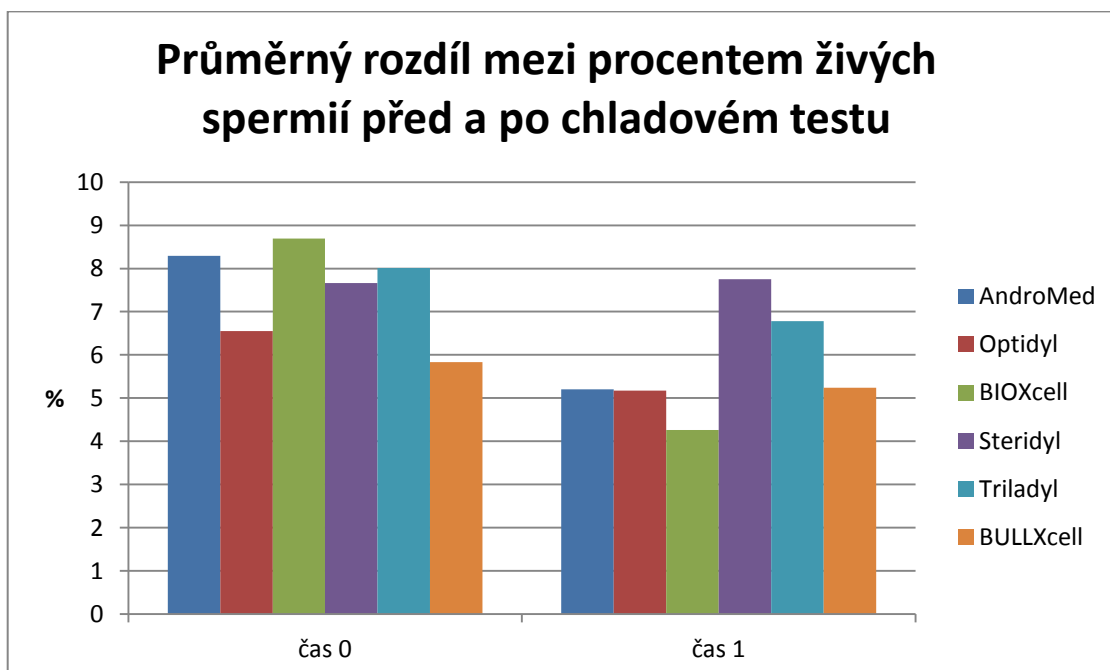
Graf 1: Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu u různých plemenných býků



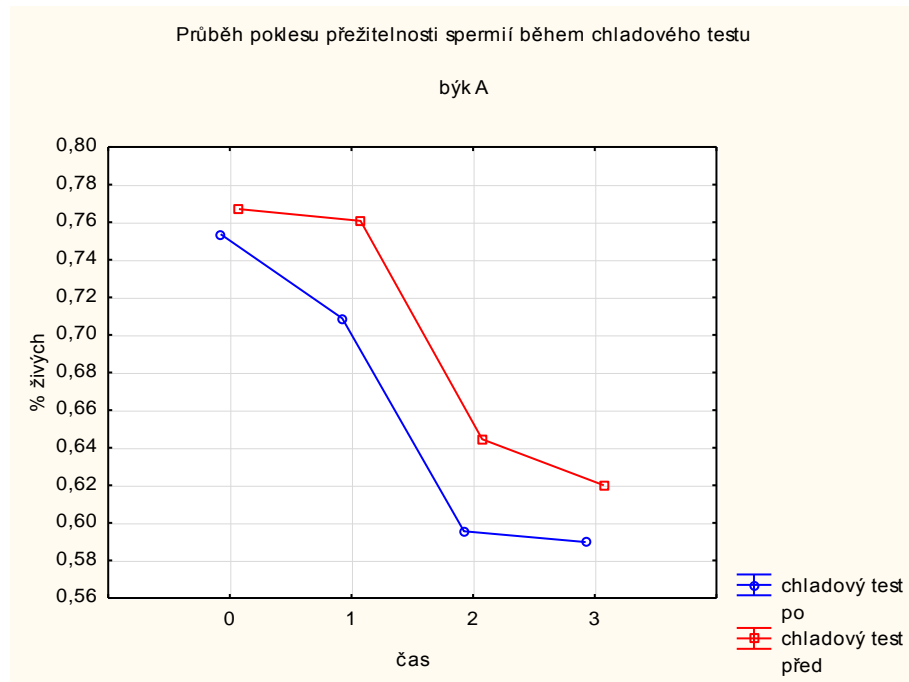
Graf 2: Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu dle typu užtkovosti



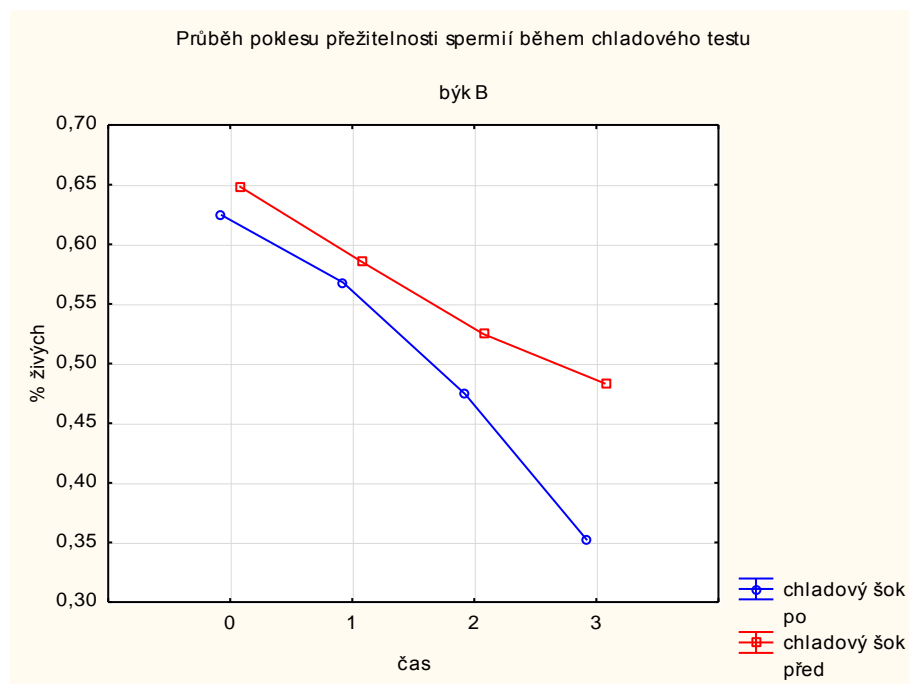
Graf 3: Průměrný rozdíl mezi procentem živých spermií před a po chladovém testu dle typu použitého ředidla



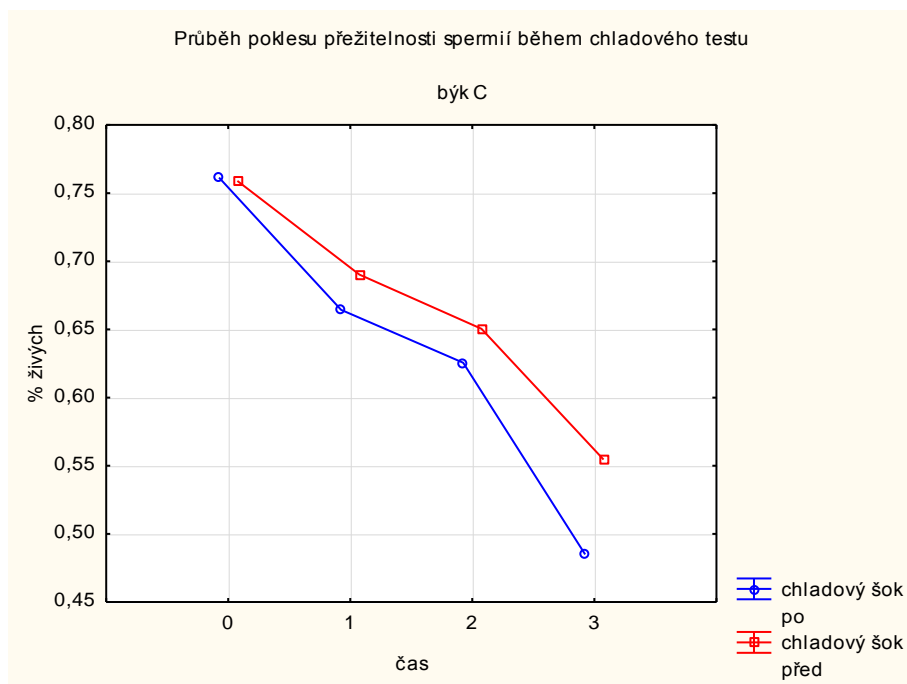
Graf 4: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk A



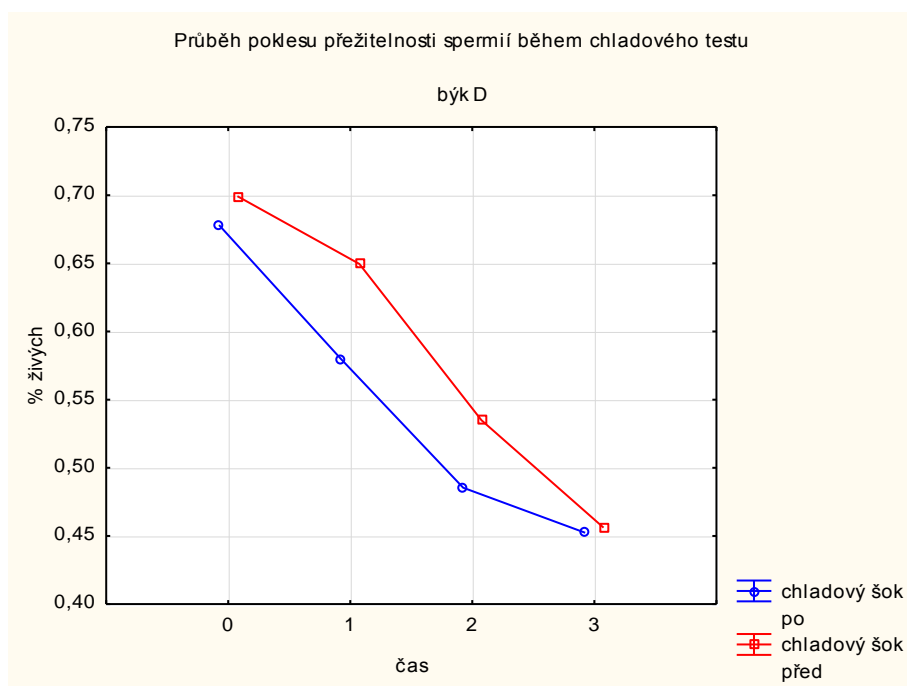
Graf 5: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk B



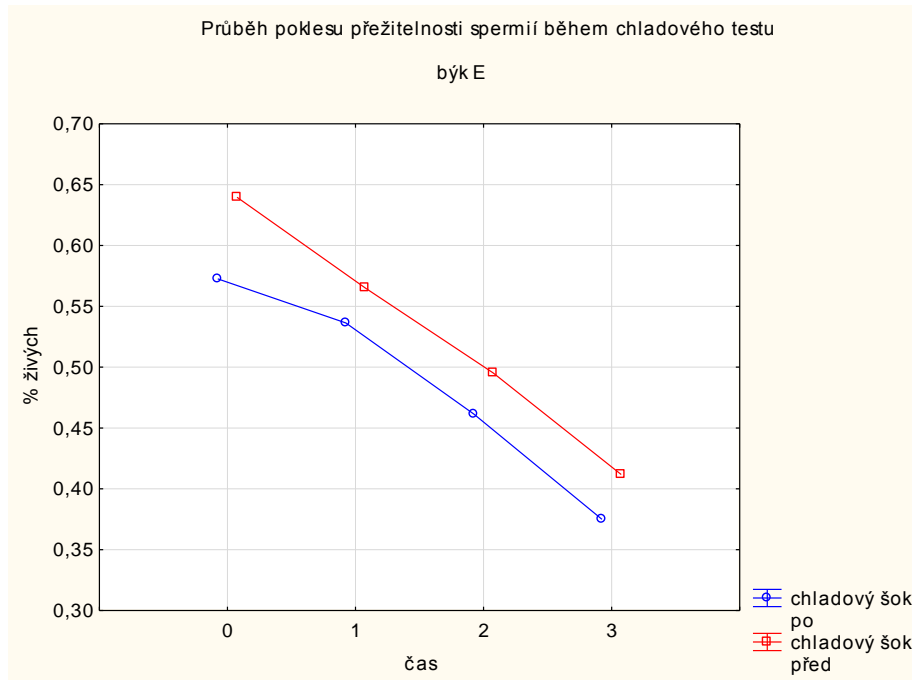
Graf 6: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk C



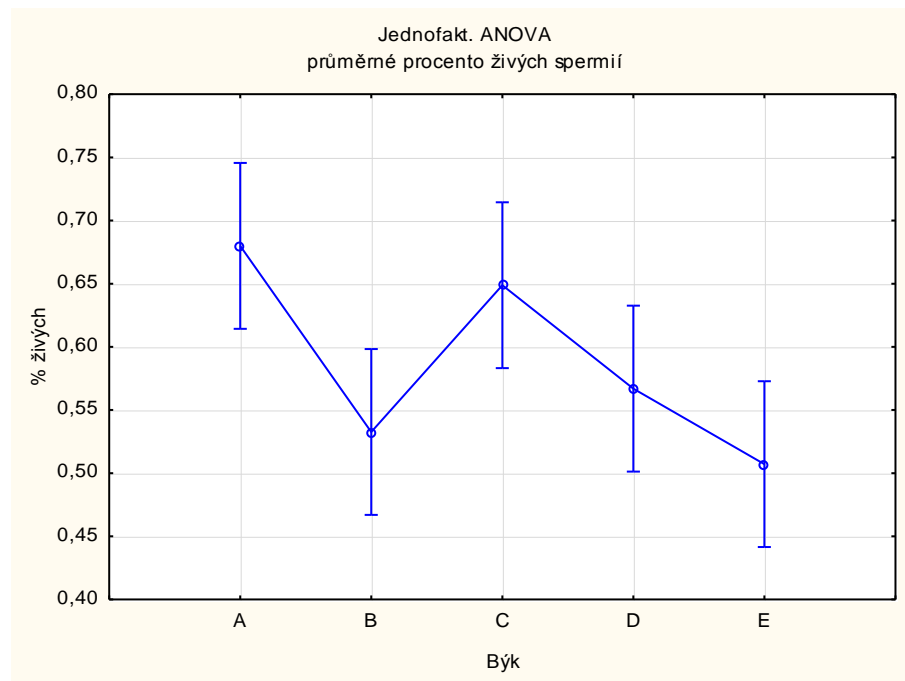
Graf 7: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk D



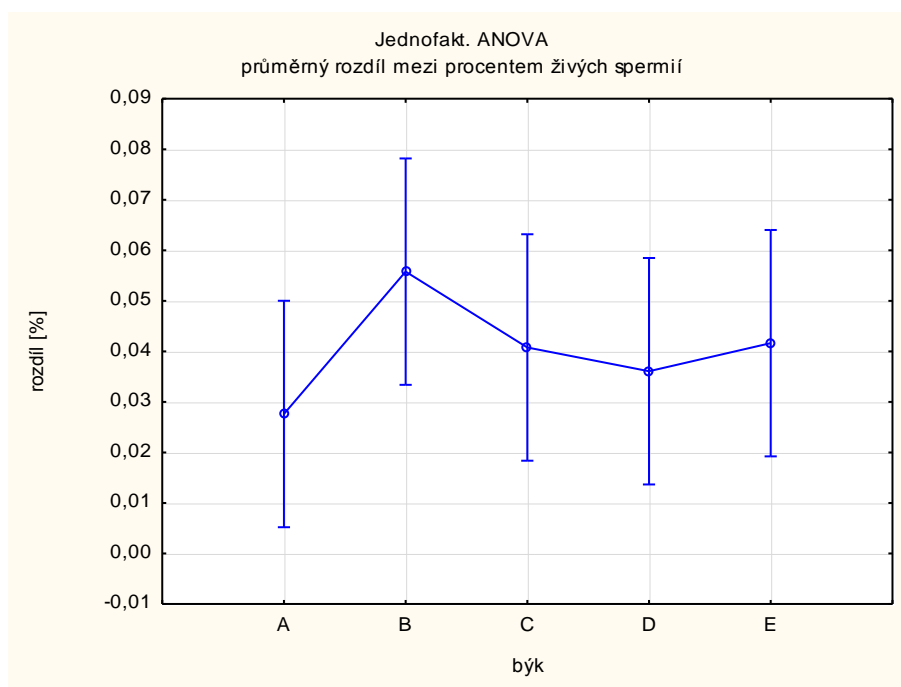
Graf 8: Průběh poklesu přežitelnosti v průběhu chladového testu býk E



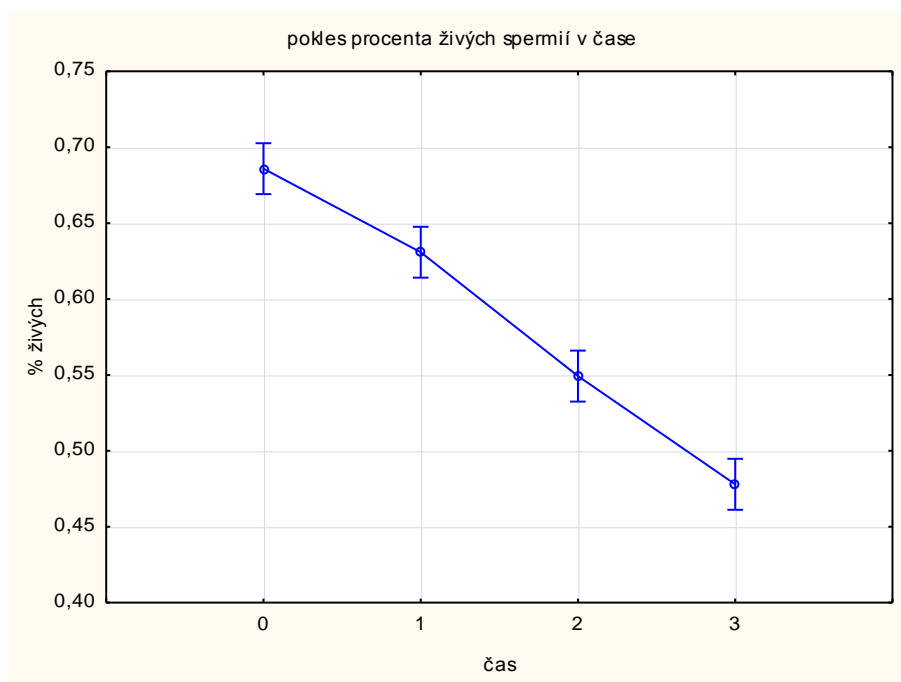
Graf 9: Průměrné procento živých spermií u jednotlivých býků



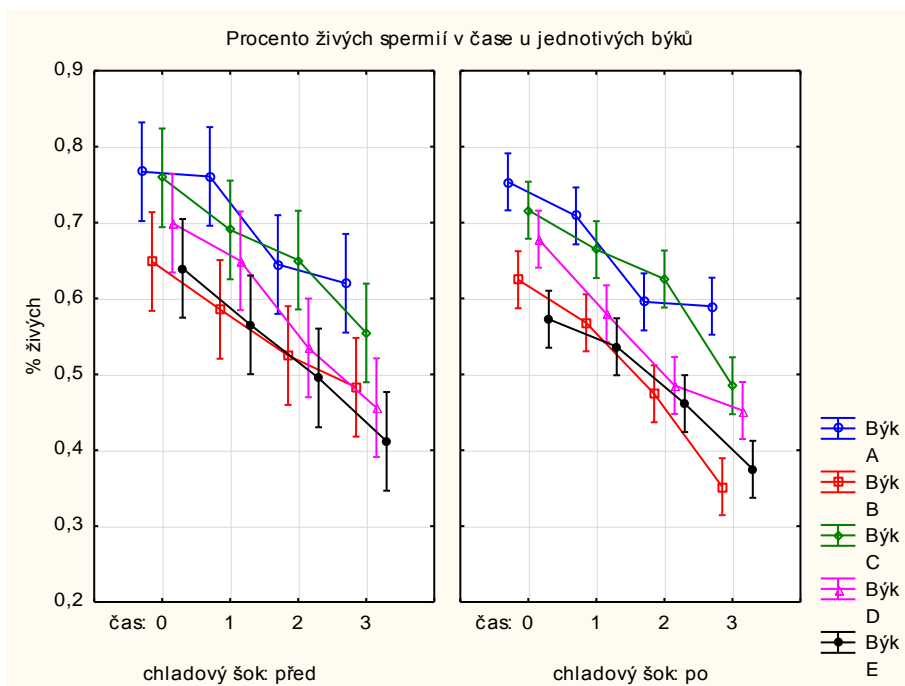
Graf 10: Průměrný rozdíl procenta živých spermií před a po chladovém testu u jednotlivých býků



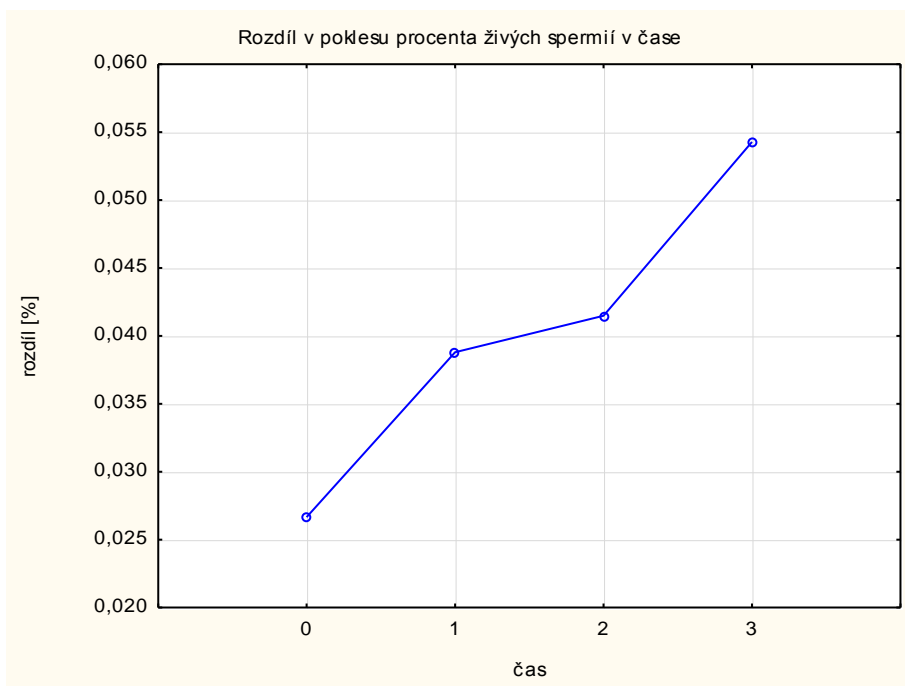
Graf 11: Pokles procenta živých spermií v čase



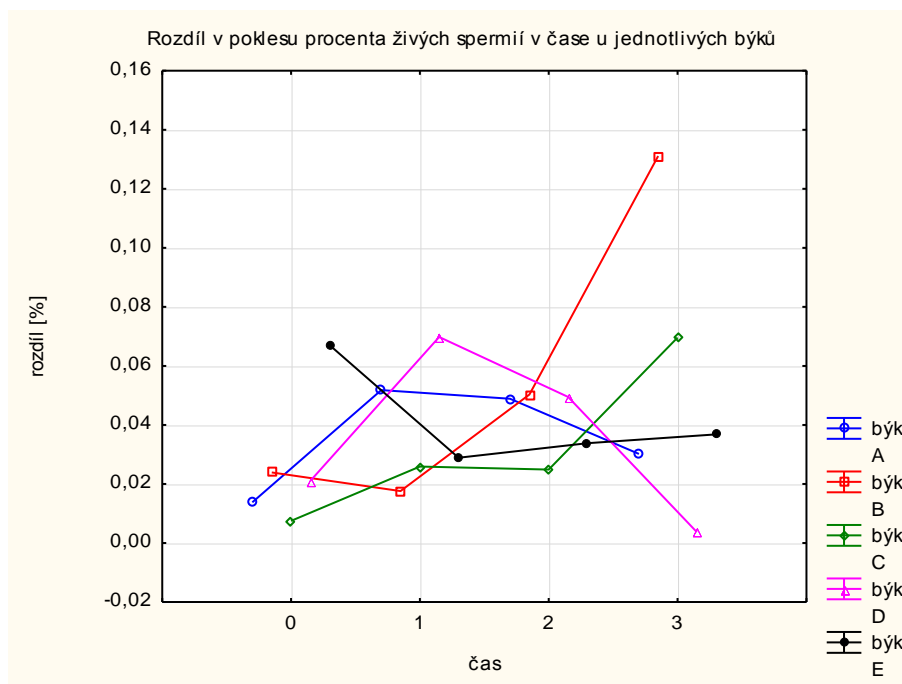
Graf 12: Procento živých spermií v čase u jednotlivých býků



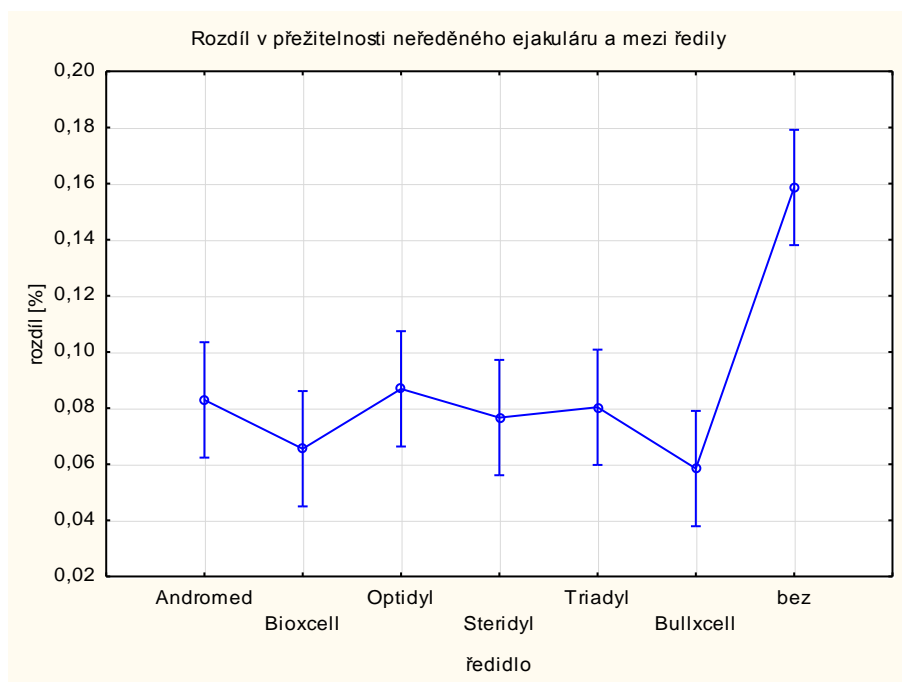
Graf 13: Rozdíl v poklesu procenta živých spermií v čase



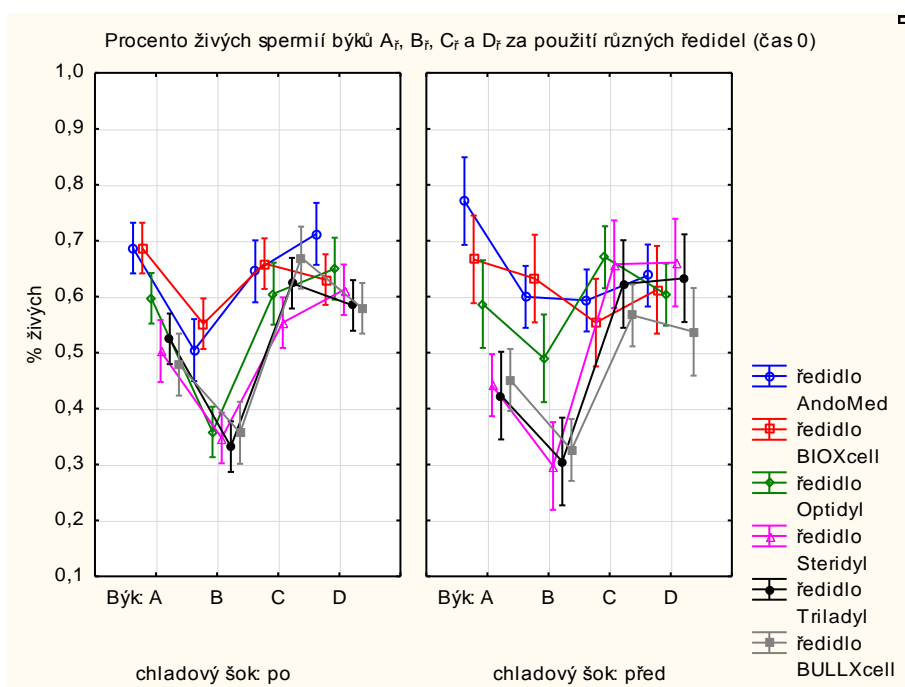
Graf 14: Rozdíl v poklesu procenta živých spermií v čase u jednotlivých býků



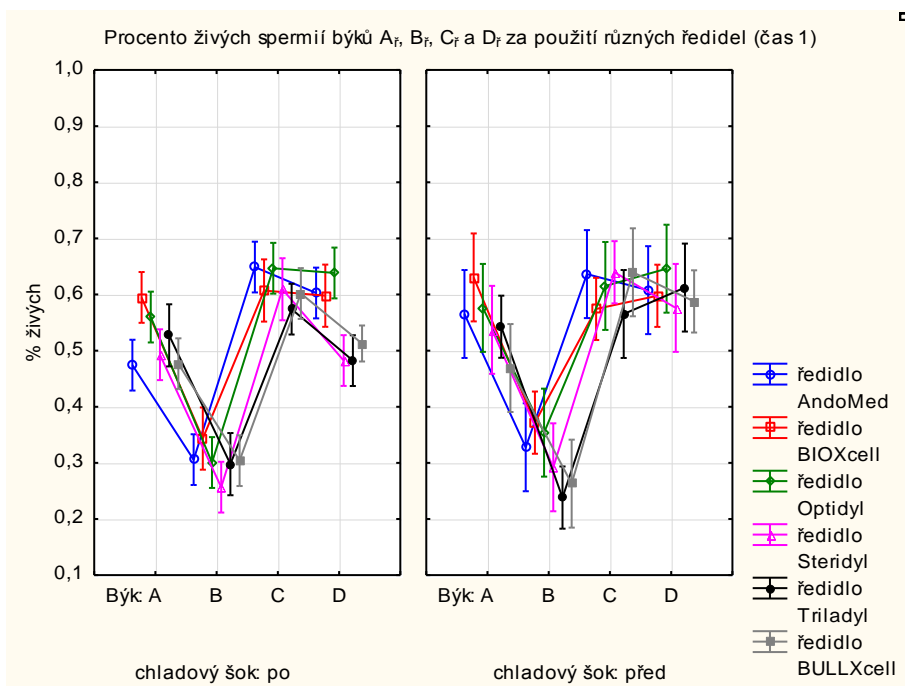
Graf 15: Rozdíl v přežitelnosti spermií neředěného a ředěného ejakulátu a mezi ředidly



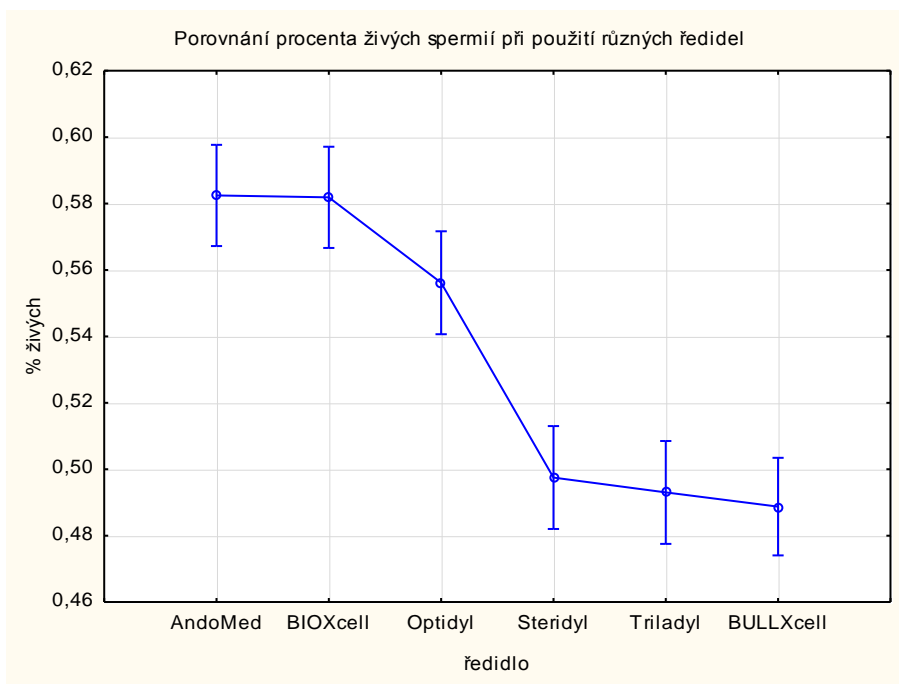
Graf 16: Procento živých spermií u jednotlivých býků ejakulátu při použití různých ředidel (čas 0)



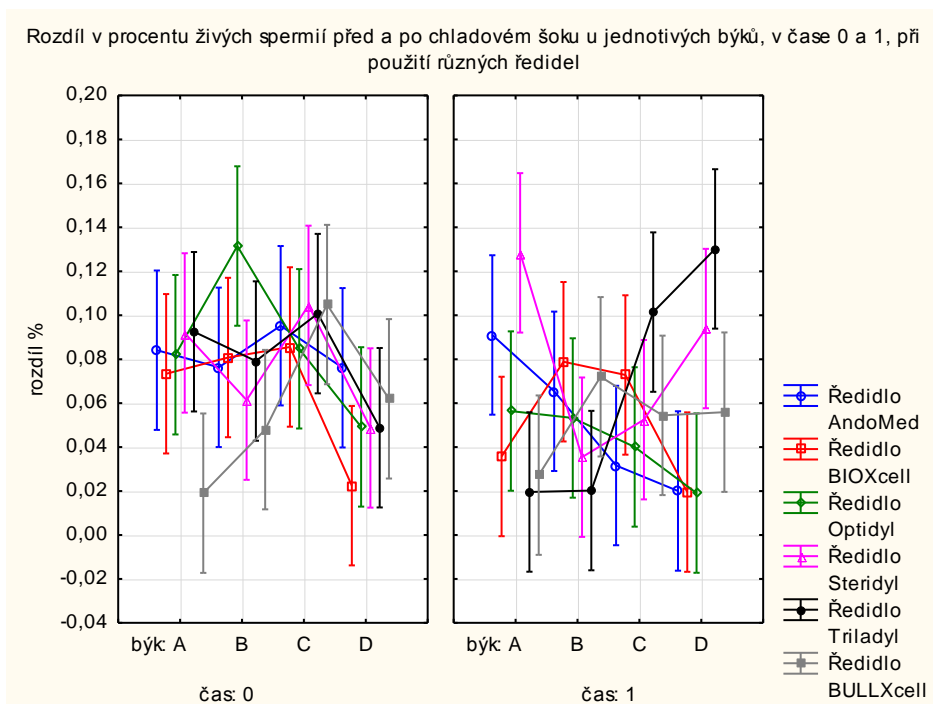
Graf 17: Procento živých spermií u jednotlivých býků ejakulátu při použití různých ředidel (čas 1)



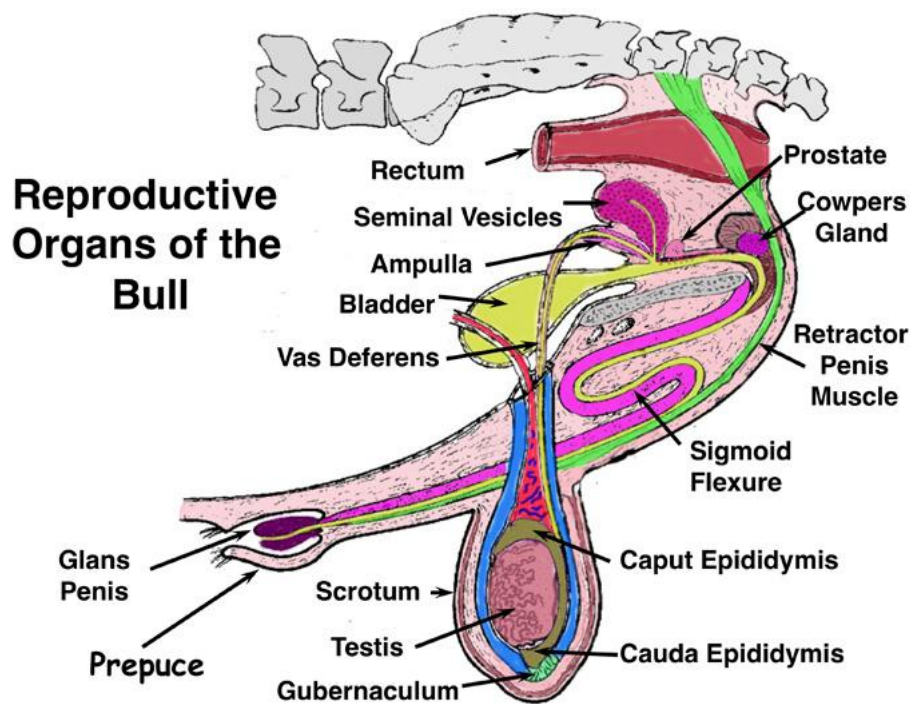
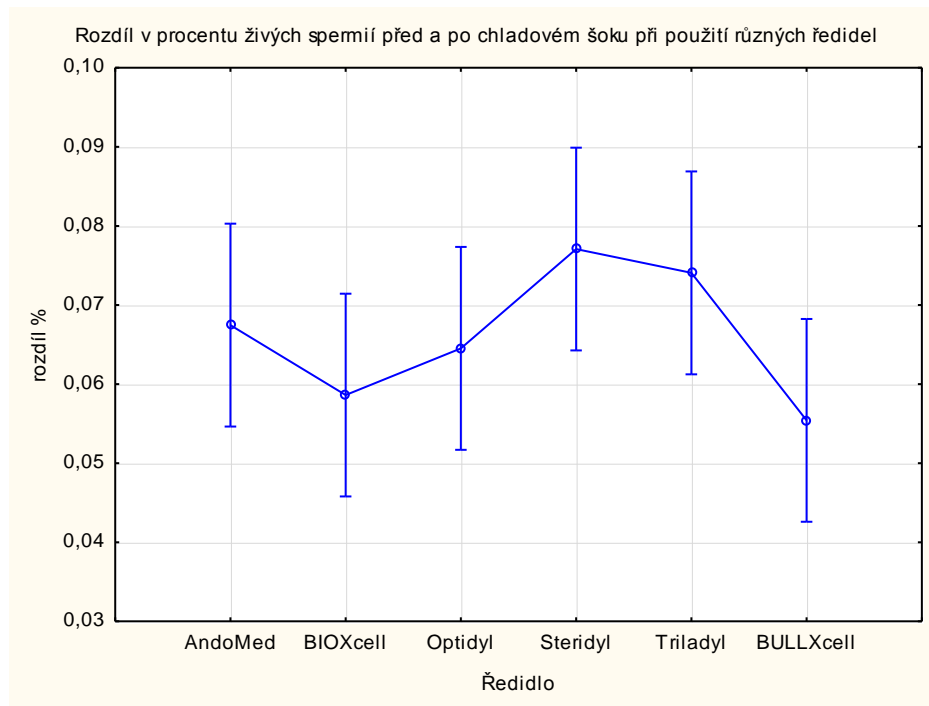
Graf 18: Porovnání procenta živých spermií při použití různých ředidel



Graf 19: Rozdíl v procentu živých spermií před a po chladovém šoku u jednotlivých býků, v čase 0 a 1, při použití různých ředidel

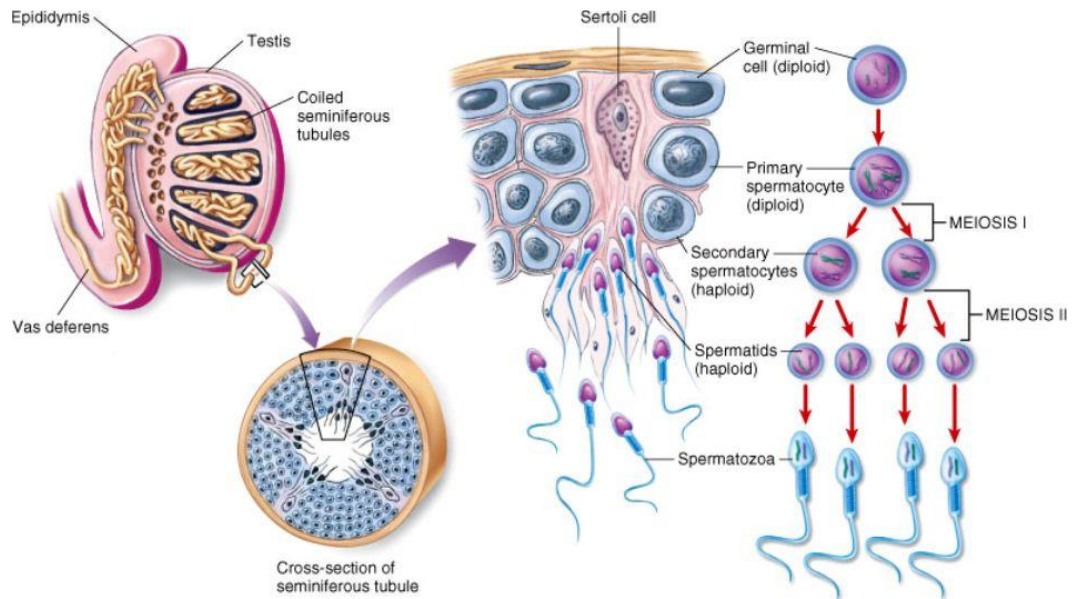


Graf 20: Rozdíl v procentu živých spermií před a po chladovém šoku při použití různých ředidel



Obr. 1: Pohlavní soustava býka

< http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lec/lec3_male_anat/lec3diag.html >



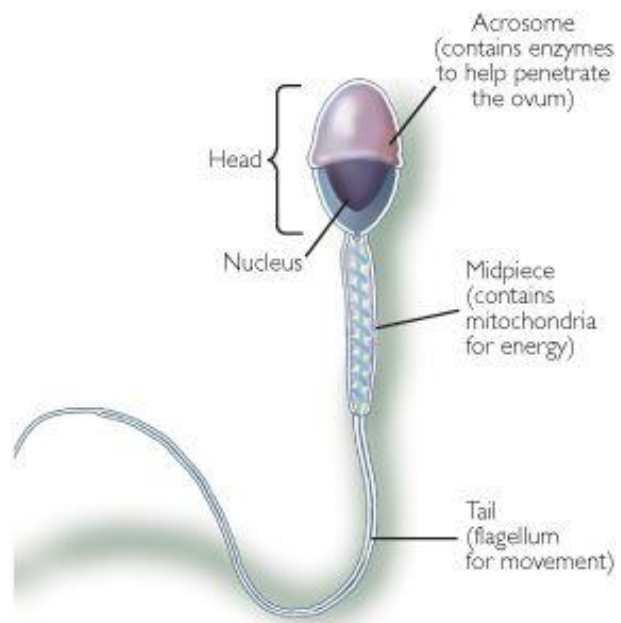
Obr. 2: Spermatogeneze

< <http://bio1100.nicerweb.com/Locked/media/ch31/> >



Obr. 3: Spermie býka

< http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/procedures/sperm/bull_morp/bull_morphology.html >



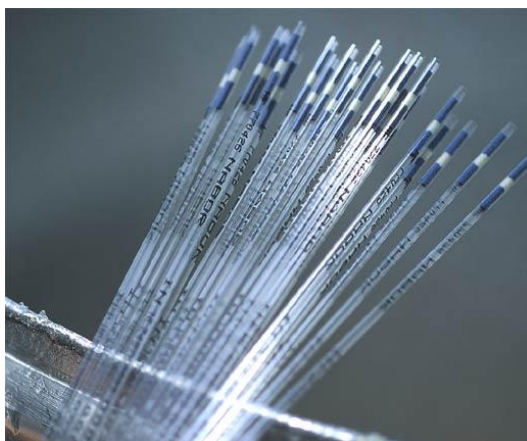
Obr. 4: Morfologie spermie

<http://www.answers.com/topic/sperm>



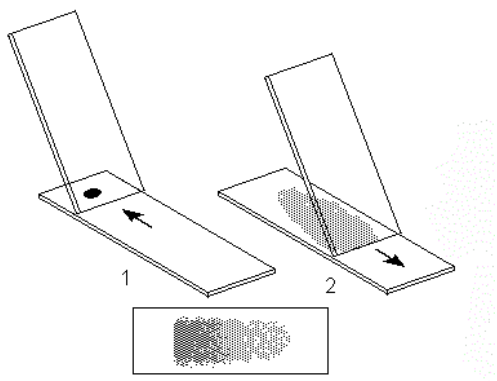
Obr. 5: Odběr ejakulátu u býka

< <http://www.totallycoolpix.com/2013/04/at-the-bull-sperm-bank/> >



Obr. 6: Pejety

<http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/misc/project_websites_07/tue07/rabbit_and_i/Artificial%20Insemination.html>



Obr. 7: Roztěr

<<http://www.lab-turnov.cz/index.php?page=odbery/odbery7>>



Obr. 8: Spermie nabarvené eosinem a nigrosinem

<<http://www.thepigsite.com/articles/2596/quality-control-of-extended-boar-semen>>